

Bruno Augusto Dias

*Caracterização funcional e estrutural de uma β -glucanase
GH12 de *Aspergillus terreus**

São José do Rio Preto
2013

Bruno Augusto Dias

*Caracterização funcional e estrutural de uma β -glucanase GH12 de
Aspergillus terreus*

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
Co-orientador: Dr. Fábio Márcio Squina

São José do Rio Preto
2013

Dias, Bruno Augusto.

Caracterização funcional e estrutural de uma β -glucanase GH12 de *Aspergillus terreus* / Bruno Augusto Dias. -- São José do Rio Preto, 2013

76 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Coorientador: Fábio Márcio Squina

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas - Aplicações industriais. 3. Celulase. 4. *Aspergillus terreus*. 5. Biocombustíveis. I. Gomes, Eleni. II. Squina, Fábio Márcio. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Bruno Augusto Dias

*Caracterização funcional e estrutural de uma β -glucanase GH12 de
*Aspergillus terreus**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, 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. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Henrique Ferreira
UNESP – Rio Claro

Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto

Dr. André Ricardo de Lima Damásio
CTBE – Campinas

São José do Rio Preto
24 de setembro de 2013

Dedico este trabalho

Aos meus pais Luiz e Paula, minha irmã Fernanda e minha noiva Tatiana por sempre acreditarem na minha capacidade e por terem me apoiado em todos os momentos da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes pela oportunidade de participar da rotina do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e pelos valiosos ensinamentos científicos, éticos e profissionais. Em especial gostaria de agradecer seu apoio e empenho para que este trabalho se concretizasse, mesmo após a minha impossibilidade de dedicação exclusiva por ter assumido cargo público.

Ao meu co-orientador, Dr. Fábio Márcio Squina, pela possibilidade de trabalhar no Laboratório de Biologia Molecular do CTBE e viver o dia-a-dia de um laboratório de ponta e poder conviver com pessoas fantásticas.

Aos meus pais Paula e Luiz, por todo apoio e dedicação nesses anos todos, especialmente nessa jornada do doutorado. Sem vocês não teria chegado até aqui.

À minha querida irmã Fernanda pelos conselhos e broncas.

À Tatiana por só ter me trazido coisas boas e muita sorte. Tudo deu certo na minha vida depois que te conheci! Não existem palavras para expressar minha alegria e agradecimento por tanto amor, dedicação e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular do CTBE, Douglas Júnio, Roberto, João Paulo, Leandro, Rodrigo, Thabata, Zaira e em especial, ao Fernando Segato, André Damásio e Dyoni pela essencial ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado mestres!

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE, Gisele, Ariane, Márcia, Diego, George, Josiane, Tássia, Larissa, Fernanda, Bárbara, Pedro, Janaína e Amanda, pela convivência agradável e amizade.

Aos companheiros de turma do Doutorado e Mestrado em Microbiologia, Bia, Monika, Juliana, Carol, Priscila, Ana e Marcelo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

Resumo

A conversão enzimática dos polissacarídeos da biomassa é um fator chave no desenvolvimento de bioetanol de segunda geração. A recalcitrância da lignocelulose para a degradação enzimática e o custo elevado de enzimas hidrolíticas necessárias para a despolimerização de polissacarídeos encontrados na parede celular da planta são barreiras significativas para a produção em larga escala e para a comercialização de biocombustíveis e bioprodutos derivados da biomassa vegetal. A fim de aumentar rapidamente a produção de biocombustíveis celulósicos e bioprodutos, existe a necessidade de desenvolver coquetéis enzimáticos mais eficientes e de menor custo para a conversão de biomassa em açúcares fermentáveis. Nesse contexto, o estudo de enzimas degradadoras da parede celular é essencial.

No presente trabalho a enzima endo-1,4- β -D-glucanase de *Aspergillus terreus* (ATEG_09894) foi clonada para expressão em *A. nidulans*. O teste de expressão mostrou a expressão solúvel da proteína. Sua identidade foi confirmada por espectrometria de massas. O pH ótimo e a temperatura ótima para sua atividade enzimática foram de 5,0 e 55°C, respectivamente. A desnaturação térmica mostrou que a partir de 60°C a enzima começa a perder estrutura. Interessantemente a enzima apresenta atividades β -glucanase e xiloglucanase, tendo preferência por β -glucano. A caracterização estrutural mostrou que ATEG_09894 foi expressa corretamente e os resultados de SEC e SAXS mostram que a proteína é monomérica em solução e o modelo de sua estrutura tridimensional indica que a superfície eletrostática da molécula contribui para um monômero estável. Os dados apresentados nesse trabalho são importantes pois identificam peculiaridades da enzima ATEG_09894, que atua na degradação da biomassa, sugerem os determinantes de sua seletividade enzimática e apresenta a degradação, não usual, de β -glucanos e xiloglucanos, característica promissora para a degradação do material lignocelulósico.

Abstract

The enzymatic conversion of polysaccharides from biomass is a key factor in the development of second generation bioethanol. The recalcitrance of lignocellulose to enzymatic degradation and the high cost of hydrolytic enzymes necessary for the depolymerization of polysaccharides found in plant cell wall are significant barriers to large-scale production and commercialization of biofuels and bioproducts derived from plant biomass. In order to rapidly increase the production of biofuel and byproducts cellulosic, a need exists to develop more efficient and lower cost enzymatic cocktails for the conversion of biomass into fermentable sugars. In this context, the study of cell wall degrading enzymes is essential.

*In this work the enzyme endo-1,4- β -D-glucanase from *Aspergillus terreus* (ATEG_09894) was cloned for expression in *A. nidulans*. The expression test showed the expression of a soluble protein. Its identity was confirmed by mass spectrometry. The optimum pH and optimum temperature for the enzyme activity were 5.0 and 55 °C, respectively. The thermal denaturation showed that above 60 °C the enzyme starts to lose structure. Interestingly, the enzyme has β -glucanase and xiloglucanase activities, preferring β -glucan. Structural characterization showed that ATEG_09894 was expressed correctly folded and the results of SEC and SAXS show that the protein is monomeric in solution and the model of its three dimensional structure indicates that the electrostatic surface molecule contributes to a stable monomer. The data presented in this study are important because they identify peculiarities of ATEG_09894, which acts in the degradation of biomass, suggest the determinants of its selectivity and enzymatic degradation presents, unusual, of β -glucans and xyloglucans, promising feature for degradation of lignocellulosic material.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Participação do petróleo na matriz energética mundial em 2006	1
Figura 2	Ciclo de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar	3
Figura 3	Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica	6
Figura 4	Arquitetura da parede celular vegetal	7
Figura 5	Estrutura da fração celulósica	8
Figura 6	Componentes da fração hemicelulose	9
Figura 7	Esquema estrutural para a lignina da madeira moída de <i>E. grandis</i>	10
Figura 8	Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulase	13
Figura 9	Mecanismo geral de inversão das glicosidases	15
Figura 10	Mecanismo geral de retenção das glicosidases	16
Figura 11	Comparação estrutura de xiloglucanases e celulasas	21
Figura 12	Sobreposição XEG-EDPG e XEG-xiloglucano	22
Figura 13	Esquema ilustrativo das etapas de clonagem para expressão de ATEG_09894	26
Figura 14	Gráfico ilustrando a predição <i>in silico</i> de regiões de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos de ATEG_09894	40
Figura 15	Gel de agarose 1% mostrando produto de PCR da β -glucanase GH 12 de <i>A. terreus</i> amplificado a partir do DNA genômico	41
Figura 16	Vetor de clonagem pGEM-T-Easy Vector	41
Figura 17	Alinhamento de sequência entre o clone AtGH12_pGEM e a sequência depositada no banco de dados	42
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR de colônia	43
Figura 19	<i>Screening</i> de transformantes	44
Figura 20	Confirmação da expressão da ATEG_09894	45
Figura 21	Purificação de ATEG_09894	46
Figura 22	Efeito de pH na atividade β -glucanase de ATEG_09894.	47

Figura 23	Efeito da temperatura na atividade β -glucanase	49
Figura 24	Produtos de hidrólise por ATEG_09894	53
Figura 25	Envelope molecular de ATEG_09894	56
Figura 26	Análise da superfície eletrostática de ATEG_09894	57
Figura 27	Alinhamento de sequências	60
Figura 28	<i>Docking</i> de substratos em ATEG_09894	61
Figura 29	Sobreposição de ATEG_09894 e BIGH12	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição de diversos materiais lignocelulósicos	8
Tabela 2	Comparação de especificidade da família GH12	19
Tabela 3	Descrição da construção de GH12 utilizada nesse estudo	27
Tabela 4	Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de ATEG_09894	27
Tabela 5	Especificidade pelo substrato DE ATEG_09894	50
Tabela 6	Identificação de ativadores e supressores da atividade enzimática	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Suprimento de energia atual	1
1.2	Biocombustíveis	2
1.3	Biomassa lignocelulósica	6
1.4	Hidrólise enzimática da lignocelulose	11
1.5	Glicosil hidrolases	13
1.6	Glicosil hidrolase família 12 (GH12)	17
1.7	Expressão de enzimas lignocelulolíticas em Fungos Filamentosos	23
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Clonagem	26
3.1.1	Desenho dos oligonucleotídeos	27
3.1.2	Amplificação gênica por PCR	27
3.1.3	Eletroforese em gel de agarose	28
3.1.4	Extração de DNA do gel de agarose	28
3.1.5	Ligação em vetor de clonagem	28
3.1.6	Preparo de bactérias e transformação por choque térmico	29
3.1.7	PCR de colônia	29
3.1.8	Extração de DNA plasmidial em pequena escala	30
3.1.9	Sequenciamento	30
3.1.10	Digestão plasmidial	30
3.1.11	Ligação de insertos em vetores de expressão	31
3.2	Expressão heteróloga da β -glucanase GH 12	31
3.2.1	Obtenção de protoplastos	31
3.2.2	Transformação	32
3.3	Purificação de ATEG_09894	32
3.4	Ensaio enzimático e quantificação de proteína	33
3.5	Determinação de pH e temperatura ótimos	33
3.6	Painel de substratos e íons para avaliação das atividades	33

	enzimáticas	
3.7	Espectrometria de Massas	34
3.8	Eletroforese capilar de oligossacarídeos	35
3.9	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	36
3.10	Modelagem e <i>Docking</i> molecular	37
3.11	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Produção de ATEG_09894 em <i>A. nidulans</i>	39
4.2	Determinação dos parâmetros físico-químicos	47
4.3	Especificidade de substrato e identificação de ativadores e supressores da atividade enzimática	50
4.4	Produtos da hidrólise	52
4.5	Determinação do envelope molecular de ATEG_09894	54
4.6	Determinantes da seletividade de ATEG_09894	57
5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Suprimento de energia atual

O uso do petróleo como fonte de energia está atrelado a diversos aspectos da sociedade humana, desde o bem-estar individual até o desempenho industrial e de prestação de serviços. Desempenho este que é fator determinante no posicionamento econômico, político e social das nações (Bon et al., 2008).

Alterações no suprimento ou no uso do petróleo teriam desdobramentos econômicos, políticos e sociais de alcance mundial (Bon et al., 2008). Isto porque o petróleo e seus derivados transformaram-se ao longo do século XX não só na principal fonte primária da matriz energética mundial, como mostra a figura 1, também em insumo para praticamente todos os setores industriais (ANEEL, 2008). Já é possível se observar a escassez e o aumento do preço desta fonte não renovável de energia (ODAC, 2011).

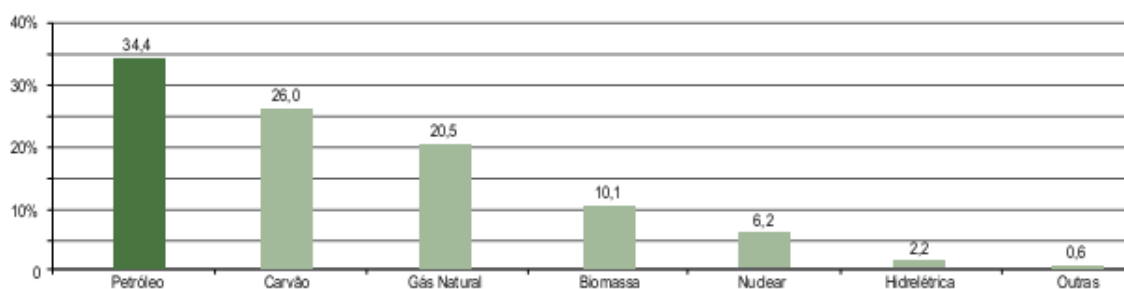


Figura 1. Participação do petróleo na matriz energética mundial em 2006 (fontes primárias). Fonte: ANEEL, 2008.

Além disso, a cadeia produtiva do petróleo e seus derivados é extremamente agressiva ao meio ambiente, inclusive produzindo em várias etapas, como na geração de energia elétrica e no consumo de combustíveis, emissões de gases que

contribuem para o efeito estufa (ANEEL, 2008).

Neste contexto, a busca por fontes renováveis de energia e de alternativas ao uso do petróleo, está mobilizando, internacionalmente, setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais, com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental (Bon e Piccatagio, 2002).

1.2 Biocombustíveis

Os biocombustíveis são combustíveis de origem biológica não fóssil. O bioetanol é o biocombustível mais comum, representando cerca de 90% do total de biocombustível em uso (AIE, 2007). Sua produção convencional é um processo bem conhecido, baseado na conversão enzimática do amido em açúcares, e/ou fermentação de açúcares de 6-carbonos com destilação final do etanol (Figura 2) (AIE, 2007). Analisando o processo total de produção de etanol e gasolina, estima-se que o etanol emite 73% menos CO₂ que a gasolina (Embrapa Agrobiologia, 2009). Na produção de biocombustíveis, a emissão de CO₂ na atmosfera é compensada pela absorção desse gás durante o desenvolvimento dos vegetais.

O etanol pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas, incluindo culturas de cereais, milho, cana-de-açúcar, beterraba, batata, sorgo e mandioca. Sendo a cana-de-açúcar a matéria prima cuja conversão em açúcar é mais fácil. Os maiores produtores mundiais de bioetanol são Brasil (etanol de cana-de-açúcar) e Estados Unidos (etanol de milho). O etanol é utilizado tanto em baixa concentração (5% - 25%) em mistura com gasolina, quanto em alta concentração (85%) como combustível para automóveis. No Brasil, a gasolina deve conter um mínimo de 22% de bioetanol (AIE, 2007, Bon et al., 2008).

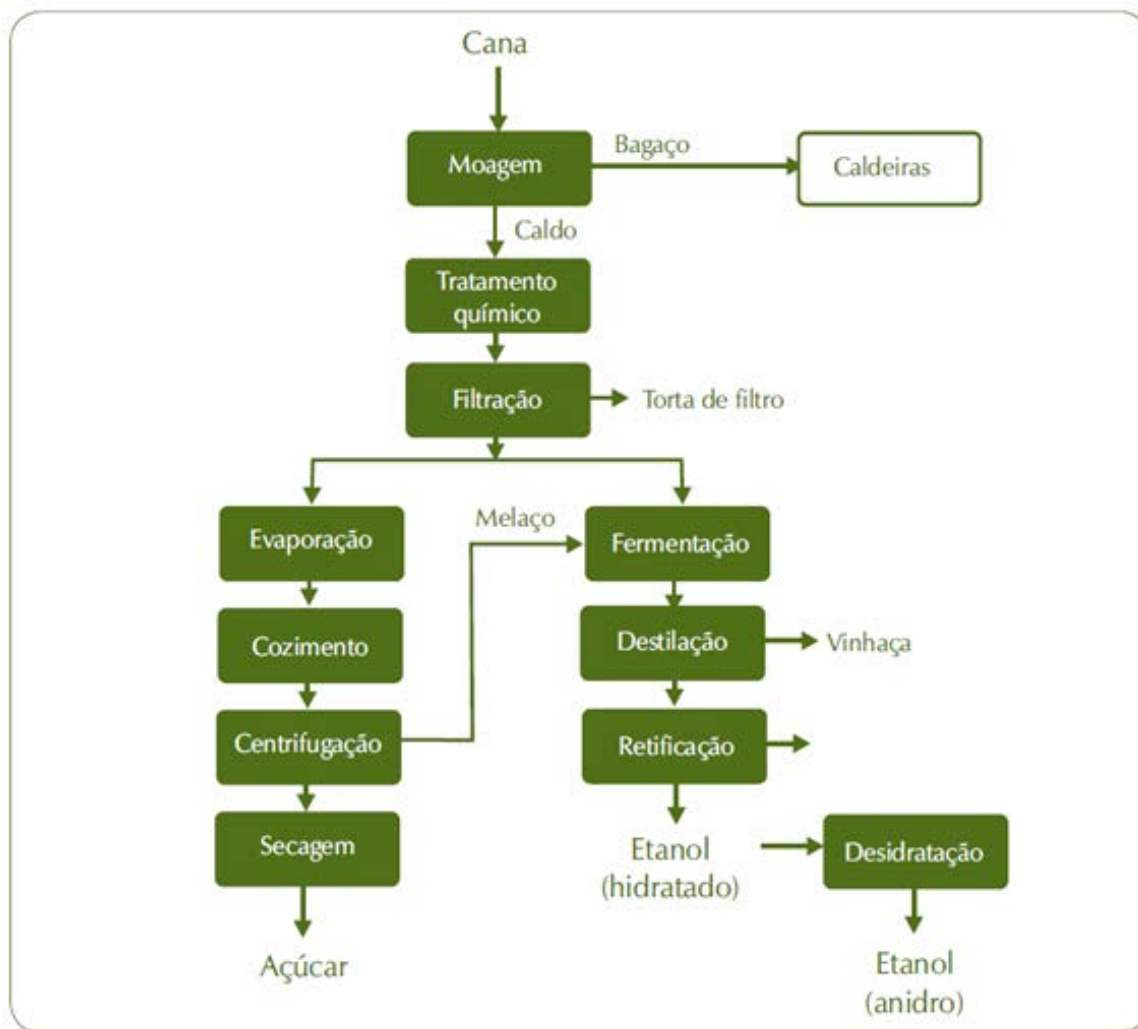


Figura 2. Ciclo de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar. Fonte: Seabra, 2008.

O Brasil já vem, por muitas décadas, utilizando apenas álcool como combustível ou em mistura com a gasolina. O Programa Nacional do Álcool (Proálcool), para a produção de álcool combustível, foi lançado em 1975, no governo de Ernesto Geisel, dentro de uma política de independência para o setor energético e em resposta à primeira crise internacional do petróleo (Bon et al., 2008). No Brasil, o álcool combustível é produzido apenas a partir do caldo de cana-de-açúcar, matéria prima prontamente fermentável, por possuir o substrato (sacarose) na forma molecular passível de utilização direta pelo agente biológico produtor de etanol, a

levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A falta de investimento em novas usinas e reforma dos canaviais, aliada aos problemas climáticos, reduziram a oferta de etanol, que caiu de 28 para 23 bilhões de litros entre 2011 e 2012. Por outro lado, o aumento da frota *flex fuel* de 12,2 para 14,9 milhões de veículos (22%) ocasionou o crescimento da demanda reprimida por etanol hidratado, a qual foi atendida pela gasolina C (EPE, 2012).

As exportações brasileiras de etanol totalizaram 2,0 bilhões de litros em 2011, praticamente o mesmo volume do ano anterior. Os volumes exportados pelo Brasil nos dois últimos anos foram os mais baixos desde 2004 devido à crise econômica que atingiu os países da Europa e os Estados Unidos, levando-os a reduzirem seus orçamentos, inclusive suas importações. Além disto, um desequilíbrio entre a oferta e a demanda do Brasil intensificou a restrição às exportações (EPE, 2012).

Estes fatos ilustram o desafio de aumentar consideravelmente a produção de etanol, não apenas para atender ao aumento da demanda interna, mas também para exportar este combustível. Para suprir o aumento na demanda, além de se contar, com a expansão da cultura da cana, deve-se produzir etanol a partir de outras fontes.

A produção avançada de bioetanol concentra-se em processos que utilizam todas as fontes de lignocelulose disponíveis. Esses processos têm o potencial de aumentar a variedade e quantidade de matéria-prima adequada, incluindo resíduos celulósicos, palha de milho, palha de cereais, resíduos de processos alimentícios, bem como plantas de crescimento rápido como árvores de álamo e grama (AIE, 2007).

A matéria-prima celulósica pode ser cultivada em terras não aráveis ou ser produzida a partir de culturas integradas, o que poderia aumentar consideravelmente

a disponibilidade de terras uma vez que a necessidade da obtenção de culturas plantares para a produção de biocombustíveis desvia o uso de terras agrícolas em detrimento do abastecimento alimentar (Buckeridge et al., 2010).

Diferentemente da fermentação alcoólica de matérias-primas sacarinas, o uso de matérias-primas lignocelulósicas, como substrato para fermentação alcoólica, inclui a hidrólise dos polissacarídeos presentes nessas matérias para a liberação dos açúcares fermentáveis (Bon et al., 2008). Dessa forma, a produção de etanol a partir de lignocelulose inclui pré-tratamento da biomassa para liberar celulose e hemicelulose, a hidrólise para liberar açúcares fermentáveis de 5- e 6-carbonos, a fermentação do açúcar, a separação dos resíduos sólidos e não-hidrolisado de celulose, e a destilação para produção do combustível (Figura 3) (AIE, 2007).

Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequentemente impacto nas etapas subsequentes. Dentre os vários métodos de pré-tratamento, os mais comumente utilizados são pirólise, *steam explosion*, *ammonia fiber explosion*, *CO₂ explosion*, ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo Organosolv (Sun e Cheng, 2005).

O custo dos biocombustíveis é altamente dependente de matéria-prima, processo, terra e os custos trabalhistas, créditos para subprodutos, subsídios agrícolas, alimentos (açúcar) e do mercado de petróleo. Atualmente o custo do etanol de cana de açúcar é 70% menor que o etanol lignocelulósico. Uma das melhorias para a redução de custos é a produção em escala comercial de enzimas hidrolíticas e microrganismos selecionados e/ou modificados para tornar a hidrólise um processo mais eficiente (AIE, 2007).

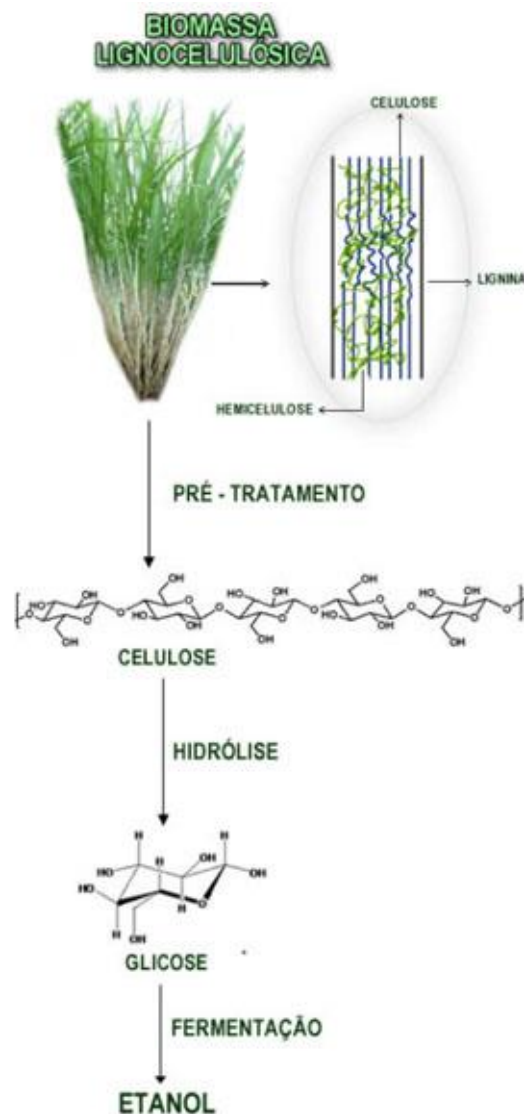


Figura 3. Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. Fonte: Santos et al., 2012.

1.3 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica pode ser agrupada em quatro categorias principais: resíduos da agricultura, culturas energéticas dedicadas, resíduos da madeira e resíduos de papel. É constituída por três principais frações poliméricas: lignina (primeira fração), hemicelulose (segunda fração) e celulose (terceira fração), unidas entre si por ligações covalentes formando uma rede complexa e resistente a ataques microbianos (Figura 4) (Jeffries, 1990). Celulose, hemicelulose e lignina

formam estruturas chamadas microfibrilas, que são organizadas em macrofibrilas que medeiam a estabilidade estrutural da parede celular vegetal.

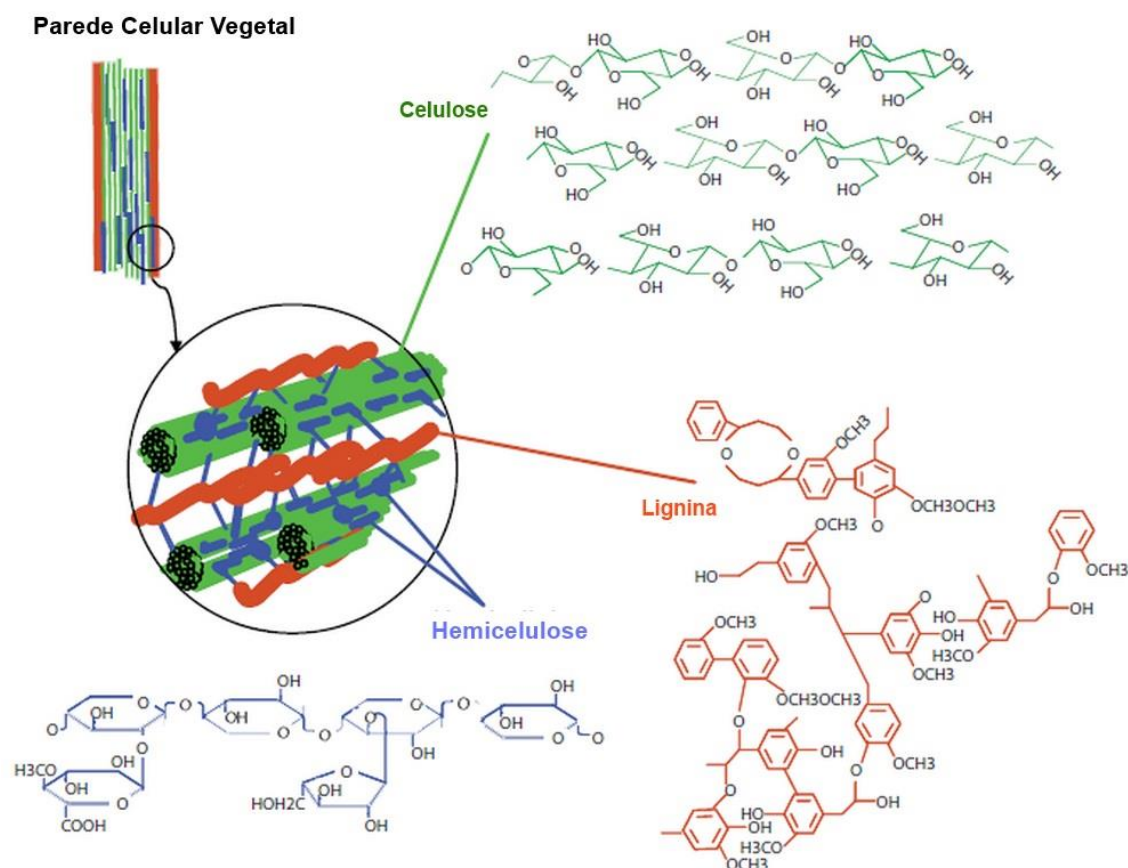


Figura 4. Arquitetura da parede celular vegetal. (adaptado de: <http://biofuel.webgarden.com/sections/blog/pictures-for-lignocellulose>)

Além destes três componentes majoritários, os materiais lignocelulósicos apresentam, em menores proporções, resinas, taninos, ácidos graxos e fenóis, entre outros (D'almeida, 1988; Wayman e Parekh, 1990). Compostos nitrogenados (proteínas) são também encontrados. Entre os sais minerais, os sais de cálcio, potássio e magnésio são os mais frequentes. A tabela 1 apresenta a composição dos resíduos lignocelulósicos.

A celulose é o principal componente do material lignocelulósico. A celobiose é a unidade repetitiva da celulose, dissacarídeo formado por duas unidades de glicose

unidas através de uma ligação β -1,4 (Delmer, 1999) (Figura 5). Uma molécula de celulose pode conter até 10.000 unidades de glicose (Fengel e Wegener, 1989) e sua hidrólise produz monômeros de glicose (Klemm, 2005).

TABELA 1. Composição de diversos materiais lignocelulósicos.

Componente (%)	Sabugo de milho	Palha de trigo	Palha de arroz	Bagaço de cana	Semente de algodão	Jornal	Lixo
Glicose	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0	64,4	40,0
Manose	0,3	0,8	1,8	n.i	2,1	16,6	8,0
Galactose	0,8	2,4	0,4	1,1	0,1	n.i	n.i
Xilose	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6	4,6	13,0
Arabinose	3,2	2,4	4,5	2,5	2,3	0,5	2,0
Lignina	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6	21,0	20,0
Cinzas	4,3	9,6	2,4	2,8	14,8	0,4	1,0
Proteína	4,0	3,0	n.i	3,0	3,0	n.i	n.i

n.i – não informado. Fonte: Wayman e Parekh (1990).

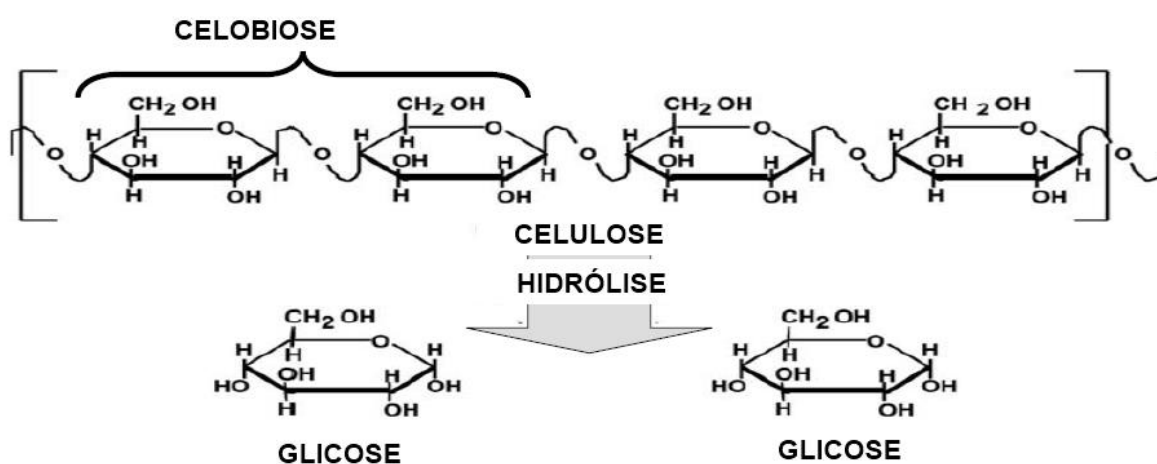


Figura 5. Estrutura da fração celulósica. Adaptado de Fengel e Wegener, 1989.

A hemicelulose, o segundo componente mais abundante de lignocelulose, é composto de diferentes polissacarídeos com cadeias menores que as da celulose, tais como arabinana, galactana, manana e xilana (Figura 6). As hemiceluloses estão associadas às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio, e promovem a união das microfibrilas de celulosas adjacentes (Figura 4). O principal constituinte da fração hemicelulósica é a xilana, um polissacarídeo composto de monômeros de xilose. Este composto faz ligações cruzadas com a celulose e lignina formando o complexo lignina-carboidratos (Lawoko et al., 2005, 2006).

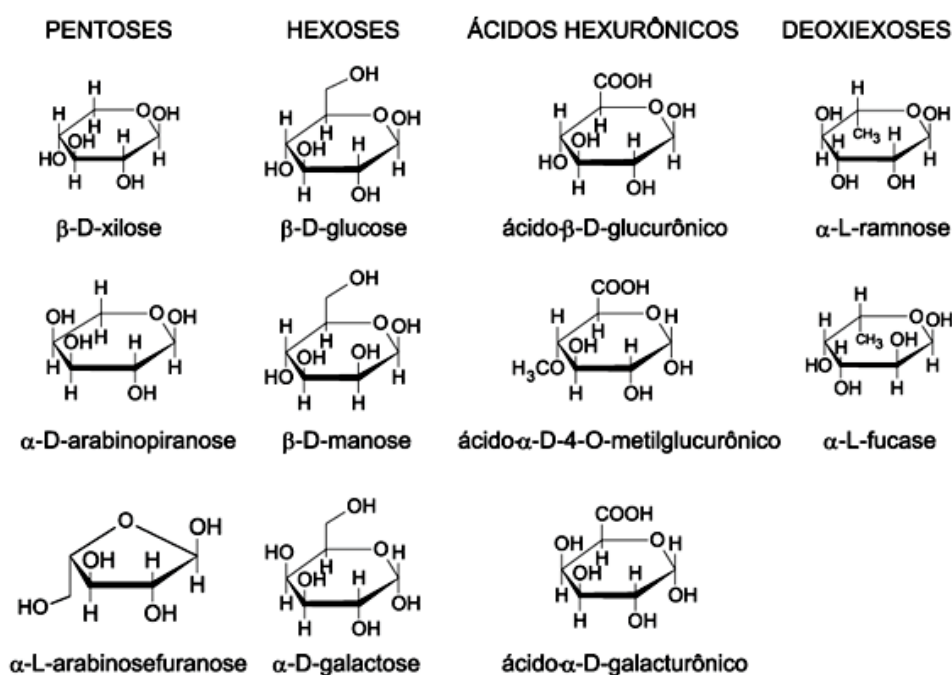


Figura 6. Componentes da fração hemicelulose. Fonte: Moraes, 2005.

O álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico são os precursores de três tipos de ligninas: lignina *p*-hidroxi-fenila (H), lignina guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente (Fengel e Wegener, 1989) (Figura 7). Dependendo da natureza do vegetal, distintas unidades compõem o polímero de lignina. As unidades G e S são encontradas em madeiras de folhosas, já a lignina de coníferas é formada por unidades G (Chen, 1991).

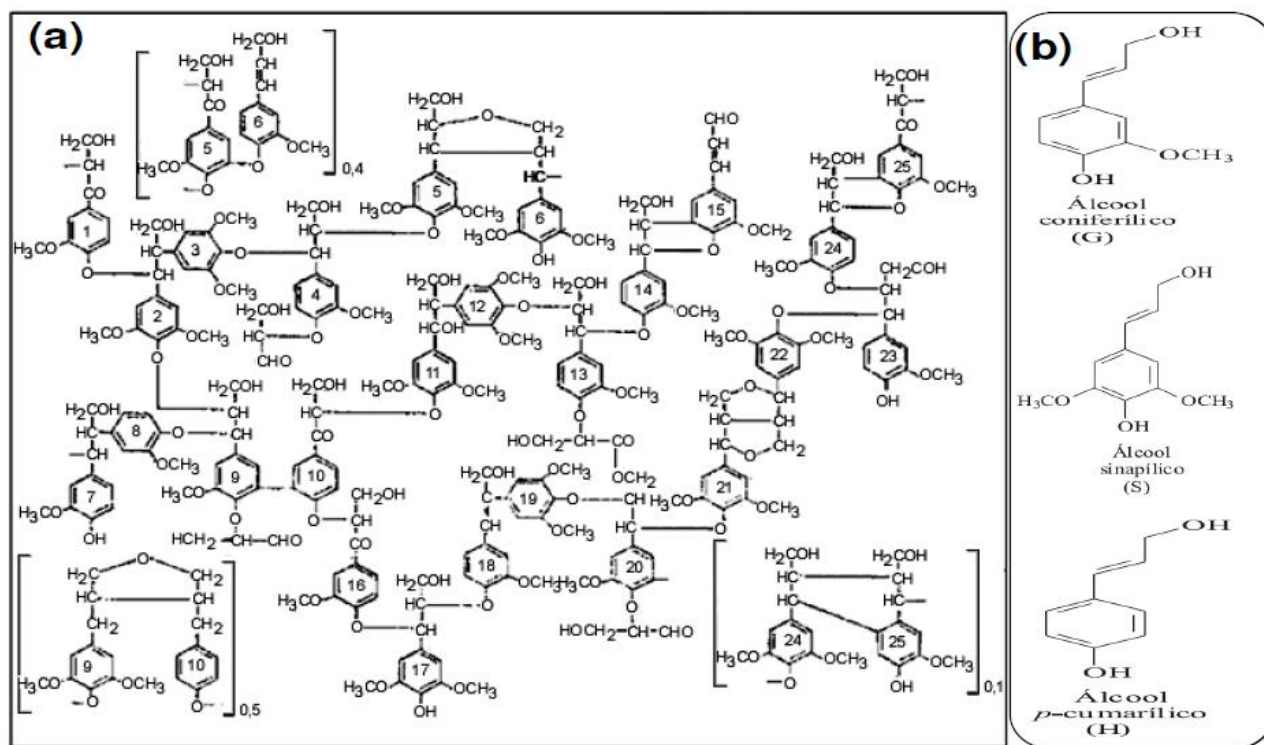


Figura 7. Esquema estrutural para a lignina da madeira moída de *Eucalyptus grandis* (a): estruturas dos alcoóis precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G),iringila (S) e p-hidroxifenila (H). (b). Fonte: Piló-Veloso et al., 1993.

Os cultivos bioenergéticos de segunda geração em estudo são constituídos principalmente de culturas de plantas lenhosas de crescimento rápido (El Bassam, 1998). Na Europa Ocidental, têm-se o cultivo de Álamo (*Populus*) e Salgueiro (*Salix*). Na América do Norte e Europa, capim-elefante (*Miscanthus x giganteus*) é o principal cultivar. Na Ásia, e parte da América do Sul, o bambu é o cultivar de escolha para produção de etanol de segunda geração (Potters et al., 2010). Como estas plantas necessitam de menor quantidade de fertilizante que outras culturas vegetais, elas têm menor probabilidade de esgotar o solo e podem ser produzidas em terra marginal que não são utilizadas para o cultivo alimentar.

A celulose e as hemiceluloses podem ser degradadas por via enzimática, produzindo açúcares que podem ser fermentados para produzir etanol. Dependendo

da fonte das lignoceluloses (agrícolas ou florestais), cerca de 110 a 300 litros de etanol pode ser produzido a partir de uma tonelada de matéria-prima (Oak Ridge National Laboratory, 2006; Mabee et al., 2006; Sims et al., 2010). Outras grandes fontes de lignocelulose são resíduos de processamento de madeira e a fração orgânica dos resíduos urbanos em geral. Segundo a Agência Internacional de Energia (AIE) (2007), é possível destilar em torno de 10^{20} J de energia a partir destes resíduos (cerca de 20% do consumo de energia do mundo atual).

1.4 Hidrólise enzimática da lignocelulose

Previamente à hidrólise da celulose encontrada nos materiais lignocelulósicos, é necessário um pré-tratamento dessa biomassa visando à quebra da estrutura cristalina da lignocelulose, a remoção da lignina para que as moléculas de celulose e hemicelulose sejam expostas à ação enzimática.

A hidrólise de lignina e hemicelulose gera açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana. Além disso, a celulase adsorve fisicamente sobre ligninas. Por esta razão, a biomassa sofre um pré-tratamento para separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose, a qual sofre tratamento específico para a obtenção de glicose (Ogeda e Petri, 2010).

Hidrólises enzimáticas de materiais lignocelulósicos possuem um rendimento de produção de açúcar menor que 20% enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento pode alcançar até > 90% (Gosh e Ghose, 2003).

Para a hidrólise de hemicelulose há enzimas específicas, como as xilanases ou mananases e para a remoção de lignina; lignina-peroxidases e lacases ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa (Ogeda e Petri, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que agem de forma sinérgica e constituem o complexo enzimático chamado celulase. É composto por endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases (E.C. 3.2.1.91) e β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21). As endoglucanases clivam as cadeias de celulose randomicamente dentro das próprias cadeias, atuando majoritariamente em porções amorfas, liberando oligossacarídeos com terminações redutoras e não redutoras livres. As celobio-hidrolases degradam eficazmente as regiões cristalinas da celulose mediante a clivagem de dímeros de celobiose nas extremidades (redutoda ou não redutora) das cadeias celulósicas de forma contínua (Divine, 1994; Li, 2007; Davies, 1995). A celobiose é posteriormente convertida à glicose pela β -glicosidase minimizando a ação inibitória que a presença de celobiose exerce sobre as atividades endo e exo (Henrissat, 1994; Lynd et al., 2002) (Figura 8).

Quando comparada com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da celulose geralmente é conduzida em condições mais brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45° e 50°C), não causa problemas de corrosão e permite maiores rendimentos (75%- 85%). Devido ao seu grande potencial de evolução, muitos especialistas veem a hidrólise enzimática como a chave para a produção de bioetanol de segunda geração a um custo competitivo em longo prazo (Philippidis e Smith, 1995; Lynd et al., 2002). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulases (Sun e Cheng, 2002).

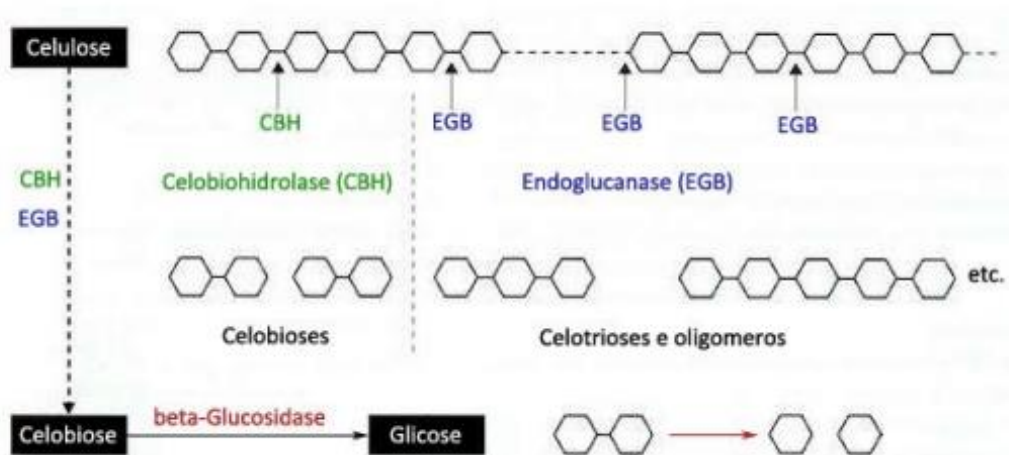


Figura 8. Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulase. Fonte: Ogeda, 2011

1.5 Glicosil hidrolases

Glicosil hidrolases (GHs), também chamadas glicosidases, são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas entre polímeros de sacarídeos ou entre um sacarídeo e outra molécula não polissacarídica. Essas enzimas estão presentes em todos os reinos da vida, onde desempenham diversas funções biológicas.

Podem atuar nas extremidades (exo-GHs) ou internamente (endo-GHs) da cadeia polissacarídica. A nomenclatura IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) dessas enzimas é baseada na sua especificidade ao substrato e, ocasionalmente, no seu mecanismo molecular; tal classificação não reflete as características estruturais das enzimas. Há alguns anos, foi proposta a classificação das glicosidases em famílias, com base em semelhanças de sequências de aminoácidos (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1996). Esta classificação reflete melhor suas características estruturais e relações evolutivas. O banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes Database) continuamente atualiza as famílias de glicosidases. Até o momento 132 famílias distintas estão

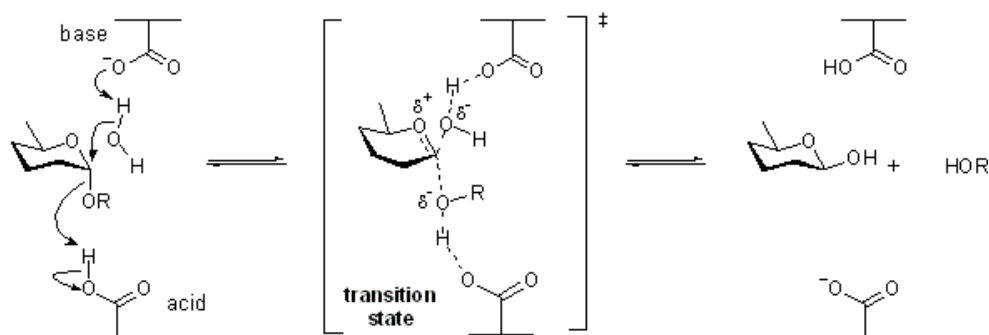
categorizadas (GH1 →132).

A clivagem da ligação glicosídica pelas GHs pode ocorrer com inversão da configuração do centro anomérico ou com retenção da configuração do centro anomérico (Collins et al., 2005). A maioria das enzimas caracterizadas até o momento tende a adotar o mecanismo clássico (de retenção) proposto por Koshland (1953).

A inversão da estereoquímica na posição anomérica envolve um mecanismo de uma etapa (Figura 9), em que a protonação do oxigênio glicosídico pelo ácido geral e a liberação do grupo de partida é concomitante com o ataque nucleofílico de uma molécula de água que foi desprotonada pela base geral. As reações ocorrem com a assistência ácido/básica da cadeia lateral de dois aminoácidos, geralmente aspartato ou glutamato (McCarter e Withers, 1994).

A hidrólise pelo mecanismo de retenção da estereoquímica envolve um mecanismo de deslocamento-duplo envolvendo um intermediário glicosil-enzima (Figura 10). A reação ocorre com a assistência de ácido/base e nucleofílica das cadeias laterais de dois aminoácidos, geralmente glutamato ou aspartato, localizados 5.5 Å de distância. Durante o primeiro passo, geralmente chamado de etapa de glicosilação, um resíduo tem o papel de nucleófilo, atacando o centro anomérico para deslocar a aglicona e formar o intermediário glicosil-enzima. O outro resíduo funciona como catalisador ácido e protona o oxigênio glicosídico ao mesmo tempo em que a ligação é clivada. No segundo passo da reação, também conhecida como etapa de deglicosilação, o complexo glicosil-enzima é hidrolisado pela água, com o outro resíduo atuando como catalisador básico e desprotonando a molécula de água nucleofílica (McCarter e Withers, 1994; Zechel e Withers, 2000).

Inverting mechanism for an α -glycosidase:



Inverting mechanism for a β -glycosidase:

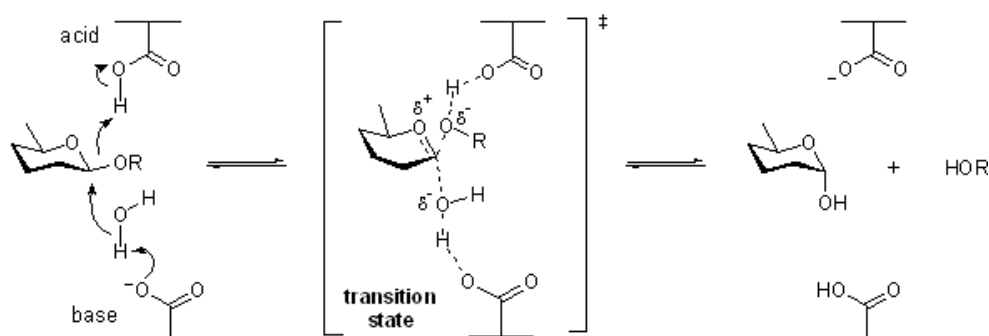
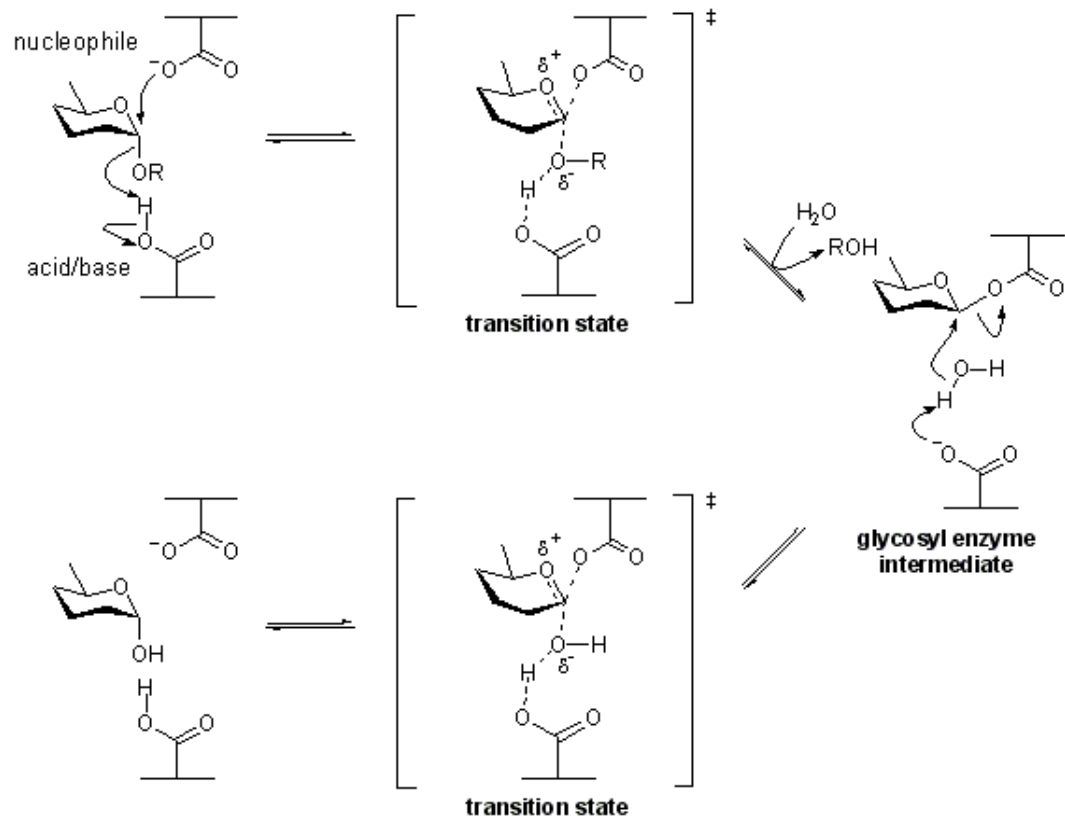


Figura 9. Mecanismo geral de inversão das glicosidases. Fonte: Cazypedia, 2012

A hidrólise pelo mecanismo de retenção da estereoquímica envolve um mecanismo de deslocamento-duplo envolvendo um intermediário glicosil-enzima (Figura 10). A reação ocorre com a assistência de ácido/base e nucleofílica das cadeias laterais de dois aminoácidos, geralmente glutamato ou aspartato, localizados 5.5 Å de distância. Durante o primeiro passo, geralmente chamado de etapa de glicosilação, um resíduo tem o papel de nucleófilo, atacando o centro anomérico para deslocar o radical e formar o intermediário glicosil-enzima. O outro resíduo funciona como catalisador ácido e protona o oxigênio glicosídico ao mesmo tempo em que a ligação é clivada. No segundo passo da reação, também conhecida como etapa de desglicosilação, o complexo glicosil-enzima é hidrolisado pela água, com o outro resíduo atuando como catalisador básico e desprotonando a molécula de água nucleofílica (McCarter e Withers, 1994; Zechel e Withers, 2000).

Retaining mechanism for an α -glycosidase:



Retaining mechanism for a β -glycosidase:

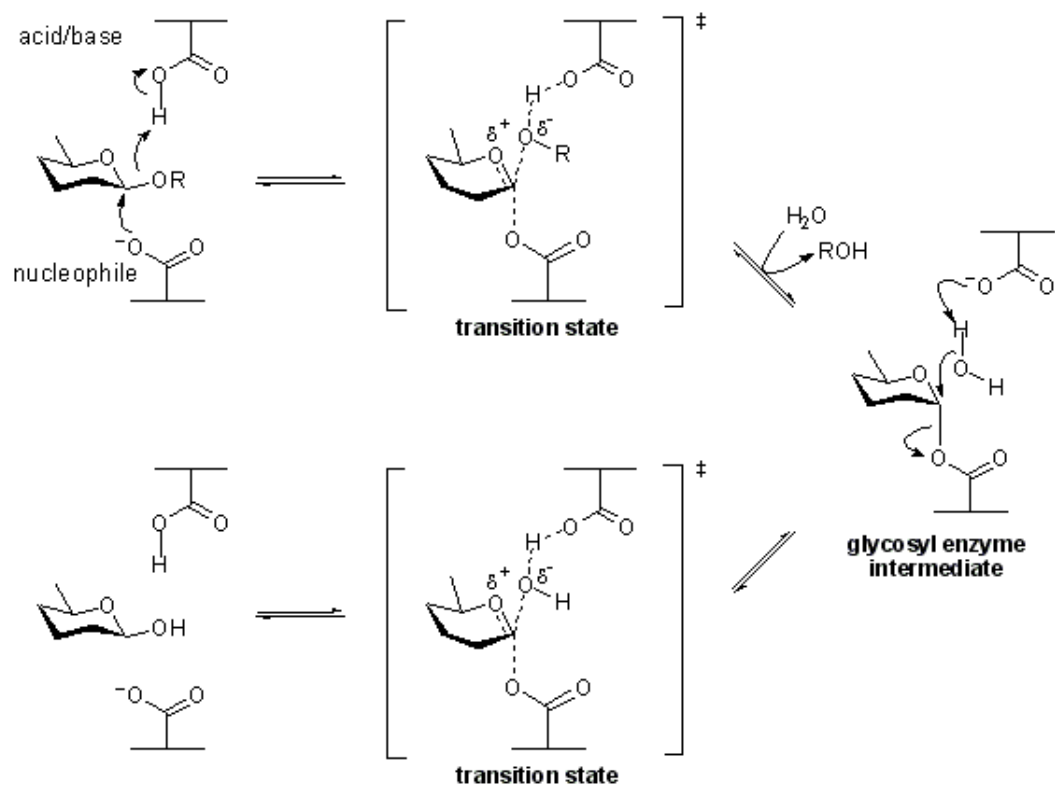


Figura 10. Mecanismo geral de retenção das glicosidases. Fonte: Cazypedia, 2012

GHs têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de aplicação industrial. Por exemplo, indústrias alimentares empregam lipases, pectinases, celulases, amilases e xilanases na digestibilidade de seus produtos, a recuperação de fibras recicladas por celulases, branqueamento de papel por xilanases e manases (enzimas hemicelulolíticas) (Bhat e Bhat, 1997; Buchert et al., 1998; Penttilä et al., 2003; Galante et al., 1998a; Galante et al., 1998b; Kenealy e Jeffries, 2003; Ahuja, 2004; Bajpai, 2004, Polizeli, 2005).

Tecnologias emergentes para a exploração da biomassa também requerem GHs. Os exemplos incluem a produção de biocombustíveis a partir de produtos residuais de lignocelulose e gordura utilizando celulases e lipases (Lynd et al., 1999) e geração de produtos de alto valor a partir de fibras de madeira, com o auxílio de uma variedade de GHs (Brumer et al., 2004; Gustavsson et al., 2005).

Tais aplicações requerem enzimas eficientes e de baixo custo para fazer uma grande variedade de produtos comercialmente viáveis. Membros da família GH12 são largamente utilizadas num certo número de aplicações industriais, tais como têxteis, detergente e alimentos (Bayer et al., 1994; Clarkson et al., 1992; Lange 1993; Maurer, 1997).

1.6 Glicosil hidrolase família 12 (GH12)

Enzimas pertencentes a família GH12 são usadas em processos industriais e o interesse na aplicação dessas enzimas na indústria alimentícia, processamento têxtil e empreendimentos farmacêuticos é crescente (Goedegebuur et al., 2002). Esta família apresenta diferenças na especificidade para o substrato (Tabela 2). Compreendem endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) fúngicas e bacterianas, tais como Cel12A de *Gloeophyllum trabeum* (Cohen et al., 2005), Cel12A de *Trichoderma*

reesei (Karlsson et al., 2002; Grishutin et al., 2006), Cella de *Thermotoga neapolitana* (Bok et al., 1998) e Cel12A de *B. Licheniformis* (Liu et al., 2004); endo- β -1,3-1,4-glucanases (EC 3.2.1.73) tais como Cel12A de *Chrysosporium lucknowense* (Bukhtojarov et al., 2004), Cel12A de *Rhodothermus marinus* (Wicher et al., 2001), e Cel12A de *Pyrococcus furiosus* (Bauer et al., 1999). A família GH12 contém ainda endo- β -1,4-glucanase xiloglucano específico (3.2.1.151), tais como XEG2 de *Aspergillus aculeatus* (Pauly et al., 1999) e XEGA de *A. niveus* (Damasio et al., 2012); e xiloglucano endo-transglicosilases (XET) (EC 3.2.1.207). Esta última atividade foi observada em um único membro de GH12 usando um teste para atividade específico, embora possa representar uma atividade paralela de uma enzima predominantemente xiloglucano endo-hidrolase (Gilbert et al., 2008).

As enzimas com atividade endo- β -1,4-glucanase, também conhecidas como celulasas, catalisam a endo-hidrólise de ligações β -1 $\rightarrow$ 4-D-glucosídicas em celulose, amido e β -glucanos de cereais. Agem em β -glucanos que possuem ligações β 1 $\rightarrow$ 4 e β 1 $\rightarrow$ 3. As enzimas com atividade endo-hidrolase xiloglucano específico, catalisam a clivagem do xiloglucano em oligossacarídeos. As enzimas com atividade endo- β -1,3-1,4-glucanase, também conhecidas como liquenases, catalisam a hidrólise de ligações β -1 $\rightarrow$ 4-D-glucosídicas em β -glucanos contendo ligações β 1 $\rightarrow$ 3 e β 1 $\rightarrow$ 4.

GH12s são enzimas de retenção, e acredita-se seguir um mecanismo clássico de Koshland de duplo deslocamento (Figura 10) e que diferenças no seu estado oligomérico pode estar relacionada com a atividade. A endo β -1,4-glucanase xiloglucano-específica (GH12) de *Aspergillus niveus* é dimérica a 20°C e monomérica na sua temperatura ótima de atividade (60°C, Damasio et al., 2012).

TABELA 2. Comparação de especificidade da família GH12

Organismo	Enzima	Atividade Específica (U mg ⁻¹)		Referências
		Barley – β - glucano	CMC	
<i>Stachybotrys atra</i> BP-A	Cel12A	27	0,5	Picart et al., 2012
<i>Aspergillus japonicus</i>	BG	263	3,9	Grishutin et al., 2006
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Mlg2	25	Low	Kim et al., 2001
<i>Chrysosporium lucknowense</i>	Cel12A	125	11	Bukhtojarov et al., 2004
<i>Rodothermus marinus</i>	Cel12A	7,2	0,7	Wicher et al., 2001
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Cel12A	58	7,1	Bauer et al., 1999
<i>Trichoderma reesei</i>	Cel12A	17	23	Grishutin et al., 2006
<i>Aspergillus aculeatus</i>	XEG2	ND	ND	Pauly et al., 1999
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Cel12A	ND	42000	Cohen et al., 2005
<i>Thermotoga neapolitana</i>	CelA	ND	1219	Bok et al., 1998
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cel12A	ND	117	Liu et al., 2004

Adaptado de Picart et al., 2012.

Alinhamento de sequências de GH12 mostra que a tríade catalítica é constituída dos resíduos Asp¹⁰⁰, Glu¹¹⁵ e Glu²⁰¹ (numeração de AnXEG12A, Powlowski et al., 2009), conservados entre as GH12. Análise filogenética permite a sua diferenciação em quatro subfamílias: GH12 fungícas alocam-se nas subfamílias 12-1 e 12-2, enzimas de *Streptomyces* alocam-se na subfamília 12-3, e a subfamília 12-4 compreende enzimas de termófilos (Goedegebuur, et al., 2002). Até o

momento, as enzimas fúngicas com grande preferência por xiloglucano são reportadas apenas na subfamília 12-2 e não na subfamília 12-1 (Master et al., 2008).

Esta classificação é baseada não apenas no alinhamento da sequência de proteína, mas também nas combinações específicas de posições dos íntrons e as inserções e supressão de aminoácidos em posições específicas dentro da molécula (Goedegebuur et al., 2002).

Estudos de alinhamento de sequência (Master et al., 2008), mutação sítio dirigida (Yoshizawa et al., 2012) e sobreposição de estruturas (Gloster et al., 2007, Powlowski et al., 2009) tentam desvendar os fatores determinantes da especificidade das GH12. A sobreposição de estruturas de AnXEG (xiloglucano específico de *A. nidulans*) e BIXG12 (endoglucanase de *B. licheniformis*) sugerem a participação de resíduos e da superfície molecular na seletividade dessas duas GH12 (Figura 11), e uma inserção SST (130-132) conservada em GH12 xilogucanases, posicionada na região da extremidade não redutora do sítio de ligação ao substrato de AnXEG, pode estar relacionada com a maior afinidade a xiloglucanos (Powlowski et al., 2009). Além disso, há possibilidade da glicosilação atuar na seletividade enzimática (Sandgren, 2003). No entanto, por existirem poucas estruturas de GH12 resolvidas e caracterizadas bioquimicamente, é difícil fazer generalizações sobre determinantes da especificidade do substrato.

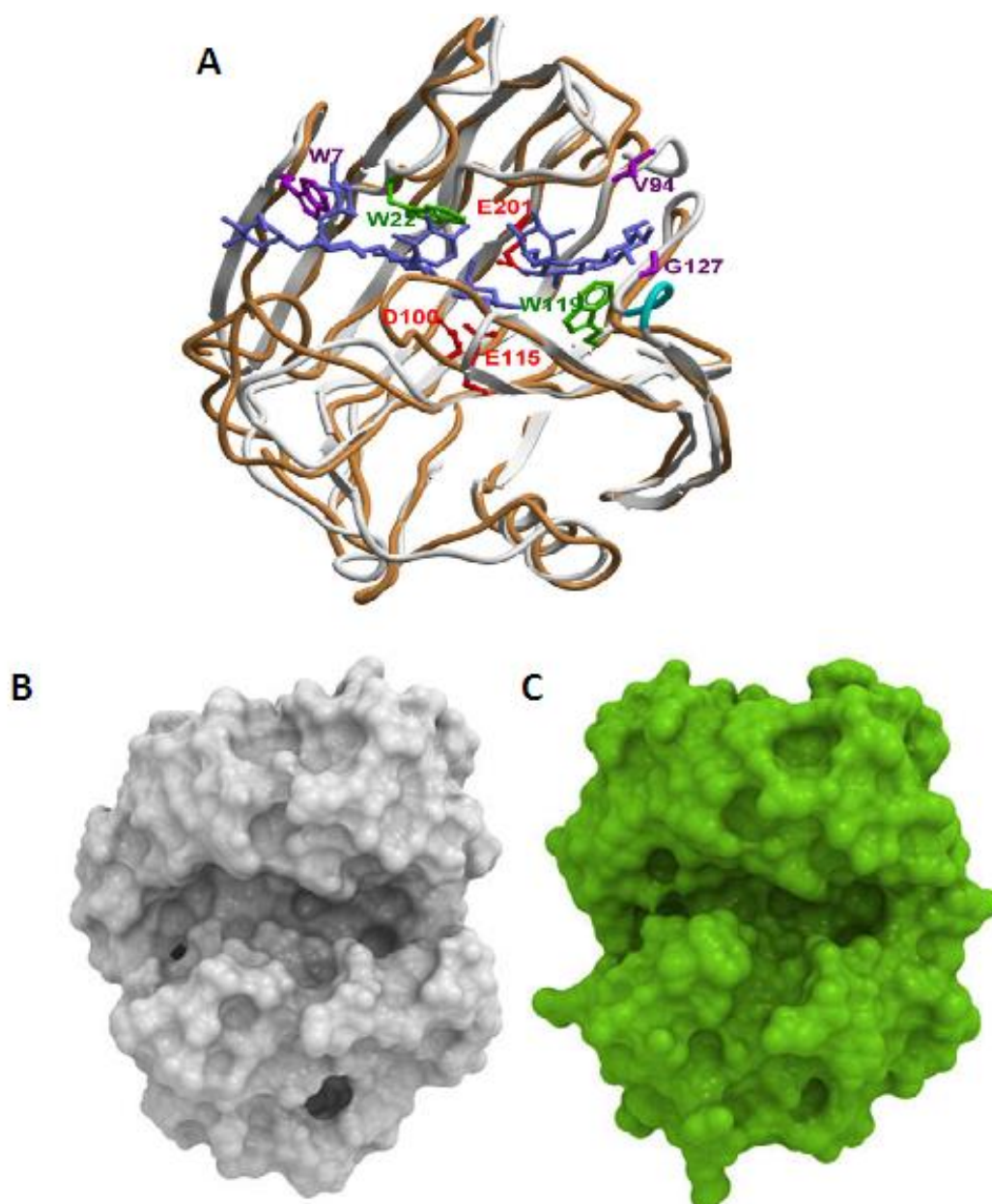


Figura 11. Comparação estrutura de xiloglucanases e celulases. A- Estrutura de AnXEG12A (cinza) e BIXG12 (dourado) em complexo com XXXG/XX (azul escuro) (PDB ID 2JEN). Resíduos catalíticos D100, E115 e E201 (vermelho), resíduos preditos como ligantes de substrato W22 e W119, (verde), resíduos que são preditos em influenciar na especificidade ao substrato em GH12 xiloglucanases W7, V94 e G127 (roxo) e a sequência de inserção SST (130-132) está evidenciada em azul claro. B e C- superfície molecular de AnXEG12A (B) e HgGH12 (C; celulase). A cavidade de ligação ao substrato é mais profunda em B que C sugerindo uma maior afinidade por substratos ramificados. Fonte: Powlowski et al., 2009.

Alguns estudos (Yoshizawa et al., 2011; Yoshizawa et al., 2012; Scarafoni et al., 2010) focam nos determinantes da inibição da atividade de GH12. A estrutura do complexo XEG-EDGP releva detalhes do mecanismo de inibição de xiloendoglucanases, onde 2 argininas localizadas nos loops de inibição 1 e 2 (IL-1 e IL2-) de EDGP entram no sítio catalítico de XEG e mimetizam as interações formadas entre XEG e xiloglucano (Figura 12). As duas argininas em IL-1 e IL2- são conservadas na maioria dos GHIPs (*GH inibitor proteins*). Ainda mais, Leu202 e Pro203 (que contatam o subsítios -4 do sitio ativo da enzima) são conservados nas GHIPs da maioria das plantas (Yoshizawa et al., 2012).

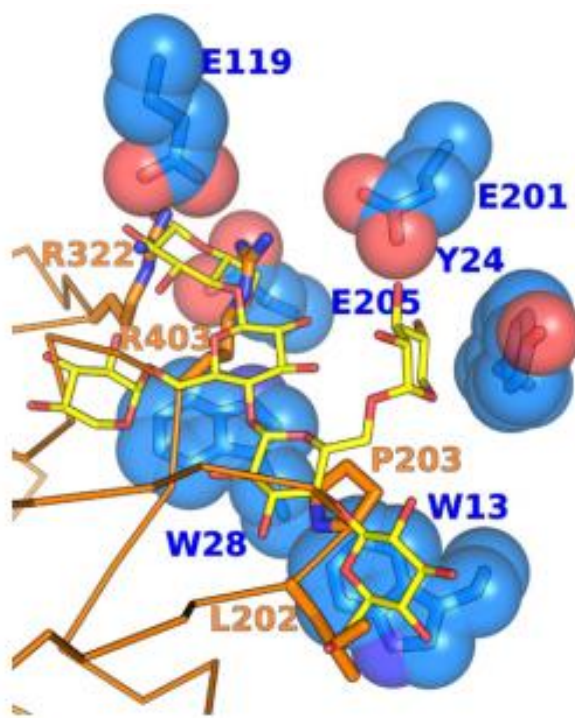


Figura 12. Sobreposição XEG-EDGP e XEG-xiloglucano. Comparação das interações de XEG (azul) e EDGP (laranja) e XEG (azul) e xiloglucano (amarelo). Fonte: Yoshizawa et al., 2012.

1.7 Expressão de enzimas lignocelulolíticas em fungos filamentosos

O primeiro relato de transformação de espécies fúngicas ocorreu em 1973 na Universidade de Rockefeller (MISHRA, 1979; MISHRA et al., 1973). Esses resultados foram recebidos com ceticismo. Após essa primeira experiência, com a transformação de outros genes e outras espécies, essa técnica se tornou amplamente aceita. O primeiro grande avanço ocorreu com a preparação de protoplastos transformáveis o que aumentou a eficiência desse processo (HINNEN et al., 1978). Desde então, o desenvolvimento de plasmídeos para expressão em fungos e o uso de diferentes espécies vem aumentando.

Fungos filamentosos são capazes de converter uma variedade de fontes baratas e abundantes de carbono e nitrogênio em proteínas secretadas para o ambiente extracelular. Os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são as principais linhagens fúngicas utilizadas para a produção de proteínas em larga escala. Vários vetores para produção de proteínas heterólogas em fungos filamentosos vêm sendo desenvolvidos (Meyer et al., 2011a; Verdoes et al., 1994) com promotores fortes e peptídeo sinal de secreção em fusão com proteínas alvos (Record et al., 2003; Meyer et al., 2011b; Joosten et al., 2003). Ainda compõem novas estratégias para expressão em fungos, a construção de cepas deficientes na expressão de proteases (Plunt et al., 2008; Swift et al., 2000); desenvolvimento em meio especializado (Weenink et al., 2006), e mutagênese aleatória de proteínas juntamente com varredura de variantes para a secreção aumentada (Kück e Roff, 2010).

Apesar de sistemas de expressão em procariotos serem econômicos e empregados com sucesso em muitos casos (Guzman et al., 1995; Lee et al., 1987; Santos et al., 2010; Squina et al., 2009), apresentam desafios para tradução de

algumas proteínas eucarióticas (degradação, enovelamento incorreto e baixa solubilidade) (Peroutka et al., 2011) e requerem métodos extensivos para isolamento e purificação da proteína de interesse. Na produção heteróloga em *Pichia pastoris*, embora a tradução ocorra através da maquinaria de um eucarioto, padrões de glicosilação variados, ineficiência de secreção e instabilidade são desvantagens desse sistema (Yurimoto et al., 2009; Bauer et al., 2006). Diante disso, a expressão em *Aspergillus nidulans*, fungo filamentoso com capacidade inata de produzir e secretar enzimas no meio de cultivo (Fleissner et al., 2010; Kuck & Hoff, 2010; Nevalainen et al., 2005; Sims et al., 2005; Punt et al., 2002; Conesa et al., 2001; Bodie et al., 1994; Squina et al., 2009; Damasio et al., 2011) vêm se destacando para a produção direcionada por vetores.

Nesse contexto, foi desenvolvido o vetor de expressão e secreção pEXPYR (Segato et al., 2012) que quando integrado no genoma do *Aspergillus nidulans* direciona a superexpressão induzida por maltose com boa acumulação de proteínas no meio extracelular, facilitando a coleta e purificação das proteínas recombinantes.

Um coquetel enzimático para a degradação do material lignocelulósico é o grande objetivo no estudo de produção de etanol de segunda geração. Para isso, sistemas de expressão de diferentes proteínas em um único hospedeiro vêm sendo desenvolvidas. O flanqueamento do marcador urotidina 5'-fosfato carboxilase (pyrG+) com uso de elementos repetitivos mate1 (Aleksenko et al., 1996) facilita a recombinação ectópica e randômica e excisão desse marcador de seleção. As linhagens PyrG- podem ser selecionadas na presença de 5-FOA. A excisão da marca de seleção possibilita a transformação em série de vetores pEXPYR contendo diferentes proteínas clientes. Devido a esses aspectos, é crescente a expressão de enzimas com potencial biotecnológico em fungos filamentosos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais incluem a caracterização funcional e estrutural da endoglucanase I (XP_001218516) de *Aspergillus terreus* com potencial uso na degradação da biomassa lignocelulósica.

Como objetivos específicos têm-se:

1. Clonar, expressar e purificar uma endoglucanase I (XP_001218516).
2. Caracterizar bioquímica e funcionalmente com determinação de pH, temperatura e substrato ótimos; identificar ativadores e supressores da atividade enzimática e produtos da hidrólise.
3. Caracterizar estruturalmente: determinar o conteúdo de estrutura secundária e estabilidade térmica por dicroísmo circular, determinar o envelope molecular por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), prever através de métodos *in silico* os determinantes estruturais da especificidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Técnicas Moleculares

A sequência correspondente ao gene endoglucanase I de *Aspergillus terreus* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis et al., 1986) utilizando-se DNA de *A. terreus*. O DNA amplificado foi ligado em vetor PGEM-T-easy vector (Promega) e submetido ao sequenciamento. Após a confirmação da sequência correta, a subclonagem em vetor de expressão pEXPYR (Segato et al., 2012) foi realizada. Após o sequenciamento para confirmação dos genes, os plasmídeos foram utilizados para transformar *Aspergillus nidulans* A773.

A metodologia empregada para a obtenção do clone é ilustrada na figura 13 e detalhada nos itens seguintes.

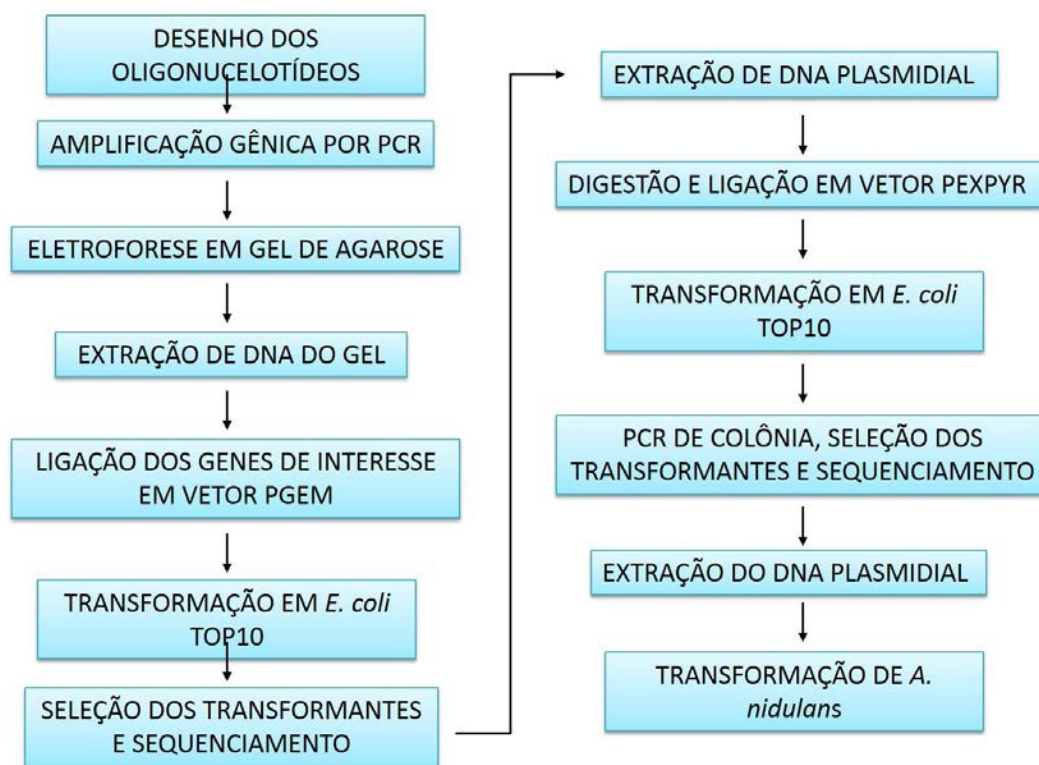


Figura 13. Esquema ilustrativo das etapas de clonagem para expressão de ATEG_09894.

3.1.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Para o isolamento da sequência ilustrada na tabela 3 foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 4) com base na sequência de cDNA depositada no banco de dados (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_001218515.1). Sítios para enzimas de restrição (*NotI* e *XbaI*) foram adicionados na região 5' de cada oligonucleotídeo permitindo ligação em plasmídeo específico para expressão em *A. nidulans*.

TABELA 3. Descrição da sequência de GH12 utilizada neste estudo.

NOMENCLATURA	SEQUENCIA MOLDE (GENEBANK)	REGIÃO DE AMPLIFICAÇÃO
ATEG_09894	XM_001218515	46-705 pb

TABELA 4. Oligonucleídeos utilizados para clonagem de ATEG_09894.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	
ATEG_09894F	TATAGCGGCCGCCAGGAGCTCTGCGAGCAATATGG
ATEG_09894R	TATATCTAGATGCCACACTAGCAGACCACT

3.1.2 Amplificação gênica por PCR

A amplificação da sequência de 660 pares de base correspondente ao gene de interesse foi feita por reação em cadeia da polimerase (PCR) para um volume final de 50 µL, utilizando-se 50 ng de DNA genômico, 5 µL de 10X PCR Buffer (Fermentas), 40 µM dNTP (Fermentas), 20 pmol de cada oligonucleotídeo do par, 2 mM MgCl₂, 5 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). O programa foi

iniciado a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/60s e finalizado a 72°C por 10 minutos. É importante ressaltar que o gene possui 2 íntrons, mas como o sistema de expressão é em linhagem de *Aspergillus*, não se faz necessário amplificar o gene de interesse a partir de biblioteca de cDNA.

3.1.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%. Foi utilizado como padrão MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), e como tampão de amostras 6X MassRuler™ Loading Dye Solution (Fermentas). A eletroforese foi realizada a 5V/cm por 1 hora.

3.1.4 Extração de DNA do gel de agarose

Após a eletroforese em gel de agarose, as bandas referentes às sequências nucleotídicas desejadas foram excisadas e purificadas utilizando-se QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN). O fragmento do gel foi ressuspensão em tampão QG e incubado a 50°C por 10 minutos. Após este período foi adicionado isopropanol e a mistura filtrada em coluna QIAquick. O DNA se liga a membrana e após lavagens com tampão PE é eluído com solução 10 mM Tris·Cl, pH 8.5.

3.1.5 Ligação em vetor de clonagem

A ligação do inserto em vetor pGEM®-T Easy (Promega), foi feita utilizando-se 200 ng de amostra purificada do gel, 50 ng de vetor e 5 U de T4 DNA Ligase. A reação foi incubada a 16°C por 16 horas.

3.1.6 Preparo de bactérias competentes e transformação por choque térmico

Uma colônia isolada de *Escherichia coli* TOP10 foi crescida em 5 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 16 horas a 37°C. Após esse período, foi realizada uma diluição 1:100 em LB líquido e mantida sob as mesmas condições até que atingisse densidade óptica entre 0,6 e 0,8 (600 nm). As células foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e coletadas por centrifugação a 4000xg por 10 minutos a 4°C. A homogeneização foi feita em 10 mL de solução 0,1 M CaCl₂ e 10% glicerol por 15 minutos em banho de gelo. As células foram centrifugadas a 4000g por 15 minutos a 4°C, ressuspensas em 1 mL de solução 0,1 M CaCl₂ e 10% glicerol e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. A estocagem foi feita a -80°C.

A transformação foi realizada adicionando-se 1 µg de plasmídeo a 75 µL de *E. coli* TOP 10, com posterior incubação em gelo por 30 minutos. Elevou-se então a temperatura a 42°C por 2 minutos e em seguida colocou-se em gelo por 2 minutos. Logo após foram adicionados 800 µL de LB líquido e incubou-se por 60 minutos a 37°C. As células foram então plaqueadas em meio apropriado (LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina).

3.1.7 PCR de colônia

Colônias isoladas de transformantes foram ressuspensas em 10 µL de H₂O estéril e utilizada como molde de DNA. Procedeu-se à reação conforme descrito na seção 3.1.2. As colônias positivas foram crescidas em meio LB com ampicilina para a extração plasmidial. Um alíquota para estoque foi mantida a -80°C em glicerol 20%.

3.1.8 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

Foi realizada através uso do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Uma cultura da bactéria com o plasmídeo de interesse crescida por 16 horas é centrifugada por 1 minuto, a 14000g. O pellet é ressuspenso em tampão apropriado. Em seguida é feita a lise alcalina e neutralização do lisado. A reação é submetida à centrifugação por 10 minutos, 13200g. O sobrenadante é então filtrado em coluna QIAprep. O DNA se liga a membrana e após lavagens com tampão PE é eluído com solução 10 mM Tris·Cl, pH 8.5.

3.1.9 Seqüenciamento

Os plasmídeos selecionados foram seqüenciados pelo serviço de sequenciamento do LNBio-CNPEM. O resultado foi analisado em banco de dados usando BLAST nucleotídeos (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschull et al., 1990). O alinhamento do sequenciamento e a sequência depositada no banco de dados foi realizada pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.1.10 Digestão plasmidial

O plasmídeo pGEM®-T Easy contendo o inserto de interesse e o vetor pEXPYR foram submetidos a reação de digestão utilizando-se 10U das enzimas *NotI* e *XbaI* para cada 1 µg de vetor. A reação foi mantida a 37°C durante 2 horas e inativação das enzimas foi realizada a 65°C por 15 minutos. Foi realizada uma eletroforese para confirmar a digestão (item 3.1.3) e excisão da banda digerida (item 3.1.4).

3.1.11 Ligação de insertos em vetores de expressão

Os insertos foram ligados nos vetores previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição. Foram utilizadas 2 U de T4 DNA ligase (Fermentas), tampão de ligação 1X, 200 ng de vetor e 80 ng inserto. O volume final foi de 10 µL e a reação incubada por 16 horas a 16°C.

3.2 Expressão heteróloga da β -glucanase GH 12

3.2.1 Obtenção de protoplastos

Aproximadamente 5×10^8 esporos da linhagem A773 de *A. nidulans* foram inoculados em meio mínimo suplementado com uracila, uridina e ácido-5-fluorótico e incubados a 37°C, sob agitação (180 rpm) por 18 horas. O micélio foi separado por filtração com papel Whatman nº1 e lavado com MgSO_4 0,6 M e incubado com 25 ml de solução DSPC (KCl 1,1M, ácido cítrico 0,1 M, pH 5,8 ajustado com KOH 1 M e esterilizada por filtração). Ao micélio foram adicionadas as seguintes enzimas: 100 mg/mL de “Lysozyme from Chicken egg White” (SIGMA L6876), 50 mg/mL de “Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*” (SIGMA L1412-10G) e 100 mg/mL de albumina bovina. A mistura foi incubada a 30°C e 100 rpm por 1-2 horas ou até não haver pellets visíveis.

Os protoplastos foram coletados por filtração em funil de Buchner contendo uma camada de membrana Miracloth (Calbiochem) em tubo de vidro estéril e lavados 2 vezes com 50 mL de STC 50 (sorbitol 1,2 M, CaCl_2 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, autoclavado e mantido 4°C). Os protoplastos obtidos foram utilizados para transformação com construção de interesse.

3.2.2 Transformação

O DNA plasmidial (10 µg) foi diluído para 50 µL com solução STC. Em seguida, foram acrescentados 150 µL de uma suspensão de protoplastos, seguido de incubação à temperatura ambiente 10-15 min. Foram adicionados 2 mL de solução PEG 60% (6g de PEG 4000 em 10 mL de STC) seguido de agitação cuidadosa e extensiva à temperatura ambiente 20-25 min. Após esse período, 8 mL de solução STC foram adicionados seguido da transferência de 2 mL da mistura final para placas contendo meio de regeneração de protoplastos (meio mínimo adicionado de Sorbitol 1,2M) e seleção de transformantes (sem uracila, uradina ou 5-FOA). Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Os transformantes positivos foram isolados pela sua habilidade de crescer na ausência de uracila e uridina. A expressão da endoglunase GH12 recombinante de *A. terreus* foi realizada em meio mínimo suplementado com 10 mM de piridoxina e 2% de maltose (meio de expressão), incubados a 37°C sob condições estáticas por 48 horas.

3.3 Purificação de ATEG_09894

O micélio foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº1) e o extrato bruto foi concentrado através de sistema Amicon® (Millipore) utilizando uma membrana com corte de 10 kDa. Após ser concentrado, o extrato bruto contendo a ATEG_09894 foi dialisado em tampão acetato de amônia 50 mM pH 6,0.

Para a purificação, as amostras concentradas e dialisadas foram aplicadas em alíquotas de 500 µL em coluna Sephadex G-75® (GE Healthcare Life Sciences) acoplada ao sistema ÄKTA™ FPLC™ (GE Healthcare Life Sciences) utilizando um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e pressão máxima de 1,8 MPa. O mesmo tampão foi utilizado

para eluição da amostra.

3.4 Ensaio enzimático e quantificação de proteína

A atividade enzimática foi medida por método colorimétrico utilizando β -glucano de cevada (P-BGBH, Megazyme) como substrato e os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A mistura de reação, consistindo de 50 μ L de substrato (0,5% m/v) em água e 50 μ L de solução de enzima em tampão acetato de amônia 50 mM pH 6.0, foram incubadas a 50°C em Thermostat® (Eppendorf) por 30 minutos a 700 rpm de agitação, a reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de DNS e fervida a 99°C por 5 minutos. Os açúcares redutores liberados foram mensurados a 540 nm no espectrofotômetro Infinite M200® (Tecan- Switzerland).

3.5 Determinação de pH e temperatura ótimos da enzima

Os efeitos do pH e temperatura na atividade de ATEG_09894 foram verificados usando β -glucano (0.5% m/v) como substrato. Para determinar o pH ótimo da enzima, os ensaios foram realizados em tampão citrato-fosfato pH (3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0). Para os ensaios para a obtenção da temperatura ótima foi utilizado tampão citrato-fosfato pH 5,0 e as reações incubadas a 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85°C.

3.6 Painel de substratos e íons para avaliação das atividades enzimáticas

A atividade de ATEG_09894 foi testada em diferentes substratos na concentração de 0,5% (m/v).

Sendo eles: β -glucano (Megazyme), Xiloglucano (Megazyme), Konjac Manana, Carboximetilcelulose (Sigma), Arabinogalactana lariço (Megazyme), Laminarina (Sigma), Arabino xilana de trigo (Megazyme), Xilana de madeira de faia (Megazyme), Arabinana desramificada (Megazyme), Galactomanana (Megazyme), goma de alfarroba (Megazyme), arabinoxilana de centeio (Megazyme), xilana de aveia (Megazyme). A influência de vários íons, solventes próticos, detergentes e agentes quelantes também foi verificada. Dentre eles: KCl (50 mM), Tween (0,5%), DMSO (0,5%), Triton-X-100 (0,5%), $MgCl_2$ (0,5%), $CaCl_2$ (10 mM), $MnCl_2$ (10 mM), EDTA (50 mM), $FeCl_3$ (10 mM), $CuSO_4$ (10 mM) e $CdCl_2$ (50 mM).

Cada ensaio foi realizado em triplicata para um volume final de 100 μ L, sendo: 40 μ L de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 5,0, 50 μ L de substrato 0,5% (m/v) e 10 μ L de enzima (aproximadamente 100 ng). Cada reação continha seu respectivo branco. Após 60 minutos de incubação a 55°C, adicionou-se 100 μ L de DNS e a reação foi incubada novamente por 5 minutos a 99°C. A reação foi medida a 540 nm de absorbância. A partir de uma curva padrão preparada no laboratório com glicose e xilose, a quantidade de açúcares redutores totais foi calculada e a atividade foi expressa em unidade por mL do extrato enzimático (μ mol de glicose equivalente/min.mL), que foi posteriormente transformada em atividade relativa.

3.7 Espectrometria de Massas

A banda correspondente à ATEG_09894 obtida em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) foi cortada e tratada como descrito por Schevchenko et al. (1996), e digerida com tripsina, como forma de preparação das amostras para aplicação no espectrômetro de massas.

Para injeção no LC-MS-MS as amostras foram ressuspensas em 12 µL de ácido trifluoroacético 0,1% e uma alíquota (4,5 µL) da fração resultante da mistura do peptídeo foi separada por C18 (100 µm x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplada com um espectrômetro de massas Q-Tof Ultima (Waters) com fonte de nano-eletrospray com fluxo de 0,6 µL/min. O gradiente foi 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico por 60 minutos para as proteínas digeridas. O instrumento foi operado no modo *top three*, no qual um espectro de MS é adquirido seguido de MS/MS dos três picos mais intensos detectados. O espectro foi adquirido usando o software Mass Lynx v. 4.1 e os arquivos com dados preliminares foram convertidos para uma lista de picos sem somar as análises, pelo software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.) e comparados no banco de dados NCBI.

3.8 Eletroforese capilar de oligossacarídeos

Para entender o modo de ação da enzima foi utilizado celohexase (Megazyme, Bray, Ireland) marcada com APTS (ácido 1,3,6-trissulfônico-8-aminopireno) por aminação redutiva. Ensaios enzimáticos foram preparados como no item 3.4 utilizando pH 5,0 e temperatura de 55°C com variação de tempo de reação (0, 15 e 30 min.) A eletroforese capilar dos oligossacarídeos foi realizada em um sistema P/ACE[™] MDQ (Beckman Coulter) com detector de fluorescência induzida por laser. Um capilar de sílica fundida (TSP050375, Polymicro Technologies) com diâmetro interno de 50 µm e 31 cm de comprimento foi usado como coluna de separação para os oligossacarídeos. As amostras foram injetadas pela aplicação de uma pressão de hélio de 4,5 psi por 0,22 minutos. As condições de eletroforese foram 15 kV/70-100 µA com o cátodo na entrada, 0,1 M de fosfato de

sódio, pH 2,5 como tampão de corrida, e uma temperatura controlada de 20°C. O capilar foi lavado com NaOH 1 M seguido de tampão de corrida com ciclo de mergulho para evitar transição após a injeção. Os oligômeros marcados com APTS foram excitados a 488 nm e a emissão foi coletada através de um filtro com banda de 520 nm.

3.9 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

O espectro de CD foi coletado usando espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco corporation, Tóquio, Japão), sendo a temperatura mantida a 20°C através de um Peltier Type Control System PFD425S (JASCO). Todos os dados foram coletados usando cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

Mediu-se a elipticidade em graus na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm, com uma velocidade de 100 nm/min, sendo feitas no total 30 leituras com resposta de 1 segundo em varredura contínua.

Os valores obtidos em miligraus foram convertidos para elipticidade molar por resíduo ($[\theta]_{MRW}$), em miligraus.cm².dmol⁻¹, que é definida pela equação (Adler et al., 1973):

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs} \times MRW}{10 \times d \times c}$$

Onde θ_{obs} é a elipticidade observada em graus, MRW é o peso molecular médio dos resíduos da proteína, d é o caminho óptico da cuβ em centímetros e c é a concentração da proteína em mg/mL. O MRW é calculado dividindo-se o peso molecular da proteína em Daltons pelo número de resíduos.

A desnaturação térmica foi realizada variando a temperatura de 4°C a 90°C sendo monitorada a 215 nm, e obtendo um espectro (de 190 nm a 260 nm) a cada

variação de 5°C.

3.10 Modelagem e *Docking* molecular

As coordenadas atômicas de endoglucanase de *Aspergillus niger* (PDB: 1KS5) (Khademi et al., 2002) foram utilizadas como modelo para a modelagem molecular por homologia de ATEG_09894 utilizando o programa MODELLER (Sali e Blundell, 1993) disponível no servidor HHpred (Söding et al., 2005).

Para o docking molecular foram utilizados como ligantes celohexaose (PDB ID 2EJ1) e xiloglucano (PDB ID 2JEN). A estrutura dos ligantes foi obtida de NCBI Pubchem Data Bank (Bolton et al., 2008).

Molegro virtual docker (MDV) (Thomsen et al., 2006) foi usado para as simulações de docking molecular com os seguintes parâmetros: rede de 0.30 Å, 15 Å de raio a partir da cavidade selecionada para o docking, MolDock SE como algoritmo de busca. O número de corridas foi ajustado para 10 e o número máximo de interações ajustado para 1500. Após cada corrida de docking, minimização de energia e otimização das ligações de hidrogênio foram realizadas. MolDock e Rerank scores foram utilizados para selecionar a melhor posição de cada ligante.

3.11 Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)

Através da técnica de SAXS, informações sobre a massa molecular das partículas espalhadoras e do raio de giro (R_g) da proteína de estudo são obtidos a partir dos dados coletados. Por meio de programas computacionais como DAMMIN (Svergun, 1999) e GASBOR (Svergun et al., 2001), um modelo de baixa resolução da forma da proteína pode ser obtido.

Os dados de SAXS foram obtidos na linha de luz D11A-SAXS1 no Laboratório

Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil, usando comprimento de onda de 1,48 Å e um detector bidimensional, com arranjo CCD (MARCCD, USA), de 165 mm. A distância do detector para a amostra foi de 1068,04 mm e os dados na faixa de 0,02 nm⁻¹ para 0,21 nm⁻¹ foram coletados usando proteína pura nas concentrações de 2,5 e 5 mg/ml, em tampão em tampão acetato de amônia 50 mM pH 6.0. Exposições de 300 e 600 s foram realizadas e os dados do tampão foram coletados antes e depois dos dados da amostra para fazer a correção do solvente e normalização do espalhamento.

Ajuste dos dados experimentais e avaliação da função p(R) foram realizados utilizando o programa GNOM (Svergun, 1992). O envelope a baixa resolução de ATEG_09894 foi determinado usando modelagem *ab initio* implementada no programa DAMMIN. O modelo a baixa resolução e o modelo da estrutura tridimensional foram superpostas usando o programa SUPCOMB (Kozin e Svergun, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de ATEG_09894 em *A. nidulans*

Aspergillus terreus, é um ascomiceto filamentoso, normalmente encontrado no solo que pode causar aspergilose. Esta doença provoca mortalidade e morbidade em todo o mundo sendo a principal causa infecciosa de morte em leucemia e transplante de células-tronco, afetando milhares de pacientes por ano. A infecção causada por *A. terreus* é responsável por uma taxa de mortalidade maior que aspergilose causada por outras espécies de *Aspergillus*, com a mortalidade atingindo 100% em muitas séries. Este microrganismo é completamente resistente à anfotericina B, medicamento fundamental no tratamento de infecções fúngicas (MSC, 2012).

A. terreus é a principal fonte de lovastatina, o primeiro medicamento da classe estatina a ser aprovada pela FDA para o tratamento de hipercolesterolemia em humanos. O mercado mundial de estatinas movimenta mais de US \$ 12 bilhões anuais. Além de lovastatina, *A. terreus* produz vários outros metabólitos secundários (por exemplo, patulina, citrinina, isoterrin, asterriquinone) e de enzimas comercialmente importantes (por exemplo, xilanases) (MSC, 2012).

Esses fatos foram determinantes para que o sequenciamento do genoma de *A. terreus* fosse objeto de estudo da Iniciativa Broad Fungal Genome, financiado pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID), através do Broad's Microbial Sequencing Center (MSC).

Com o genoma disponível foi possível a busca por genes de interesse para este estudo. Para a identificação de um gene que codifica uma endoglucanase GH12 no genoma de *A. terreus* utilizou-se a ferramenta “Simple Modular Architecture

research tool” SMART (Letunic et al., 2008). A sequência nucleotídica encontrada (GeneBank code XM_001218515.1) foi analisada pelo software “Signal P 4.0 server”, onde regiões referentes a peptídeo sinal são identificadas. Após essa análise foram construídos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do nucleotídeo 45 ao 705 (Figura 14).

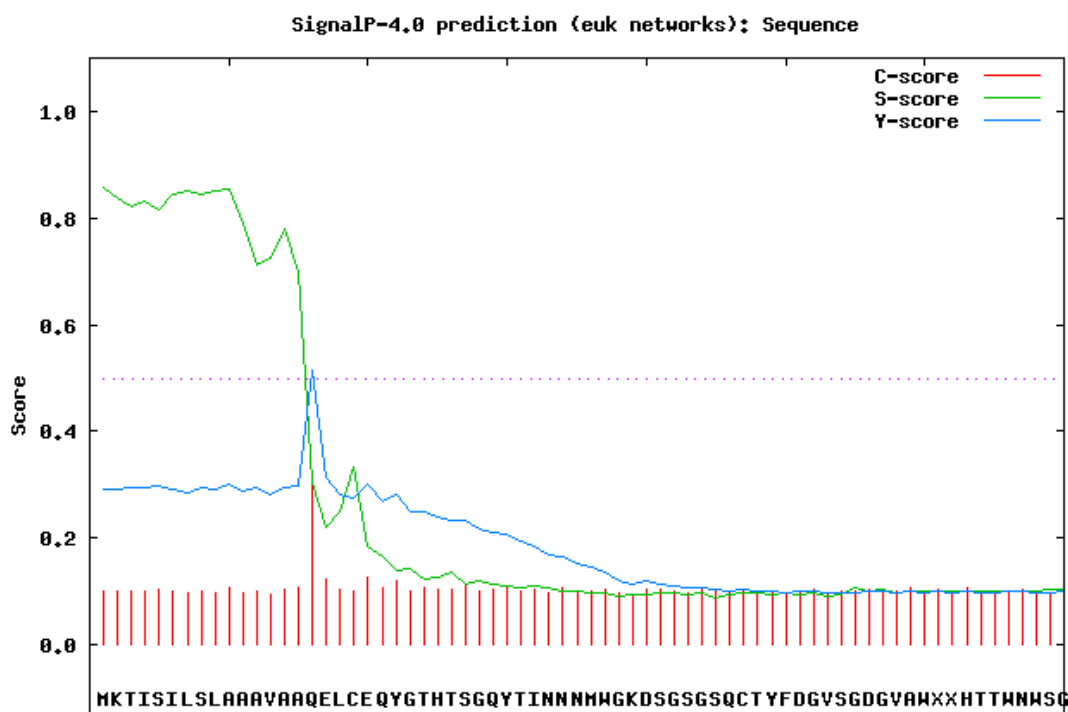


Figura 14. Gráfico ilustrando a predição *in silico* de regiões de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos de ATEG_09894.

A amplificação de um fragmento composto de 660 nucleotídeos foi observada por eletroforese em gel de agarose (Figura 15). As bandas foram excisadas do gel, ligadas em pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 16) e estes usados para transformar células *E. coli* TOP10. A seleção dos clones foi feita por alfa complementação em meio contendo X-GAL.

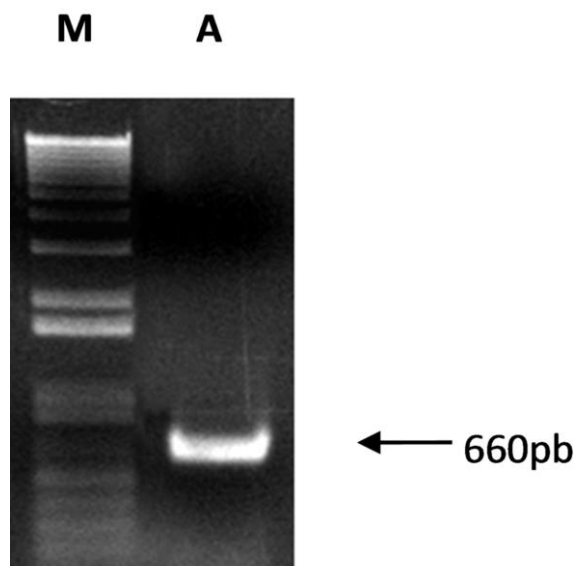


Figura 15. Gel de agarose 1% mostrando produto de PCR da endoglucanase GH 12 de *A. terreus* amplificado a partir do DNA genômico. M: marcador de pares de base (1Kb)

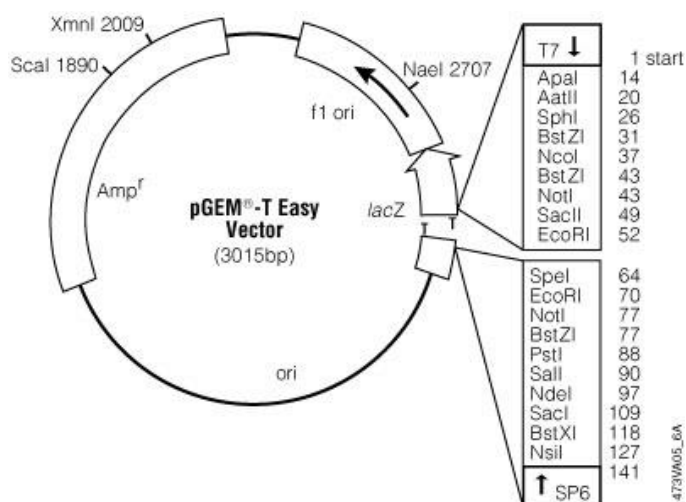


Figura 16. Vetor de clonagem pGEM-T-Easy Vector. Observa-se que o sítio múltiplo de clonagem encontra-se no interior da sequência do gene lacZ. Quando nenhuma sequência é inserida este gene codifica a proteína β -galactosidase, no entanto, se a clonagem é realizada esta proteína não é produzida.

Algumas colônias brancas foram crescidas em meio LB para a realização da extração plasmidial. Os plasmídeos foram submetidos ao sequenciamento e o resultado foi comparado à sequência depositada no banco de dados (Figura 17).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com sítios para as enzimas de restrição NotI e XbaI visando a clonagem no vetor de expressão pEXPYR (Segato et al., 2012), um vetor de alta expressão e secreção de proteínas recombinantes em *Aspergillus nidulans*. Este fungo é um sistema modelo de fácil cultivo em laboratório e possui capacidade inata de produzir e secretar enzimas (Fleissner e Dersch, 2010; Kück e Hoff, 2010; Nevalainen et al., 2005; Sims et al., 2005; Punt et al., 2002; Conesa et al., 2001; Bodie et al., 1994; Squina et al., 2009; Damásio et al., 2011).

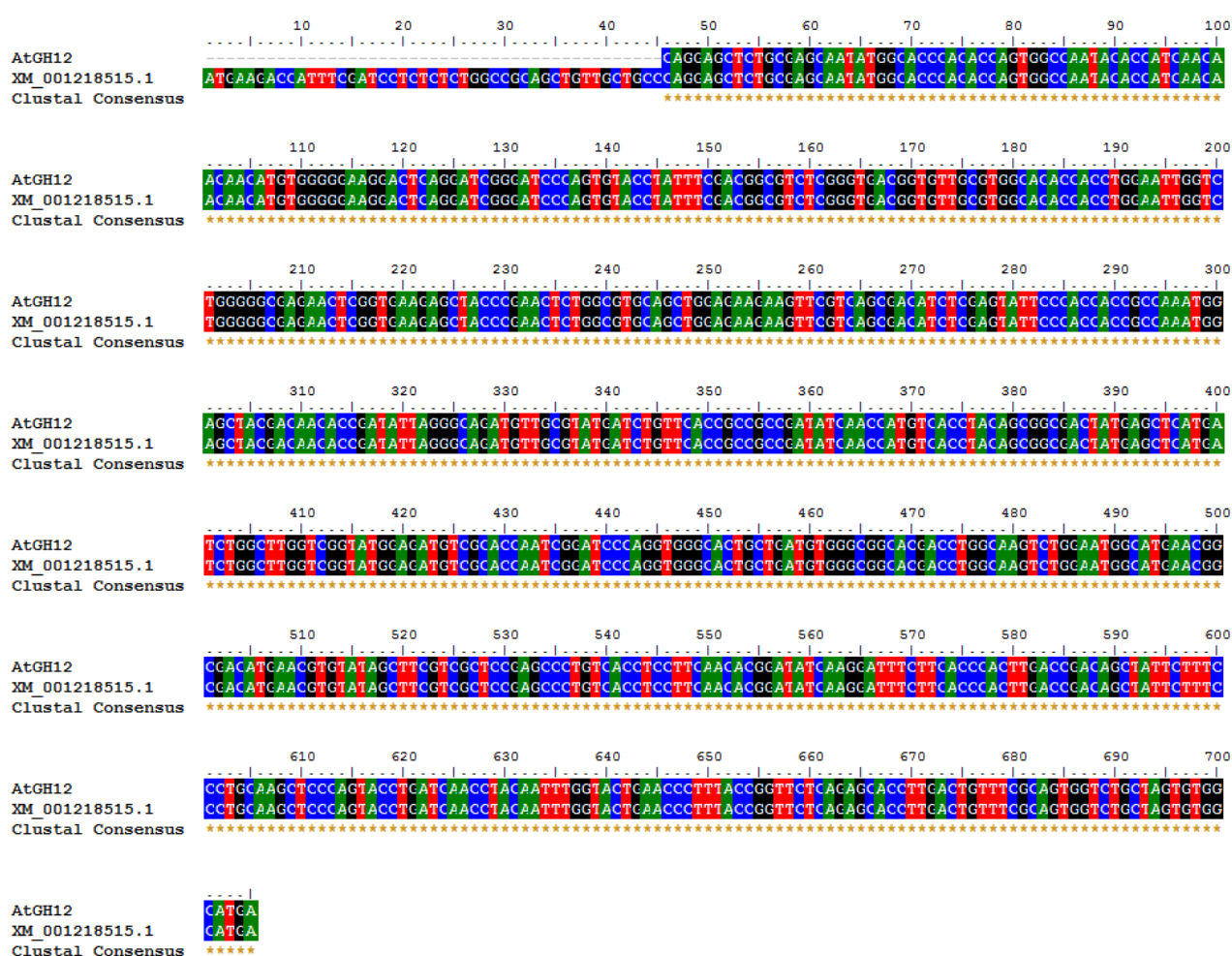


Figura 17. Alinhamento de sequência entre o clone AtGH12_pGEM e a sequência depositada no banco de dados (GeneBank code 001218515.1).

O plasmídeo digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose, e o inserto foi excisado e purificado do gel. Foi feita ligação no vetor de expressão pEXPYR previamente digerido com as mesmas enzimas. Células *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen) foram transformadas e PCR de colônia confirmou a presença de vetores contendo o gene de interesse nas células (Figura 18).

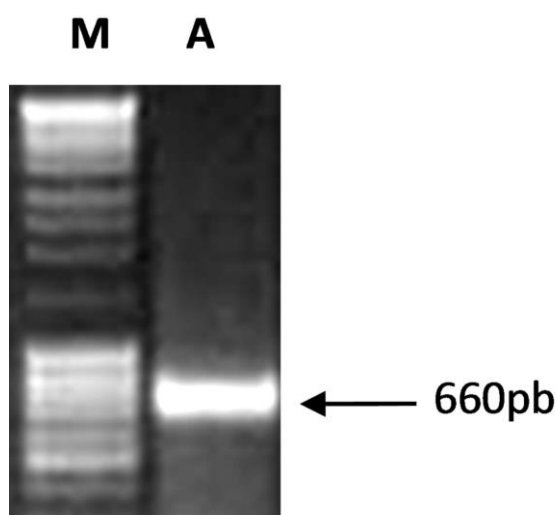


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR de colônia. M: Marcador de pares de base (1Kb) A: ATEG_09894.

Esse vetor foi então utilizado para transformar *Aspergillus nidulans* A773, linhagem que tem mostrado resultados satisfatórios para a expressão de hidrolases fúngicas. O vetor de expressão e secreção, pEXPYR, quando integrado no genoma do hospedeiro *Aspergillus*, dirige super-expressão induzida por maltose, juntamente com alto rendimento a secreção e acumulação de proteínas recombinantes no meio extracelular (Segato et al., 2012).

Apesar das vantagens inerentes de sistemas eucarióticos de expressão gênica com relação ao processamento pós-traducional, a expressão de proteínas heterólogas em fungos filamentosos não é um processo trivial. Primeiramente é necessária a confirmação do evento de integração no genoma do organismo

hospedeiro e após esta confirmação, é necessário fazer uma triagem de vários clones, visando selecionar a melhor linhagem com relação à eficiência de expressão e de secreção da proteína de interesse (Squina et al., 2009; Damasio et al., 2011).

Quatro transformantes foram cultivados em meio de expressão e a produção de ATEG_09894 avaliada em SDS-PAGE (Figura 19).

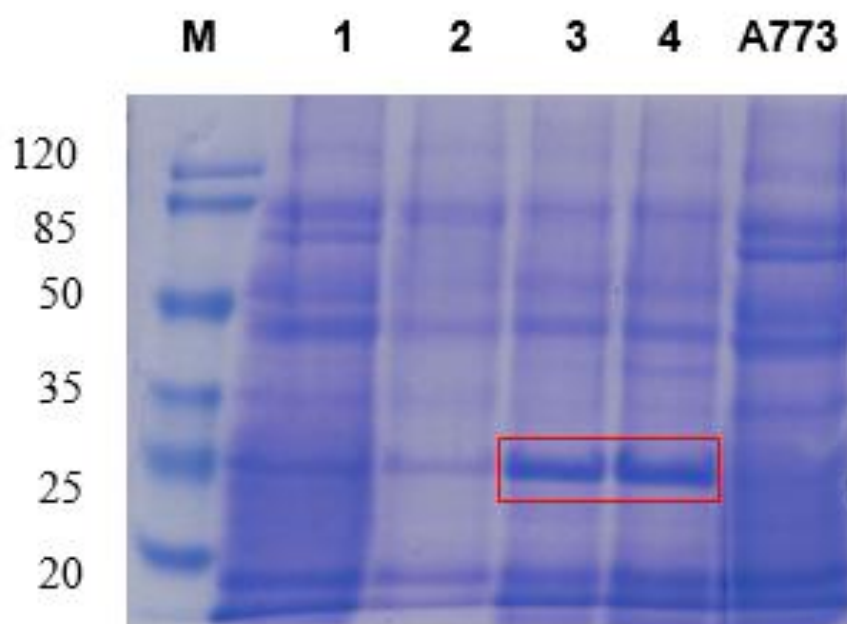


Figura 19. Screening de transformantes. SDS – PAGE de quatro transformantes e da linhagem de referência A773. No detalhe a banda correspondente a At_G12.

Após a seleção de uma boa linhagem produtora (Figura 19), foi realizada a expressão da ATEG_09894 em larga escala. Apesar de a sequência de aminoácidos da GH12 em estudo ter apenas 48% de similaridade com a GH12 de *A. nidullans*, ambas as proteínas possuem massa molecular similar. Um experimento de espectrometria de massas foi realizado para confirmar que a proteína purificada correspondia à proteína de interesse. Este método permite a determinação da massa molecular de compostos com altíssima precisão. Dessa forma é possível determinar a massa dos peptídeos presentes nas amostras digeridas com tripsina; e

através de softwares comparar estes dados com os gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados. Se a sequência da proteína analisada estiver no banco de dados, ela será imediatamente identificada. Os peptídeos identificados confirmaram que a amostra isolada do SDS-PAGE correspondia à proteína GH12 de *A. terreus* (Figura 20).

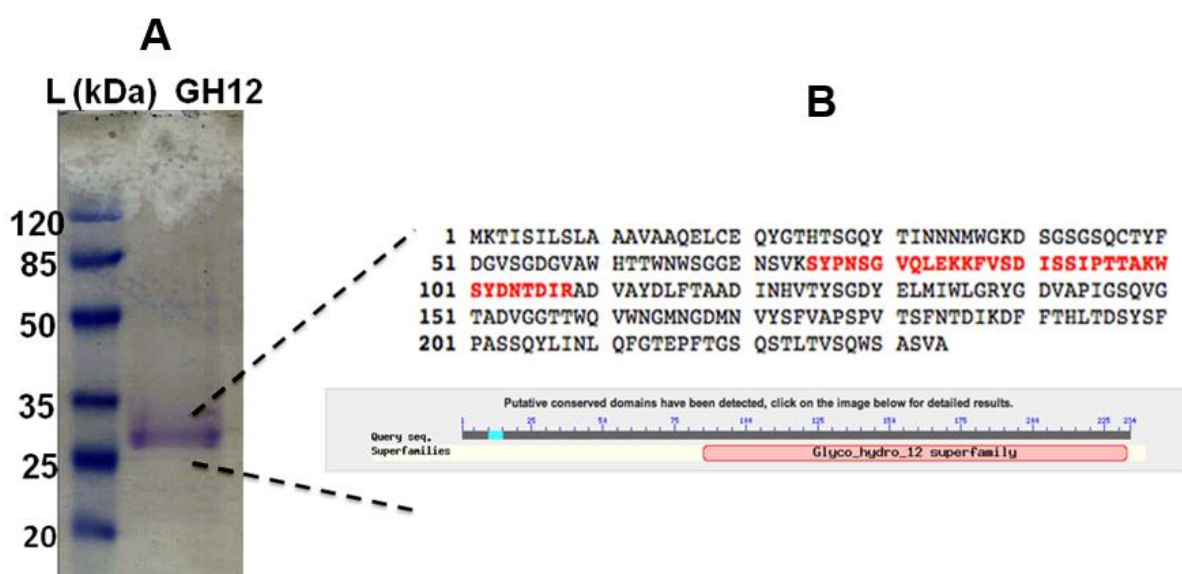


Figura 20. Confirmação da expressão da ATEG_09894. A- SDS-PAGE mostrando a endoglucanase ATEG_09894 purificada. Essa banda foi excisada do gel e submetida a identificação de peptídeos por ESI Q-TOF. B- Os peptídeos em vermelho foram identificados e confirmam a expressão de ATEG_09894.

A expressão em larga escala foi realizada para se obter proteína satisfatoriamente para os ensaios bioquímicos e estruturais. Para tal o extrato do meio de cultivo, que continha a proteína recombinante secretada, foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G75. A coluna utilizada para este tipo de purificação contém “poros” e, dessa forma, separa amostras de acordo com o tamanho das moléculas presentes na solução. Quanto maiores forem estas moléculas, mais rapidamente elas serão eluídas já que as mesmas “desviam-

se” dos obstáculos ao percorrerem a coluna, de maneira que percorrem um caminho menor que as moléculas menores, que, por sua vez, penetram em porosidades estreitas, ficando retidas na coluna por mais tempo.

Para a estimativa da massa molecular da amostra purificada, uma curva de calibração é construída (peso molecular contra Volume de eluição (V_e)/ V morto da coluna (V_o). Calculando V_e/V_o da amostra, a partir de seu volume de eluição, é possível estimar sua massa molecular utilizando a curva de calibração. Na curva de calibração (Figura 20, inset) abaixo mostra-se V_e/V_o da cromatografia de albumina bovina (66.0), anidrase carbônica (29.0 kDa), citocromo C (12.4 kDa) e aprotinina (6.5 kDa) em Sephadex G-75.

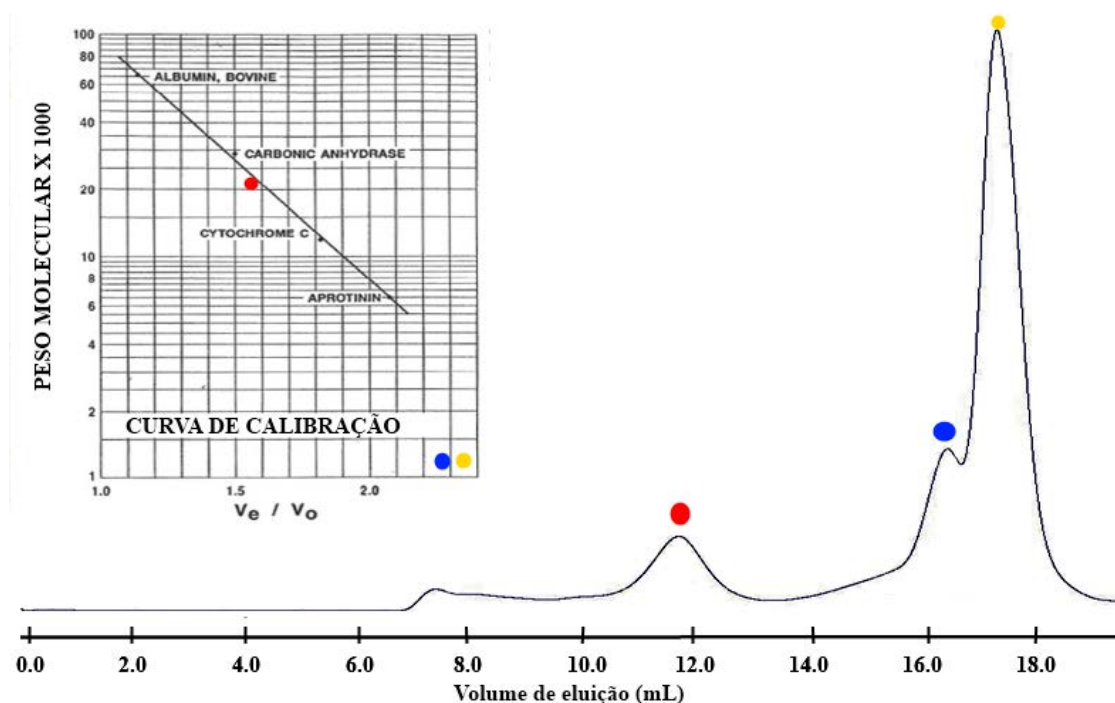


Figura 21. Purificação de ATEG_09894. Cromatografia de exclusão molecular do meio de cultivo contendo ATEG_09894 (ponto vermelho). Inset: curva de calibração utilizando proteínas com massa molecular conhecidos. Em vermelho, ponto estimando de ATEG_09894. Em azul e amarelo, pontos estimados dos outros picos observados na cromatografia.

Sabendo-se que o volume morto dessa coluna é 7 mL e observando a eluição do primeiro pico em 12 mL estima-se que a massa da proteína purificada neste pico é por volta de 25 kDa. Isso nos indica que a ATEG_09894 é monomérica em solução. Outros dois picos foram observados na cromatografia, no entanto trata-se provavelmente de metabólitos de baixo peso molecular encontrados no meio de cultura (Figura 21).

4.2 Determinação dos parâmetros físico-químicos

A influência do pH e temperatura na atividade da enzima purificada foi avaliada. Esta enzima mostrou-se bastante responsiva em ambiente ácido, tendo pH ótimo igual a 5.0. Em contrapartida, demonstrou-se sensível a pHs não ácidos. Em pH 7 (neutro), por exemplo, a enzima apresenta aproximadamente 25% de atividade e em pHs acima de 8, sua atividade é quase nula (Figura 22).

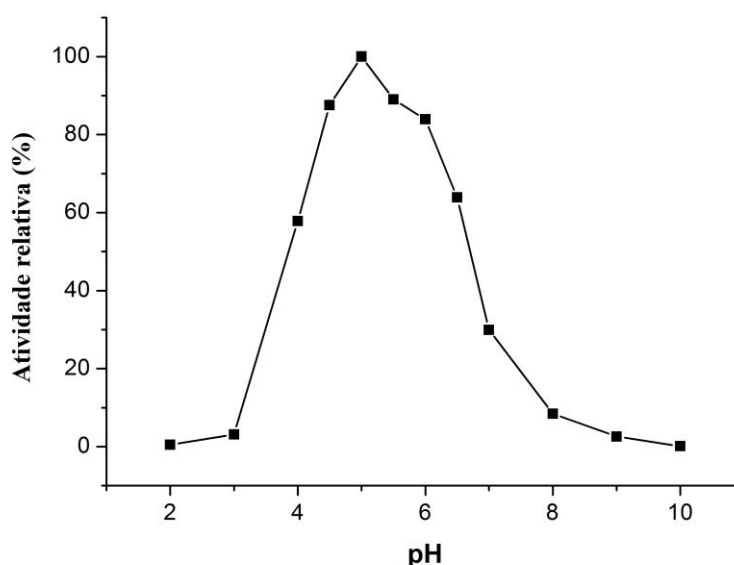


Figura 22. Efeito de pH na atividade B-glucanase de ATEG_09894. Desvios inferiores a 5%.

A sensibilidade enzimática de GH12 ao pH difere entre as enzimas dessa família. FGSG_11037, FGSG_07892 e FGSG_16349 (endo-xilanases de *Fusarium*

graminearum) são bastante sensíveis à variação de pH. Apresentam pH ótimo por volta de 6.0, sendo que em pH 7.0 sua atividade é de 50% da encontrada no pH 6.0 (Habrylo et al., 2012). A atividade em pH ácido também é observada para uma xiloglucanase GH12 de *A. niveus* (pH ótimo 6.0) (Damásio et al., 2012). Já FGSG_05851 e Cel12A de *Stachybotrys atra* são menos sensíveis a variação de pH (Habrylo et al., 2012; Picart et al., 2012). Observa-se que quando a variação de pH não influencia fortemente a atividade enzimática, essas GH12s são menos ativas que as sensíveis a essa variação, ou seja, a atividade específica é maior naquelas sensíveis à variação de pH quando se observa a atividade em seus pHs ótimos (Habrylo et al., 2012).

A temperatura ótima de atividade detectada foi de 55°C (Figura 23A). Através da análise do espectro de dicroísmo circular pode-se verificar que em temperaturas igual ou menores que 55°C, o conteúdo de estrutura secundária é correspondente a uma proteína rica em folha- β (mínimo em 215 nm) (Figura 23B). A presença de estrutura secundária da proteína recombinante sugere enovelamento. Além disso, é sabido que as GH12 são ricas em folha- β , de forma que este resultado indica o enovelamento esperado da proteína recombinante.

O ensaio de desnaturação térmica nos mostra que acima de 55°C a enzima começa a perder estrutura (Figura 23B-C). Em temperaturas acima de 75°C, a enzima perde completamente a estrutura e portanto, não desempenha sua atividade (Figura 23A). Já em temperaturas abaixo do ótimo, o conteúdo de estrutura secundária da proteína permanece semelhante ao conteúdo encontrado na temperatura ótima (Figura 23B-C). Portanto, nessas temperaturas, mudanças locais determinam atividade enzimática distintas.

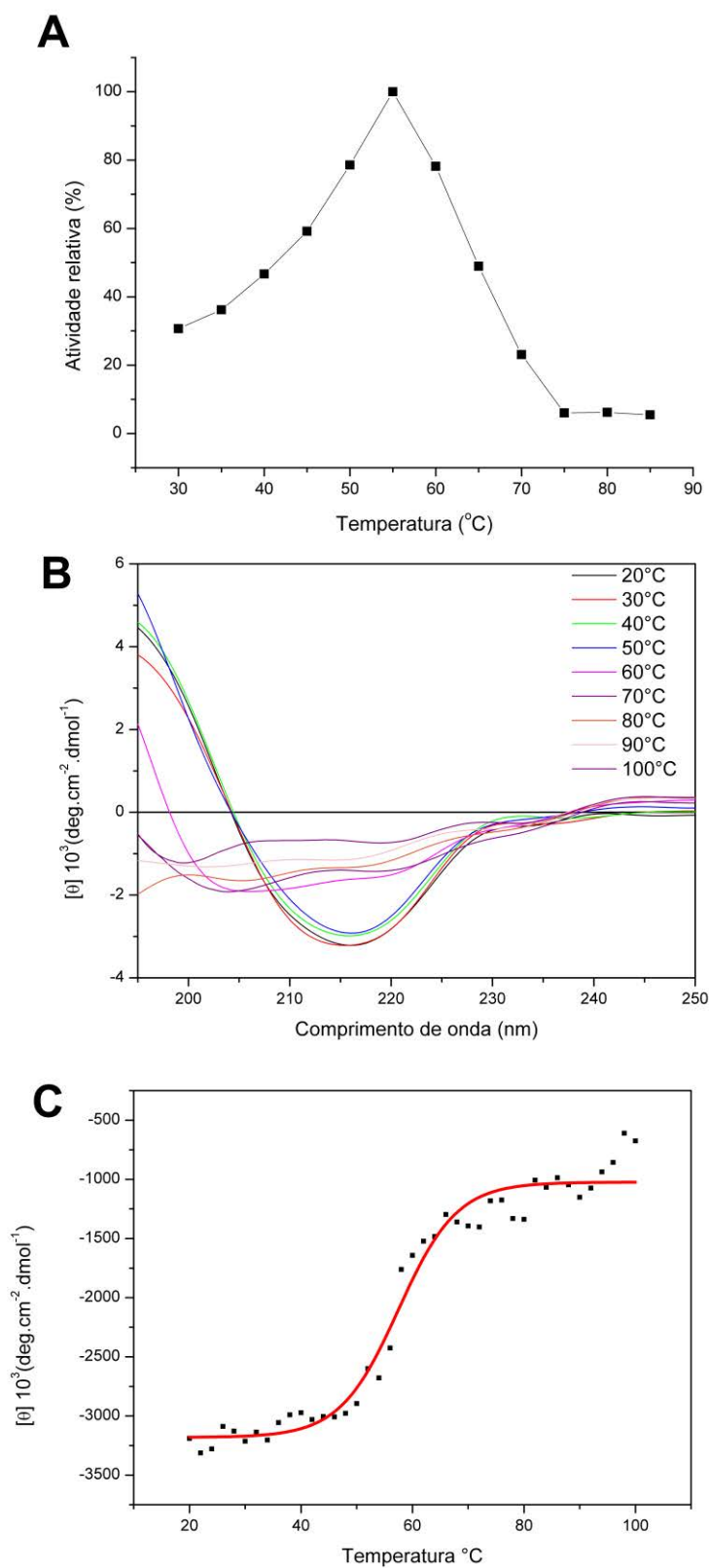


Figura 23. Efeito da temperatura na atividade β -glucanase. A- Atividade relativa em diferentes temperaturas, B- Espectros de dicroísmo circular em diferentes temperaturas. C- Curvas de desnaturação térmica em 215nm.

4.3 Especificidade de substrato e identificação de ativadores e supressores da atividade enzimática

A atividade da enzima purificada com os substratos polissacarídeos (0.5%) foi determinada a 55°C e pH 5,0, condição ótima para a enzima (Tabela 5). Os substratos Konjac Mannan (glucomanana fibrosa), CMC (celulose amorfa) e Arabinogalactana lariço foram hidrolisados em proporções muito pequenas, 8,6%, 1,4% e 0,6% e todos os outros substratos apresentaram baixa especificidade (Tabela 5).

TABELA 5. Especificidade pelo substrato DE ATEG_09894

Substrato	Atividade relativa (%)*
β -glucano	100
Xiloglucano	45.1
Konjac manana	8.6
CMC	1.4
Arabinogalactana lariço	0.6
LAM	0.4
Arabino xilana de trigo	0.3
Xilana de madeira de faia	0.3
Arabina desramificada	0.3
Galactomanana	0.2
Goma de alfarroba	0.1
Arabinana de beterrada	0.1
Arabinoxilana de centeio	0.0
Xilana de aveia	0.0

*Desvios inferiores a 5%

ATEG_09894 apresenta alta atividade com xiloglucano e β -glucanos, com preferência por este último. β -glucanos são polissacarídeos que contêm apenas glicose como componentes estruturais e estão unidas por ligações glicosídicas. Já os xiloglucanos, possuem um cerne formando por resíduos de glicoses unidos por

ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ e substituições de xilose nas cadeias laterais. Esses resultados demonstram a atividade β -glucanase de ATEG_09894. Além disso, mostram que enzima pode tolerar as cadeias laterais de xilose, embora seja menos responsiva que frente ao β -glucano. Esses resultados mostram ainda a atividade reduzida frente ao CMC, celulose metilada, o que indica que a metilação da celulose também diminui a interação enzima-substrato.

Esses resultados podem ser úteis, pois hidratos de carbono complexos na biomassa contêm glicose e xilose como as principais unidades de açúcar e sabe-se que o xilano pode ter um "efeito de bloqueio" na atividade de celulases sobre a celulose e o uso de uma enzima com atividade glucanase/xiloglucanase pode maximizar o rendimento de açúcar na sacarificação enzimática (isto é, a conversão de hidratos de carbono complexos para açúcares simples).

Atualmente têm-se observado que o pré-tratamento da biomassa com xilanase melhora a acessibilidade de beta-glucanases e conseqüentemente sua atividade. Por outro lado, em alguns casos observa-se que a xilanase pode bloquear a atividade de beta-glucanases (Suurnakki ET AL., 1997; deJong ET AL., 1997; Wong ET. AL., 1997; Arantes & Saddler, 2010). Nesse trabalho, a caracterização da ATEG_09894 mostra que se trata de uma enzima com potencial biotecnológico pois além de ser ativa contra beta-glucanos é também ativa contra xiloglucanos. Sendo interessante tanto para compor um coquetel enzimático quanto como modelo para estudo de especificidade enzimática.

A influência por solventes orgânicos, detergentes, agentes redutores, quelantes e íons metálicos na atividade enzimática de ATEG_09894 foi verificada (Tabela 6). Foi verificado que alguns metais podem inibir a atividade enzimática (Blackburn et al., 1994). Os metais pesados possuem a capacidade de se ligar a

grupamento sulfidrilas de cisteínas. Como no caso de ATEG_09894, nenhuma cisteína compõe o sítio ativo da proteína, sugere-se que a inibição ocorrerá pois o grupamento SH é fundamental para o enovelamento da proteína, com isso o metal pesado pode funcionar como agente desnaturante.

TABELA 6. Identificação de ativadores e supressores da atividade enzimática

	Atividade relativa (%)*
Sem aditivo	100
KCl (50 mM)	112.2
Tween (0.5%)	110.6
DMSO (0.5%)	107.6
Triton-X-100 (0.5%)	105.2
MgCl ₂ (0.5%)	103.1
CaCl ₂ (10 mM)	90.5
MnCl ₂ (10 mM)	56.9
EDTA (50 mM)	57.9
FeCl ₃ (10 mM)	30.4
CuSO ₄ (10 mM)	27
CdCl ₂ (50 mM)	16.5

*Desvios inferiores a 5%

4.4 Produtos da hidrólise

A análise do padrão de hidrólise de celohexaose (seis moléculas de glicose unidas por ligação do tipo β 1-4) marcada com APTS foram analisados por eletroforese capilar. ATEG_09894 liberou majoritariamente celotetraose (tetrâmero) e celobiose (dímero) (Figura 24).

Observamos a hidrólise incompleta do substrato (15 minutos) (Figura 24 B) e completa (30 e 60 minutos) (Figura 24 C e D). A predominante liberação de

celobiose sugere que a enzima hidrolise preferencialmente o quarto resíduo a partir da extremidade não redutora da molécula de celohexaose.

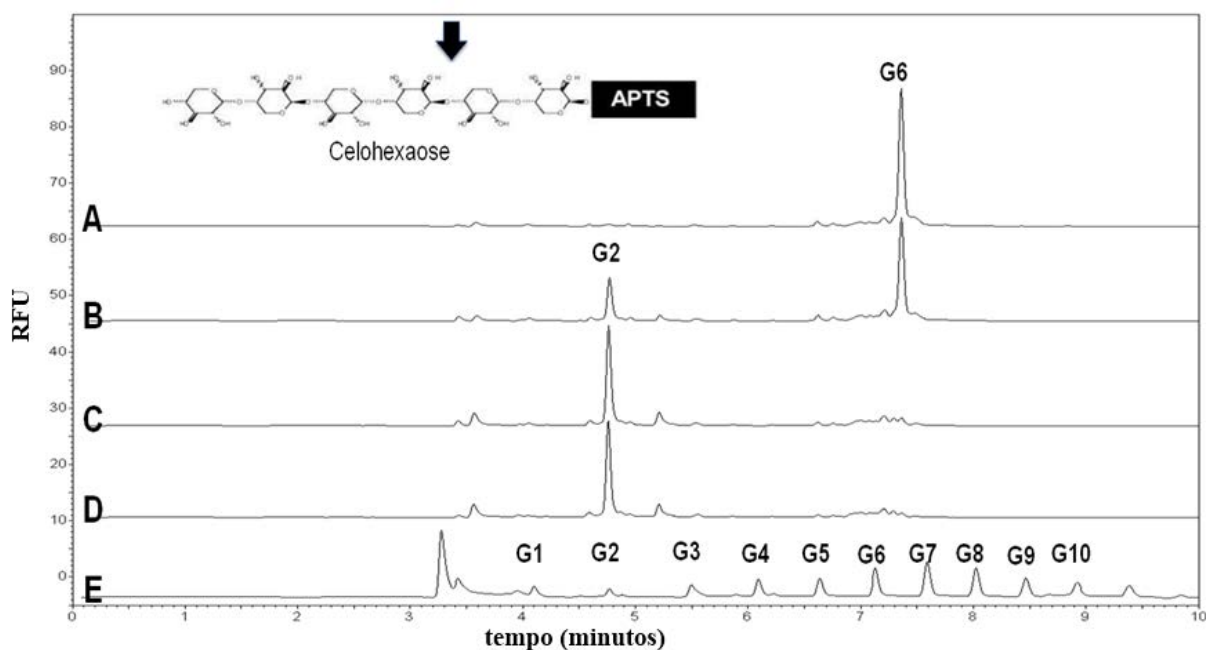


Figura 24. Produtos de hidrólise por ATEG_09894. (A) Eletroforese capilar de oligossacarídeo (G6) marcado com APTS (8-aminopireno-1,3,6-ácido trissulfônico); **A** – Celohexaose marcada com APTS (substrato); **B** – Celohexaose marcada com APTS após exposição por 15 minutos (hidrólise parcial) na presença de ATEG_09894; **C** – Celohexaose marcada com APTS após exposição por 30 minutos (hidrólise completa) na presença de ATEG_09894; **D** – Celohexaose marcada com APTS após exposição por 1 hora (hidrólise completa) na presença de ATEG_09894 e **E** – Eletroferograma controle de tamanhos definidos: G1, glicose; G2, celobiose; G3, celotriose; G4, celotetraose; G5, celopentose; G6, celohexaose; G7, celoseptose; G8, celooctose; G9 celoenase e G10, celodecaose.

Esse padrão de hidrólise difere de algumas GH12 já caracterizadas, a endoglucanase Cel12A de *T. reesei* (Grishutin et al., 2006), *C. lucknowense* Cel12A (Bukhtojarov et al., 2004) e *S. atra* Cel12A (Picart et al., 2012) mostram glicose e celobiose entre os produtos da hidrólise. Já a liquenase de *Bacillus subtilis* libera trissacarídeos e tetrassacarídeos como produtos da hidrólise de uma mistura de glucanos (Grishutin et al., 2006), que é um perfil de produtos de liquenases autênticas.

Esses dados ressaltam a importância da caracterização de enzimas em busca de suas peculiaridades e nos ajudam a compreender como ocorre o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima, sendo de suma importância para obtenção de dados confiáveis na caracterização *in silico*.

4.5 Determinação do envelope molecular de ATEG_09894

A coleta de dados de SAXS foi realizada na linha de luz D11A-SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O comprimento de onda utilizado em todos os experimentos foi $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$. O tratamento dos dados bidimensionais e integração das contagens sobre a região detectada para obtenção de uma curva de espalhamento unidimensional foi realizada utilizando o programa FIT2D (Hammersley, copyright 1987 – 2005). O tratamento dos dados foi realizado no programa PRIMUS (Konarev et al., 2003). O cálculo da função $p(r)$ para todas as curvas de intensidade de espalhamento foram obtidas utilizando o programa GNOM (Svergun, 1992). Esse programa realiza uma transformada de Fourier dos dados experimentais de espalhamento e fornece a função $p(r)$ a partir de um ajuste da curva de espalhamento. Ele também fornece o valor do raio de giro (R_g) e o valor da máxima dimensão da partícula.

A curva experimental de SAXS e a distribuição $p(r)$ de ATEG_09894 são exibidos na figura 25 A. O valor R_g obtidos a partir da função $p(r)$ é de $1,85 \pm 0,01$ nm. O modelo de baixa resolução ATEG_09894 obtido por cálculos *ab initio* mostrou uma forma globular (Figura 25 B).

Um modelo da estrutura tridimensional de ATEG_09894 foi construído. Para a construção do modelo foi utilizado o programa MODELLER (Sali e Blundell, 1993), este programa é utilizado para a modelagem por homologia a estruturas tridimensionais de proteínas. O programa automaticamente constrói um modelo baseado na análise de um alinhamento de sequências entre a proteína para a qual se deseja construir o modelo e uma proteína relacionada cuja estrutura tridimensional já foi resolvida. A qualidade do modelo pode ser avaliada, por exemplo, através de gráficos e tabelas que analisam restrições químicas e físicas de cada átomo constituinte do modelo.

A estrutura da endoglucanase GH12 de *A. niger* foi utilizada como molde para construção da estrutura de ATEG_09894. Estas estruturas possuem 64% de similaridade entre si.

A estrutura modelada foi sobreposta ao modelo de baixa resolução obtido por SAXS e observa-se que a proteína é monomérica em solução (Figura 25 B).

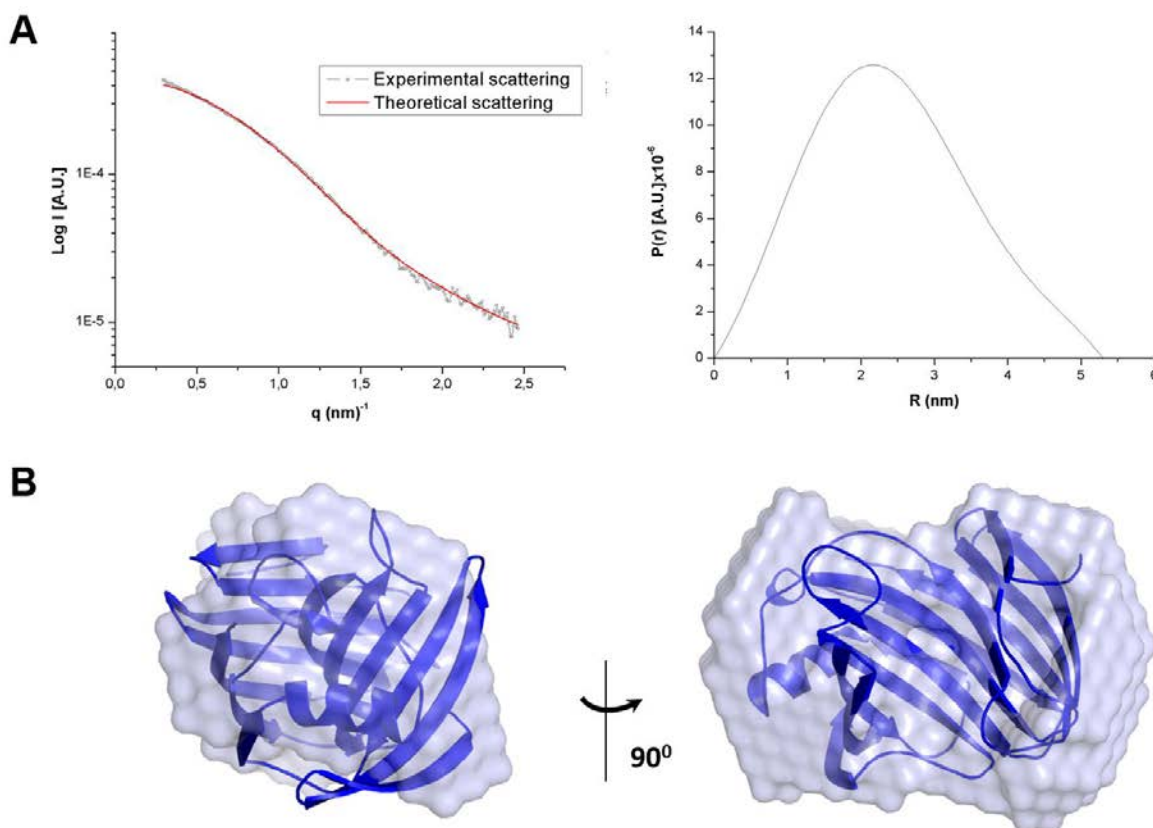


Figura 25. Envelope molecular de ATEG_09894. A - Curva de espalhamento experimental e teórico de ATEG_09894 utilizando o programa GNOM e distribuição de $p(r)$ de ATEG_09894. B - Monômero de ATEG_09894 ajustado ao envelope de SAXS.

Esses resultados indicam que diferentemente da XegA de *Aspergillus niveus*, a oligomerização não influencia na atividade enzimática. Em XegA, em temperaturas ambientes, a proteína é dimérica e não apresenta atividade (Damásio et al., 2012). O dímero provavelmente obstrui a cavidade do sítio ativo. Na temperatura ótima, essa enzima é monomérica e ativa (Damásio et al., 2012). No nosso caso, o estado oligomérico não parece ter influência na atividade enzimática, as diferenças na atividade são provavelmente provenientes de alterações locais do sítio ativo.

A análise da superfície eletrostática mostra que a superfície da molécula é negativamente carregada indicando porque a enzima tende a ser monomérica.

Como não há complementariedade de carga da superfície, com regiões positivas e negativas, a interação entre moléculas não é favorável (Figura 26).

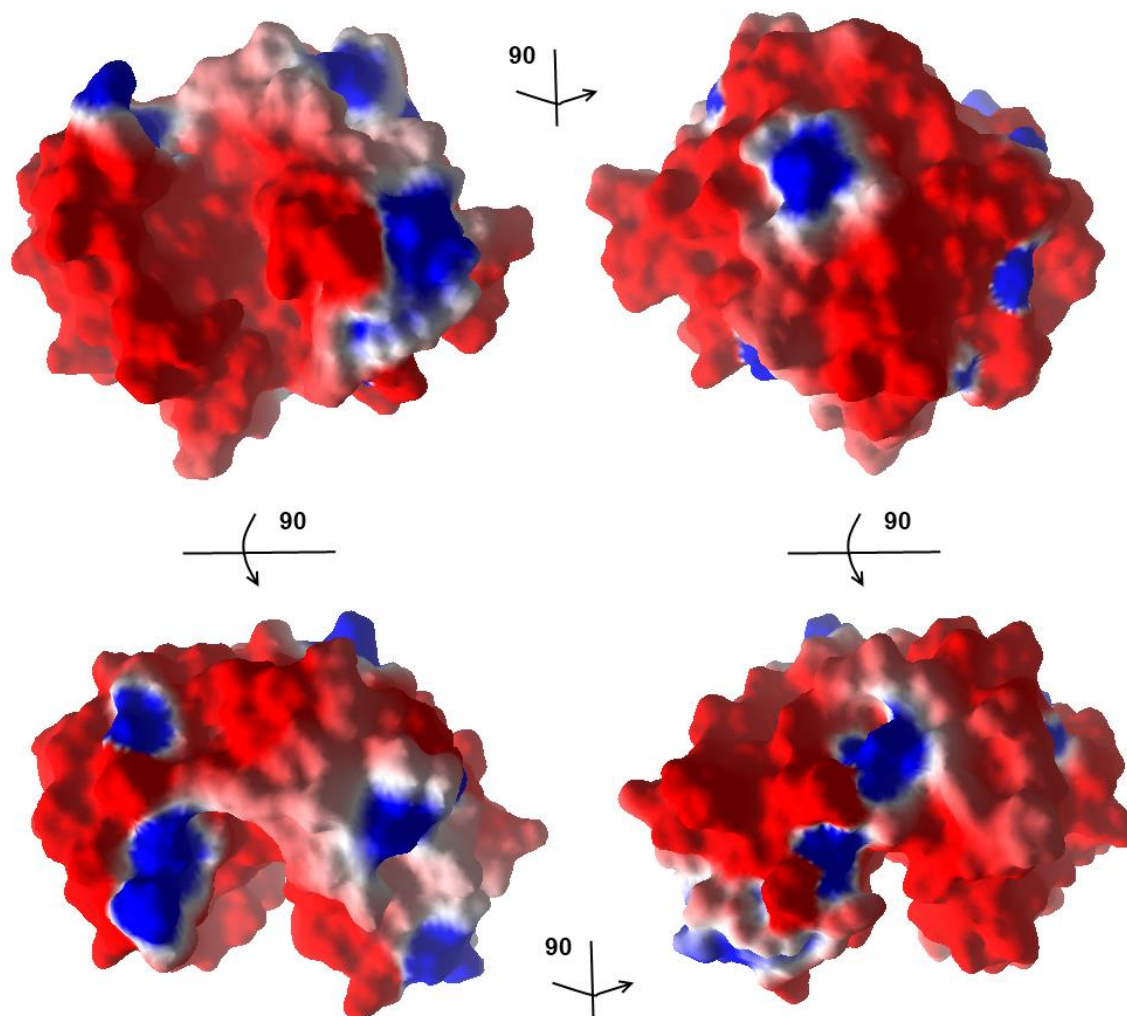


Figura 26. Análise da superfície eletrostática de ATEG_09894. 4 faces da proteína rotacionadas por 90°.

4.6 Determinantes da seletividade de ATEG_09894

O alinhamento da sequência de ATEG_09894 com endoglucanases e xiloglucanases de *Aspergillus* sp mostra alguns resíduos que são exclusivos de acordo com a atividade enzimática (Figura 27). Procedeu-se com o *docking* de celohexaose e um oligossacarídeo de xiloglucano para avaliar a importância desses resíduos exclusivos na especificidade enzimática.

A *docking* da celohexaose na estrutura de ATEG_09894 mostra que para que o quarto resíduo a partir da extremidade não redutora da molécula de celohexaose seja hidrolisado, como observado nos ensaios de hidrólise, os seguintes resíduos são determinantes para promover a atividade enzimática e o posicionamento do ligante: N³⁵, W³⁷, A⁴³, V⁷³, Y⁷⁶, D¹¹⁴, F¹¹⁶, V¹²⁴, T¹²⁵, E¹³¹, M¹³³, W¹³⁵, V¹⁴², A¹⁴³, I¹⁴⁵, G¹⁴⁶, W¹⁶², Q²¹¹, E²¹⁵ (Figura 28A-B).

Quando o xiloglucano é posicionado no sítio ativo de GH12 o resíduo R109 colide com o substrato (Figura 28C). Essa colisão impede que o xiloglucano se aloque corretamente para sofrer a catálise pelos resíduos E131 e E215 (Figura 28C). Em xiloglucanases, observa-se uma valina nessa posição que não se choca com o substrato (Figura 27, 28C). Os ensaios de atividade contra xiloglucanos mostrou que ATEG_09894 é capaz de hidrolisar esse substrato em uma taxa 50% menor que β -glucanos. A análise estrutural sugere que é necessário um deslocamento do loop 140-156 para a hidrólise desse substrato.

O alinhamento de sequência (Figura 27) mostra duas regiões: deleção YSG e inserção STT que parecem estar associadas com a atividade de xiloglucanases (Master, 2008). Analisando essas regiões em nosso modelo, verifica-se que a deleção YSG situa-se na entrada do sítio catalítico e que a região correspondente à inserção SST presente em XEGs localiza-se no loop 140-156 de ATEG_09894. Uma vez que XEGs possuem uma inserção SST, as endoglucanases GH12 que possuem atividade tanto em β -glucanos quanto em xiloglucanos podem na movimentação desse loop mimetizar as interações realizadas pela inserção.

Esse dado indica a importância do loop 140-156 na especificidade ao substrato. No entanto, são necessários estudos de mutação sítio dirigida para confirmação dos indícios gerados pelos dados *in silico*.

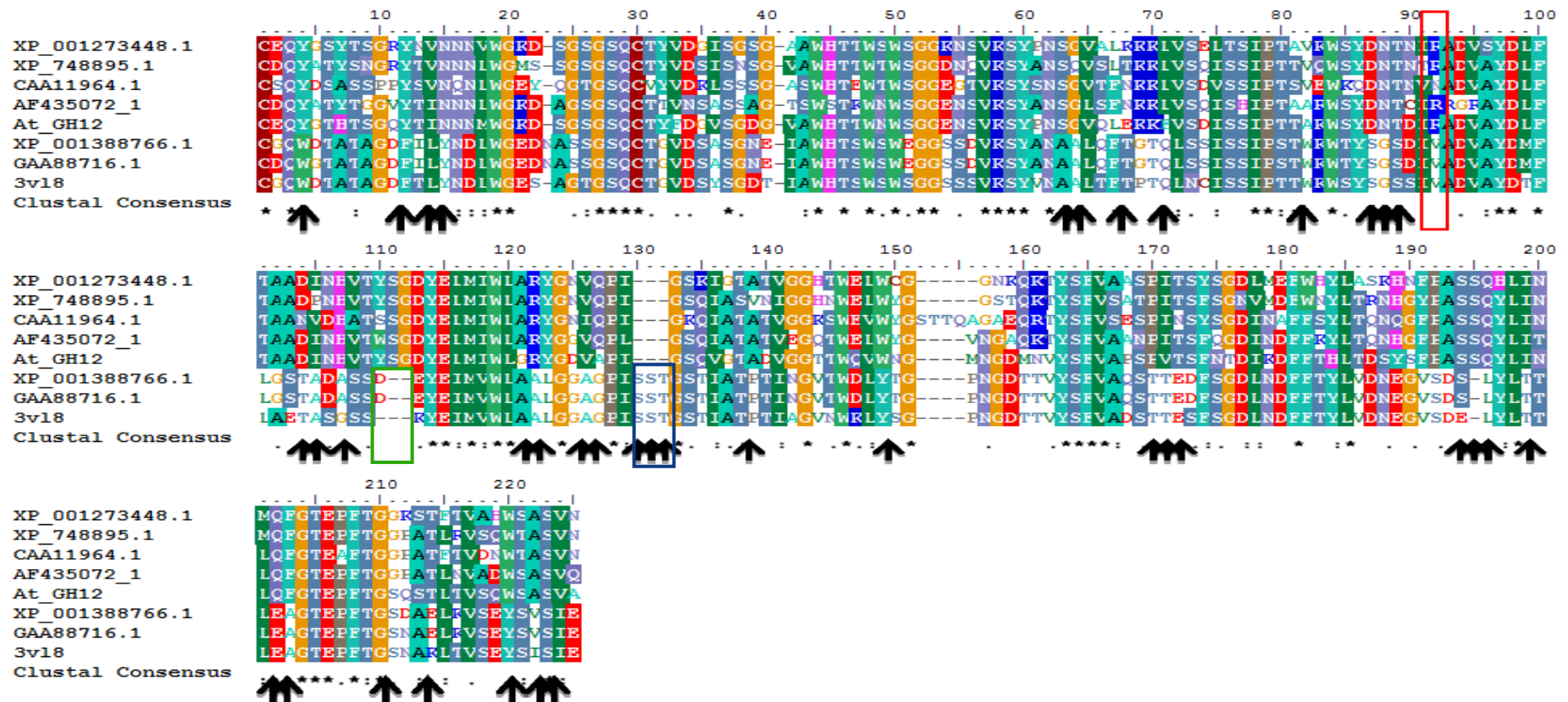


Figura 27. Alinhamento de sequências de aminoácidos de ATEG_09894, endoglucanase de *A. clavatus* (XP_001273448.1); *A. fumigatus* (XP_748895.1), *A. kawachi* (AF435072_1), *A. niger* (CAA11964.1) e XEG de *A. niger* (XP_001388766.1); *A. aculeatus* (pdb id: 3vl8) e *A. kawachi* (GAA88716.1). Flechas indicam resíduos únicos em xiloglucanases ou endoglucanases. Caixa vermelha indica R109. Caixa verde mostra deleção no loop 1 Caixa azul mostra inserção SST no loop 2, conservada em xiloglucanases.

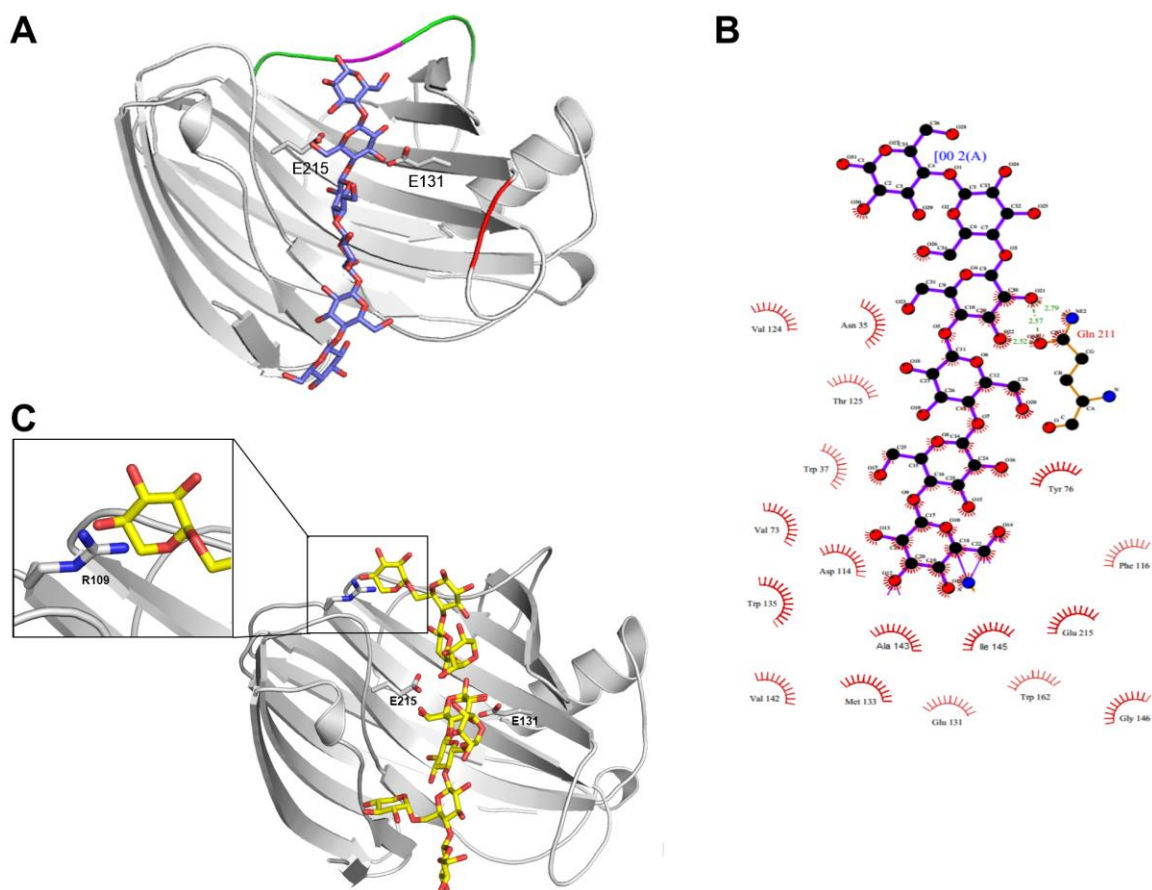


Figura 28. Docking de substratos em ATEG_09894. Docking de celohexaose (carbono- α azul) (A) e xiloglucose (carbono- α em amarelo) (C) em ATEG_09894 (cinza). Resíduos catalíticos E215 e E131; R109 (numeração de ATEG_09894) que colide com xiloglucano, loop 140-156 (verde), região correspondente à deleção SST(rox) e inserção YSG (vermelho) estão evidenciados. B- Plotagem dos resíduos de ATEG_09894 que interagem com celohexaose.

Além disso, comparando a estrutura de ATEG_09894 com a GH12 de *Bacillus licheniformis* (BIGH12; PDBid: 2JEN) é possível verificar que a BIGH12 possui um loop que abraça o sítio ativo tornando sua área 35% menor que em ATEG_09894 (Figura 29). Nesse loop está presente o resíduo W146 (numeração de BIGH12) que estabiliza a extremidade do xiloglucano (Figura 29). Esse loop não é conservado em XEGs de *Aspergillus* sp e portanto não influi na capacidade de reconhecimento de XEGs ao substrato mas pode estar relacionado com uma maior atividade enzimática.

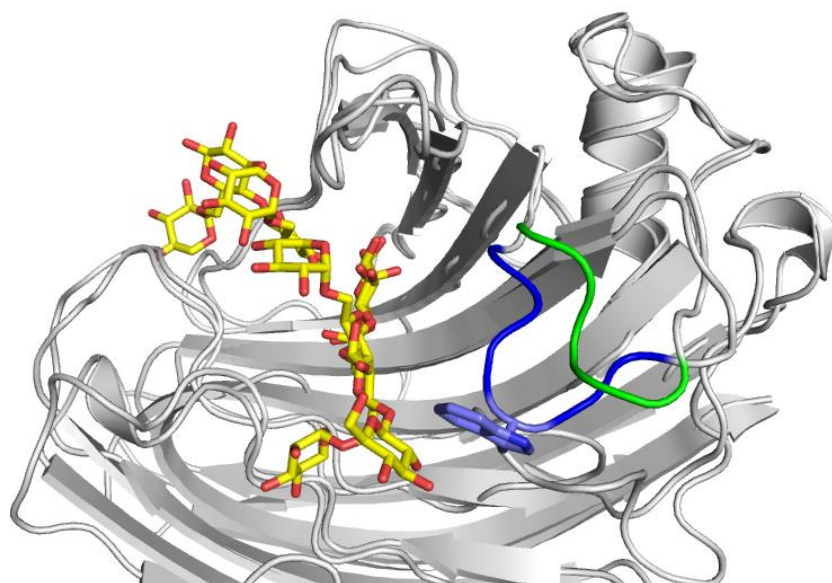


Figura 29. Sobreposição de ATEG_09894 e BIGH12. Xiloglucano (carbono- α amarelo). Loop de BIGH12 em azul com W146 evidenciando. Loop de ATEG_09894 em verde.

5 CONCLUSÕES

- Um gene correspondendo a uma endoglucanase GH12 foi ligada a sistema para expressão em *A. nidulans*. O teste de expressão mostrou que o gene foi expressa satisfatoriamente. ATEG_09894 foi expressa em larga escala, e sua identidade confirmada por espectrometria de massas. Esta enzima mostrou-se bastante responsiva em ambiente ácido, tendo pH ótimo igual a 5.0. A temperatura ótima de atividade detectada foi de 55°C. ATEG_09894 apresenta alta atividade com xiloglucano e β -glucanos, com preferência por este último. O padrão de hidrólise mostrou que ATEG_09894 liberou majoritariamente celotetraose (tetrâmero) e celobiose (dímero). Compostos ativadores e supressores de sua atividade foram identificados.
- A caracterização estrutural mostrou que ATEG_09894 foi expressa funcionalmente enovelada e mostra-se estável até 60°C, apresentando TM de 55°C. Resultados de SAXS e gel filtração indicam que a proteína é monomérica em solução e o modelo de sua estrutura tridimensional indica que a superfície eletrostática da molécula contribui para um monômero estável.
- Análise de sequências mostrou resíduos conservados em endoglucanases e ausentes em xiloglucanases, sugerindo determinantes para seletividade de substrato. Análises de *docking* molecular indicaram os resíduos determinantes para promover a atividade enzimática e o posicionamento de celohexaose no sítio ativo de ATEG_09894; além de sugerir o deslocamento do loop 140-156 para a hidrólise do xiloglucano.

REFERÊNCIAS

- ADLER, A.J., GREENFIELD, N. J., FASMAN, G. D. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. **Methods Enzymol.**, v. 27, p. 675–735, 1973.
- AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA (2007) **EA Bioenergy. Potential contribution of bioenergy to the world's future energy demand** . Disponível em: <http://www.ieabioenergy.com/MediaItem.aspx?id=5586>. Acesso em 10 de outubro de 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (2008). **Atlas de Energia Elétrica do Brasil. Parte III – 7 Derivados de Petróleo**. Disponível em http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas_par3_cap7.pdf. Acesso em 15 de outubro de 2012.
- AHUJA, S. K., FERREIRA, G. M., MOREIRA, A. R. Utilization of enzymes for environmental applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 24, p. 125–154, 2004.
- ALEKSENKO, A., GEMS, D., CLUTTERBUCK, J. Multiple copies of MATE elements support autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 427–34, 1996.
- ALTSCHULL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, 5:215(3):403-413, 1990.
- ARANTES, V., SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p.4, 2010.
- BAJPAI, P. Biological bleaching of chemical pulps. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 24, p. 1–58, 2004.
- BAUER, M. W., DRISKILL, L. E., CALLEN, W., SNEAD, M. A., MATHUR, E. J., KELLY, R. M. An endoglucanase, EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes β -1,4 bonds in mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4) β -D-glucans and cellulose. **J Bacteriol.**, v. 181(1), p. 284-90, 1999

- BAUER, S., VASU, P., PERSSON, S., MORT, A.J., SOMERVILLE, C.R. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p. 11417–22, 2006.
- BAYER, E. A., MORAQ, E., LAMED, R. The cellulosome – a treasure trove for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 12, p. 379–386, 1994.
- BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potencial industrial applications. **Biotechnol. Adv.**, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BLACKBURN, N. J., BARR, M. E., WOODRUFF, W. H., VAN DER OOST, J., DE VRIES S. Metal-Metal Bonding in Biology: EXAFS Evidence for a 2.5 Å. Copper-Copper Bond in the CuA Center of Cytochrome Oxidase. **Biochemistry**, v. 33 (34), p. 10401–10407, 1994.
- BODIE, E. A., BOWER, B., BERKA, R. M., DUNN-COLEMAN, N. S. Economically important organic acid and enzyme products. **Prog. Ind. Microbiol.**, v. 29, p. 561-602, 1994.
- BOK, J. D., YERNOOL, D. A., EVELEIGH, D. E. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64(12), p. 4774-81, 1998.
- BOLTON, E., WANG, Y., THIESSEN, P.A., BRYANT, S. H. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. IN: *Annual Reports in Computational Chemistry*, v. 4, c. 12. **American Chemical Society**, Washington, DC, 2008.
- BON, E. P. S., GIRIO, F., PEREIRA JR., N. Enzimas na produção de etanol. in: BOM, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia. Produção, aplicações e mercado*, ed. **Interciência**, Rio de Janeiro, p. 241-269, 2008.
- BON, E. P. S., PICCATAGIO, S. Enzyme and microbial biocatalyst. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 163, p. 98-100, 2002.
- BRUMER III, H., ZHOU, Q., BAUMANN, M. J., CARLSSON, K., TEERI, T. T. Activation of crystalline cellulose surfaces through the chemoenzymatic modification of xyloglucan. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, p. 5715–5721, 2004.

- BUCHERT, J., OKSANEN, J., PERE, J., SIIKA-AHO, M., SUURNÄKKI, A., VIIKARI, L. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: HARMAN, G. E., KUBICEK, C. P., *Trichoderma and Gliogladium*, Ed. **Taylos & Francis**, v. 2, p. 343-364, Londres, 1998.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P., 2010. As rotas para o etanol celulósico. Disponível em: <http://mundodacana.blogspot.com/2010/08/as-rotas-para-o-etanol-celulosico-no.html>. Acesso em 10 de outubro de 2012.
- BUKHTOJAROV, F. E., USTINOV, B. B., SALANOVICH, T. N., ANTONOV, A. I., GUSAKOV, A. V., OKUNEV, O. N., SINITSYN, A. P. Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. **Biochemistry (Mosc)**, v. 69(5), p. 542-51, 2004.
- CAZYPEDIA, **Glycoside hydrolases**. Disponível em: http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases. Acesso em 06 de outubro de 2012.
- CHEN, C. L. Lignins. Occurrence in wood tissue, isolations reactions and structure. In: LEWIS, M., GOLDSTEIN, I. S. *Wood structure and composition*, ed. **Marcel Dekker**, Nova Iorque, p. 183-261, 1991.
- CLARKSON, K. A., WEISS, G. L., LARENAS, E. A. Detergent compositions containing substantially pure EGIII cellulase. **Patent WO 92/06184, 1992**.
- COHEN, R., SUZUKI, M. R., HAMMEL, K. E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2412-2417, 2005.
- COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 2, p. 3-13, 2005.
- CONESA, A., PUNT, P. J., van LUIJK N., van den HONDEL, C. A. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. **Fungal Genet. Biol.**, v. 33(3), p. 155-71, 2001.
- D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: *Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da pasta celulósica*. 2ed. São Paulo: **Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo**, v. 1, 1988.

- DAMÁSIO, A. R., SILVA, T. M., ALMEIDA, F. B., SQUINA, F. M., D. A RIBEIRO, LEME, A. F. P., SEGATO, F., PRADE, R. A., JORGE, J. A., TERENCE, H. F., POLIZEL, M. L. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1236-1242, 2011
- DAMÁSIO, A. R., RIBEIRO, L. F., RIBEIRO, L. F., FURTADO, G. P., SEGATO, F., ALMEIDA F. B., CRIVELLARI, A. C., BUCKERIDGE, M. S., SOUZA, T. A., MURAKAMI, M. T., WARD R. J., PRADE, R. A., POLIZELI, M. L. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1824(3), p. 461-7, 2012.
- DAVIES, G., HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853-859, 1995.
- DEJONG , E., WONG, K.K.Y., SADDLER, J.N. The mechanism of xylanase prebleaching of kraft pulp: An examination using model pulps prepared by depositing lignin and xylan on cellulose fibers. **Holzforschung**, v. 51(1), p. 19-26, 1997.
- DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 245-276, 1999.
- DIVINE, C., STÄHLBERG, J., REINIKAINEN, T., RUOHONEN, I., PETTERSSON, G., KNOWLES, J. K. C., TEERI, T. T., JONES, T. A. The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265, p. 524-528, 1994.
- EI BASSAM, N. Energy plant species: their use and impact on environment and development. London, ed. **Earthscan Publications**, 240 p., 1998.
- EMBRAPA AGROBIOLOGIA (2009). **Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil**. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/destaques/mitigacao-etanol>. Acesso em 07 de setembro de 2012.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética (2012). **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis**. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20-%20boletins%20peri%C3%B3dicos/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20%E2%80%93%20Ano%202011.pdf>. Acesso em 06 de setembro de 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin, ed. **Walter de Gruyter**, 613 p., 1989.

FLEISSNER, A., DERSCH, P. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87(4), p. 1255-70, 2010.

GALANTE, Y. M., DE CONTI, A., MOTEVERDI, R. (Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the textile industry. In: ***Trichoderma and Gliogladium***, Ed. **Taylos & Francis**, v. 2, p. 311-326, Londres, 1998b.

GALANTE, Y. M., DE CONTI, A., MOTEVERDI, R. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the food and feed industries. In: **HARMAN, G. E., KUBICEK, C. P., *Trichoderma and Gliogladium***, Ed. **Taylos & Francis**, v. 2, p. 338-342, Londres, 1998a.

GHOSH, P., GHOSE, T. K. Bioethanol in India: Recent Past and Emerging Future. In: SCHEPER, T. **Advances in biochemical Engineering/Biotechnology**, ed. **Springer**, v. 85, p. 1-27, Nova Iorque, 2003.

GILBERT, H. J., STALBRAND, H., BRUMER, H. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v. 11, p. 338–348, 2008.

GLOSTER, T. M., F. M. IBATULLIN, K. MACAULEY, J. M. EKLOF, S. ROBERTS, J. P. TURKENBURG, M. E. BJORNVAD, P. L. JORGENSEN, S. DANIELSEN, K. S. JOHANSEN, T. V. BORCHERT, K. S. WILSON, H. BRUMER, AND G. J. DAVIES. Characterization and three-dimensional structures of two distinct bacterial xyloglucanases from families GH5 and GH12. **J. Biol. Chem.**, v. 282: p. 19177-19189, 2007

- GOEDEGEBUUR, F., FOWLER, T., PHILLIPS, J., VAN DER KLEY, P., VAN SOLINGEN, P., DANKMEYER, L., POWER, S. D. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. **Current Genetics**, v. 41, p. 89-98, 2002.
- GRISHUTIN, S. G., GUSAKOV, A. V., DZEDZYULYA, E. I., SINITSYN, A. P. A lichenase-like family 12 endo-(1→4)-β-glucanase from *Aspergillus japonicus*: study of the substrate specificity and mode of action on β-glucans in comparison with other glycoside hydrolases. **Carbohydr. Res.**, v. 341(2), p. 218-29, 2006.
- GUSTAVSSON, M. T., PERSSON, P. V., IVERSEN, T., MARTINELLE, M., HULT, K., TEERI, T. T., BRUMER III, H. Modification of cellulose fiber surfaces by use of a lipase and a xyloglucan endotransglycosylase. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 196–203, 2005.
- GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J., BECKWITH, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. **J. Bacteriol.**, v. 177(14), p. 4121-4130, 1995.
- HABRYLO, O., SONG, X., FORSTER, A., JELTSCH, J. M., PHALIP, V. Characterization of the four GH12 Endoxylanases from the plant pathogen *Fusarium graminearum*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22(8), p. 1118-26, 2012.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280 (Pt 2), p. 309-316, 1991.
- HENRISSAT, B. Cellulases and their interaction with cellulose. **Cellulose**, v. 1, p. 169-196, 1994.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316 (Pt 2), p. 695-696, 1996.
- HINNEN, A., HICKS, J.B., FINK, G.R. Transformation of yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 75(4), p.1929-33, 1978.
- JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, p. 163-176, 1990.

- JOOSTEN, V., LOKMAN, C., VAN DEN HONDEL, C. A., PUNT, P. J. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. **Microb. Cell. Fact.**, v. 2(1), p. 1, 2003.
- KARLSSON, J., SIIKA-AHO, M., TENKANEN, M., TJERNELD, F. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **J. Biotechnol.**, v. 99(1), p. 63-78, 2002.
- KENEALY, W. R., JEFFRIES, T. W. Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments. In: GOODELL, B., NICOLAS, D. D., SCHULTZ, T. P. *Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World*, p. 210–239, **American Chemical Society**, Washington, 2003.
- KHADEMI, S., ZHANG, D., SWANSON, S.M., WARTENBERG, A., WITTE, K., MEYER, E.F. Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. **Acta Crystallogr.**, v. 58, p. 660-667, 2002.
- KLEMM, D., HEUBLEIN, B., FINK, H. P, BOHN A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International**, v. 44, p. 3358-3393, 2005.
- KONAREV, P. V., VOLKOV, V. V., SOKOLOVA, A. V., KOCHAND, M. H. J., SVERGUN, D. I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **J. Appl. Cryst.**, v. 36, p. 1277-1282, 2003.
- KOSHLAND, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 28, p. 416-436, 1953.
- KOZIN, M. B., SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 34, p. 33–41, 2001.
- KÜCK, U., HOFF, B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86(1), p. 51-62, 2010.
- LANGE, N. K. Application of cellulases in the textile industry. In: SOUMINEN, P., REINIKAINEN, T. *2nd TRICEL Symposium Trichoderma reesei cellulases and other hydrolases. Foundation of Biotechnical and Industrial Fermentation Research*, Espoo, p. 263–272, 1993.

- LAWOKO, M., HENRIKSSON, G., GELLERSTEDT, G. Characterization of lignin carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L) isolated with two methods. **Holzforschung**, v. 60, p. 156-161, 2006.
- LAWOKO, M., HENRIKSSON, G., GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes presents in wood and chemical pulps. **Biomacromolecules**, , v. 6, p. 3467-3473, 2005.
- LEE, N., FRANCKLYN, C., HAMILTON, E.P. Arabinose-induced binding of AraC protein to aral2 activates the araBAD operon promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., v. 84, p. 8814-8, 1987.
- LETUNIC, I., DOERKS, T., BORK, P. SMART 6: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 229-32, 2009.
- LI, Y. C., IRWIN, D. C., WILSON, D. B. Processivity, substrate binding, and mechanism of cellulose hydrolysis by *Thermobifida fusca* Ce19A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3165-3172, 2007.
- LIU, Y., ZHANG, J., LIU, Q., ZHANG, C., MA, Q. Molecular cloning of novel cellulase genes cel9A and cel12A from *Bacillus licheniformis* GXN151 and synergism of their encoded polypeptides. **Curr. Microbiol.**, v. 49(4), p. 234-8, 2004.
- LYND, I. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.
- LYND, L. R., WYMAN, C. E., GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 777-793, 1999.
- MABEE, W. E., GREGG, D. J., ARATO, C., BERLIN, A., BURA, R., GILKES, N., MIROCHNIK, O., PAN, X., PYE, E. K., SADDLER, J. N. Update on softwood-to-ethanol process development. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 29, p. 55-70, 2006.
- MASTER, E. R., ZHENG, Y., STORMS, R., TSANG, A., POWLOWSKI, J. A xyloglucan-specific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger*: recombinant expression, purification and characterization. **Biochem. J.**, v. 411(1), p. 161-70. 2008

- MAURER, K. H. Development of new cellulases. In: VAN EE, J. H., MISSET, O., BAAS, E. J. **Enzymes in detergency**. Ed. **Dekker**, Nova Yorque, p. 175–202, 1997.
- MCCARTER, J. D., WITHERS, S. G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, p. 885-892, 1994.
- MEYER, V., WANKA, F., VAN GENT, J., ARENTSHORST, M., VAN DEN HONDEL, C. A., RAM, A. F. Fungal Gene Expression on Demand: an Inducible, Tunable, and Metabolism-Independent Expression System for *Aspergillus niger*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 77(9), p.2975-2983, 2011a.
- MEYER, V., WU, B., RAM, A. F. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnol. Lett.**, v. 33(3), p.469-476, 2011b.
- MILLER, J. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem.**, v. 31(3), p. 426–428, 1959.
- MISHRA, N.C. DNA-mediated genetic changes in *Neurospora crassa*. **J Gen Microbiol**. V. 113(2), p. 255-9, 1979.
- MISHRA, N.C., TATUM, E.L. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 70(12), p.3875-9, 1973.
- MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., MELO, D. C. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PART I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.
- Microbial Sequencing Center (2012). Disponível em: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/GenomeDescriptions.html. Acesso em 02 de outubro de 2012.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol**, v. 51, p. 263-73, 1986.
- NEVALAINEN, K. M., TEO, V. S., BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends Biotechnol.**, v. 23(9), p. 468-74, 2005.

- OAK RIDGE NATIONAL LABORATORY (2006). Bioenergy conversion factors. Disponível em https://bioenergy.ornl.gov/papers/misc/energy_conv.html. Acesso em 06 de setembro de 2012.
- ODAC** (2011) – Oil depletion analysis center. Disponível em: <http://odac-info.org/peak-oil-primer>. Acesso em 06 de setembro de 2012.
- OGEDA, T. L. Hidrólise enzimática de celuloses pré-tratadas. Dissertação mestrado. Instituto de química da Universidade Estadual de São Paulo. 2011
- OGEDA, T. L., PETRI, D. F. Hidrólise Enzimática da Biomassa. **Química Nova**, v. 33(7), p. 1549-1558, 2010.
- PAULY, M., ANDERSEN, L. N., KAUPPINEN, S., KOFOD, L. V., YORK, W. S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. A xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. **Glycobiology**, v. 9(1), p. 93-100, 1999.
- PENTTILÄ, M., LIMÓN, C., NEVALAINEN, H. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. In: AURORA, K. D. *Handbook of fungal Biotechnology*, ed. **Marcel Deccker Inc.**, Nova Iorque, p. 413-427, 2003.
- PEROUTKA, III. R.J., ORCUTT, S. J., STRICKLER, J. E., BUTT, T.R. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. **Methods Molecular Biology**, v. 705, p.15–30, 2011.
- PHILIPPIDIS, G. P., SMITH, T. K. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51/52, p. 117-124, 1995.
- PICART, P., GOEDEGEBUUR, F., DÍAZ, P., JAVIER PASTOR, F. I. Expression of novel β -glucanase Cel12A from *Stachybotrys atra* in bacterial and fungal hosts. **Fungal Biol.**, v. 116(3), p.443-51, 2012.
- PILÓ-VELOSO, D., NASCIMENTO, E. A., MORAIS, S. A. L. () Quantitative chemical and ^{13}C NMR analysis of *Eucalyptus grandis* lignin, Proceedings of the third symposium on the chemistry of lignin and other wood components. **Química Nova**, p. 150-154, 1993.

- POLIZELI, M. L., RIZZATTI, A. C., MONTI, R., TERENCE, H. F., JORGE, J. A., AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 577–591, 2005.
- POTTERS, G., VAN GOETHEM, D., SCHUTTE, F. Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. **Nature Education**, v. 3(9), p. 14, 2010.
- POWLOWSKI, J., MAHAJAN, S., SCHAPIRA, M., MASTER, E. R. Substrate recognition and hydrolysis by a fungal xyloglucan-specific family 12 hydrolase. **Carbohydr. Res.**, v. 344(10), p. 1175-9, 2009.
- PUNT, P. J., SCHUREN, F. H., LEHMBECK, J., CHRISTENSEN, T., HJORT, C., VAN DEN HONDEL, C. A. Characterization of the *Aspergillus niger* prtT, a unique regulator of extracellular protease encoding genes. **Fungal Genet. Biol.**, v. 45(12), p. 1591-1599, 2008.
- PUNT, P. J., VAN BIEZEN, N., CONESA, A., ALBERS, A., MANGNUS, J., VAN DEN HONDEL, C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends Biotechnol.**, v. 20(5), p. 200-6, 2002.
- RECORD E., ASTHER, M., SIGOILLOT, C., PAGES, S., PUNT, P. J., DELATTRE, M., HAON, M., VAN DEN HONDEL, C. A., SIGOILLOT, J. C., LESAGE-MEESSEN, L. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62(4), p. 349-355, 2003.
- SALI, A., BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779-815, 1993.
- SANDGREN, M. Structural and functional studies of glycoside hydrolase family 12 enzymes from *Trichoderma reesei* and other cellulolytic microorganisms. In: Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Science and Technology 819. **Acta Universitatis Upsaliensis**, Uppsala, 68 p., 2003.
- SANTOS, C.R., SQUINA, F.M., NAVARRO, A.M., RULLER, R., PRADE, R., MURAKAMI, M.T. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary Xray diffraction studies of the catalytic domain of a hyper thermostable endo-1,4-beta-d-mannanase from *Thermotoga petrophila* RKU1. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization.**, v. 66, p.1078–81, 2010.

- SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35(5), p. 1004-1010, 2012.
- SCARAFONI, A., RONCHI, A., DURANTI, M. Gamma-conglutin, the *Lupinus albus* XEGIP-like protein, whose expression is elicited by chitosan, lacks of the typical inhibitory activity against GH12 endo-glucanases. **Phytochemistry**, v. 71(2-3), p. 142-8, 2010.
- SCHEVCHENKO, A., WILLM, M., VORM, O., MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850- 858, 1996.
- SEABRA, J. E. A. Avaliação tecnico-economica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- SEGATO, F., DAMÁSIO, A. R., GONÇALVES, T. A., DE LUCAS, R. C., SQUINA, F. M., DECKER, S. R., PRADE, R. A. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 51(2), p. 100-6, 2012.
- SIMS, R. E. H., MABEE, W., SADDLER, J. N., TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresour. Technology**, v. 101, p. 1570-1580, 2010.
- SIMS, A. H., GENT, M. E., LANTHALER, K., DUNN-COLEMAN, N. S., OLIVER, S. G., ROBSON, G. D. Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the unfolded-protein response in vivo. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71(5), p. 2737-47, 2005.
- SÖDING, J., BIEGERT, A., LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33(2), p. W244-W248 (Web Server issue), 2005.
- SQUINA, F.M., PRADE, R.A., WANG, H., MURAKAMI, M.T. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of an endo-1,5- α -L-arabinanase from hyperthermophilic *Thermotoga petrophila*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization**, v.65, p. 902–5, 2009.

- SQUINA, F. M., MORT, A. J., DECKER, S. R., PRADE, R. A. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. **Protein Expr. Purif.**, v. 68(1), p. 65-71, 2009.
- SUN, Y., CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599–1606, 2005.
- SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83(1), p. 1-11, 2002.
- SUURNAKKI, A., LI, T.Q., BUCHERT, J., TENKANEN, M., VIIKARI, L., VUORINEN, T., ODBERG, L. Effects of enzymatic removal of xylan and glucomannan on the pore size distribution of kraft fibres. **Holzforschung**, v. 51(1), p. 27-33, 1997.
- SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, **J. Appl. Crystallogr.**, v. 25, p. 495–503, 1992.
- SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys. J.**, v. 77(5), p. 2879-2886, 1999.
- SVERGUN, D. I., PETOUKHOV, M. V., KOCH, M. H. J. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. **Biophys. J.**, v. 80, p. 2946-2953, 2001.
- SWIFT, R. J., KARANDIKAR, A., GRIFFEN, A. M., PUNT, P. J., VAN DEN HONDEL, C. A., ROBSON, G. D., TRINCI, A. P., WIEBE, M. G. The Effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture. **Fungal Genet. Biol.**, v. 31(2), p.125-133, 2000.
- THOMSEN, R., CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **J. Med. Chem.**, v. 49(11), p. 3315-21, 2006.
- VERDOES, J. C., PUNT, P. J., STOUTHAMER, A. H., VAN DEN HONDEL, C.A. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene. **Gene**, 145(2), p. 179-187, 1994.
- WAYMAN, M., PAREKH, S. R. Biotechnology of biomass conversion: Fuels and chemicals from renewable resources, ed. **Open University Press**, 278 p. 1990.

- WEENINK, X. O., PUNT, P. J., VAN DEN HONDEL, C. A., RAM, A. F. A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69(6), p. 711-717, 2006.
- WICHER, K.B., ABOU-HACHEM, M., HALLDÓRSDÓTTIR, S., THORBJARNA-DÓTTIR, S. H., EGGERTSSON, G., HREGGVIDSSON, G. O., NORDBERG KARLSSON, E., HOLST, O. Deletion of a cytotoxic, N-terminal putative signal peptide results in a significant increase in production yields in *Escherichia coli* and improved specific activity of Cel12A from *Rhodothermus marinus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55(5), p. 578-84, 2001.
- WONG, K.K.Y., DEJONG, E., SADDLER, J.N., ALLISON, R.W. Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part2. Target substrates. **Appita J.**, v. 50(6), p. 509-518, 1997.
- YOSHIZAWA, T., SHIMIZU, T., HIRANO, H., SATO, M., HASHIMOTO, H. Purification, crystallization and X-ray diffraction study of extracellular dermal glycoprotein from carrot and the inhibition complex that it forms with an endo- β -glucanase from *Aspergillus aculeatus*. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.**, v. 67(Pt 7), p. 830-2, 2011.
- YOSHIZAWA, T., SHIMIZU, T., HIRANO, H., SATO, M., HASHIMOTO, H. Structural basis for inhibition of xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v. 287(22), p. 18710-6, 2012.
- YURIMOTO, H., SAKAI, Y. Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v53, p.85–92, 2009.
- ZECHEL, D. L., WITHERS, S. G. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. **Acc. Chem. Res.**, v. 33, p. 11-18, 2000.