



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

Clonagem do cDNA da endoglicanase 2 de
Humicola grisea var. *thermoidea* e sua expressão
em *Saccharomyces cerevisiae*

Saulo José Linhares de Siqueira

Orientadora: Prof. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Brasília, Março de 2006



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

Clonagem do cDNA da endoglicanase 2 de
Humicola grisea var. *thermoidea* e sua expressão
em *Saccharomyces cerevisiae*

Saulo José Linhares de Siqueira

Orientadora: Prof. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito
parcial à obtenção do grau de mestre em
biologia molecular.

Brasília, Março de 2006

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dr^a Lídia Maria Pepe de Moraes

Banca Examinadora:

- Profa. Dra. Janice Lisboa de Marco – UnB – Examinador externo
- Profa. Dra. Andréa Queiroz – UnB – Examinador interno
- Prof .Dr. Marcio Jose Poças-Fonseca – UnB – Suplente
- Prof^a. Dr^a Lídia Maria Pepe de Moraes – UnB – Orientadora

“Não existe verdadeira inteligência sem bondade”

Ludwig van Beethoven

Dedico este trabalho aos meus pais, Dimas e Ana, e à minha irmã Isabela. O amor que recebo de vocês é a fonte das minhas energias.

Agradecimentos

A Deus por me oferecer a graça da vida, pela minha família e por me tornar capaz de realizar esse trabalho. “Porque Nele vivemos, e nos movemos, e existimos” (At 17.28a).

Aos meus pais, Dimas e Ana, por sempre estarem do meu lado, por não me deixam desanimar durante a caminhada e por serem sempre o aconchego nos bons e maus momentos. Só cheguei onde estou por causa dos ensinamentos e do amor de vocês. Amo vocês!

À minha irmãzinha Isabela pelo carinho infinito, por todas as brincadeiras, cantorias e pela curiosidade com meu trabalho. Mesmo sendo mais nova, eu aprendo muito com seu jeito de ser. Te amo maninha!

À Lídia, minha orientadora, por ter me recebido no laboratório, por me ajudar e por muito ter me ensinado durante esse trabalho. A sua paixão pela ciência me motiva a continuar aprendendo.

Ao Mauro Xavier, que foi meu primeiro orientador de bancada. Seus ensinamentos ajudaram muito na minha formação e sua competência me serve de exemplo profissional.

Aos professores do laboratório de Biologia Molecular: Fernando, Marcelo Brígido, Márcio, Ildinete, Marcos, Andréa, Elida e Sueli por estarem sempre dispostos a ajudar, o que mostra que a força desse laboratório se dá pela união e pelo cuidado com os alunos.

À minha amiga Nádia, por sua amizade, uma das coisas boas da minha vida em Brasília, pelo carinho incondicional, além de toda a ajuda profissional, que foi essencial para o trabalho. Você é para mim um grande exemplo de determinação, objetividade e força! Muito obrigado por fazer parte da minha vida!!

Aos amigos Christian e Luanne, por terem me proporcionado ótimos passeios e trilhas, pelos momentos de descontração e pelo carinho. Obrigado Lu por me aturar e discutir comigo nos momentos de grandes dúvidas nos meus experimentos

À chefe Viviane, por toda a atenção prestada, por sempre ter aquele protocolo à mão, pela parceria no trabalho com as enzimas e pela amizade.

À Camila, por sempre me animar e incentivar quando os experimentos falhavam.

Ao Rafael, o Gaúcho, pela amizade, pelos mL de reagentes emprestados e pelos gigabytes de arquivos compartilhados.

Ao Bruno, pela ajuda com os experimentos e por sempre me incentivar a tentar novamente.

Aos colegas de trabalho e amigos do Lab 2: Aleksandro, pelas discussões com os experimentos e pelas imitações, à Patrícia (PatyVet) pelo carinho e confiança, ao Basti, pelas fotos. Ao Thiago, Rafael Ajuz, Loise, Diego, Marianna, Pollyanna, Juliana, Andreisse, Mauro, Hugo, Tatiana, Guilherme, Karen e Fabrício. Todo esse pessoal faz do Lab 2 um ótimo lugar para trabalhar.

Aos amigos demais colegas da BioMol: Flávia (e seu alto astral invejável), Alessandra, Livônios, Cristiano, Davi, Thiago, Túlio, Gabi, Carol, Victor, Bárbara, Mariany, Pedro, Cecília, PatyLu, Gina, Chrisinha, Luana, Mariana, Thiago Mello, Sérgio, Oscar Popó, Marciano, Lorena, Carine, Luciano, Leandro, Antonio Leonardo, PattyGirl, Aldo, Simoneide, Rose, Vera, Alice, André Nicola, Larissa, Izabel, Sócrates, Eduardo. O ambiente de trabalho no laboratório muito agradável por causa de vocês!

À Dona Ivanildes e à Dona Fátima, que são fundamentais para o funcionamento do laboratório. Ao Celso pela manutenção dos equipamentos e da capela e a Dona Conceição pela limpeza. À Ana e à Sandra, da secretaria, pelo suporte burocrático para as disciplinas e afins.

Ao Laboratório de Enzimologia: Félix, Janice, Marísia, Margarete, Gil e Daniel, a colaboração de vocês contribuiu imensamente para o andamento desse trabalho. Muito obrigado!

Aos bioamigos Rodrigo, Cláudio, Samuel, Joana, Willian, Vanessa, Paulo, Pedro Henrique, Rafael Leite, Pedro Ivo, Ana, Verônica, Isabela e Adriana, obrigado pelos bons momentos e pelo apoio.

Ao grande amigo Hugo Couto, por se esforçar para entender de biologia molecular pra poder ajudar e entender meu trabalho. Muito obrigado pela força!!

Ao amigo Charlys e à Dona Sandra, pelas prosas sempre boas e descontraídas, pelo carinho e pelo apoio.

À galera da república: João Paulo, Murillo e Criz, pelo ótimo ambiente de convivência e por me ajudarem com o trabalho.

Aos amigos Jader Allan, Daniele, Caroline pelo carinho e apoio.

Às minhas avós Alice e Margarida, aos meus tios, tias, primos e primas, pela grande importância que têm na minha vida e por sempre me incentivarem.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que participaram desse momento da minha vida e que minha “ótima” memória não permitiu que fossem mencionadas, fica o meu muito obrigado.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
ABREVIATURAS	xx
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
INTRODUÇÃO	01
1. Utilização de biomassa para produção de etanol	01
2. Produção de biomassa e sua degradação	04
3. Estrutura da celulose	06
4. Degradação de celulose	09
5. Microrganismos termófilicos e seu complexo celulolítico	12
5.1. O complexo celulolítico de fungos	13
5.2. O fungo <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	14
5.3. Endoglicanases de <i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	15
6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema de expressão heteróloga	17
6.1. Produção de celulases por <i>S. cerevisiae</i>	17
OBJETIVOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
1. Microrganismos utilizados e condições de cultura	21
1.1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	21
1.2. Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.3. Linhagem de <i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	21

2. Plasmídios e vetores utilizados	22
3. Meios de cultura e soluções	24
3.1. Soluções e meios para cultivo de <i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	24
3.2. Meios e soluções para cultivo de <i>E. coli</i>	25
3.3. Soluções para cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	26
3.4. Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinante	27
3.5. Soluções e tampões para transformação de <i>S. cerevisiae</i>	28
3.6. Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática	28
3.7. Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante	29
4. Técnicas do DNA Recombinante	30
4.1. Extração de RNA total de <i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	30
4.2. Análise de Ácidos Nucléicos em Gel de Agarose	31
4.3. Reação de transcrição reversa (RT)	31
4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
4.5. Seqüenciamento e análise da sequência do DNA	32
4.6. Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose	32
4.7. Extração de DNA plasmidial de bactéria	32
4.8. Digestão de DNA com enzimas de restrição	34
4.9. Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)	34
4.10. Transformação de bactéria	34
5. Transformação de <i>S. cerevisiae</i> e seleção dos transformantes	36
6. Produção da enzima recombinante	37
6.1. Diálise e liofilização do sobrenadante	37
6.2. Permeabilização da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	37
7. Detecção da atividade celulolítica e caracterização bioquímica	39
7.1. Ensaio enzimático	39
7.2. Atividade enzimática em diferentes pH	39
7.3. Atividade enzimática em diferentes temperaturas e estabilidade térmica	41
7.4. Atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato	41
7.5. Atividade enzimática sobre diferentes substratos	41
8. Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	42

8.1. Condições da eletroforese em gel de poliacrilamida	42
8.2. Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma)	42
8.3. Coloração de gel de poliacrilamida com prata	42
RESULTADOS	43
1. Clonagem dos genes <i>egl2</i> e <i>egl4</i> de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	43
1.1. Obtenção dos cDNAs correspondentes às endoglicanases 2 e 4	43
1.2. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados	45
1.3. Clonagem do cDNA <i>egl2</i> no vetor de expressão pAAH5 de <i>S. cerevisiae</i>	47
2. Expressão de endoglicanase 2 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.1. Transformação de levedura e detecção da atividade enzimática	51
2.2. Cinética de produção da endoglicanase recombinante	53
3. Caracterização bioquímica da EGL2 recombinante	55
3.1. Atividade enzimática em diferentes pH	55
3.2. Atividade enzimática em diferentes temperaturas e estabilidade térmica	55
3.3. Atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato	58
3.4. Atividade enzimática sobre diferentes substratos	58
3.5. Determinação da massa molecular da EGL2 recombinante	61
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose	7
Figura 2. Estrutura cristalina da celulose	7
Figura 3. Esquema de uma fibra de celulose	8
Figura 4. Representação esquemática da hidrólise de celulose	11
Figura 5. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM [®] -T Easy	23
Figura 6. Representação esquemática do mapa físico do vetor pAAH5	23
Figura 7. Curva padrão de glicose utilizada para se medir a quantidade de açúcares redutores nos ensaios enzimáticos.	40
Figura 8. Análise eletroforética dos produtos das reações de RT-PCR.	44
Figura 9. Análise eletroforética da reação de RT-PCR	46
Figura 10. Perfil de restrição dos plasmídios pGEGL2 e pGEGL4.	46
Figura 11. Análise eletroforética do perfil de restrição dos plasmídios pAA3 e pGEGL2	48
Figura 12. Clonagem do cDNA <i>egl2</i> no plasmídio de expressão pAAH5.	49
Figura 13. Representação esquemática do vetor de expressão pAEGL2	50

Figura 14. Ensaio de hidrólise de CMC em placa.	52
Figura 15. Curva de crescimento celular e produção da atividade de endoglicanase	54
Figura 16. Efeito da variação de pH na atividade de EGL2 recombinante	56
Figura 17. Efeito da variação de temperatura na atividade de EGL2.	56
Figura 18. Termoestabilidade de EGL2 recombinante a 50 °C e a 60 °C.	57
Figura 19. Curva da cinética enzimática da endoglicanase recombinante sobre CMC.	59
Figura 20. Gráfico de duplo-recíproco para endoglicanase 2 recombinante.	59
Figura 21. Atividade de EGL2 sobre celulose microcristalina e papel de filtro	60
Figura 22. Ensaio de atividade sobre MUC.	60
Figura 23. Perfil eletroforético das proteínas dos extratos periplasmáticos das linhagens YAEGL2-2 e YAAH5	62
Figura 24. Análise eletroforética e zimograma dos extratos periplasmáticos.	62
Figura 25. Análise eletroforética e zimograma do meio de cultura concentrado.	63
Figura 26. Seqüência de aminoácidos da EGL2 analisada no programa NetNGlyc	70
Figura 27. Gráfico do duplo-recíproco representando o efeito inibitório da enzima pelo substrato.	73

Índice de Tabelas

Tabela 1. Condições ideais de atividade e aplicação de celulases comerciais produzidas pela Novozymes.	13
Tabela 2. Endoglicanases produzidas por <i>S. cerevisiae</i> por expressão heteróloga.	18
Tabela 3. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas nesse trabalho.	21
Tabela 4. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR	32
Tabela 5. Composição dos tampões utilizados no ensaio de atividade em diferentes pH	40
Tabela 6. Expressão de hidrolases de diferentes organismos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67

Abreviaturas

%	- por cento
μ	- micro
μg	- micrograma
μL	- microlitro
1X	- concentração de uso
5X	- cinco vezes concentrado
10X	- dez vezes concentrado
20X	- vinte vezes concentrado
100X	- cem vezes concentrado
ADH	- álcool desidrogenase
BCA	- bagaço de cana-de-açúcar
BGL	- β-glicosidase
CBD	- domínio de ligação à celulose
cDNA	- ácido deoxirribonucléico complementar
CBH	- celobiohidrolase
CMC	- carboximetilcelulose
Da	- dalton
DNA	- ácido deoxirribonucléico
dNTP	- deoxirribonucleotídeo
DTT	- ditioneitol
EGL	- endoglicanase
g	- grama
G	- velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
GAP	- gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H	- hora
IPTG	- isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Kb	- kilobases

kDa	- kiloDaltons
L	- litro
M	- molar
mg	- miligrama
min	- minuto
mL	- mililitro
mM	- milimolar
MOPS	- ácido 3-N-morfolino propanosulfônico
mRNA	- ácido ribonucléico mensageiro
MUC	- 4-metilumbeliferil-β-D-celobiosídeo
NAM	- ácido N-acetilmurâmico
NAG	- N-acetilglicosamina
ηg	- nanograma
nm	- nanometro
°	- graus
°C	- graus centígrados
OD	- densidade óptica
p/v	- peso por volume
PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	- pares de base
PCR	- reação de polimerização em cadeia
PGK	- 3-fosfoglicerato quinase
PH	- potencial de hidrogênio
ρmol	- picomol
pNPC	- p-nitrofenil-β-D-celobiosídeo
q.s.p.	- quantidade suficiente para
RNA	- ácido ribonucléico
RNAse	- ribonuclease
rpm	- rotações por minuto
RT-PCR	- transcrição reversa- reação de polimerização em cadeia

SDS	- sódio dodecil sulfato
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
T _m	- temperatura de desnaturação
Tris	- tri(hidroximetil) aminometano
U	- unidade de atividade enzimática
V	- volts
v	- volume
v/v	- volume por volume
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3indoxil-β-D-galactopiranosídeo

Resumo

Humicola grisea var. *thermoidea* é um fungo termofílico que apresenta um sistema celulolítico com potencial para aplicação em processos de degradação de material lignocelulósico para produção de etanol. O crescente interesse nesse combustível e a abundância de materiais lignocelulósicos que podem ser usados como matéria-prima (como rejeitos agrícolas) fez aumentar o interesse no estudo de celulases. A expressão de celulases em *S. cerevisiae* é interessante pois esse microrganismo pode ser utilizado diretamente em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) para produção de etanol. Anteriormente os cDNA da *cbh1.2* e *bgl4* de *H. grisea* var. *thermoidea* foram expressos em levedura. Neste trabalho o cDNA do gene de *egl2* desse fungo foi amplificado por RT-PCR e clonado no vetor de expressão pAAH5 de *Saccharomyces cerevisiae*. Este vetor foi utilizado para transformar a linhagem MFL de *S. cerevisiae* com genótipo *leu2*. A atividade enzimática dos transformantes foi detectada por ensaio com Congo Red em placas contendo carboximetilcelulose (CMC) como substrato. A endoglicanase 2 de *H. grisea* var. *thermoidea* foi expressa em *S. cerevisiae* sob controle do promotor ADH1 e a levedura produziu a enzima em sua forma ativa. A enzima EGL2 recombinante possui massa molecular de 55 kDa e sua atividade enzimática foi caracterizada. Essa enzima apresentou atividade ótima em pH 5,0 e em temperaturas entre 50 e 60° C. EGL2 manteve aproximadamente 80% de sua atividade após pré-incubação a 50 °C por 6 horas, mostrando-se estável nessa temperatura. A enzima apresentou atividade sobre papel de filtro e atividade significativa sobre celulose microcristalina. Esta enzima foi capaz de hidrolisar o substrato sintético MUC, indicando que a enzima tem atividade sobre pequenos celo-oligossacarídeos.

Abstract

Humicola grisea var. *thermoidea* is a thermophilic fungus that produces high levels of cellulases which has high potential for use in lignocellulose degradation for ethanol production. With the increasing interest on this fuel and the amount of lignocellulosic wastes that can be used as raw material, new cellulases are characterized each day. Strains of *S. cerevisiae* expressing cellulases can be used in simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) for ethanol production. Previously, *cbh1.2* and *bgl4* cDNAs from *H. grisea* var. *thermoidea* was expressed in yeast. In this work, *egl2* cDNA from this fungus was obtained by RT-PCR and inserted into a *Saccharomyces cerevisiae* expression vector. The resulting molecular construction was introduced into a *leu2 S. cerevisiae* strain. Enzymatic activity in the transformants were detected by the Congo red assay using carboxymethyl cellulose (CMC) as substrate. Endoglucanase 2 from *H. grisea* var. *thermoidea* was expressed in *S. cerevisiae* under the control of ADH1 promoter and the enzyme was in its active form. Recombinant EGL2 presented a molecular mass of 55 kDa. This enzyme has an optimal pH of 5.0 and optimal temperatures between 50 and 60 °C. Recombinant EGL2 retained 80% of the initial activity after incubation at 50 °C up to 6 hours. The enzyme showed high activity toward filter paper and significantly activity toward microcrystalline cellulose. The activity toward the synthetic substrate MUC was observed, indicating that this enzyme can hydrolize small cellooligosaccharides.

Introdução

1. Utilização de biomassa para produção de etanol

A busca por fontes de energia alternativas aos combustíveis fósseis tem crescido devido à inevitável diminuição das reservas de petróleo e o seu conseqüente aumento de preço. O etanol ganha importância no cenário mundial como principal opção de fonte de energia alternativa ao petróleo em curto prazo. Esse combustível apresenta baixo custo de produção, baixos níveis de poluição e, em relação à sua matéria-prima, é considerado renovável (Tokarski, 2005). O custo médio de produção de um litro de etanol no Brasil é de US\$ 0,23, enquanto que nos Estados Unidos e na Europa esses valores são de US\$ 0,33 e US\$ 0,56, respectivamente (Veiga Filho, 2004). O Brasil domina a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, possuindo 300 usinas em operação no país e é responsável pela produção de um terço da produção mundial de etanol (Lin & Tanaka, 2006). Os Estados Unidos são o segundo maior produtor de etanol do mundo, obtendo o produto a partir do amido de milho. O produto nesse país é, porém, subsidiado pelo governo para manter a produção. O valor do subsídio é maior que o custo da produção de etanol no Brasil (Leite, 2005). O etanol apresenta ainda algumas vantagens em relação à gasolina que justificam sua importância. Possui maior octanagem (resistência a compressão sem entrar em combustão), maior eficiência de combustão, produz menos fumaça e menos resíduos provenientes da queima (Demain *et al.*, 2005). Além disso, o etanol contribui para a redução na emissão de CO₂ na atmosfera como determina o Protocolo de Kyoto, uma vez que o gás carbônico emitido pela combustão, foi originalmente absorvido do ar pelas plantas utilizadas como matéria-prima para produção do álcool (Lin & Tanaka, 2006). Diversos países têm adotado medidas para aderirem às exigências ambientais do Protocolo de Kioto. A União européia passou a recomendar o uso de 2% de combustíveis de origem renovável na gasolina e o Japão pretende adicionar 3% de etanol à sua gasolina (Veiga Filho, 2004; Tokarski, 2005). Essas medidas fazem com que haja um aumento substancial na demanda mundial de etanol e estimula os países a comprarem ou produzirem o combustível. Uma das estratégias para atender às exigências de exportação de etanol adotadas pelo Brasil foi de reduzir o teor desse combustível adicionado à gasolina. Por determinação do governo, a porcentagem de etanol adicionada à gasolina caiu de 25 para

20%, causando aumento na demanda interna de gasolina e conseqüente aumento na emissão de monóxido de carbono no ar (Lage, 2006).

Uma possibilidade de aumento na produção mundial de etanol é a utilização de biomassa em larga escala. Essa matéria-prima apresenta grande disponibilidade, uma vez que somente a partir de resíduos agrícolas pode-se obter cerca de 180 milhões de toneladas por ano. Biomassa também pode ser obtida a partir de resíduos municipais e das indústrias de papel, que contribuem, juntamente com os resíduos agrícolas, com o problema da poluição (Demain *et al.*, 2005; Lin & Tanaka, 2006). Outro aspecto interessante em relação à utilização da biomassa é a sua contribuição para o desenvolvimento sustentável. Enquanto o preço da gasolina está ligado ao petróleo, países de base agrícola podem desenvolver uma economia doméstica devido à disponibilidade dos recursos, além da geração de empregos na área rural (Mielenz, 2001; Lin & Tanaka, 2006).

Embora a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar seja relativamente simples, o processo utilizando biomassa é mais complicado. O composto alvo da biomassa é principalmente a celulose, que compõe cerca de 40% da biomassa de resíduos agrícolas e de 50 a 100% dos rejeitos das indústrias madeireira e de papel (Klyosov, 1995a). A produção de etanol a partir de biomassa requer uma etapa de deslignificação para liberar os polímeros de carboidratos da biomassa (celulose e hemicelulose), uma etapa de despolimerização para produção dos açúcares fermentáveis e finalmente a fermentação para a produção de etanol (Mielenz, 2001; Lin & Tanaka, 2006). As etapas de deslignificação e despolimerização das cadeias de carboidratos (também chamada de etapa de sacarificação) são realizadas a partir de métodos mecânicos, físicos e principalmente químicos. Processos que utilizam ácidos (ácido sulfúrico, ácido clorídrico ou ácido fosfórico), diluídos ou concentrados, associados a altas temperaturas (120-190 °C), são bastante eficientes para a sacarificação (Klyosov, 1995a, Saha *et al.*, 2005). Por outro lado, é exigido um alto gasto com material resistente às condições de tratamento, gera compostos tóxicos (devido ao tratamento ácido) e requer uma etapa de separação dos açúcares dos produtos indesejados (Klyosov, 1996a). Além disso, esses processos podem gerar, dependendo da temperatura de tratamento, produtos como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), que são inibitórios para os microrganismos que realizam a fermentação (Saha *et al.*, 2005).

A quebra dos polissacarídeos pelo processo enzimático tem sido estudada durante vários anos e apresenta-se como solução para a conversão de biomassa a etanol (Klyosov, 1995a, Mielenz, 2001). O custo da produção das enzimas hidrolíticas, uma etapa que até então representava um entrave para a produção de etanol, apresentou recentemente uma significativa queda (US\$ 0,10 – 0,18 por galão de etanol - fonte Novozymes – www.novozymes.com). A produção das enzimas hidrolíticas pode, entretanto, ser feita durante o processo de fermentação, o que representaria uma economia no custo total do processo de produção de etanol a partir de lignocelulose (Lynd *et al.*, 2002).

O microrganismo comumente utilizado na fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta bons níveis de produção de etanol durante a fermentação, pode ser modificado por engenharia genética para a produção das enzimas hidrolíticas necessárias para a conversão de celulose a glicose. Esse processo, conhecido como fermentação e sacarificação simultâneas (*simultaneous saccharification and fermentation* – SSF), elimina a necessidade de diferentes reatores para os processos de sacarificação e fermentação e, pode diminuir o custo de produção de etanol a partir de biomassa (Hari Krishna *et al.*, 2001). Esse processo ainda precisa ser otimizado pois a temperatura de sacarificação (45-50 °C) é diferente da temperatura ideal de fermentação (28-37 °C) (Lin & Tanaka, 2006). Diferentes microrganismos tem sido estudados para o processo de fermentação, como a levedura termotolerante do gênero *Kluyveromyces* (Hari Krishna *et al.*, 2001) e a bactéria *Clostridium thermocellum* (Demain *et al.*, 2005). O estudo para caracterização de novas enzimas é necessário pois algumas delas são inibidas pelos produtos de suas reações e também pelo etanol (Lin & Tanaka, 2006; Hari Krishna *et al.*, 2001).

2. Produção de biomassa e sua degradação

A biomassa vegetal é gerada a partir da fixação do dióxido de carbono do ar por plantas verdes pelo processo de fotossíntese. Esse processo transforma a energia luminosa em energia na forma de moléculas químicas que são utilizadas nos processos celulares da planta ou ainda servirão de energia para outros seres vivos. A fixação de CO₂ pelas plantas consome anualmente 15% do carbono da atmosfera. Desse carbono assimilado, metade entra na composição de polissacarídeos estruturais e lignina (conjuntamente chamadas de lignocelulose) que compõem a parede celular de plantas (Sandgren *et al.*, 2005).

A produção de biomassa vegetal atinge a escala de bilhões de toneladas anuais e cerca de 90% desse total é composta de lignocelulose (Lin & Tanaka, 2006). As plantas não reutilizam como energia o carbono contido na parede celular e esse composto fica contido em folhas e plantas mortas (Sandgren *et al.*, 2005, Lynd *et al.*, 2002). Devido a essa grande quantidade de biomassa gerada, muitos organismos desenvolveram a capacidade de decompor as macromoléculas que a compõem como fonte de carbono e de energia, principalmente fungos e bactérias. A degradação de celulose, hemicelulose e mesmo lignina por fungos e bactérias tem um papel importante na biosfera, pois geram mono e oligossacarídeos que servem de fonte de energia para esses e outros seres vivos e, conseqüentemente, reciclam o carbono para a atmosfera e contribuem para o ciclo do carbono no planeta (Béguin & Aubert, 1994; Leonowicz *et al.*, 1999, Sandgren *et al.*, 2005). Existe um grande espectro de microrganismos que degradam biomassa, principalmente celulose, produzindo diferentes complexos de enzimas que agem em conjunto (Pérez *et al.*, 2002). Na natureza, esses microrganismos interagem sinergisticamente com microrganismos não-celulolíticos, fazendo a completa degradação da celulose, que é convertida a CO₂ e água em condições aeróbicas e, em CO₂, metano e água em condições anaeróbicas. (Béguin & Aubert, 1994).

Os microrganismos celulolíticos possuem formas diferentes de degradar a celulose, que ocorre naturalmente na forma de partículas insolúveis ou associadas a polímeros de hemicelulose e lignina. Algumas bactérias garantem acesso aos produtos da quebra da celulose utilizando-se de um complexo multi-enzimático chamado celulosoma, um complexo enzimático produzido na parede celular dessas bactérias que se ligam à celulose quando o microrganismo cresce sobre material celulósico. Microrganismos que o possuem, diferentes espécies dos gêneros *Clostridium* e

Ruminococcus, são encontrados em ambientes anaeróbicos. O celulosoma permite que as enzimas atuem sinergisticamente nas proximidades da célula e diminui a difusão dos produtos de hidrólise da celulose, permitindo uma eficiente captação desses produtos pela célula (Lynd *et al.*, 2002). Os fungos celulolíticos e outras bactérias (geralmente aeróbicas) produzem celulasas que, na sua maioria, são secretadas pelas células, e que devem ser estáveis fora do ambiente celular para fazer a degradação do substrato (Pérez *et al.*, 2002). Esse sistema de degradação de celulose é bastante conhecido pelos estudos realizados com celulasas de fungos aeróbicos, principalmente as de *Trichoderma reesei*. Dentre as bactérias celulolíticas aeróbicas, espécies dos gêneros *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Thermomonospora* e *Microbispora* têm sido estudadas em detalhes (Béguin & Aubert, 1994).

3. Estrutura da celulose

A celulose é o maior componente da biomassa vegetal e o polímero orgânico mais abundante do planeta. Pode ser encontrada na forma pura, como no algodão, mas é comumente encontrada associada a hemicelulose e lignina na parede celular. Dependendo do tipo de planta e do seu estágio de crescimento, 35 a 50% do seu peso seco é composto por celulose, 25 a 35% de hemicelulose e 5 a 30% de lignina (Lynd *et al.*, 2002). A hemicelulose forma uma mistura heterogênea de polissacarídeos dentre os quais se destacam as xilanas, mananas, galactanas e arabinanas. Na estrutura da parede celular, as hemiceluloses mantêm interações covalentes com as moléculas de lignina e não-covalentes com as moléculas de celulose. A lignina é um polímero aromático heterogêneo de estrutura complexa que, juntamente com a hemicelulose, reveste a celulose e fornece à parede celular rigidez e proteção contra o ataque de microrganismos celulolíticos (Sandgren *et al.*, 2005).

A celulose tem uma estrutura relativamente simples, sendo formada de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4. Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando assim a celobiose, a subunidade repetitiva do polímero (Figura 1). Cada microfibrila é sintetizada independentemente e contém entre 2.000 e 20.000 resíduos de D-glicose. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose cujo carbono anomérico não está livre é chamada extremidade redutora; a outra extremidade é chamada não redutora (Sandgren *et al.*, 2005). A união de 30 microfibrilas forma uma fibrila, que reunidas em unidades maiores formam as fibras de celulose (Lodish *et al.*, 2000). A orientação das microfibrilas pode ser paralela ou antiparalela, formando a celulose do tipo I (mais abundante na natureza) ou do tipo II, respectivamente (Brown, 1999).

Uma característica importante da celulose é sua estrutura cristalina: as fibrilas são unidas por pontes de hidrogênio tanto intra quanto inter cadeias de celulose (Figura 2). Cada camada adjacente de celulose é ainda unida por forças de van der Waals. Isso resulta em uma fibra compacta de tal forma que enzimas e até moléculas pequenas, como a água, não consigam penetrá-la. As regiões cristalinas da celulose são intermediadas por regiões menos compactas, chamadas amorfas, em que as fibras apresentam maior distância uma das outras (Figura 3). Além das regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a

superfície de contato da celulose, permitindo o acesso de moléculas de água e outras moléculas maiores, como enzimas celulolíticas. (Lynd *et al.*, 2002).

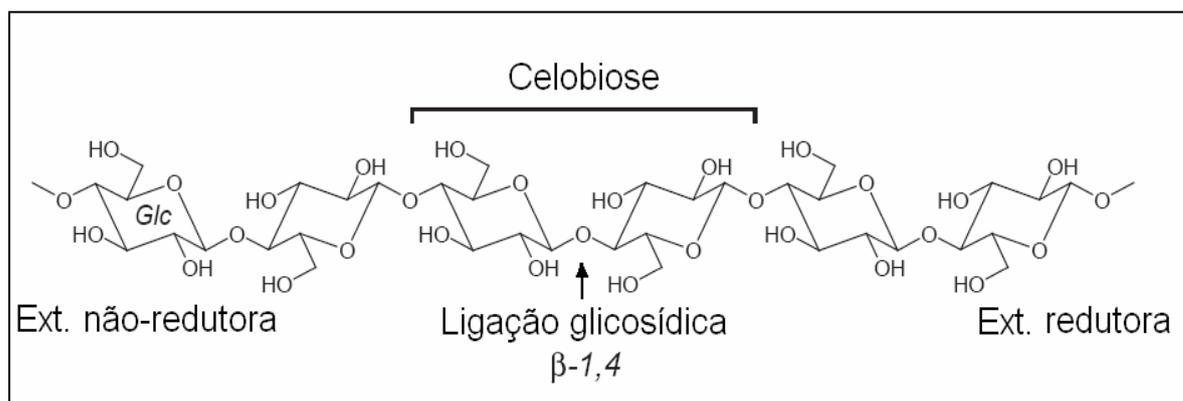


Figura 1. Estrutura da celbiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren *et al.*, 2005).

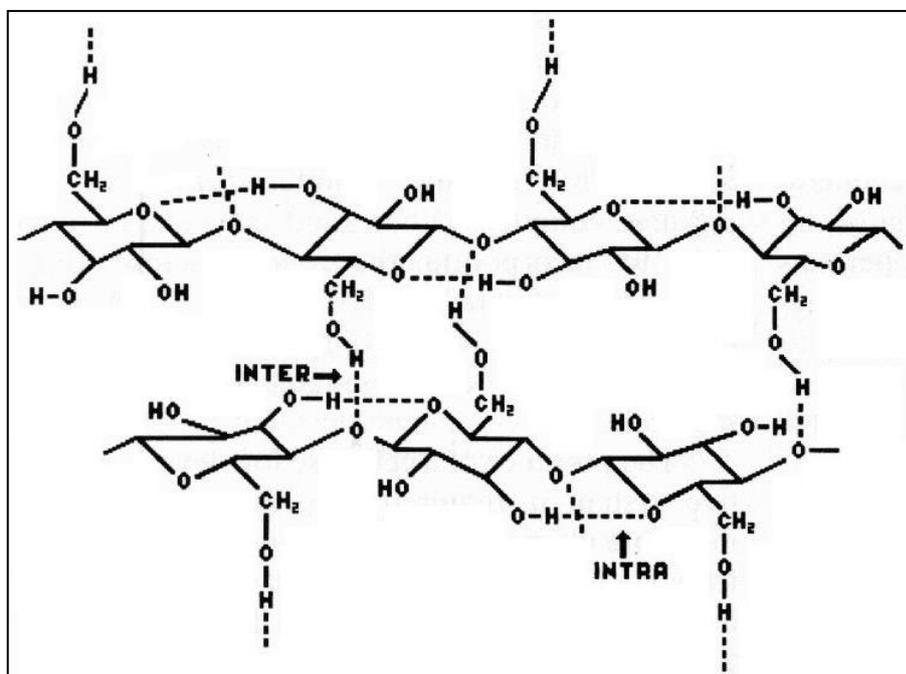


Figura 2. Estrutura cristalina da celulose. Representação das pontes de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra). (Radford *et al.* 1996).

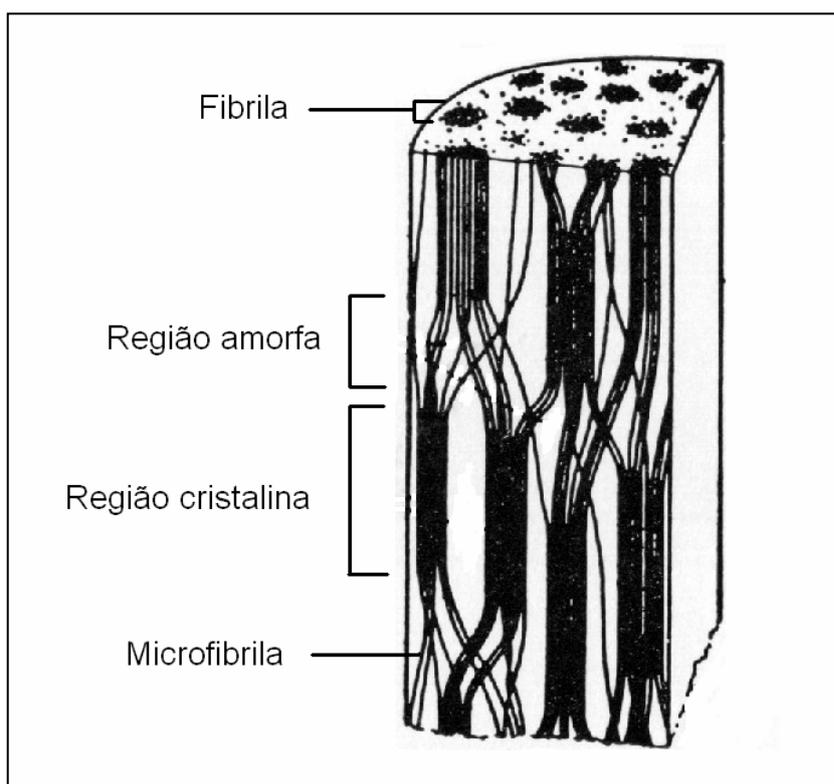


Figura 3. Esquema de uma fibra de celulose. É mostrado a estrutura de uma fibrila, microfibrilas e as regiões cristalina e amorfa da celulose (adaptado de Cowling, 1963).

4. Degradação de celulose

Celulases são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 da celulose. São produzidas por vários microrganismos para obtenção de glicose e oligossacarídeos a partir da degradação da celulose. Três tipos de enzimas são encontradas nos sistemas celulolíticos: as endoglicanases (EG, endo-1,4- β -glicanase, 1,4- β -D-glicana-4-glicanohidrolase ou EC 3.2.1.4), as exoglicanases (CBH, exo-1,4- β -glicanases, 1,4- β -D-glicana celobiohidrolases ou EC 3.2.1.91) e as β -glicosidases (celobiasas, β -D-glicosideo glucohidrolases ou EC 3.2.1.21) (van Rensburg *et al.*, 1996; Klyosov, 1995b, Sun & Cheng, 2002). As enzimas do sistema celulolítico foram classificadas com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose: as endoglicanases clivam ligações internas nas microfibrilas que se encontram nas regiões menos cristalinas (amorfa) da fibra de celulose, diminuindo o comprimento das mesmas e, conseqüentemente, gerando novas extremidades livres; as exoglicanases agem de maneira progressiva em extremidades redutoras (CBHI) ou não-redutoras (CBHII) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos; as β -glicosidases atuam nos resíduos de celodextrina e celobiose liberados e os hidrolisam a glicose (Figura 4) (Lynd *et al.* 2002; Phillipidis & Smith, 1995; Teeri, 1997). A quebra da ligação β -1,4 feita por essas enzimas ocorre quando o grupo carboxil do resíduo conservado de ácido glutâmico do sítio ativo doa um próton para a ligação e o íon carbônio formado é estabilizado pelo resíduo de ácido aspártico. Esse modelo foi proposto por analogia com o mecanismo de ação da lisozima, que cliva ligações β -glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico (NAM) e a N-acetilglicosamina (NAG) (Radford *et al.* 1996, Dillon, 2004). Dois diferentes mecanismos de quebra da ligação glicosídica são utilizados por essas enzimas. Algumas enzimas usam o mecanismo de retenção, no qual o carbono anomérico (carbono 1) permanece na conformação β (abaixo do plano da molécula) após a quebra da ligação. No outro mecanismo, chamado de inversão, a configuração do carbono anomérico é alterada para a forma α (acima do plano da molécula) durante a hidrólise (Teeri, 1997, Sandgreen *et al.*, 2005).

As enzimas do complexo celulolítico atacam o substrato de uma forma sinérgica. O sinérgismo resulta em um aumento de eficiência pela ação de dois ou mais componentes de um sistema quando comparado a ação de cada um deles isoladamente. No caso das celulases, esse sinérgismo faz com que a velocidade de

formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (Klyosov, 1995b). Esse sinergismo foi comprovado a partir de estudos de cada uma das enzimas, separadas e conjuntamente. Endoglicanases hidrolisam as ligações internas nas regiões mais acessíveis (amorfas) da celulose gerando novas extremidades livres. Celobiohidrolases conseguem penetrar nas regiões cristalinas das microfibrilas degradando o polímero de celulose a partir das extremidades geradas pelas endoglicanases. As β -glicosidades complementam a degradação clivando os celo-oligossacarídeos e celobiose gerados pelas celobiohidrolases (Teeri, 1997). A interação sinérgica pode acontecer entre uma endoglicanase de uma espécie de microrganismo e uma celobiohidrolase de outra. As celobiohidrolases são capazes de atuar muito rapidamente em uma extremidade gerada pelas endoglicanases, mostrando que as enzimas ficam distribuídas ao longo da fibra de celulose. O sinergismo ocorre também entre os diferentes subtipos de celobiohidrolases, uma vez que há enzimas que atacam as extremidades redutoras (CBHI) e outras que atacam as extremidades não-redutoras (CBHII) das fibras de celulose (Lynd *et al.*, 2002). O grau de sinergismo varia conforme o tipo de celulose utilizada: na presença de celulose cristalina o sinergismo endo-exo é alto, diminui na celulose amorfa e é muito baixo ou ausente em derivados solúveis da celulose, como a carboximetilcelulose (CMC) (Bhat & Bhat, 1997; Radford *et al.* 1996).

Embora celulasas sejam divididas em diferentes famílias de glicosil-hidrolases, existem algumas características em comum, obtidas provavelmente durante a evolução. Elas possuem uma longa cavidade de uma das regiões da proteína que se liga a resíduos consecutivos de açúcar do substrato, geralmente dois resíduos de cada lado da região catalítica da enzima. Nas endoglicanases elas se apresentam em forma de fenda, enquanto que as celobiohidrolases possuem uma espécie de túnel que envolve a microfibrila de celulose (Sandgren *et al.*, 2005). A maioria das endoglicanases e celobiohidrolases de microrganismos celulolíticos possuem um domínio de ligação à celulose (CBD – cellulose binding domain) que é ligado ao domínio catalítico por um peptídeo de ligação flexível. O CBD apresenta especificidade de ligação pela superfície da celulose cristalina e enfraquece as pontes de hidrogênio das microfibrilas de celulose vizinhas. As enzimas que possuem o CBD apresentam maior atividade sobre substratos sólidos, principalmente sobre celulose cristalina, mas não afetam sua atividade em substratos solúveis (Ito *et al.*, 2004, Sandgren *et al.*, 2005).

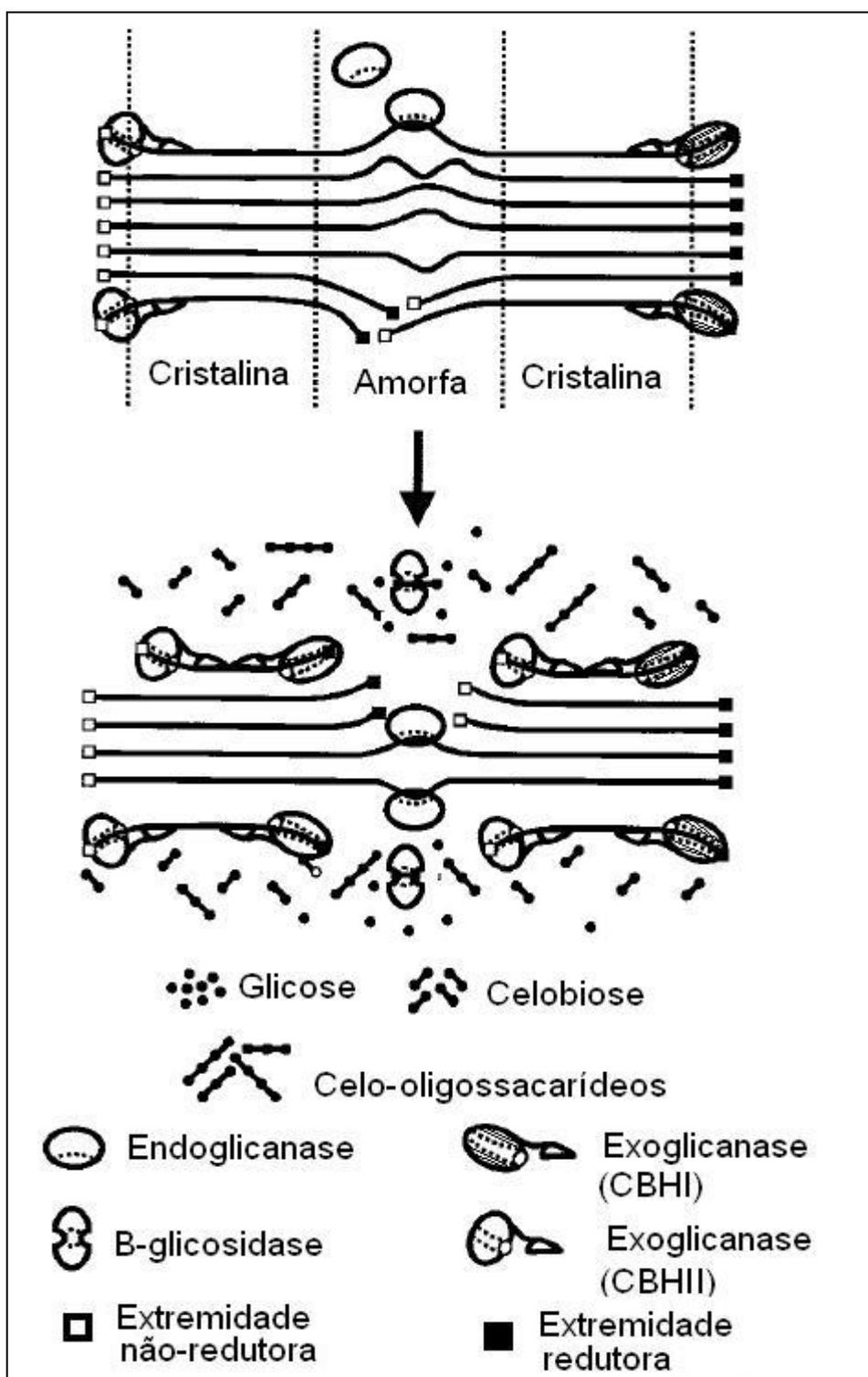


Figura 4. Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico. O esquema mostra a região de ação de cada uma das celulases (adaptado de Lynd *et al.*, 2002).

5. Microrganismos termófilicos e seu complexo celulolítico

Os microrganismos possuem mecanismos que permitem sua adaptação às condições do meio em que vivem. Microrganismos termófilicos apresentam adaptações que garantem sua sobrevivência em altas temperaturas. A membrana celular desses microrganismos é composta de ácidos graxos saturados que mantêm a célula rígida o suficiente para resistir a altas temperaturas e possuem proteínas termoestáveis e mais resistentes a proteólise. Alguns desses microrganismos possuem ainda uma proteína chamada DNA girase reversa, que provoca um giro positivo no DNA prevenindo que suas fitas se separem a altas temperaturas (revisto por Haki & Rakshit, 2003). Enzimas de termófilicos são estáveis e ativas a temperaturas ainda maiores que a temperatura ótima para crescimento do microrganismo. Essas enzimas se tornaram alvo de interesse industrial e biotecnológico por serem apropriadas para algumas condições de processos industriais que envolvem altas temperaturas ou condições extremas de acidez (Bruins *et al.*, 2001, Haki & Rakshit, 2003).

Enzimas celulolíticas são produzidas por uma grande variedade de bactérias e fungos. Muito do que se sabe sobre o sistema enzimático de degradação de celulose foi elucidado a partir de estudos com *Trichoderma reesei* (Bhat & Bhat, 1997; Lynd *et al.*, 2002; Sandren *et al.*, 2005). Celulases se tornaram úteis em processos industriais, o que estabeleceu uma demanda para a produção comercial dessas enzimas (Miettinen-Oinonen, 2004). As principais fontes de celulases vendidas comercialmente são oriundas dos fungos *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Humicola insolens* (Sandgren *et al.* 2005; Khademi *et al.*, 2002, Klyosov, 1995a) (Tabela 1). Para a degradação de celulose cristalina, que é insolúvel em água devido a sua estrutura altamente compacta, é interessante a utilização de celulases termoestáveis ativas a altas temperaturas (Haki & Rakshit, 2003). Com o maior interesse por celulases termoestáveis, os sistemas de microrganismos termofílicos passaram a ser estudados e caracterizados. Dentre estes, destacam-se as bactérias *Clostridium thermocellum*, *Thermonospora fusca* e *Microbispora bispora* (Wilson, 1992; Bhat & Bhat, 1997) e os fungos *Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Sporotrichum thermophile* e *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Bhat & Bhat, 1997; Maheshwari *et al.*, 2000).

Tabela 1. Condições ideais de atividade e aplicação de celulases comerciais produzidas pela Novozymes.

<i>Produto</i>	<i>Origem</i>	<i>pH</i> [*]	<i>Temperatura</i> [*]	<i>Aplicação recomendada</i>
Celluclast®	<i>T. reesei</i>	4,5 – 6,0	50 – 60 °C	Conversão de celulose a celobiose e glicose
Denimax™	<i>A. niger</i>	6,0 – 7,5	45 – 60 °C	Acabamento do jeans
Celluzyme®	<i>H. insolens</i>	7,0 – 8,0	45 – 55 °C	Remoção de fibras projetadas de tecido

* Informações obtidas no endereço eletrônico do fabricante (www.novozymes.com).

5.1. O complexo celulolítico de fungos

O complexo celulolítico dos fungos é bastante estudado por apresentar eficiente degradação de celulose. Isso se deve à produção de mais de um dos diferentes tipos de celulases. *T. reesei* produz pelo menos duas exoglicanases, oito endoglicanases e duas β -glicosidases e *H. insolens* produz duas celobiohidrolases e cinco endoglicanases (Lynd et al., 2002, Sandgren et al., 2005, Shülein, 1997). A maioria dessas enzimas apresenta-se glicosilada e acredita-se que a cadeia de carboidratos tem a função de estabilizar a atividade da enzima, uma vez que celulases parcialmente deglicosiladas de *H. insolens* apresentaram estabilidade térmica reduzida em diferentes pHs (revisto por Maheshwari et al., 2000).

Organismos termofílicos podem ser caracterizados por apresentar temperatura ótima de crescimento acima de 37 °C. Fungos classificados como termófilos apresentam temperatura de crescimento entre 20 e 50 °C (Maheshwari *et al.*, 2000; Miettinen-Oinonen, 2004). Suas celulases apresentam, de uma forma geral, atividade ótima em temperaturas entre 50 e 80 °C em pH entre 4,0 e 8,0 e são termoestáveis (Maheshwari *et al.*, 2000). Outras enzimas hidrolíticas, como amilases, xilanases, quitinases, lipases e proteases apresentam comportamento termoestável semelhante. A busca por enzimas termoestáveis e por microrganismos que sejam bons produtores de enzima tem sido de grande interesse pois, além da utilização industrial, é importante se obter informações que sejam úteis para a engenharia de proteínas e a engenharia metabólica de microrganismos (Haki & Rakshit, 2003)

5.2. O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi isolado de material vegetal em decomposição (Chaves *et al.*, 1989). Esse fungo é um deuteromiceto heterotrófico e saprofítico, capaz de degradar celulose, hemicelulose, amido, gomas vegetais e compostos presentes na lignina. Utiliza os produtos da degradação desses substratos e componentes inorgânicos presentes no ambiente para seu crescimento. É um fungo aeróbico e cresce em temperaturas que podem variar de 20 a 50 °C, apresentando crescimento ótimo entre 40 e 42 °C, sendo considerado um fungo termófilo (De-Paula, 1999). A sua característica termofílica e o amplo espectro de substratos degradados por *H. grisea* var. *thermoidea* fizeram com que esse fungo se tornasse objeto de estudo para identificação e caracterização de enzimas hidrolíticas, bem como a regulação da produção das mesmas. Muitas desses estudos têm sido realizados nos laboratórios de Biologia Molecular e de Enzimologia da Universidade de Brasília.

Azevedo *et al* (1990) fizeram a caracterização do gene de uma celobiohidrolase (*cbh1.1*) de *H. grisea* var. *thermoidea* que apresentou 60% de homologia com um gene de celulase de *T. reesei*. Posteriormente foi identificado o gene da enzima celobiohidrolase I.2 (*cbh1.2*) (Poças-Fonseca *et al.*, 1997) e que a proteína codificada por esse gene é a mais abundante no sobrenadante da cultura do fungo quando crescido em bagaço de cana (De-Paula *et al.*, 2003). O gene *cbh1.2* foi clonado e expresso em *Saccharomyces cerevisiae* (Benoliel, 2004) e em *Pichia pastoris* (Miranda, 1999) com a finalidade de fazer a caracterização da enzima. A regulação da expressão desses genes de celobiohidrolase foi analisada crescendo-se *H. grisea* var. *thermoidea* em diferentes fontes de carbono e foi mostrado que *cbh1.2* apresenta expressão constitutiva, enquanto *cbh1.1* apresenta um mecanismo regulatório distinto (Poças-Fonseca *et al.*, 2000). Foram caracterizados também endoglicanases (Takashima *et al.*, 1996a, 1997, 1999a) e β -glicosidasases (Ferreira Filho, 1996; Takashima *et al.*, 1996b, 1999b) de *H. grisea* var. *thermoidea*, sendo que o gene *bgl4*, que codifica a enzima β -glicosidase 4, foi expresso em *S. cerevisiae* e a enzima recombinante foi caracterizada (Benoliel, 2004). *H. grisea* var. *thermoidea* também tem sido estudado para identificação e caracterização de amilases (Felix & Oliveira, 1991; Campos & Felix, 1995) e xilanases (Cerri e Siva *et al.*, 2000; Lucena Neto *et al.*, 2004; Iembo *et al.*, 2005) termoestáveis. Esses estudos têm mostrado que as enzimas hidrolíticas produzidas por esse fungo podem ser exploradas para utilização em processos industriais, principalmente as enzimas induzidas por materiais lignocelulósicos complexos (De-Paula *et al.*, 1999).

5.3. Endoglicanases de *H. grisea* var. *thermoidea*

Endoglicanases são enzimas do complexo celulolítico que clivam as ligações das regiões menos compactas (amorfas) da celulose. É encontrada em diferentes organismos, desde fungos e bactérias até protozoários (Takenaka *et al.*, 1999), plantas (Suda & Giorgini, 2003), bactérias simbiotes de planta (Lima *et al.*, 2005), nematódeos (Béra-Maillet *et al.*, 2000) e cupim (Nakashima & Azuma, 2000). Existem em diferentes formas em fungos celulolíticos, apesar de não representarem a maior parte das celulasas produzidas (apenas 20% do total de celulasas produzidas por *T. reesei*) (Lynd *et al.*, 2002). Essa diversidade de endoglucanases garante ao microrganismo que as produz atividade sobre diferentes substratos, sendo que algumas delas possuem atividade em xiloglucanas (Suda & Giorgini, 2003; Lynd *et al.*, 2002). Essa atividade permite que as endoglucanases hidrolisem hemicelulose, ajudando a remover a barreira de lignina e permitindo melhor ação do sistema celulolítico sobre a celulose cristalina. O fungo *H. grisea* var. *thermoidea* produz alta atividade celulolítica e xilanolítica mesmo em substrato hemicelulósico sem celulose (Maheshwari *et al.*, 2000). Neste fungo foram identificados quatro endoglicanases (Takashima *et al.*, 1997, 1999a) duas celobiohidrolases (Azevedo *et al.*, 1990, Poças-Fonseca *et al.*, 1997) e seis β -glicosidases (Takashima *et al.*, 1996b).

Os genes das endoglicanases de *H. grisea* var. *thermoidea* e as suas respectivas enzimas foram caracterizadas por Takashima *et al.* em diferentes trabalhos (1996a, 1997 e 1999a). O gene de endoglicanase 1 (*egl1*) de *H. grisea* var. *thermoidea* foi obtido usando como sonda parte do gene de endoglicanase 1 de *T. reesei*. A região codante desse gene possui 1367 nucleotídeos com um íntron de 62 nucleotídeos interrompendo a seqüência. A enzima codificada por esse gene contém 435 resíduos de aminoácidos, massa molecular predita de 58 kDa e apresenta apenas o domínio catalítico, não possuindo CBD e o peptídeo de ligação. A EGL1 desse microrganismo apresentou atividade ótima em temperaturas de 55 a 60 °C e pH ótimo de 5,0, sendo estável por 10 minutos a 60 °C. Esta enzima apresenta alta atividade sobre CMC e pNPC (*p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo) e praticamente ausente sobre celulose microcristalina (Takashima *et al.*, 1996a).

O gene da endoglicanase 2 (*egl2*) de *H. grisea* possui uma região codificadora de 1326 nucleotídeos contendo dois introns, de 78 e 84 pb, respectivamente. O alinhamento dessa seqüência com o gene *cmc3* de *H. insolens* mostrou 97,7% de identidade. O produto da tradução da região codificadora apresenta 388 resíduos de

aminoácidos com massa molecular predita de aproximadamente 42 kDa e apresenta na região N-terminal resíduos de aminoácidos conservados do domínio de ligação à celulose (CBD). A proteína codificada por esse gene (EGL2) apresenta temperatura ótima de reação de 75 °C, pH ótimo de 5.0 e se mostrou termoestável a 75 °C, mantendo 80% da atividade após 10 minutos de aquecimento nessa temperatura. Essa enzima possui alta atividade sobre CMC, atividade significativa sobre celulose microcristalina e preferência por celo-oligossacarídeos longos (Takashima *et al.*, 1997).

Os genes das endoglicanases 3 e 4 foram obtidos por PCR com iniciadores desenhados a partir da sequência do gene de endoglicanase V de *H. insolens*. O gene *egl3* apresenta uma região codante de 971 nucleotídeos e contém um íntron de 56 pb. A enzima EGL3 possui 305 resíduos de aminoácidos com massa molecular predita de 32,2 kDa, apresentando o domínio catalítico, CDB e peptídeo de ligação. As condições ótimas de reação dessa enzima são em 60 °C e pH 5,0 e manteve 75% da sua atividade após 10 minutos de incubação a 80 °C. O gene *egl4* apresenta 854 nucleotídeos em sua região codificadora e um íntron de 173 pb. O produto desse gene (EGL4) possui 227 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 24,2 kDa. A enzima apresentou atividade ótima a 75 °C e pH 6,0, apresentando a mesma estabilidade térmica da *egl3*. Essas duas enzimas apresentaram atividade relativamente alta sobre CMC, mas atividade muito baixa sobre celulose microcristalina, além de não serem capazes de hidrolisar substratos sintéticos como o pNPG e pNPC (*p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo) (Takashima *et al.*, 1999a).

As endoglicanases de *H. grisea* var. *thermoidea* utilizadas para caracterização enzimática foram obtidas por expressão heteróloga em *Aspergillus oryzae* a partir da clonagem dos respectivos genes. As enzimas nativas não puderam ser purificadas pois não se conseguiu aumentar os níveis de expressão pelo fungo *H. grisea* var. *thermoidea* por expressão homóloga. Mesmo assim, acredita-se que as enzimas produzidas em *A. oryzae* refletem os dados das enzimas nativas de *H. grisea* var. *thermoidea* (Takashima *et al.*, 1997). Para este trabalho, foram escolhidos para a expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* os genes das endoglicanases 2 e 4 devido às características de termoestabilidade e pH apresentadas pelas respectivas enzimas.

6. *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expressão heteróloga

Leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares que são bastante atrativos para utilização em processos de biotecnologia devido à facilidade de manipulação genética e por realizarem processamento pós-traducional eucariótico nas proteínas que expressam. *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo muito bem estudado e informações sobre sua genética, biologia molecular e fisiologia têm contribuído para o entendimento da célula eucariótica, bem como da biologia humana. Esse organismo já tem seu genoma totalmente seqüenciado e possui aproximadamente 3.000 genes caracterizados. Desde muitos anos ela tem sido usada pelo homem para fabricação de pães e bebidas alcoólicas e atualmente, devido à sua classificação como organismo GRAS (*Generally Regarded as Safe*), é utilizada em processos na indústria farmacêutica. Isso só foi possível devido a todo esse tempo de aplicação na fabricação de produtos de consumo humano e por ser um microrganismo não-patogênico (Osergaard *et al.*, 2000), apesar de, em alguns casos, ser um patógeno oportunista (Goldstein & McCusker, 2001).

Durante as duas últimas décadas os estudos em engenharia genética tem permitido criar linhagens de microrganismos capazes de produzir proteínas de interesse em grandes quantidades e de boa qualidade. *S. cerevisiae* é um microrganismo facilmente manipulado geneticamente pela tecnologia do DNA recombinante e seu processo de fermentação é bem conhecido e estabelecido. Devido a essas vantagens e a possibilidade de se modificar as vias metabólicas a fim de aumentar o rendimento de produção, muitas proteínas heterólogas são produzidas nesse microrganismo, dentre elas, a primeira vacina recombinante comercializada, para hepatite B (Gellissen & Hollenberg, 1997). A expressão heteróloga em *S. cerevisiae* é facilitada pois possui um protocolo de transformação simples e uma taxa de recombinação homóloga muito eficiente *in vivo*, além de ser um dos poucos eucariotos que possui um plasmídeo natural, o 2 μ , que permite a construção de vetores para a transferência de genes e sistemas de expressão (Brandão, 1996).

6.1. Produção de celulasas por *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae originalmente não apresenta atividade celulolítica (Wong & Maclachlan, 1979; van Rensburg *et al.*, 1996). Por esse motivo, muitas celulasas são expressas e caracterizadas nesta levedura. A expressão dessas enzimas em *S. cerevisiae*

tem por interesse utilizar o sistema de expressão para se conseguir enzima em grande quantidade para aplicação industrial, bem como a produção de etanol (Lynd *et al.*, 2000). Endoglicanases de diversos fungos tem sido clonadas e expressas em *S. cerevisiae* (Tabela 2). A maioria dos trabalhos relata um bom nível de produção e grande parte da enzima é secretada para o meio de cultura pela levedura. Os níveis de glicosilação da enzima, quando existentes, não aumentam significativamente a massa molecular da enzima em relação ao tamanho da nativa (de 24 kDa para 28 kDa na FI-CMCCase de *Aspergillus aculeatus*) e não interferem na atividade enzimática (Minamiguchi *et al.*, 1995). As endoglicanases 1 e 3 de *Trichoderma longibrachiatum* foram expressas em *S. cerevisiae* dirigidas pelos promotores dos genes PGK (fosfogliceratoquinase) e ENO1 (enolase). As enzimas foram eficientemente secretadas somente após o final da fase exponencial de crescimento. Foram produzidas somente na forma hiperglicosiladas e ficaram heterogêneas no tamanho. Apesar disso, mais de 80% dessas celulasas foram detectadas no meio de cultura, sendo que a maioria das enzimas intracelulares ficou localizada no espaço periplasmático. Apesar da hiperglicosilação a atividade específica da enzima recombinante não foi significativamente alterada em relação à enzima nativa, apresentando considerável atividade em celulose insolúvel (Lynd *et al.*, 2002).

Tabela 2. Endoglicanases produzidas por *S. cerevisiae* por expressão heteróloga.

<i>Enzima(s)</i>	<i>Origem</i>	<i>Referência</i>
FI-CMCCase, XEG	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Pauly <i>et al.</i> , 1999; Minamiguchi <i>et al.</i> , 1995
ENG1	<i>Aspergillus niger</i>	Hong <i>et al.</i> , 2001
<i>EG1</i>	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Hong <i>et al.</i> , 2003
<i>PCE1</i>	<i>Phycomyces nitens</i>	Shimonaka <i>et al.</i> , 2004
<i>EGL1, EGL2</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Pérez-González <i>et al.</i> , 1993

Para a utilização da levedura em processo de sacarificação e fermentação simultâneas, foram construídas linhagens de *S. cerevisiae* co-expressando uma endoglicanase, uma celobiohidrolase e uma β -glicosidase (Cho *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2004). Ensaio preliminares foram feitos com celodextrinas e celulose amorfa como fonte de carbono para essas leveduras e mostraram que *S. cerevisiae* co-expressando essas três enzimas é capaz de gerar açúcares a partir desse substrato e produzir etanol.

Plasmídios contendo os genes de celobiohidrolase I.2 e de β -glicosidase 4 de *H. grisea* var. *thermoidea* foram construídos, linhagens de *S. cerevisiae* expressando esses genes foram obtidas em nosso laboratório, bem como a caracterização das enzimas recombinantes (Benoliel, 2004). Para obtenção de um sistema celulolítico capaz de degradar celulose à glicose falta clonar uma endoglicanase de *H. grisea* var. *thermoidea* em um vetor de expressão para essa levedura. Assim será possível construir uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de expressar enzimas do sistema celulolítico de *H. grisea* var. *thermoidea* e estudar a interação destas enzimas na degradação de substratos contendo celulose. Para tal, é necessário obter uma linhagem de *S. cerevisiae* que expresse uma endoglicanase funcional e fazer a caracterização da enzima recombinante a fim de se verificar suas propriedades enzimáticas diferem da enzima nativa.

Objetivos

1. Geral

Este trabalho tem como objetivo principal a clonagem e expressão do cDNA do gene da endoglicanase 2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Saccharomyces cerevisiae* e a caracterização bioquímica da enzima recombinante.

2. Específicos

1. Isolar o cDNA correspondente ao gene *egl2* de *H. grisea* var. *thermoidea*.
2. Clonar o cDNA correspondente ao gene *egl2* de *H. grisea* var. *thermoidea* no vetor de expressão em *S. cerevisiae*, pAAH5.
3. Selecionar os transformantes de *S. cerevisiae* produtores de endoglicanase e analisar a expressão da enzima recombinante pela levedura.
4. Fazer a caracterização bioquímica parcial da endoglicanase recombinante.

Material e Métodos

1. Microrganismos utilizados e condições de cultura

1.1. Linhagens de *Escherichia coli*

As linhagens bacterianas utilizadas para manipulação de DNA foram DH5- α e XL10 Gold (Tabela 3). Tanto as células selvagens quanto as transformadas foram cultivadas em meio LB (ver seção de meios de cultura) estocadas a -80 °C em glicerol 25%.

Tabela 3. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas nesse trabalho.

<i>Linhagem</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Referência ou fornecedor</i>
DH5- α	<i>EndA1 recA1 hsdR17 supE44 gyrA96 thi-1</i> <i>relA1 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15)</i>	Sambrook e Russel, (2001)
XL10 Gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r</i>] ^a	Stratagene

1.2. Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura utilizada no trabalho foi a linhagem MFL de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente para a produção de leucina (*leu2*). As culturas crescidas em meio YPD e selecionadas em meio mínimo (YNB) contendo glicose e tamponado com solução de AspGlu pH 6,0. Estoques das culturas selvagem e transformadas foram guardadas a -80 °C em meio YPD contendo 25% de glicerol.

1.3. Linhagem de *Humicola grisea* var. *thermoidea*

A linhagem selvagem de *Humicola grisea* utilizada nesse trabalho foi obtida a partir de um subcultivo do isolado inicial (Araújo *et al.*, 1983), classificado como *Humicola grisea* var. *thermoidea*, tendo como base as características morfológicas e fisiológicas, segundo Cooney & Emerson (1964).

2. Plasmídios e vetores utilizados

Para clonagem dos produtos de PCR e manipulação dos genes de interesse foi utilizado o plasmídio pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 5). Esse vetor de 3,0 kb possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, a origem de replicação do fago f1, parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino terminal da enzima β -galactosidase, diversos sítios de clonagem na região codante do *lacZ*, e as seqüências T7 e SP6 (para anelamento dos oligonucleotídeos universal e reverso) flanqueando a região de clonagem. A seleção dos recombinantes é feita pela ausência da atividade da β -galactosidase na presença de X-gal.

Para a expressão dos genes de interesse em *S. cerevisiae* foi utilizado o vetor pAAH5, obtido a partir da digestão do vetor pAA3 (Moraes *et al.* 1995) com a enzima *Hind* III para remoção do gene da α -amilase de *Bacillus subtilis*. Esse possui os genes de resistência a ampicilina e tetraciclina como marca de seleção em bactéria. A marca de seleção em levedura é feita pela complementação auxotrófica com o gene *leu2*. O promotor e o terminador são do gene da álcool-desidrogenase 1 (ADH1) que são flanqueados por sítios para a enzima de restrição *Bam*H I e o sítio de clonagem presente é o da enzima de restrição *Hind* III (Figura 6).

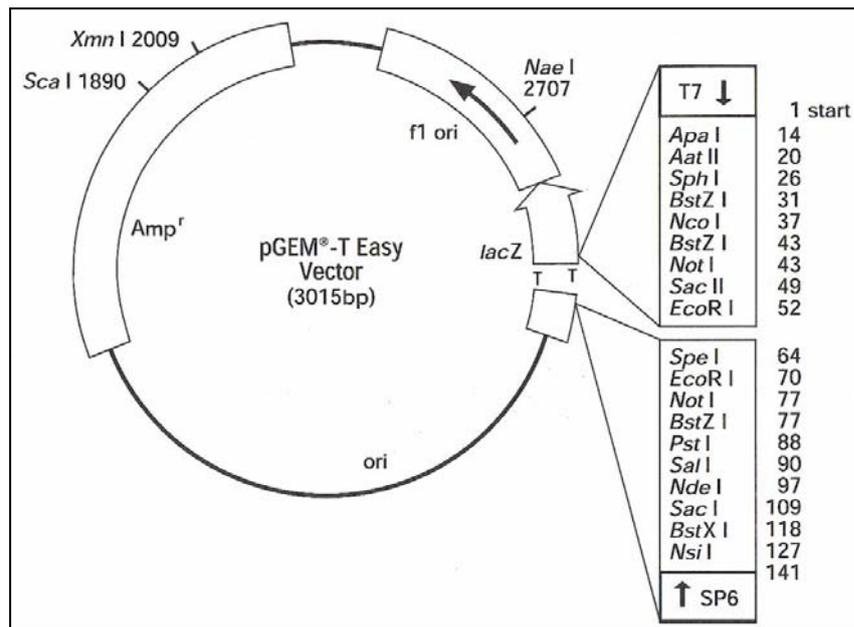


Figura 5. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM[®]-T Easy (Promega).

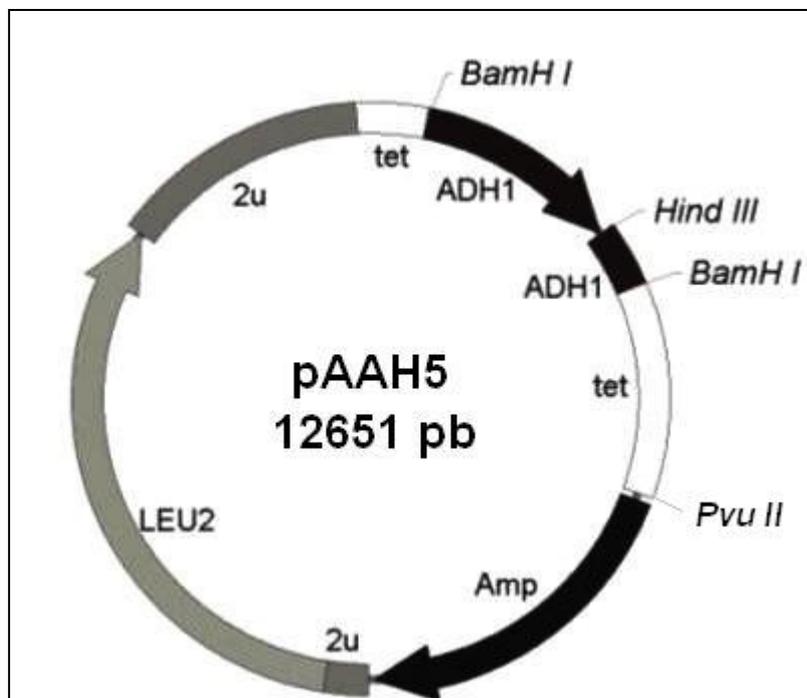


Figura 6. Representação esquemática do mapa físico do vetor pAAH5 para expressão em *S. cerevisiae*.

3. Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo de microrganismos foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos, a menos que especificado outro método.

3.1. Soluções e meios para cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*

Solução de Elementos Traço

KCl	26 mg/L
CuSO ₄ -5H ₂ O	400 mg/L
FeSO ₄ -7H ₂ O	714 mg/L
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	800 mg/L
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8 mg/L
pH ajustado para 2,0	

Solução de Sais

Na ₂ B ₄ O ₇ -10H ₂ O	40 mg/L
MgSO ₄ -7H ₂ O	10 g/L
KH ₂ PO ₄	76 g/L
Sol. Elementos Traço	50 mL/L

Meio Completo

Solução de sais	20,0 mL
Glicose (p/v)	1,0%
Caseína hidrolisada	1,5 g/L
Peptona	2,0 g/L
Extrato de levedura	0,5 g/L
pH ajustado para 6,5 a 6,8	

Meio Ágar-Aveia

Farelo de Aveia comercial	20 g/L
Ágar bacteriológico	15 g/L

Meio Mínimo (de indução)

Solução de sais	20 mL/L
Bagaço de cana explodido a vapor (BCA)	1% (p/v)
pH ajustado para 6,8	

3.2. Meios e soluções para cultivo de *Escherichia coli***Meio Luria-Bertani (LB)**

Peptona de caseína	10g/L
Extrato de Levedura	5g/L
NaCl	10g/L
pH ajustado para 7,2	

Meio LB-Ágar

Meio LB adicionado de agar bacteriológico a 15g/L.

Meio SOB

Bacto-Triptona	20,0 g/L
Extrato de Levedura	5,0 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,5 g/L
pH ajustado para 7,2	

Meio SOC

SOB	100ml
Glicose	20,0mM
MgCl ₂	5,0mM
MgSO ₄	5,0mM

As soluções de glicose, MgCl₂ e MgSO₄ foram esterilizadas por filtração em membrana milipore 0,22 µm.

3.3. Soluções para cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Meio YPD

Extrato de Levedura	10 g/L
Peptona de caseína	20 g/L
Glicose	20 g/L

A glicose deve ser autoclavada separadamente.

Meio YPD-Ágar

Meio YPD adicionado de agar bacteriológico a 15 g/L.

Meio YNB 20X (Sem aminoácidos)

Yeast Nitrogen Base Without Amino acids (Difco)	3,4% (p/v)
NH ₄ SO ₄	10% (p/v)

Esterilização por filtração em membrana milipore 0,22 µm.

Tampão AspGlu 20x pH 6,0

Ácido Aspartico	8,0% (p/v)
Ácido Glutâmico	8,0% (p/v)

Meio mínimo para *Saccharomyces cerevisiae*

Tampão AspGlu pH 6,0	1X
YNB	1X
Glicose	2,0% (p/v)

Meio mínimo-Ágar

Meio Mínimo adicionado de Agar bacteriológico a 15g/L.

Meio mínimo-Ágar CMC

Meio Mínimo-Ágar adicionado de carboxi-metil-celulose (CMC low viscosity – Sigma) 1% (p/v).

3.4. Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinante

Tampão TE

Tris-HCl (pH 8,0)	25mM
EDTA	10mM

Solução 2

NaOH	0,2M
SDS	1,0% (p/v)

Preparada no momento do uso.

Solução 3

Acetato de Potássio 5 M	60,0 mL
Ácido acético Glacial	11,5 mL
Água	28,5 mL

Tampão Tris-Borato EDTA (TEB) 10X

Trizma base	0,89M
Ácido Bórico	0,89M
EDTA	0,08M

pH ajustado para 8,4

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 10X

Tris-Acetato	40 mM
EDTA	1mM

pH ajustado para 8,5

Tampão de Amostra para DNA (10x)

TEB 20X	50,00% (v/v)
Glicerol	30,00% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
Xilenocianol	0,25% (p/v)

3.5. Soluções e tampões para transformação de *S. cerevisiae*

Tampão TE 10X

Tris-HCl(pH 7,5)	100mM
EDTA	10mM

Tampão *One-step*

Acetato de Lítio	0,2M
PEG 4000	40% (p/v)
DTT	100mM

Soluções preparadas separadamente e misturadas no momento do uso.

3.6. Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática

Tampão Acetato de Sódio 0,5 M pH 5,0

Acetato de Sódio	43,55 g/L
Ácido acético glacial	1,03% (v/v)

Reagente DNS

Ácido Dinitrosalicílico	10g
NaOH 2M	200mL
Tartarato de Sódio e Potássio	150g

O tartarato de sódio e potássio foi dissolvido em 500ml de água destilada aquecida e adicionado ao DNS previamente dissolvido em NaOH também aquecido. A solução foi agitada sob aquecimento até ser observada a completa dissolução dos reagentes. O volume foi então completado para 1000 mL com água destilada.

3.7. Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante

Tampão de Amostra para proteína (2x)

Tris-HCl 1 M pH 6,8	200 mM
SDS	4,0% (p/v)
β -Mercaptoetanol	4,0% (v/v)
Glicerol	20,0% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Volume final de 10 mL	

Acrilamida:Bis-Acrilamida (39:1)

Acrilamida	39 g
Bis-acrilamida	1 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada em frasco escuro a 4°C.

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris	18,2 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Tris-HCl 1 M pH 6,8

Tris	12,1 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Persulfato de Amônio (P.A.) 10% (P/V)

P.A.	1 g
Água destilada (q.s.p.)	10 mL

Tampão de Corrida – Tris-Glicina 5x (Estoque)

Tris	16,7 g
Glicina	104,5 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

No momento do uso, foi adicionado SDS para a concentração final de 0,1%.

4. Técnicas do DNA Recombinante

4.1. Extração de RNA total de *Humicola grisea* var. *thermoidea*

O fungo *H. grisea* foi inicialmente cultivado em meio completo a fim de se restaurar a cultura do microrganismo. Culturas em placa de Meio Ágar-Aveia crescidas a 37 °C foram utilizadas para produção de esporos. A placa de petri foi lavada com uma solução de Tween 80 0,01%, os esporos contados em câmara de Neubauer e 10⁶ esporos inoculados em 200 mL de meio completo e incubados a 37 °C a 220 rpm por 20 horas. O fungo crescido em meio completo foi coletado por filtração em papel de filtro estéril. Antes de ser inoculado no meio de indução o fungo foi lavado com água comum estéril a fim de se retirar o excesso do meio completo. Uma pequena porção da cultura filtrada foi utilizada para inocular 200 mL de meio mínimo para indução da produção de celulases. O fungo foi crescido por 24 horas 37 °C a 220 rpm. O micélio de *H. grisea* foi coletado por filtração e uma quantidade de 2 a 5 g (peso úmido) foi utilizado para a extração de RNA. Foram empregados dois métodos de extração. Uma delas utilizando o kit comercial “Rneasy Mini kit” (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante, e outra utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen), descrito a seguir (todo o material e soluções utilizados estavam em condições livre de RNase).

A massa de micélio foi congelada em cadinho com N₂ líquido, macerada até adquirir aspecto de pó e transferido para um tubo falcon de 50 mL contendo 5 mL de TRIzol[®] para cada 3 g de macerado e pérolas de vidro suficiente para cobrir o fundo do tubo. Em seguida, a mistura foi agitada em vortex durante 1 a 2 minutos e centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo Corex contendo 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol[®] inicial. A mistura no tubo foi homogeneizada e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente antes de ser centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo Corex adicionado de 0,5 mL de isopropanol por mL de TRIzol[®], misturada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos seguida de centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% por mL de TRIzol[®] utilizado. A mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado, o precipitado contendo o RNA foi secado por 5 a 10 minutos e ressuspenso em 400 µL de água MiliQ.

4.2. Análise de Ácidos Nucléicos em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação da qualidade do RNA e análise de fragmentos de DNA (De-Souza, 2003). A agarose foi preparada em concentrações de 0,8 a 1,0% (p/v) em tampão de corrida TEB 1X ou TAE 1X. Como marcadores moleculares para DNA foram utilizados 1 kb ladder (INVITROGEN, NEW ENGLAND BIOLABS ou PROMEGA) ou DNA de fago λ digerido com *EcoR* I e *Hind* III (λ *Eco/Hind*).

4.3. Reação de transcrição reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o kit “Superscript™ Preamplification System” (GIBCO), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações realizadas pela técnica de polimerização em cadeia foram feitas utilizando-se como molde 10 ng de DNA total de *H. grisea* var. *thermoidea*, 2 μ L da reação de transcrição reversa, 1 ng de DNA plasmidial ou 1 μ L de uma reação de PCR, 0,2 mM de dNTPs, tampão da *Taq* DNA polimerase, 1,5 a 3 mM de cloreto de magnésio, 1U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot), 10 a 30 pmol de oligonucleotídeos iniciadores 5' e 3', em um volume final de reação de 30 a 50 μ L. O desenho dos oligonucleotídeos foi feito com base nas seqüências dos genes *egl2* e *egl4* de *H. grisea* descritos por Takashima *et al.* (1997, 1999a) e contêm a seqüência para a introdução do sítio de restrição para a enzima *Hind* III nas extremidades dos produtos de PCR (Tabela 4).

As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial (94°C – 2 min), 30 ciclos de desnaturação (94°C – 1 min), anelamento (50 a 60°C – 1 min), extensão (72°C – 1,5 min) e extensão final (72°C – 10 min). As reações de PCR com Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (INVITROGEN) foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 4. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR

<i>Oligonucleotídeo</i>	<i>Seqüência (5' → 3')</i>	<i>T_m</i>
E2SF	<u>AAGCTT</u> ACCATGAAGCACAGTGTCCCTTGC	62,5 °C
E2SR	<u>AAGCTT</u> CTATGGCACGTATTTCTTGAGAAGGGA	62 °C
E4SF	<u>AAGCTT</u> ATCATGCAGCTCCCCCTGACCAC	65 °C
E4SR	<u>AAGCTT</u> TTAGTTAGCACTCAAGGGAAAAAAAA CACA ACTTCT	62,5 °C

4.5. Seqüenciamento e análise da seqüência do DNA

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics). Era utilizado cerca de 100 ng de DNA, 5 pmoles dos primers apropriados e o kit “DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”. Os DNAs utilizados no seqüenciamento eram quantificados por espectrofotometria utilizando o GeneQuant RNA/DNA Calculator *pro* (Biochrom).

A qualidade das seqüências obtidas através do seqüenciamento automático era analisada, utilizando as ferramentas de bioinformática: Phred, Phrap, CAP3 disponíveis na página: www.unb.br/ib/cel/biomol. Depois da análise de qualidade, as seqüências eram submetidas ao programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1990), para análise de identidade com seqüências já depositadas no GenBank.

4.6. Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

Após digestão dos plasmídios com as enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos de DNA contendo as seqüências de interesse eram aplicados em gel de agarose e submetidos a eletroforese. Os fragmentos de DNA eram recortados do gel de agarose e purificados utilizando-se o kit “GeneClean” (Biorad), conforme as especificações do fabricante.

4.7. Extração de DNA plasmidial de bactéria

Minipreparação – Inoculou-se uma colônia de bactéria em 5mL de meio LB contendo ampicilina (100 mg/mL). Esse inóculo foi incubado por aproximadamente 16 horas a

200 rpm a 37 °C. Um volume de 3mL de cultura foi centrifugado a 5.000 x g por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado em 200µL de solução TE, adicionou-se 200µL de Solução 2, agitando-se o tubo por inversão. A seguir, foram adicionados 200µL de Solução 3, misturado por inversão, incubado no gelo por 5 minutos e centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 750µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma centrifugação a 10.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 100µL de solução TE. Foi adicionado 1 volume de solução fenol/clorofórmio tamponado (1:1) e a mistura homogeneizada em vortex por 1 minuto. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 5.000 x g e a fase aquosa transferida para um outro tubo. A seguir foi adicionado igual volume de clorofórmio. O tubo foi agitado vigorosamente e centrifugado a 5.000 x g por 5 minutos. À fase aquosa final foi transferida para um tubo limpo e a ele foram adicionados 750µL de etanol 100%. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado (sem ressuspender) com 1mL de etanol 70%. Repetiu-se a centrifugação anterior e o excesso de álcool foi removido. O precipitado foi secado por 5 a 10 minutos e ressuspensionado em 50µL de TE + RNAase A (1µL da solução estoque de RNAase 10mg/µL para cada 100µL de TE).

O DNA plasmidial utilizado na reação de seqüenciamento foi obtido utilizando-se o kit “Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System” (Promega™), conforme especificações do fabricante.

Midipreparação –Inoculou-se uma colônia de bactéria em 50mL de meio LB contendo ampicilina (100 mg/mL). Esse inóculo foi incubado por aproximadamente 16 horas a 200 rpm a 37 °C. A cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado por agitação em vortex em 2mL de solução TE, adicionou-se 3,6mL de Solução 2, agitando-se o tubo por inversão. A seguir, foram adicionados 3mL de Solução 3, misturado por inversão, incubado no gelo por 5 minutos e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 7,5mL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma centrifugação a 10.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 300µL de

solução TE. Foi adicionado 1 volume de solução fenol/clorofórmio tamponado (1:1) e a mistura homogeneizada em vortex por 1 minuto. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 5.000 x g e a fase aquosa transferida para um outro tubo. A seguir foi adicionado igual volume de clorofórmio. O tubo foi agitado vigorosamente e centrifugado a 5.000 x g por 5 minutos. À fase aquosa final foi transferida para um tubo limpo e a ele foi adicionado 750µL de etanol 100%. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado (sem ressuspender) com 1mL de etanol 70%. Repetiu-se a centrifugação anterior e o excesso de álcool foi removido. O precipitado foi secado por 5 a 10 minutos e ressuspensionado em 500µL de TE + RNAase A (1µL da solução estoque de RNAase 10mg/µL para cada 100µL de TE).

4.8. Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões de moléculas de DNA com enzimas de restrição foram realizadas em sistemas de 10 a 100 µL, durante 1 a 16h (estipulados de acordo com a quantidade de DNA a ser digerido). Os tampões e as temperaturas de reação foram utilizadas de acordo com as indicações dos fabricantes, utilizando-se cerca 10 a 20 U de enzima para cada micrograma de DNA a ser digerido.

4.9. Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)

Para sistemas de ligação não direcionados de fragmentos de DNA (apenas um sítio de restrição) foi necessário defosforilar as extremidades do vetor linearizado. Sendo assim, até 150 ng de vetor linearizado foram tratados com 1 U da enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP – *Boehringer Mannheim*) a 37 °C por 10 minutos, seguidos de incubação a 65 °C por 15 minutos para inativar sua atividade.

Os sistemas de ligação foram feitos de modo que a razão molar entre vetor e inserto ficasse entre 1:3 e 1:10. Foram utilizadas as enzimas T4 DNA Ligase das empresas Promega, USB e Jena Biosciences, com os tampões de reação fornecidos pelos fabricantes. Os sistemas foram incubados a 16 °C por pelo menos 14 h antes de serem utilizados para transformação de bactérias.

4.10. Transformação de bactéria

O preparo de células de *E. coli* competentes pelo método de choque térmico foi realizado como descrito por Cohen (1972) (com modificações). As células da linhagem

de *E. coli* foram inoculadas em 5mL de meio LB e incubadas a 37°C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida 1mL do pré-inóculo foi adicionado a 30mL de meio LB sendo a cultura de células incubada a 37°C sob agitação (250rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspendido em 10 mL de CaCl₂ 100mM e submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores e novamente ressuspendidas em 1mL de 100mM de CaCl₂ e 15% glicerol. Aliquotas de 50 ou 100μL foram preparadas e estocadas a -80°C.

Para transformação, o sistema de ligação foi adicionado a uma alíquota de células competentes (até 10% do volume de células) adicionado e incubados no gelo por 30 minutos. O sistema de transformação foi submetido ao choque térmico a 37°C durante 5 minutos ou 42°C durante 90 segundos. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio LB ou SOC e as células incubadas por 1 hora a 37°C. Um volume de 50 a 200 μL de células foram semeadas em placas de Petri meio LB-Ágar com ampicilina (100 μg/mL), e X-gal e IPTG quando necessário.

5. Transformação de *S.cerevisiae* e seleção dos transformantes

A transformação de *S. cerevisiae* com o vetor de expressão foi realizada utilizando o método descrito por Cheng *et al.* (1992). A levedura foi crescida durante a noite em meio YPD a 30 °C sob agitação de 200 rpm até atingir a fase estacionária. Um volume de 200 µL de células foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 5 segundos e ressuspendidas em tampão “One Step”, ao qual foram adicionados de 50 a 1000 ng de plasmídeo, num volume final de 100 µL. As células foram incubadas a 45 °C por uma hora antes de serem semeadas em placas de meio mínimo-Ágar. As placas foram incubadas a 30 °C por 3 dias. Após o crescimento, os clones transformantes foram semeados em meio mínimo-Ágar CMC e incubados a 30 °C pelo mesmo período anterior. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada para remover as colônias e coradas com solução de Congo Red 0,1% (p/v) por 15 minutos. As placas foram descoradas com solução NaCl 1 M por 15 minutos e os clones transformantes foram detectados pela formação de um halo de hidrólise na área de crescimento da colônia, indicando a degradação do substrato.

6. Produção da enzima recombinante

Para análise de produção da enzima recombinante foram utilizados uma colônia de *S. cerevisiae* expressando o gene de interesse, juntamente com um clone controle, transformado com o vetor de expressão vazio. Para cada um dos clones foi preparado um pré-inóculo em 20 mL de meio mínimo crescido por 48 horas sob agitação (200 a 250 rpm) a 30 °C. Após a leitura da densidade celular (OD_{600}) do pré-inóculo, foi adicionado a 800 mL de meio mínimo uma concentração de células suficiente para que a OD_{600} inicial ficasse em torno de 0,2. O meio foi dividido em 4 frascos contendo 200 mL de meio cada, os quais foram incubados a 30 °C sob agitação por 96 horas. A cada 24 horas um frasco da cultura foi coletado para fazer a curva de produção de enzima. As células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos e cada uma dessas frações foram tratadas (como descrito abaixo) para detecção da atividade enzimática.

6.1. Diálise e liofilização do sobrenadante

Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido a diálise, para a remoção de sais e açúcares presentes no meio de cultura, em sacos de celulose (Dialysis tubing – Sigma) que retém proteínas maiores que 12.000 Da. A diálise foi feita contra água destilada a temperatura de 4 °C. Na primeira hora do processo a água foi trocada a cada 30 minutos e depois a cada hora durante 6 horas. Os sacos de diálise das amostras contendo a endoglicanase foram trocados a cada duas horas para evitar a dissolução dos mesmos devido a atividade da endoglicanase. Uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante dialisado foi utilizada para determinação da atividade enzimática. O restante desse sobrenadante foi concentrado por liofilização. O material liofilizado foi ressuspendido em água destilada em 1/10 do volume inicial e utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

6.2. Permeabilização da parede celular de *S. cerevisiae*

O sedimento de células obtido depois da centrifugação (item 6) foi lavado duas vezes com 50 mL de água destilada para remoção do meio de cultura, seguido de centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos. A seguir, as células foram ressuspendidas em 20 mL de água e transferidas para um falcon de 50 mL. Para facilitar a permeabilização da parede celular as células foram congeladas e em seguida descongeladas a 42 °C.

Adicionou-se 2 mL de pérolas de vidro (10% do volume de células) ao tubo e as células foram incubadas em um banho com gelo e água por 10 minutos. Em seguida, as células foram agitadas vigorosamente em vortex, para rompimento da parede celular por atrito. Foram feitos três tratamentos de 45 segundos com intervalos de 15 segundos no gelo. O extrato periplasmático foi separado por centrifugação a 6.000 x *g* por 10 minutos. Esse extrato foi estocado a 4 °C e utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

7. Detecção da atividade celulolítica e caracterização bioquímica

7.1. Ensaio enzimático

A atividade de endoglicanase 2 foi determinada pelo ensaio colorimétrico de detecção açúcares redutores geradas pela hidrólise do substrato carboximetilcelulose (CMC low viscosity – Sigma). Para a detecção de açúcares redutores em solução foi utilizado o reagente DNS - ácido dinitrosalicílico - (Miller, 1959). Os ensaios de atividade de EGL2 foram feitos nas seguintes condições: 250 μ L de CMC 1 % (p/v), 50 μ L de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 5,0 e 200 μ L de amostra contendo a enzima. A mistura foi incubada a 50 °C por 1 hora e em seguida adicionou-se 500 μ L de reagente DNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e após o resfriamento a absorbância foi lida a 550 nm no espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III. As leituras de absorbância foram convertidas em quantidade de equivalente de glicose, por meio da curva de calibração obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações de glicose (0 a 30 μ g) com o reagente DNS (Figura 7). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco de leitura no aparelho a solução contendo apenas o tampão de reação; e como controle da concentração inicial de açúcares redutores, as amostras contendo a enzima foram fervidas por 5 minutos antes de serem adicionadas à reação com CMC. Para verificar se a EGL2 não apresentava atividade após a desnaturação foram feitos ensaios nos quais o DNS era adicionado à reação antes da amostra contendo a enzima. Uma unidade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μ mol de equivalente de glicose por minuto de reação.

7.2. Atividade enzimática em diferentes pH

O efeito da variação do pH na atividade enzimática foi avaliado realizando-se os ensaios utilizando-se 50 μ L de diferentes tampões (Tabela 5) em diferentes pH na temperatura de 50 °C por 1 hora.

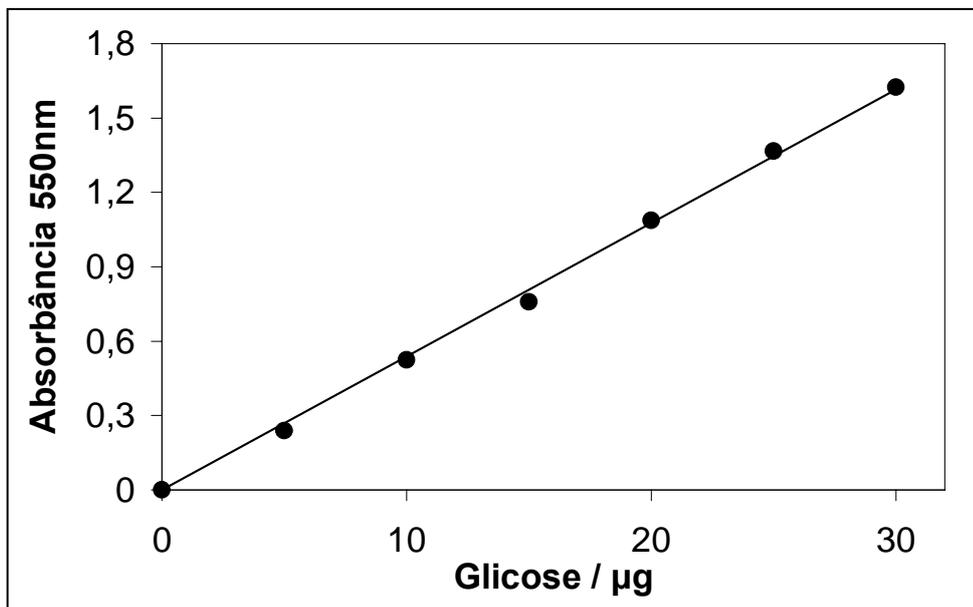


Figura 7. Curva padrão de glicose utilizada para se medir a quantidade de açúcares redutores nos ensaios enzimáticos. A equação da curva é $y = 0,0538x$ de $R^2 = 0,998$.

Tabela 5. Composição dos tampões utilizados no ensaio de atividade em diferentes pH

<i>Tampão</i>	<i>pH(s)</i>
Citrato de Sódio 0,5 M	2,0
Citrato de Sódio 0,1 M	3,0
Acetato de Sódio 0,4 M	4,0, 5,0 e 6,0
MOPS 0,4 M	6,0 e 7,0
Tris-HCl 0,4 M	8,0
Tris-Glicina 0,4 M	9,0

7.3. Atividade enzimática em diferentes temperaturas e estabilidade térmica

Os ensaios para verificação da influência da temperatura sobre a atividade enzimática foram realizadas nas temperaturas de 0, 25, 40, 50, 60, 70 e 80 °C por 1 hora em pH 5,0. Para o ensaio de estabilidade térmica alíquotas da enzima foram pré-incubadas nas temperaturas de 50 e 60 °C, em pH 5,0, durante 0, 1, 2, 4 e 6 horas. A atividade remanescente da enzima foi detectada fazendo-se o ensaio na mesma temperatura de pré-incubação por 1 hora com 250 µL de CMC 1% (p/v).

7.4. Atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato

Foram realizados dois ensaios independentes. Em um deles, foram utilizadas as concentrações de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 e 15 mg/mL de CMC. No outro, as concentrações utilizadas foram de 0, 0,50, 0,62, 0,83, 1,25, 2,50 e 5,00 mg/mL de CMC. Os dados obtidos foram utilizados para fazer a curva de velocidade de reação (produto formado por unidade de tempo) por concentração de substrato.

7.5. Atividade enzimática sobre diferentes substratos

A atividade da endoglicanase 2 recombinante foi testada utilizando-se os substratos celulose microcristalina (Sigmacell tipo 20 - Sigma), papel de filtro (Whatman N° 2), MUC (4-metilumbeliferil-β-D-celobiosídeo) e pNPC (p-nitrofenil-β-D-celobiosídeo). Os ensaios com sigmacell e papel de filtro foram feitos medindo-se a quantidade de açúcares redutores produzidos, nas mesmas condições de reação dos ensaios realizados com CMC, que foi substituído por 250 µL de solução sigmacell 1% (p/v) e por uma tira de 6 cm X 0,5cm de papel de filtro, respectivamente. No ensaio com sigmacell, os tubos foram agitados a cada 15 minutos, para manter o substrato em suspensão.

O ensaio com pNPC foi realizado adicionando-se 50 µL de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 5,0, 200 µL de água e 125 µL de amostra contendo atividade de endoglicanase a 125 µL de pNPC 2 mM. O sistema foi incubado por 1 hora a 40 °C e em seguida foram adicionados 500 µL de acetato de sódio 1 M pH 9,0, para parar a reação. O ensaio com MUC foi feito com 250 µL de MUC 2 mM, 50 µL de tampão acetato de sódio 0,5 M e 200 µL de amostra contendo a enzima recombinante e incubados a 40 °C por uma hora. A atividade enzimática foi detectada pela emissão de fluorescência ao incidir luz ultravioleta sobre os tubos contendo a reação.

8. Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

8.1. Condições da eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo descrito em Silva-Pereira (2003). As amostras do extrato periplasmático contendo a enzima recombinante foram concentrados por centrifugação e evaporação a vácuo e ressuspendidas em tampão de amostra de proteína. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel separador de 15% contendo 0,1% de CMC (p/v) e concentrador de 4%. A eletroforese foi realizada por 2 horas em voltagem de 80 a 120 V. Como marcador de massa molecular para proteínas foi utilizado o “BenchMark Protein Ladder” (Invitrogen).

8.2. Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma)

Após o processo de eletroforese o gel foi tratado para revelar a atividade enzimática conforme descrito por Takenaka *et al.* (1999) (com modificações). O gel foi retirado do sistema de eletroforese e lavado três vezes em solução de Triton X-100 1% durante 20 minutos para remover o SDS. Em seguida procedeu-se a lavagem do gel com água destilada antes de incubá-lo em tampão acetato de sódio 50 mM, a 37 °C por 18 horas. A atividade enzimática foi detectada corando o gel com solução de Congo Red 0,1% (p/v) durante 1 hora, seguida de lavagem com cloreto de sódio 1 M. Após a detecção da região de degradação do substrato no gel foram adicionados 200 µL de HCl 0,2 M à solução de NaCl para fixação da cor, permitindo um maior contraste para visualização da atividade enzimática em gel.

8.3. Coloração de gel de poliacrilamida com prata

Um gel preparado nas mesmas condições descritas anteriormente juntamente com o zimograma foi utilizado para visualização do perfil protéico por coloração com prata. Para tal, foi utilizado o kit “Silver Staining Kit Protein Silver One™” (Amersham Biosciences) conforme especificações do fabricante.

Resultados

1. Clonagem dos genes *egl2* e *egl4* de *Hemicella grisea* var. *thermoidea*

1.1. Obtenção dos cDNAs correspondentes às endoglicanases 2 e 4

Foi extraído o RNA total de *H. grisea* var. *thermoidea* crescido em meio contendo bagaço de cana explodido a vapor (BCA) como única fonte de carbono a fim de induzir a produção de celulases pelo fungo. Estudos realizados por De-Paula *et al.* (1999, 2003) mostraram que substratos lignocelulósicos complexos, como o BCA, são bons indutores de celulases em *H. grisea* var. *thermoidea*, sendo a enzima celobiohidrolase 1.2 a proteína mais secretada pelo fungo quando crescido nessa fonte de carbono. O RNA total obtido foi utilizado em uma reação de RT-PCR para a obtenção dos cDNA correspondentes aos genes de endoglicanase 2 (EGL2) e endoglicanase 4 (EGL4). Os iniciadores específicos utilizados na PCR (E2SF/E2SR e E4SF/E4SR) (Tabela 4), foram desenhados com base na sequência dos genes *egl2* (número no Gene Bank D84470) e *egl4* (AB003108) de *H. grisea* var. *thermoidea* descritas por Takashima *et al.* (1997, 1999a). Os produtos amplificados por esses iniciadores inserem sítios de *Hind* III nas extremidades dos fragmentos para permitir a clonagem em vetor de expressão em *S. cerevisiae*.

Para se determinar a melhor temperatura de anelamento para os oligonucleotídeos foram realizadas PCR em diferentes temperaturas de anelamento, com diferentes concentrações de magnésio para a enzima *Taq* DNA polimerase (Cenbiot). Foram escolhidas as temperaturas de 50, 52,8, 56 e 60 °C e as concentrações de 1,5, 2,0 e 3,0 mM de cloreto de magnésio para as reações. Para todas as reações foram utilizados 2 µL da reação de transcrição reversa. A reação com o par de oligonucleotídeos E2SR/E2SR gerou um fragmento de aproximadamente 1.200 pb nas condições de 2,5 e 3,0 mM de magnésio em todas as temperaturas testadas, enquanto que com o par E4SF/E4SR houve a amplificação um fragmento de aproximadamente 700 pb, com baixo rendimento, em 2,5 mM de magnésio na temperatura de anelamento de 50 °C (Figura 8). Os fragmentos amplificados correspondem aos tamanhos esperados para os cDNAs de *egl2* (1164 pb) e *egl4* (682 pb). As reações controle sem cada um dos iniciadores e sem o molde foram feitas e não amplificaram nenhum fragmento (dado não mostrado).

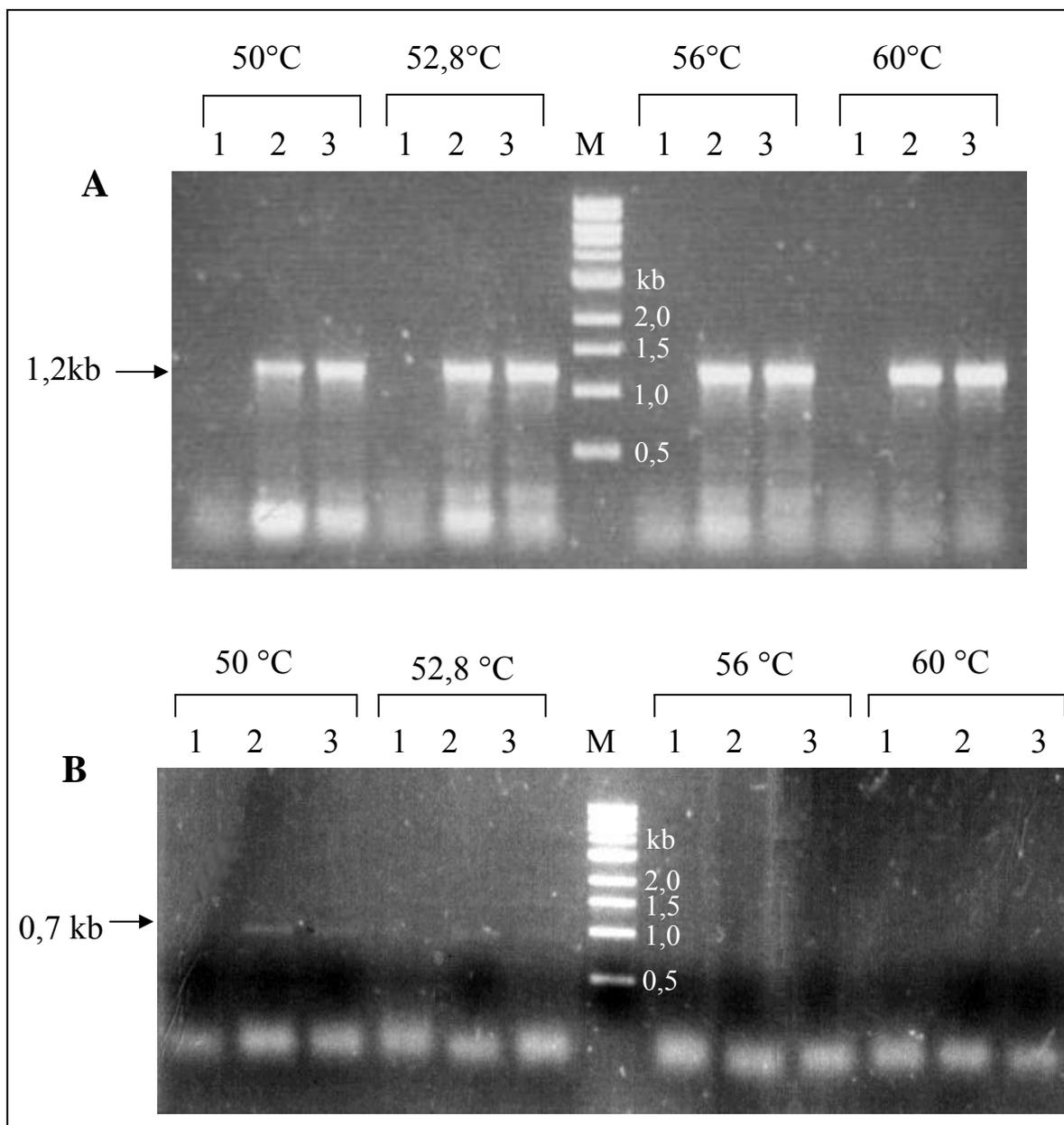


Figura 8. Análise eletroforética dos produtos das reações de RT-PCR. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio das (A) reações de RT-PCR com os oligonucleotídeos E2SF/E2SR (B) e E4SF/E4SR. Para cada uma das diferentes temperaturas de anelamento utilizadas (especificadas acima) foram feitas reações com 1,5 mM (1), 2,0 mM (2) e 3,0 mM de magnésio (3). M- marcador 1 kb ladder Biolabs.

Com a finalidade de se obter quantidade suficiente desses amplicons para ligação no vetor pGEM-T easy foram feitas reações de PCR em maior número utilizando-se as temperaturas de anelamento de 60 °C para o par de iniciadores E2SF/E2SR e de 50 °C para o par E4SF/E4SR (Figura 9). Para amplificação do fragmento de 1200 pb, correspondente ao cDNA da *egl2*, foi utilizada a mesma concentração de cDNA das reações anteriores (2 µL da reação de transcrição reversa), enquanto que para o fragmento de 700 pb, correspondente ao cDNA da *egl4*, foi utilizado 1 µL da reação de PCR anterior, devido ao baixo rendimento obtido a partir da reação de transcrição reversa. A enzima utilizada para esses procedimentos foi a Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Nesse procedimento, a reação com os iniciadores E4SF/E4SR geraram produtos inespecíficos (Figura 9 linha 2). Portanto, o fragmento de 700 pb foi purificado do gel de agarose e os cDNAs da *egl2* e *egl4* foram ligados ao plasmídeo pGEM-T easy. A digestão dos plasmídios pGEGL2 e pGEGL4 com a enzima *Hind* III liberou fragmentos de 1,2 e 0,7 kb, correspondente aos cDNAs *egl2* e *egl4*, respectivamente (Figura 10).

1.2. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Os fragmentos clonados nos plasmídios pGEGL2 e pGEGL4 foram submetidos ao seqüenciamento e as seqüências resultantes foram submetidas ao programa BLAST, comparando com as seqüências presentes no banco de dados GenBank. O cDNA *egl2* apresentou identidade de 97% com a seqüência do gene da endoglicanase 2 de *H. grisea* descrito por Takashima *et al.* (1997). As seqüências geradas pela reação de seqüenciamento do vetor pGEG4 apresentaram baixa qualidade e não puderam ser usadas para busca no banco de dados, não sendo confirmada a obtenção do cDNA *egl4*. Considerando-se esse fato, os experimentos seguintes foram realizados apenas com o cDNA da endoglicanase 2 de *H. grisea* var. *thermoidea*.

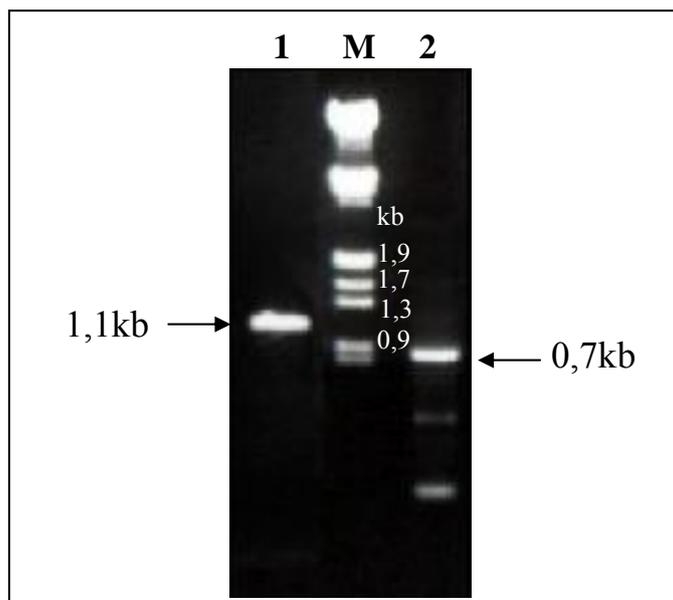


Figura 9. Análise eletroforética da reação de RT-PCR utilizando a enzima *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen). Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo indicando a amplificação do cDNA de (1) *egl2* e (2) *egl4*. M- DNA do fago λ digerido com *EcoR* I e *Hind* III.

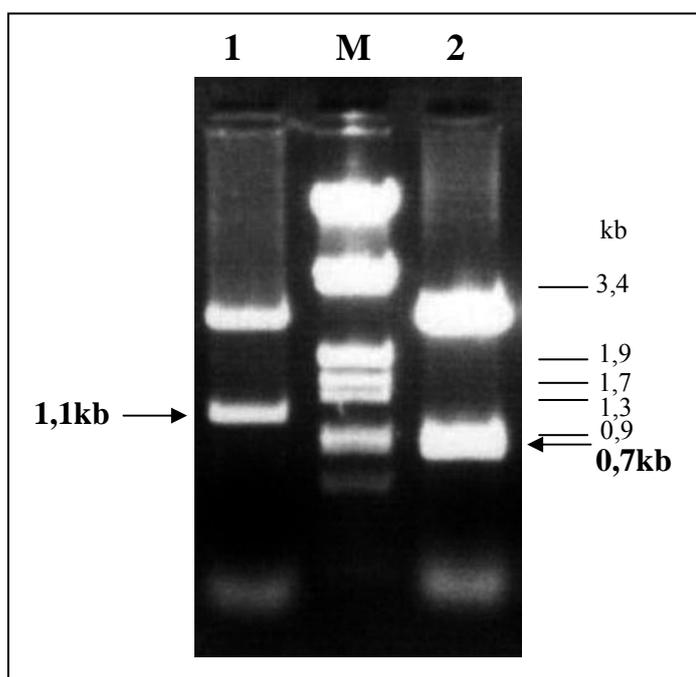


Figura 10. Perfil de restrição dos plasmídios pGEGL2 e pGEGL4. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo: Plasmídios pGEGL2 (1) e pGEGL4 (2) digeridos com a enzima *Hind* III. M- DNA do fago λ digerido com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Hind* III.

1.3. Clonagem do cDNA *egl2* no vetor de expressão pAAH5 de *S. cerevisiae*

Para expressão do cDNA *egl2* em *S. cerevisiae* foi utilizado o vetor pAAH5 (Ameerer, 1983; Kimura *et al.*, 1987)). Esse plasmídio foi obtido digerindo-se o plasmídio pAA3 com a enzima de restrição *Hind* III. O plasmídio pAA3 (gentilmente cedido pela Dra. Ana Clara G. Schenberg) contém um fragmento de 2,3 kb correspondente ao gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* clonado no vetor pAAH5 entre as regiões promotora e terminadora do gene *ADH1* (álcool desidrogenase 1). O plasmídio pAA3 foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III e o fragmento de 12,6 kb, correspondente ao vetor pAAH5, foi purificado, defosforilado e ligado ao fragmento de 1,1 kb, contendo o cDNA *egl2*, obtido da digestão do plasmídio pG EGL2 com a enzima *Hind* III (Figura 11). Parte do fragmento correspondente ao vetor pAAH5 foi religado e transformado em bactéria para preparação em grande quantidade desse vetor.

O sistema de ligação entre o vetor pAAH5 e o cDNA de *egl2* foi transformado em *E. coli* DH5- α e foram obtidos seis clones recombinantes. Para determinar a orientação de clonagem do inserto nos diferentes clones foi feito o perfil de restrição do plasmídio com as enzimas *Bam*HI e *Pvu* II para as duas orientações possíveis (Figura 12 A e B). As construções apresentando a orientação correta do inserto em relação ao promotor produziram fragmentos de 1,9 1,2 e 1,7 kb, enquanto que os plasmídios com o inserto na orientação contrária apresentaram fragmentos de aproximadamente 2,2 0,9 e 1,7 kb (Figura 12 C). Dois clones confirmaram o cDNA *egl2* na orientação correta. O vetor de expressão para o cDNA de *egl2* de *H. grisea* var. *thermoidea* foi denominado de pA EGL2 (Figura 13).

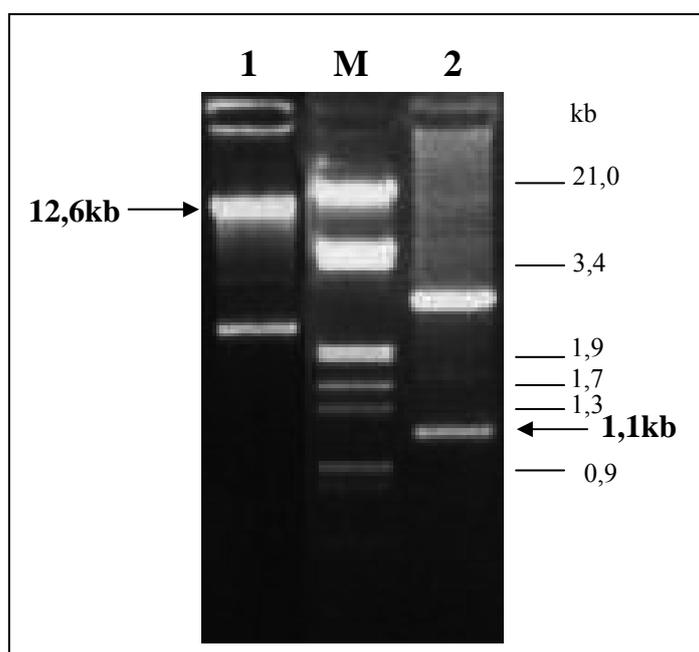


Figura 11. Análise eletroforética do perfil de restrição dos plasmídios pAA3 e pG EGL2. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio: plasmídios pAA3 (1) e pG EGL2 (2) digeridos com a enzima *Hind* III. M- DNA do fago λ digerido com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Hind* III.

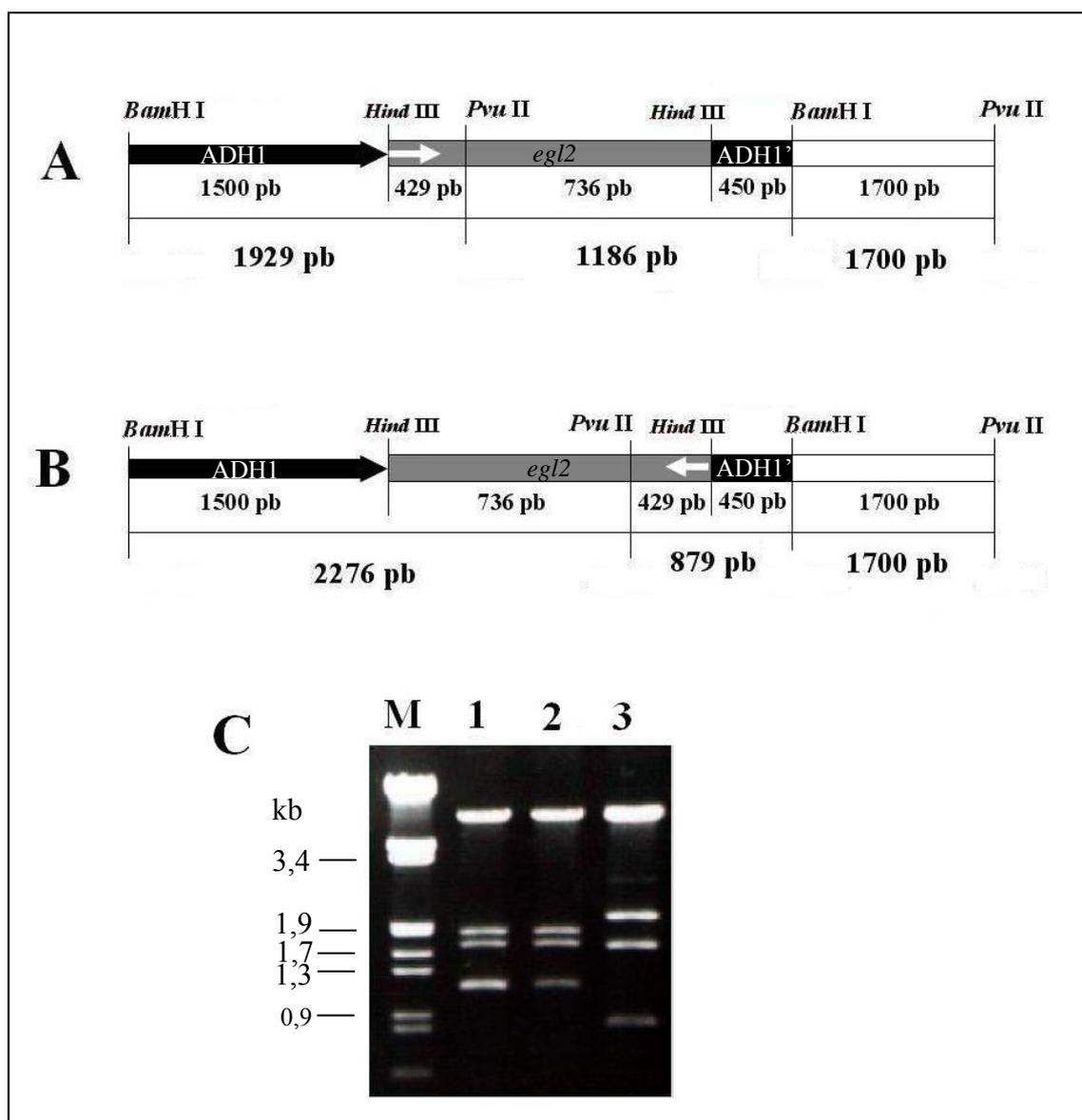


Figura 12. Clonagem do cDNA *egl2* no plasmídio de expressão pAAH5. A e B - Representação esquemática da análise do perfil de restrição com *Bam* HI e *Pvu* II para determinação da orientação do cDNA do gene *egl2* em relação ao promotor ADH1, no vetor de expressão pAAH5. Estão mostrados os tamanhos dos fragmentos esperados para a orientação correta para expressão (A) e contrária (B), os sítios das enzimas de restrição *Bam*H I, *Pvu* II e *Hind* III e as regiões correspondentes ao vetor (promotor e terminador ADH1) e o inserto *egl2*. C-Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio: Clones (1), (2) e (3) digeridos com *Pvu* II e *Bam*H I. M-DNA do fago λ digerido com enzimas *Eco*R I e *Hind* III.

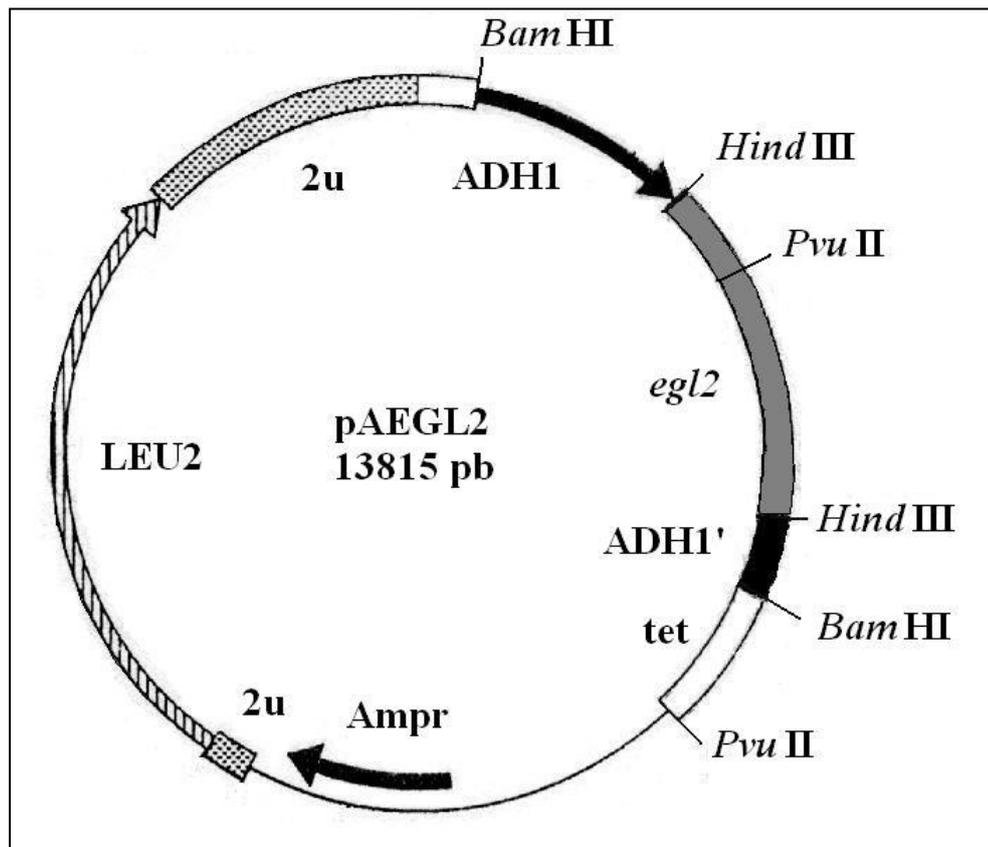


Figura 13. Representação esquemática do vetor de expressão pAEG2

2. Expressão de endoglicanase 2 em *Saccharomyces cerevisiae*

2.1. Transformação de levedura e detecção da atividade enzimática

Os vetores pAEG2 e pAAH5 foram utilizados para transformar a linhagem MFL de *S. cerevisiae*. Os transformantes capazes de crescer em meio mínimo-ágar sem leucina por receberem a complementação auxotrófica contida no vetor (LEU2) foram transferidos para placas de meio mínimo-ágar-CMC. Os transformantes expressando a enzima recombinante foram detectados pela formação de um halo de hidrólise de CMC em placa, revelado pela coloração com Congo red 0,1% (p/v), após 48 horas de crescimento dos transformantes a 30 °C. Dois transformantes que apresentaram atividade (YAEG2-1 e YAEG2-2) foram crescidos em uma placa juntamente com um transformante controle (YAAH5), que contém o vetor pAAH5 sem inserto (Figura 14). Esse ensaio mostra que a atividade celulolítica produzida pela *S. cerevisiae* transformada é devido à expressão do gene *egl2* e que a enzima é produzida de forma funcional.



Figura 14. Ensaio de hidrólise de CMC em placa. Colônias de *S. cerevisiae* transformadas com os vetores pAEG2 (1 e 2) e pAAH5 (3) crescidas em meio mínimo-agar-CMC. A placa foi corada com Congo Red 0,1%. O halo de degradação compreende a região amarelada e a região escura interna.

2.2. Cinética de produção da endoglicanase recombinante

O clone YEGL2-2 foi crescido em meio líquido com o objetivo de se determinar o melhor tempo de produção enzimática, além de se obter quantidade suficiente de enzima para posterior caracterização bioquímica. Foram retiradas amostras a cada 24 horas de cultivo. As culturas controle (YAAH5) e YEGL2-2 apresentaram o mesmo perfil de crescimento (Figura 15 A), sendo que a densidade celular da cultura controle foi maior nos tempos de 72 e 96 horas. A produção enzimática do transformante YEGL2-2 chegou a 0,705 U/L de cultura no tempo de 96 horas. Ensaio feitos com o sobrenadante da cultura e com o extrato periplasmático da cultura revelaram que 84% da atividade enzimática foi encontrada no extrato periplasmático. A atividade de endoglicanase secretada foi detectada somente após concentração do meio de cultura em 10X, sendo de 0,125 U/L (Figura 15 B).

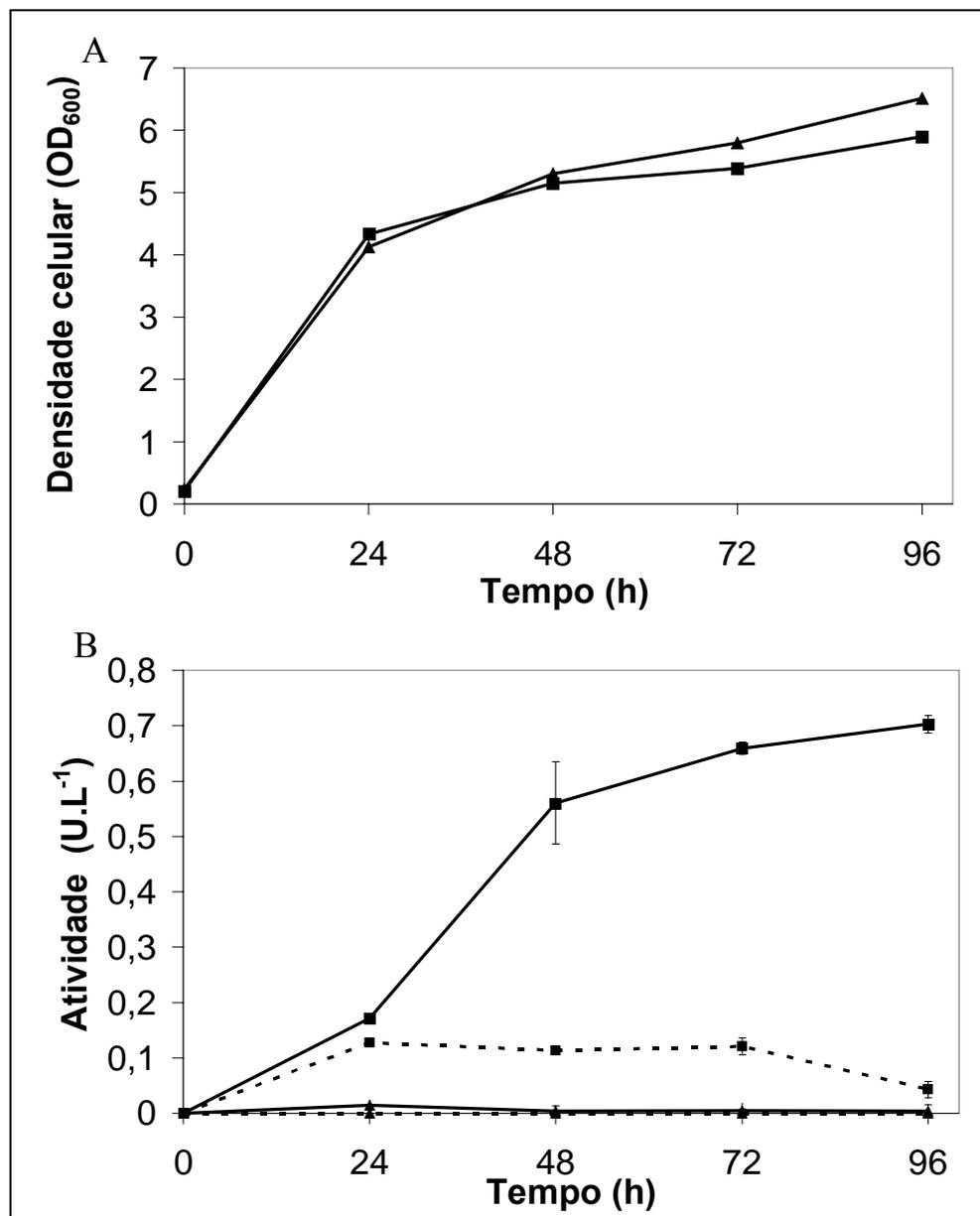


Figura 15. Curva de crescimento celular (A) e produção da atividade de endoglicanase (B) das linhagens YAEGL2-2 (■) e YAAH5 (▲). Em (B): linha cheia – extrato periplasmático; linha pontilhada – sobrenadante; as reações foram feitas em triplicata e o desvio padrão está mostrado no gráfico.

3. Caracterização bioquímica da EGL2 recombinante

Para a caracterização bioquímica da endoglicanase recombinante foi utilizado o extrato periplasmático concentrado obtido a partir de 200 mL de cultura da linhagem YAEGL2-2 crescida por 96 horas em meio mínimo.

3.1. Atividade enzimática em diferentes pH

A EGL2 expressa por *S. cerevisiae* apresentou maior atividade em pH 5,0, mantendo cerca de 88% da atividade nos pHs 4,0 e 6,0 em tampão acetato (Figura 16). Em um ensaio realizado em tampão MOPS pH 6,0 a enzima apresentou menor atividade (70% dado não mostrado) que em tampão acetato no mesmo pH, indicando que a composição do tampão afeta a atividade enzimática.

3.2. Atividade enzimática em diferentes temperaturas e estabilidade térmica

O ensaio para determinar a faixa ótima de temperatura para a atividade de EGL2 foi feito em pH 5,0. Das temperaturas escolhidas para os ensaios a enzima apresentou alta atividade na faixa de 50 a 60 °C, sendo que, a melhor atividade foi a 50 °C (Figura 17). Na temperatura de incubação de 70 °C a enzima apresentou uma redução de 36% da atividade quando comparada à atividade em 50 °C, sendo que esse valor diminuiu para 21% a 80° C.

Apesar da baixa diferença na atividade de EGL2 a 50 e 60 °C, a estabilidade dessa enzima nessas temperaturas apresentou grande variação. EGL2 mantém cerca de 80% de sua atividade após pré-incubação por 6 horas a 50 °C em pH 5,0; enquanto que a 60 °C a enzima mantém 61% da sua atividade após 1 hora de pré-incubação, valor este que cai para 36% após 6 horas (Figura 18). Os ensaios enzimáticos foram realizados por 1 hora nas temperaturas selecionadas após o período de pré-incubação.

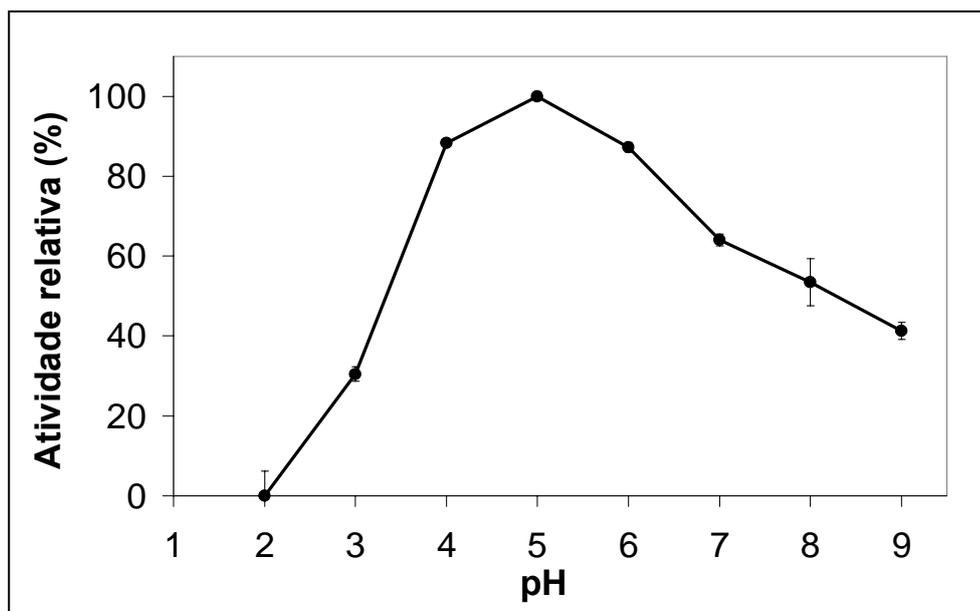


Figura 16. Efeito da variação de pH na atividade de EGL2 recombinante. Os ensaios foram realizados em triplicata e o desvio padrão para cada ponto foi menor que 10%.

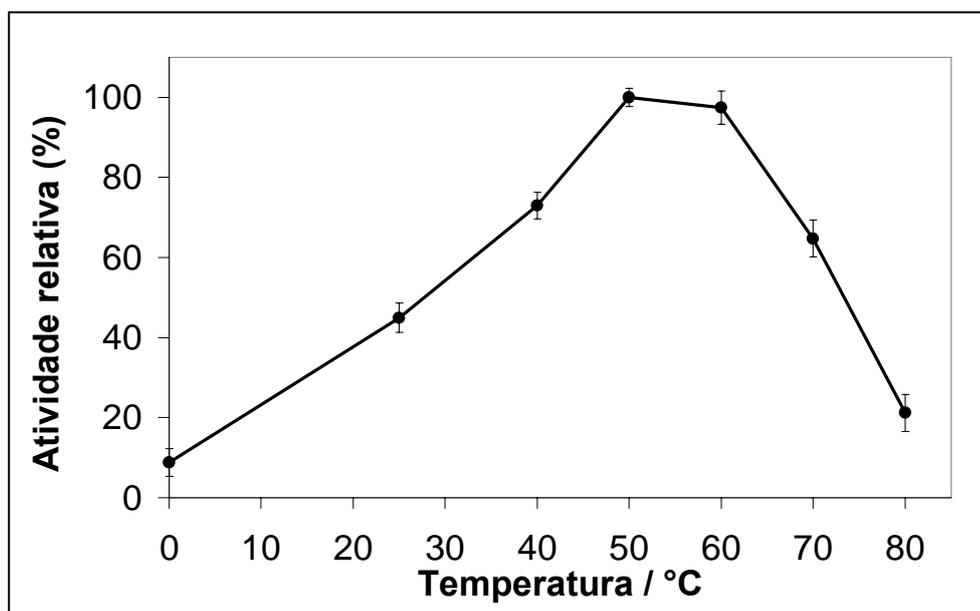


Figura 17. Efeito da variação de temperatura na atividade de EGL2. Os ensaios para as diferentes temperaturas foram realizados em triplicata e o desvio padrão está mostrado nos gráficos.

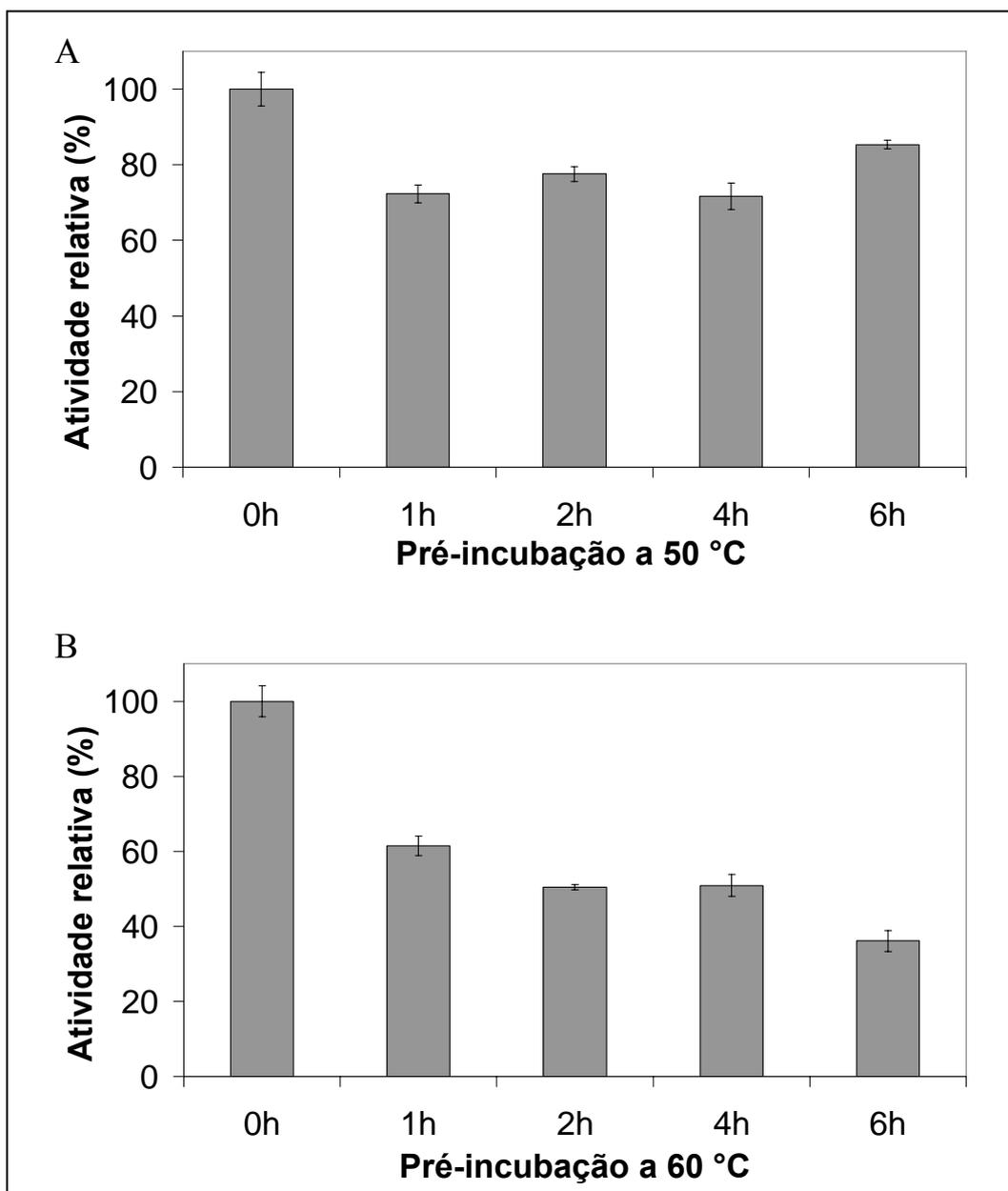


Figura 18. Termoestabilidade de EGL2 recombinante a 50 °C (A) e a 60 °C (B). Os ensaios para as diferentes temperaturas foram realizados em triplicata e o desvio padrão para cada ponto foi menor que 5%.

3.3. Atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato

Para a obtenção da cinética de concentração de substrato pelo tempo foram realizados ensaios com a endoglicanase recombinante com concentrações de CMC variando de 0 a 15 mg/mL de substrato. A enzima apresentou inibição em concentrações de substrato acima de 12,5 mg/mL (Figura 19). A produção máxima de açúcares redutores obtida com as concentrações utilizadas foi de 0,14 µg/min. O gráfico do duplo-recíproco pode ser feito retirando-se os pontos cujos valores de concentração causaram inibição na atividade enzimática (Marangoni, 2003). A curva do duplo-recíproco (Figura 20) foi obtida excluindo-se os pontos referentes às concentrações de CMC acima de 7,5 mg/mL e a equação que a representa é $y = 22,865x + 4,9166$, com $R^2 = 0,9633$ (devido também ao baixo número de pontos). Dessa forma foi possível obter valores de K_m de 4,65 mg/mL (mg de CMC por mL de reação) e V_{max} de 0,203 µg/min (µg de açúcares redutores por minuto de reação), que refletem a atividade da enzima sem o efeito inibitório de altas concentrações de substrato.

3.4. Atividade enzimática sobre diferentes substratos

A atividade de EGL2 foi testada sobre celulose microcristalina e papel de filtro e comparada com a atividade em CMC. A enzima apresentou alta atividade sobre papel de filtro e atividade significativa (20% em relação à atividade em CMC) sobre celulose microcristalina (Figura 21).

Os ensaios com os substratos pNPC e MUC foram apenas qualitativos, com a finalidade de se detectar a atividade de EGL2 nesses substratos. Esses ensaios foram realizados também com o extrato periplasmático do transformante YAAH5 como controle. Não foi detectada atividade de EGL2 sobre pNPC, o que coincide com os dados de Takashima *et al.* (1997). A enzima apresentou atividade sobre MUC, que foi visualizada pela emissão de fluorescência quando a reação foi exposta a luz ultravioleta (Figura 22).

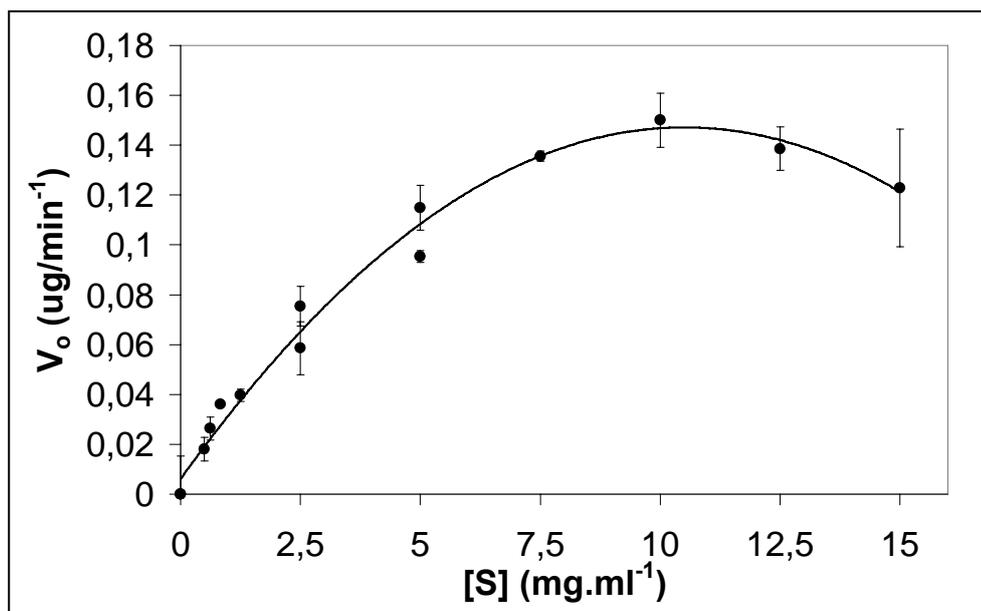


Figura 19. Curva da cinética enzimática da endoglicanase recombinante sobre CMC. Os pontos foram obtidos a partir de dois ensaios diferentes feitos em triplicata e o erro padrão dos pontos está mostrado no gráfico.

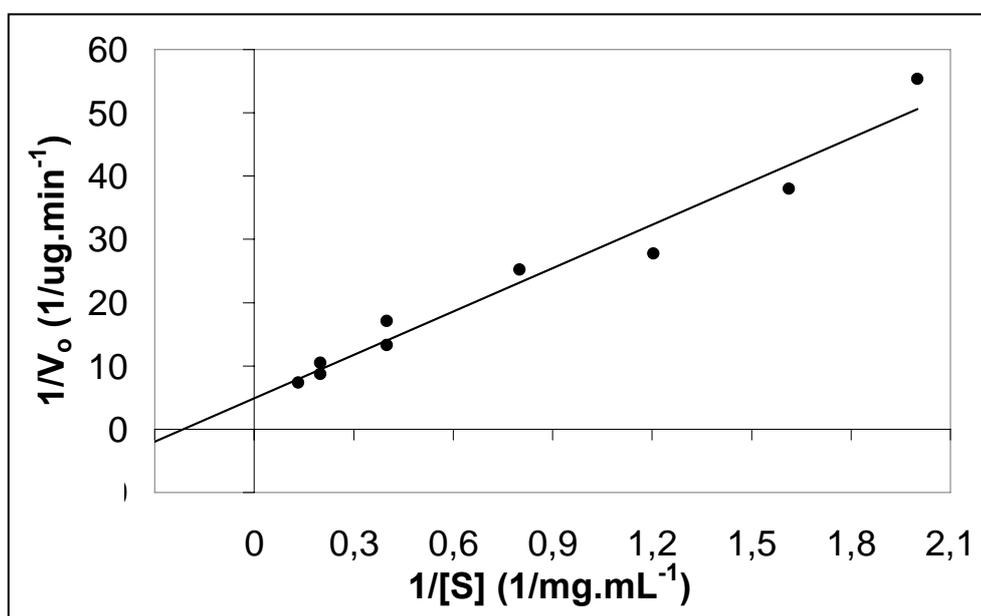


Figura 20. Gráfico de duplo-recíproco para endoglicanase 2 recombinante.

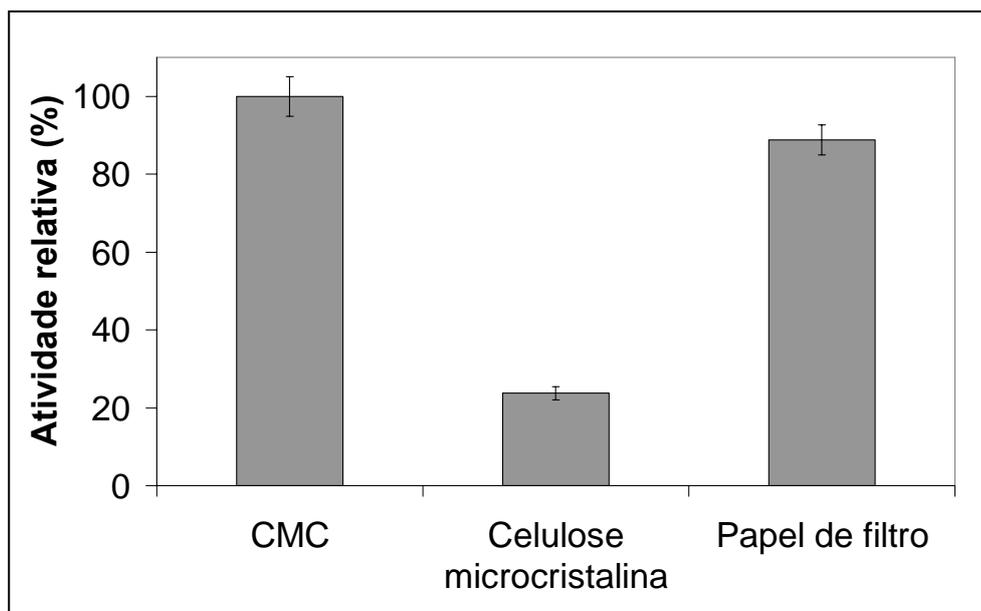


Figura 21. Atividade de EGL2 sobre celulose microcristalina e papel de filtro comparada com a atividade em CMC. Os ensaios foram realizados em triplicata e o desvio padrão está mostrado no gráfico.

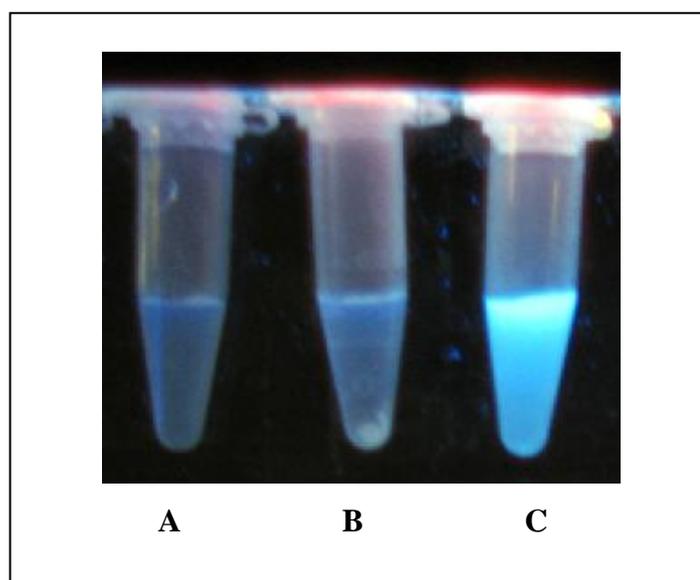


Figura 22. Ensaio de atividade sobre MUC. Reações contendo extrato periplasmático de YAAH5 (A) YAEGL2-2 fervido (B) e YAEGL2-2 não fervido (C).

3.5. Determinação da massa molecular da EGL2 recombinante

O extrato periplasmático da linhagem YAEGL2-2 foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida e comparado com o perfil do extrato periplasmático da linhagem controle a fim de se detectar a endoglicanase recombinante e determinar sua massa molecular. A partir do perfil de migração por eletroforese em gel das proteínas desses extratos não foi possível identificar uma banda correspondente à endoglicanase recombinante (Figura 23).

Para confirmar a presença da enzima recombinante foi feito o zimograma dos extratos periplasmático as das linhagens controle e YAEGL2-2 (Figura 24). A massa molecular da EGL2 foi estimada pela comparação da migração das amostras do gel corado com prata com o zimograma. O zimograma apresentou um halo de hidrólise na altura correspondente à uma proteína de aproximadamente 55 kDa, valor descrito por Takashima *et al.* (1997) para a proteína glicosilada. Não houve a formação de uma área definida de degradação de CMC e sim uma região de arraste ao longo da área de migração da endoglicanase (Figura 24 – linha 4). Este efeito se deve ao fato da amostra não haver sido fervida antes da aplicação no gel. A etapa de fervura para preparação das amostras para o gel desnaturante levava a uma inativação irreversível da atividade de endoglicanase (Figura 24 – linha 2).

O perfil protéico do sobrenadante da cultura da linhagem YAEGL2-2 também foi submetido à análise eletroforética e zimograma (Figura 25). Os perfis de migração dos sobrenadantes obtidos da cultura das linhagens YAEGL2-2 e YAAH5 não apresentaram diferença (Figura 25-A). O zimograma da amostra YAEGL2-2 apresentou duas áreas de degradação, uma correspondente banda de 55 kDa e outra de aproximadamente 42 kDa. O tamanho de aproximadamente 42 kDa corresponde ao tamanho da proteína não glicosilada (Takashima *et al.*, 1997).

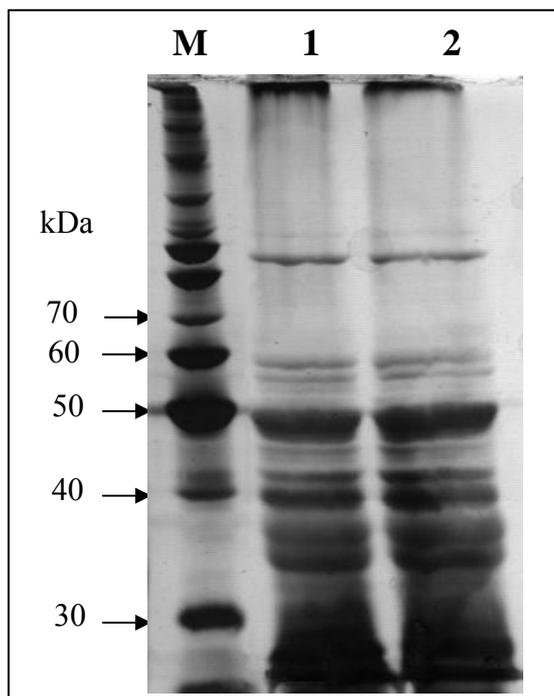


Figura 23. Perfil eletroforético das proteínas dos extratos periplasmáticos das linhagens YAEGL2-2 (1) e YAAH5 (2). M- marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen).

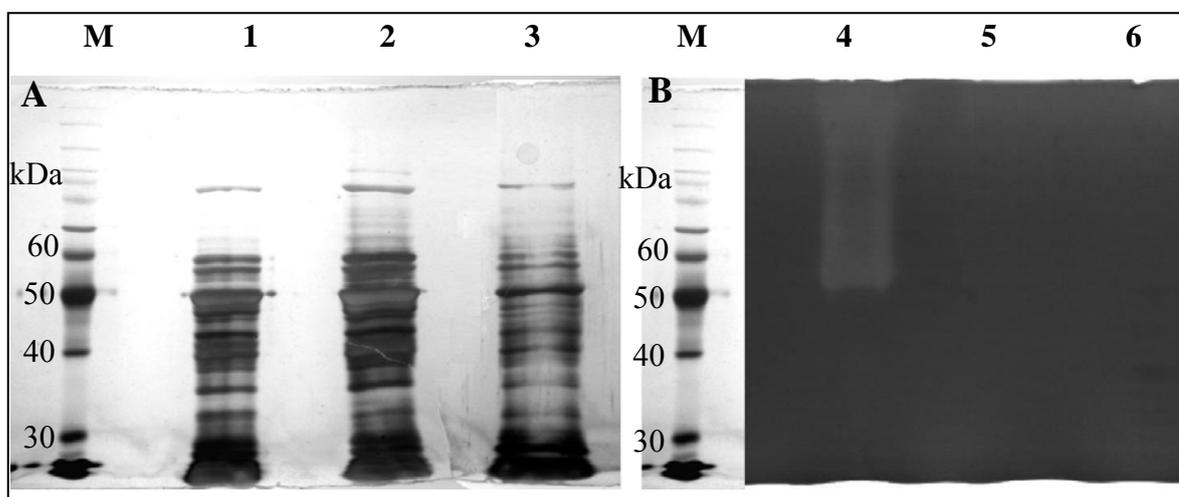


Figura 24. Análise eletroforética e zimograma dos extratos periplasmáticos. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 15 % corado com prata (A) e zimograma dos extratos periplasmáticos da linhagem YAEGL2-2 não fervido (1 e 4), fervido (2 e 5) da linhagem controle YAAH5 (3 e 6). (M - BenchMark Protein Ladder Invitrogen).

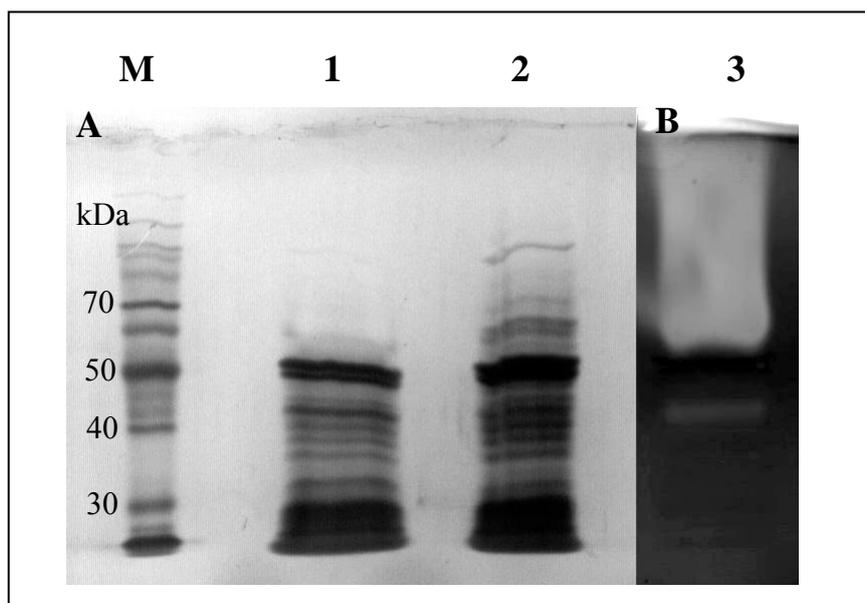


Figura 25. Análise eletroforética e zimograma do meio de cultura concentrado. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 15 % corado com prata (A) e zimograma (B) do sobrenadante da cultura concentrado das linhagens YAEGL2-2 não fervido (1 e 3) e YAAH5 (2).

Discussão

A produção de etanol a partir de material lignocelulósico passou a ser pesquisada devido à abundância e o imenso potencial para conversão desse material a açúcares fermentescíveis (Hari Krishna *et al.*, 2001). O estudo de celulases é de grande interesse devido à grande quantidade de celulose presente nos rejeitos lignocelulósicos de origem agrícola e industrial. *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo interessante para o estudo de caracterização de celulases pois, além da sua genética molecular bem estabelecida, não é capaz de degradar celulose. A maioria das linhagens de *S. cerevisiae* produzem principalmente exo-1,3- β -glicanases e endo-1,2- β -glicanases (van Rensburg *et al.*, 1996), sendo também detectadas atividades de endo-1,3- β -glicanases (Hien & Fleet, 1983). Essas enzimas, porém, não apresentam atividade sobre celulose ou derivados que consistem de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Wong & Maclachlan, 1979; van Rensburg *et al.*, 1996). Além disso, é um dos organismos que podem ser usados no processo de sacarificação e fermentação simultâneas expressando celulases heterólogas.

A caracterização de endoglicanases é importante pois essa enzima é necessária para degradação da celulose, uma vez que diminui rapidamente o grau de polimerização do substrato, gerando celo-oligossacarídeos que são alvos das celobiohidrolases e β -glicosidases (Teeri, 1997). Além disso podem ser estudadas para utilização na separação de hemicelulose e celulose da lignina, uma vez que algumas endoglicanases apresentam atividade em xiloglucanas (Suda & Giorgini, 2003; Lynd *et al.*, 2002).

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* produz endoglicanases que possuem CBD (EGL2 e EGL3) e endoglicanases que possuem apenas o domínio catalítico (EGL1 e EGL4). A EGL 2 é mais termoestável que EGL3 e apresenta atividade sobre celulose microcristalina, que é praticamente ausente nas outras endoglicanases. Em relação às celulases sem CBD, EGL4 é mais termoestável que EGL1. Possuem alta atividade sobre CMC, mas EGL4 é a única dentre as endoglicanases que é mais ativa em pH 6,0 (Takashima *et al.*, 1996a, 1997, 1999a). Ainda não é entendido o fato de um mesmo microrganismo apresentar diferentes formas de endoglicanases (cinco em *T. reesei* e quatro em *H. grisea* var. *thermoidea*), mas acredita-se que diferentes endoglicanases consigam apresentar melhor desempenho em gerar extremidades redutoras para as celobiohidrolases (Lynd *et al.*, 2002).

Dessa forma, foram desenhados e sintetizados os pares de iniciadores E2SF/E2SR e E4SF/E4SR para obtenção, por RT-PCR, os cDNA correspondentes aos genes *egl2* e *egl4* de *H. grisea* var. *thermoidea*, respectivamente. O fragmento de 0,7 kb obtido com o par de iniciadores E4SF/E4SF não pode ser comparado com as seqüências depositadas em bancos de dados devido à baixa qualidade da seqüência obtida. O iniciador E4SF possui uma porcentagem baixa de nucleotídeos CG (33%), além de uma região que contém oito adenosinas em seqüência, fazendo com que este iniciador apresente baixa especificidade de anelamento na região desejada. Tal fato foi confirmado pela baixa eficiência de síntese do fragmento na reação de RT-PCR (Figura 8 B) e pela presença de fragmentos inespecíficos quando o produto da reação anterior foi usado como molde. A seqüência desse iniciador foi baseada na seqüência da fita codante do gene *egl4* (Takashima, 1999a), que apresenta alta taxa de nucleotídeos AT no final da fase aberta de leitura do gene (19 dos últimos 30 nucleotídeos da região codante, desconsiderando-se o códon de terminação, são A ou T). Para amplificar o cDNA correspondente ao gene *egl4* um novo iniciador que se anele na região 3' UTR do gene deve ser desenhado considerando-se os nucleotídeos após o códon de terminação do gene. O fragmento de 1,1 kb obtido com o par de iniciadores E2SF/E2SR foi seqüenciado e confirmado como sendo o cDNA correspondente ao gene *egl2* de *H. grisea* var. *thermoidea* (Takashima, 1997). O cDNA foi então clonado no vetor de expressão pAAH5, obtendo-se assim o plasmídeo pA EGL2. O cassete de expressão de *egl2* contém o promotor ADH1, um promotor constitutivo que permite atingir altos níveis de expressão da proteína de interesse.

O vetor de expressão construído foi transformado em *S. cerevisiae* para a obtenção de uma linhagem dessa levedura capaz de expressar a endoglicanase 2 do organismo termofílico *H. grisea* var. *thermoidea*. Foram obtidos transformantes de *S. cerevisiae* capazes de expressar a enzima EGL2 recombinante de forma funcional. A atividade celulolítica foi confirmada em ensaio de degradação de CMC em placa com meio mínimo corado com Congo Red. Dois desses transformantes foram crescidos em placa contendo CMC, juntamente com um transformante controle que contém o vetor de expressão vazio (Figura 14), mostrando que a atividade de endoglicanase ocorre devido a expressão do cDNA de *egl2*.

Os níveis de expressão, observados para o clone YAEGL2-2, aumentaram a partir de 24 horas de crescimento, chegando ao máximo de atividade em 96 horas. A maior taxa de produção da enzima foi no período entre 24 e 48 horas, atingindo

produção máxima em 96 horas. Isso pode ser explicado pelo comportamento do promotor ADH1, que apresenta os maiores níveis de expressão durante o início da fase exponencial de crescimento (Aho et al., 1996). Quando a cultura se aproxima da fase estacionária de crescimento (a partir de 96 horas em meio de cultura contendo glicose como única fonte de carbono) (Herman, 2002), o crescimento celular diminui e a atividade do promotor ADH1 cai (Rouhonen *et al.*, 1995), reduzindo a produção da enzima. A diminuição da concentração de proteína encontrada no sobrenadante em 96 horas pode ser explicada pela ação de proteases liberadas no meio de cultura em resposta à baixa disponibilidade de nutrientes.

A quantidade de EGL2 recombinante produzida por *S. cerevisiae* foi baixa se considerados os níveis de expressão relatados por outros trabalhos (Tabela 6). Baixos níveis de produção da informação recombinante podem estar associados ao estresse causado pelas condições utilizadas para o crescimento das células (Mattanovich *et al.* 2004). Aho *et al.* (1996) observaram que a atividade de EGI (endoglicanase 1) de *T. reesei* produzida em *S. cerevisiae*, dirigida pelo promotor ADH1, se apresentava 40 vezes maior em meio completo (YPD) quando comparado ao crescimento em meio mínimo (glicose e YNB). Essa diferença foi atribuída à produção de uma grande quantidade de enzima inativa em meio mínimo. É possível então que em melhores condições de crescimento (suplementando o meio mínimo de cultura com vitaminas ou aminoácidos) possa haver um aumento na produção de EGL2 pela linhagem YAEGL2.

A expressão da proteína heteróloga também pode causar estresse metabólico nas células por limitar outros processos celulares competindo por seus substratos (Mattanovich *et al.*, 2000). Uma proteína produzida em altos níveis pode ficar acumulada na forma de proteína não enovelada e isso causa estresse na célula. Kauffman *et al.* (2004) mostraram que a expressão de uma cadeia de anticorpo provocou diminuição do crescimento e conseqüente diminuição da proteína de interesse. Isso causa ativação na via de resposta a proteínas não enoveladas (UPR – unfolded protein response), que é caracterizada basicamente pelo aumento na produção da chaperonina BiP. (Mattanovich *et al.*, 2004). Para que a levedura volte a apresentar níveis normais de crescimento é necessário que a via UPR esteja funcional (Kauffman *et al.*, 2004).

Tabela 6. Expressão de hidrolases de diferentes organismos em *Saccharomyces cerevisiae*.

<i>Enzima</i>	<i>Organismo de origem</i>	<i>Promotor</i>	<i>Meio de cultura</i>	<i>Produção (U/mL)</i>	<i>Resíduos de aminoácidos</i>	<i>Secretada</i>	<i>Purificada</i>	<i>Referência</i>
EGL2	<i>H. grisea</i>	ADH1	Glicose + YNB	0,0007	388	Não	Não	Este trabalho
EGIII	<i>T. reesei</i>	ADH1	YPD + extrato de malte	0,017	234	Sim	Sim	Okada <i>et al.</i> , 1998
β -gli	<i>H. grisea</i>	PGK	Glicose + YNB	0,09	234	Não	Não	Benoliel, 2004
CMCase	<i>A. aculeatus</i>	GAP	Glicose + YNB	0,1	237	Sim	Sim	Minamiguchi <i>et al.</i> , 1995
EG I	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	PGK	YPD	0,109	229	Sim	Não	Nakatani <i>et al.</i> , 2000
EngI	<i>A. niger</i>	GAPDH	Glicose + YNB + CMC + suplemento*	0,529	332	Sim	Sim	Hong <i>et al.</i> , 2001
<i>CfXYN1</i>	<i>Cryptococcus flavus</i>	PGK	Glicose + YNB	1,4	253	Sim	Não	Parachin, 2006
END1	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	PGK	Glicose + YNB + suplemento*	1100	521	Sim	Não	van Rensburg <i>et al.</i> , 1996

* - aminoácidos e fatores de crescimento necessários conforme a linhagem utilizada

A EGL2 produzida por *S. cerevisiae* apresentou massa molecular de 55 kDa, detectada por atividade em zimograma, e corresponde ao tamanho apresentado pela enzima recombinante produzida por *Aspergillus oryzae*. Nesses dois microrganismos a enzima se apresentou glicosilada, uma vez que o tamanho predito pela seqüência de resíduos de aminoácidos é de 42,6 kDa. Não se sabe o tamanho da EGL2 produzida por *H. grisea* var. *thermoidea* pois essa enzima não foi purificada a partir de culturas deste microrganismo (Takashima *et al*, 1997). No zimograma com o sobrenadante da cultura de YAEGL2-2 com 96 horas de crescimento foram detectadas duas áreas de degradação de CMC (Figura 25). Uma delas corresponde à área encontrada no zimograma do extrato periplasmático (55 kDa). A outra área apresentou um tamanho de aproximadamente 42 kDa, indicando que parte da EGL2 recombinante, encontrada no sobrenadante da cultura de YAEGL2-2, não foi glicosilada. É possível que essa redução seja também produto de degradação por proteases presentes no meio de cultura mas que não afetaram o centro ativo da enzima.

A enzima EGL2 se apresentou retida na parede celular da levedura. Pelo halo de degradação de CMC exibido pelos transformantes crescidos em meio sólido, era esperado que a EGL2 recombinante fosse, em sua maioria, secretada para o meio de cultura. Porém, a atividade enzimática detectada no meio de cultura foi baixa, quando comparado com os níveis de atividade do extrato periplasmático. No tempo de 96 horas, cerca de 92 % da atividade de EGL2 recombinante foi encontrada presa à parede celular da levedura (Figura 15 B). Os trabalhos listados na Tabela 6 também relatam a secreção para o meio de cultura das enzimas expressas em *S. cerevisiae*. Minamiguchi *et al.* (1995) analisou a fração celular e detectou 94% da atividade de CMCase no meio de cultura. Aho *et al.* (1996), que expressou uma endoglicanase I de *T. reesei* em *S. cerevisiae*, também analisou o homogenato de células, encontrando 79% a 97% da atividade enzimática no sobrenadante. Uma β -glicosidase de *A. kawachii* estudada por Iwashita *et al.* (1999) e expressa em *S. cerevisiae* apresentou 80% da atividade associada à parede celular em cultura líquida, mas a enzima apresentava-se também associada à parede celular do organismo nativo, representando uma propriedade intrínseca dessa enzima.

A endoglicanase 2 de *H. grisea* var *thermoidea* expressa em *A. oryzae* foi purificada a partir do sobrenadante (Takashima *et al.*, 1997). Não há relatos sobre retenção dessa enzima na parede celular do fungo. A seqüência da enzima EGL2 de *H. grisea* var.

thermoidea obtida por Takashima *et al.* (1997) apresenta três possíveis sítios de N-glicosilação (Figura 26). Esse dado foi obtido submetendo-se a sequência da proteína a uma análise com o programa NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/), que procura na sequência de aminoácidos da proteína por regiões consenso contendo resíduos de asparagina que possam ser reconhecidos e glicosilados. Proteínas que contêm peptídeo sinal e são glicosiladas apresentam bons níveis de secreção em diferentes condições (meio de cultura, temperatura de crescimento e pH) (Rossini *et al.*, 1993). As proteínas que apresentam N-glicosilação têm maior eficiência de secreção, sendo que, se a glicosilação ocorrer na região N-terminal da proteína, os níveis de secreção podem aumentar em até cinco vezes (Han *et al.*, 2005, Sagt *et al.*, 2000).

Esses fatos conflitam com o dado obtido nesse trabalho sobre a localização da enzima recombinante. A enzima produzida por *S. cerevisiae* contém o peptídeo sinal da própria proteína e se apresentou glicosilada, uma vez que a massa apresentada em gel de poliacrilamida (55 kDa) é maior que o tamanho predito somente para a cadeia de resíduos de aminoácidos (42,6 kDa) (Takashima, *et al.*, 1997). Sendo assim, é possível que a enzima tenha ficado retida na parede celular devido a uma diminuição da sua permeabilidade, apesar de estar sendo corretamente direcionada para o meio extracelular. A camada externa da parede celular, que consiste de cadeias pesadas de manoproteínas glicosiladas, limita sua permeabilidade, indicando que a estrutura da parede celular pode afetar as etapas finais de secreção da proteína (Bartkevicuite & Sasnauskas, 2004; Klis *et al.*, 2002). A enzima pode também ter ficado parcialmente retida no retículo endoplasmático ou no ponto de saída para o Golgi. As etapas de dobramento de proteínas no retículo endoplasmático e de transporte para o Golgi possuem uma grande maquinaria celular responsável por sua eficiência e manutenção, mas que, em uma célula geneticamente modificada para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis, pode apresentar falhas ou limitações (Bartkevicuite & Sasnauskas, 2004).

```

MKHSVLASLFATGALAQGGAWQQCGGVGFSGSTSCVSGYTCVYLNDWYSQCQPQPTTLR
TTTTTPGATSTTRSAPAATSTTPAKGKFKWFGINQSCAEFKGGEYPGLWGKHFTFPSTSS
                                     92
IQTHINDGFNMFRVAFSMERLAPNQLNAAFDANYLRNLTETVNFITGKGKYAMLDPHNF
                                     155
GRYYERIITDKAAFASFFTKLATHFASNPLVVFDTNNEYHDMDQQLVFDLNQAAIDAIR
AAGATSQYIMVEGNSWTGAWTNVTNNNLAALRDPENKLVYQMHQYLDSGSGTSTACV
                                     259
STQVGLQRVIGATNWLRLQNGKVGLLGEFAGGANSVCQQAIEGMLNHLQENSVDVWTGALW
WAGGPWWGDYIYSFEPSPGIGYTYYNLLKKYVP

```

Figura 26. Seqüência de aminoácidos da EGL2 analisada no programa NetNGlyc mostrando as regiões consenso para N-glicosilação (sublinhadas) e o peptídeo sinal da proteína (negrito). Os números representam a posição dos resíduos de asparagina (N) preditas para serem glicosiladas.

Lynd *et al.* (2002) relataram trabalhos nos quais a enzima heteróloga produzida por *S. cerevisiae* não foi secretada. Em um deles, uma celobiohidrolase expressa sobre o controle do promotor *SUC2* (invertase) e o peptídeo sinal da invertase de *S. cerevisiae* não foi secretada pela levedura. Os autores afirmaram que a translocação da proteína era influenciada por sua estrutura (Uozumi *et al.*, 1993). Quando o promotor foi substituído pelo promotor do gene *STAI* (glicoamilase extracelular) e o peptídeo sinal de uma glicoamilase fungica foi utilizado, a levedura recombinante secretou aproximadamente 40% da celobiohidrolase sintetizada. A partir destes dados é possível que a mudança do peptídeo sinal da EGL2 por um peptídeo sinal de *S. cerevisiae*, como a sequência sinal do fator alfa de acasalamento de levedura, leve a um aumento nos níveis de secreção da enzima. A região pré-pró do fator α apresenta sítios de glicosilação em sua sequência, o que facilita o reconhecimento para secreção em *S. cerevisiae* inclusive de proteínas citoplasmáticas e heterólogas (Moraes, 1989).

Takashima *et al.* (1997) fizeram a caracterização da EGL2 de *H. grisea* var. *thermoidea* expressa em *A. oryzae*, uma vez que não conseguiram realizar a expressão homóloga da enzima. Os dados obtidos nesse trabalho foram comparados com os que Takashima *et al.* (1997) obtiveram para a EGL2 expressa em *A. oryzae*. A enzima expressa em *S. cerevisiae* teve sua massa molecular determinada por zimograma e apresentou aproximadamente 55 kDa, tamanho apresentado pela enzima produzida em *A. oryzae*. O comportamento dessas enzimas em relação à variação de pH foi semelhante, apresentando faixa de pH ótimo de 5,0. Diferenças na atividade foram verificadas quanto à variação de temperatura. EGL2 produzida em *A. oryzae* apresentou temperatura ótima de 75 °C em ensaios de 5 minutos e estabilidade de 80% após pré-incubação por 10 minutos a 75 °C. A enzima produzida por *S. cerevisiae* apresentou atividade ótima entre as temperaturas 50 e 60°C em ensaios de 1 hora e estabilidade de 80% após pré-incubação por 6 horas. Essa diferença no comportamento de EGL2 de *H. grisea* var. pode ser decorrente da diferença de tempo de ensaio adotado. A temperatura ótima de celulasas para ensaios de curta duração pode chegar a 70 °C, enquanto que para ensaios com mais de 1 hora de duração geralmente apresentam temperatura ótima de 50 °C (Mandels & Reese, 1963). Outra diferença é que os ensaios realizados neste trabalho foram feitos com enzima não

purificada. O extrato periplasmático preparado para obtenção da enzima contém impurezas tais como polissacarídeos, nutrientes, produtos do metabolismo e outras proteínas, que podem interferir com a atividade enzimática. A remoção destes compostos pode levar a um aumento da atividade da enzima. Entretanto, os efeitos específicos das moléculas remanescentes são desconhecidos. Sabe-se que elas podem atuar inibindo a atividade enzimática, mas é possível que existam proteínas que protejam a enzima de fatores inibitórios (Halliwell, 1963; Mandels & Reesei, 1963).

A cinética enzimática de EGL2 recombinante foi obtida fazendo-se o ensaio em diferentes concentrações de CMC. A curva obtida com os dados do ensaio mostra um comportamento diferente do padrão Michaeliano, pois, com o aumento da concentração de substrato, a velocidade da reação atinge um valor máximo e em seguida decai, indicando que a enzima apresenta inibição por altas concentrações de substrato. O aumento na concentração do substrato provoca diminuição da concentração de água, reagente necessário para a hidrólise, reduzindo a velocidade da reação. Pode ocorrer também que mais moléculas do substrato se liguem simultaneamente ao sítio ativo da enzima gerando complexos incapazes de completar a reação (Mandels & Reese, 1963; Webb, 1963), sendo que esse tipo de inibição ocorre mais frequentemente em estudos com substratos sintéticos (Westley, 1969), como, no caso, o CMC. A curva do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para essas enzimas apresenta um padrão semelhante ao mostrado pela Figura 27, não sendo possível determinar diretamente os valores de K_m e V_{max} . Esses dados podem ser estimados fazendo-se uma extrapolação da curva com os valores de concentração que não afetaram a atividade da enzima. Para EGL2 recombinante, os valores obtidos com as condições do ensaio foram de 0,189 $\mu\text{g}/\text{min}$ para V_{max} e 4,65 mg/mL de CMC para K_m . O K_m obtido para uma endoglicanase de *Coptotermes formosanus* foi de 3,8 mg/mL de CMC (Nakashima & Azuma, 2000). Os dados cinéticos obtidos para EGL2 produzida por *S. cerevisiae* devem ser confirmados realizando-se ensaios com um maior número de pontos em concentrações não inibitórias.

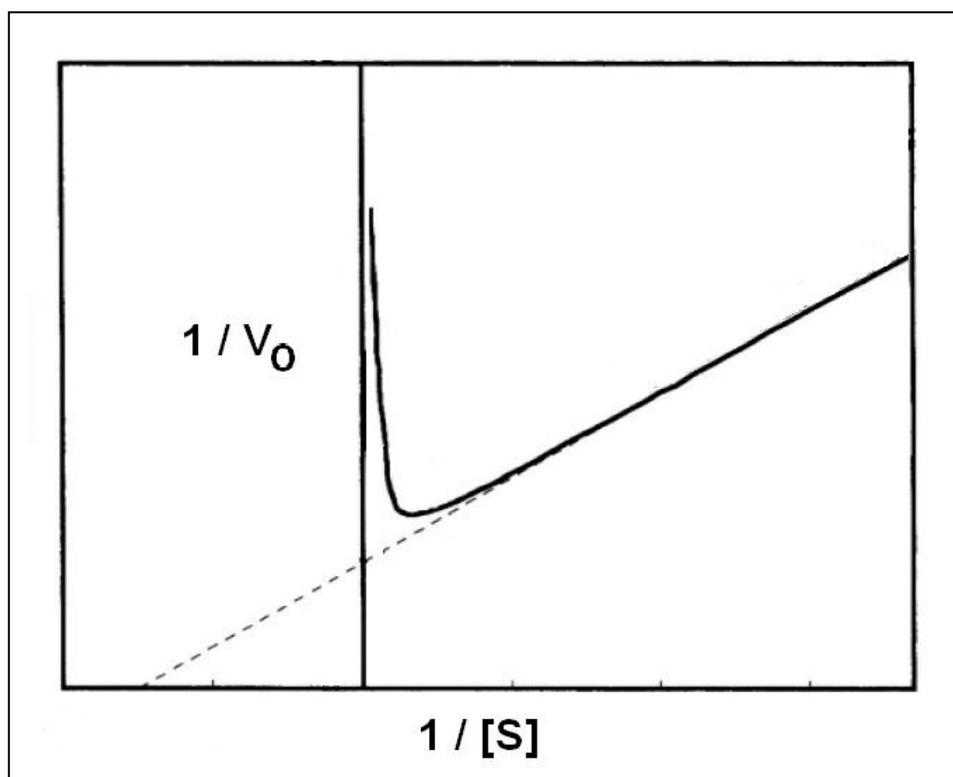


Figura 27. Gráfico do duplo-recíproco representando o efeito inibitório da enzima pelo substrato. A linha pontilhada representa a reação sem inibição (Adaptado de Leskovac, 2003).

A atividade de EGL2 produzida por *S. cerevisiae* foi também testada em outros substratos além de CMC. A enzima apresentou atividade significativa sobre celulose microcristalina, dado que coincide com o relatado para EGL2 expressa em *A. oryzae* (Takashima *et al.*, 1997) e alta atividade sobre papel de filtro. Das endoglicanases de *H. grisea* var. *thermoidea* caracterizadas por Takashima *et al.*, (1996a, 1997), EGL2 é a que apresenta maior atividade sobre celulose microcristalina.. O domínio de ligação à celulose (CBD) é essencial para a atividade enzimática de celulases em substratos sólidos (Linder e Teeri, 1996). As endoglicanases apresentam atividade principalmente sobre a região amorfa da celulose, o que explica a alta atividade em papel de filtro. Na celulose microcristalina as fibras de celulose são bastante compactas, sendo mais resistente ao ataque das endoglicanases. Essas enzimas apresentam, porém, forte efeito sinérgico de degradação desse substrato quando associado com a CBHI desse mesmo microrganismo (Takashima *et al.*, 1999a).

A atividade de EGL2 recombinante foi testada sobre os substratos sintéticos pNPC e MUC. Assim como a EGL2 produzida por *A. oryzae*, não foi detectada atividade sobre pNPC e o autor não testou a atividade sobre MUC. A enzima expressa em *S. cerevisiae* apresentou atividade sobre MUC, separando o celobiosídeo da 4-metilubeliferona, um produto fluorescente. Isso indica que a enzima apresenta atividade sobre celooligosacarídeos curtos, apesar de apresentar preferência para longas espécies de celooligosacarídeos (Takashima *et al.*, 1997).

A linhagem de *S. cerevisiae* YAEGL2-2 obtida nesse trabalho foi capaz de produzir a endoglicanase 2 de *H. grisea* var. *thermoidea* de forma ativa. Os baixos níveis de produção e a ineficiência de secreção da enzima por esta levedura não a tornam atrativas para utilização em processo de sacarificação e fermentação simultâneas, uma vez que a atividade de endoglicanase é essencial no meio extracelular. Mas é possível aumentar os níveis de expressão da enzima fazendo-se a otimização das condições de cultivo dessa linhagem, bem como melhorar a secreção substituindo-se o peptídeo sinal da enzima por um peptídeo sinal melhor reconhecido pela levedura.

As características da EGL2 produzida por *S. cerevisiae* obtidas nesse trabalho se mostraram semelhantes às características previamente obtidas por Takashima *et al.* (1997).

Essa enzima apresenta potencial para utilização no processo de sacarificação pois se apresentou termoestável a 50 °C, temperatura ideal para sacarificação da celulose (Lin & Tanaka, 2006), por pelo menos 6 horas. A capacidade de degradação de substratos sólidos, conferida pela presença do CBD nessa enzima, é outra característica que a torna uma boa opção para degradação de celulose.

Conclusões e Perspectivas

Os dados obtidos por esse trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

1. O fragmento de DNA de 1,1 kb obtido por RT-PCR com os iniciadores E2SF/E2SR é o cDNA correspondente ao gene *egl2* de *Humicola grisea* var. *thermoidea*;

2. O cDNA correspondente ao gene *egl2* clonado no vetor de expressão em *S. cerevisiae* e transformado nessa levedura gerou linhagens capazes de expressar a enzima de interesse de forma funcional;

3. A endoglicanase 2 (EGL2) de *H. grisea* var. *thermoidea* apresentou baixos níveis de secreção pela levedura *S. cerevisiae*, sendo que a maior parte da enzima produzida ficou retida na parede celular da levedura;

4. A enzima EGL2 produzida por *Saccharomyces cerevisiae* se apresentava glicosilada, apresentando massa molecular de aproximadamente 55 kDa, sendo que a forma não-glicosilada (42 kDa) foi detectada no sobrenadante de cultura da levedura;

5. A enzima EGL2 recombinante possui atividade ótima em pH 5,0, nas temperaturas de 50 e 60 °C e é termoestável, mantendo cerca de 80% de sua atividade após 6h de incubação a 50 °C.

6. A enzima recombinante teve sua atividade inibida por altas concentrações do substrato solúvel carboximetilcelulose (CMC);

7. EGL2 produzida por *S. cerevisiae* apresentou boa atividade sobre substratos sólidos (celulose microcristalina e papel de filtro) e foi capaz de hidrolisar o substrato sintético MUC, indicando que a enzima tem atividade sobre oligossacarídeos pequenos;

8. A endoglicanase 2 produzida por *S. cerevisiae* apresenta bom potencial para utilização em processos de sacarificação para produção de etanol por apresentar boa atividade sobre substratos sólidos e termoestabilidade a 50 °C, temperatura geralmente utilizada no processo de sacarificação.

Os resultados desse trabalho abrem ainda as seguintes perspectivas:

1. O desenho de um novo iniciador para reação de PCR que se anele na região 3' UTR do gene *egl4* de *H. grisea* var. *thermoidea* para maior eficiência de amplificação do cDNA correspondente e sua posterior clonagem;

2. A construção de um cassete de expressão do cDNA correspondente ao gene *egl2* substituindo a seqüência sinal desse gene pela região pré-pro do fator α de acasalamento de *S. cerevisiae*, com a finalidade de melhorar a secreção da enzima pela levedura;

3. Otimização das condições de cultivo da linhagem recombinante para uma melhor produção da enzima heteróloga;

4. Purificação da endoglicanase 2 recombinante produzida por *S. cerevisiae* para utilização em ensaios de caracterização bioquímica, incluindo o estudo do efeito de moléculas como íons, glicose e celobiose sobre a atividade enzimática;

5. Realização de novos ensaios para a determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) de atividade da EGL2 recombinante;

6. Utilização das celulases de *H. grisea* var. *thermoidea* (EGL2, CBHII.2 e BGL4) conjuntamente em um ensaio para avaliação da capacidade de degradação de celulose à glicose por essas enzimas.

Referencias Bibliográficas

- Aho, S., Arffman, A., Korhola, M. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* mutants selected for increased production of *Trichoderma reesei* cellulases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 36-45.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Molec. Biol. 215(3):403-410.
- Ammerer, G. (1983). Expression of genes in yeast using the ADC1 promoter. Methods Enzymol. 101:192-201.
- Araújo, E.F., Barros, E.G., Caldas, R.A., Silva, D.O. (1983) Beta-glycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. Biotechnol. Lett. 5: 781-784.
- Bartkeviciute, D., Sasnauskas, K. (2004). Disruption of the MNN10 gene enhances protein secretion in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 4(8):833-40.
- Béguin, P., Aubert, J.P., (1994). The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol Rev. 13(1):25-58.
- Benoliel, B. (2004). Produção por *Saccharomyces cerevisiae* da Celobiohidrolase 1.2 e da β -glicosidase 4 de *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Dissertação de Mestrado Universidade de Brasília.
- Béra-Maillet, C., Arthaud, L., Abad, P., Rosso, M. (200). Biochemical characterization of MI-ENG1, a family 5 endoglucanase secreted by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Eur. J. Biochem. 267: 3255-3263.

- Brandão, G.O. (1996). Expressão heteróloga do cDNA da Celobiohidrolase (cbhI.1) do fungo *Phanerochaete crhysosporium* em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- Brown Jr, R.M. (1999). Cellulose structure and biosynthesis. *Pure Appl. Chem.* 71 (5): 767-775.
- Bruins, E.M., Janssen, A.E.M., Boom, R.M. (2001). Thermozyms and their applications. A review of recent literature and patents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90: 155-186.
- Campos, L., Felix, C.R. (1995). Purification and Characterization of a Glucoamilase from *Humicola grisea*. *Appl. Env. Microbiol.* 61 (1): 2436-2438.
- Cerri e Silva, C.H., da Fonseca, A.S., Lucena Neto, S.A., Ximenes, E.A., Puls, J., Ferreira Filho, E.X. (2000). Evaluation of hydrolysis products of xylans by xylan-degrading enzymes from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and *Aspergillus fumigatus* *Fresenius*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 81-83.
- Chaves, V.M.G., Brune, W., Moreira, M.A. (1989). Characterization of a thermophilic and cellulolytic *Humicola sp.* isolated from compost. *Revista de Microbiología* 20 (4): 470-476.
- Chen, D.C., Yang, B.C., Kuo, T.T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* 21 (1): 83-84.
- Cho, K.M., Yoo, Y.J., Kang, H.S. (1999). δ -Integration of endo/exoglucanase and β -glucosidase genes into yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enz. Microb. Technol.* 25:23-30.

- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110-2114.
- Cooney, D.G., Emerson, R. (1964). *Humicola insolens* and *Humicola grisea* var. *thermoidea*. In: Thermophilic fungi. WH. Freeman and Co., San Francisco.
- Cowling, E.B. (1963). Structural features of cellulose. In: Reese, E.T. Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials. The Macmillan Company, New York.
- De-Paula, E.H. (1999). Análise da expressão gênica do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em bagaço de cana-de-açúcar: identificação de CBHI.2, a maior fração protéica secretada. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- De-Paula, E.H., Ramos, L.P., Azevedo, M.O. (1999). The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. Biores. Technol. 68: 35-41.
- De-Paula, E.H., Poças-Fonseca, M.J., Azevedo, M.O. (2003). The product of *Humicola grisea* var. *thermoidea* *cbh1.2* gene is the major expressed protein under induction by lignocelulose residues. World J. Microbiol. Biotechnol. 19: 631-635.
- Demain, A.L., Newcomb, M., Wu, J.H.D. (2005). Cellulase, Clostridia and Ethanol. Microbiol. Mol. Biol. Rew. 69 (1): 124-154.
- De-Sousa, M.T. (2003). Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose. In: Azevedo, M.O., Felipe, M.S.S., Brígido, M.M., Maranhão, A.Q., De-Souza, M.T. Técnicas básicas em Biologia Molecular. Editora Universidade de Brasília, Brasília.
- Dillon, A.J.P. (2004). Celulases In: Said, S., Pietro, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. Leigis Summa, Ribeirão Preto.

- Felix, C.R., Oliveira, A.R. (1991). Amylolytic activity of *Humicola sp.* Anais Acad. Brasileira Ciên. 63: 409-414.
- Ferreira Filho, E.X. (1996). Purification And Characterization Of A Beta-Glucosidase From Solid-State Cultures Of *Humicola grisea* Var. *thermoidea*. Can. J. Microbiol. 42: 1-5.
- Fujita, Y., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H., Kondo, A., (2002). Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 68(10):5136-5141.
- Goldstein, A.L., McCusker, J.H. (2001). Development of *Saccharomyces cerevisiae* as a model pathogen. A system for the genetic identification of gene products required for survival in the mammalian host environment. Genetics 159 (2): 499-513.
- Halliwell, G. (1963). Measurement of cellulase and factors affecting its activity. In: Reese, E.T. Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials. The Macmillan Company, New York.
- Han, K.S., Kim, S.I., Choi, S.I., Seong, B.L. (2005). N-Glicosilation of secretion enhancer peptide as influencing fator for the secretion of target proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 377:557-562.
- Hien, N.H., Fleet, G.H. (1983). Separation and Characterization of Six (1-3)- β -Glucanases from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 156 (3): 1204-1213.
- Hong, J., Tamaki, H., Akiba, S., Yamamoto, K., Kumagai, H. (2001). Cloning of a Gene Encoding a Highly Stable Endo- β -1,4-Glucanase from *Aspergillus niger* and Its Expression in Yeast. J. Biosc. Bioeng. 92 (5): 434-441.

- Iembo, T., Azevedo, M.O., Bloch JR., C., Filho, E.X.F. (2005) Purification and partial characterization of a new beta-xylosidase from *Hemicola grisea* var. *thermoidea*. World J. Microbiol. Biotechnol. Online first.
- Kauffman, K.J., Pridgen, E.M., Doyle III, F.J., Dhurjati, P.S., Robinson, A.S. (2002). Decreased protein expression and intermittent recoveries in BiP levels result from cellular stress during heterologous protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Prog. 18(5):942-50.
- Kimura, S., Smith, H.H., Hankinson, O., Nebert, D.W. (1987). Analysis of two benzo[a]pyrene resistant mutants of the mouse hepatoma Hepa-1 P₁ 450 gene via cDNA expression in yeast. EMBO J. 6(7): 1929-1933.
- Klyosov, A.A., (1995a). Biomass conversion with cellulases In: Industrial Enzyme Engineering. A 6-volume treatise. Volume 1, Harvard University, Cambridge.
- Klyosov, A.A., (1995b). Principles of the enzymatic degradation of cellulose Industrial Enzyme Engineering. A 6-volume treatise. Volume 2, Harvard University, Cambridge.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 26(3):239-56.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Biores. Technol. 89: 17-34.
- Han, K.S., Kim, S.I., Choi, S.I., Seong, B.L. (2005). N-Glycosylation of secretion enhancer peptide as influencing factor for the secretion of target proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun 337: 557-562.
- Herman, P.K. (2002). Stationary phase in yeast. Curr. Op. Microbiol. 5: 602-607.

- Hong, J. Hisanori, T., Shunichi, A., Yamamoto, K., Kumagai, H., (2001). Cloning of a gene encoding a highly stable endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. *J. Biosci. Bioeng.* 32 (5): 434-441.
- Ingram, L.O., Doran, J.B. (1995). Conversion of cellulosic materials to ethanol. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 235-241.
- Ito, J., Fujita, Y., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A. (2004). Improvement of Cellulose-Degrading Ability of a Yeast Strain Displaying *Trichoderma reesei* Endoglucanase by Recombination of Cellulose-Binding Domains. *Biotechnol. Prog.* 20: 688-691.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lage, J. (2006). Gasolina terá menos álcool por "período longo", diz Petrobras. Folha de São Paulo, São Paulo. Folha online, 2 mar (www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u105635.shtml), acessado em 05/03/2006.
- Leite, R.C.C. (2005). Biomassa, a esperança verde para poucos. Folha de São Paulo, São Paulo, 25 fev. Tendências e Debates.
- Leskovac, V. (2003). *Comprehensive Enzyme Kinetics*. Kluwer Academic Press, New York.
- Lima, A.O.S., Quecine, M.C., Fungaro, M.H.P., Andreote, F.D., Maccheroni Jr., W., Araújo, W.L., Silva-Filho, M.C., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L. (2005). Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 57-65.
- Lin, Y., Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. *App. Microbiol. Biotechnol.* 69: 627-642.

- Linder, M., Teeri, T.T. (1996). The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. PNAS, 93 (22): 12251-12255.
- Lucena Neto, S.A., Filho, E.X.F. (2004). Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Brazilian J. Microbiol. 35: 86-90.
- Lynd, L.R., Weimer, P.L., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 66 (3): 506-577.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 34 (3): 461–488.
- Mandels, M., Reese, E.T. (1963). Inhibition of cellulases and β -glucosidases. In: Reese, E.T. Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials. The Macmillan Company, New York.
- Marangoni, A.G. (2003). Enzyme Kinetics: A modern approach. John Willey and Sons Inc., New York.
- Mattanovich, D, Gasser, B., Hohenblum, H., Sauer, M. (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. J. Biotechnol. 113; 121-135.
- Mielenz, J.R. (2001) Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. Curr. Opin. Microbiol. 4: 324-329.
- Miettinen-Oinonen, A. (2004). *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. VTT Publications, Helsinki, Finland.

- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428.
- Minamiguchi, K., Ooi, T., Kawaguchi, T., Okada, H., Murao, S, Arai, M. (1995). Secretive Expression of the *Aspergillus aculeatus* Cellulase (FI-CMCase) by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferm. Bioeng.* 79 (4): 363-366.
- Miranda, M.R.S.B. (1999). Expressão Heteróloga do cDNA de Celobiohidrolase I.2 (*cbhI.2*) do Fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* na Levedura Metilotrófica *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- Moraes, L.M.P. (1989). Construções moleculares para o estudo da ação de diferentes peptídeos sinal em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- Moraes, L.M.P., Astolfi-Filho, S., Oliver, S.O. (1995). Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express alpha-amylase and glicoamylase separately or as a functional fusion protein. *Appl. Microbiol. Biotech.* 43: 43(6):1067-76.
- Nakatani, F., Kawagushi, T., Takada, G., Sumitani, J., Moritawa, Y., Arai, M. (2000). Cloning and Sequencing of an Endoglucanase Gene from *Scopulariopsis brevicaulis* TOF-1212, and Its Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(6): 1238-1246.
- Nakashima, K., Azuma, J. (2000). Distribution and Properties of Endo- β -1,4-glucanase from a Lower Termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (7): 1500-1506.
- Okada, H., Tada, K. Sekiya, T., Yokoyama, K., Takahashi, A., Tohda, H., Kumagai, H., Morikawa, Y. (1998). Molecular Characterization and Heterologous Expression of the

- Gene Encoding a Low-Molecular-Mass Endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl. Environ. Microb.* 64(2): 555-563.
- Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J., (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Molec Biol Rev* 60(1):34-50.
- Parachin, N.S. (2006). Atividade xilanolítica em *Cryptococcus flavus*: Perfil de xilanases secretadas, Clonagem e Expressão de um dos genes (cfXYN1) em *S. cerevisiae*. Dissertação de Mestrado Universidade de Brasília.
- Pérez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J., (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5(2):53-63.
- Pérez-González, J.A., González, R., Querol, A., Sendra, J., Ramon, D. (1993). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2801–2806.
- Phillipidis, G.P., Smith, T.K., (1995). Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 117-124.
- Poças-Fonseca, M.J, Lima, B.D., Brigido, M.M., Silva-Pereira, I., Felipe, M.S.S., Radford, A., Azevedo, M.O. (1997). *Hemicola grisea* var. *thermoidea* *cbh1.2*: A new gene in the family of cellobiohydrolases is expressed and encodes a cellulose-binding domain-less enzyme. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 115-120.
- Pocas-Fonseca, M.J., Silva-Pereira, I., Rocha ,B.B., Azevedo, M.O. (2000). Substrate-dependent differential expression of *Hemicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. *Can. J. Microbiol.* 46(8):749-52.

- Rossini, D. Porro, D., Brambilla, L., Venturini, M., Ranzi, B.M., Vanoni, M., Alberghina, L. (1993). In *Saccharomyces cerevisiae*, protein secretion into the growth medium depends on environmental factors. *Yeast* 9 (1):77 -84.
- Rouhonen, L., Aalto, M.K., Keranen, S. (1995). Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *J. Biotechnol.* 39, 193-203.
- Sagt, C.M.J., Kleizen, B., Verwaal, R., de Jong, M.D.M., Muller, W.H., Smits, A., Visser, C., Boonstra, J., Verkleij, A.J., Verrips, C.T. (2000). Introduction of an N-Glycosylation Site Increases Secretion of Heterologous Proteins in Yeasts. *Appl Environ. Microbiol.* 66(11): 4940-4944.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V. (2005). Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnol. Prog.* 21: 816-822.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandgren, M., Sahlberg, J., Mitchinson, C. (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Bioph. Mol. Biol.* 89: 246-291.
- Shimonaka, A, Baba, Y., Koga, J., Nakane, A., Kubota, H., Kono, T. (2004). Molecular cloning of a gene encoding endo- β -D-1,4-glucanase PCE1 from *Phycomyces nitens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (11): 2299-2305.
- Shülein, M. (1997). Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *J. Biotechnol.* 57: 71-81.

- Silva-Pereira, I. (2003). Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. In: Azevedo, M.O., Felipe, M.S.S., Brígido, M.M., Maranhão, A.Q., De-Souza, M.T. Técnicas básicas em Biologia Molecular. Editora Universidade de Brasília, Brasília.
- Suda, C.N.K., Giorgini, J.F. (2003). Multiple forms of endo-1,4- β -glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophylla* L. J. Experim. Bot. 54 (390): 2045-2052.
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., Uozumi, T. (1996a). Cloning, sequencing, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. J. Biotechnol. 50: 137-147.
- Takashima, S., Nakamura, A., Masaki, H., Uozumi, T. (1996b) Purification and characterization of cellulases from *Humicola grisea*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 77 – 82.
- Takashima, S.; Nakamura, A.; Masaki, H. and Uozumi, T. (1997) Cloning, sequencing and expression of a thermostable cellulase gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61 (2): 245-250.
- Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. and Uozumi, T. (1999a) Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from *Humicola grisea*. J. Biotechnol. 67, 85 – 97.
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. and Uozumi, T. (1999b) Molecular Cloning and Expression of Novel Fungal β -Glucosidase Genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. J. Biochem. 125, 728 - 736.
- Takenaka, A., Colin, G.D., Kudo, H., Itabashi, H., Cheng, K. (1999). Molecular cloning, expression, and characterization of an endo- β -1,4-glucanase cDNA from *Epidinium caudatum*. J. Gen. Appl. Microbiol. 45, 57-61.

- Teeri, T.T., (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnol.* 15:160-167.
- Tokarski, M. (2005). O proálcool renasce. *Correio Braziliense*, Brasília, p. 14, 25 nov.
- Uozumi, N., Hayashi, A., Ito, T., Patthra, A., Yamashita, I., Iijima, S., Kobayashi, T. (1993). Secretion of thermophilic bacterial cellobiohydrolase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 399-404.
- van Rensburg, P., van Zyl, W.H., Pretorius I.S., (1996). Co-expression of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase gene and a *Butyrivibrio fibrisolvens* endo- β -1,4-glucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genetics.* 30:246-250.
- Veiga Filho, L. (2004). Presença forte. *Valor Econômico*, São Paulo, 2 dez. Caderno Valor Especial, p. F1.
- Webb, L.J. (1963). *Enzyme and Metabolic Inhibitors. Volume I – General Principles of Inhibition.* Academic Press, New York.
- Westley, J. (1969). *Enzymic Catalysis.* Harper & Row Publishers, New York, Evanston and London.
- Wilson, D.B., (1992). Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12(1-2):45-63.
- Wong, Y.S., Maclachlan, G.A. (1979). 1,3-beta-D-glucanases from *Pisum sativum* seedlings. II. Substrate specificities and enzymic action patterns. *Biochim Biophys Acta.* 571(2):256-69.