



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Carolina Bezerra Bussoli

Expressão heteróloga de celulases de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli* com a caracterização e purificação das enzimas produzidas

São José do Rio Preto
2016

Carolina Bezerra Bussoli

Expressão heteróloga de celulases de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli* com a caracterização e purificação das enzimas produzidas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto
2016

Carolina Bezerra Bussoli

Expressão heteróloga de celulases de *Myceliophthora heterothallica*
F.2.1.4 em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli* com a caracterização e
purificação das enzimas produzidas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
USP – São Paulo

Prof. Dr. Mario Tyago Murakami
UNICAMP– Campinas

Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Aliandra Maura Gibertoni Malaman
UNESP – Jaboticabal

São José do Rio Preto
2016

“Sem Sonhos,

*As perdas se tornam insuportáveis, as pedras no caminho se tornam montanhas,
Os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas se você tiver grandes
sonhos...*

*Seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades,
Seus medos produzirão coragem. Por isso, nunca desista de seus sonhos!”*

(Augusto Cury)

Dedico:

*Ao meu marido, Mário, por todo apoio,
compreensão e respeito ao meu trabalho. Acima
de tudo por todo amor e dedicação*

*Aos meus pais, Fernando e Áurea, pelo amor e
dedicação, pelos ensinamentos e exemplos que
serão levados comigo durante toda minha vida.*

*Às amigas sinceras que sempre estarão em
meu coração...*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter iluminado meu caminho, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Eleni Gomes, pela confiança depositada, pela sua valiosa orientação e, pelo carinho e paciência em me receber e ajudar todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, por me receber em seu laboratório desde o início da minha carreira e pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Jose Henrique Pereira, pela orientação durante o estágio no exterior e por todo aprendizado adquirido.

To Dr. Paul D. Adams, thank you for accepting me as research scholar in the Crystallography group, and for giving me all the support during my work at Lawrence Berkeley National Laboratory and Joint BioEnergy Institute.

Aos professores Prof. Dr. Henrique Ferreira e Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez, pelos seus ensinamentos e, pela contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os funcionários da Seção de Pós-graduação do Instituto, pela atenção e eficiência.

Aos colegas do laboratório Ariane, Ana Lúcia, Andréia, Diego, Erick, Erik, Fabiana, Gabriela, Gisele, Josiani, Isabel, Maria Cecília e Pedro Lucas pelos agradáveis momentos, incentivos, conversas e pelas muitas contribuições nas dúvidas.

Aos antigos amigos de laboratório e atuais professores de universidades: Profa. Dra. Carolina Merheb Dini, Profa. Dra. Ellen Lago, Profa. Dra. Milla Baffi, vocês são exemplos a serem seguidos.

A minha amiga e parceira de trabalho Márcia, pela amizade e pelos conselhos sábios profissionais e pessoais.

A minha amiga irmã Marina, por estar sempre presente na minha vida, pelo carinho e atenção nos momentos mais difíceis.

A minha amiga Júlia, por termos nos encontrado e por trazer alegria aos dias em que estávamos tão longe de pessoas queridas.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela estrutura e oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo 2012/00506-9).

À CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro.

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu marido que me apoiou durante todo o trabalho e incentivou cada decisão tomada, me escutando e aconselhando com muita paciência nesses últimos anos.

Enfim,

À todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA

RESUMO

Os microrganismos termofílicos são de grande interesse biotecnológico, não apenas por tolerar altas temperaturas, mas também por secretarem proteínas de maior estabilidade, com características bioquímicas e estruturais importantes de múltiplas aplicações na indústria. A linhagem do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, isolada de camas de frango, apresentou alta atividade da enzima β -1,4-endoglucanase (31 U/ml). O gene codificante da β -1,4-endoglucanase de F.2.1.4 foi identificado e expresso em leveduras *Pichia pastoris* e em bactéria *Escherichia coli*. A caracterização do gene permitiu identificar esta enzima como membro da família glicosídeo hidrolase 5 (GH5), nomeada neste estudo como Mh_GH5. A enzima apresenta na região N-terminal um módulo de ligação ao substrato (CBM) pertencente a família 1. As enzimas expressas em *P. pastoris* e em *E. coli* foram purificadas e submetidas à caracterização bioquímica. A caracterização bioquímica demonstrou que as enzimas recombinantes apresentaram ótimos de temperatura de 55°C (*P. pastoris*) e 60°C (*E. coli*) e pH ótimo de 4,0 para ambos os sistemas heterólogos. A análise da estabilidade das enzimas demonstrou que as enzimas expressas por *Pichia pastoris* apresentaram-se estáveis em temperaturas mais elevadas (70°C), indicando que a glicosilação teria papel essencial na termoestabilidade de enzimas recombinantes. A determinação estrutural em alta resolução foi realizada para o domínio catalítico desta nova β -1,4-endoglucanase GH5 de *M. heterothallica* expressa em *E. coli*. A estrutura foi determinada à 1.1 Å e apresenta uma arquitetura frequentemente encontrada dentre os membros da família de GH5, $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel. Os dados obtidos neste estudo podem contribuir para a determinação de características envolvidas na termoestabilidade de enzimas provenientes de organismos termofílicos e, conseqüentemente na obtenção de biocatalisadores eficientes na conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis ou compostos químicos biossintetizados.

Palavras-chave: Endoglucanase. *Pichia pastoris*. *Myceliophthora heterothallica*.

ABSTRACT

Thermophilic microorganisms have gain attention in the last years because of the biotechnological interest. Essentially these organisms secrete thermostable proteins displaying suitable features, such as biochemical and structural, for industrial platforms. The thermophilic fungus Myceliophthora heterothallica F.2.1.4, isolated from poultry litter, showed high activity for β -1,4-endoglucanase (31 U/ml). A new sequence encoding for glycoside hydrolase was identified and expressed in Pichia pastoris and Escherichia coli. Sequence analysis allowed to classify this new β -1,4-endoglucanase as a member of the glycoside hydrolase 5 (GH5). The enzyme, named Mh_GH5, has N-terminal family 1 carbohydrate binding module (CBM1). The recombinant enzymes expressed in Pichia pastoris and Escherichia coli were purified and subjected to biochemical characterization. Recombinant endoglucanases showed optimal temperature of 55°C (P. pastoris) and 60°C (E. coli) and optimal pH of 4,0 for both heterologous systems. The thermostability of these new enzymes were evaluated and demonstrated that post-translational modifications, such as glycosylation, found on Pichia pastoris heterologous enzymes, contributed to higher thermostability. Structural analysis of the catalytic domain of the new GH5 from M. heterothallica expressed in E. coli was solved at 1.1 Å resolution and shows a common $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel fold found in members of GH5 family. Based on the biochemical and structural information we have obtained for Mh_GH5 it is possible to suggest potential features involved in the thermostability of proteins from thermophilic microorganisms and might contribute for the development of new efficient biocatalysts required for biomass conversion to bioethanol and/or chemicals.

Keywords: Endoglucanase. Pichia pastoris. Myceliophthora heterothallica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural da organização de materiais lignocelulósicos (Figura adaptada de LOQUÉ <i>et al.</i> , 2015).....	27
Figura 2. (a) Polímero de celulose (Sandgren et al, 2005) e (b) regiões amorfas e cristalinas da celulose (FESTUCCI-BUSELLI <i>et al.</i> , 2007) com modificações.....	30
Figura 3. Monossacarídeos encontrados nos heteropolissacarídeos de hemicelulose Adaptada de FENGEL E WEGENER, 1989.....	32
Figura 4. Precursores primários das ligninas: I – álcool p-cumarílico, II – álcool coniferílico e III – álcool sinapílico (PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993).....	33
Figura 5. Estrutura proposta para lignina de madeira moída do <i>Eucalyptus grandis</i> (PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993).....	34
Figura 6. Modo de ação sinérgico de celulases. Figura adaptada de JUTURU E WU, 2014 e Harris et al., 2014.....	36
Figura 7. Estrutura do cristal de endoglucanase de <i>T. aurantiacus</i> (PDB ID: 1GJZH) mostrando a arquitetura de barril (β/α) ₈ , estrutura regular e compacta com loops curtos. Figura adaptada de JUTURU E WU, 2014.....	39
Figura 8. Estrutura de exoglucanase de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PDB ID: 1GPI). A proteína tem estrutura de β -jelly roll formada por duas grandes folhas β antiparalelas. Figura adaptada de Juturu e Wu (2014).....	40
Figura 9. Estrutura do cristal de uma β -glicosidase A de <i>B. polymyxa</i> (PDB ID: 1BGA) com uma conformação octamérica. Figura Adaptada de JUTURU E WU, 2014.....	42

Figura 1.1. Diagrama esquemático do vetor pGEM-T (Promega).....	49
Figura 1.2. Diagrama esquemático do vetor pPIC9 (Invitrogen).....	50
Figura 1.3. Curva de produção da enzima endoglucanase (CMCase) produzida pelo fungo termofílico <i>Myceliophthora heterothallica</i> linhagem F.2.1.4 cultivado sob fermentação semi-sólida.....	54
Figura 1.4. Curva de produção da enzima β -glicosidase produzida pelo fungo termofílico <i>Myceliophthora heterothallica</i> linhagem F.2.1.4 cultivado sob fermentação semi-sólida.....	55
Figura 1.5. Curva de produção da enzima FPase produzida pelo fungo termofílico <i>Myceliophthora heterothallica</i> linhagem F.2.1.4 cultivado sob fermentação semi-sólida.....	56
Figura 1.6. a) RNA contaminado com DNA genômico. b) RNA após o tratamento com a DNase I, intacto e sem contaminação.....	58
Figura 1.7. Amplificação do gene da endoglucanase Mh_GH5 a partir do cDNA por PCR. M: marcador 1kb (Fermentas); 1: Amplicon; B: controle da reação de PCR.....	58
Figura 1.8. Alinhamento da sequência de aminoácidos da β -1,4-endoglucanase de <i>M. heterothallica</i> (Mh_GH5) com as sequência de aminoácidos disponíveis no banco de dados GenBank NCBI (XP_003659014.1), indicando a proteína pertenceria a família GH5 com um CBM-1. Figura adaptada do GenBank NCBI.....	60
Figura 1.9. Análise dos sítios de restrição encontrados na sequência de nucleotídeos de Mh_GH5 de <i>M. heterothallica</i> isolada.....	60
Figura 1.10. Amplificação do gene da endoglucanase de <i>M. heterothallica</i> dos clones de <i>E. coli</i> DH5 α contendo o vetor pGEM-T + Mh_GH5, para a confirmação e controle da	

clonagem. M: marcador de massa molecular 1kb (Fermentas), 1-4: clones selecionados e B: controle da reação de PCR.....62

Figura 1.11. Restrição do vetor de clonagem pGEM-T com as enzimas EcoRI e NotI para a liberação do inserto de interesse (~1200 pb) contendo a ORF referente a β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica*. M: marcador de massa molecular 1kb (Fermentas); 1 e 2 pGEM-T tratado com as enzimas de restrição; C: controle da digestão – pGEM-T não tratado com as enzimas de restrição.....62

Figura 1.12. Amplificação do gene da endoglucanase de *M. heterothallica* dos clones de *E. coli* DH5 α contendo o vetor pPIC9-Mh_GH5, para a confirmação e controle da clonagem. M: marcador de massa molecular 1kb (Fermentas), 1-8: clones selecionados e C: controle da reação de PCR.....63

Figura 1.13. Halos de hidrólise evidenciados pela coloração com *Congo Red* nos três transformantes de *Pichia pastoris* expressando o gene da β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica*.....64

Figura 1.4. Diagrama esquemático do vetor pJ911 (DNA 2.0[®]).....66

Figura 1.15. Screening em placa em meio MM+CMC (1%) para observação dos halos de hidrólise. A) Mutantes expressando a construção pJ911-Mh_GH5-CBM1; B) Mutantes expressando a construção pJ911-Mh_GH5-CD.....72

Figura 1.16. SDS-PAGE dos níveis de expressão da proteína expressa Mh_GH5-CBM1, a 28°C, em meio BMMY, 120h. MW: marcador de massa molecular, -: poço sem amostra, 0h – 120h: tempos de expressão amostrados para análise dos níveis de expressão..... 73

Figura 1.17. SDS-PAGE dos níveis de expressão da proteína expressa Mh_GH5-CD, a 28°C, em meio BMMY, 120h. MW: marcador de massa molecular, 0h – 120h: tempos de expressão amostrados para análise dos níveis de expressão.....73

Figura 1.18. A) Cromatograma da purificação HisTap™ HP. B) Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CBM1 por cromatografia de afinidade em SDS-PAGE. MW: marcador de massa molecular; Load: amostra injetada; Flow: “flow through, 11-16: frações analisadas.....	75
Figura 1.19. A) Cromatograma da purificação HisTap™ HP. B) Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CD por cromatografia de afinidade em SDS-PAGE. MW: marcador de massa molecular; Load: amostra injetada; Flow: “flow through, 11-16: frações analisadas.....	76
Figura 1.20. Efeito da temperatura na atividade enzimática das enzimas recombinantes de <i>M. heterothallica</i> utilizando CMC como substrato. As análises foram realizadas em duplicata.....	77
Figura 1.21. Efeito do pH na atividade das enzimas recombinantes de <i>M. heterothallica</i> utilizando CMC como sbstrato. As análises foram realizadas em duplicata.....	78
Figura 1.22. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> . As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.....	79
Figura 1.23. Termoestabilidade das enzimas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> mantidas à 70°C. As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.....	80
Figura 1.24. Efeito do pH na estabilidade das proteínas recombinantes expressas em <i>Pichia pastoris</i>	59
Figura 2.1. Mapa do vetor de expressão pSKB3 associado ao gene de interesse Mh_GH5 - gerado para ambas as construções Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD.....	81

Figura 2.2. Alinhamento da sequência de aminoácidos de Mh_GH5 (“full-length”) com três β -1,4-endoglucanases pertencentes à família GH5 utilizando o programa ClustaW. As sequências foram denominadas como: Ta_GH5 – *Thermoascus aurantiacus* (PDB ID: 1GZJ); Cc_GH5 – *Clostridium cellulolyticum* (PDB: 1EDG); Tm_GH5 – *Thermotoga marítima* (PDB: 3MMW). Os resíduos idênticos estão destacados em vermelho. Resíduos catalíticos, resíduos conservados para membros de GH5 e sítios potenciais de glicosilação estão identificados pelos símbolos: & - * - # , respectivamente.....98

Figura 2.3. SDS-PAGE dos níveis de expressão das proteínas recombinantes Mh_GH5 testadas a 20°C, 30°C e 37°C em meio de cultura “Terrific Broth” - TB. M: molecular weight markers, I: frações insolúveis , S: frações solúveis.....100

Figura 2.4. SDS-PAGE dos níveis de expressão das proteínas recombinantes Mh_GH5 testadas a 20°C, 30°C e 37°C em meio de cultura Luria Bertani - LB. M: molecular weight markers, I: frações insolúveis , S: frações solúveis.....100

Figura 2.5. SDS-PAGE referente à otimização da expressão das endoglucanases recombinantes de *M. heterothallica*. M: molecular weight marker; C1I, Mh_GH5-CBM1 fração insolúvel; C1S, Mh_GH5-CBM1 fração solúvel; C2I, Mh_GH5-CD fração insolúvel; C2S, Mh_GH5-CD fração solúvel.....101

Figura 2.6. A. Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CD por cromatografia de afinidade de em SDS- PAGE. M: molecular weight marker; I: fração insolúvel, Lo: amostra injetada – extrato inicial, Fl: “flow through”, B11 – B6, frações analisadas. B. Cromatograma da purificação HisTrap™ HP.....102

Figura 2.7. A. Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CD por cromatografia de afinidade de em SDS- PAGE. M: molecular weight marker; I: fração

insolúvel, Lo: amostra injetada – extrato inicial, Fl: “flow through”, B11 – B7, frações analisadas. B. Cromatograma da purificação HisTrap™ HP.....	102
Figure 2.8. Análise SDS-PAGE da enzima recombinante Mh_GH5-CD purificada após a remoção da “His-tag”. M: molecular weight marker; UnD: Mh_GH5-CD não tratada com a protease TEV; D: Mh_GH5-CD após o tratamento com a protease TEV.....	103
Figura 2.9. Fotomicrografia do cristal de Mh_GH5-CD obtido na condição de cristalização 0.03M ácido cítrico, 0.07M Bis-Tris propano pH 7,6 e 20% Polietileno glicol 3350.....	104
Figure 2.10. Fotomicrografia do cristal de Mh_GH5-CD obtido na condição de cristalização 2% Tascimate pH 7,0, 0.1M HEPES pH 7,5 e 20% Polietileno glicol 3350.....	105
Figure 2.11. Fotomicrografia de cristais de Mh_GH5-CD após a remoção da cauda de histidina “His-tag” em diferentes condições de cristalização. (1) 0.2M acetato de amônio, 0.1M Tris pH 7,5, 25% PEG 3350; (2) 0.8M potássio sódio tratrato tetra-hidratado, 0.1M Tris pH 8,5, 0.5% Polietileno glicol monometil éter 5000; (3) 0.2M cloreto de sódio, 0.1M Tris:HCl pH 8,5 e 25% PEG 3350.....	105
Figura 2.12. Estrutura da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CD. Mh_GH5-CD apresenta-se em domínio único, referente ao domínio catalítico, com arquitetura (β/α)8 <i>TIM-barrel</i> . As oito folhas β paralelas, representadas em amarelo, criam uma estrutura chamada de β - <i>barrel</i> no interior da proteína Mh_GH5, envolta por oito α -hélices representadas em magenta. N – amino-terminal (N-terminal); C – carboxi-terminal (C-terminal).....	108
Figura 2.13. Representação do modo de ligação ao substrato e Representação da superfície molecular de Mh_GH5-CD. A. Mh_GH5-CD ligada à moléculas de celobiose (CBI). B. Duas moléculas de celobiose foram observadas nesta estrutura. A molécula de	

celobiose apresentada em amarelo ocupa os sub-sítios -3 ao -2 e a molécula de celobiose demonstrada em verde ocupa os sub-sítios +1 a +2.....	109
Figura 2.14. Estrutura de Mh_GH5-CD destacando-se os resíduos catalíticos ácido/base e nucleófilo, Glu216 e Glu323, respectivamente. Três resíduos estritamente conservados dentre os membros da família de glicosídeo hidrolases 5 (GH5) foram identificados, Arg132, Asn215 e Trp356.....	110
Figura 2.15. Superposição das estruturas de Mh_GH5-CD (azul) e Cc_Cel5A (vermelho) demonstrando os “loops” diminuídos na proteína termofílica.....	111
Figura 2.16. Efeito da temperatura na atividade enzimática das enzimas recombinantes de <i>M. heterothallica</i> utilizando CMC como substrato. As análises foram realizadas em duplicate.....	113
Figura 2.17. Efeito do pH na atividade enzimática das enzimas recombinantes de <i>M. heterothallica</i> utilizando CMC como substrato. As análises foram realizadas em duplicata.....	114
Figura 2.18. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas recombinantes de <i>Escherichia coli</i> . As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.....	115
Figura 2.19. Análise SDS-PAGE das enzimas recombinantes expressas em sistema <i>Pichia pastoris</i> e <i>E. coli</i> , demonstrando glicosilação da enzimas provenientes do sistema eucarioto de <i>P. pastoris</i> . A) Mh_GH5-CBM1 expressa em <i>P. pastoris</i> e <i>E. coli</i> . MW: marcador de massa molecular; 1: Mh_GH5-CBM1 expressa em <i>P. pastoris</i> ; 2: Mh_GH5-CD expressa em <i>P. pastoris</i> e <i>E. coli</i> . MW: marcador de massa molecular; 1: Mh_GH5-CD expressa em <i>P. pastoris</i> ; 2: Mh_GH5-CD expressa em <i>E. coli</i>	116

Figura 2.20. Termoestabilidade das enzimas recombinantes de <i>Escherichia coli</i> mantidas à 70°C. As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.....	117
Figura 2.21. Efeito do pH na estabilidade das proteínas recombinantes expressas em <i>Escherichia coli</i>	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de alguns materiais lignocelulósicos. Adaptada de Castro e Pereira, 2010).....	25
Tabela 1.1. Vetores utilizados em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	48
Tabela 1.2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene da endoglucanase Mh_GH5.....	50
Tabela 1.3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene da endoglucanase contendo sítios de restrição e His-tag.....	50
Tabela 1.4. Vetores utilizados em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	65
Tabela 1.5. Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos sobre a atividade das endoglucanases heterólogas expressas em <i>Pichia pastoris</i> . A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos agentes.....	83
Tabela 2.1. Linhagens de <i>E. coli</i> e plasmídeos utilizados.....	69
Tabela 2.2. Estatística da coleta de dados e refinamento da estrutura de Mh_GH5-CD.....	87
Tabela 2.3. Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos sobre a atividade das endoglucanases heterólogas expressas em <i>E. coli</i> . A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos agentes.....	120
Tabela 2.4. Parâmetros cinéticos determinados para as enzimas recombinantes de <i>Escherichia coli</i>	121

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
cm	Centímetros
CBD	Domínio de ligação à celulose
CBM	Módulo de ligação à celulose
CMC	Carboximetilcelulose
DC	Domínio catalítico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
g	Gramas
GH5	Glicosídeo hidrolase família 5
G418	Geneticina
°C	Graus Celsius
J	Joules
M	Molar
mM	Milimolar
mg/mL	Relação de concentração miligramas por mililitro
Mh_GH5	Endoglucanase do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i>
µL	Microlitros
µmol	Micromol
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
OD₆₀₀	Densidade Óptica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
pNPG	p-nitro-fenil-β-D-glicopiranosídeo
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1. Introdução.....	23
2. Revisão Bibliográfica.....	25
2.1. Biomassa Lignocelulósica.....	25
2.2. Celulose.....	28
2.3. Hemicelulose.....	30
2.4. Lignina.....	32
2.5. Enzimas Celulolíticas.....	34
2.5.1. Celulases.....	34
2.5.2. Classificação CAZY.....	37
2.6. Estrutura de celulases.....	37
2.6.1. Endoglucanases.....	38
2.6.2. Exoglucanases.....	39
2.6.3. β -glucosidases.....	41
2.7. Hidrólise de materiais do complexo celulósico.....	42
3. Objetivos.....	44
Capítulo 1	45
Resumo.....	46
1. Materiais e Métodos	47
1.1. Análise da produção de celulases pela linhagem <i>M. heterothallica</i> F.2.1.4.....	47
1.1.1. Cultura do fungo filamentoso <i>M. heterothallica</i> para a produção de celulases.....	47
1.1.2. Análise da atividade de celulases produzida pelo fungo termofílico <i>M. heterothallica</i> F.2.1.4.....	47
1.2. Clonagem e Expressão da endoglucanase de <i>M. heterothallica</i> em <i>Pichia pastoris</i>	48
1.2.1. Linhagens de microrganismos e plasmídeos.....	48
1.2.2. Extração de RNA total e obtenção do cDNA de Mh_GH5.....	50
1.2.3. Construção do plasmídeo de expressão.....	51
1.2.4. Análise da sequência.....	52

1.2.5. Transformação de <i>P. pastoris</i> , Seleção dos clones e Screening em placa.....	53
2. Resultados Iniciais do Trabalho.....	53
2.1. Análise da produção de celulasas pela linhagem <i>M. heterothallica</i>	
F.2.1.4.....	53
2.2. Extração de RNA total e obtenção do cDNA de Mh_GH5.....	57
2.3. Clonagem do gene Mh_GH5 e Sequenciamento.....	58
2.4. Construção do vetor de expressão induzida.....	61
2.5. Transformação de <i>P. pastoris</i> e detecção da atividade endoglucanásica.....	63
3. Etapa 2: Clonagem e expressão da endoglucanase (Mh_GH5) de <i>M. heterothallica</i> em <i>P. pastoris</i> X-33.....	64
3.1. Material e métodos.....	65
3.1.1. Clonagem e Expressão da endoglucanase de <i>M. heterothallica</i> em <i>P. pastoris</i> X-33.....	65
3.1.1.1. Linhagens de Microrganismos e plasmídeos.....	65
3.1.1.2. Construção do vetor de expressão induzida.....	67
3.1.1.3. Transformação de <i>P. pastoris</i> , Seleção dos clones e Screening em placa.....	67
3.1.1.4. Indução da expressão heteróloga da endoglucanase de <i>M. heterothallica</i> em <i>P. pastoris</i>	69
3.1.1.5. Caracterização Bioquímica das enzimas recombinantes.....	70
3.1.1.6. Quantificação da concentração de açúcares redutores.....	71
3.2. Resultados e Discussão.....	71
3.2.1. Transformação de <i>P. pastoris</i> , Seleção dos clones e Screening em placa.....	71
3.2.2. Caracterização Bioquímica das endoglucanases recombinantes de <i>M. heterothallica</i>	77
4. Conclusão.....	85
Capítulo 2.....	86
Resumo.....	87
1. Material e métodos.....	88
1.1. Linhagens de microrganismos, plasmídeos e reagentes químicos.....	88
1.2. Clonagem do cDNA da enzima GH5 do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i>	
F.2.1.4.....	89

1.3. Análise da sequência.....	89
1.4. Expressão heteróloga da endoglucanase de <i>M. heterothallica</i> em <i>Escherichia coli</i>	90
1.5. Otimização da produção das endoglucanases recombinantes de <i>M. heterothallica</i> e Purificação.....	92
1.6. Testes de Cristalização.....	93
1.7. Coleta de dados utilizando radiação síncrotron e Análise estrutural.....	94
1.8. Caracterização Bioquímica das Enzimas Recombinantes.....	95
1.9. Quantificação da concentração de açúcares redutores.....	96
2. Resultados e Discussão	96
2.1. Análise da Sequência.....	96
2.2. Expressão heteróloga da endoglucanase de <i>M. heterothallica</i> em <i>E. coli</i> e Purificação das enzimas recombinantes.....	99
2.3. Remoção da cauda de histidina – His-tag.....	103
2.4. Testes de Cristalização.....	103
2.5. Estrutura da proteína Mh_GH5-CD.....	106
2.6. Termoestabilidade.....	110
2.7. Caracterização Bioquímica Parcial das endoglucanases recombinantes de <i>M. heterothallica</i>	113
3. Conclusão	122
Referências.....	124

1. INTRODUÇÃO

As incertezas das fontes de combustíveis fósseis, preocupações sobre o clima e, poluição ambiental tem gerado grande interesse em combustíveis renováveis e produtos químicos bio-derivados da biomassa lignocelulósica (CHEN *et al.*, 2013).

A celulose é a fonte de carbono renovável mais abundante no planeta e, portanto, tem o potencial de suprir a demanda mundial de combustíveis associados ao transporte; a energia solar armazenada na biomassa está estimada em cerca de dois mil Exajoules (10^{18} J) por ano, dez vezes maior do que o conteúdo de energia de produção anual de petróleo do mundo (CHEN *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de plataformas eficazes para a produção de biocombustíveis tem ganhado cada vez mais força ao longo da última década. Dentre as etapas críticas deste processo, a conversão da biomassa celulósica em açúcares fermentescíveis, é um dos temas de grande investimento na pesquisa mundial com a exploração da biologia sintética para a produção de celulasas e glicosídeo hidrolases no melhoramento ou substituição dos organismos nativos (GARVEY *et al.*, 2013).

Neste âmbito de pesquisas surge a expressão heteróloga de celulasas em leveduras, que vêm se tornando sistemas frequentemente encontrados, mesmo em escala industrial. Leveduras são sistemas adequados para a hiperexpressão de enzimas celulolíticas de fungos e bactérias. Muitas destas linhagens foram desenvolvidas para o uso na indústria de biocombustíveis, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* e *Kluyveromyces marxianus* (GARVEY *et al.*, 2013).

Dentre estas, a levedura *Pichia pastoris* apresentou progressos substanciais nos últimos anos, com a expressão de tipos enzimáticos únicos, como celulasas e xilanases, pertencentes a vários organismos sendo que estas enzimas foram expressas em alta

concentração mantendo atividade e estabilidade comparáveis às formas nativas (GARVEY *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2012; BEY *et al.*, 2011; HUY *et al.*, 2011).

Além do sistema de expressão em leveduras, o sistema de expressão heteróloga em bactérias continua sendo uma alternativa atrativa devido à sua habilidade de crescimento rápido, alta densidade celular, utilizando substratos economicamente viáveis. Enzimas heterólogas têm sido expressas em *Escherichia coli* (*E. coli*), Bacilli (i.e. *Bacillus subtilis*) e bactérias lácteas (i.e. *Lactobacillus lactis*). Entretanto, devido ao genoma estar bem caracterizado e a variedade de linhagens e instrumentos disponíveis para manipulação genética, *E. coli* se tornou o sistema mais comum a ser utilizado para a produção de proteínas recombinantes (LIU *et al.*, 2013).

Os fungos termofílicos são aceitos atualmente como o grupo produtor mais eficiente de celulasas termoestáveis para a degradação da biomassa celulósica (BHALLA *et al.*, 2013). Entretanto, devido à produção ser insuficiente para a hidrólise completa deste material e a capacidade de purificação e caracterização serem complicadas pela presença de outras enzimas de atividades similares, se torna vantajoso a clonagem e expressão de genes codificantes de uma enzima hidrolítica individual, como endoglucanase, em um hospedeiro heterólogo (HUY *et al.*, 2011)

Assim, o presente trabalho tem como objetivo a identificação e isolamento do gene codificante de uma β -1,4-endoglucanase pertencente ao fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e sua superexpressão em leveduras *Pichia pastoris* e em bactéria *E. coli*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa Lignocelulósica

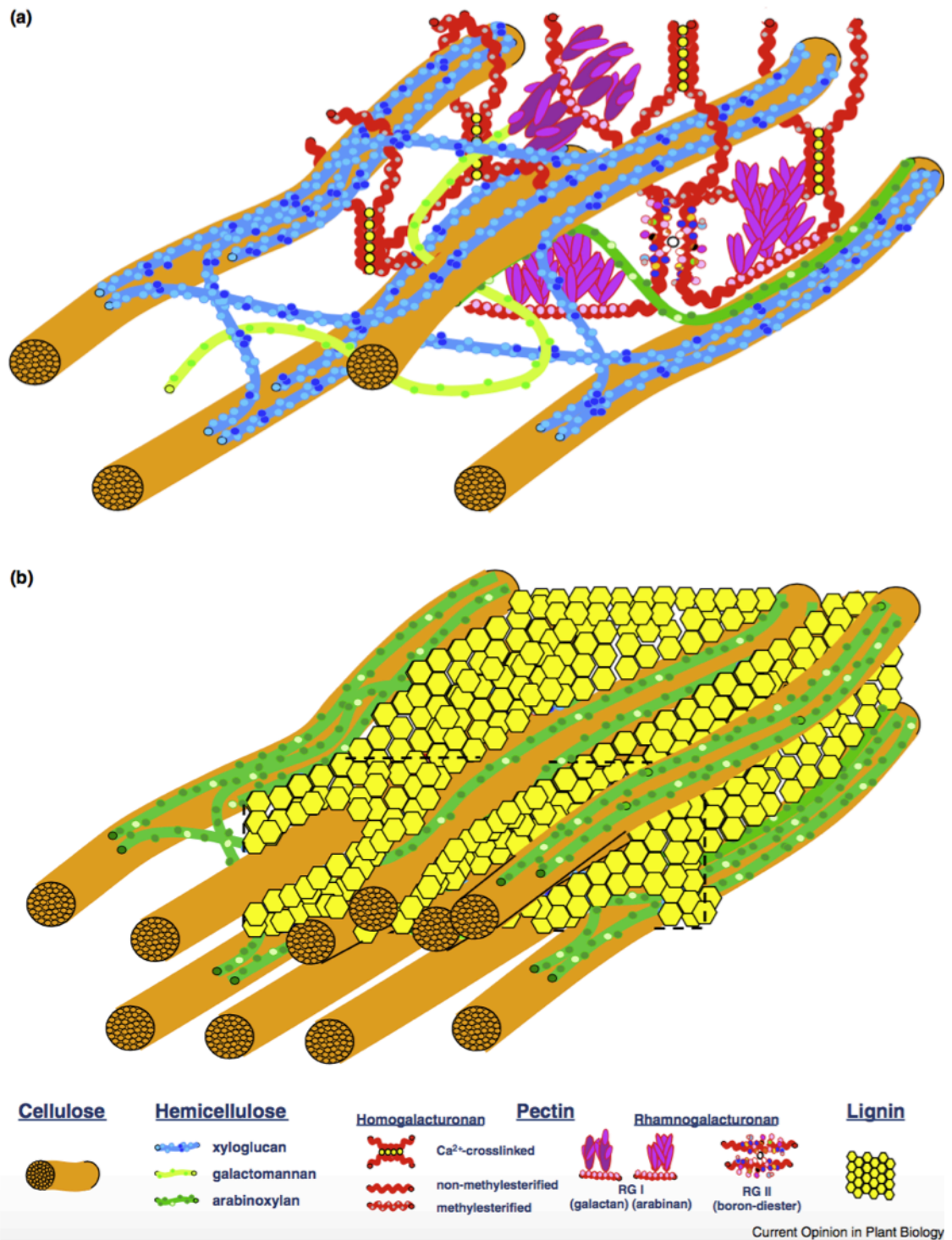
É o material mais abundante em nosso planeta, o que o torna atrativo para a produção de biocombustíveis como o bioetanol. Constitui-se basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 1), incluindo pequenas porcentagens de outros componentes como lipídeos, proteínas, extrativos, açúcares simples, amido, água e cinzas (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006). A figura 1 demonstra a estrutura molecular dos principais componentes do complexo lignocelulósico.

Tabela 1. Composição de alguns materiais lignocelulósicos. Adaptada de CASTRO E PEREIRA, 2010)

Material	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Bagaçõ de cana (<i>Saccharum officinarum</i>)	36	28	20
Palha de cana	36	21	16
Palha de milho (<i>Zea mays</i>)	36	28	29
Sabugo de milho	36	28	NR*
Palha de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	39	36	10
Palha de cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	44	27	7
Farelo de cevada	23	33	21
Palha de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	33	26	7
Casca de arroz	36	20	19
Palha de aveia (<i>Avena sativa</i>)	41	16	11
Palha de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	42	12	15
Casca de amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	38	36	16
Abeto de Douglas (<i>Pseudotsuga menziessi</i>)	50	18	28
Pinheiro (<i>Pinus</i> sp.)	44	26	29
Salgueiro (<i>Salix alba</i>)	37	23	21
Capim elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>)	32	20	9
Resíduos sólidos municipais	33	9	17
Papel	43	13	6
Papelão	47	25	12
Jornal	62	16	21

*NR: Valores não reportados

Figura 1. Representação estrutural da organização de materiais lignocelulósicos (Figura adaptada de LOQUÉ *et al.*, 2015).



Analisando a estrutura molecular deste complexo, observa-se que seus componentes encontram-se arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose estão afixadas pela lignina, que foi desenvolvida ao longo da evolução para proteger a planta de ataques externos (PANDEY *et al.*, 2000).

Com uma estrutura compacta como esta, o ataque enzimático fica dificultado para a hidrólise dos polissacarídeos impossibilitando a liberação de açúcares fermentescíveis, tornando indispensável um tratamento prévio da biomassa lignocelulósica para viabilizar a hidrólise enzimática.

Os pré-tratamentos podem ser de natureza mecânica ou química. Com esses tratamentos pode-se atingir a estrutura celular, reduzindo a cristalinidade da celulose, promovendo a quebra da lignina e, conseqüentemente possibilitando a hidrólise enzimática (CASTRO E PEREIRA, 2010).

Os polissacarídeos após os pré-tratamentos podem ser hidrolisados a açúcares fermentescíveis por hidrólise química ou enzimática. Entre os açúcares liberados estão a celobiose e glicose, gerados a partir da celulose, bem como a xilose a partir da hemicelulose (OGEDA E PETRI, 2010).

2.2 Celulose

A celulose de materiais vegetais pode ser encontrada na forma pura, como no algodão, ou associada à hemicelulose e à lignina, na parede celular de diferentes plantas, tendo esta última estrutura a função fornecer rigidez e proteção (SANDGREN *et al.*, 2005). Durante os estágios iniciais de crescimento das plantas, o conteúdo de celulose pode variar entre 35 a 50% do peso seco, de hemicelulose 25 a 35% e o de lignina, de 5 a 30% (LYND *et al.*, 2002).

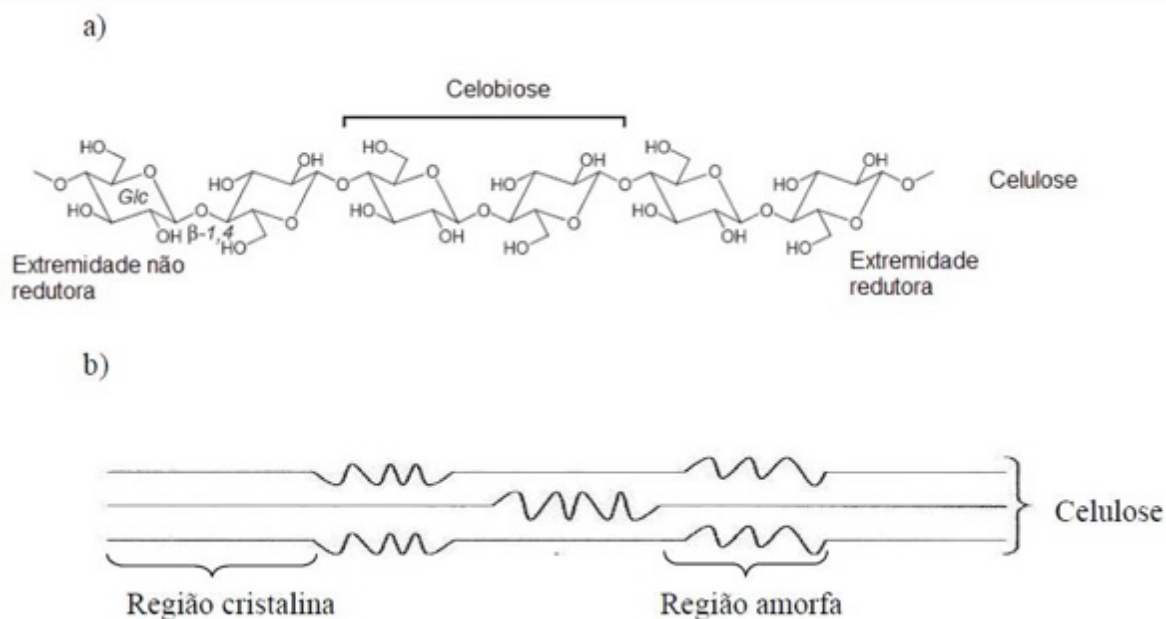
Quimicamente é uma molécula simples, polimérica, linear, formada por anéis de β -D-glicopirranose unidas por ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, o que resulta num polímero de alta massa molecular com grau de polimerização variando de 5.000 a 7.500 (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Para a formação da celulose, polímeros adjacentes interagem formando pontes de hidrogênio e organizam-se em estruturas denominadas de microfibrilas, as quais reúnem-se em estruturas maiores, as fibras de celulose. Essas se agrupam em regiões cristalinas mais organizadas, onde as fibrilas são unidas por pontes de hidrogênio tanto intra quanto intermolecular (Figura 2). Várias formas cristalinas de celulose são encontradas e todas apresentam características físicas e químicas próprias (LYND *et al.*, 2002).

Cada camada adjacente de celulose é ainda unida por forças de van der Waals, resultando em uma fibra com alto grau de compactação. Devido a este grau de compactação, a penetração de pequenas moléculas como a água e a ação das enzimas, podem não ocorrer (LYND *et al.*, 2002).

As regiões cristalinas são entremeadas por regiões amorfas, onde o grau de compactação dos polímeros é menor. Além das regiões amorfas as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato, permitindo o acesso de moléculas de água e outras moléculas maiores como as enzimas celulolíticas. A unidade repetitiva da celulose é o dissacarídeo de D-glicose chamado celobiose (SANDGREN *et al.*, 2005).

Figura 2. (a) Polímero de celulose (SANDGREN *et al.*, 2005) e (b) regiões amorfas e cristalinas da celulose (FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2007) com modificações.



2.3.Hemicelulose

Seguida da celulose, a hemicelulose é o segundo biopolímero mais comum na natureza. As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, onde atua como um elo químico entre a celulose e a lignina (CASTRO E PEREIRA, 2010).

Apresentam natureza heteropolissacarídica ramificada, formada, principalmente, por blocos de construção de pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila (Figura 3). Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (CASTRO E PEREIRA, 2010).

A xilana é o principal polímero desta fração, e consiste num polissacarídeo composto de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas, contendo ramificações de pentoses e hexoses. Outros polímeros como glicomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglicomanana (heteropolímero de D-

galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e D-arabinose) são encontrados na hemicelulose (CHADHA *et al.*, 2004).

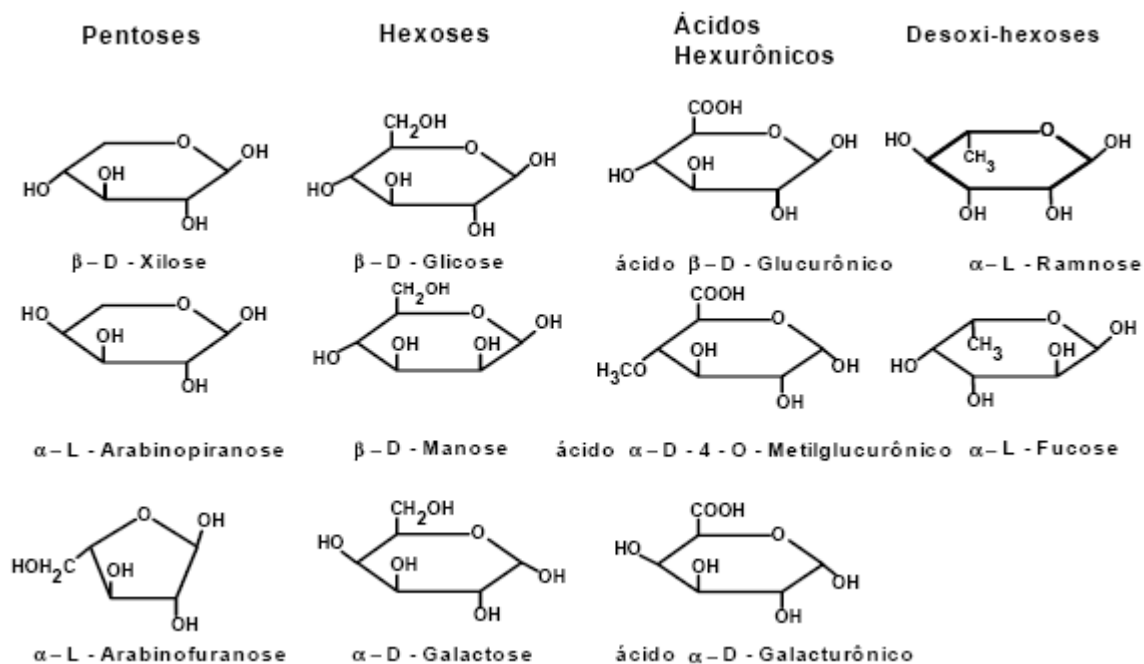
Trata-se do maior polissacarídeo estrutural das células vegetais e o segundo polissacarídeo mais abundante em vegetais, calcula-se que esteja entre as três primeiras fontes de carbono orgânico renovável (BEG *et al.*, 2001; KATAPODIS; CHRISTAKOPOULOU; CHRISTAKOPOULOU, 2006).

Diferentes hemiceluloses são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto da cadeia e várias subclasses com diferentes composições químicas podem ser encontradas dependendo da espécie da planta, do estágio de desenvolvimento e dos tipos de tecidos (OGEDA E PETRI, 2010).

As hemiceluloses possuem uma massa molecular menor que a celulose, sendo que o número de repetições dos monômeros é de aproximadamente apenas 150, comparado com o da celulose varia entre 5000 e 10000 (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

As interações entre a hemicelulose e a celulose são geralmente mais fortes do que as interações entre a hemicelulose e a lignina, e a composição e ligação das cadeias secundárias determinam as suas propriedades físicas e químicas. Ao remover as cadeias secundárias eleva-se a taxa de degradação através das enzimas endoxilanas, pois os grupos laterais de xilanas podem ter um papel importante na ligação de ligninas com hemiceluloses.

Figura 3. Monossacarídeos encontrados nos heteropolissacarídeos de hemicelulose
Adaptada de FENGEL E WEGENER, 1989.

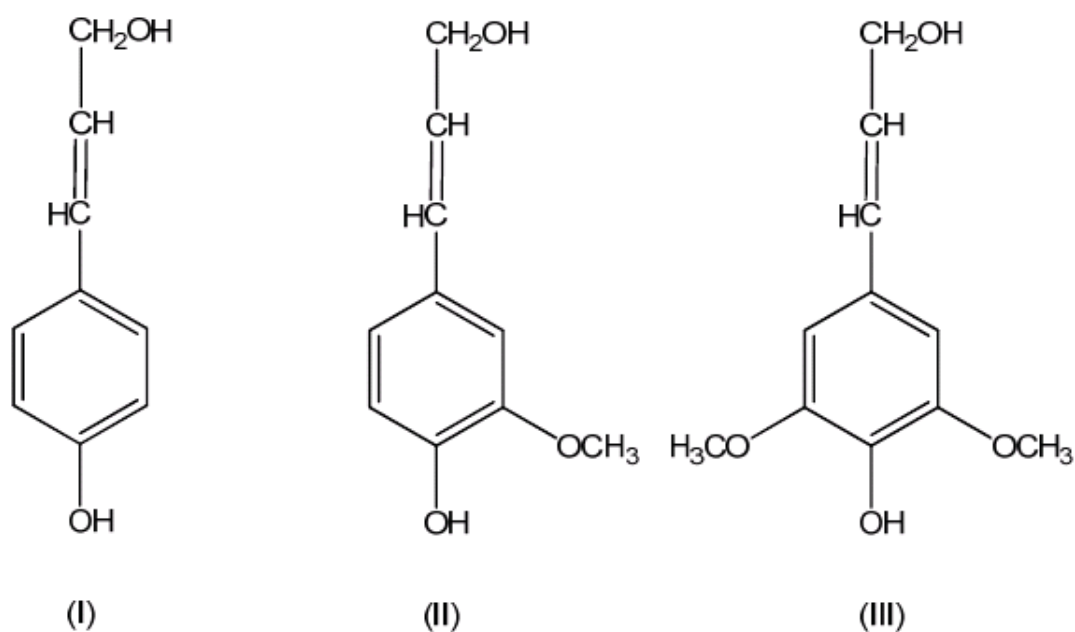


2.4. Lignina

A lignina envolve as fibras de celulose e é constituída por um polímero aromático heterogêneo e amorfo, sendo sua função aumentar a resistência do material lignocelulósico, protegendo a celulose e hemicelulose do ataque microbiano, dar resistência ao material, além de impermeabilizar os vasos condutores da planta (CASTRO E PEREIRA, 2010).

É incorporada durante o crescimento do vegetal, composta basicamente de unidades de unidades de fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. Estes monômeros que formam a lignina são denominados álcoois cumarílicos, que são diferenciados entre si pelas substituições que apresentam no anel aromático: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico, álcool sinapílico (Figura 4).

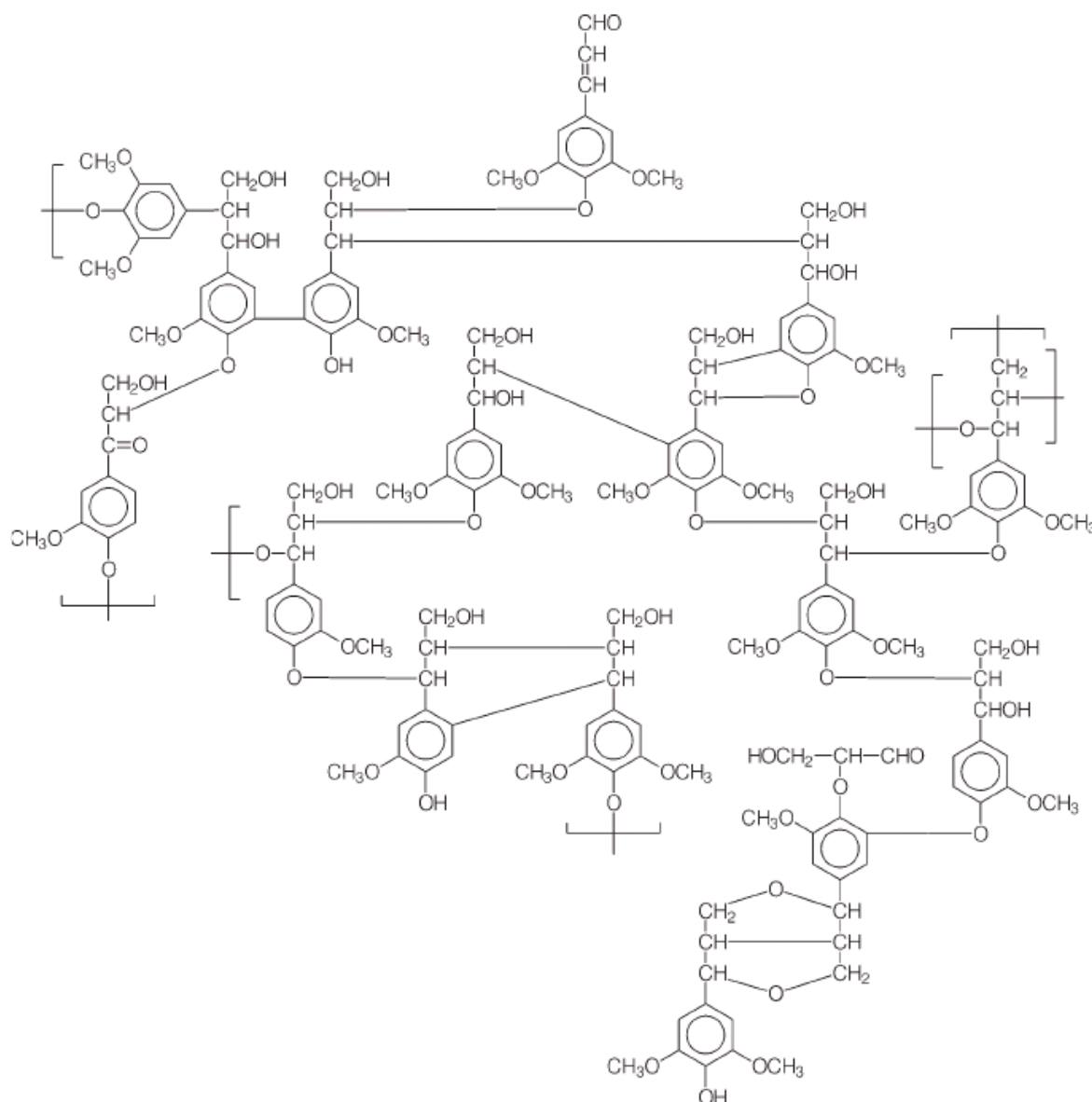
Figura 4. Precursores primários das ligninas: I – álcool p-cumarílico, II – álcool coniferílico e III – álcool sinapílico (PILO-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993).



A concentração de lignina e proporção dos alcoóis que formam a lignina varia entre diferentes espécies de plantas (BAURHOO; RUIZ-FERIA; ZHAO, 2008). O teor de lignina em base seca, geralmente varia entre 20 e 40% do peso nas madeiras duras e moles, e de 10 a 40% para espécies herbáceas, como o bagaço de cana de açúcar, a espiga de milho, casca de amendoim, casca de arroz e a palha (YAMAN, 2004).

Além disso, a presença de diferentes unidades precursoras e o elevado número de combinações possíveis entre as unidades precursoras faz com que a estrutura da macromolécula de lignina seja bem mais complexa que a apresentada pela celulose e pela hemicelulose (Figura 5) (RAMOS, 2003).

Figura 5. Estrutura proposta para lignina de madeira *Eucalyptus grandis* (PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993).



2.5. Enzimas Celulolíticas

2.5.1. Celulases

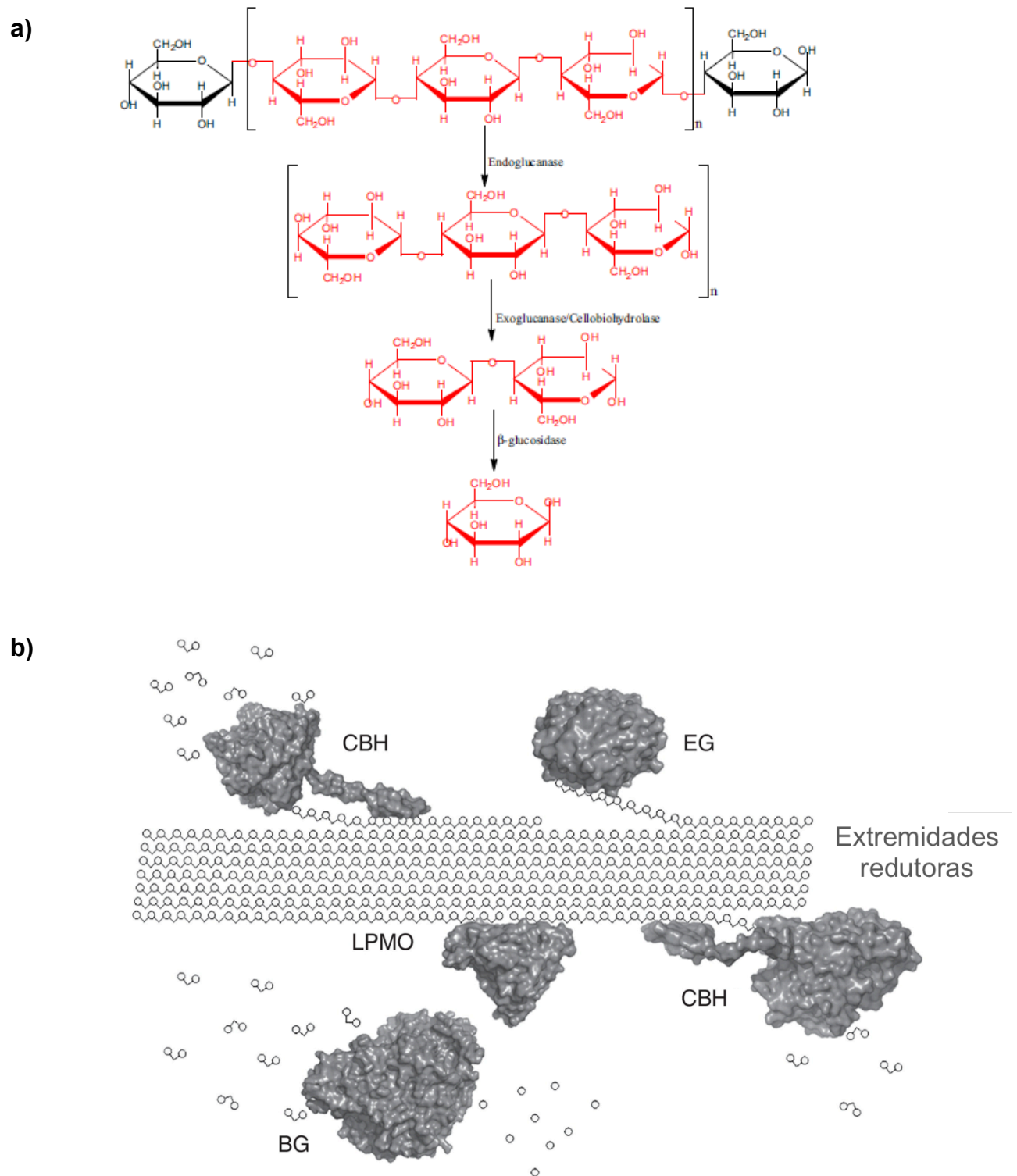
A hidrólise da celulose para obtenção de açúcares pode ser feita por meio do uso de enzimas do complexo celulolítico, que são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada. A classificação das celulases, de acordo com

seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases (EC 3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (EC 3.2.1.91), que atuam na região externa da celulose e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO E PEREIRA, 2010; HUY *et al.*, 2015).

As endoglucanases ou 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase, desempenham um papel importante na conversão da biomassa lignocelulósica, clivando randomicamente ligações glicosídicas internas do tipo β -1,4 em regiões não-cristalinas da cadeia de celulose liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. As endoglucanases são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (PELEGRINI *et al.*, 2015; CASTRO E PEREIRA, 2010).

Em uma segunda etapa de conversão da biomassa lignocelulósica em monossacarídeos de glicose, as endoglucanases atuam em conjunto com as outras enzimas do complexo celulolítico, em um fenômeno conhecido com sinergismo, apresentando rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras (PELEGRINI *et al.*, 2015; CASTRO E PEREIRA, 2010) (Figura 6).

Figura 6. Modo de ação sinérgico de celulases. A. Figura adaptada de JUTURU E WU, 2014. B. Figura adaptada de HARRIS *et al.*, 2014.



2.5.2. Classificação CAZy

Celulases são agrupadas dentre as famílias de glicosídeo hidrolases (GH) baseado na sua sequência e estrutura tridimensional. De acordo com “Carbohydrate-Active enZYmes Database”(CAZy), endoglucanases são dispostas nas famílias 5-8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124, 128. Exoglucanases ou celobiohidrolases se encontram nas famílias 5-7 e 48, as β -glicosidases estão entre as famílias 1, 3, 4, 17, 30 e 116 (www.cazy.org) (HUY *et al.*, 2015; JUTURU E WU, 2014; VLASENKO *et al.*, 2010).

As reações catalisadas por glicosídeo hidrolases sugerem estar envolvidas com catálise ácido-básica através de resíduos localizados no sítio catalítico da enzima. Um dos resíduos atua como um ácido e doador de prótons ao oxigênio da ligação O-glicosídica; ao mesmo tempo, o outro resíduo atua como o nucleófilo. Dependendo da distância entre estes dois grupos carboxílicos localizados do sítio catalítico das celulases, o mecanismo pode ser classificado por inversão ($\sim 10 \text{ \AA}$) ou retenção ($\sim 5 \text{ \AA}$) (KUHAD *et al.*, 2016).

2.6. Estruturas de celulases

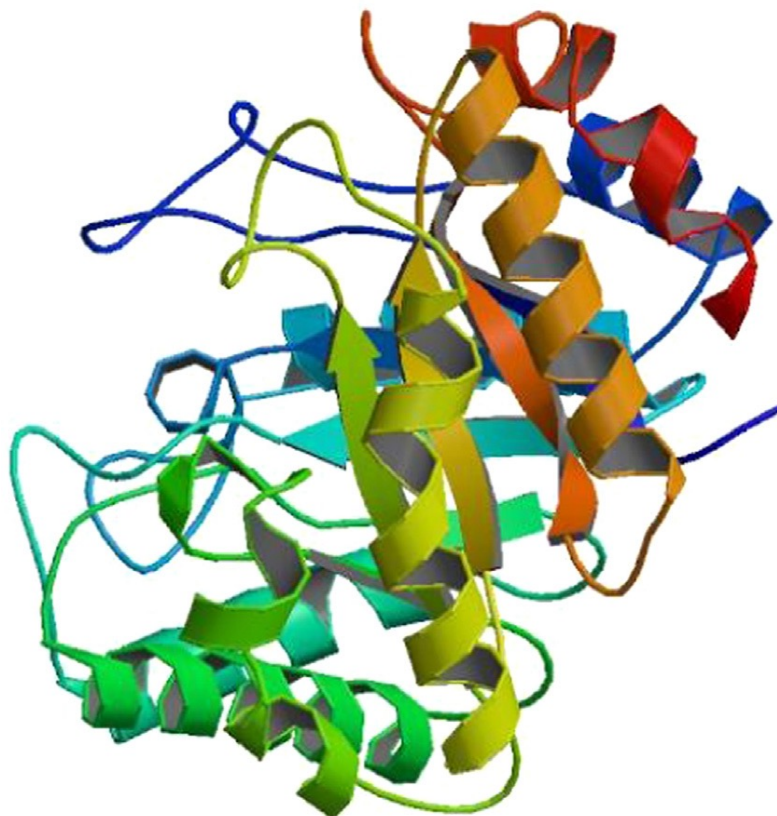
Celulases fúngicas apresentam uma arquitetura simples contendo um domínio catalítico (DC) e um domínio de ligação à celulose (CBD). O domínio catalítico é conectado ao CBD através de um peptídeo de ligação (linker). O CBD se liga à celulose permitindo o DC realizar sua função catalítica. O CBD não está envolvido na hidrólise, mas a sua remoção pode reduzir significativamente a atividade da enzima (JUTURU E WU, 2014).

2.6.1. Endoglucanase

A estrutura de endoglucanases são frequentemente observadas como a arquitetura do cristal de β -1,4-endoglucanase de *Thermoascus aurantiacus* (Cel5A) (PBD ID: 1GZJ), pertence à família GH5. Após modificações pós-traducionais 335 aminoácidos são modelados em uma enzima funcional que apresenta uma estrutura em forma de barril $(\beta/\alpha)_8$. Esta enzima apresenta uma única subunidade catalítica com uma estrutura compacta contendo “loops” curtos. A estrutura da enzima tem algumas estruturas secundárias extras em relação à arquitetura clássica de barril β/α , que incluem duas fitas antiparalelas em folha β , localizada no terceiro loop de β/α e três estruturas de hélice com apenas uma volta (JUTURU E WU, 2014).

O ácido glutâmico catalítico Glu 133 (ácido/base) e o Glu 240 (nucleófilo) são conservados. O sítio de ligação do substrato é raso e está localizado entre os subsítios -4 a +3. Este sítio de ligação do substrato sempre se encontra na sua conformação ativa. Um grande número de resíduos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) estão alinhados no sítio ativo cobrindo da região não redutora até a região redutora do substrato (Figura 7) (JUTURU E WU, 2014).

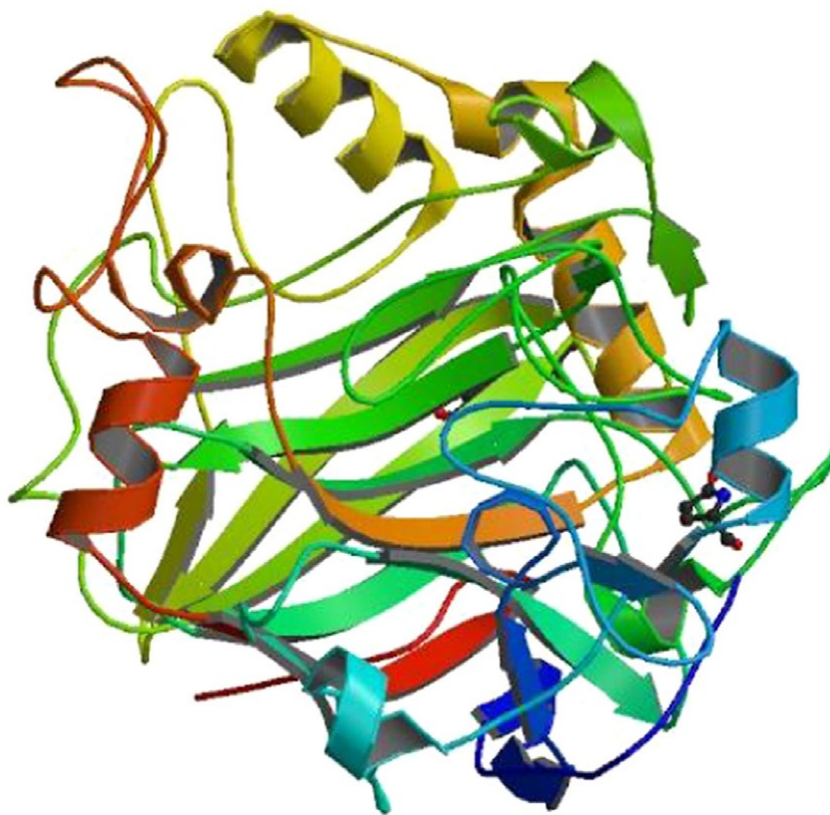
Figura 7. Estrutura do cristal de endoglucanase de *T. aurantiacus* (PDB ID: 1GJZH) mostrando a arquitetura de barril (β/α)₈, estrutura regular e compacta com loops curtos. Figura adaptada de JUTURU E WU, 2014.



2.6.2. Exoglucanase ou celobiohidrolase

A estrutura de exoglucanases ou celobiohidrolases geralmente é observada como a estrutura do cristal de celobiohidrolase (Cel7A) (PDB ID: 1GPI). Esta enzima pertence à família 7 dentre as glicosídeo hidrolases. Após modificações pós-traducionais, a cadeia polipeptídica de 431 aminoácidos é moldada em uma enzima funcional que apresenta estrutura tridimensional de rocambole- β (*β -jelly roll*) (Figura 8).

Figura 8. Estrutura de exoglucanase de *Phanerochaete chrysosporium* (PDB ID: 1GPI). A proteína tem estrutura de β -jelly roll formada por duas grandes folhas β antiparalelas. Figura adaptada de JUTURU E WU (2014).



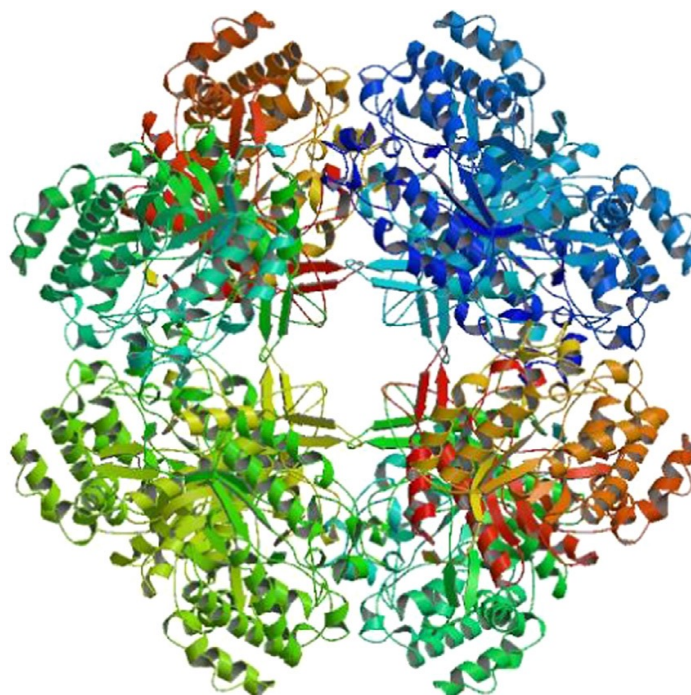
Cada β -jelly roll tem duas grandes folhas β , uma de frente a outra com uma interface hidrofóbica entre elas. Cada folha β é composta de seis fitas levemente curvadas desenvolvendo uma face côncava e outra convexa. Essas folhas β estão interligadas por quatro α -hélices. Os loops originários da porção côncava da folha β estão estabilizados por nove pontes dissulfeto. Os loops das folhas β são responsáveis pelo formato do sítio de ligação do substrato. Os resíduos de aminoácidos (427-430) na região C-terminal de cada monômero interagem por ligações de pontes de hidrogênio com os mesmos resíduos pertencentes a outro monômero, gerando uma interação antiparalela entre as folhas β . A estrutura intacta desta proteína se dá com um “linker” e um domínio de ligação ao substrato (CBD) conectado à região C-terminal do domínio catalítico (JUTURU E WU, 2014).

Com relação aos aminoácidos envolvidos na catálise enzimática, Glu 207 (nucleófilo) e Glu 212 (ácido/base) - doador de prótons ao oxigênio envolvido na ligação glicosídica no primeiro estágio da reação. No mecanismo de reação ácido/base, Glu 207 está carregado negativamente e, Asp 209 estaria protonado e não carregado. A Asp 209 provavelmente estaria envolvida na manutenção do valor de pka adequado para outros resíduos catalíticos, assegurando que as cargas destes resíduos do sítio ativo se encontrem favoráveis à catálise (JUTURU E WU, 2014).

2.6.3. β -glicosidases

A estrutura de β -glicosidases, observada como a arquitetura do cristal de uma β -glicosidase A de *Bacillus polymyxa* (BglA) (PDB ID: 1BGA) (Figura 9). Esta enzima pertence à família de glicosídeo hidrolase 1 clan GH-A. A partir dos dados cristalográficos, BglA apresenta uma conformação octamérica. Cada monômero adota a topologia de barril (α/β)₈ com unidades adicionais de estrutura secundária inseridas entre as subunidades α/β . Os resíduos Glu 166 (ácido/base) e Glu 352 (nucleófilo) estariam envolvidos com a reação de hidrólise. A histidina 121 é bem conservada entre as hidrolases da família GH1 e estaria envolvida com a ligação ao substrato ou com a estabilização no estado de transição. A tirosina 296 (Tyr 296) também é considerada como uma possível candidata com relação ao seu envolvimento na reação catalítica (JUTURU E WU, 2014).

Figura 9. Estrutura do cristal de uma β -glicosidase A de *B. polymyxa* (PDB ID: 1BGA) com uma conformação octamérica. Figura Adaptada de JUTURU E WU, 2014.



2.7. Hidrólise de materiais do complexo celulósico

Uma das mais emergentes aplicações das enzimas do complexo celulolítico atualmente é a hidrólise de biomassas, possibilitando a conversão da estrutura polimérica da celulose em glicose. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado para uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse. Tais tecnologias se enquadram no conceito de biorrefinarias celulósicas, as quais visam o aproveitamento integral e integrado dos resíduos agroindustriais gerados em uma determinada cadeia produtiva (CASTRO E PEREIRA, 2010).

A hidrólise enzimática do material lignocelulósico vem sendo constantemente comparada à hidrólise química (SUN E CHENG, 2002). Na hidrólise enzimática utiliza-se condições amenas (pH 5,0 e temperatura 45-50°C, aproximadamente), além de não existir o problema de corrosão dos equipamentos industriais.

Entretanto, as tecnologias disponíveis de hidrólise enzimática realizadas em temperaturas superiores a 50°C apresentam taxas de hidrólise enzimática muito baixa, gerando baixas quantidades de açúcares fermentecíveis a partir da biomassa lignocelulósica, necessitando de maior concentração de enzimas, além de maior propensão à contaminação por microrganismos indesejáveis. Tem sido sugerido que essas limitações poderiam ser superadas com a utilização de microrganismos termofílicos produtores de enzimas termoestáveis (BHALLA *et al.*, 2013).

Termoestabilidade é definida como a capacidade de uma enzima manter sua conformação estrutural a uma temperatura elevada por um período de tempo prolongado. Enzimas termoestáveis oferecem uma série de vantagens potenciais na hidrólise de materiais lignocelulósicos, como por exemplo: 1- aumento da solubilidade de reagentes e produtos, resultando em maior velocidade de reação e conseqüentemente quantidade diminuída de enzima a ser utilizada; 2 – menor tempo de hidrólise; 3 – menor risco de contaminação, e assim maior produtividade; 4- recuperação facilitada de compostos voláteis, como o etanol; 5 – menores gastos energéticos com resfriamento da biomassa após procedimento de pré-tratamento (BHALLA *et al.*, 2013).

Muitos fungos e bactérias têm sido reportados como produtores de celulasas termoestáveis, dentre eles estão fungos pertencentes ao mesmo gênero de *Myceliophthora heterothallica* F. 2.1.4, o fungo *Sporotrichum thermophile* (*Myceliophthora thermophila*) (BHALLA *et al.*, 2013; NOORT *et al.*, 2013; MORETTI *et al.*, 2012).

Embora o fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 apresente a capacidade de produzir enzimas termoestáveis atuantes no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica, a purificação e caracterização de uma enzima individual podem ser complicadas devido à presença de outras enzimas que apresentem atividades

enzimáticas e propriedades similares. Assim, a clonagem e a expressão do gene codificante de uma enzima em um modelo heterólogo se torna vantajoso.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho é a superexpressão do gene codificador de β -1,4-endoglucanase da linhagem de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 em *Pichia pastoris* e em *Escherichia coli*, avaliando a termoestabilidade das enzimas heterólogas. Além disso, a determinação da estrutura do domínio catalítico da enzima expressa em *E. coli*.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolamento e identificação do cDNA de β -1,4-endoglucanase;
- Construção dos sistemas de expressão heterólogo para *Pichia pastoris* e *Escherichia coli*;
- Expressar as enzimas solúveis em *Pichia pastoris* e em *E. coli*;
- Purificação das enzimas;
- Caracterização bioquímica;
- Estudos de cinética enzimática;
- Testes de Cristalização com as proteínas purificadas de *E. coli*;
- Análise estrutural em alta resolução do domínio catalítico de β -1,4-endoglucanase expressa *E. coli*;

Capítulo 1

Análise da produção de celulasas pela linhagem *Myceliophthora*

***heterothallica* F.2.1.4**

&

**Clonagem e Expressão da endoglucanase (Mh_GH5) de
Myceliophthora heterothallica em *Pichia pastoris***

RESUMO

Os microrganismos termofílicos são de grande interesse biotecnológico, não apenas por tolerar altas temperaturas, mas também por secretarem proteínas de maior estabilidade, com características bioquímicas e estruturais importantes de múltiplas aplicações na indústria. A linhagem do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 foi analisada para a produção de celulases e demonstrou-se produtor potencial de enzimas do complexo celulolítico (CMCase: 31 U/mL, β -glucosidase e FPase: 1 U/mL). O gene codificante de uma nova β -1,4-endoglucanase foi identificado e isolado do secretoma do fungo termofílico *M. heterothallica* e expresso eficientemente em *Pichia pastoris*. A enzima, identificada como membro da família glicosídeo hidrolase 5 (GH5), apresenta na região N-terminal um módulo de ligação ao substrato (CBM), identificado como membro da família 1. Duas construções desta enzima foram desenvolvidas, Mh_GH5 ligada ao domínio de ligação ao substrato (Mh_GH5-CBM1) e uma segunda construção compreendendo apenas o domínio catalítico da enzima (CD) – Mh_GH5-CD. As enzimas recombinantes apresentaram as mesmas características bioquímicas, com temperatura ótima à 55°C e pH ótimo de 4,0, mantendo-se estáveis após seis horas de incubação à 70°C e apresentam aumento na atividade enzimática na presença de íons Mg^{2+} . Os parâmetros cinéticos demonstraram que a enzima Mh_GH5-CD apresenta velocidade máxima de 171,52 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ e sua construção contendo o domínio de ligação ao substrato de 150,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, demonstrando que Mh_GH5-CD seria potencialmente mais eficiente na hidrólise do substrato CMC. Esse é o primeiro estudo de expressão heteróloga de uma endoglucanase de *M. heterothallica*. Os dados obtidos neste trabalho serão de grande relevância do ponto de vista biotecnológico, visando a busca de biocatalisadores eficientes na conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e/ou biomateriais.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Análise da produção de celulases pela linhagem *M. heterothallica* F.2.1.4

1.1.1. Cultura do fungo filamentoso *M. heterothallica* F.2.1.4 para produção de celulases

O fungo filamentoso *M. heterothallica* foi cultivado por fermentação em estado semi-sólido usando como substrato uma mistura de papelão (0,4g), palha de cana de açúcar (0,3g) e palha de milho (0,3g), em erlenmeyers contendo 20 mL de solução nutriente e esterilizado a 120 ° C por 20 min. Este substrato foi inoculado com 20 mL de suspensão de esporos em uma solução estéril de nutrientes composto por (g.L⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 3,5; KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; CaCl₂, 0,5 e Tween 80 (1,0% v/v). A fermentação foi realizada a 45°C por 360 horas para análises enzimáticas. Cada 24 horas, dois frascos foram tomados e o material fermentado filtrado e centrifugado a 10.000 xg, a 10°C. O sobrenadante foi utilizado como uma solução enzimática bruta.

1.1.2. Análise da atividade de celulases produzida pelo fungo termofílico *M. heterothallica* F.2.1.4

A atividade de celulases foi determinada em uma mistura de 0.1 mL da enzima bruta e 0.9 mL de solução tampão 0.1 M pH 5,0 contendo 4% carboximetilcelulose (CMC). Esta mistura foi incubada a 60°C por 10 min, os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

A atividade celulolítica no papel de filtro foi determinada usando pedaços de papel Whatman nº 1 (1.0 cm x 6.0 cm) imersas em 1.0 mL de tampão acetato 0.05 M,

pH 5,0 e 0.5 mL da solução enzimática bruta (GHOSE, 1987). A reação foi realizada a 60°C por 60 min e interrompida com 3.0 mL de DNS.

Uma unidade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para a liberação de um mol de açúcar redutor por minuto sob as condições de análise.

A dosagem de atividade de β -glicosidase foi determinada de acordo com Leite et al. (2008) em reação composta de 50 μ L de solução enzimática bruta, 250 μ L de tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 250 μ L de 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (4 mM), (PNPG, Sigma-Aldrich) incubado a 60°C, por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 2.0 mL de Na₂CO₃ (2 M). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar um mol de p-nitrofenol por minuto sob essas condições de ensaio.

1.2. Clonagem e Expressão da endoglucanase de *Myceliophthora heterothallica* em *Pichia pastoris* – Primeira Etapa do Trabalho.

1.2.1. Linhagens de microrganismos e plasmídeos

O fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 foi isolado de camas de frango e sua identificação foi realizada em trabalhos anteriores por métodos convencionais e moleculares. A identificação molecular foi realizada através do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico em conjunto com análises filogenéticas descritas em Sette et al. (2006) (ZANPHORLIN *et al.*, 2010). A linhagem de *Escherichia coli* DH5 α (Gibco BRL) foi utilizada para propagação dos plasmídeos (Tabela 1.1 e Figuras 1.1 e 1.2) e a linhagem de *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen) para expressão desta nova endoglucanase de *Myceliophthora heterothallica* (Mh_GH5).

Tabela 1.1. Vetores utilizados em *E. coli* e *P. pastoris*.

Vetor	Tipo de vetor	Tamanho	Característica principal	Origem
pGEMT	Vetor de clonagem	3 Kb	Vetor de clonagem de produto de PCR	Promega
pPIC9	Vetor de Integração	8 Kb	Resistência a ampicilina Gene de seleção <i>HIS4</i>	Invitrogen

Figura 1.1. Diagrama esquemático do vetor pGEM-T (Promega).

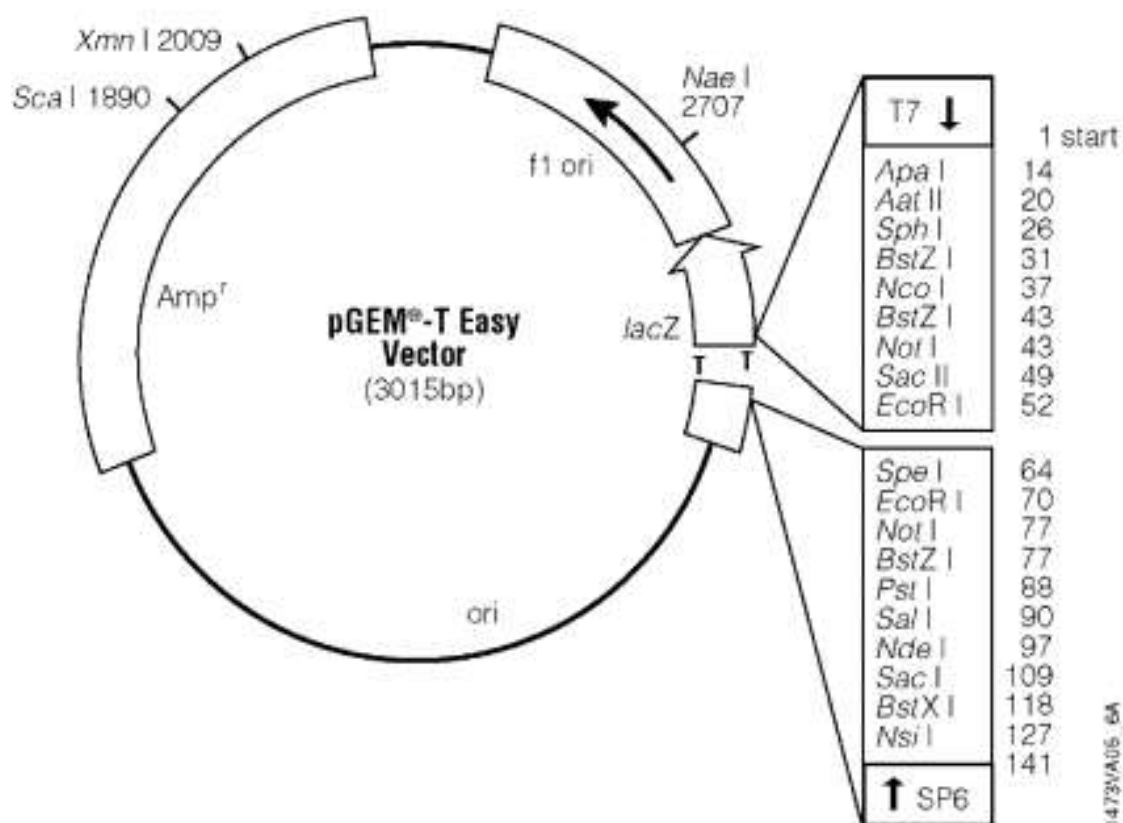
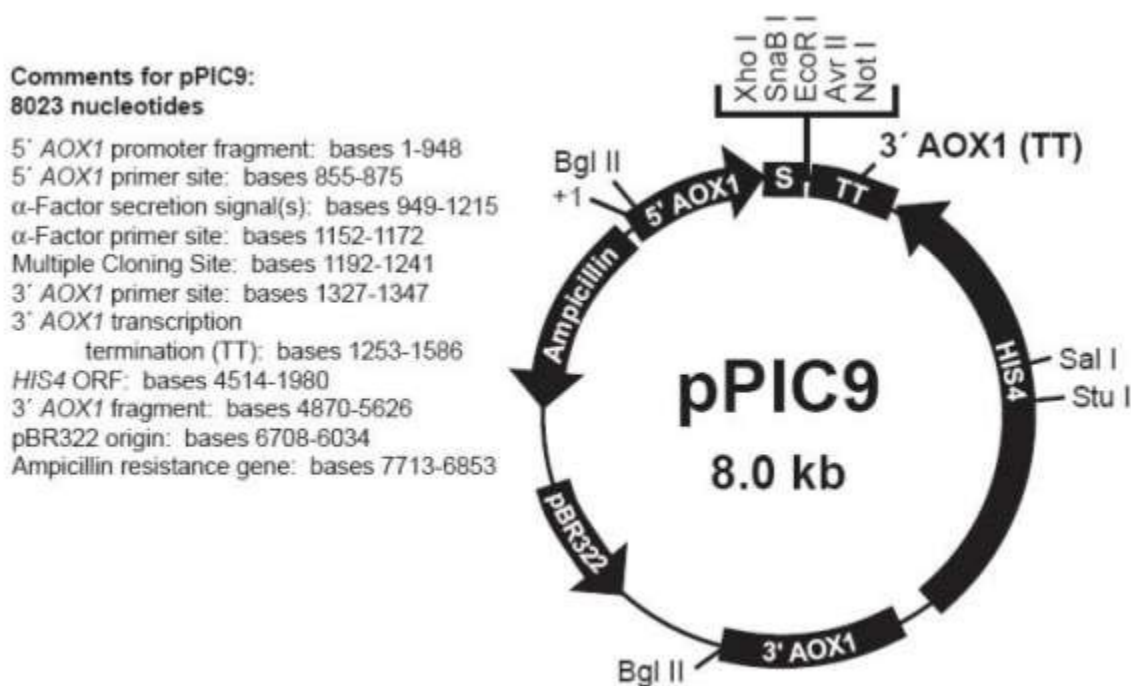


Figura 1.2. Diagrama esquemático do vetor pPIC9 (Invitrogen).



1.2.2. Extração de RNA total e Obtenção do cDNA de Mh_GH5

O RNA total foi extraído com o uso do kit "*RNeasy Mini Kit*" (Qiagen) e tratado com DNase I, de acordo com as recomendações dos fabricantes. O RNA total foi analisado em gel de agarose 1%. O cDNA de Mh_GH5 foi obtido através da técnica de PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) com o kit "*Superscript III first-strand synthesis system for RT-PCR*" (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Os oligonucleotídeos usados para a PCR foram baseados na sequência do precursor da β -1,4-endoglucanase (Cel5A) de *Myceliophthora thermophila* depositada no NCBI (número de acesso HQ163779.1) (Tambor et al., 2012). As reações de PCR foram constituídas de 1X tampão de reação, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de oligonucleotídeo líder (ou "forward") e de reverso (Tabela 1.2), e 1 unidade de *Platinum Taq* DNA polimerase. As condições utilizadas foram 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto e, 72°C por 2 minutos (30 ciclos). A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

Tabela 1.2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene da endoglucanase Mh_GH5.

Oligonucleotídeos	Sequência
Mh_GH5-Forward	5'-ATGAAGTCCTCCATCCTCG-3'
Mh_GH5-Reverso	5'-TTACGGCAAGTACTTCTTCAAG-3'

O produto de PCR foi purificado com o kit *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. O DNA foi analisado em gel de agarose a 1%.

1.2.3. Construção do plasmídeo de expressão

O produto de PCR, que consiste do gene da β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica* foi clonado no vetor de clonagem “pGEM-T Easy vector” e sequenciado para a confirmação.

Após a confirmação, novos oligonucleotídeos foram confeccionados contendo sítios de restrição e seis códons referentes ao aminoácido histidina (His-tag) que foram adicionados na região C-terminal da sequência alvo (Tabela 1.3).

Tabela 1.3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene da endoglucanase contendo sítios de restrição e His-tag.

Oligonucleotídeos	Sequência
<i>EcoRI</i> /His-tag/Mh_Gh5-F	5' <u>GAATTC</u> CATCATCATCATCATATGAAGTCCTCCATCCTCG3'
<i>NotI</i> /endoMh_GH5-R	5' GCGGCCGCTTACGGCAAGTACTTCTTCAAG 3'

O novo inserto contendo os sítios de restrição foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) sob as mesmas condições citadas anteriormente com a enzima “*Pfu DNA polymerase*” (Fermentas). O plasmídeo pGEMT-Mh_GH5 foi

transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α e mutantes positivos foram identificados em meio LB-ágar (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% e ágar 2%) contendo X-gal e transferidos para meio LB líquido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) contendo ampicilina (50mg/mL) para isolamento do plasmídeo através da preparação de DNA plasmidial em pequena escala (*miniprep*) (adaptado de Sambrook; Fritsch; Maniats, 2001). Plasmídeo dos clones selecionados foram submetidos à reação de PCR para confirmação e controle da clonagem.

O inserto da endoglucanase (Mh_GH5) clonado em pGEM-T foi excisado utilizando as enzimas *EcoRI* e *NotI* (Fermentas) e posteriormente clonado no vetor pPIC9 previamente digerido com as mesmas enzimas, resultando no pPIC9-Mh_GH5. As ligações foram feitas utilizando a T4 ligase sob as condições do produtor. O plasmídeo de expressão gerado foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α e os mutantes positivos foram selecionados em meio LB-ágar com ampicilina (50 mg/mL). O vetor de expressão pPIC9-Mh_GH5 dos clones selecionados foram isolados através da preparação de DNA plasmidial em pequena escala (*miniprep*) e submetidos à reação de PCR para confirmação e controle da clonagem.

1.2.4. Análise da sequência

A sequência do gene foi comparado com sequências disponíveis no GenBank usando os programas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A sequência de aminoácidos foi analisada com ferramentas do EXPASY (<http://expasy.org/>). Os sítios de restrição presentes na sequência de nucleotídeos foram identificados através do NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

1.2.5. Transformação de *P. pastoris*, Seleção dos clones e Screening em placa

Para integração em *P. pastoris*, 10µg de plasmídeo recombinante, pPIC9-Mh_GH5, foi linearizado com *Bgl*III (Fermentas) e transformado em *P. pastoris* GS115 por eletroporação a 2500V, 400Ω e 25µF. Os transformantes foram selecionados em placas com meio mínimo (MD) com glicose e sem histidina (YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵%, ágar 2% e glicose 2%).

Os transformados que apresentaram crescimento no meio MD foram selecionados para o screening em placa. O *screening* dos transformantes foi realizado em meio mínimo (MM) com carboximetilcelulose - CMC (YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵%, ágar 2%, CMC 1%, 0,2% glicose e metanol 0,5% a cada 24h), para observação de halos de hidrólise com coloração de *Congo Red*.

2. RESULTADOS INICIAIS DO TRABALHO

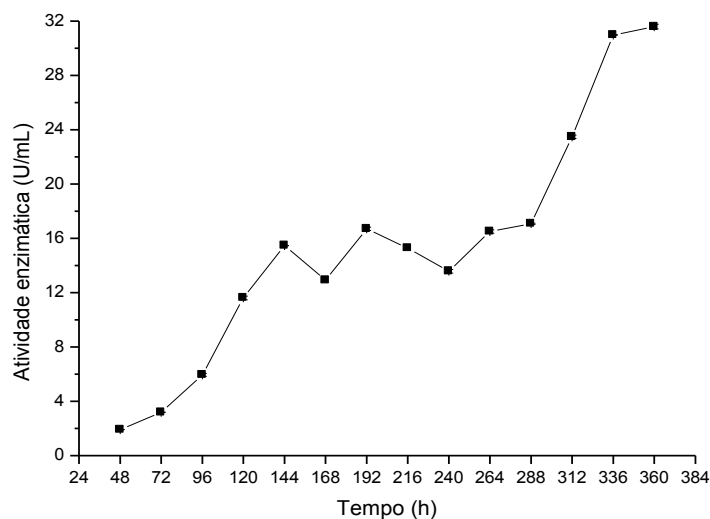
2.1. Análise da produção de celulasas pela linhagem *M. heterothallica* F.2.1.4

O fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 apresentou boa produção de enzimas do complexo celulolítico quando cultivado sob fermentação semi-sólida.

Para a produção de endoglucanase, o fungo apresentou 31 U/mL após 360h de cultivo (Figura 1.3). Comparando esta produção com dados encontrados na literatura, este fungo teve boa produção de endoglucanase. Badhan e colaboradores (2007) analisaram a produção de CMCase pelo fungo *Myceliophthora* sp. IMI 387099 cultivado por fermentação sólida utilizando como substrato 5g de diversos resíduos agroindustriais, como palha de arroz, palha e farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar,

sabugo de milho. A palha de arroz foi a fonte de carbono mais eficiente para a produção desta enzima, obtendo 3,3 U/mL.

Figura 1.3. Curva de produção da enzima endoglucanase (CMCase) produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* linhagem F.2.1.4 cultivado sob fermentação semi-sólida.



Comparando estes resultados com a produção de outros fungos do gênero *Myceliophthora* também pode-se dizer que obtivemos bons resultados. Moretti e colaboradores (2012) analisaram a produção de celulases pelo fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7 sob fermentação em estado sólido e obtiveram 2,7 U/mL de endoglucanase quando utilizou-se bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 p/p) como fonte de carbono.

Este dado indica que para a produção de endoglucanases a mistura de substratos papelão, palha de cana de açúcar e palha de milho pode ter sido mais eficiente na indução destas enzimas quando comparado com bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo.

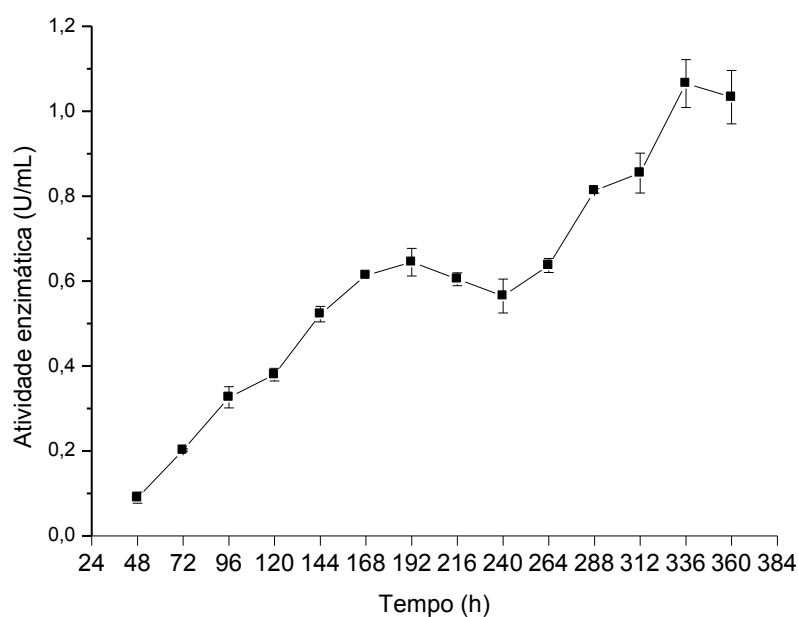
Para a produção de β -glicosidase, o fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 também se mostrou bom produtor com aproximadamente 1 U/mL após 360h de cultivo (Figura 1.4) sob fermentação semi-sólida até mesmo quando comparados com

produções de fungos do gênero *Thermoascus* sp e *Aspergillus* sp, fungos relatados como bons produtores de enzimas celulolíticas (KALOGERIS *et al.*, 2003; BANSAL *et al.*, 2012).

Leite e colaboradores (2008), encontraram valores próximos aos relatados neste trabalho quando cultivou o fungo *Thermoascus aurantiacus* sob fermentação em estado sólido utilizando como substrato resíduos de soja (1,3 U/mL).

Valores similares também foram obtidos por Moretti e colaboradores (2012) quando cultivaram o fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7 sob fermentação sólida, utilizando como fonte de carbono farelo de trigo, com aproximadamente 1 U/mL.

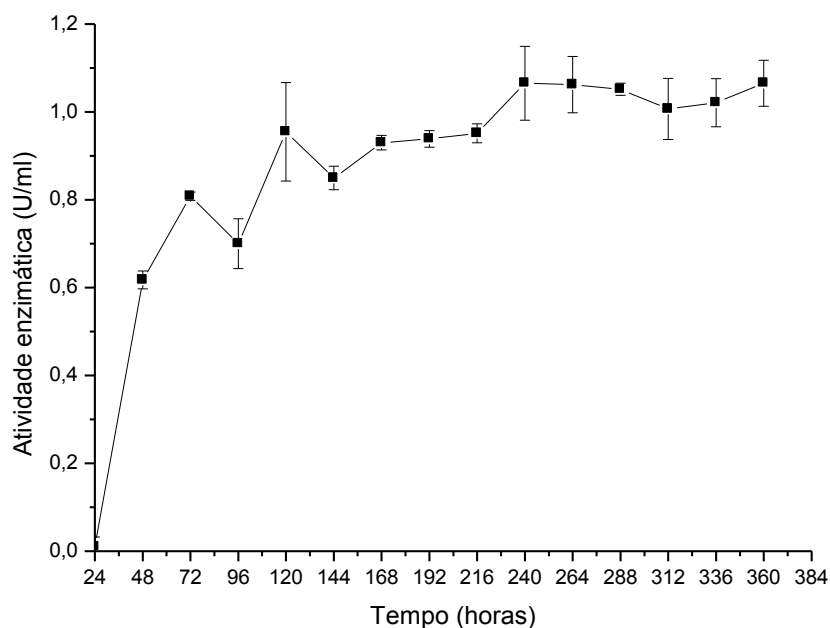
Figura 1.4. Curva de produção da enzima β -glicosidase produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* linhagem F.2.1.4 cultivado sob fermentação semi-sólida.



A atividade em papel de filtro (FPase) também foi realizada, visto que está relacionada com o total de atividade celulolítica. Para a atividade de FPase o fungo *M. heterothallica* apresentou 1 U/mL (Figura 1.5).

Segundo alguns autores, a quantificação de atividade celulolítica através da dosagem de FPase pode estar sujeita à diversas variações influenciando os resultados (MORETTI *et al.*, 2012).

Figura 1.5. Curva de produção da enzima FPase produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* linhagem F.2.1.4 cultivado sob fermentação semi-sólida.



Bansal e colaboradores (2012), analisaram a produção de FPase pelo fungo *Aspergillus niger* em diversos substratos lignocelulósicos originários de resíduos agroindustriais e domésticos. O farelo de trigo foi a fonte de carbono mais eficiente para a produção de enzimas de caráter FPásico (1,6 U/mL), valores próximos aos encontramos neste estudo, mostrando alto potencial do fungo *M. heterothallica* F.2.1.4 na sacarificação da biomassa lignocelulósica.

Muitos dos fungos termofílicos, mesmo sob condições otimizadas geram baixas taxas de hidrólise e conversão do complexo celulósico em monômeros fermentescíveis.

Diaz e colaboradores (2015) analisaram as taxas de hidrólise da biomassa lignocelulósica utilizando o extrato bruto de *M. heterothallica* F.2.1.4 comparado com

enzimas comerciais. Os maiores índices de hidrólise enzimática foram observadas com a utilização de extratos enzimáticos provenientes do fungo termofílico *M. heterothallica*.

Visto o potencial deste fungo *M. heterothallica* F.2.1.4 na produção de enzimas hidrolíticas e a termoestabilidade das proteínas produzidas, a “superexpressão” destas enzimas em um hospedeiro adequado se tornaria uma possível alternativa para a completa hidrólise do complexo lignocelulósico.

2.2. Extração de RNA total e Obtenção do cDNA de Mh GH5

O RNA total de *M. heterothallica* extraído foi analisado em gel de agarose, onde foi detectada a contaminação com DNA genômico (Fig. 1.6a). O RNA foi, então, tratado com DNase I e novamente analisado em gel, no qual observamos o RNA intacto sem contaminação (Fig. 1.6b). Após a síntese da primeira fita de cDNA e a reação de PCR, o produto com ~1200 pb foi analisado em gel de agarose 1% (Figura 1.7). O DNA foi purificado e observado em gel de agarose 1% e sua concentração foi estimada em 200 ng/ μ L.

Figura 1.6. a) RNA contaminado com DNA genômico. b) RNA após o tratamento com a DNase I, intacto e sem contaminação.

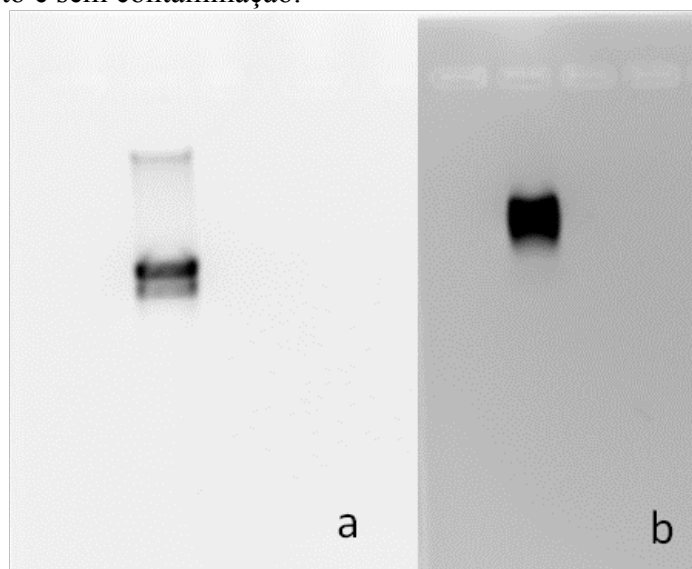
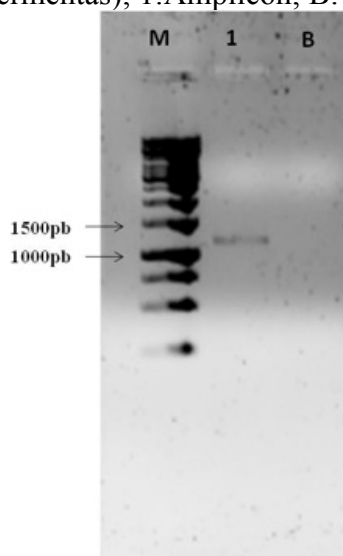


Figura 1.7. Amplificação do gene da endoglucanase Mh_GH5 a partir do cDNA por PCR. M: marcador 1kb (Fermentas); 1: Amplicon; B: controle da reação de PCR.



2.3. Clonagem do gene Mh_GH5 e Sequenciamento

O amplificado de PCR do gene da β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica* (Mh_GH5) foi clonado no vetor de clonagem pGEM-T e o inserto foi sequenciado. Os resultados da análise da sequência indicaram que a sequência clonada continha uma região codificadora “open reading frame” (ORF) iniciada com o códon ATG e terminando com um códon de terminação TAA. A ORF do gene da β -1,4-endoglucanase isolada, consiste em 1170 nucleotídeos codificando uma proteína de 389 aminoácidos,

apresentando a predição de massa molecular de 42kDa. A sequência de aminoácidos apresentou 100% de similaridade com a sequência de β -1,4-endoglucanase de *Myceliophthora thermophila* ATCC42464 (número de acesso GenBank XP_003659014.1), conforme o alinhamento a seguir:

```

Mh  1 MKSSILASVFATGAVAQSGPWQQCGGIGWQGSTDCVSGYHCVYQNDWYSQCVPGAASTTL  60
      MKSSILASVFATGAVAQSGPWQQCGGIGWQGSTDCVSGYHCVYQNDWYSQCVPGAASTTL
XP  1 MKSSILASVFATGAVAQSGPWQQCGGIGWQGSTDCVSGYHCVYQNDWYSQCVPGAASTTL  60
C    1 ***** 60

Mh  61 QTSTTSRPTATSTAPPSSTTSPSKGKLGKWLGSNESGAEFGEENYPGLWGKHFIFPSTSAI  120
      QTSTTSRPTATSTAPPSSTTSPSKGKLGKWLGSNESGAEFGEENYPGLWGKHFIFPSTSAI
XP  61 QTSTTSRPTATSTAPPSSTTSPSKGKLGKWLGSNESGAEFGEENYPGLWGKHFIFPSTSAI  120
C    61 ***** 120

Mh  121 QTLINDGYNIFRIDFSMERLVPNQLTSSFDQGYLRNLTEVVNFVTNAGKYAVLDPHNYGR  180
      QTLINDGYNIFRIDFSMERLVPNQLTSSFDQGYLRNLTEVVNFVTNAGKYAVLDPHNYGR
XP  121 QTLINDGYNIFRIDFSMERLVPNQLTSSFDQGYLRNLTEVVNFVTNAGKYAVLDPHNYGR  180
C    121 ***** 180

Mh  181 YYGNIITDTNAFRTFWTNLAKQFASNSLVI FDTNNEYNTMDQTLVLNLNQAAIDGIRAAG  240
      YYGNIITDTNAFRTFWTNLAKQFASNSLVI FDTNNEYNTMDQTLVLNLNQAAIDGIRAAG
XP  181 YYGNIITDTNAFRTFWTNLAKQFASNSLVI FDTNNEYNTMDQTLVLNLNQAAIDGIRAAG  240
C    ***** 240

Mh  241 ATSQYIFVEGNAWSGAWSWNTTNTNMAALTDPQNKIVYEMHQYLSDSSGTHAECVSSTI  300
      ATSQYIFVEGNAWSGAWSWNTTNTNMAALTDPQNKIVYEMHQYLSDSSGTHAECVSSTI
XP  241 ATSQYIFVEGNAWSGAWSWNTTNTNMAALTDPQNKIVYEMHQYLSDSSGTHAECVSSTI  300
C    ***** 300

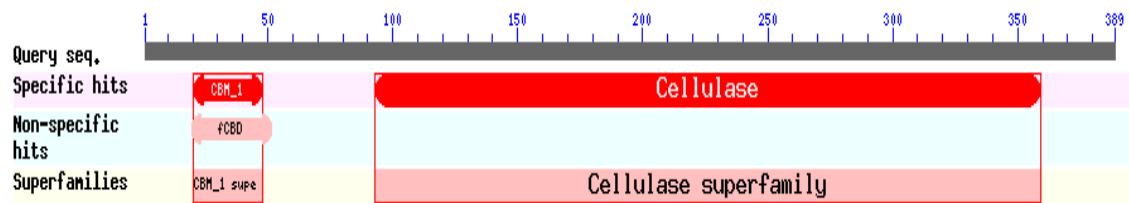
Mh  301 GAQRVVGATQWLRANGKLGVLGEFAGGANAVCQQAVTGLLDHLQDNSDVWL GALWAAAGP  360
      GAQRVVGATQWLRANGKLGVLGEFAGGANAVCQQAVTGLLDHLQDNSDVWL GALWAAAGP
XP  301 GAQRVVGATQWLRANGKLGVLGEFAGGANAVCQQAVTGLLDHLQDNSDVWL GALWAAAGP  360
C    ***** 360

Mh  361 WWGDYMYSFEPSPGTGYVNYNSILKKYLP  389
      WWGDYMYSFEPSPGTGYVNYNSILKKYLP
XP  361 WWGDYMYSFEPSPGTGYVNYNSILKKYLP  389
C    361 ***** 389

```

Análises subseqüentes da sequência de aminoácidos indicaram que possivelmente se trata de uma glicosídeo hidrolase da família 5 (GH5) com um sítio de ligação ao substrato CBM-1 (Figura 1.8).

Figura 1.8. Alinhamento da sequência de aminoácidos da β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica* (Mh_GH5) com as sequência de aminoácidos disponíveis no banco de dados GenBank NCBI (XP_003659014.1), indicando que a proteína pertenceria a família GH5 com um CBM-1. Figura adaptada do GenBank NCBI.

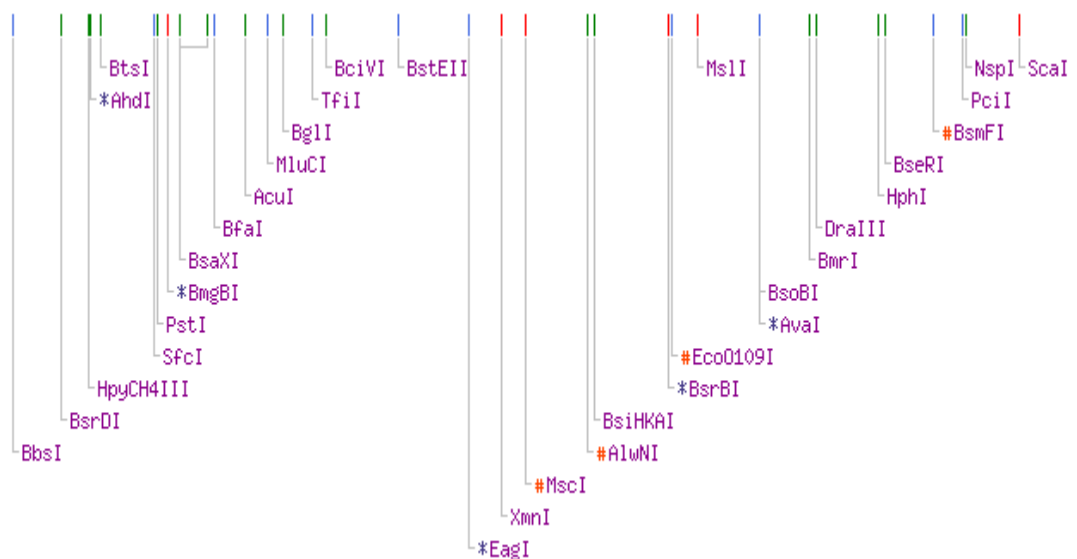


5

Em seguida, os sítios de restrição presentes na sequência de nucleotídeos foram identificados através do NEBcutter (Figura 1.9).

Figura 1.9. Análise dos sítios de restrição encontrados na sequência de nucleotídeos de Mh_GH5 de *M. heterothallica* isolada.

1



1170

2.4. Construção do vetor de expressão induzida

A fim de analisar a expressão do gene da endoglucanase de *M. heterothallica* MH_GH5 em *P. pastoris* foi construído o vetor de expressão pPIC9-Mh_GH5. A estratégia utilizada foi ligar o inserto correspondente ao gene da endoglucanase previamente amplificado com o segundo conjunto de oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição (~1200 pb) e ligá-lo ao vetor pPIC9 que foi utilizado para a transformação em *P. pastoris*. As ligações foram feitas utilizando a T4 ligase e as digestões foram analisadas em gel de agarose 1%.

O DNA purificado após a PCR foi ligado no vetor pGEM-T nos sítios de *EcoRI* e *NotI*, e inserido na bactéria. Após a transformação, os clones foram submetidos ao procedimento de extração de DNA plasmidial e o material resultante foi analisado através de reação de PCR com os primers específicos para o gene da endoglucanase de *M. heterothallica* para a confirmação e controle da clonagem. Os clones positivos apresentaram amplicons de ~1200bp (Figura 1.10).

Os clones selecionados foram então digeridos com *EcoRI* e *NotI* para liberação do inserto da endoglucanase (Figura 1.11), que posteriormente foi purificado utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

Após a purificação do inserto, contendo os sítios de restrição *EcoRI* e *NotI*, foi realizada sua ligação no vetor de expressão pPIC9 (Invitrogen) previamente digerido com as mesmas enzimas. Como controle da ligação mediada pela enzima T4 ligase, o vetor pPIC9-Mh_GH5 foi submetido à reação de PCR para confirmação e controle da clonagem, apresentando um fragmento de acordo com o esperado de ~1200bp (Figura 1.12).

Figura 1.10. Amplificação do gene da endoglucanase de *M. heterothallica* dos clones de *E. coli* DH5 α contendo o vetor pGEM-T + Mh_GH5, para a confirmação e controle da clonagem. M: marcador de massa molecular 1kb (Fermentas), 1-4: clones selecionados e B: controle da reação de PCR.

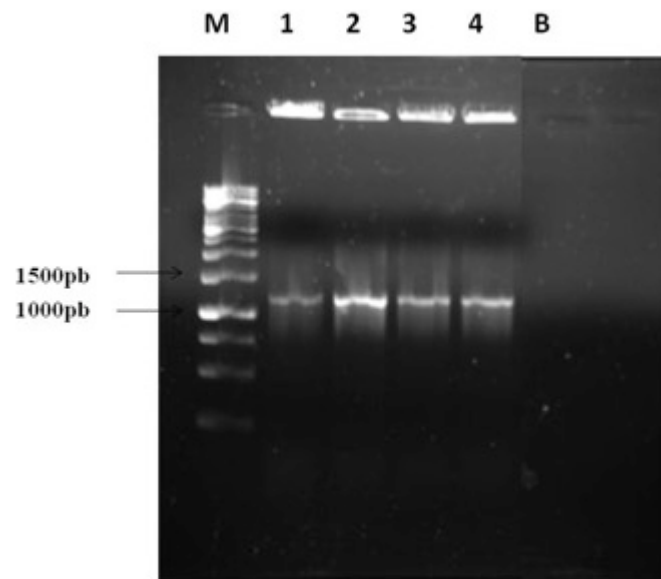


Figura 1.11. Restrição do vetor de clonagem pGEM-T com as enzimas EcoRI e NotI para a liberação do inserto de interesse (~1200 pb) contendo a ORF referente a β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica*. M: marcador de tamanho molecular 1kb (Fermentas); 1 e 2 pGEM-T tratado com as enzimas de restrição; C: controle da digestão – pGEM-T não tratado com as enzimas de restrição.

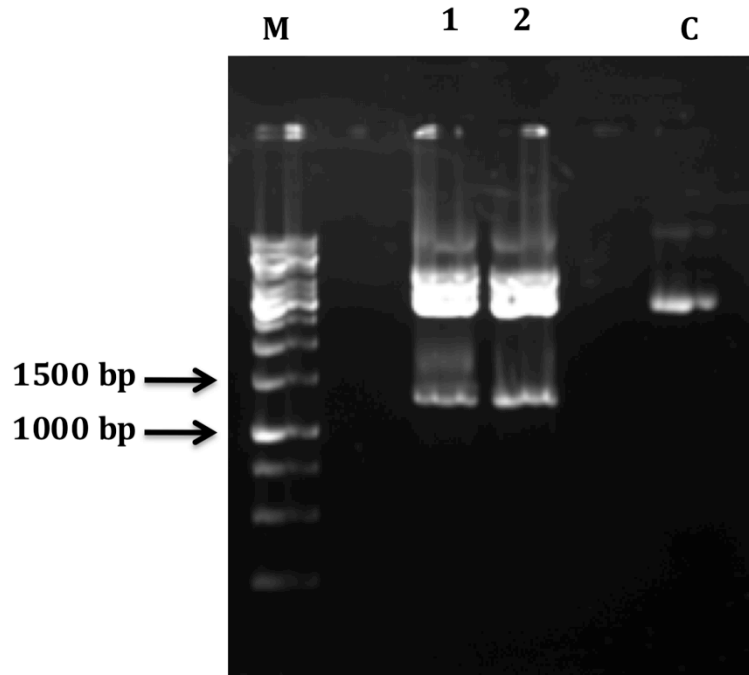
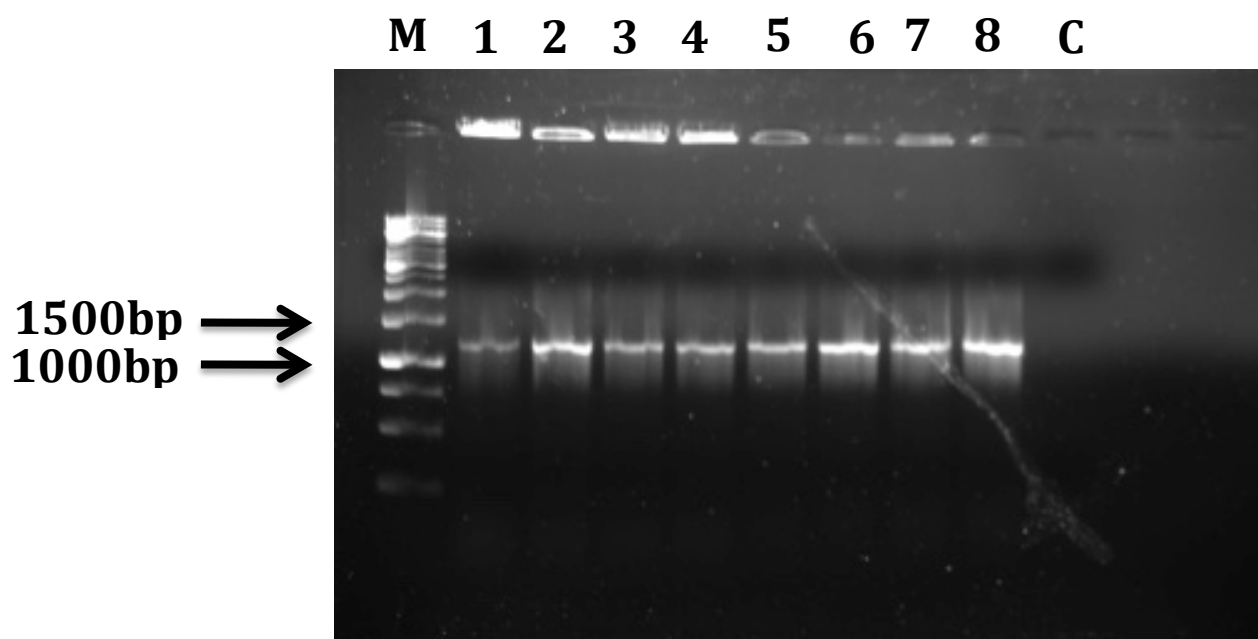


Figura 1.12. Amplificação do gene da endoglucanase de *M. heterothallica* dos clones de *E. coli* DH5 α contendo o vetor pPIC9-Mh_GH5, para a confirmação e controle da clonagem. M: marcador de massa molecular 1kb (Fermentas), 1-8: clones selecionados e C: controle da reação de PCR.

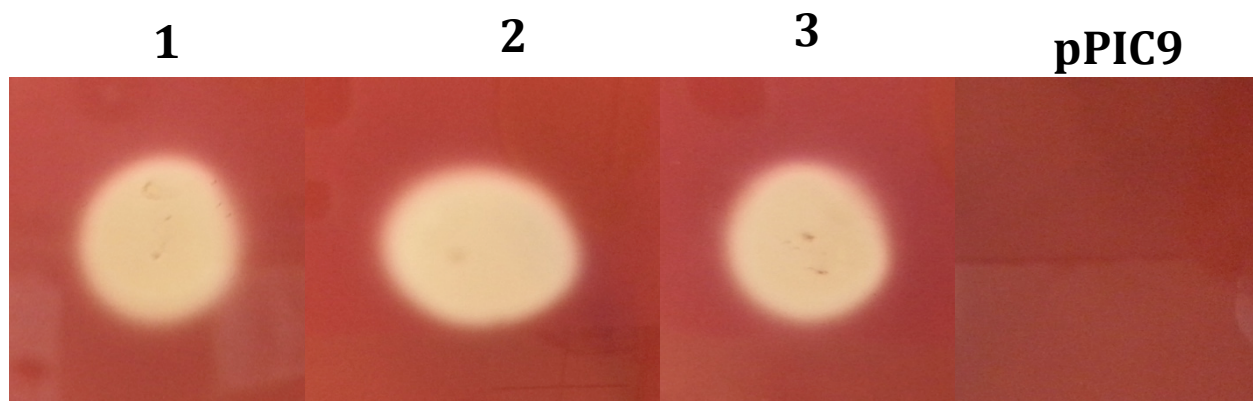


2.5. Transformação de *P. pastoris* e detecção da atividade endoglucanásica

A linhagem GS115 de *P. pastoris* foi transformada com os vetores de expressão induzida construído, pPIC9-Mh_GH5 e pPIC9 (controle negativo), devidamente linearizado como descrito. Os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo (MD), pois a presença do gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) nos vetores complementa a mutação auxotrófica *his4* dessa linhagem de *P. pastoris*. A transformação resultou em apenas três transformantes com pPIC9-Mh_GH5. Para o *screening* dos clones expressando a endoglucanase de *M. heterothallica* os transformantes com pPIC9-Mh_GH5 e um transformante com pPIC9 (controle negativo) foram cultivados em meio mínimo com CMC (MM-CMC) e halos de hidrólise de diferentes tamanhos foram observados após coloração com *congo red* nos três clones. O controle negativo não apresentou halo de hidrólise (Figura 1.13). Este

dado confirma que o gene da β -1,4-endoglucanase foi expresso adequadamente em leveduras *Pichia pastoris*.

Figura 1.13. Halos de hidrólise evidenciados pela coloração com *Congo Red* nos três transformantes de *Pichia pastoris* expressando o gene da β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica*.



O sistema de expressão em leveduras *Pichia pastoris* transformadas com o vetor de expressão pPIC9-Mh_GH5 apresentou grande potencial para a expressão da enzima β -1,4-endoglucanase do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Entretanto, a etapa de transformação gerou apenas três colônias transformadas com o gene de interesse. Assim, o presente trabalho propôs a realização de uma nova etapa de transformação de leveduras *P. pastoris* para a obtenção de novos clones.

3. Segunda Etapa do Trabalho: Clonagem e Expressão da endoglucanase (Mh_GH5) de *Myceliophthora heterothallica* em *Pichia pastoris* X-33

Dando continuidade aos experimentos de expressão em leveduras *Pichia pastoris*, devido aos problemas encontrados na primeira parte do trabalho, decidimos alterar o vetor de expressão e a linhagem utilizada. Para esta nova etapa do trabalho, seguem abaixo o novo sistema de expressão e construções gênicas desenvolvidos.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Clonagem e Expressão da endoglucanase de *Myceliophthora heterothallica* em *Pichia pastoris* X-33

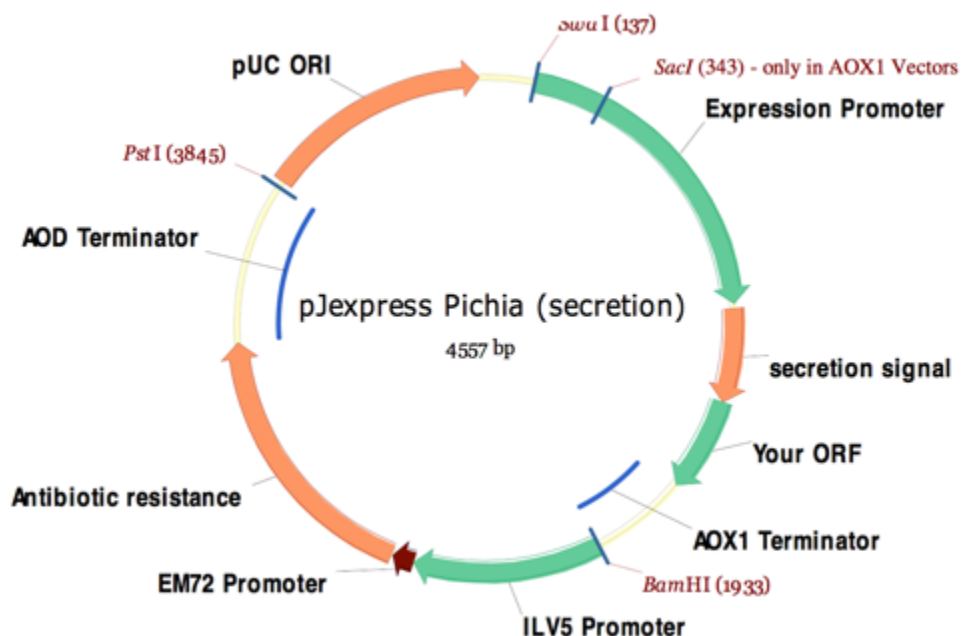
3.1.1.1. Linhagens de microrganismos e plasmídeos

O fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 foi isolado de camas de frango e sua identificação foi realizada em trabalhos anteriores por métodos convencionais e moleculares. A identificação molecular foi realizada através do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico em conjunto com análises filogenéticas descritas em Sette *et al.* (2006) (Zanphorlin *et al.*, 2010). A linhagem de *Escherichia coli* DH5 α (Gibco BRL) foi utilizada para propagação dos plasmídeos (Tabela 1.4 e Figuras 1.14) e a linhagem de *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen) para expressão desta nova endoglucanase de *Myceliophthora heterothallica* (Mh_GH5).

Tabela 1.4. Vetores utilizados em *E. coli* e *P. pastoris*.

Vetor	Tipo de vetor	Tamanho	Característica principal	Origem
pGEM-T	Vetor de clonagem	3 Kb	Vetor de clonagem de produto de PCR	Promega
pJ911	Vetor de Integração	8 Kb	Resistência a geneticina (G418)	DNA 2.0 (USA)

Figura 1.14. Diagrama esquemático do vetor pJ911 (DNA 2.0[®]).



Região	Origem	Função
Promotor AOX1	Sintética, gi:2104960	Promotor AOX1 para expressão induzida com metanol do gene-alvo em <i>Pichia pastoris</i>
Promotor ILV5	CBS7435, linhagem <i>Pichia pastoris</i>	Promotor ILV5 para a expressão do respectivo gene de resistência ao antibiótico em <i>Pichia pastoris</i>
Promotor EM72	Sequência consenso sintética do promotor para <i>E. coli</i>	Promotor constitutivo para a expressão do respectivo gene de resistência ao antibiótico em <i>E. coli</i>
AOX1 Terminator	Sintética, gi:2104960	AOX1 fator de transcrição terminador (TT)
AOD Terminator	CBS7435, linhagem <i>Pichia pastoris</i>	AOD fator de transcrição terminador
KanMX6 CDS	KanMX6	Resistência a kanamicina e geneticina em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> , respectivamente, marca de seleção.
pUC ORI	pBR322, plasmídeo	pUC origem de replicação para <i>E. coli</i>
Sequência-Sinal Alpha	Sintética, gi: 2168568, otimização de códon	Sequência-Sinal de Secreção

3.1.1.2. Construção do vetor de expressão induzida

O produto de PCR, que consiste o cDNA da β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica* foi ligado ao vetor de clonagem “pGEM-T Easy vector” e sequenciado para a confirmação.

Após a confirmação, a sequência codificadora do gene da enzima GH5 (“full-length”) foi purificada e enviada à empresa 96protein[®] (San Francisco, California, EUA). Foram realizados dois tipos de deleções que resultaram em duas construções para a enzima recombinante à ser expressa em *P. pastoris*. A primeira construção derivada desta nova GH5 de *M. heterothallica* compreende a enzima ligada ao domínio de ligação ao substrato (Mh_GH5-CBM1) e a segunda apresentando apenas o domínio de catalítico da enzima (Mh_GH5-CD, criadas com o objetivo de verificar as interações do CBM, CD e o substrato celulósico. As construções foram desenvolvidas sem a sequência codificadora do peptídeo sinal nativa do fungo *M. heterothallica*. As sequências sintéticas foram então sub-clonadas no vetor de expressão pJ911 (DNA 2.0 – San Francisco, CA, USA), responsável pela adição de uma cauda de histidina (His-tag) na região N-terminal das proteínas recombinantes expressas. Um sítio de clivagem, TEV protease, foi inserido entre a His-tag e o gene de interesse, para fins de remoção da His-tag após a purificação.

3.1.1.3. Transformação de *P. pastoris*, Seleção dos clones e Screening em placa

Para integração em *P. pastoris*, 10 μ g de plasmídeo recombinante, pJ911-Mh_GH5, foram linearizados com *SacI* (ThermoScientific) e transformado em *P. pastoris* X-33 (Invitrogen) através do método “Lithium Chloride Transformation Method (Invitrogen)”.

Para o preparo das células quimiocompetentes, a linhagem de *Pichia pastoris* X-33 foi cultivada em 50 mL de meio YPD, a 30°C, sob agitação, até a densidade celular de OD₆₀₀ de 0,8-1,0. As células foram centrifugadas e lavadas com água deionizada estéril e centrifugadas novamente a 1500xg por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, as células foram resuspensas em 1ml de 100 mM LiCl. Em seguida a suspensão de células foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL e centrifugadas em velocidade máxima por 15 segundos. A remoção do LiCl foi realizada com um pipetador automático. Em uma próxima etapa, as células foram ressuspensas em 400µL de 100 mM LiCl. Foram feitas alíquotas de 50 µL em microtubos para microcentrífuga e usados imediatamente.

Para a transformação das células quimiocompetentes, foram fervidos uma amostra de 1 mL de DNA fita simples (*Salmon sperm single-stranded DNA*) por 5 minutos e mantidos em gelo. Em seguida, as células quimiocompetentes foram centrifugadas para a remoção do LiCl.

Para cada transformação, foram adicionados os seguintes reagentes, adicionados nesta ordem (de acordo com o fabricante): 240 µl 50% PEG, 36 µL 1M LiCl, 25 µL 2 mg/ml *single stranded DNA*, 5-10µg vetor de DNA em 50 µL de água. As amostras foram vortexadas vigorosamente até as células estarem homogeneizadas com as soluções adicionadas (~1 minuto). Foram incubadas a 30°C por 30 minutos. Em seguida, aquecidas em banho-maria a 42°C por 20-25 minutos. As células foram então centrifugadas a 6000-8000 rpm e o sobrenadante descartados.

Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%) e incubadas a 30°C sob agitação. Após 1 hora e 4 horas, as células foram plaqueadas em YPD contendo 2mg/mL de geneticina (G418) e incubadas a 30°C.

Os mutantes que apresentaram crescimento no meio YPD+G418 foram selecionados para o screening em placa. O *screening* dos transformantes foi realizado em meio mínimo (MM) com carboximetilcelulose - CMC (YNB 1,34%, biotina 4×10^{-5} %, ágar 2%, CMC 1% e metanol 0,5% a cada 24h), para observação de halos de hidrólise com coloração de *Congo Red*.

3.1.1.4. Indução da Expressão Heteróloga da endoglucanase de *M.heterothallica* em *Pichia pastoris*

Uma colônia isolada foi inoculada em 25mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, 100mM tampão fosfato pH 6,0, YNB 1,34%, biotina 4×10^{-5} %, glicerol 1%) em *Erlenmeyer* de 250mL e incubada a 28°C sob agitação (270rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 2 a 6 (em torno de 16 a 18 horas), as células foram coletadas por centrifugação a 1500xg por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado. As células são ressuspensas em 100mL de meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, 100mM tampão fosfato pH 6,0, YNB 1,34%, biotina 4×10^{-5} %, metanol 0.5%) em *Erlenmeyer* haletado de 1L, obtendo uma OD₆₀₀ 0,4 e incubadas novamente sob as mesmas condições. Metanol 100% foi adicionado a cada 24 horas a uma concentração final de 0,5%, para manter a indução dos transformantes. Nesse mesmo intervalo foi retirado 5mL de cultura, que foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para análise da expressão em gel SDS-PAGE.

O sobrenadante então foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna HisTrap HP™ 5mL, previamente equilibrada com tampão A (25 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl) em sistema FLPC AKTA (GE Healthcare®). A amostra, anteriormente ao momento de injeção, foi suplementada com imidazol, atingindo uma concentração final de 30 mM. As proteínas recombinantes foram então eluídas em um

gradiente linear com o mesmo tampão porém adicionado de 500 mM de imidazol (tampão B). O gradiente de tampão B foi realizado de maneira que no início do processo de purificação utilizou-se 0% de tampão B e ao final 100%. A homogeneidade e o massa molecular das proteínas recombinantes purificadas foram estimadas utilizando a técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE. As proteínas eluídas foram concentradas e dializadas utilizando o tampão A, em concentradores Vivaspín 20 (GE Healthcare®). A determinação da concentração das proteínas expressas foi realizada através do NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®) utilizando os coeficientes calculados a partir da composição predita de aminoácidos.

3.1.1.5. Caracterização Bioquímica das Enzimas Recombinantes

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados de acordo com a literatura entretanto com algumas modificações (REYES-ORTIZ *et al.*, 2013). Para a determinação da temperatura e pH ótimos das enzimas recombinantes, as enzimas foram incubadas em uma solução de 50 mM de tampão citrato (3,0-5,5) e 50 mM de tampão fosfato (6,0-8,0) com 1% de CMC, em microplacas de PCR, com volume total de reação de 60 µl. As soluções de pH variaram de 3,0 a 8,0 e as amostras foram incubadas em termociclador por 30 minutos em temperaturas variando de 30°C a 85°C. Após o período de incubação, a quantificação de açúcares solúveis foi determinada pela técnica colorimétrica de DNS (MILLER, 1959).

As enzimas foram analisadas quanto à estabilidade perante o mesmo intervalo de pH (3,0-8,0) após a incubação de 24 horas em temperatura ambiente, na ausência de substrato. Além disso, analisou-se a termoestabilidade dessas enzimas recombinantes após a incubação em tampão citrato (pH 4,0) por 1 hora em diferentes temperaturas

(30°C-85°C). Em ambas as análises de estabilidade, as atividades enzimáticas residuais foram medidas nas condições padrões de atividade enzimática.

O efeito de íons metálicos e reagentes químicos na atividade de Mh_GH5 foi determinada após a incubação das enzimas na presença de K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Li^+ , EDTA, SDS e β -mercaptoetanol à temperatura ambiente por 1 hora. As atividades residuais foram medidas nas condições padrões de atividade enzimática.

Os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , foram também determinados com tampão citrato (pH 4,0) contendo 3.0 – 39.0 mg/mL de carboximetil celulose (CMC) à 55°C por 30 minutos. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados utilizando regressão não-linear de Michaelis-Menten.

3.1.1.6. Quantificação da concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores nas amostras foram realizadas através da técnica de DNS, como descrito previamente (Miller, 1959). Brevemente, 60 μ l de 2x reagente DNS (1g DNS, 30g KNa tartrate, 20 mL 2N NaOH em 100 mL) foram adicionadas com 60 μ L de sobrenadante das reações. As amostras, após homogeneização, foram incubadas por 5 minutos à 95°C. A leitura da absorbância foi realizada à 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices). Uma unidade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para a liberação de um μ mol de açúcar redutor por minuto sob as condições de análise.

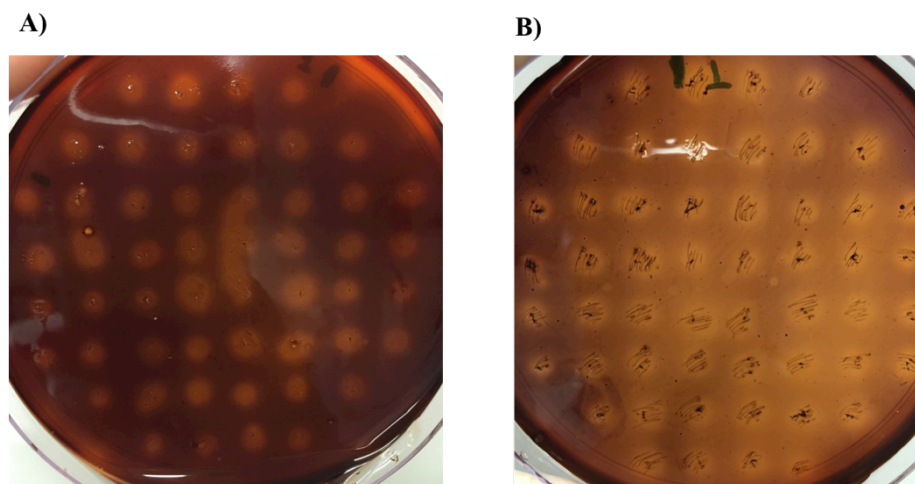
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. Transformação de *P. pastoris*, Seleção dos clones e Screening em placa

A linhagem X-33 de *P. pastoris* foi transformada com os vetores de expressão induzida contendo as construções derivadas da sequência selvagem do gene de β -1,4-endoglucanase (Mh_GH5), chamadas Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD. Os mutantes foram selecionados pela resistência ao antibiótico geneticina (G418) quando cultivados em meio YPD.

A transformação resultou em aproximadamente 52 mutantes com pJ911-Mh_GH5. Para o *screening* em placa dos clones expressando as variantes da endoglucanase de *M. heterothallica* foi realizado o cultivo em meio mínimo (MM) contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. Após 48h de cultivo e coloração com *Congo Red* foram observados os halos de hidrólise nos 104 clones analisados (52 clones Mh_GH5-CBM1 e 52 clones Mh_GH5-CD). Não foram observados diferenças significativas entre os halos de hidrólise (Figura 1.15).

Figura 1.15. Screening em placa em meio MM+CMC (1%) para observação dos halos de hidrólise. A) Mutantes expressando a construção pJ911-Mh_GH5-CBM1; B) Mutantes expressando a construção pJ911-Mh_GH5-CD.



Dois clones, positivo para pJ911-Mh_GH5-CBM1 e pJ911-Mh_GH5-CD, foram então selecionados pra indução em frascos por 120h em 100 mL de meio BMMY,

mantidos a 28°C e 270 rpm. A cada 24h foi retirado 2 mL do sobrenadante para avaliação do perfil protéico em SDS-PAGE (Figura 1.16 e 1.17).

Figura 1.16. SDS-PAGE dos níveis de expressão da proteína expressa Mh_GH5-CBM1, a 28°C, em meio BMMY, 120h. MW: marcador de massa molecular, -: poço sem amostra, 0h – 120h: tempos de expressão amostrados para análise dos níveis de expressão.

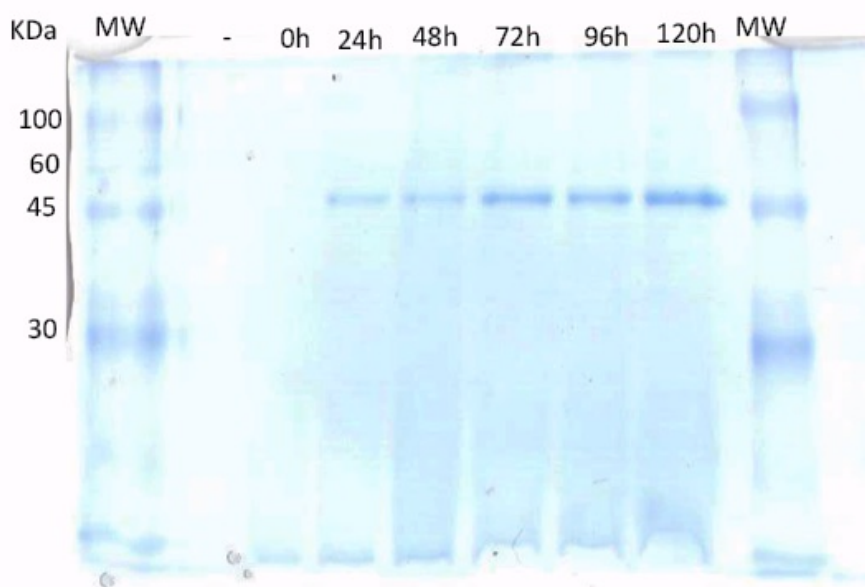
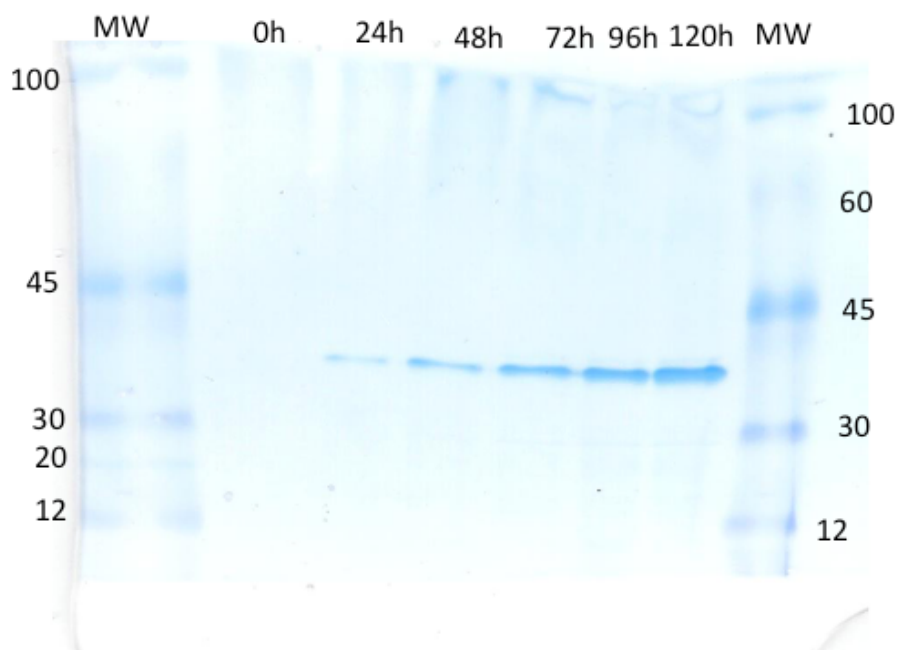


Figura 1.17. SDS-PAGE dos níveis de expressão da proteína expressa Mh_GH5-CD, a 28°C, em meio BMMY, 120h. MW: marcador de massa molecular, 0h – 120h: tempos de expressão amostrados para análise dos níveis de expressão.

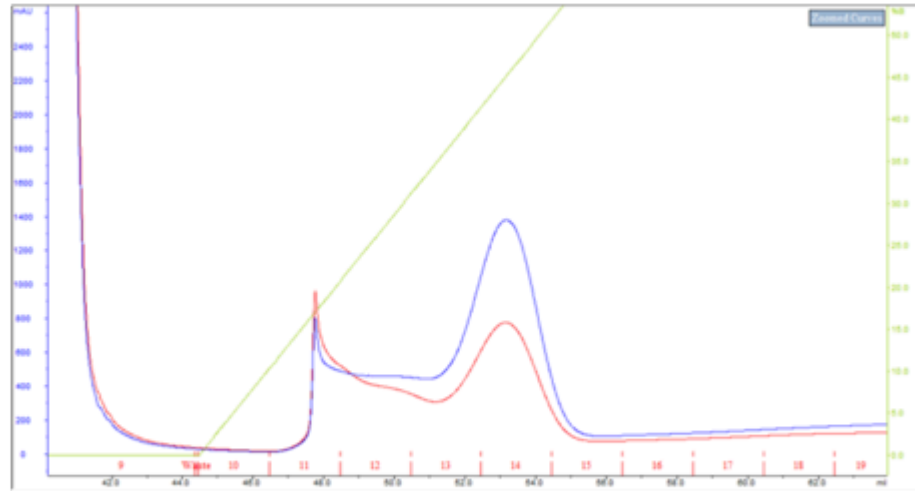


A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE revelou que as proteínas migraram através do gel em bandas únicas com pesos moleculares ~ 45 KDa para Mh_GH5-CBM1 e ~ 35 KDa para Mh_GH5-CD. Os pesos moleculares estão levemente acima da informação predita calculados com base na sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta EXPASY ProtParam, provavelmente devido à presença de glicosilações. As leveduras metilotróficas *P. pastoris* são conhecidas devido ao seu potencial de expressão de proteínas extracelulares e modificações pós-traducionais, como as N-glicosilações (AHMAD *et al.*, 2014).

As enzimas recombinantes expressas em *P. pastoris* foram submetidas ao processo de purificação em colunas de afinidade HisTrap™ 5 mL (GE Healthcare) (Figuras 18 e 19). O rendimento final de proteína para a purificação foi de 1,13 mg por 50 mL de cultura purificada para a construção Mh_GH5-CBM1 e 2,84 mg para Mh_GH5-CD.

Figura 1.18. A) Cromatograma da purificação HisTap™ HP. B) Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CBM1 por cromatografia de afinidade em SDS-PAGE. MW: marcador de massa molecular; Load: amostra injetada; Flow: “flow through, 11-16: frações analisadas.

A)



B)

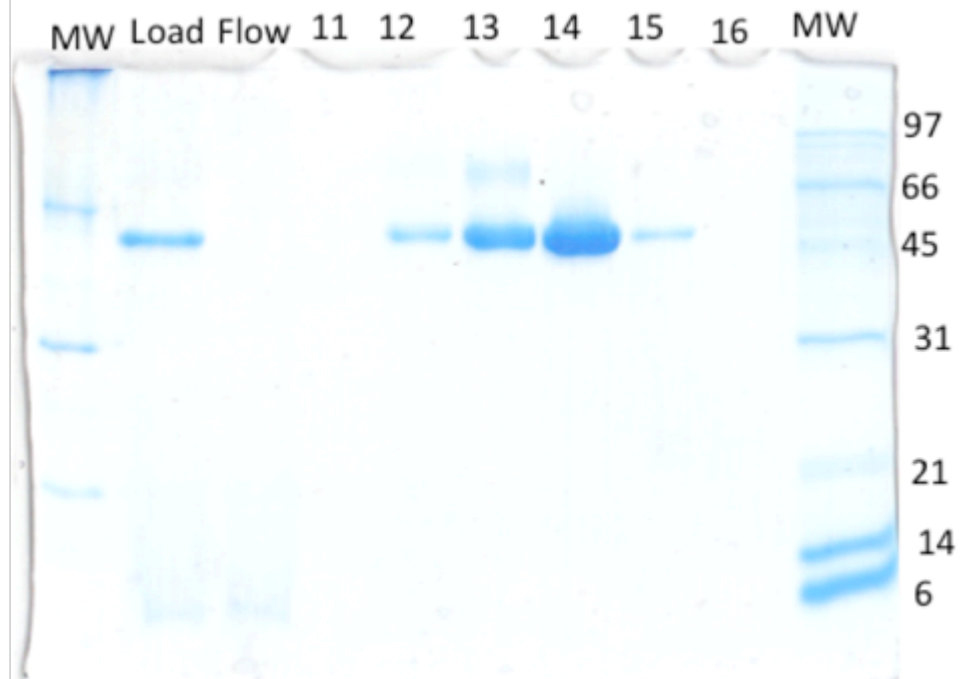
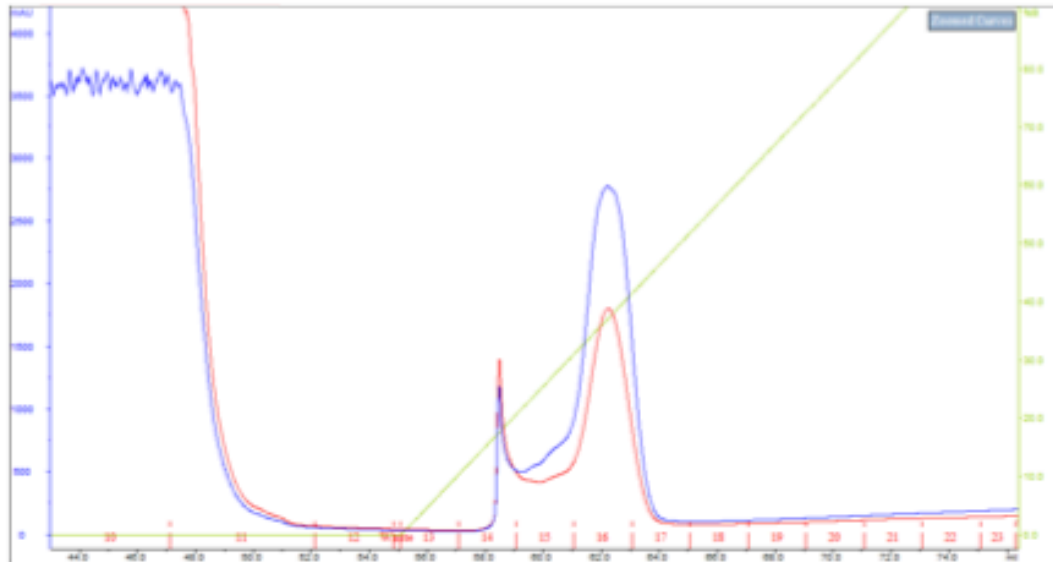
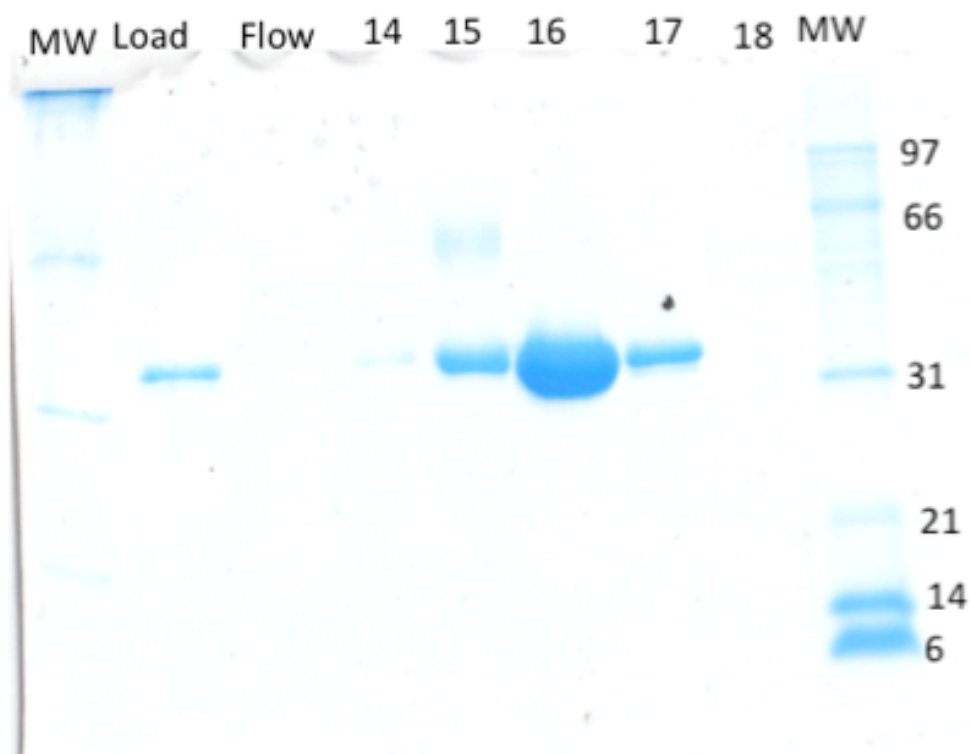


Figura 1.19. A) Cromatograma da purificação HisTap™ HP. B) Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CD por cromatografia de afinidade em SDS-PAGE. MW: marcador de massa molecular; Load: amostra injetada; Flow: “flow through, 11-16: frações analisadas.

A)



B)



3.2.2. Caracterização Bioquímica das endoglucanases recombinantes de *M.*

heterothallica

As enzimas GH5 recombinantes purificadas foram submetidas à caracterização bioquímica. Foram testadas a influência da temperatura (30°C - 85°C) e pH (3,0 – 8,0) na atividade enzimática destas proteínas, utilizando CMC como substrato.

O resultado das análises indicaram que as enzimas são ativas em um amplo intervalo de temperatura, apresentando atividade específica ótima de ~129 U/mg para Mh_GH5-CBM1 e ~152 U/mg para Mh_GH5-CD, à 55°C (Figura 1.20).

A atividade específica ótima com relação aos índices de pH também demonstraram que as enzimas estão ativas em um amplo intervalo de pH. As condições ótimas foram encontradas em pH 4,0, com atividades específicas de 140 U/mg (Mh_GH5-CBM1) e 159 U/mg (Mh_GH5-CD) (Figura 1.21).

Figura 1.20. Efeito da temperatura na atividade enzimática das enzimas recombinantes de *M. heterothallica* utilizando CMC como substrato. As análises foram realizadas em duplicata.

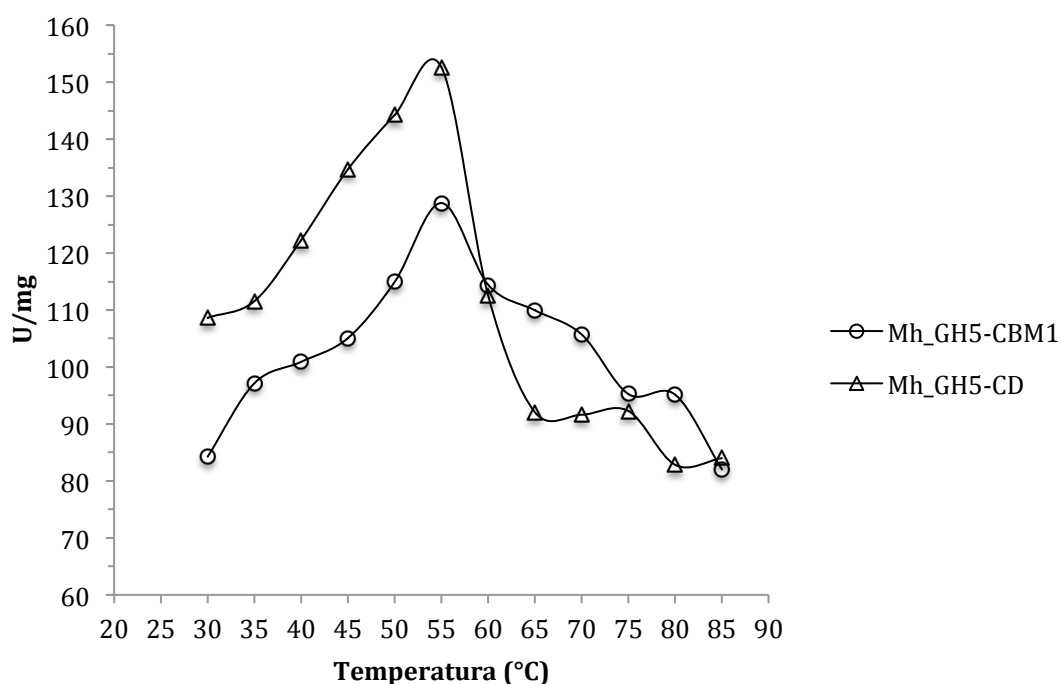
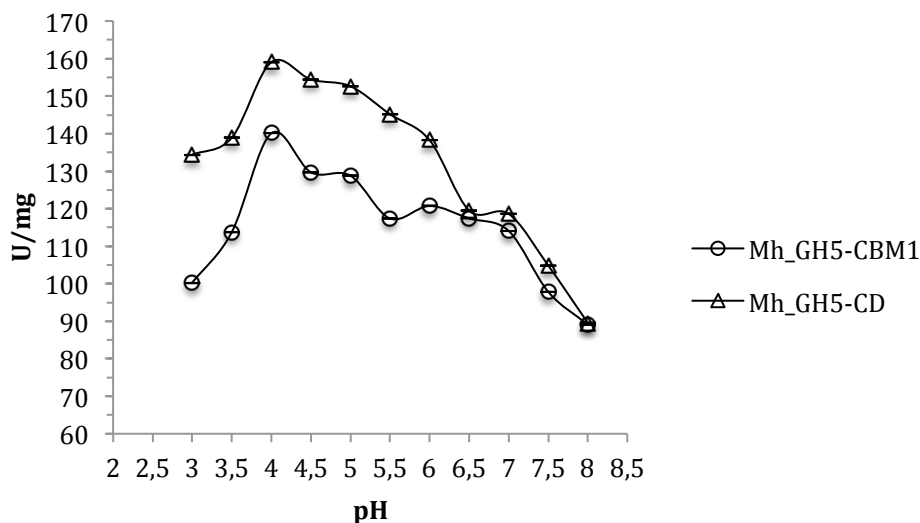


Figura 1.21. Efeito do pH na atividade das enzimas recombinantes de *M. heterothallica* utilizando CMC como sbstrato. As análises foram realizadas em duplicata.



As enzimas recombinantes de *M. heterothallica* expressas em *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen) se mostraram promissoras devido aos elevados índices de atividade específica em um amplo intervalo de temperatura e pH.

Comparando aos dados encontrados com a literatura, Li e colaboradores (2011) expressaram uma endoglucanase de *V. volvacea* em *P. pastoris*. A enzima recombinante apresentou a mesma temperatura ótima que a enzima recombinante de *M. heterothallica* expressa em *P. pastoris* (55°C).

Huy e colaboradores (2015) descreveram a caracterização de uma β -1,4-endoglucanase termoestável recombinante do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. A caracterização bioquímica mostrou que esta enzima termoestável apresentou o mesmo pH ótimo que as enzimas recombinantes de *M. heterothallica* (pH 4,0), dado frequentemente encontrado dentre as endoglucanases. Dave e colaboradores (2015) sugerem que as β -1,4-endoglucanases apresentam ótimos de pH entre 4,0-5,5.

A estabilidade das enzimas heterólogas expressas em *Pichia pastoris* também foi analisada. A utilização de enzimas em processos industriais encontram frequentemente

como problema a inativação térmica dos biocatalizadores. Assim, a estabilidade é um fator crucial em aplicações industriais (DAVE *et al.*, 2015).

A estabilidade de Mh_GH5, para ambas as construções, testadas em um intervalo de temperatura de 30-85°C revelou o perfil demonstrado na figura 1.22. Endo- β -1,4-endoglucanases expressas em *P. pastoris* foram estáveis até 70°C, exibindo ~107% e ~80% da atividade residual após uma hora de incubação. Além disso, as enzimas recombinantes foram mantidas à 70°C por seis horas de incubação e mantiveram a atividade residual em torno de 100% (Figura 1.23).

Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, onde é reportado que a maioria das celulases de origem fúngica termofílica são estáveis dentro do intervalo de temperatura de 55-80°C (DAVE *et al.*, 2015; HARRIS *et al.*, 2014; MORETTI *et al.*, 2012). Dave e colaboradores (2015) relatam que uma endo- β -1,4-endoglucanase de *Thermoascus aurantiacus* apresentou-se estável à 70°C por 8 horas (DAVE *et al.*, 2015).

Figura 1.22. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas recombinantes de *Pichia pastoris*. As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.

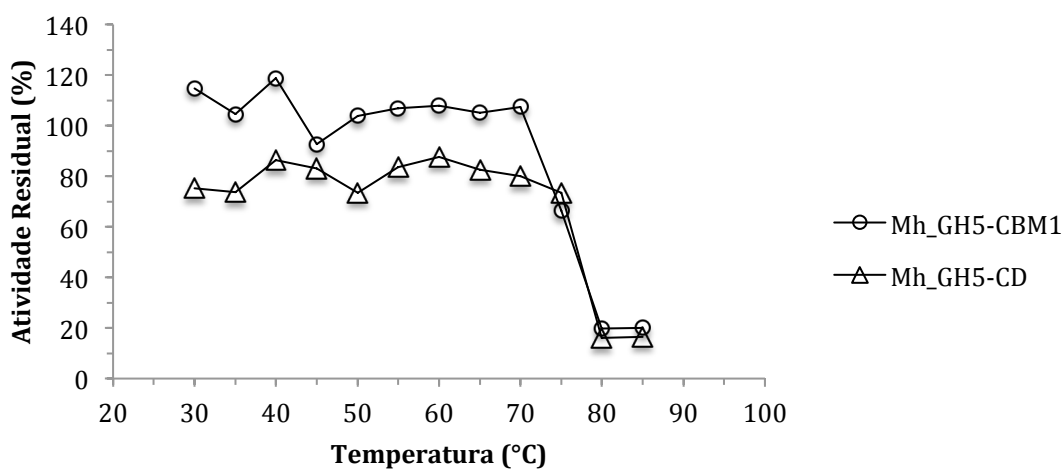
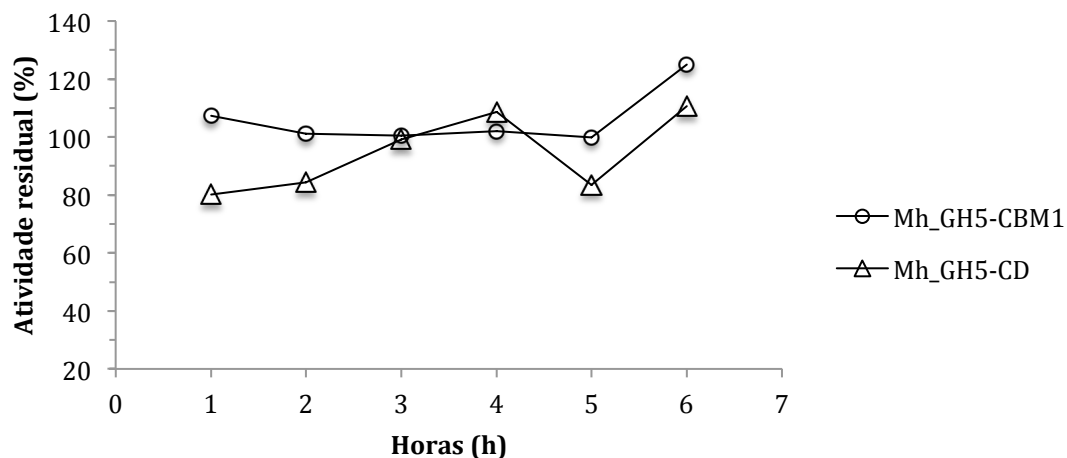
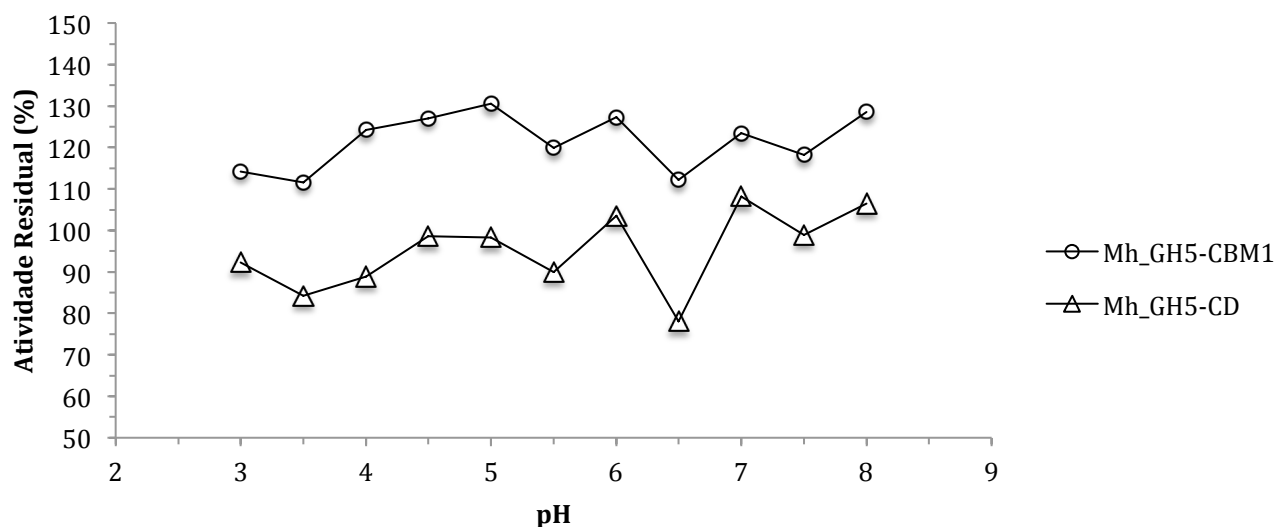


Figura 1.23. Termoestabilidade das enzimas recombinantes de *Pichia pastoris* mantidas à 70°C. As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.



Além da termoestabilidade, o efeito do pH na estabilidade das enzimas expressas em *Pichia pastoris* também foi avaliado. Segundo Dave e colaboradores (2015) a atividade enzimática é afetada pelo pH devido à ligação do substrato e a catálise serem influenciados pela distribuição de cargas tanto nas moléculas de substrato quanto nas enzimas (DAVE *et al.*, 2015). A figura 1.24 demonstra que as enzimas heterólogas se mostraram estáveis em um intervalo de pH de 3,0-8,0, apresentando-se altamente ativas nesta faixa de pH (atividade residuais ~100%) e não apresentam decréscimo da atividade significativo com o aumento do pH. Esse resultado demonstra que essas enzimas são interessantes do ponto de vista industrial, mantendo-se estáveis em um amplo intervalo de pH.

Figura 1.24. Efeito do pH na estabilidade das proteínas recombinantes expressas em *Pichia pastoris*.



O efeito de íons e outros químicos foram testados em diferentes concentrações, 1mM e 5mM. Como demonstrado na tabela 1.5, a adição de íons como K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Li^+ ativaram a atividade enzimática das enzimas recombinantes. Zhang e colaboradores (2015) expressaram uma endoglucanase GH5 de *Thermobifida halotolerans* e demonstraram que a enzima recombinante foi inibida em aproximadamente 70% e 40% na presença de 5mM de Ag^+ e Cd^+ . No caso das enzimas usadas neste estudo, a presença de 5mM de Ag^+ levou a uma ativação de 89% (Mh_GH5-CBM1) e 60% (Mh_GH5-CD). No caso dos íons Cd^+ , a presença de 1mM levou à uma ativação de 42% para Mh_GH5-CBM1. Além disso, Zhang e colaboradores demonstram que a GH5 de *T. halotolerans* em presença de EDTA e SDS apresentou inibição da atividade enzimática. Para Mh_GH5-CBM1 e Mh-GH5-CD expressas em *Pichia pastoris*, a presença de 1mM de EDTA levou à ativação de 14% (Mh_GH5-CBM1) e 8% (Mh-GH5-CD). Quando analisada à ação do SDS, observou-se que a presença de 5 mM ativou as enzimas Mh_GH5-CBM1 e Mh-GH5-CD em 27% e 11%, respectivamente.

As enzimas recombinantes expressas em *Pichia pastoris* apresentaram-se com atividade aumentada em presença dos íons Mn^{2+} , com ativação de 112% e 66% para Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD, respectivamente. Huy e colaboradores (2015) expressaram uma GH5 de *Phanerochaete chrysosporium* em *Pichia pastoris* e reportaram uma ativação de 77% da atividade enzimática na presença de íons manganês, indicando que essa enzima seria dependente do íon Mg^{2+} para uma melhor performance. O íon manganês estaria relacionado com a “hiper-estabilização” do centro catalítico da enzima (ZHANG *et al.*, 2015).

Zhang e colaboradores (2015) ainda reportam a ativação da enzima GH5 de *T. halotolerans* por íons Ca^{2+} (ativação de 27-38%). No presente estudo as enzimas Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD foram ativadas em 52% e 19%, respectivamente. A ativação por íons cálcio estaria provavelmente relacionada à capacidade estabilizar a conformação da enzima levando à uma maior afinidade pelo substrato (ZHANG *et al.*, 2015).

Embora os mecanismos envolvidos nos efeitos de vários íons sobre enzimas recombinantes não estejam esclarecidos, a compreensão da atuação desses íons metálicos na atividade enzimática é importante devido aos processos industriais que requerem sua adição nas várias etapas dos processos envolvidos (ZHANG *et al.*, 2015).

Tabela 1.5. Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos sobre a atividade das endoglucanases heterólogas expressas em *Pichia pastoris*. A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos agentes.

Agentes	Atividade Residual (%)			
	Mh_GH5-CBM1		Mh_GH5-CD	
	1mM	5mM	1mM	5mM
KCl	139,79±0,01	122,59±0,06	108,04±0,08	99,61±0,02
MgCl ₂	122,56±0,05	113,62±0,05	99,85±0,02	107,39±0,02
CuCl ₂	155,86±0,03	149,24±0,01	121,71±0,01	143,40±0,01
MnCl ₂	207,38±0,13	212,62±0,01	147,04±0,01	166,72±0,04
CaCl ₂	128,45±0,019	152,62±0,03	109,21±0,01	119,24±0,03
FeCl ₃	158,84±0,02	172,99±0,01	109,76±0,02	135,85±0,01
CdCl ₂	142,38±0,01	116,93±0,01	100,28±0,03	96,91±0,01
HgCl ₂	121,30±0,01	78,28±0,01	91,82±0,03	73,49±0,04
AgNO ₃	137,56±0,01	189,66±0,01	127,27±0,02	160,47±0,03
EDTA	114,23±0,03	124,09±0,03	108,09±0,04	96,19±0,01
SDS	109,63±0,01	127,09±0,01	101,07±0,01	111,62±0,02
LiCl	124,30±0,02	130,86±0,01	100,89±0,1	101,91±0,05
B-mercaptoetanol	130,02±0,01	134,65±0,02	90,01±0,01	108,30±0,04

Os valores de K_m e V_{max} das β -1,4-endoglucanases recombinantes expressas em *Pichia pastoris* foram determinadas utilizando CMC como substrato entre 3-39 mg/mL. Os valores de K_m e V_{max} foram estimados em 25,7 mg/mL e 150,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para Mh_GH5-CBM1 e para Mh_GH5-CD de 26,8 mg/mL e 171,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Tabela 1.6). Esses dados confirmam os dados encontrados nas atividades enzimáticas dessas enzimas recombinantes de *Pichia pastoris*. Mh_GH5-CD apresentou maiores valores de atividade enzimática quando comparada à Mh_GH5-CBM1. As enzimas não apresentam diferença significativa nos valores de K_m entretanto, apresentou maior V_{max} para Mh_GH5-CD, indicando potencial eficiência catalítica aumentada. Zhang e colaboradores (2015) determinou o K_m e V_{max} de uma GH5 recombinante de *T.*

halotolerans (34,2 mg/ml e 1240 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), demonstrando uma enzima de alta eficiência catalítica.

Dave e colaboradores (2015) analisaram os parâmetros cinéticos de uma β -1,4-endoglucanase *T. aurantiacus*. Os valores reportados de K_m e V_{\max} foram de 37 mg/mL e 82,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Tambor e colaboradores (2012) descreveram os valores de K_m e V_{\max} para uma GH5 recombinante de *Sporotrichum thermophile* - fungo reclassificado como *Myceliophthora thermophila* – estimados em 11,5 g/mL e 194,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Tabela 1.6. Parâmetros cinéticos determinados para as enzimas recombinantes de *Pichia pastoris*.

Enzimas Recombinantes	K_m (mg/mL)	V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Mh_GH5-CBM1	25,729 \pm 5,93	150,27 \pm 18,08
Mh_GH5-CD	26,863 \pm 8,52	171,53 \pm 28,92

4. CONCLUSÃO

Uma nova β -1,4-endoglucanase de *M. heterothallica* foi identificada e eficientemente expressa em leveduras metilotróficas *P. pastoris*. Duas construções derivadas da nova β -1,4-endoglucanase foram desenvolvidas, Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD. As características bioquímicas mostraram que as enzimas recombinantes apresentam pH e temperatura ótimas de 4,0 e 55°C, respectivamente e, se mostraram ativas em um amplo intervalo de pH (3,0-8,0) e temperatura (30°C-85°C). Além disso, as enzimas recombinantes expressas em *Pichia pastoris* se mostraram estáveis após a incubação de 6 horas à 70°C.

Alguns componentes como íons, quelantes, detergentes e agentes químicos foram colocados em contato com a enzima para avaliação da sua inibição ou ativação. A maior influência foi observada na presença de 5mM do íon Mn^{2+} , aumentando a atividade enzimática em 112% e 60%, para as construções Mh_GH5-CBM1 e MH_GH5-CD, respectivamente. Com relação aos parâmetros cinéticos as enzimas demonstraram, comparado com outras endoglucanases da família GH5, eficiência catalítica promissora. Além disso, observamos que enzima contendo apenas o domínio catalítico apresentou maior índice de V_{max} , apomtando maior eficiência na hidrólise do substrato.

As enzimas recombinantes de *Myceliophthora heterothallica* apresentaram inúmeras características interessantes, incluindo perfil acidofílico, resistência à íons metálicos e estabilidade em altas temperaturas. Essas características tornam essas enzimas ideais para aplicações industriais, com destaque para a produção de etanol celulósico, indústria têxtil e aplicações na indústria de detergentes. Vários trabalhos mostram a expressão de celulasas de fungos no entanto esse é o primeiro relato de expressão da endoglucanase do fungo *Myceliophthora heterothallica*.

Capítulo 2

**Expressão Heteróloga, Purificação e Caracterização Parcial da
Endoglucanase de *Myceliophthora heterothallica* em *Escherichia coli***

&

**Análise Estrutural do Domínio catalítico da Endoglucanase
recombinante (Mh_GH5-CD) de *Myceliophthora heterothallica***

RESUMO

Uma nova glicosil hidrolase pertencente à família 5 (GH5) foi identificada no secretoma do fungo *M. heterothallica* e expressa eficientemente em *Escherichia coli*. A enzima apresenta na região N-terminal um módulo de ligação ao substrato (CBM), identificado como membro da família 1. Duas construções desta enzima foram analisadas, Mh_GH5 ligada ao domínio de ligação ao substrato (Mh_GH5-CBM1) e uma segunda construção compreendendo apenas o domínio catalítico da enzima (CD) – Mh_GH5-CD. As endoglucanases recombinantes foram submetidas à caracterização. As enzimas recombinantes apresentaram as mesmas características bioquímicas, com temperatura ótima à 60°C e pH ótimo de 4,0, demonstrando ser ativadas na presença de íons Mn^{2+} e, mantêm-se ativas após 6 horas de incubação à 55°C. A construção Mh_GH5-CD demonstrou-se cataliticamente mais eficiente quando comparada com a enzima ligada ao CBM (Mh_GH5-CBM1), com índices de atividade enzimática e V_{max} (136,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) mais elevados. Análises estruturais foram realizadas para avaliar as características envolvidas na termoestabilidade de Mh_GH5-CD. A estrutura do cristal da enzima recombinante Mh_GH5-CD foi determinada à 1.1 Å pelo método de substituição molecular. A estrutura de Mh_GH5-CD apresenta uma arquitetura frequentemente encontrada dentre os membros da família de GH5, $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel. Os resíduos Glu216 e Glu323 estão envolvidos na catálise da enzima, como resíduos ácido-base e nucleófilo, respectivamente. A informação estrutural obtida de Mh_GH5-CD fornece informações importantes que contribuem para estudos futuros de engenharia genética de novas celulases objetivando a construção de enzimas termorresistentes e/ou cataliticamente mais eficientes necessárias para a conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis ou compostos químicos biossintetizados.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Linhagens de microrganismos, plasmídeos e reagentes químicos

As linhagens de bactérias e plasmídeos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 2.1. Os meios de cultura Luria-Bertani (LB) e Terrific Broth (TB) foram utilizados para as culturas de *Escherichia coli*. 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D- galactopiranosídeo (X-Gal), isopropyl β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e os antibióticos (ampicilina e kanamicina) foram adquiridos da companhia Sigma-Aldrich (EUA) e foram utilizados para a seleção dos clones recombinantes. Todos os outros reagentes foram adquiridos das empresas Milipore-Novagen (EUA), Promega (EUA) and Invitrogen (EUA).

Tabela 2.1. Linhagens de *E. coli* e plasmídeos utilizados

Linhagens e Plasmídeos	Descrição	Origem
<i>Linhagens</i>		
<i>E. coli</i> Top10	Linhagem destinada à clonagem	Invitrogen (USA)
<i>E. coli</i> Origami2(DE3) pLysS	Linhagem destinada à expressão	Novagen (USA)
<i>Plasmídeos</i>		
pGEM-T easy	Vetor de clonagem	Promega (USA)
pSKB3	Vetor de expressão	Addgene (USA)
pGEM-T-Mh_GH5	Vetor de clonagem recombinante	Desenvolvido neste estudo
pSKB3-Mh_GH5	Vetor de expressão recombinante	Desenvolvido neste estudo

1.2. Clonagem do cDNA da enzima GH5 do fungo *Myceliophthora heterothallica*

F.2.1.4

O fungo termofílico *M. heterothallica* F.2.1.4 foi isolado de camas de frango. A identificação molecular foi realizada através do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico associada à análises filogenéticas como descrito por Sette et al. (2006) em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (ZANPHORLIN *et al.*, 2010). O isolamento do gene foi realizado como descrito previamente no capítulo anterior onde o fungo filamentososo *M. heterothallica* foi cultivado em meio sólido contendo 2% de carboximetilcelulose, como única fonte de carbono, para a indução de genes codificadores de endoglucanases. Em seguida foi realizado a extração do RNA total, utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Na sequência, a síntese do cDNA foi obtida através do “Superscript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen). O gene da endoglucanase GH5 de *M. heterothallica* foi amplificado utilizando o cDNA como molde, através da técnica de PCR com os oligonucleotídeos “forward” 5’-ATGAAGTCCTCCATCCTCG-3’ e reverso 5’-TTACGGCAAGTACTTCTTCAAG-3’ (TAMBOR *et al.*, 2012). Para a reação de amplificação utilizou-se uma unidade da enzima Taq polimerase “High Fidelity” PFU. As condições utilizadas foram: 95°C 5 min, 95°C 30 sec, 65°C 1 min and 72°C 2 min (30 ciclos). A extensão final foi realizada à 72°C por 5 min. A ORF amplificada foi clonada no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega[®]) e sequenciada para a verificação dos insertos.

1.3. Análise da sequência

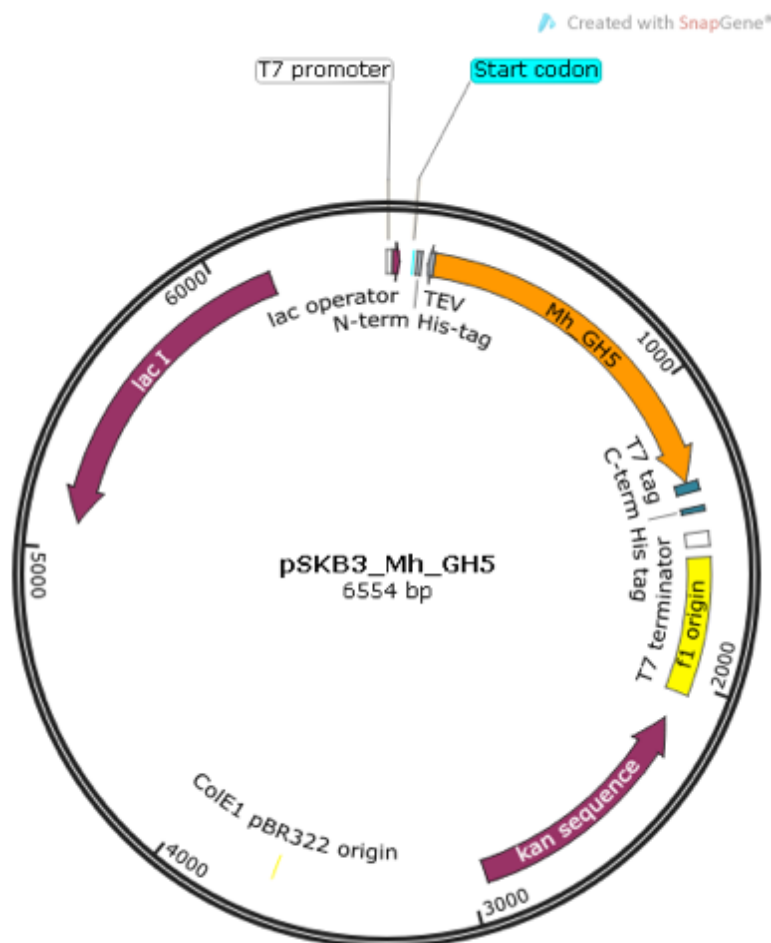
A sequência de DNA e proteína foram alinhadas utilizando a ferramenta BLASTn e BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), respectivamente. O

alinhamento múltiplo de sequências foi obtido através do software ClustalW. O peptídeo sinal foi predito pelo “SignalP 4.0 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Os potenciais sítios de N-glicosilação e O-glicosilação foram identificados online (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

1.4. Expressão Heteróloga da endoglucanase de *M. heterothallica* em *Escherichia coli*

A sequência codificadora do gene da enzima GH5 (“full-length”) foi purificada e enviada à 96protein[®] (San Francisco, California, EUA). Foram realizados dois tipos de deleções que resultaram em duas construções para a enzima recombinante a ser expressa em *E. coli*. A primeira construção derivada desta nova GH5 de *M. heterothallica* compreende a enzima ligada ao domínio de ligação ao substrato (Mh_GH5-CBM1) e a segunda apresentando apenas o domínio catalítico da enzima (Mh_GH5-CD). As construções foram desenvolvidas sem a sequência codificadora do peptídeo sinal nativa do fungo *M. heterothallica*. As sequências recombinantes foram então sub-clonadas no vetor de expressão pSKB3 (PEREIRA *et al.*, 2009), responsável pela adição de uma cauda de histidina (His-tag) na região N-terminal das proteínas recombinantes expressas. Um sítio de clivagem, TEV protease, foi inserido entre a His-tag e o gene de interesse, para fins de remoção da His-tag após a purificação. Os plasmídeos resultantes pSKB3-Mh_GH5 (Figura 2.1) foram transformadas em *E. coli* Origami2 (DE3) pLysS (Novagen).

Figura 2.1. Mapa do vetor de expressão pSKB3 associado ao gene de interesse Mh_GH5 - gerado para ambas as construções Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD.



Os transformantes de *E. coli* foram cultivados em 50 mL de meio LB e TB suplementados com 30 µg/mL de Kanamicina, à 37°C até a densidade óptica (DO₆₀₀) atingir 1.0, então a cultura foi induzida com 0.5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Essas culturas foram incubadas “overnight” à 20°C, 30°C e 37°C sob agitação (180 rpm). Os “pellets” de célula foram coletados por centrifugação a 5000xg por 15 minutos. A massa celular referente a um mililitro de cultura foi

resuspendida em 400 μ L de tampão de lise – ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-(2-etanosulfônico (HEPES) e 50mM NaCl, pH 7,5. A lise celular foi obtida com a utilização do sonicador Sonicator 3000 (Misonix, Inc). Após a lise celular as amostras foram centrifugadas a 15000xg por 10 minutos para a remoção total de resíduos celulares. Eletroforese SDS-PAGE foi utilizada para a análise das proteínas expressas.

1.5. Otimização da produção das endoglucanases recombinantes de *M. heterothallica* e Purificação

Após a determinação das melhores condições para a expressão das proteínas recombinantes, os transformantes foram cultivados à 37°C em 1 litro de meio de cultura TB suplementado com 30 μ g/mL de kanamicina. Assim que a cultura atingiu a densidade óptica (DO₆₀₀) de 1.0, realizou-se a indução da expressão adicionando-se 0.5 mM de IPTG e, a incubação foi realizada à 20°C por 24h. Subsequentemente, as células foram recuperadas por centrifugação (5000xg por 15 minutos) e ressuspendidas em tampão (25 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0.1mg/mL Lysozyme, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 10 μ g/mL DNase, 1X Protease inhibitor Sigma[®]). A lise celular foi realizada pelo método de “*French Press*” e, o lisado celular foi centrifugado para a remoção dos resíduos celulares (15000xg por 10 minutos à 4°C). O sobrenadante então foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna HisTrap HP[™] 5mL, previamente equilibrada com tampão A (25 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl) em sistema FLPC AKTA (GE Healthcare[®]). A amostra, anteriormente ao momento de injeção, foi suplementada com imidazol, atingindo uma concentração final de 30 mM. As proteínas recombinantes foram então eluídas em um gradiente linear com o mesmo tampão porém adicionado de 500 mM de imidazol (tampão B). O gradiente de tampão B foi realizado de maneira que no início do processo de purificação utilizou-se 0% de

tampão B e ao final 100%. A homogeneidade e a massa molecular das proteínas recombinantes purificadas foram estimadas utilizando a técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE. As proteínas eluídas foram concentradas e dialisadas utilizando o tampão A, em concentradores Vivaspin 20 (GE Healthcare[®]). A determinação da concentração das proteínas expressas foi realizada através do NanoDrop 2000 (Thermo Scientific[®]) utilizando os coeficientes calculados a partir da composição predita de aminoácidos.

1.6. Testes de cristalização

As proteínas recombinantes foram concentradas e dialisadas com o tampão 25mM HEPES (pH 7,5) contendo 50 mM NaCl. A concentração final das proteínas, ambas as construções, durante os testes de cristalização foi de 11 mg/mL. As proteínas foram analisadas de acordo com estratégia da matriz esparsa (ou fatorial incompleto) (JANCARIK E KIM, 1991), com utilização do robô “Phenix Robot” (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, CA) e com os seguintes soluções (“screens”) de cristalização: CrysNa Screen, PEG/Ion and PEGRx (Hampton Research[®], Aliso, Viejo, CA), Berkeley Screen (JAVIDPOUR *et al.*, 2013) e MCSG1 screen (Microlytic[®]).

Mh_GH5-CD também foi co-cristalizada, nas mesmas condições citadas acima, porém adicionando-se 5mM de celobiose como substrato. Em seguida, os cristais obtidos foram incubados com 20mM de celobiose pela técnica de “soaking” a fim de analisar o sítio de ligação do substrato a esta nova endoglucanase de *M. heterothallica* (Mh_GH5-CD).

1.7. Coleta de dados utilizando radiação sincrotron e Análise Estrutural

Para a coleta de dados de raios X os cristais de Mh_GH5-CD foram selecionados, envoltos em uma solução crio-protetora de glicerol (20%) e em seguida congelados em nitrogênio líquido. Os conjuntos de dados de difração de raios X foram coletados no “Berkeley Center for Structural Biology”, linha (beamline) 8.2.2, no “Advanced Light Source” do “Lawrence Berkeley National Laboratory” (Berkeley, California, EUA). Os dados de difração foram detectados utilizando um detector ADSC-Q315r. Os dados foram processados utilizando o programa HKL-2000 (OTWINOWSKI E MINOR, 1997).

A estrutura do cristal de Mh_GH5-CD foi determinada pela técnica de substituição molecular com o programa PHASER (MCCOY *et al.*, 2007) localizado dentro do pacote de programas PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010), utilizando como modelo a estrutura de uma endoglucanase pertencente à família de glicosídeo hidrolase 5 de *Thermoascus aurantiacus* (PDB: 1GZJ) (LEGGIO E LARSEN, 2002), a qual demonstra 60% de identidade com a proteína-alvo. As posições atômicas obtidas da substituição molecular e o mapa de elétron-densidade foram utilizadas para a construção da estrutura de Mh_GH5-CD e para iniciar a etapa de refinamento cristalográfico e modelagem. O refinamento da estrutura foi realizada usando o programa “Phenix refine” (AFONINE *et al.*, 2009). A modelagem manual, realizada com a utilização do programa COOT (EMSLEY E COWTAN, 2004) e, a adição de moléculas de água permitiram a construção do modelo final. Cinco por cento do dado coletado foi selecionado randomicamente para validação do modelo. O modelo final de Mh_GH5-CD apresenta Rfactor de 12.1% e Rfree de 13.3%.

1.8. Caracterização Bioquímica das Enzimas Recombinantes

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados de acordo com a literatura entretanto com algumas modificações (REYES-ORTIZ *et al.*, 2013). Para a determinação da temperatura e pH ótimos das enzimas recombinantes, as enzimas foram incubadas em uma solução de 50 mM de tampão citrato (3,0-5,5) e 50 mM de tampão fosfato (6,0-8,0) com 1% de CMC, em microplacas de PCR, com volume total de reação de 60 μ l. As soluções de pH variaram de 3.0 a 8.0 e as amostras foram incubadas em termociclador por 30 minutos em temperaturas variando de 30°C a 85°C. Após o período de incubação, a quantificação de açúcares solúveis foi determinada pela técnica colorimétrica de DNS (MILLER, 1959).

As enzimas foram analisadas quanto à estabilidade perante o mesmo intervalo de pH (3,0-8,0) após a incubação de 24 horas em temperatura ambiente, na ausência de substrato. Além disso, analisou-se a termoestabilidade dessas enzimas recombinantes após a incubação em tampão citrato (pH 4,0) por 1 hora em diferentes temperaturas (30°C-85°C). Em ambas as análises de estabilidade, as atividades enzimáticas residuais foram medidas nas condições padrões de atividade enzimática.

O efeito de íons metálicos e reagentes químicos na atividade de Mh_GH5 foi determinada após a incubação das enzimas na presença de K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Li^+ , EDTA, SDS e β -mercaptoetanol à temperatura ambiente por 1 hora. As atividades residuais foram medidas nas condições padrões de atividade enzimática.

Os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , foram também determinados com tampão citrato (pH 4,0) contendo 3.0 – 39.0 mg/ml de carboximetil celulose (CMC) à 55°C por

30 minutos. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados utilizando regressão não-linear de Michaelis-Menten.

1.9. Quantificação da concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores nas amostras foram realizadas através da técnica de DNS, como descrito previamente (MILLER, 1959). Brevemente, 60 μ l de 2x reagente DNS (1g DNS, 30g KNa tartrate, 20 ml 2N NaOH em 100 ml) foram adicionadas com 60 μ l de sobrenadante das reações. As amostras, após homogeneização, foram incubadas por 5 minutos à 95°C. A leitura da absorbância foi realizada à 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices). Uma unidade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para a liberação de um μ mol de açúcar redutor por minuto sob as condições de análise.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

M. heterothallica é um bom produtor de endoglucanase com um total de atividade endoglucanásica de 31 U/ml após 360h de cultivo. Um fragmento de 1170pb foi identificado no cDNA. A região codificadas do gene foi clonada no vetor pGEM-T Easy vector (Promega[®]) e sequenciada para a verificação dos insertos.

2.1. Análise da sequência

A sequência predita de aminoácidos de *M. heterothallica* exibiu 100% de similaridade com a sequência de uma GH5 β -1,4-endoglucanase de *Myceliophthora thermophila* (GenBank: HQ163779.1). O alinhamento da sequência de *M. heterothallica* com outras β -1,4-endoglucanase originárias de fungos e bactérias revelou

que este gene isolado representa uma sequência típica de membros da família GH5 (Figura 2.2). A análise através do software Signal IP permitiu a identificação de uma sequência referente ao peptídeo sinal de *M. heterothallica*, a sequência predita compreende os resíduos de número 1 ao 16. Um módulo de ligação ao substrato foi também identificado, resíduos 17-52, a qual estaria conectado ao domínio catalítico (CD – resíduos 85-389) por meio de uma região denominada “linker” (31 resíduos – 53-84). A proteína compreende 389 aminoácidos com ponto isoelétrico predito de 5.19 e massa molecular de aproximadamente 42 kDa. Análises subsequentes permitiram a identificação de três possíveis sítios de N-glicosilação.

Os resíduos conservados Glu216 e Glu323, identificados como responsáveis pela catálise da enzima, estão localizados na região C-terminal de folha β -4 (ácido/base) e β -7 (nucleofilo) desta nova endoglucanase de *M. heterothallica*, respectivamente. Comparando os dados coletados da *M. heterothallica* com estruturas de GH5 disponíveis no banco de dados “RCSB Protein Data Bank”, identificou-se três outros resíduos estritamente conservados, Arg132, Asn215 e Trp356. De acordo com a literatura esses resíduos estariam envolvidos com a ligação da enzima ao substrato (PEREIRA *et al.*, 2010; HENRISSAT E DAVIES, 1997).

2.2. Expressão Heteróloga da endoglucanase de *M. heterothallica* em *Escherichia coli* e Purificação das enzimas recombinantes

O gene codificante para a GH5, sem a sequência referente ao peptídeo sinal do fungo termofílico *M. heterothallica*, ligado ao módulo de ligação do substrato (construct 1: Mh_GH5-CBM1) e Mh_GH5 sem o sequência referente ao CBM1 (construct 2: Mh_GH5-CD) foram subclonados no vetor de expressão pSKB3, gerando os vetores de expressão recombinantes pSKB3-Mh_GH5-CBM1 e pSKB3-Mh_GH5-CD, os quais foram transformados na linhagem de *Escherichia coli* Origami2 (DE3) pLysS (Novagen[®]). Os transformantes foram analisados para a expressão em meios de cultura LB e TB utilizando o método de indução por IPTG. O protocolo de crescimento foi realizado em duas etapas (37°C para o crescimento celular e 20°C, 30°C e 37°C para o teste de expressão de proteínas heterólogas, sob agitação 180 rpm) (CHEN *et al.*, 2013). Os melhores níveis de expressão das proteínas recombinantes foi observado em meio TB à 20°C (Figura 2.3-2.4)

Figura 2.3. SDS-PAGE dos níveis de expressão das proteínas recombinantes Mh_GH5 testadas a 20°C, 30°C e 37°C em meio de cultura “Terrific Broth” - TB. M: molecular weight markers, I: frações insolúveis, S: frações solúveis.

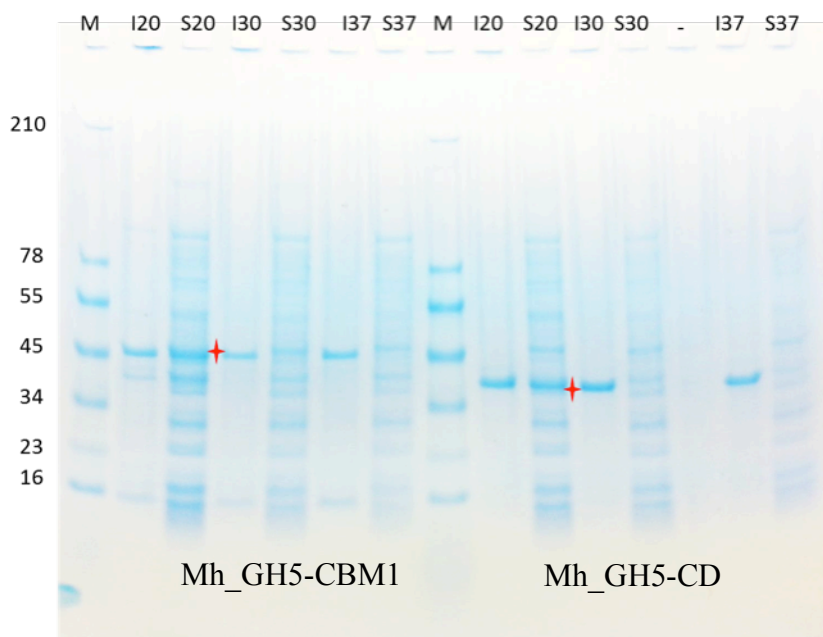
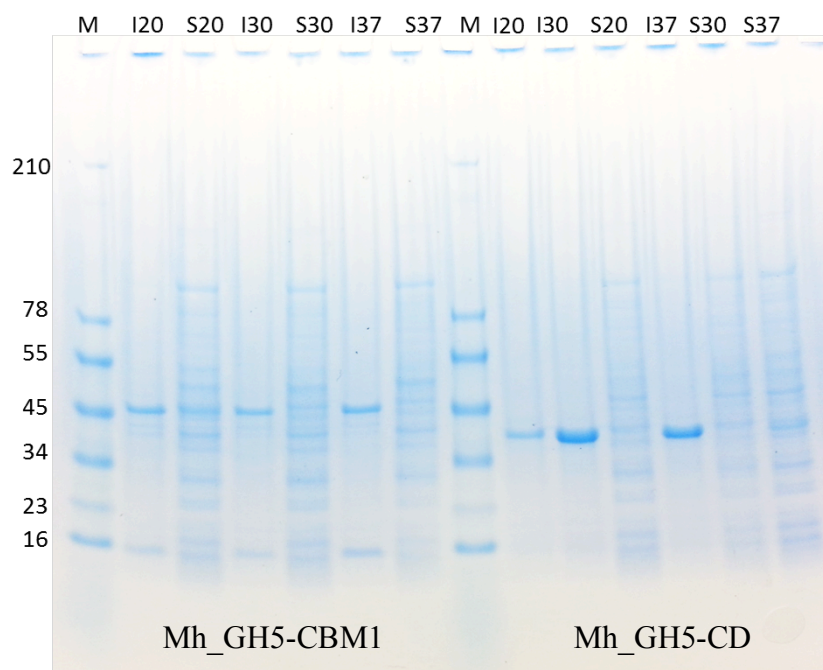


Figura 2.4. SDS-PAGE dos níveis de expressão das proteínas recombinantes Mh_GH5 testadas a 20°C, 30°C e 37°C em meio de cultura Luria Bertani - LB. M: molecular weight markers, I: frações insolúveis, S: frações solúveis.



Após a determinação dos melhores parâmetros para a expressão solúvel das proteínas recombinantes, os transformantes foram cultivados em um litro de meio TB à 20°C (Figura 2.5). As enzimas recombinantes expressas em *E. coli* foram submetidas ao processo de purificação em colunas de afinidade HisTrap HP™ 5ml (GE Healthcare). A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE revelou que as proteínas migraram através do gel em bandas únicas com pesos moleculares de 41 KDa para Mh_GH5-CBM1 e 34 KDa para Mh_GH5-CD (Figura 2.6-2.7). Os pesos moleculares estão de acordo com a informação predita calculados com base na sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta EXPASY ProtParam. O rendimento final de proteína para a purificação foi de 11mg/ml por litro de cultura purificada ($V_{\text{final}}= 1\text{ml}$)

Figura 2.5. SDS-PAGE referente à otimização da expressão das endoglucanases recombinantes de *M. heterothallica*. M: molecular weight marker; C1I, Mh_GH5-CBM1 fração insolúvel; C1S, Mh_GH5-CBM1 fração solúvel; C2I, Mh_GH5-CD fração insolúvel; C2S, Mh_GH5-CD fração solúvel.

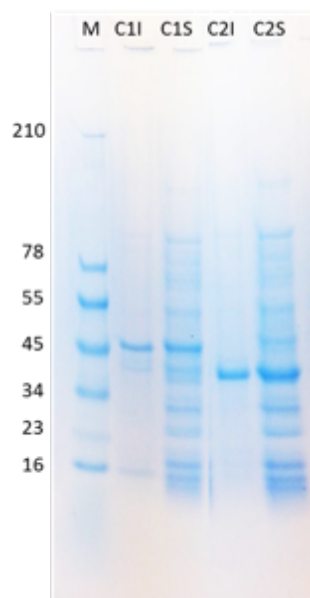


Figura 2.6. A. Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CBM por cromatografia de afinidade de em SDS- PAGE. M: molecular weight marker; I: fração insolúvel, Lo: amostra injetada – extrato inicial, Fl: “flow through”, B11 – B6, frações analisadas. B. Cromatograma da purificação HisTrap™ HP.

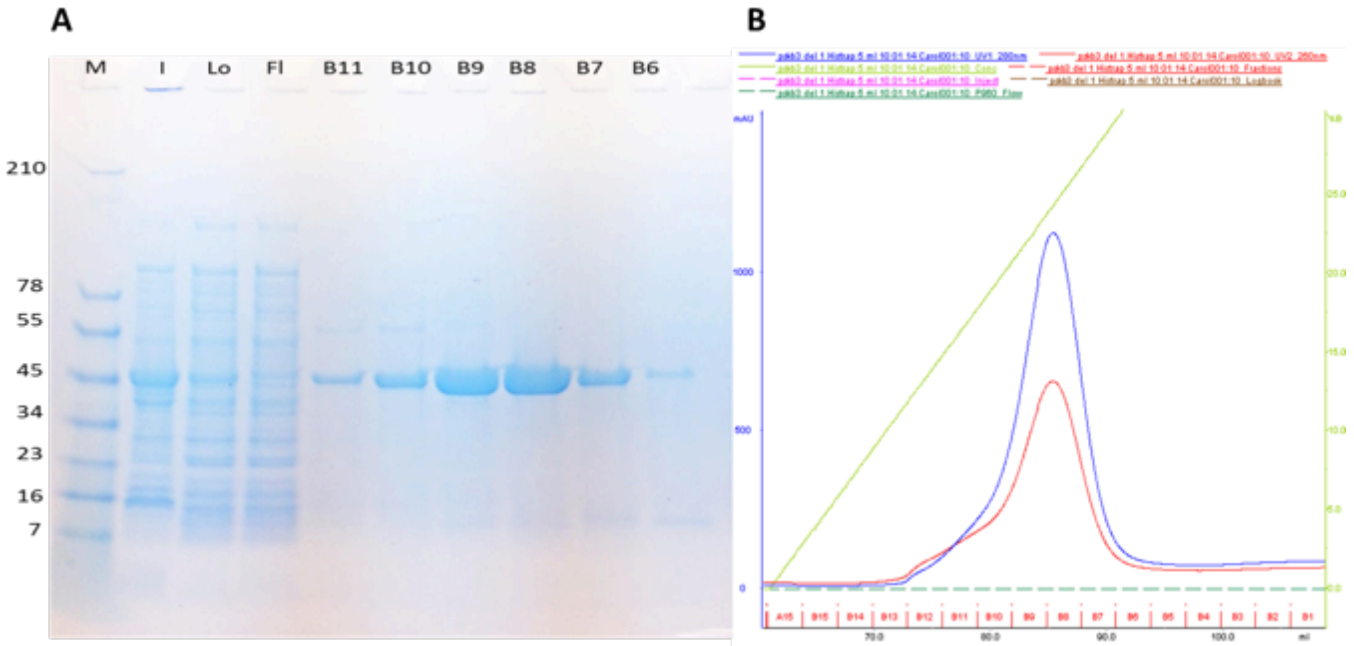
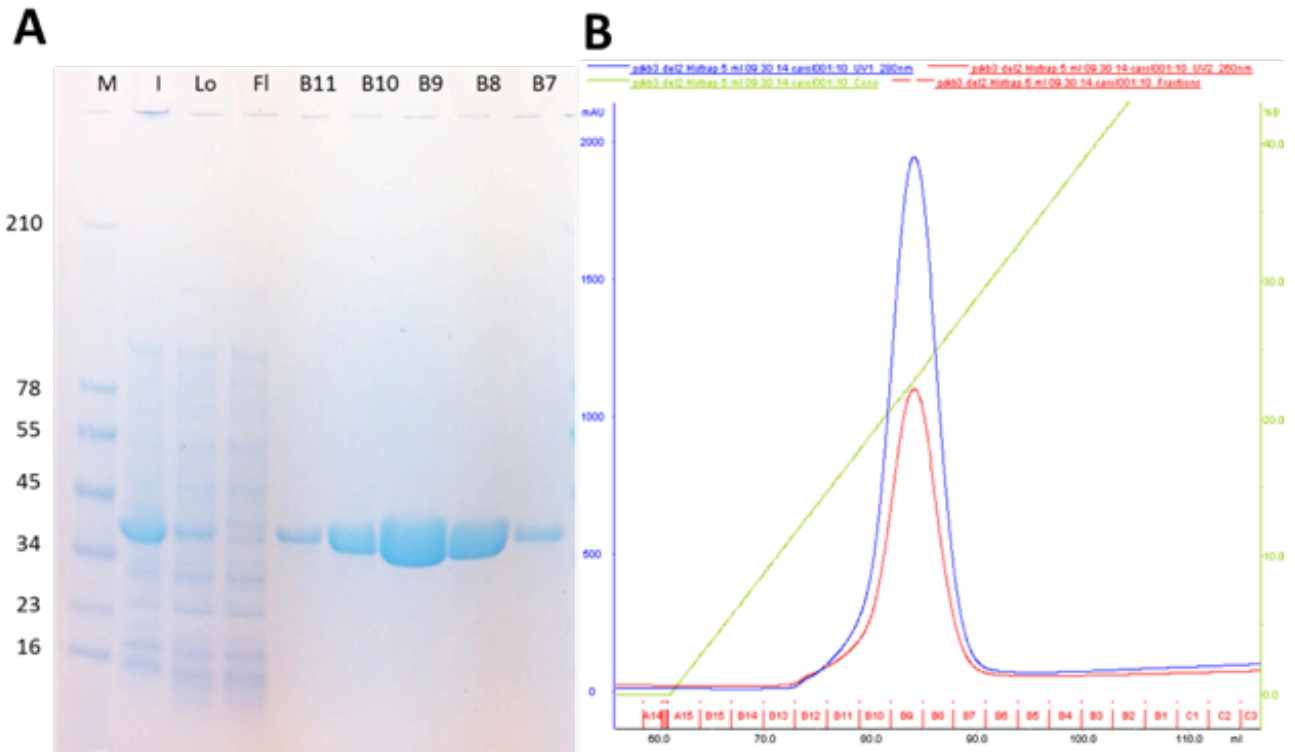


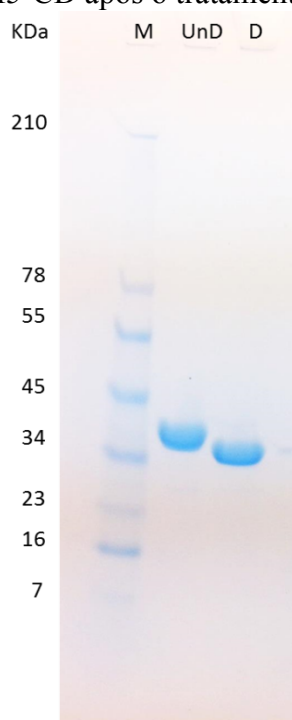
Figura 2.7. A. Análise da purificação da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CD por cromatografia de afinidade de em SDS- PAGE. M: molecular weight marker; I: fração insolúvel, Lo: amostra injetada – extrato inicial, Fl: “flow through”, B11 – B7, frações analisadas. B. Cromatograma da purificação HisTrap™ HP.



2.3. Remoção da cauda de Histidina – His-tag

A remoção da His-tag da enzima heteróloga Mh_GH5-CD foi realizada através de tratamento com a protease TEV. Após a incubação “overnight” à 4°C, a proteína foi novamente submetida ao processo de purificação de afinidade em coluna HisTrap HP™ 5ml (GE Healthcare), como descrito anteriormente (Figura 2.8). A proteína purificada Mh_GH5-CD sem His-tag também foi utilizada nos testes de cristalização.

Figure 2.8. Análise SDS-PAGE da enzima recombinante Mh_GH5-CD purificada após a remoção da “His-tag”. M: molecular weight marker; UnD: Mh_GH5-CD não tratada com a protease TEV; D: Mh_GH5-CD após o tratamento com a protease TEV.



2.4. Testes de cristalização

Cristais da enzima heteróloga Mh_GH5-CD foram obtidas em duas condições de cristalização. A primeira condição foi 0.03M ácido cítrico, 0.07M Bis-tris propano pH 7,6 e 20% de Polietileno glicol (PEG) 3350 (Figura 2.9). A segunda condição de cristalização em que foi observado a formação de cristais foi: 2% tascimate pH 7,0, 0.1M HEPES pH 7,5 e 20% PEG 3350 (Figura 2.10).

A proteína Mh_GH5-CD, sem a porção correspondente à His-tag, também foi submetida aos testes de cristalização. Os cristais obtidos desta proteína heteróloga foram observados em três condições: (1) 0.2M acetato de amônio, 0.1M Tris pH 7,5, 25% PEG 3350; (2) 0.8M potássio sódio tartrato tetra-hidratado, 0.1M Tris pH 8,5, 0.5% Polietileno glicol monometil éter 5000; (3) 0.2M cloreto de sódio, 0.1M Tris:HcL pH 8,5 e 25% PEG 3350 (Figura 2.11).

Os cristais foram observados após 4 dias pelo método de difusão de vapor em gota sentada “sitting drop”, sendo as gotas formadas de uma mistura de 0.5µl da proteína em solução e 0.5µl de solução de cristalização a ser testada.

Não foi possível a observação nenhuma formação de cristais para a proteína heteróloga Mh_GH5-CBM1.

Figura 2.9. Fotomicrografia do cristal de Mh_GH5-CD obtido na condição de cristalização 0.03M ácido cítrico, 0.07M Bis-Tris propano pH 7,6 e 20% Polietileno glicol 3350.

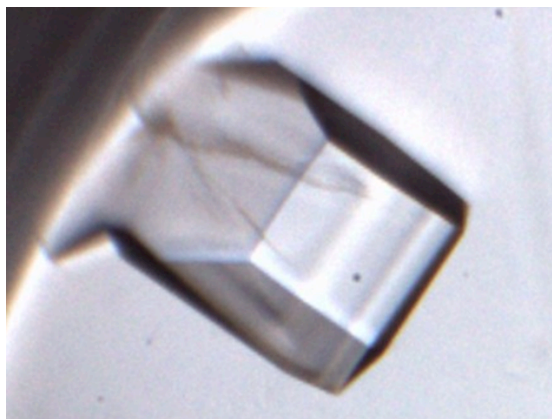
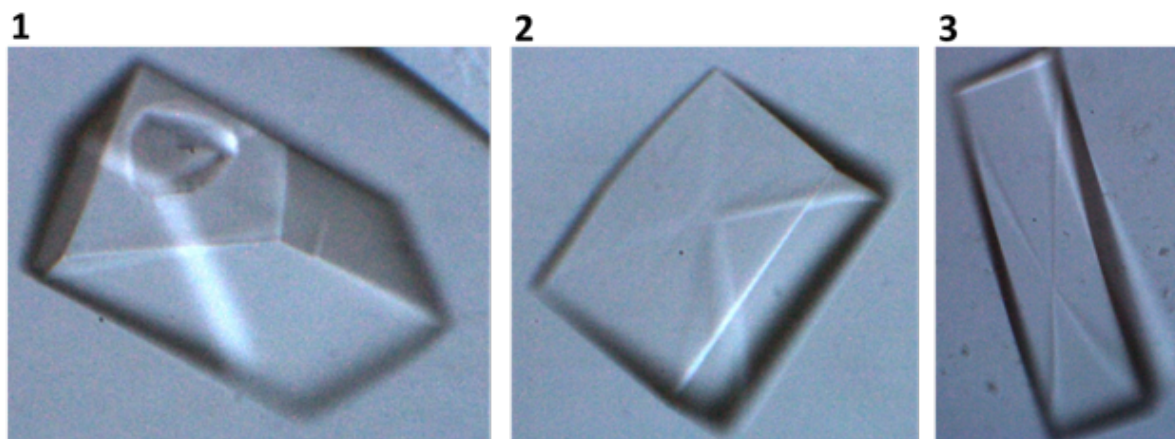


Figure 2.10. Fotomicrografia do cristal de Mh_GH5-CD obtido na condição de cristalização 2% Tascimate pH 7,0, 0.1M HEPES pH 7,5 e 20% Polietileno glicol 3350.



Figure 2.11. Fotomicrografia de cristais de Mh_GH5-CD após a remoção da cauda de histidina “His-tag” em diferentes condições de cristalização. (1) 0.2M acetato de amônio, 0.1M Tris pH 7,5, 25% PEG 3350; (2) 0.8M potássio sódio tartrato tetra-hidratado, 0.1M Tris pH 8,5, 0.5% Polietileno glicol monometil éter 5000; (3) 0.2M cloreto de sódio, 0.1M Tris:HcL pH 8,5 e 25% PEG 3350.



2.5. Estrutura da Proteína Mh_GH5-CD

A proteína heteróloga Mh_GH5-CD difratou à uma resolução de 1.1Å. O cristal pertence ao grupo espacial (P212121) com uma cópia por unidade assimétrica. A coleta de dados e os dados estatísticos estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Estatística da coleta de dados e refinamento da estrutura de Mh_GH5-CD

A. Coleta de dados	
Wavelength (Å)	0.99998
Resolution range (Å)	30.79 - 1.134 (1.175 - 1.134)
Detector Distance (mm)	125.24
Φ (deg.) collected / ΔΦ (deg.)	180 / 1.0
Exposure time (seconds)	1
Temperature of collect (Kelvin)	100
B. Dados estatísticos	
Space group	P21 21 21
Unit-Cell parameters (Å)	a=41.96, b=73.96 and c=90.63; α=90°, β=90° and γ=90°
Total reflections	724671
Unique reflections	104887 (10236)
Multiplicity	6.9 (5.0)
Data completeness (%)	99 (81.9)
I/σ(I)	3.57 (1.13)
R _{sym} ^a (%)	0.055 (0.462)
C. Refinamento da estrutura	
Resolution range	30.79 - 1.134
R _{factor} ^b (%)	12.1
R _{free} ^c (%)	13.3
RMS from ideal geometry	
Bond lengths (Å)	0.007
Bond angles (°)	1.24
Protein residues	306
Water molecules	484
Average isotropic B-factors	
Protein atoms (Å ²)	8.9
Solvent atoms (Å ²)	24.3
Ramachandran Plot	
Favored region (%)	98
Outliers region (%)	0.0

^a $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where \sum_{hkl} denotes the sum over all reflections and \sum_i is the sum over all equivalent and symmetry-related reflections.

^b $R_{factor} = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum F_{obs}}$.

^c $R_{free} = R_{factor}$ for 5 % of the data were not included during crystallographic refinement.

A estrutura do cristal de Mh_GH5 exibe uma arquitetura de domínio único composto exclusivamente composto pelo domínio catalítico. Mh_GH5-CD pertence à família de glicosídeo hidrolases 5 (GH5). Membros deste grupo apresentam uma arquitetura $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel (Figura 2.12-2.14), de modo que os resíduos catalíticos ácido/base e nucleófilo estão localizados nas folhas beta β -4 e β -7 (HENRISSAT *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 2010). No caso de Mh_GH5, os resíduos ácido/base e nucleófilo estão representados pelos resíduos Glu216 e Glu323, respectivamente. De acordo com a literatura, enzimas que apresentam arquitetura (“fold”) TIM-barrel, o sítio de ligação ao substrato contém três resíduos (Arg132, Asn215 e Trp356) identificados como estritamente conservados em membros da família de GH5s (PEREIRA *et al.*, 2010; LEGGIO E LARSEN, 2002; DUCROS *et al.*, 1995). Pereira e colaboradores (2010) sugerem que Arg132 forma pontes de hidrogênio com o resíduo catalítico Glu216. Asn215, que é estabilizado por pontes de hidrogênio com Arg132, desempenha um papel essencial na estabilização no estado de transição realizando uma ponte de hidrogênio com a hidroxila do carbono 2 (OH-C) da unidade do substrato (glucana) localizada no sub-sítio -1. Finalmente, o resíduo Trp356, atua como resíduo hidrofóbico, favorecendo a ligação do substrato celulósico no sub-sítio -1.

Figura 2.12. Estrutura da endoglucanase recombinante Mh_GH5-CD. Mh_GH5-CD apresenta-se em domínio único, referente ao domínio catalítico, com arquitetura $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel. As oito folhas β paralelas, representadas em amarelo, criam uma estrutura chamada de β -barrel no interior da proteína Mh_GH5, envolta por oito α -hélices representadas em magenta. N – amino-terminal (N-terminal); C – carboxi-terminal (C-terminal).

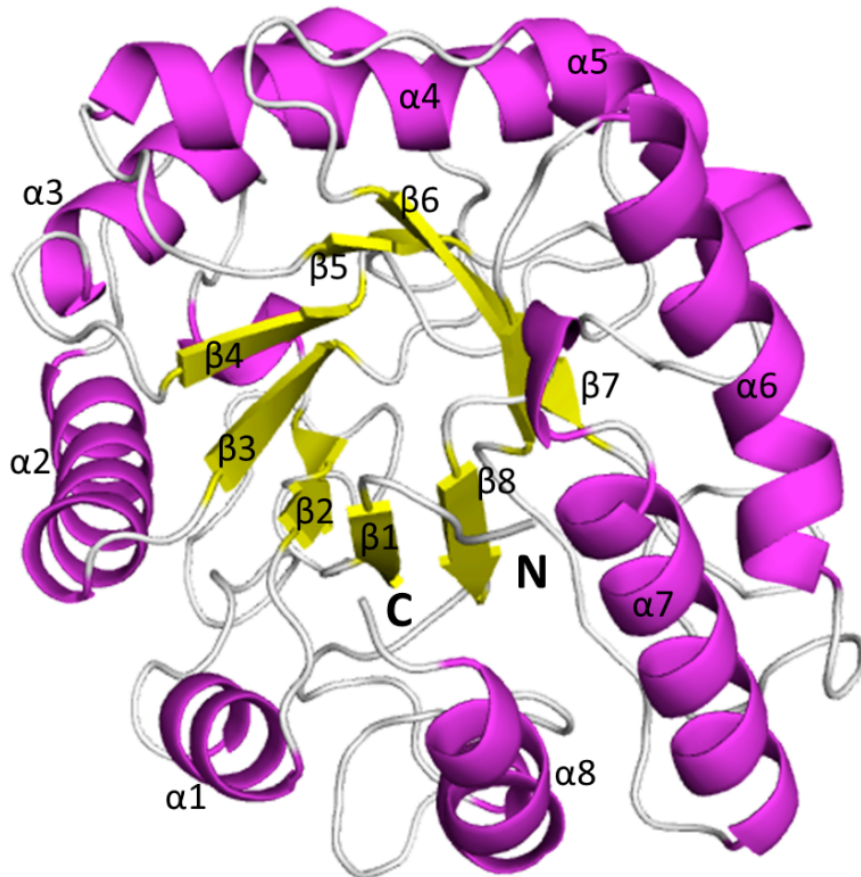


Figura 2.13. Representação do modo de ligação ao substrato e Representação da superfície molecular de Mh_GH5-CD. A. Mh_GH5-CD ligada à moléculas de celobiose (CBI). B. Duas moléculas de celobiose foram observadas nesta estrutura. A molécula de celobiose apresentada em amarelo ocupa os sub-sítios -3 ao -2 e a molécula de celobiose demonstrada em verde ocupa os sub-sítios +1 a +2.

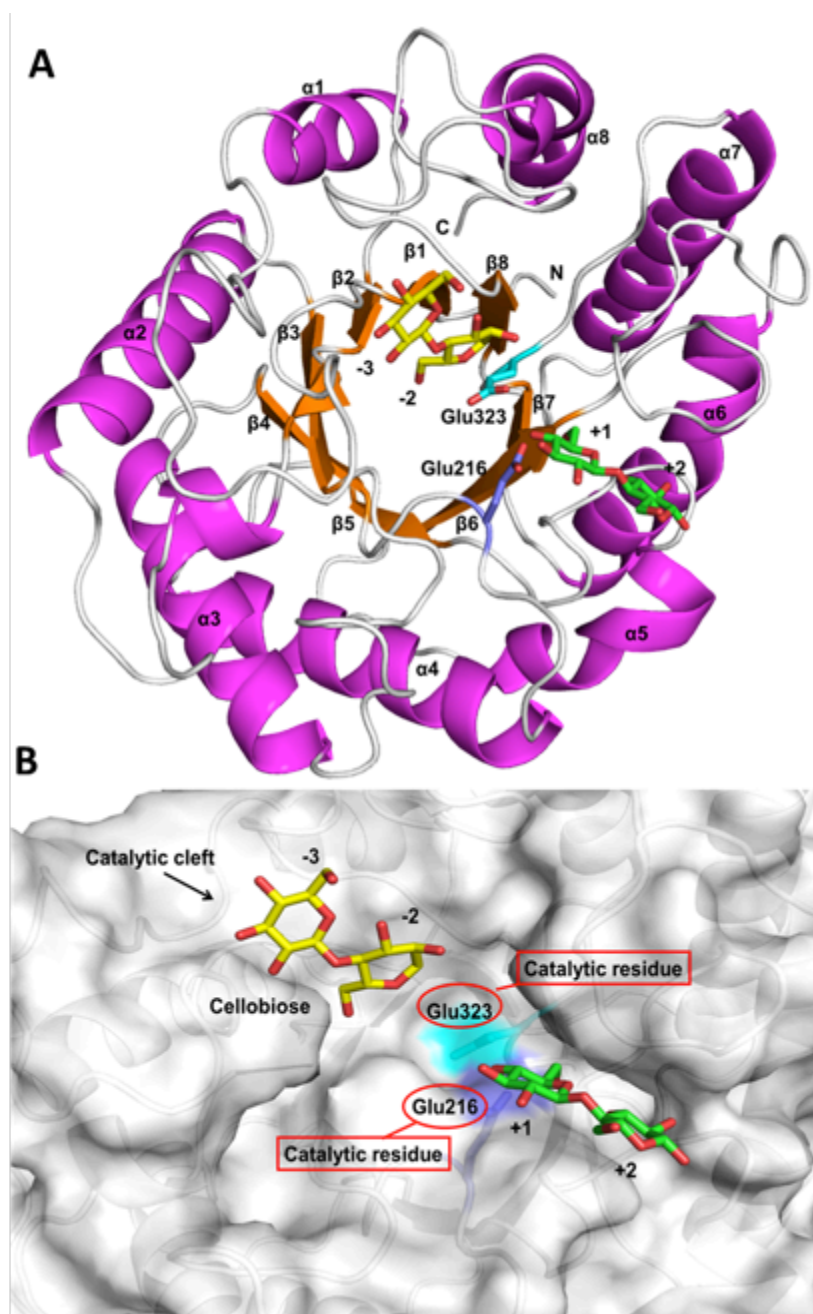
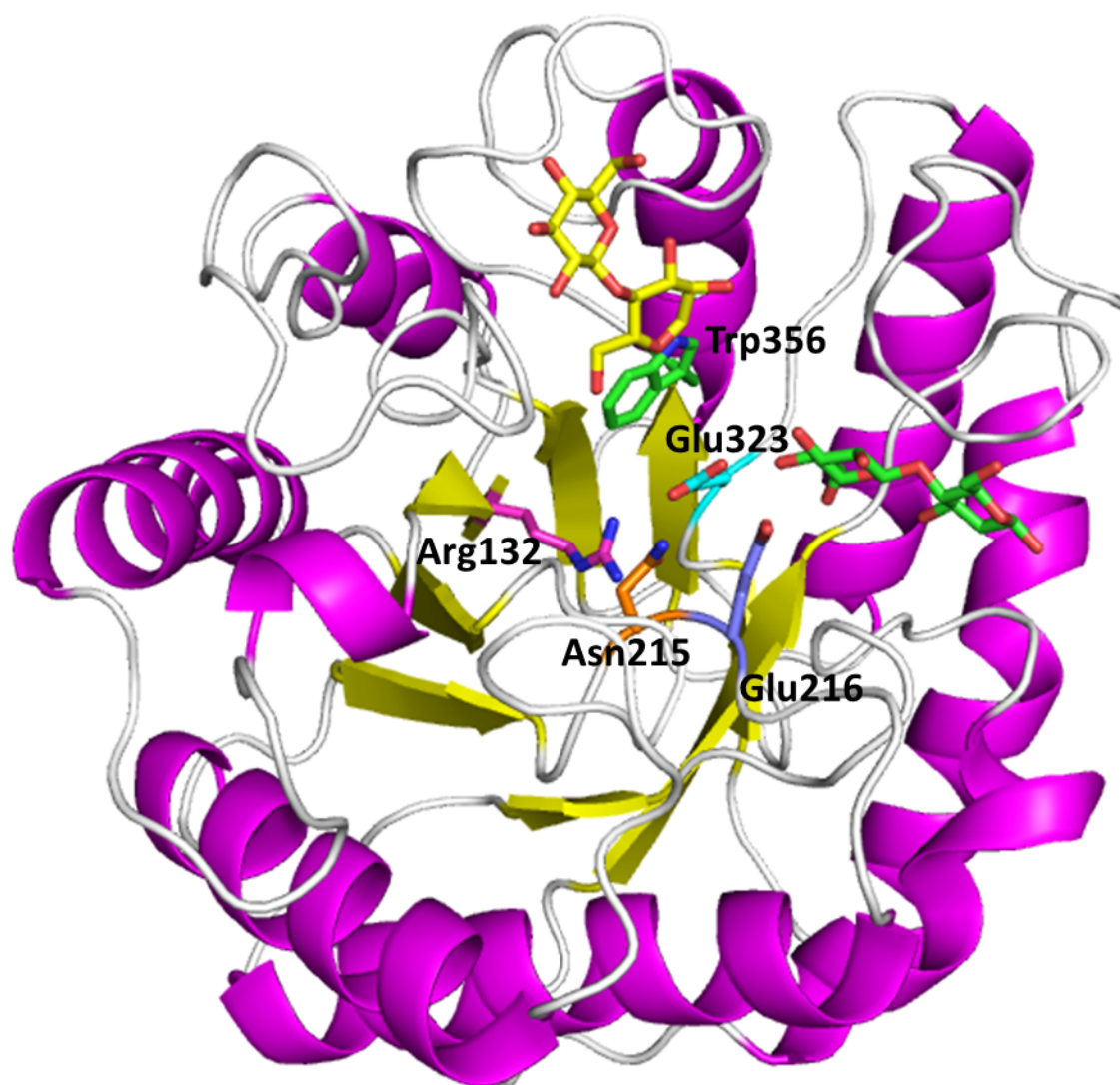


Figura 2.14. Estrutura de Mh_GH5-CD destacando-se os resíduos catalíticos ácido/base e nucleófilo, Glu216 e Glu323, respectivamente. Três resíduos estritamente conservados dentre os membros da família de glicosídeo hidrolases 5 (GH5) foram identificados, Arg132, Asn215 e Trp356.

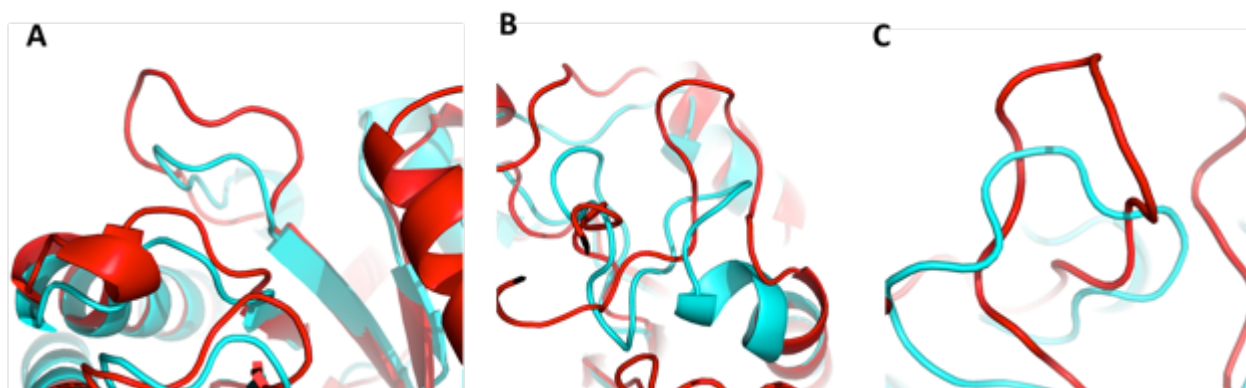


2.6. Termoestabilidade

A termoestabilidade de proteínas provenientes de organismos termofílicos têm sido alvo de muito estudos, principalmente no que se refere à influência da estrutura destas proteínas na termorresistência. A fim de responder esta questão, a estrutura de Mh_GH5-CD foi comparada com a estrutura de enzimas pertencentes à família GH5, originárias da bactéria mesofílica *Clostridium cellulolyticum* (Cc_Cel5A) que apresenta

temperatura ótima entre 37°C e 50°C. Algumas características se mostram relevantes com relação à termoestabilidade, Pereira e colaboradores (2010) relatam o comprimento de “loops” conectando os elementos de estrutura secundária. Eles sugerem que os “loops” atuam como regiões frágeis durante a desnaturação por temperatura e que proteínas termofílicas apresentam uma redução no tamanho de regiões em “loop” (PEREIRA *et al.*, 2010). As regiões em “loop” observadas em Mh_GH5-CD são menores quando comparadas com a proteína mesofílica Cc_Cel5A, o que possivelmente confere maior resistência à desnaturação provocada pelo aumento de temperatura (Figura 2.15).

Figura 2.15. Superposição das estruturas de Mh_GH5-CD (azul) e Cc_Cel5A (vermelho) demonstrando os “loops” diminuídos na proteína termofílica.



Características adicionais estão relacionadas com a termoestabilidade. A análise das sequências de aminoácidos de Mh_Gh5-CD e Cc_Cel5A não apresentou diferença significativa no total de aminoácidos aromáticos em suas composições. Mh_GH5-CD e Cc_Cel5A apresentam 13.7% e 12% de sua composição em resíduos aromáticos, respectivamente. Entretanto, Mh_GH5-CD demonstra uma porcentagem maior de triptofano (Trp) em sua cadeia de aminoácidos (3.9%), enquanto que Cc_Cel5A apresenta 2.4%. Os níveis aumentados de Trp estão associados com a termoestabilidade

de proteínas termofílicas (PEREIRA *et al.*, 2010). Outra característica que estaria relacionada com o aumento da termoestabilidade é a porcentagem de resíduos envolvidos na formação de estruturas secundárias. A análise da sequência de aminoácidos de Mh_GH5-CD demonstra 50.3% de seus resíduos contribuindo na formação de estruturas secundárias, enquanto que em Cc_Cel5A observa-se 47%. Níveis elevados de estrutura secundária proporcionam um aumento de pontes de hidrogênio e conseqüentemente maior estabilidade à proteínas provenientes de organismos termofílicos.

Análises da sequência de aminoácidos de Mh_GH5-CD indicam a presença de três sítios preditos de N-glicosilação. Beckham e colaboradores (2012) afirmam que eventos de glicosilação permitem um aumento na solubilidade e termoestabilidade de celulasas.

De acordo com Juturu e colaboradores (2014), uma exoglucanase e endoglucanase de *Humicola insolens* YH-8 estaria glicosilada em 26% e 39%, respectivamente. Em sua composição, essas enzimas apresentam manose e N-acetilglicosamina (N-glicosilação). Essas enzimas apresentam ampla faixa de estabilidade, tanto para temperatura quanto para índices de pH. A de-glicosilação parcial destas enzimas reduziu significativamente sua estabilidade (T°C e pH) sem afetar sua atividade específica (JUTURU E WU, 2014). A expressão de celulasas em leveduras, i.e. *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris* demonstrou um aumento de 30% na atividade enzimática de celulasas (BECKHAM *et al.*, 2012). Desta maneira, a expressão de novas endoglucanases, como Mh_GH5-CD, utilizando leveduras como sistemas heterólogos poderá ter efeito positivo no aumento de sua termoestabilidade.

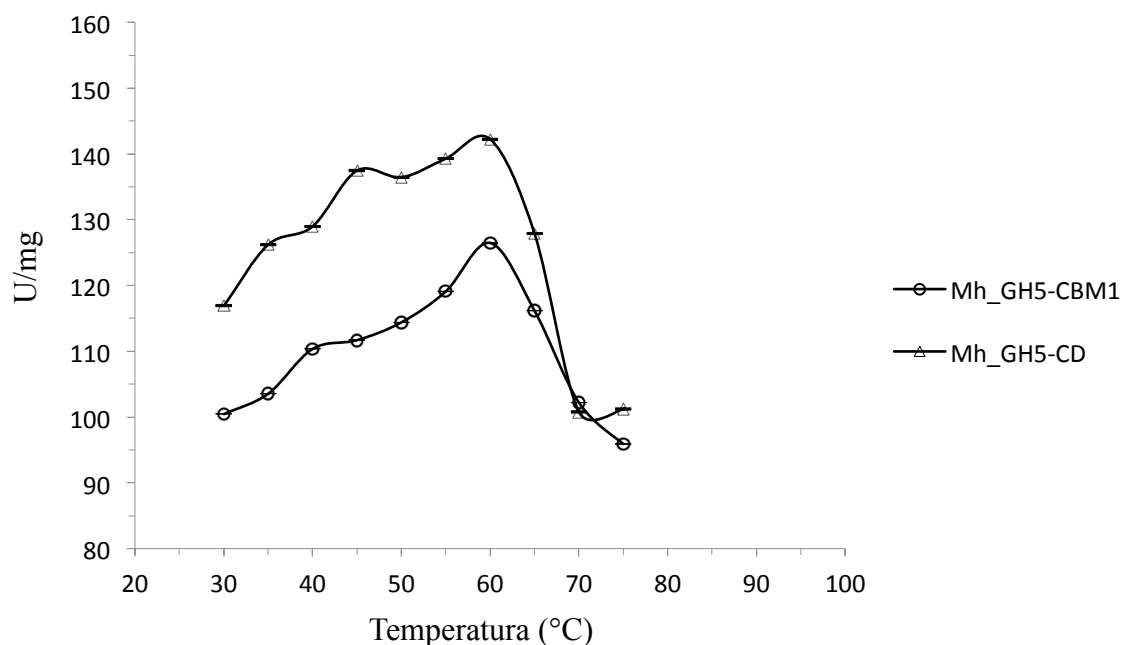
2.7. Caracterização Bioquímica Parcial das Endoglucanases Recombinantes

de *M. heterothallica*

As enzimas GH5 recombinantes purificadas foram submetidas à caracterização bioquímica. Foram testadas a influência da temperatura (30°C -75°C) e pH (3,0 – 8,0) na atividade enzimática destas proteínas, utilizando CMC como substrato.

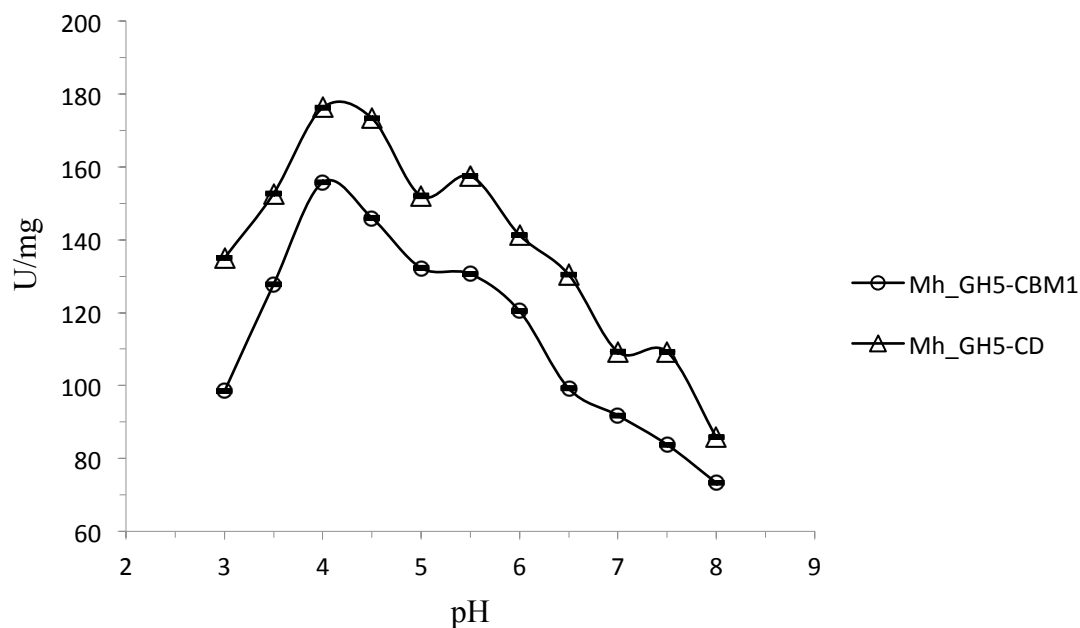
O resultado das análises indicaram que as enzimas são ativas em um amplo intervalo de temperatura, apresentando atividade específica ótima de 126 U/mg para Mh_GH5-CBM1 e 142 U/mg para Mh_GH5-CD, à 60°C (Figura 2.16).

Figura 2.16. Efeito da temperatura sobre atividade enzimática das enzimas recombinantes de *M. heterothallica* utilizando CMC como substrato. As análises foram realizadas em duplicata.



A atividade específica ótima com relação aos índices de pH também demonstraram que as enzimas estão ativas em um amplo intervalo de pH. As condições ótimas foram encontradas em pH 4,0, com atividades específicas de 156 U/mg (Mh_GH5-CBM1) e 176 U/mg (Mh_GH5-CD) (Figura 2.17).

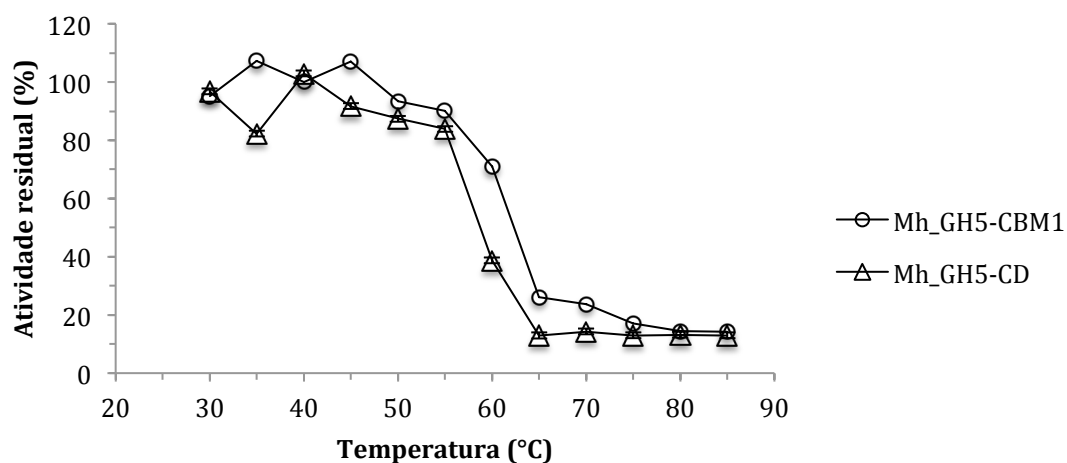
Figura 2.17. Efeito do pH sobre atividade enzimática das enzimas recombinantes de *M. heterothallica* utilizando CMC como substrato. As análises foram realizadas em duplicata.



As enzimas recombinantes de *M. heterothallica* se mostraram promissoras devido aos elevados índices de atividade e termoestabilidade, comparado aos dados encontrados na literatura. Liu e colaboradores (2010) expressaram uma endoglucanase Cel5A de *Clostridium phytofermentans* em *E. coli*. Essas enzimas, nas suas condições ótimas, apresentaram atividade de 18.1 U/mg utilizando CMC como substrato. Salinas e colaboradores (2011) expressaram uma GH5 do fungo *Trametes versicolor* em *Pichia pastoris* e análises preliminares indicaram que a endoglucanase apresentou atividade específica de 35-40 U/mg.

Com relação à termoestabilidade, as enzimas expressas pelo sistema heterólogo *Escherichia coli* apresentaram menor termoestabilidade quando comparadas às enzimas provenientes do sistema *Pichia pastoris*. As enzimas expressas em *E. coli* mantiveram-se estáveis após 1h de incubação à 55°C, apresentando atividades residuais de 90% para Mh_GH5-CBM1 e 83% para Mh_GH5-CD (Figura 2.18).

Figura 2.18. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas recombinantes de *Escherichia coli*. As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.



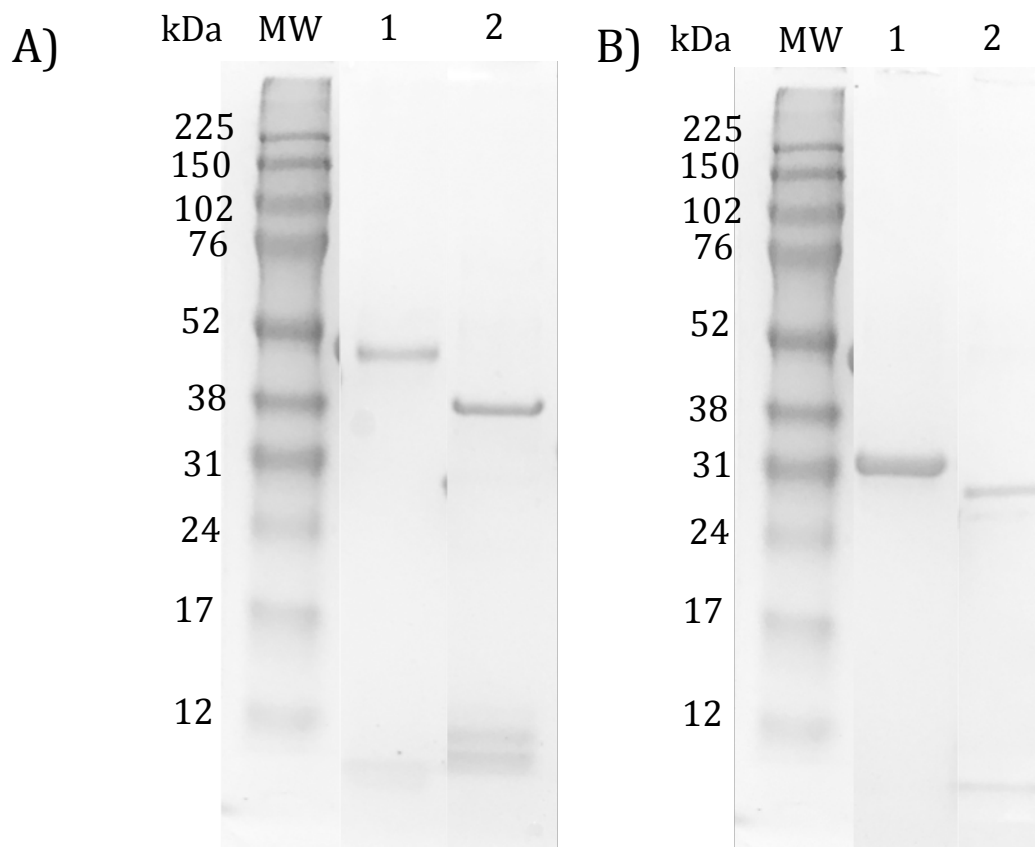
Comparando aos resultados obtidos para as construções de *P. pastoris* - 107% para Mh_GH5-CBM1 e 80% para Mh_GH5-CD após 1 hora de incubação à 70°C - nos permite concluir que modificações pós-traducionais realizadas no sistema eucarioto estariam influenciando e contribuindo para uma maior termoestabilidade. Dentre as modificações pós-traducionais, a glicosilação seria a mais reportada como fator determinante para a termoestabilidade (BECKHAM *et al.*, 2012; JUTURU E WU, 2014).

Kumar e Satyanarayana (2015) descreveram uma β -1,4-endoxylanase recombinante de *Bacillus halodurans* expressa em *Pichia pastoris*. A enzima heteróloga apresentou maior termoestabilidade ($T_{1/2}$ of 45 min à 80°C) quando comparada à enzima nativa

($T_{1/2}$ of 35 min à 80 °C), melhoria atribuída à presença de eventos pós-traducionais – como a glicosilação – realizada pelo sistema *P. pastoris*.

Para a confirmação da presença de glicosilação nas enzimas expressas em *Pichia pastoris* foi realizada a análise em gel de eletroforese SDS-PAGE, comparando as enzimas encontradas nos diferentes sistemas heterólogos (Figura 2.19). Como relatado no capítulo anterior, as enzimas expressas em *Pichia pastoris* apresentaram pesos moleculares acima da informação predita - calculados com base na sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta EXPASY ProtParam - ~ 45 KDa para Mh_GH5-CBM1 e ~ 35 KDa para Mh_GH5-CD, devido à presença de glicosilação.

Figura 2.19. Análise SDS-PAGE das enzimas recombinantes expressas em sistema *Pichia pastoris* e *E. coli*, demonstrando glicosilação da enzimas provenientes do sistema eucarioto de *P. pastoris*. A) Mh_GH5-CBM1 expressa em *P. pastoris* e *E. coli*. MW: marcador de massa molecular; 1: Mh_GH5-CBM1 expressa em *P. pastoris*; 2: Mh_GH5-CD expressa em *P. pastoris* e *E. coli*. MW: marcador de massa molecular; 1: Mh_GH5-CD expressa em *P. pastoris*; 2: Mh_GH5-CD expressa em *E. coli*.

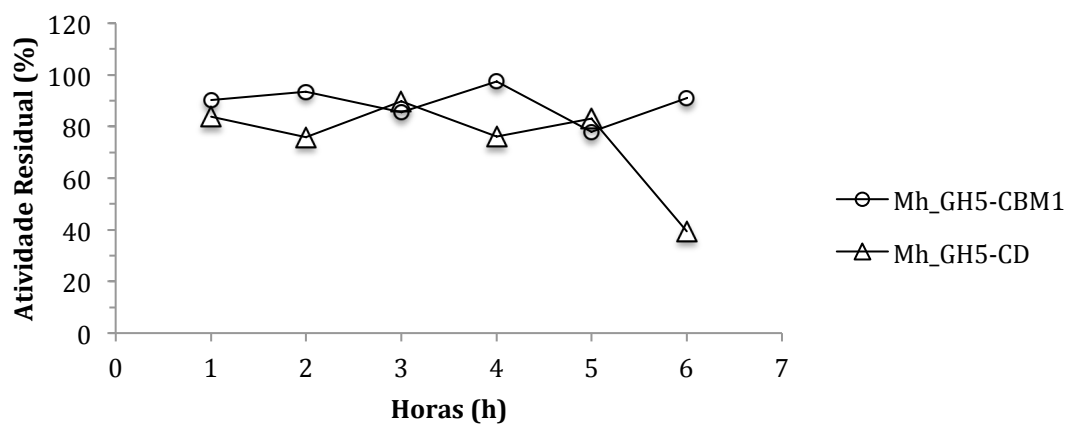


Além disso, a termoestabilidade das enzimas heterólogas de *E. coli* também foi analisada após a incubação em tampão citrato (pH 4,0) à 55°C por seis horas. As enzimas recombinantes apresentaram atividades residuais em torno de 90% (Figura 2.20). Como observado para os ensaios de termoestabilidade após uma hora de incubação, as proteínas originárias da expressão em *P. pastoris* mostraram-se estáveis em temperatura mais elevadas (70°C) e, portanto mais promissoras quanto à termoestabilidade.

Zhao e colaboradores (2012) expressaram uma β -1,4-endoglucanase de *Bacillus subtilis* em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli*. Os autores reportaram que a enzima expressa em *Pichia pastoris* apresentou-se N-glicosilada e a glicosilação a protegeu do ataque de protease (papaína) e demonstrou maior termoestabilidade.

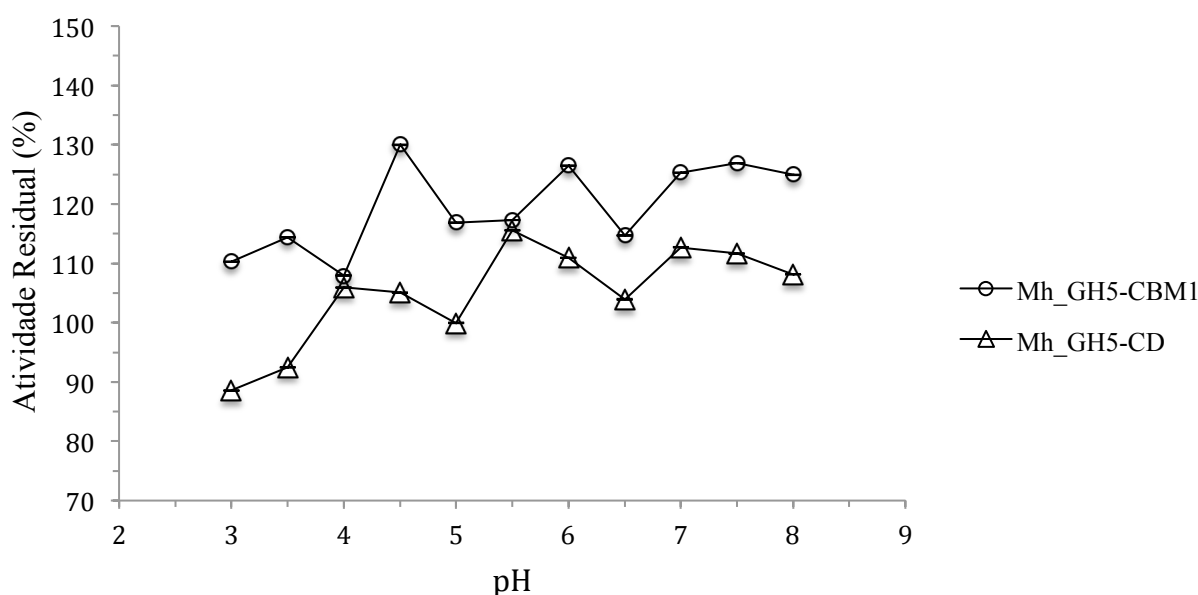
Adicionalmente, Zhao e colaboradores (2015) relataram a expressão de uma xilanase de *Thermobifida fusca* em *Pichia pastoris* e, as enzimas recombinantes demonstraram estar N-glicosiladas. A xilanase recombinante apresentou melhoria na termoestabilidade, corroborando os dados encontrados no presente trabalho.

Figura 2.20. Termoestabilidade das enzimas recombinantes de *Escherichia coli* mantidas à 70°C. As atividades enzimáticas foram medidas em condições padrões de análise e expressas como atividade residual.



Além da termoestabilidade, o efeito do pH na estabilidade das enzimas expressas em *Escherichia coli* também foi avaliado. Segundo Dave e colaboradores (2015) a atividade enzimática é afetada pelo pH devido à ligação do substrato e a catálise serem influenciados pela distribuição de cargas tanto nas moléculas de substrato quanto nas enzimas (DAVE *et al.*, 2015). A figura 2.21 demonstra que as enzimas heterólogas se mostraram estáveis em um intervalo de pH de 3,0-8,0, apresentando-se ativas nesta faixa de pH (atividade residuais ~100%) e não apresentam decréscimo da atividade significativo com o aumento do pH. Esse resultado demonstra que essas enzimas são interessantes do ponto de vista industrial, mantendo-se estáveis em um amplo intervalo de pH.

Figura 2.21. Efeito do pH na estabilidade das proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli*.



O efeito de íons e outros químicos foram testados em diferentes concentrações, 1mM e 5mM. Como demonstrado na tabela 2.3, a adição de íons como K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Li^+ não afetaram de maneira drástica a atividade enzimática

das enzimas recombinantes, mantendo as atividades residuais próximas de 100%. Entretanto demonstraram ser mais sensíveis à presença de íons e agentes químicos do que as enzimas expressas em *Pichia pastoris*.

Xiang e colaboradores (2014) expressaram uma endoglucanase, proveniente de uma biblioteca metagenômica, em *E. coli* e analisaram a ação de diferentes íons metálicos na atividade da enzima. Os autores reportaram que a enzima recombinante foi inibida em 20% pelo íon Li^+ e foi totalmente inibida pela Cu^{2+} e Hg^{2+} . As enzimas recombinantes de *M. heterothallica* Mh_GH5 expressas em *E. coli*, apresentaram não apresentaram forte inibição pelo íon Li^+ , mantendo sua atividade próximas de 100%. Com relação ao Cu^{2+} e Hg^{2+} , apresentaram ativação de 14% (Mh_GH5-CBM1) e 25% (Mh_GH5-CD) para Cu^{2+} e, 3% (Mh_GH5-CBM1) e 12% (Mh_GH5-CD) para Hg^{2+} .

Zhang e colaboradores (2015) demonstraram que a GH5 de *T. halotolerans* em presença de EDTA e SDS apresentou inibição da atividade enzimática. Para Mh_GH5-CBM1 e Mh-GH5-CD expressas em *E. coli*, a presença de EDTA e SDS também levou uma inibição, sendo o SDS o agente mais inibidor da atividade das endoglucanases de *E. coli*, mantendo apenas 18% da atividade residual para Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD.

Assim como as enzimas recombinantes expressas em *Pichia pastoris*, a presença dos íons Mn^{2+} levou à ativação da atividade enzimática das novas β -1,4-endoglucanases. Para as construções de *E.coli*, os níveis de ativação foram de 71% e 90% para Mh_GH5-CBM1 e Mh_GH5-CD, respectivamente. Como relatado no capítulo anterior o íon manganês estaria relacionado com a “hiper-estabilização” do centro catalítico da enzima (ZHANG *et al.*, 2015).

Embora os mecanismos envolvidos nos efeitos de vários íons sobre enzimas recombinantes não estejam esclarecidos, a compreensão da atuação desses íons

metálicos na atividade enzimática é importante devido aos processos industriais que requerem sua adição nas várias etapas dos processos envolvidos (ZHANG *et al.*, 2015).

Tabela 2.3. Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos sobre a atividade das endoglucanases heterólogas expressas em *E. coli*. A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos agentes.

Atividade Residual (%)				
Agentes	Mh_GH5-CBM1		Mh_GH5-CD	
	1mM	5mM	1mM	5mM
KCl	99,01±0,06	99,84±0,02	109,69±0,01	107,05±0,09
MgCl ₂	97,44±0,03	97,41±0,01	112,80±0,01	110,39±0,05
CuCl ₂	114,96±0,03	136,09±0,01	125,41±0,02	138,07±0,01
MnCl ₂	139,69±0,03	171,16±0,04	141,81±0,05	190,08±0,01
CaCl ₂	103,05±0,01	99,18±0,02	103,54±0,09	107,15±0,03
FeCl ₃	106,83±0,05	119,46±0,01	113,49±0,04	112,13±0,01
CdCl ₂	94,57±0,06	102,24±0,06	105,95±0,01	92,55±0,01
HgCl ₂	103,16±0,01	107,85±0,02	112,16±0,02	73,20±0,02
AgNO ₃	104,42±0,01	111,78±0,02	107,06±0,01	141,92±0,12
EDTA	98,50±0,04	87,66±0,05	93,63±0,01	92,79±0,09
SDS	94,90±0,01	18,92±0,01	81,63±0,03	18,68±0,01
LiCl	94,50±0,03	96,87±0,01	97,51±0,04	102,49±0,01
B-mercaptoetanol	101,53±0,07	98,76±0,04	104,55±0,03	105,89±0,03

Os parâmetros cinéticos determinados para as enzimas Mh_GH5 expressas em *Escherichia coli* mostraram que a enzima contendo o domínio de ligação ao substrato apresentou menor índice de K_m (16 mg/ml), indicando uma maior afinidade ao substrato, entretanto a eficiência catalítica da construção contendo apenas o domínio catalítico seria potencialmente maior ($V_{max}=136,9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Tabela 2.4).

Na literatura, diferentes índices de K_m e V_{max} para diferentes endoglucanases de origem fúngica são encontrados utilizando CMC como substrato. Dave e colaboradores (2015) demonstram valores como K_m e V_{max} de 4.8 mg/ml e $72 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para

uma endoglucanase de *Penicillium pinophilum*. Uma endoglucanase de *Daldinia eschscholzii* apresentou K_m e V_{max} de 17,24 mg/ml e 0,63 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Para endoglucanase de *T. aurantiacus* os autores reportaram K_m e V_{max} de 37 mg/ml e 82.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Esses resultados, similares aos encontrados neste estudo, sugerem que as enzimas analisadas requerem maior quantidade de substrato (DAVE *et al.*, 2015).

Comparando os parâmetros cinéticos encontrados para as enzimas recombinantes de *Escherichia coli* com os de *Pichia pastoris*, observamos que as enzimas provenientes do sistema de expressão eucarioto demonstraram ser mais eficientes na catálise do substrato, com maiores valores de V_{max} . A melhoria na eficiência catalítica provavelmente estaria envolvida também com as modificações pós-traducionais realizadas por *Pichia pastoris*. Qin e Qu (2014) relatam que além da termoestabilidade a glicosilação poderia estar envolvida com a eficiência catalítica das enzimas recombinantes.

Tabela 2.4. Parâmetros cinéticos determinados para as enzimas recombinantes de *Escherichia coli*.

Enzimas Recombinantes	K_m (mg/ml)	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Mh_GH5-CBM1	16,159±3,64	119,10±11,51
Mh_GH5-CD	36,874±10,58	136,96±23,47

3. CONCLUSÃO

Neste capítulo descrevemos a expressão heteróloga de uma nova endoglucanase GH5 do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* em *E. coli*. Essas enzimas demonstraram ser promissoras baseada nos elevados índices de atividade específica, utilizando CMC como substrato.

As novas β -1,4-endoglucanases apresentam-se ativas em um amplo intervalo de temperatura (30°C-75°C) e pH (3,0-8,0), apresentando ótimos de temperatura de 60°C e pH ótimo 4,0. Além disso, mostraram-se ativas após a incubação de seis horas à 55°C e com perfil de ativação na presença de íons Mn^{2+} .

A estrutura da enzima recombinante endoglucanase GH5 (Mh_GH5-CD) do fungo *M. heterothallica* também foi descrita neste trabalho. Este é o primeiro relato da estrutura desta proteína. Dentre as características analisadas, as de maior relevância neste estudo estão relacionadas com a termoestabilidade, como sítios de glicosilação, estruturas em “loop”, conteúdo de triptofano e quantidade de pontes de hidrogênio. Todas estas características proporcionariam o aumento da termoestabilidade de Mh_GH5-CD quando comparado com uma proteína homóloga mesofílica.

Comparando os resultados de expressão e caracterização destas novas GH5 recombinantes – expressas em *Pichia pastoris* e *E. coli* - o sistema heterólogo em *E. coli* se mostrou mais eficiente na expressão das enzimas recombinantes. Entretanto as enzimas de *Pichia pastoris* apresentaram tanto maior eficiência catalítica quanto melhor termoestabilidade, levando a conclusão de que a melhoria na performance dessas enzimas estariam relacionados à eventos de glicosilação.

As características bioquímicas e estruturais dessas nova β -1,4-endoglucanase de *Myceliophthora heterothallica* demonstram grande interesse biotecnológico,

principalmente na conversão da biomassa lignocelulósica em combustíveis renováveis como o etanol de segunda geração.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P.D.; AFONINE, P.V.; BUNKÓCZI, G.; CHEN, V.B.; DAVIS, I.W.; ECHOLS, N.; HEADD, J.J.; HUNG, L.W.; KAPRAL, G.J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; MCCOY, A.J.; MORIARTY, N.W.; OEFFNER, R.; READ, R.J.; RICHARDSON, D.C.; RICHARDSON, J.S.; TERWILLIGER, T.C.; ZWART, P.H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D*, v. 66, p. 213–221, 2010.

AFONINE, P.V.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; URZHUMTSEV, A.; ADAMS, P.D. Automatic multiple-zone rigid-body refinement with a large convergence radius. *J. Appl. Crystallogr.*, v.42, p.607–615, 2009.

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H. SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recente achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p. 5301-5317, 2014.

BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technology*, v. 98, p.504-510, 2007.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S.K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, v. 32, p. 1341-46, 2012.

BAURHOO, B.; RUIZ-FERIA, C. A.; ZHAO, X. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 144, p.175–184, 2008.

BECKHAM, G.T.; DAI, Z.; MATTHEWS, J.F.; MOMANY, M., PAYNE, C.M.; ADNEY, W.S.; BAKER, S.E.; HIMMEL, M.E. Harnessing glycosylation to improve cellulose activity. *Curr. Op. Biotechn.*, 23, p. 338-345, 2012.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 326-338, 2001.

BEY, M.; BERRIN, J.; POIDEVIN, L.; SIGOILLOT, J. Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes. *Microbial Cell Factories* v.10:113, 2011.

BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R.K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, v.128, p. 751-759, 2013.

CASTRO, A. M; PERREIRA, N. J. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p.181-188, 2010.

CHADHA, B.S.; AJAY,B.K; MELLON, F; BHAT, M. K. Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Journal of Biotechnology*, v.109, p. 227-37, 2004.

CHEN, Z.; PEREIRA, J.H.; LIU, H.; TRAN, H.M.; HSU, N.S.Y.; DIBBLE, D.; SINGH, S.; ADAMS, P.D.; SAPRA, R.; HADI, M.Z.; SIMMONS, B.A. Improved activity of a thermophilic cellulose, Cel5A, from *Thermotoga maritima* on ionic liquid pretreated switchgrass. *Plos one*, v.8, issue 11, e79725, 2013.

DAVIS, I.W.; LEAVER-FAY, A.; CHEN, V.B.; BLOCK, J.N.; KAPRAL, G.J.; WANG, X.; MURRAY, L.W.; ARENDAL III, W.B.; SOEYINK, J.; RICHARDSON, J.C.; RICHARDSON, D.C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*v. 35, p.375–383, 2007.

DIAZ, A.B.; MORETTI, M.M.S.; BEZERRA-BUSSOLI, C.; NUNES, C.C.C.; BLANDINO, A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars. *Biores. Techn.*, v.185, p.316-323, 2015.

DUCROS, V.; CZYZEK, M.; BELAICH, A.; GAUDIN, C.; FIEROBE, H-P.; BELAICH, J.-P.; DAVIES, G.J.; HASER, R. Crystal structure of the catalytic domains of a bacterial cellulose belonging to family 5. *Structure*, v.3, p.939-949, 1995.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D*, v.60, p.2126–2132, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood. Chemistry: Ultrastructure: Reactions*. Berlin. Walter de Gruyter. 1989.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 19, p. 1-13, 2007.

GARVEY, M.; KLOSE, H.; FISCHER, R.; LAMBERTZ, C.; COMMANDEUR, U. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulose expression platforms. *Trends in Biotechnology*, v. 31(10), p. 581-93, 2013.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.*, 59, 257- 268, 1987.

HARRIS, P.V.; XU, F.; KREEL, N.E.; KANG, C.; FUKUYAMA, S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.19, p.162-170, 2014.

HENRISSAT, B.; CALLEBAUD, I.; FABREGA, S.; LEHN, P.; MORNON, J.P.; DAVIES, G.; Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold from several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, p.7090-7094, 1995.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.*, v.7, p.637-644, 1997.

HUY, N. D.; KIM, S.W.; PARK, S.M. Heterologous expression of endo-1,4-beta-xylanaseC from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, v. 111, p. 654-657, 2011.

HUY, N. D.; NGUYEN, C. L.; PARK, HAN-SUNG; LOC, N. H.; CHOI, MYOUNG-SUK; KIM, DAE-HYUK; SEO, JEONG-WOO; PARK, SEUNG-MOON. Characterization of a novel manganese dependent endoglucanase belongs in GH family 5 from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biosci. Bioeng. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.06.009>, 2015.

JANCARIK, J.; KIM, S.-H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. J. Appl. Cryst., v.24, p.409–411, 1991

JAVIDPOUR, P.; PEREIRA, J.H.; GOH, E.B.; MCANDREW, R.P.; MA, S.M.; FRIEDLAND, G.D.; KEASLING, J.D.; CHHABRA, S.R.; ADAMS, P.D.; BELLER, H.R. Biochemical and structural studies of NADH-Dependent FabG used to increase the bacterial production of fatty acids under anaerobic conditions. Appl Environ Microbiol., v. 80, p. 497-505, 2013.

JUTURU, V.; WU, J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.33, p.188–203, 2014.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. Process Biochemistry, v.38, p.1099-1104, 2003.

KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU V.; CHRISTAKOPOULOU P. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 22, p. 501-506, 2006.

KUHAD, R.C.; DESWAL, D.; SHARMA, S.; BHATTACHARYA, A.; JAIN, K.K.; KAUR, A.; PLETSCHKE, B.I.; SINGH, A.; KARP, M. Revisiting cellulase production

and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 55, p.249-272, 2016.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Generation of xylooligosaccharides from microwave irradiated agroresidues using recombinant thermo-alkali-stable endoxylanase of polyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans* expressed in *Pichia pastoris*. *Bioresource technology*, v. 179, p. 382-389, 2015.

LEGGIO, L.L.; LARSEN, S. The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. *FEBS Letters*, p. 103-108, 2002.

LI, J.; TANG, C.; SHI, H.; WU, M. Cloning and optimized expression of a neutral endoglucanase gene (ncel5A) from *Volvariella volvacea* WX32 in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.111(5), p.537-540, 2011.

LIU, W.; ZHANG, X.Z.; ZHANG, Z.; PERCIVAL ZHANG, Y.-H. Engineering of *Clostridium phytofermentans* endoglucanase Cel5A for improved thermostability. *App. Environm. Microbiol.*, p. 4914-1917, 2010.

LIU, L.; YANG, H.; SHING, HYUN-DONG; CHEN, R.R.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. How to achieve high-level expression of microbial enzymes – Strategies and perspectives. *Bioengineered*, v.4(4), p. 212-23, 2013.

LOQUÉ, D.; SCHELLER, H.V.; PAULY, M. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology*, v.25, p.151-161, 2015.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 66, p. 506-577, 2002.

MCCOY, A.J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; ADAMS, P.D.; WINN, M.D.; STORONI, L.C.; READ, R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.*, v.40, p.658–674, 2007.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428, 1959.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy Fuels*, v. 20, p. 848-889, 2006.

MORETTI, M.M.S.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L.D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazilian J. Microbiology*, p.1062-1071, 2012

NOORT, V.V.; BRADATSCH, B.; ARUMUGAM, M.; AMLACHER, S.; BANGE, G.; CREEVEY, C. Consistent mutational path predict eukaryotic thermostability. *BMC Evolutionary Biology*, v. 13(7), p.1471-2148, 2013.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Quím. Nova*, v. 33, 1549-1558, 2010

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography*, v.276, p.307-326, 1997.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation. I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153- 1169, 2000.

PELLEGRINI, V.O.A.; SERPA, V.I.; GODOY, A.S.; CAMILO, C.M.; BERNARDES, A.; REZENDE, C.A.; JUNIOR, N.P.; CAIRO, J.P.L.F.; SQUINA, F.M.; POLIKARPOV, I. Recombinant *Thricoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 99, p.9591-9604, 2015.

PEREIRA, J.H.; SAPRA, R.; VOLPONI, J.V.; KOZINA, C.L.; SIMMONS, B.; ADAMS, P.D. Structure of endoglucanase Cel9A from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Acta Cryst. D*65, p.744-750, 2009.

PEREIRA, J.H.; CHEN, Z.; MCANDREW, R.P.; SAPRA, R.; CHHABRA, S.R.; SALE, K.L.; SIMMONS, B.A.; ADAMS, P.D. Biochemical characterization and crystal structure of endoglucanase Cel5A from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*. J. Struc. Biol., v.172, p. 372-379, 2010.

PILO-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. Quím. Nova, v. 16, p. 435-448, 1993.

QIN, Y.; QU, Y. Asn124 of Cel5A from *Hypocrea jecorina* not only provides the N-glycosylation site but is also assential in maintaining enzymatic activity. BMB Rep., v.47(5), p. 256-261, 2014.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. Química Nova, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

REYES-ORTIZ, V. HEINS, R.A.; CHENG, G.; KIM, E.Y.; VERNON, B.C.; ELANDT, R.B.; ADAMS, P.D.; SALE, K.L.; HADI, M.Z.; SIMMONS, B.A.; KENT, M.S.; TULLMAN-ERCEK, D. Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulose penetration into cellulose substrates. Biotechnol. for biofuels, v.6:93, 2013.

SALINAS, A.; VEGA, M.; LIENQUEO, M.E.; GARCIA, A.; CARMONA, R.; SALAZAR, O. Cloning of novel cellulases from cellulolytic fungi: Heterologous expression of a family 5 glycoside hydrolase fro *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. Enz. and Microb. Techn., 49, p.485-491, 2011.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 89, p. 246-291, 2005.

SETTE, L.D.; PASSARINI, M.R.Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M.C.T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. World J. Microb. Biotechnol., v.22, p.1185-1195, 2006.

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

TAMBOR, J.H.; REN, H.; USHINSKY, S.; ZHENG, Y.; RIEMENS, A.; ST-FRANCOIS, C.; TSANG, A.; POWLOWSKI, J.; STORMS, R. Recombinant expression, activity screening and functional characterization identifies three novel endo-1,4- β -glucanases that efficiently hydrolyse cellulosic substrates. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.93, p.203–214, 2012.

VLASENKO, E.; SCHULEIN, M.; CHERRY, J.; XU, F. Substrate specificity of family 5,6,7,9,12, and 45 endoglucanases. *Bioresource Technology*, v.101, p.2405-2411, 2010.

XIANG, L.; LI, A.; TIAN, C.; ZHOU, Y.; ZHANG, G.; MA, Y. Identification and characterization of a new acid-stable endoglucanase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification*, v.102, p.20-26, 2014.

YAMAN S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. *Energy Convers Manage*, v. 45, p. 651-671, 2004.

ZANPHORLIN, L.M.; FACCHINI, F.D.A.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; RODRIGUES, A. SETTE, L.D.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUES, G.O. Production, Partial Characterization, and Immobilization in Alginate Beads of an Alkaline Protease from a New Thermophilic Fungus *Myceliophthora* sp. *J. Microbiol.*, v. 48, p. 331-336, 2010.

ZHANG, F.; ZHANG, X.M.; YIN, Y.R.; LI, W.J. Cloning, expression and characterization of a novel GH5 exo/endoglucanase of *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 by genome mining. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.120(6), p.644-649, 2015.

ZHAO, XI-HUA; WANG, WEI; WANG, FENG-QING; WEI, DONG-ZHI. A comparative study of β -1, 4-endoglucanase (possessing β -1, 4-exoglucanase activity) from *Bacillus subtilis* LH expressed in *Pichia pastoris* GS115 and *Escherichia coli* Rosetta (DE3). *Bioresource Technology*, v. 110, p.539-45, 2012.

ZHAO, L.; GENG, J.; GUO, Y.; LIAO, X.; LIU, X.; WU, R.; ZHENG, Z.; ZHANG, R. Expression of the *Thermobifida fusca* xylanase Xyn11A in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology*, p.15-18, 2015.