



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

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum*

Marciano Régis Rubini

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira

Brasília, agosto de 2009.



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

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum*

Marciano Régis Rubini

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira
Co-orientação: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
de Brasília como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Biologia Molecular.

Brasília, agosto de 2009

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

Orientador: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira
Co-orientação: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Roberto Félix – Examinador (UnB)

Prof. Dr. Jürgen Andreaus – Examinador Externo (FURB)

Prof. Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes – Examinadora (UnB)

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido – Examinador (UnB)

Prof. Dra. Janice Lisboa de Marco – Suplente (UnB)

Saudade...

Um dia a maioria de nós irá se separar.

Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, das descobertas que fizemos dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos.

Saudades até dos momentos de lágrimas, da angústia, das vésperas de finais de semana, de finais de ano.

Enfim... do companheirismo vivido.

Em breve cada um vai pra seu lado, seja pelo destino, ou por algum desentendimento, segue a sua vida.

Talvez continuemos a nos encontrar.

Quem sabe, nos e-mails trocados...

Podemos nos telefonar conversar algumas bobagens....

Passarão dias, meses, anos até este contato tornar-se cada vez mais raro.

Vamos nos perder no tempo...

Um dia nossos filhos verão aquelas fotografias e perguntarão:

Quem são aquelas pessoas?

Diremos que eram nossos amigos.

E isso vai doer tanto...

A saudade vai apertar bem dentro do peito.

Vai dar uma vontade de ligar, ouvir aquelas vozes novamente...

Quando o nosso grupo estiver incompleto... nos reuniremos para um último adeus de um amigo.

E entre lágrimas nos abraçaremos.

Faremos promessas de nos encontrar mais vezes daquele dia em diante.

Por fim, cada um vai para o seu lado para continuar a viver a sua vida isolada do passado.

E nos perderemos no tempo mais uma vez.

Por isso, fica aqui um pedido deste humilde amigo: não deixe que a vida passe em branco e que pequenas adversidades sejam a causa de grandes tempestades...

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos”

Vinícius de Moraes

“A natureza para o sábio, é aquela que escolhe o caminho. O homem quando maduro, limita-se a se entregar a ela e dela tirar o proveito desejado. Violentá-la traz a certeza de que se pagará um alto preço, cedo ou tarde”

Alberto Santos Dumont

Dedico este trabalho aos meus pais Pedro e Laura Rubini, ao meu irmão Marcelo, a meu afilhado Andrei, e em especial aos meus avôs, com quem aprendi muito sobre a vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Ildinete Silva Pereira, pela orientação, apoio, amizade, exemplo de profissionalismo, de humildade, de luta, coragem e doação, pelo apoio dado nas horas, em que mesmo sem saber, foram fundamentais para o termino deste trabalho.

Aos meus pais, Pedro e Laura, por sempre estarem comigo mesmo a distância, por não me deixarem desanimar durante a caminhada e pela certeza de seu carinho incondicional. Só cheguei onde estou por causa dos ensinamentos e do amor de vocês.

Ao Prof. Amigo e sócio Aldo José Pinheiro Dillon, pela apresentação a Ciência, seu exemplo de batalha e espiritualidade, sempre buscando o correto (as vezes pelos caminhos mais logos mas.....), Aldo ainda venceremos!!!!

A Prof^a. Cynthia M. Kyaw pelo auxilio mais que essencial para o termino e publicação do paper e pela sua colaboração durante toda a execução deste trabalho.

Ao Grande Amigo Andre Pinos Klein, pelos inúmeros telefonemas de apoio e pela compreensão durante meus desabafos pelas estadas na Serra Gaucha.

Aos amigos (a) cúmplices Juliana, Rafael, Victor, Alex, Viviane, Camilo (SP), Pedro, ao anônimo Total Flex!! Que entre uma cerveja e outra trocávamos reagentes protocolos experiências do laboratório etc.....Sentirei muitas saudades de vocês!!

Aos desbravadores de terras Argentinas, Pedro, Rafael, Juliano pelos mais notórios dias de companheirismo e cumplicidade (amigo é amigo o resto.....)

Aos professores do laboratório de Biologia Molecular: Fernando, Janice, Marcelo Brígido, Márcio, Marcos, Andréa, Elida, Lidia e Sueli por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos e colegas de trabalho do lab3 Thiago, Bebe (Eveline), Dani, Letícia, Barbara, Calliandra (a louca) e Lorena.

A Prof^a Dra. Fabrícia Paula de Faria pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e a salvadora bolsa. A amiga Gisele que muito auxiliou durante minha estadia em terras Goianas.

A Prof^a Dra. Leila Maria Gomes Barros (Cenargen) pelos inúmeros microlitros doados nas horas de aperto para a realização dos experimentos.

Ao Prof Dr. Jürgen Andreaus pela disponibilidade e sugestões dadas para a correção deste trabalho.

Aos amigos e colegas que estão ou já fizeram parte da BioMol: Saulo, Renata, Viviane, Samuel, Greice, Taynara (Noventa), Ezequiel, Daniel, Flávia, Cristiano, Davi, Túlio, Bárbara, Yuri, Pedro, Cecília, PatyLu, Gina, Chrisinha, Luana, Mariana, Carine, Luciano, Sergio, Tosta, Leandro, Antonio Leonardo, PattyGirl, Aldo, Simoneide, Rose, Vera, Alice, André Nicola, Larissa, Izabel, Camila, Bruno, Andreisse, Mauro, Hugo, Tatiana, Guilherme, Karen, Fabrício, Christian, Luanne, Theyssa, Betúlia, Marcos, Zé Carlos, Ana Karina, Laura, Adriane, Andre Amaral, Melissa, Cristiane.

Ao Guilherme pela enorme ajuda de última hora com as análises estatísticas.

Às incansáveis mães de todos ao entrarem no Lab. Dona Fátima e Dona Ivanildes cuja paciência de ambas é memorável.

Ao Laboratório de Enzimologia: Prof. Félix, Prof. Edivaldo, Marísia, Margarete, Gil, Daniel e GOOZUK, tenham certeza que muito contribuíram para o termino deste trabalho

Ao CNPq 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.

(By Saulo)

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Índice de figuras | i |
| Índice de tabelas | iii |
| Abreviaturas | iv |
| Resumo | vii |
| Abstract | viii |
| 1. Introdução | |
| 1.1 Estrutura da Celulose | 1 |
| 1.2. Celulases | 4 |
| 1.3 Classificação de Glicosil Hidrolases | 7 |
| 1.4 Mecanismo catalítico de Glicosil Hidrolases | 7 |
| 1.5 Hidrolases da família 5 | 10 |
| 1.6 Emprego Industrial das Celulases | 14 |
| 1.7 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão heteróloga | 19 |
| 1.8 Expressão de celulases em <i>P. pastoris</i> | 21 |
| 1.9 <i>Penicillium echinulatum</i> | 24 |
| 2. Justificativa | 28 |
| 3. Objetivos | 30 |
| 3.1 Geral | 30 |
| 3.2 Específicos | 30 |
| 4. Material e Métodos | 31 |
| 4.1 Microrganismos utilizados | 31 |
| 4.1.1 Linhagem de <i>Penicillium echinulatum</i> | 31 |
| 4.1.2 Linhagens de Levedura <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella</i>) | 31 |
| 4.1.2.1 <i>Pichia pastoris</i> linhagem GS115 (<i>K. phaffii</i>) | 31 |
| 4.1.2.2 <i>Pichia pastoris</i> linhagem SMD 1168 (<i>K. pastoris</i>) | 31 |
| 4.1.3 Linhagens de <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| 4.2 Meios de cultura e soluções | 32 |
| 4.2.1 Soluções e meios para cultivo de fungos filamentosos | 32 |
| 4.2.1.1 Meio para indução de celulases de <i>P. echinulatum</i> (MPIC) | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.1.2 Meio para produção de micélio <i>P. echinulatum</i> (MPM) | 32 |
| 4.2.1.3 Meio BDA para crescimento e produção de esporos <i>P. echinulatum</i> | 33 |
| 4.2.1.4 Solução de Elementos Traço | 33 |
| 4.2.1.5 Solução de Sais | 33 |
| 4.2.2 Soluções e meios para cultivo de leveduras <i>P. pastoris</i> | 33 |
| 4.2.2.1 Meio YPD | 33 |
| 4.2.2.2 Meio YPD-Ágar | 33 |
| 4.2.2.3 Meio YPDS-Ágar | 33 |
| 4.2.2.4 Meio MD | 34 |
| 4.2.2.5 Meio MD-Ágar | 34 |
| 4.2.2.6 Meio MM (Meio mínimo metanol) | 34 |
| 4.2.2.7 Meio BMGY (Meio complexo tamponado com glicerol) | 34 |
| 4.2.2.8 Meio BMMY (Meio complexo tamponado com metanol) | 34 |
| 4.2.2.9 Meio BMGluY (Meio complexo tamponado com glicose) | 34 |
| 4.2.2.10 Meio MGY (Meio mínimo com glicerol) | 34 |
| 4.2.2.11 Meio mínimo-Ágar CMC + Metanol | 35 |
| 4.2.3 Meios e soluções para cultivo de <i>Escherichia coli</i> | 35 |
| 4.2.3.1 Meio Luria-Bertani (LB) | 35 |
| 4.2.3.2 Meio LB-Ágar | 35 |
| 4.2.3.3 Meio SOB | 35 |
| 4.2.3.4 Meio SOC | 35 |
| 4.2.3.5 Meio 2XYT ou 2YT para o “Screening” do banco cDNA | 35 |
| 4.2.3.6 Meio mínimo para bactéria (M9) | 36 |
| 4.2.3.7 Solução IPTG 1M | 36 |
| 4.2.3.8 Solução X-gal 2% | 36 |
| 4.2.3.9 Solução de ampicilina 50 mg/mL | 37 |
| 4.2.3.10 Solução de Vermelho do Congo 1% | 37 |
| 4.2.4 Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinante | 37 |
| 4.2.4.1 Soluções para a extração de DNA plasmidial (mini-preparação) | 37 |
| 4.2.4.2 Solução 1 (Tampão Tris - EDTA) | 37 |
| 4.2.4.3 Solução 2 (Solução de Lise alcalina) | 37 |
| 4.2.4.4 Solução 3 (Solução de Neutralização) | 37 |
| 4.2.4.5 Solução de lise (Extração de DNA genômico) | 37 |
| 4.2.4.6 Tampão de corrida para gel de eletroforese | 38 |

| | |
|--|----|
| 4.2.4.7 Tampão Tris-Borato EDTA (TEB) 20X | 38 |
| 4.2.4.8 Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 10X | 38 |
| 4.2.4.9 Tampão de Amostra (10X) para análise de DNA por eletroforese | 38 |
| 4.2.4.10 Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante | 38 |
| 4.2.4.10.1 Tampão de Amostra para proteína | 38 |
| 4.2.4.10.2 Acrilamida:Bis-Acrilamida (39:1) | 38 |
| 4.2.4.10.3 Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 | 38 |
| 4.2.4.10.4 Tris-HCl 1 M pH 6,8 | 39 |
| 4.2.4.10.5 Persulfato de Amônio | 39 |
| 4.2.4.10.6 Tampão de Corrida – Tris-Glicina 5x | 39 |
| 4.2.5 Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática (DNS) | 39 |
| 4.2.5.1 Tampão Tris-HCl 1M pH 7,0 | 39 |
| 4.2.5.2 Reagente DNS | 39 |
| 4.3 Marcadores de massa molecular para DNA | 39 |
| 4.4 Endonucleases de restrição e tampões e de reação | 40 |
| 4.5 Oligonucleotídeos sintéticos | 40 |
| 4.6 Condições de cultivo de fungos | 41 |
| 4.6.1 Cultivo de <i>Penicillium echinulatum</i> | 41 |
| 4.6.2 Cultivo de <i>Pichia pastoris</i> | 41 |
| 4.6.2.1 Indução e expressão de recombinantes em frasco | 41 |
| 4.6.2.2 Otimização das condições de cultivo de <i>P. pastoris</i> em frasco. | 42 |
| 4.7 Obtenção dos RNAs Total e Mensageiro | 43 |
| 4.8 Obtenção das moléculas de cDNA | 44 |
| 4.9 Construção da Biblioteca de cDNA | 44 |
| 4.10 Plasmídeo utilizados | 45 |
| 4.10.1 Plasmídeo pSPORT 1 | 45 |
| 4.10.2 Plasmídeo pPIC9 | 46 |
| 4.10.3 Plasmídeo pGEM-T | 47 |
| 4.11 Transformação de células bacterianas | 47 |
| 4.11.1 Transformação de células de <i>E. coli</i> por Eletroporação | 47 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4.11.2 | Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico | 48 |
| 4.11.3 | Transformação de <i>P. pastoris</i> por Eletroporação | 49 |
| 4.12 | Seleção de clones com atividade celulolítica (bactéria) | 50 |
| 4.12.1 | Preparação de células bacterianas competentes choque térmico (CaCl ₂) | 50 |
| 4.12.2 | Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação | 50 |
| 4.13 | Seleção de clones recombinantes (bactéria) (<i>Screening</i> primário) | 51 |
| 4.14 | Seleção de clones com atividade celulolítica em placas <i>deep well</i> (96 Well) | 51 |
| 4.15 | Extração de DNA plasmidial em pequena escala para seqüenciamento | 52 |
| 4.16 | Seqüenciamento e análise das seqüências de DNA | 52 |
| 4.17 | Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Método de lise alcalina) | 53 |
| 4.18 | Extração de DNA plasmidial em média escala (midi-prep) | 53 |
| 4.19 | Análise de Ácidos Nucléicos por eletroforese em Gel de Agarose | 55 |
| 4.20 | Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose | 55 |
| 4.21 | Reação de polimerização em cadeia (PCR) | 55 |
| 4.22 | Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto) | 56 |
| 4.23 | Caracterização bioquímica da enzima EGL1 | 56 |
| 4.23.1 | Diálise e liofilização do sobrenadante | 56 |
| 4.23.2 | Ensaio enzimático | 57 |
| 4.23.3 | Atividade enzimática em diferentes pHs | 58 |
| 4.23.4 | Atividade enzimática em diferentes temperaturas e estabilidade térmica | 59 |
| 4.23.5 | Atividade enzimática sobre diferentes substratos | 59 |
| 4.23.6 | Detecção de Atividade enzimática em placa de Petri | 60 |
| 4.23.7 | Efeito de íons | 60 |
| 4.24 | Análise de proteína em gel de policrilamida desnaturante (SDS-PAGE) | 61 |
| 4.24.1 | Condições de eletroforese em gel de poliacrilamida | 61 |
| 4.24.2 | Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (Zimograma) | 61 |
| 4.24.3 | Coloração com <i>Coomassie Brilliant Blue</i> G-250 | 62 |
| 4.25 | Precipitação de proteínas com TCA e acetona | 62 |
| 4.26 | Predição da estrutura 3D da endoglicanase 1 de <i>P. echinulatum</i> | 63 |

| | |
|--|-----|
| 4.27 Adição de um “dATP” para ligação em vetor pGEN-T (técnica de A-tailing) | 63 |
| 4.28 Ferramentas de bioinformática | 64 |
| 5 Resultados e Discussão | 66 |
| 5.1 Obtenção do RNA total e RNA poli (A)⁺ | 66 |
| 5.2 Construção da Biblioteca de cDNA | 67 |
| 5.3 Screening da biblioteca de cDNA de <i>P. echinulatum</i> | 67 |
| 5.4 Sequenciamento automático de clones | 68 |
| 5.4.1 Geração de <i>Expressed Sequence Tags (ESTs)</i> | 69 |
| 5.5 Obtenção e caracterização do cDNA <i>egl1</i> de <i>Penicillium echinulatum</i> | 75 |
| 5.5.1 Obtenção do cDNA | 75 |
| 5.5.2 Características da seqüência de nucleotídeos e protéica do cDNA <i>egl1</i> | 78 |
| 5.5.3 Predição da estrutura 3D da EGL1 de <i>P. echinulatum</i> | 82 |
| 5.6 Expressão heteróloga do cDNA <i>egl1</i> em <i>Pichia pastoris</i> | 83 |
| 5.6.1 Construção do vetor de expressão induzida | 83 |
| 5.6.2 Transformação de <i>P. pastoris</i> e detecção da atividade enzimática | 86 |
| 5.7 Otimização da produção de enzima (Clone C4) | 89 |
| 5.8 Detecção da atividade enzimática em placa | 94 |
| 5.8.1 Cinética de produção da endoglicanase recombinante | 95 |
| 5.9 Caracterização bioquímica da endoglicanase EGL1 recombinante | 98 |
| 5.9.1 Atividade enzimática em diferentes pHs | 98 |
| 5.9.2 Atividade enzimática em diferentes temperaturas | 99 |
| 5.9.3 Estabilidade térmica de EGL1 recombinante | 100 |
| 5.9.4 Atividade enzimática de EGL1 sobre diferentes substratos | 103 |
| 5.9.5 Efeito de Íons | 105 |
| 5.10 Determinação da massa molecular da EGL1 recombinante | 110 |
| 6. Resultados Principais e Perspectivas | 113 |
| 7. Referências Bibliográficas | 117 |

ÍNDICE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação esquemática da celulose | 1 |
| Figura 2. Estrutura cristalina da celulose | 2 |
| Figura 3. Representação esquemática de uma fibra de celulose | 3 |
| Figura 4. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica | 3 |
| Figura 5. Representação esquemática de um corte em uma fibra de celulose | 4 |
| Figura 6. Sinergismo entre endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases | 6 |
| Figura 7. Representação esquemática da reação de retenção | 9 |
| Figura 8. Representação esquemática da reação de inversão | 9 |
| Figura 9. Estrutura 3D da Endoglicanase-1GZJ de <i>Thermoascus aurantiacus</i> | 11 |
| Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de fibras de tecido de algodão | 16 |
| Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura de um tecido misto | 18 |
| Figura 12. Representação esquemática do mapa físico do vetor pSPORT1 | 45 |
| Figura 13. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9 | 46 |
| Figura 14. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM-T | 47 |
| Figura 15. Curva padrão de glicose | 58 |
| Figura 16. Perfil eletroforético da preparação de RNA total de <i>P. echinulatum</i> | 66 |
| Figura 17. Perfil característico de DNAs plasmideais (Placas de <i>deep weel</i>) | 69 |
| Figura 18. Distribuição do número de seqüências em <i>contigs</i> | 70 |
| Figura 19. Alinhamento múltiplo da região correspondente ao possível peptídeo sinal da proteína predita a partir do cDNA <i>egl1</i> de <i>P.echinulatum</i> | 76 |
| Figura 20. Amplificação de fragmento do cDNA <i>egl1</i> de <i>P. echinulatum</i> | 77 |
| Figura 21. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pGEM-T- <i>egl1</i> /P.e. | 78 |

| | |
|--|-----|
| Figura 22. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos de <i>P. echinulatum</i> cDNA <i>egl1</i> | 80 |
| Figura 23. Alinhamento múltiplo (ClustalW) de <i>Penicillium echinulatum</i> EGL1 com outras seqüências de glicosil hidrolases da família 5 (GH5) | 81 |
| Figura 24. Sobreposição das estruturas 3D preditas: <i>T. aurantiacus</i> e <i>P. echinulatum</i> | 82 |
| Figura 25. Análise de restrição para confirmação do vetor pPIC9- <i>egl1</i> /P.e | 84 |
| Figura 26. Digestão enzimática do vetor pPIC9- <i>egl1</i> /P.e. | 85 |
| Figura 27. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pPIC9- <i>egl1</i> /P.e. | 86 |
| Figura 28. Curva de atividade enzimática da endoglicanase 1 de <i>P. echinulatum</i> produzida por <i>Pichia pastoris</i> em sistema heterólogo | 88 |
| Figura 29. Curva de atividade enzimática obtida a partir do planejamento fatorial completo (2^3) | 90 |
| Figura 30. Gráfico da interação entre dois diferentes parâmetros, densidade celular inicial vs % metanol | 92 |
| Figura 31. Gráfico da interação entre dois diferentes parâmetros, densidade celular inicial vs % YNB | 93 |
| Figura 32. Gráfico da interação entre dois diferentes parâmetros, YNB vs % metanol | 93 |
| Figura 33. Ensaio de hidrólise de CMC em placa | 95 |
| Figura 34. Cinética de crescimento celular do clone C4 | 97 |
| Figura 35. Efeito do pH na atividade enzimática de EGL1 recombinante | 99 |
| Figura 36. Efeito da temperatura na atividade enzimática de EGL1 recombinante | 100 |
| Figura 37. Estabilidade térmica em diferentes temperaturas | 101 |
| Figura 38. Ensaio de atividade enzimática sobre distintos substratos | 104 |
| Figura 39. Ensaio de atividade enzimática sobre o substrato MUC | 105 |
| Figura 40. SDS-PAGE e atividade de endoglicanase em gel do sobrenadante de cultura do recombinante de <i>P. pastoris</i> expressando o cDNA <i>egl1</i> | 111 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas | 32 |
| Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para amplificação | 40 |
| Tabela 3. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2^3) | 43 |
| Tabela 4. Composição dos tampões utilizados no ensaio de atividade | 58 |
| Tabela 5. Análise de similaridade das <i>contigs</i> obtidas | 72 |
| Tabela 6. Resultado do planejamento fatorial completo (2^3) | 90 |
| Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática (UI/mL) | 91 |
| Tabela 8. Efeito de distintos íons na atividade de EGL1 de <i>P. echinulatum</i> | 110 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| Å | - angstrom |
| AOX | - proteína álcool oxidase |
| <i>AOX1</i> | - gene que codifica para a álcool oxidase 1 |
| <i>AOX2</i> | - gene que codifica para a álcool oxidase 2 |
| APS | - persulfato de amônio |
| BDA | - batata-ágar –dextrose |
| BMS | - bagaço de serial moído |
| BCA | - bagaço de cana-de-açúcar |
| BGL | - β-glicosidase |
| BrEt | - Brometo de etídeo |
| CBD | - domínio de ligação ao carboidrato |
| cDNA | - ácido deoxirribonucléico complementar |
| CBH | - celobiohidrolase |
| CMC | - carboximetilcelulose |
| cm | - centímetro |
| Da | - Dalton |
| DNA | - ácido deoxirribonucléico |
| dNTP | - deoxirribonucleotídeo |
| DTT | - ditioneitol |
| EDTA | - ácido etilenodiaminotetracético |
| EGL | - endoglicanase |
| EST | - <i>Expressed Sequence Tags</i> (seqüências expressas) |
| g | - grama |
| h | - hora |
| His | - histidina |
| <i>HIS4</i> | - gene que codifica para a histidinol desidrogenase |
| IPTG | - isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo |
| kb | - kilobases |
| kDa | - kiloDaltons |
| kv | - quilo Volts |

| | |
|-------------------|--|
| L | - litro |
| LB | - Luria-Bertani |
| 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 |
| ms | - milisegundos |
| NAM | - ácido N-acetilmurâmico |
| NAG | - N-acetilglicosamina |
| ng | - nanograma |
| nm | - nanômetro |
| °C | - graus centígrados |
| OD ₆₀₀ | - densidade óptica a 600 nm |
| ORF | - <i>Open Reading Frame</i> (quadro de leitura) |
| p/v | - peso por volume |
| PAGE | - eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pb | - pares de base |
| PCR | - reação de polimerização em cadeia |
| pH | - potencial hidrogeniônico |
| pmol | - picomol |
| pNPG | - p-nitrofenil- β -D-glicosídeo |
| 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 | - dodecilsulfato de sódio |
| TEMED | - N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina |
| Tm | - temperatura de desnaturação |

| | |
|---------|---|
| Tris | - tri (hidroximetil) aminometano |
| UI | - unidade internacional de atividade enzimática |
| V | - volts |
| V | - volume |
| v/v | - volume por volume |
| X-gal | - 5-bromo-4-cloro-3indoxil- β -D-galactopiranosídeo |
| YNB | - <i>yeast nitrogen base</i> (Base nitrogenada de levedura) |
| X g | - força gravitacional |
| μ g | - micrograma |
| μ L | - microlitro |

RESUMO

Neste trabalho foram realizados estudos pioneiros de Biologia Molecular com o fungo *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1 (DSM 18942), que resultaram no primeiro isolamento e caracterização de um cDNA correspondente ao gene *egl1*, codificador da endoglicanase 1 (EGL1). O cDNA *egl1* foi obtido a partir de uma biblioteca construída sob condições de indução do sistema celulolítico deste fungo. Sua sequência, de 1161 pares de bases, exibe alto grau de identidade com genes de endoglicanases fúngicas da família 5A. Este codifica uma proteína predita de 387 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 41,1 kDa, ponto isoelétrico teórico de 4,99 e um sitio potencial de N glicosilação. A proteína predita possui três diferentes domínios: um domínio catalítico, um domínio de ligação à celulose (CBD) altamente conservado, e uma região de conexão entre os dois domínios (*hinge*). A partir da sequência predita de aminoácidos de EGL1 foi possível realizar a modelagem tridimensional, utilizando-se proteínas existentes em banco de dados (PDB). Tal proteína apresenta propriedades estruturais similares às endoglicanases da família 5A. O cDNA *egl1* foi clonado em um vetor de expressão de *Pichia pastoris*, pPIC9. Após a transformação, clones recombinantes exibindo maior atividade enzimática foram selecionados, utilizando-se micro-fermentações em placa *Deep Well*. Após a seleção do melhor clone produtor, foram avaliadas as propriedades bioquímicas da enzima recombinante, bem como a otimização das condições de cultivo e posterior caracterização de sua cinética enzimática. A enzima recombinante expressa em *P. pastoris* apresenta características de particular interesse para a utilização em processos industriais: uma atividade ótima na faixa de pH 5,0 – 9,0, temperatura ótima a 60°C, exibindo alta termoestabilidade a 70°C após uma hora de pré-incubação, sendo a atividade da EGL1 recombinante fortemente estimulada pela adição do íon cálcio na reação.

ABSTRACT

This work describes the pioneering molecular biology studies with the fungus *Penicillium echinulatum* lineage 9A02S1 (DSM 18942), which resulted in the first isolation and characterization of a cDNA corresponding to an *egl1* gene, encoding a endoglucanase 1 (EGL1). The *egl1* cDNA was obtained from a library constructed under induction conditions of the cellulolytic system of this fungus. The cDNA sequence is 1,161 base pairs long, showing high identity scores with genes of fungal endoglicanases family 5A. It encodes a predicted protein of 387 amino acid residues, with molecular mass of 41.1 kDa, theoretical isoelectric point of 4.99 and a potential site of N-glycosylation. The predicted protein has three different domains: a catalytic domain, a highly conserved carbohydrate binding domain (CBD), and a region linking the two domains (hinge). From the predicted amino acid sequence of EGL1 it was possible to perform a three-dimensional model, using protein sequences deposited in data bank (PDB). The solved structure revealed that this protein displays structural properties similar to those observed in family 5A endoglucanases. The *egl1* cDNA was cloned in a *Pichia pastoris* expression vector, pPIC9. Following transformation, recombinant clones with higher enzymatic activity were selected, using micro-fermentations in Deep Well plates. After selecting the best producer clone, we evaluated the biochemical properties of recombinant enzyme, as well as the optimization of culture conditions and subsequent characterization of the enzyme kinetics. The recombinant EGL1 secreted by the recombinant *P. pastoris* revealed characteristics of particular interest for industrial applications: an optimal activity over a broad range pH (5.0 – 9.0) and an optimal temperature of 60°C. The recombinant EGL1 showed high thermostability at 70°C after 1 h of pre-incubation, and the activity of recombinant EGL1 was strongly stimulated by the addition of calcium ion in the reaction.

1. Introdução

1.1 Estrutura da Celulose

A celulose, o principal componente da biomassa vegetal, é um polímero linear de resíduos de D-glicose (2000 a 20000) unidos por ligações do tipo beta 1,4, que formam as microfibrilas. A união de 30 destas estruturas irá formar a fibra de celulose, que requer a presença de diferentes enzimas atuando sinergicamente para sua degradação (revisado por Teeri, 1997) (Figura 1). A celulose pode ser encontrada na forma pura, como no algodão, ou associada à hemicelulose e lignina, na parede celular de diferentes plantas, tendo por função fornecer rigidez e proteção (Sandgren *et al.*, 2005). Durante os estágios iniciais de crescimento das plantas, o conteúdo de celulose pode variar entre 35 a 50%, hemicelulose 25 a 35% e lignina 5 a 30%, de seu peso seco (Lynd *et al.*, 2002).

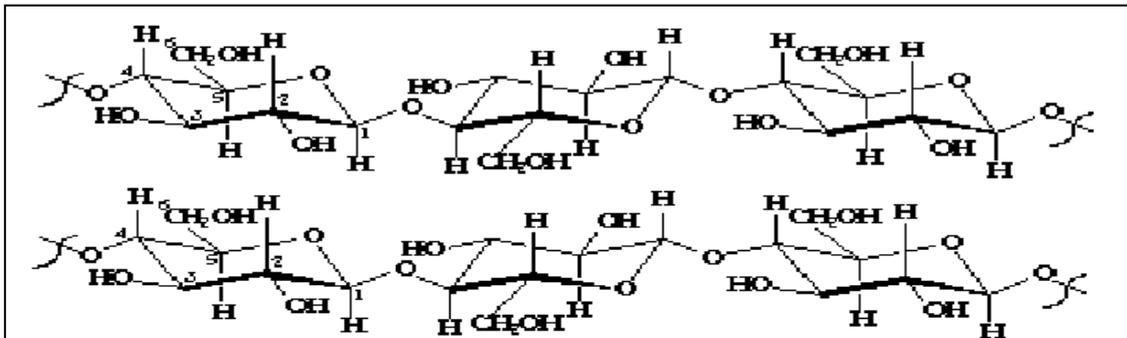


Figura 1. Representação esquemática da celulose, composta por polímeros lineares de resíduos de D-glicose (adaptado de Atas, 2004).

Para a formação da celulose, polímeros adjacentes interagem formando pontes de hidrogênio e organizam-se em estruturas denominadas de microfibrilas, as quais reúnem-se em estruturas maiores, as fibras de celulose. Essas se agrupam em regiões cristalinas mais organizadas, onde as fibrilas são unidas por pontes de hidrogênio tanto intra quanto

intermolecular (Figura 2). Cada camada adjacente de celulose é ainda unida por forças de van der Waals, resultando em uma fibra com alto grau de compactação. Devido a este grau de compactação, a penetração de pequenas moléculas como a água e a ação das enzimas, podem não ocorrer (Lynd *et al.*, 2002).

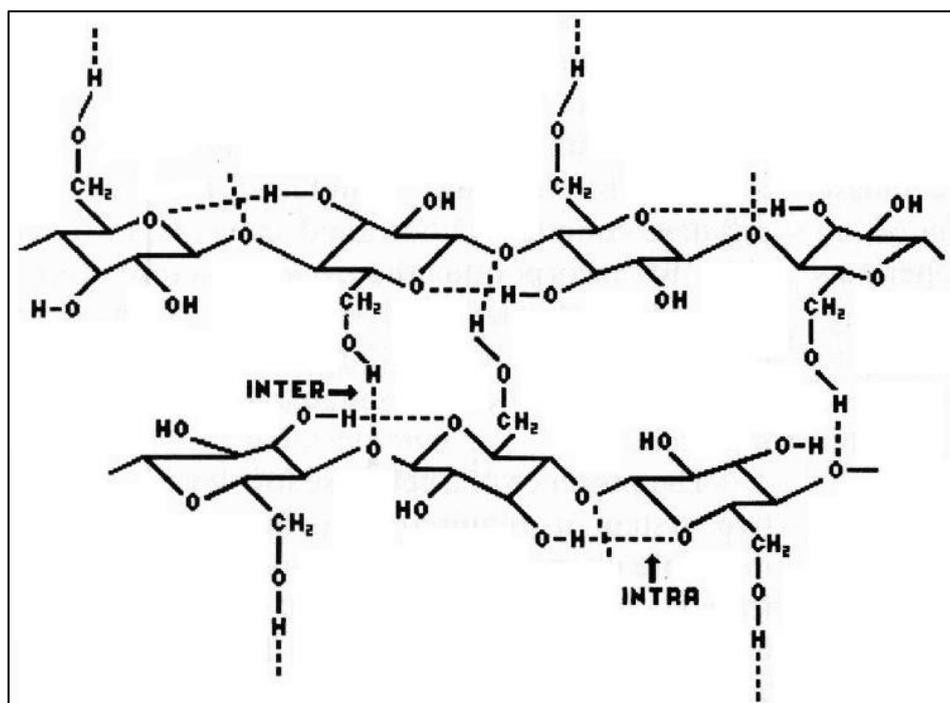


Figura 2. Estrutura cristalina da celulose. Representação das pontes de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra). (adaptado de Radford *et al.* 1996).

As regiões cristalinas são entremeadas por regiões amorfas, onde o grau de compactação dos polímeros é menor (Figura 3). Além das regiões amorfas as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato, permitindo o acesso de moléculas de água e outras moléculas maiores como as enzimas celulolíticas. A unidade repetitiva da celulose é o dissacarídeo de D-glicose chamado celobiose (Figura 4) (revisado por Béguin & Aubert, 1994). Figura 5 mostra a representação esquemática de um corte em uma fibra de celulose.

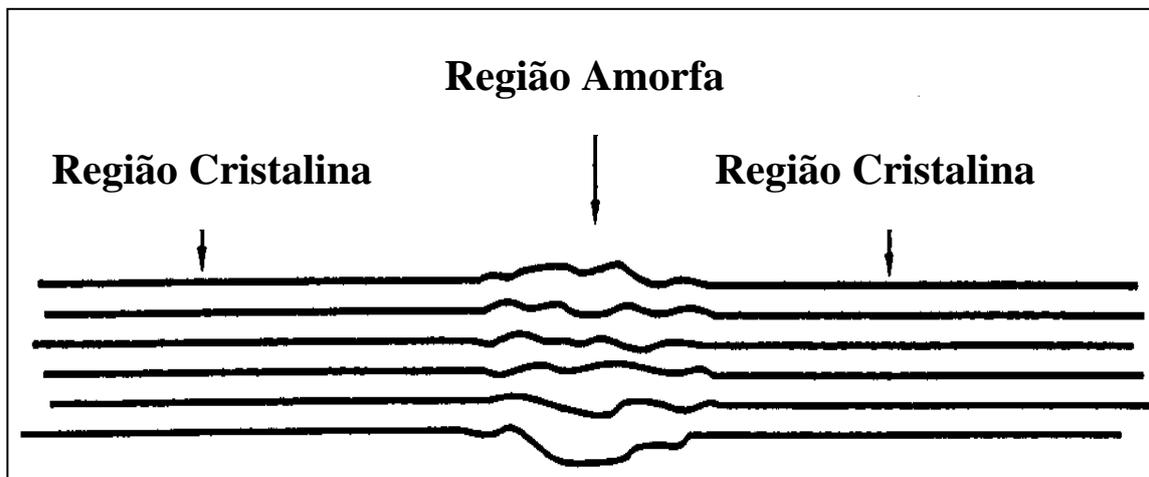


Figura 3. Representação esquemática de uma fibra de celulose, contendo regiões cristalinas que apresentam maior grau de compactação, entremeadas por regiões amorfas que apresentam menor grau de compactação.

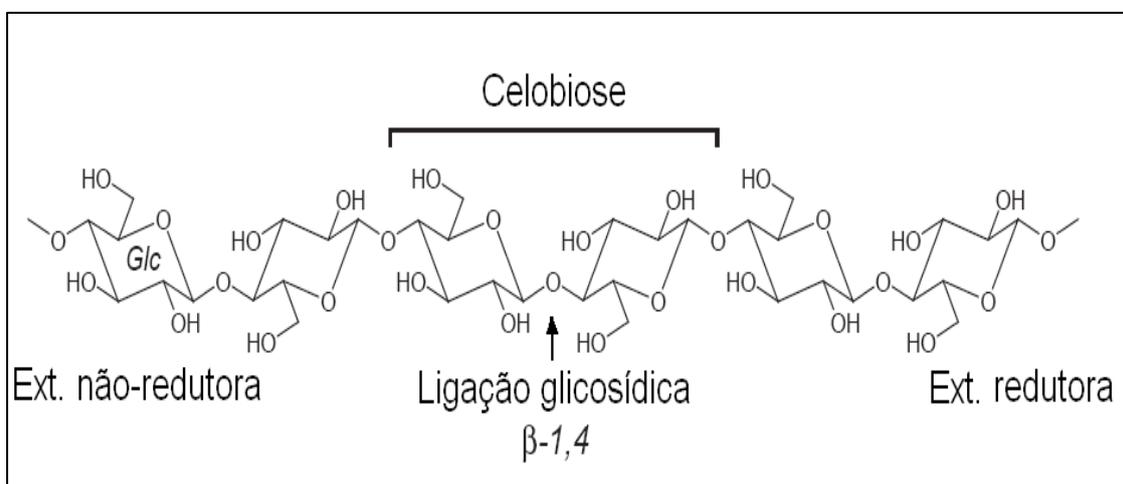


Figura 4. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren *et al.*, 2005).

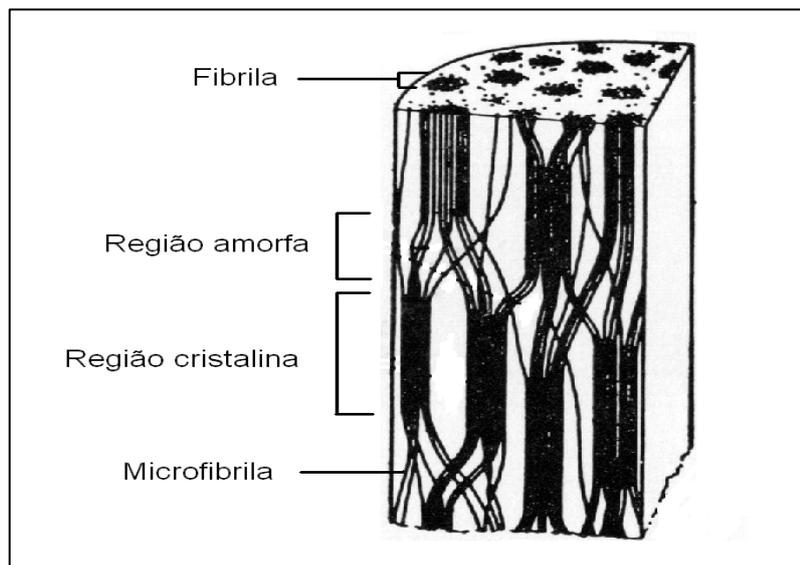


Figura 5. Representação esquemática de um corte em uma fibra de celulose, sendo indicadas suas diferentes regiões e estruturas (adaptado de Cowling, 1963).

1.2. Celulases

As celulases correspondem a um complexo de enzimas naturalmente secretadas por microrganismos como fungos e bactérias. Este complexo também está presente no sistema digestório de algumas espécies de gastrópodes, que apresentam a capacidade de hidrolisar celulose a pequenos oligossacarídeos e a moléculas de glicose (Kubicek *et al.*, 1993).

Dentre estes produtores naturais de celulases, os fungos filamentosos apresentam grande habilidade e versatilidade na degradação de fontes de carbono complexas como: celulose, xilana, lignina e pectina. Tais substratos são utilizados na ausência de fontes de carbono prontamente utilizáveis, visando garantir o seu crescimento trófico (Strauss *et al.*, 1999).

Estudos genéticos realizados inicialmente com os fungos *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii* e *Phanerochaete chrysosporium* revelaram a existência de um sistema especializado para a biodegradação da celulose. Dentre estes, o microrganismo mais estudado, *Trichoderma reesei* (*Hipocrea jecorina*), apresenta um sistema celulolítico composto por distintas hidrolases: endo- β -1,4glicanase (EG I, EG II, EG III, EG IV, EG V, EC 3.2.1.4) e exo- β -1,4glicanase (CBH I, CBH II, EC 3.2.1.91) que hidrolisam as ligações β -1,4, degradando os polímeros de celulose a celobiose. Uma terceira hidrolase, a β -1,4-glicosidase (BG I, BG II, EC 3.2.1.21) degrada a celobiose em duas moléculas de D-glicose (Bisaria & Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000). Acredita-se que as endoglicanases (endo- β -1,4-glicanase) atuem nas regiões amorfas fosfatadas das fibras de celulose, liberando extremidades redutoras e não redutoras que serão atacadas pelas celobiohidrolases (exo- β -1,4-glicanase). Verificou-se que as três enzimas atuam em sinergismo (Messner & Kubicek, 1988) (Figura 6).

As enzimas celulolíticas são reguladas por repressão catabólica, ou seja, o produto final da via enzimática, a glicose, inibe a expressão dos genes. Entretanto, esse fenômeno não é universal, sendo outros sacarídeos capazes de atuar na repressão, tais como frutose, galactose e sacarose (Kubicek *et al.*, 1993; Ilmén *et al.*, 1997; Poças-Fonseca *et al.*, 2000; Suto & Tonita, 2001). Existem evidências que sugerem que a repressão pode ser minimizada pela suplementação do meio com metilxantinas, aumentando o produto de secreção (Camassola & Dillon, 2006).

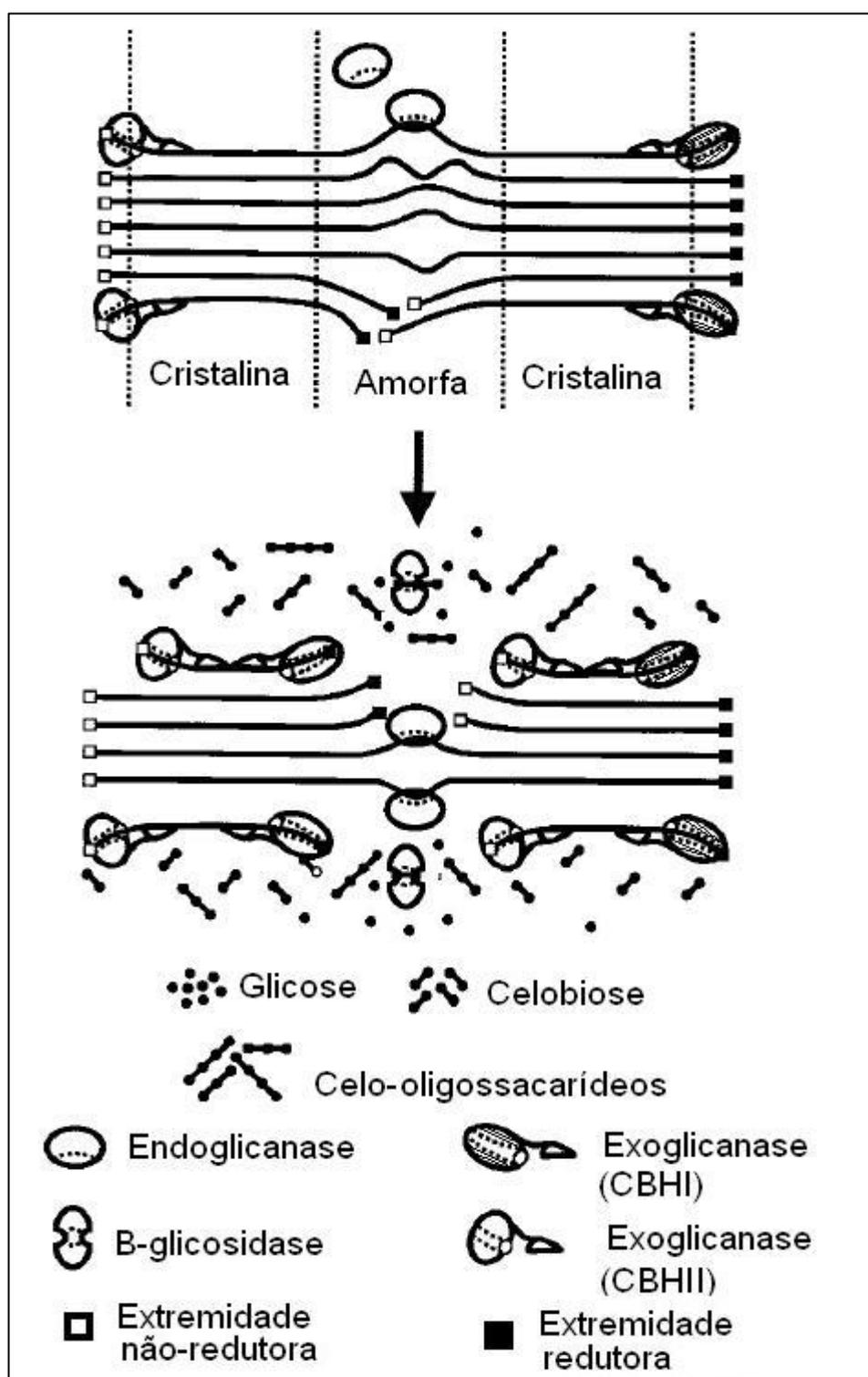


Figura 6. Sinergismo entre endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidasas, para a hidrólise da celulose pelo sistema celulotítico. O esquema mostra as regiões de ação de cada uma das celulases (adaptado de Lynd *et al.*, 2002).

1.3 Classificação de Celulases (Glicosil Hidrolases)

Glicosil hidrolases (EC 3.2.1.x) são um amplo grupo de enzimas que realizam a hidrólise glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre um agrupamento carboidrato e um não-carboidrato e podem ser encontradas nos três maiores reinos archaeobacteria, eubacteria e eucaria. Um primeiro sistema de nomenclatura enzimático IUB-MB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) de glicosil hidrolases é baseada em sua especificidade por substrato e, ocasionalmente, em seu mecanismo molecular, tal classificação, não reflete e não se destina as características estruturais destas enzimas.

Uma segunda classificação para glicosil hidrolases, leva em conta a similaridade das seqüências de aminoácidos, sua arquitetura de dobramento e foi proposta há alguns anos por Henrissat, onde se observou que a arquitetura de dobramento é mais conservada que as seqüências, podendo estas serem agrupadas e organizadas em clãs (grupo de enzimas que apresentam semelhante conformação tridimensional) (Henrissat, 1991; Coutinho & Henrissat, 1999). Utilizando o sistema de classificação para hidrolases proposto por Henrissat, baseado na semelhança de seqüências e estruturas de dobramento, foram definidas 115 famílias diferentes. Esta classificação está disponível no CAZy (*Carbohydrate-Active EnZymes*) (http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html). Uma vez observado que a variação nas seqüências protéicas é elevada, as famílias de endoglicanases foram divididas em seis subfamílias, A1-A6 (Opassiri *et al.*, 2007).

1.4 Mecanismo catalítico de Glicosil Hidrolases

O mecanismo catalítico de Glicosil hidrolases pode operar de duas formas distintas: (1) Retenção da configuração do carbono anomérico (2) Inversão da configuração do carbono anomérico.

A retenção de glicosil hidrolases opera via um duplo mecanismo de deslocamento direcionando a retenção da configuração do carbono anomérico após sua catalise, envolvendo passos de glicosilação e deglicosilação. Os grupos catalíticos são dois ácidos carboxílicos os quais podem estar em um ou outro lado da cadeia glicosídica podendo ser resíduos de Aspartato ou Glutamato. Na retenção de glicosidases a distância entre esses grupos é em torno de 5,5 Å (Figura 7). Na primeira etapa um grupo carboxílico age como um ácido promovendo a catálise ácida do oxigênio glicosídico, enquanto o outro atua como uma base (nucleofílico) formando uma enzima intermediária covalente (glicosil-enzima). Acredita-se que o estado de transição tenha principalmente um caráter dissociativo, isto é, a quebra das ligações glicosídicas acontece antes do ataque pelo grupo nucleofílico. A segunda etapa da reação envolve o ataque as ligações da enzima monossacarídica por uma molécula de água, com a transferência simultânea de um próton da água para o doador de prótons, de uma maneira inversa a primeira etapa, se um açúcar acceptor ataca o intermediário ativo do substrato da enzima, em vez da molécula de água, uma nova ligação glicosídica é formada e neste caso a reação é chamada transglicosilação. Contudo o rendimento das reações de transglicosilação é tipicamente baixo porque o produto desta é utilizado como substrato para a hidrólise da enzima. (Brás *et al.*, 2009)

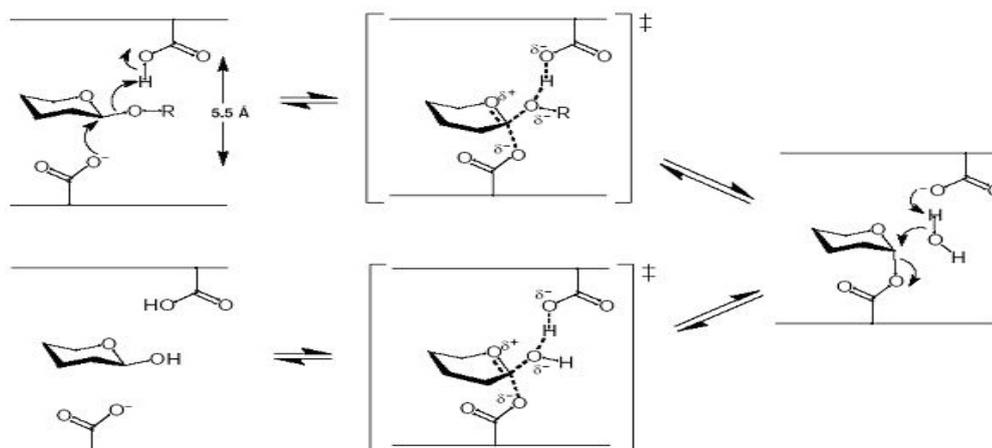


Figura 7. Representação esquemática da reação de retenção adaptado de (http://www.cazy.org/fam/ghf_INV_RET.html)

O processo de inversão das glicosil hidrolases leva a inversão da configuração anomérica via um simples deslocamento. A hidrólise de uma ligação beta glicosídica produz uma configuração alfa ou beta dependendo do substrato utilizado. A maquinaria catalítica dessas enzimas envolve dois aminoácidos carboxilados da enzima que atuam como ácido e base respectivamente. Neste caso uma molécula de água ativada pelo resíduo básico ataca o centro anomérico hidrolizando a ligação glicosídica, ocorrendo a inversão anomérica (Motomitsu *et al.*, 2009, Nascimento, 2008).(Figura 8).

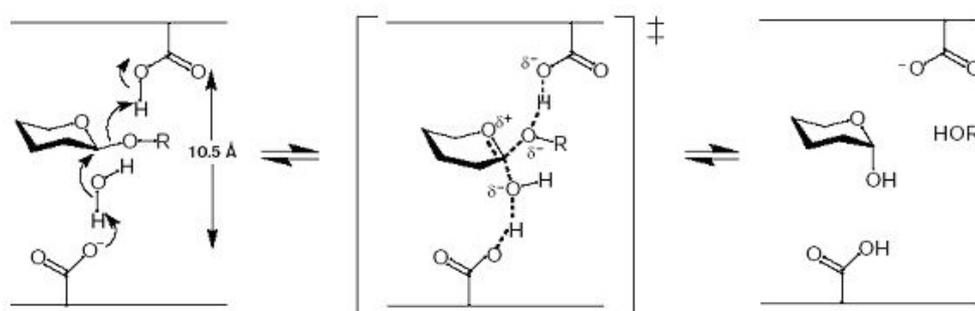


Figura 8. Representação esquemática da reação de inversão adaptado de (http://www.cazy.org/fam/ghf_INV_RET.html)

1.5 Hidrolases da família 5

Glicosil hidrolases da família 5, fazem parte do clã GH-A que contém 18 famílias, compreendem enzimas com uma região conservada contendo um resíduo de ácido glutâmico, que é potencialmente envolvido no mecanismo catalítico. A estrutura destas hidrolases é formada por β -folha e α -hélice (β/α)₈, sendo conhecidas até agora 32 estruturas (3D) desta família (Figura 9).

Na maioria dos casos, a hidrólise das ligações glicosídicas por enzimas deste clã é realizada por dois resíduos catalíticos: um geralmente ácido (doador de prótons) e um básico (nucleófilo). Dependendo da posição espacial destes resíduos catalíticos a hidrólise ocorre através da Retenção ou Inversão da configuração anomérica (Figuras 7 e 8). Em alguns casos, o nucleófilo catalítico não é suportado pela enzima, sendo substituído pelo grupo acetamido em C-2 do substrato.

Diversas atividades são conhecidas para esta família de hidrolases como: Quitosanase (EC 3.2.1.132); β -manosidase (EC 3.2.1.25); Celulase (EC 3.2.1.4); glican-1,3- β -glicosidase (EC 3.2.1.58); liqueninase (EC 3.2.1.73); glican endo-1,6- β -glicosidase (EC 3.2.1.75); manan endo-1,4- β -manosidase (EC 3.2.1.78); endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8); celulose 1,4- β -celobiosidase (EC 3.2.1.91); endo-1,6- β -galactanase (EC 3.2.1.x); β -1,3-mananase (EC 3.2.1.x); xiloglican-specific endo- β -1,4-glicanase (EC 3.2.1.151) (<http://www.cazy.org/fam/GH5.html>).

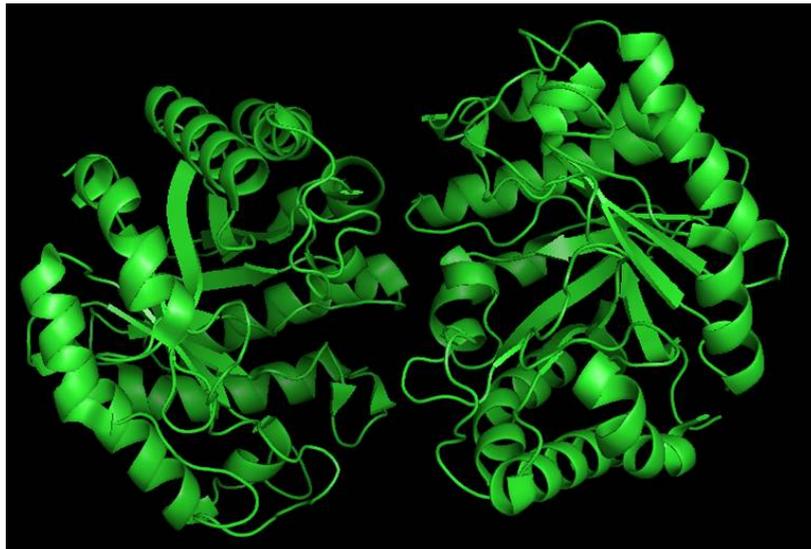


Figura 9. Estrutura 3D da Endoglicanase-1GZJ de *Thermoascus aurantiacus* pertencente a família 5A de glicosil hidrolases (EC 3.2.1.4) Endo-1,4- β -glucanase 5A, sendo sua estrutura 3D formada por β -folha e α -hélice (β/α)₈. (Proteína dimérica) (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1GZJ>)

Por apresentarem uma grande diversidade de atividades e degradarem um variado número de substratos, genes de hidrolases da família 5 podem ser encontradas nos mais distintos organismos e nos mais complexos meios, 60% das enzimas desta família são originárias de bactérias, apenas 2% de archaea e 38% de origem eucariótica. (coutinho & Henrissat, 1999).

Neste sentido pesquisando genes previamente identificados como hidrolases e envolvidos no sistema glandular de animais de origem simbiótica, Smant *et al.* (1998), isolaram e caracterizaram genes das glândulas do esôfago de nematóides e de cistos de *Globodera rostochiensis* e *Heterodera glycines*. De cada espécie de nematóide, foram obtidos dois cDNAs. Estes foram caracterizados e revelaram pertencer à família 5A de glicosil hidrolases. Com este mesmo modelo de estudo, Goellner *et al.* (2001), estudaram a origem das enzimas (endo- β -1,4-Glicanases) envolvidas nas alterações da parede

celular pela interação planta patógeno. Plantas de tabaco foram infectadas em suas raízes com cistos e nematóides. Decorrido o tempo necessário para a infecção, foi possível identificar cinco endoglicanase semelhantes as encontradas em planta que pertencem à família GH5A.

Haegeman *et al.* (2008), relataram a descoberta de quatro diferentes endoglicanases da família 5 (GHF5) isolados de nematóide (*Radopholus similis*). As quatro proteínas correspondentes tinham um putativo peptídeo sinal de secreção, sendo que duas das proteínas apresentavam como adicional um *linker* e um domínio de ligação ao carboidrato (CBM). Os tamanhos preditos para as endoglicanases são respectivamente 49, 48, 39 e 35 kDa. Quando visualizado as atividades em zimograma, foi observado uma diferença entre o tamanho das bandas observadas e a predição de sua massa molecular, fato que poderia ser explicado pela existência de putativos sítios de N-glicosilação.

Utilizando o conteúdo do rúmeme de animais, foi isolado e clonado um gene de endoglicanase (Cel5A) de *Eubacterium cellulosolvens* 5, composto por 3444pb que codifica uma proteína de 1148 aminoácidos, com uma massa molecular aproximada de 127 kDa, apresentando atividade sobre CMC, lichena, swolenina ácida e Xilana (*oat spelt xylan*). (Yoda *et al.*, 2005). Da mesma forma Matsui *et al.* (2001), isolaram e clonaram um gene de endoglicanase de *Prevotella ruminicola* JCM8958T. O gene é composto de 927 nucleotídeos e codifica uma proteína com 322 resíduos de aminoácido, com uma massa aproximada de 37 kDa, apresentando atividade sobre CMC, lichena e Avicel.

Bischoff *et al.* (2006) avaliaram 47 linhagens de bactéria termofílicas, quanto a sua atividade celulolítica. A linhagem identificada como *Bacillus licheniformis* (B-

412361) apresentou atividade sobre CMC. A proteína foi isolada, purificada e sua região amino terminal seqüenciada apresentou homologia com glicosil hidrolases da família 5.

Induzindo stress salino em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.). Opassiri *et al.* (2007) isolaram e clonaram um cDNA que codifica 510 resíduos de aminoácidos, tendo sua proteína madura 491 resíduos. Após sua identificação a proteína madura foi identificada como membro de um sub-grupo de enzimas de planta-específica do subgrupo da família GH5.

Preparada uma biblioteca de cosmídeos em *E. coli*, a partir do DNA extraído do conteúdo do cecum de coelho e testado quanto à atividade de celulasas, onze independentes clones foram obtidos, sub-clonados, seqüenciados e analisados. Dos clones obtidos 4 endo- β -glicanases pertencentes a família das glicosil hidrolase 5, foram identificados (Feng *et al.*, 2007).

Elifantz *et al.* (2008) pesquisaram a diversidade e abundância de glicosil hidrolases da família 5 no norte do oceano Atlântico. Foram montadas três bibliotecas de clones utilizando bactérias coletadas de estruturas deixadas no mar anteriormente. A abundância de genes de glicosil hidrolases da família 5 foi estimada por PCR quantitativa e positivamente correlacionada com a concentração de clorofila existente em cada ambiente.

Um gene de endoglicanase foi obtido da levedura psicrotrófica isolada do solo, *Rhodotorula glutinis* KUJ2731. Esta enzima apresenta uma massa de aproximadamente 40 kDa e ponto isoelétrico de 8,57. A enzima é ativa em temperaturas que variam entre 0°C a 70°C, sendo a ideal 50°C para carboximetilcelulose (CMC) (Oikawa *et al.*, 1998).

Krogh *et al.* (2009) isolaram e clonaram um gene de endoglicanase (cel5C) de *Penicillium brasilianum*, que foi expresso em *Aspergillus oryzae*. Os autores relatam ser a segunda GH5 EG do gênero *Penicillium* existente na base de dados do CAZy. A enzima apresenta pH ótimo na faixa de 4,0 e temperatura ótima a 70° C. A região codificadora é formada por 1471 pb, interrompida por quatro introns, e que codifica um polipeptídeo de 421 aminoácidos sendo a massa molecular estimada em 42,56 kDa.

1.6 Emprego Industrial das Celulases

Celulases são atualmente a terceira maior indústria de enzimas em todo o mundo, em volume de dólares negociados, devido à sua utilização no processamento de algodão, reciclagem de papel, formulação de detergente, extração de sucos, bioestonagem e biopolimento de tecidos, produtos dermatológicos, pigmentos, extração de óleo vegetal, produção de álcool, como adjuvante para malte na fabricação de cerveja, sendo também utilizadas como constituintes de rações animais e em indutores de silagem (Dillon, 2004, Wilson, 2009). A indústria mundial de enzimas obteve um faturamento total de US\$ 3,7 bilhões em 2004, com uma previsão de crescimento da demanda mundial de 6,5% ao ano até 2009. No que diz respeito ao mercado de enzimas industriais, o faturamento em 2004 somou US\$ 2,3 bilhões de dólares, com um crescimento esperado para os próximos dez anos de 5,7% ao ano, em valor transacional, podendo atingir US\$ 4 bilhões no ano de 2014 (Sá-Pereira *et al.*, 2008).

No entanto, as celulases se tornarão a maior indústria de enzimas, se etanol, butanol, ou algum outro produto da fermentação de açúcares, produzido a partir de biomassa por enzimas, for elaborado de forma viável e se tornar um combustível de

transporte barato e rentável (Wilson, 2009). Graças ao seu grande emprego, as celulases são consideradas essenciais na catálise de alguns processos e na elaboração de novos produtos (Haakana *et al.*, 2003).

A utilização de enzimas para a hidrólise de celulose de algodão tem sido estudada em pormenor desde a década de 1980, quando as enzimas foram introduzidas para substituir pedras pomes em processos de finalização de tecidos (efeito *stonewashing*). Atualmente cerca de 26% de todas as empresas têxteis utilizam enzimas em seus processos, sendo o mercado de enzimas para este setor estimado em US\$ 200 milhões de dólares (Heikinheimo *et al.*, 2003). O tratamento com celulases tem-se afirmado nos últimos anos como uma forma ecológica de processar o algodão. As duas aplicações mais frequentes são a obtenção do aspecto usado do jeans (bioestonagem) e a remoção de borbotos e fibras soltas em tecidos de algodão (biopolimento), estes efeitos de acabamento são geralmente obtidos com misturas celulolíticas brutas e em processos com forte agitação (Cavaco-Paulo, 1995). Sua aplicação na indústria têxtil tornou os processos de bioestonagem e biopolimento de tecidos, que anteriormente se apresentavam como muito abrasivos desgastando excessivamente os tecidos (jeans), em processos mais amenos, possibilitando a retirada do excesso de corante dos tecidos e aumentar o brilho destes pela retirada de microfibrilas desorganizadas. Este fato tem estimulado estas empresas a inovar, empregando processos que utilizem celulases especialmente produzidas para esta finalidade (Dillon, 2004). Com este intuito, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas objetivando aprimorar estes processos, obtendo-se celulases em alto grau de pureza associado à otimização mecânica dos processos de bioestonagem e biopolimento. Desta forma Boisset *et al.* (1997), trabalhando com uma endoglicanase V recombinante produzida pelo fungo *Humicola insolens*, demonstraram

que o processo de biopolimento pode ser realizado utilizando celulases em pequenas quantidades juntamente com a lavagem dos tecidos, resultando na remoção das fibras superficiais dos tecidos, devolvendo o aspecto de novo, não sendo evidenciada a sua atuação no interior das fibras (Figura 10).



Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fibras de tecido de algodão (a) fibra original de algodão (b) fibra após 25 lavagens convencionais consecutivas, (c) fibra após 25 lavagens convencionais e uma lavagem com adição de endoglicanase V (adaptado de Boisset *et al.*, 1997).

Neste mesmo sentido, diferentes autores avaliaram o biopolimento do algodão utilizando celulases e xilanases comerciais em dois sistemas distintos, um sistema com agitação e o outro sem agitação, sendo variada a concentração da enzima e o tempo de tratamento dos tecidos. Os resultados obtidos sugerem que estas enzimas podem ser utilizadas em processos de biopolimento, sendo os principais parâmetros que afetam o tratamento, a concentração da enzima, o mecanismo de agitação e o tempo de tratamento (Cavaco-Paulo *et al.*, 1996; Kundu *et al.*, 1996; Gulrajani *et al.*, 1998; Csizár *et al.*, 2001; Verenich *et al.*, 2008).

Outro fator que deve ser considerado com relação às técnicas de lavagem e biopolimento do jeans está relacionado ao pH ótimo das celulases utilizadas. Celulases ácidas ou neutras podem ocasionar a re-deposição do corante utilizado para colorir o

algodão. Quando utilizado celulasas alcalinas esta re-deposição não é observada.

Utilizando uma endoglicanase alcalina estável, conhecida como T-EG, obtida a partir de *Thermomonospora* sp., um microrganismo alcalófilo e termofílico, Anish *et al.* (2007) realizaram experimentos de biopolimento e re-deposição, constatando que esta enzima se apresentava efetiva para o tratamento dos jeans, não ocorrendo a re-deposição de corante, sendo a enzima ativa mesmo em condições não tamponadas.

A utilização de enzimas de fungos do gênero *Penicillium* para a bioestonagem e biopolimento de tecidos apresenta-se como uma excelente alternativa às enzimas produzidas por fungos de outros gêneros como *Trichoderma* e *Humicola*, as quais são comercializadas em grande escala. Desta forma, um mutante de *P. occitanis* (Pol6), que secreta um conjunto de enzimas com alta atividade, foi avaliado quanto ao seu emprego para os processos de biopolimento e bioestonagem de tecidos. Seus resultados demonstraram que o conjunto de enzimas secretadas pela linhagem Pol6, apresenta alta atividade sobre os tecidos tratados, sendo seu efeito abrasivo muito uniforme e com eficiência comparável à obtida com enzimas comerciais (Belghith *et al.*, 2001).

Celulasas de *Acrophialophora nainiana* e *Penicillium echinulatum*, foram utilizadas no acabamento de tecidos de malha de algodão (*stonewashing*) e comparadas com os tratamentos enzimáticos utilizando celulasas de *Trichoderma reesei*. Ambas as celulasas testadas, reduziram a tendência de remoção das fibras (*pilling*) com uma menor perda de peso. Celulasas produzidas por *P. echinulatum* apresentaram melhores resultados para a remoção da cor e uma menor redeposição dos corantes (*stonewashing*), quando comparado às outras enzimas testadas, sob as condições de ensaio (Rau *et al.*, 2008).

Outro emprego para as celulases na indústria têxtil está relacionado à remoção de parte da celulose que compõe os tecidos ditos mistos, onde as proporções de fibras naturais e artificiais são variáveis. A remoção de parte das fibras de celulose resulta em um tecido mais macio e de melhor aspecto. Vasconcelos & Cavaco-Paulo, (2006) estudaram a combinação de diferentes ações para a remoção de parte da celulose que compõe estes tecidos. O resultado de seus estudos aponta para uma combinação de ações entre efeitos mecânicos e enzimáticos, sendo possível tornar os tecidos mais macios e resistentes, evitando o seu desgaste excessivo. Esta metodologia, comparada à tradicional, que utiliza ácido para remover estas fibras, se demonstra menos abrasiva (Figura 11).

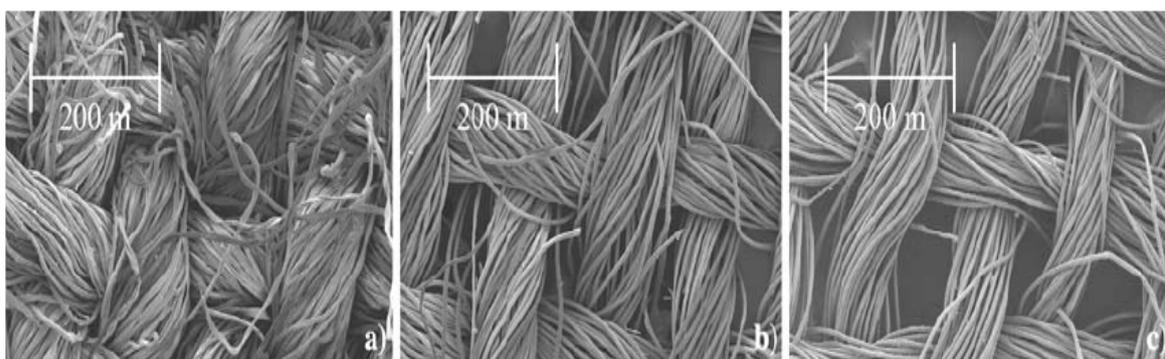


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura (100x) de um tecido misto composto por poliéster/algodão tratado com diferentes agentes para a remoção de fibras de algodão. (a) Fibras sem tratamento, (b) Fibras tratadas com celulase, (c) Fibras tratadas com ácido sulfúrico. (Retirado de Vasconcelos & Cavaco-Paulo, 2006)

Utilizando diferentes enzimas para realizar o biopolimento de tecidos de poliéster e mistos de algodão/poliéster, McCloskey & Jump (2005) relatam a utilização de duas cutinases distintas e a associação entre cutinases e celulases compatíveis na proporção de 50/50. Os resultados demonstraram que 100% dos tecidos de poliéster e poliéster/algodão podem ser tratados com estas enzimas isoladas, ou em conjunto,

resultando em um excelente acabamento, sendo esta metodologia uma possível alternativa aos processos químicos e mecânicos utilizados atualmente nas indústrias.

Novas metodologias estão sendo testadas para o tratamento de tecido de algodão, utilizando o extrato total contendo as celulasas de *Trichoderma reesei*. Os tratamentos são realizados em duas etapas variando-se a temperatura, quantidade de enzima bem como agitação e tempo de tratamento. Com esta metodologia se observa uma diminuição no peso das amostras e um aumento na taxa de hidrólise, quando comparado a processos que não utilizam duas etapas de tratamento (Schimper *et al.*, 2008).

Com base nestes dados, podemos constatar que o mercado de celulasas apresenta-se altamente promissor para a utilização destas em processos indústrias, com aplicação direta na indústria têxtil. Desta forma cria-se um ambiente favorável ao desenvolvimento de tecnologias que visem ao fornecimento dessas enzimas em larga escala e em elevado grau de pureza para as distintas áreas indústrias bem como a têxtil e a de papel, que têm seu processo produtivo encarecido pela importação desses insumos.

1.7 *Pichia pastoris* como sistema de expressão heteróloga

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, que pode ser geneticamente modificada para produzir um grande número de proteínas tanto a nível experimental como industrial. Utilizando este sistema mais de 400 proteínas já foram expressas, apresentando diferentes graus de sucesso (Cereghino *et al.*, 2002). Dentre as características observadas e desejadas de *P. pastoris* como sistemas de expressão heteróloga destacam-se: facilidade de manipulação genética, tendo sido seu genoma recentemente seqüenciado (Schutter *et al.*, 2009), apresenta crescimento a alta densidade

celular (>500 OD₆₀₀), uma via eucariótica de secreção capaz de promover modificações pós-traducionais como a formação de pontes dissulfeto, O- e N-glicosilação, expressão de proteínas em altos níveis tanto intracelular como extracelular, apresenta um promotor forte induzível que dirige a expressão das proteínas heterólogas (AOX), aumentando sua expressão em até 100 vezes quando na presença de metanol, após estabelecidas as condições de cultivo em pequena escala, o escalonamento não necessita de grandes modificações, existência de linhagens protease deficientes que secretam baixas quantidades de proteínas endógenas no meio de crescimento facilitando as etapas seguintes de purificação (Tschopp *et al.*, 1987; Cereghino *et al.*, 2002; Daly & Hearn, 2005). Recentemente Mattanovich *et al.*, (2009) caracterizaram o secretoma de *P. pastoris* utilizando a linhagem DSMZ 70382, crescida em glicose. Analisado o meio de cultivo, só 20 proteínas são naturalmente secretas a níveis detectáveis. Segundo os autores apenas algumas proteínas e proteinases não são realmente secretadas em glicose, sugerindo que o crescimento em metanol não apresente grandes diferenças no padrão de proteínas secretadas a nível detectável. Por possuir o *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e por ser não-patogênico, este microrganismo é utilizado para a síntese de diferentes produtos (Hohenblum *et al.*, 2004). Por apresentar estas características esse sistema é considerado de uso rápido, fácil e mais econômico que os sistemas de expressão derivados de eucariotos superiores, baseados em cultura de células de mamíferos (Gellissen, 2000).

Uma das características que fazem desta levedura um dos sistemas heterólogos mais promissores é a existência de um promotor regulável da própria levedura (AOX) que utiliza o metanol como fonte de carbono (agente desrepressor), desencadeando a produção da enzima álcool oxidase que por apresentar uma baixa afinidade por oxigênio,

é hiperexpressa chegando a 35% do total de proteínas do meio de cultura (Sreekrishna *et al.*, 1997).

A álcool oxidase catalisa os primeiros passos na via metabólica para a oxidação do metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio, ocorrendo nos peroxisomos, seguido por uma etapa metabólica subsequente no citoplasma. Existem dois genes em *P. pastoris* que codificam para álcool oxidase (AOX) – *AOX1* e *AOX2* – sendo o primeiro responsável por 85 % da atividade de álcool oxidase na célula (Cregg & Cereguino, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Jahic, 2003; Gellissen, 2000; Daly & Hearn, 2005).

P. pastoris tem sido reclassificada dentro de um novo gênero *Komagataella* proposto por Yamada *et al.*, (1995). Posteriormente este gênero foi acrescido de três espécies, *K. pastoris*, *K. phaffii* e *K. pseudopastoris* (Kurtzman, 2005). As linhagens utilizadas para aplicação biotecnológica foram reclassificadas em duas espécies *K. pastoris* e *K. phaffii*. As linhagens GS 115 e X 33 passaram a ser conhecidas como *K. phaffii*, enquanto as SMDs da serie de linhagens protease deficientes (mais popular SMD1168) são classificadas dentro da espécie *K. pastoris* (Kurtzman, 2005).

1.8 Expressão de celulases em *P. pastoris*

A levedura *P. pastoris* naturalmente não apresenta atividade celulolítica e por este motivo, muitas celulases são expressas e caracterizadas utilizando-se este organismo como sistema heterólogo. A expressão dessas enzimas em *P. pastoris* tem por objetivo obter a enzima em grandes quantidades e com elevado grau de pureza, principalmente para aplicação industrial nos mais diferentes setores. Genes de celulases de diversos fungos e plantas têm sido rotineiramente clonados e expressos em *P. pastoris*.

Desta forma Ferrarese *et al.* (1998) isolaram e clonaram os genes de duas endoglicanases de pimenteiro denominadas de cCel1 e cCel2, apresentando ambas uma massa molecular de 54 kDa e ponto isoelétrico 8,5 e 7,2 respectivamente, a atividade enzimática medida pelo método de viscosidade apresentou valores distintos para cCel1 1000Unid/100µg de proteína/hora e para cCel2 1400Unid/100µg de proteína/hora, sendo observado que estas enzimas apresentavam diferentes graus de sensibilidade a degradação proteolítica. Uma endo-1,4-β-glucanase isolada de *Brassica napus* denominada Cel16, apresentou uma massa predita de 59 kDa. Quando determinada a massa molecular por SDS-PAGE, foi observada uma massa molecular distinta da predita (130 kDa), após uma reação de deglicosilação a massa molecular da proteína se assemelhou ao valor predito (60 kDa), sugerindo um aumento de massa devida a N-glicosilação. A Atividade enzimática foi avaliada pelo método viscosimétrico sendo expressa em atividade específica (0,05 Umg⁻¹) (Molhoj *et al.*, 2001).

Isolados três genes de endoglicanase de *Bursaphelenchus xylophilus* (nematóide) que apresentava massa molecular esperada de 25,4 kDa; 30,3 kDa e 36,4 kDa respectivamente. Pela análise destas proteínas em gel de SDS-PAGE as massas não apresentaram correspondência com aquelas preditas, sendo as encontradas em sua maioria superiores, 18 kDa; 39 kDa e 140 kDa respectivamente. Fato devido a formação de pontes de dissulfeto na primeira proteína e artefatos de glicosilação nas duas outras (Shibuya & Kikuchi, 2008).

Já utilizando fungos filamentosos como doadores de genes Ding *et al.* (2001), isolaram um gene de endoglicanase de *Volvariella volvacea*, cuja proteína apresenta uma massa molecular de 42 kDa e ponto isoelétrico de 7.7. Este gene apresenta uma ORF de 1167 pb que codifica 389 aa. A atividade enzimática foi medida pelo método de

Somogyi-Nelson resultando em valores de atividade específica de 241 Umg^{-1} . Da mesma forma Wu *et al.* (2007), compararam genes de *Volvariella volvacea* produtores de endoglucanase I, GE1 e GE1-CM (apresentando o CBD truncado) sendo que as proteínas transcritas apresentaram respectivamente 45 kDa e 43 kDa. Pela análise das atividades específicas dos recombinantes, GE1 se mostrou mais eficiente que GE1-CM para os diferentes substratos utilizados. Acredita-se que esta diferença se deva a perda da capacidade de ligação ao substrato pelo recombinante GE1-CM.

O gene de endoglicanase *cel12* de 720 pb foi isolado de *Fomitopsis palustris*, codifica uma proteína de 244 aa, que não apresenta o domínio de ligação ao carboidrato. A atividade enzimática foi determinada pelo método de Somogy-Nelson resultando em 118,21 U (Byeong-Cheo *et al.*, 2008).

Wonganu *et al.* (2008) isolaram e clonaram um gene de endoglucanase de *Syncephalastrum racemosum*, de 340 aa. O gene transcrito resultou em duas proteínas uma apresentando tamanho esperado de 55 kDa e uma segunda truncada com massa aparente de 30 kDa. As atividades foram medidas pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Da mesma forma Koseki *et al.* (2008) isolaram e clonaram um gene de endoglicanase de *Aspergillus kavachii*. Este gene com 1200 pb quando expresso produz uma proteína de 78 kDa, um recombinante faltando o CBD também foi expresso e apresentou uma massa de 28 kDa, ambas as enzimas testadas apresentaram uma fraca atividade sobre substratos solúveis, não apresentando atividade sobre substratos insolúveis. As amostras foram analisadas utilizando Cromatografia de alto desempenho de troca aniônica com detector amperométrico de pulso (HPAEC-PAD, *high-performance anion-exchange chromatography with a pulsed amperometric detection*).

Um gene de 1,3-1,4- β -D-glicanase de *Fibrobacter succinogenes* truncada foi otimizada e expressa em *Pichia pastoris*, utilizando a seqüência do peptídeo sinal de *S.cerevisiae* (fator- α). Para a otimização dos códons foram alterados 189 nucleotídeos sendo o conteúdo G + C ajustado para cerca de 48-49%. A produção da endoglicanase resultante (secretada) se apresentou surpreendente alta chegando a 3 gL⁻¹, sendo significativamente superior a nativa truncada que apresentou valores de 0,11 gL⁻¹ (Huang *et al.*, 2008).

1.9 *Penicillium echinulatum*

Fungos do gênero *Penicillium* são mundialmente conhecidos como bons produtores de celulasas. Tais fungos se caracterizam por suas densas estruturas de esporos, apresentando conidióforos simples ou ramificados e terminados por agrupamentos de fiálides, sendo seus conídios produzidos em cadeia nas extremidades das fiálides (revisado por Velho, 2000). Dentre as espécies do gênero *Penicillium*, a espécie *echinulatum* é pouco estudada até o momento. Esta espécie pertence à classe *Euascomicota*; sub-classe *Euascomycetes*; ordem *Eurotiales*; família *Trichocomaceae* e apresenta conidióforos duplamente ramificados, triverticilados, sendo facilmente identificada por seu perfil simples de metabólicos secundários, não apresentando a produção de micotoxinas no sobrenadante de suas culturas (Frisvad & Filtenborg, 1983).

Quando comparada a outras espécies tais como *P. funiculosum* e *P. pinophilum*, *P. echinulatum* apresenta níveis similares e/ou superiores de secreção enzimática, bem como, quando comparado com *Trichoderma harzianum* (Joglekar & Karanth, 1984; Sadler *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1987).

Dentre os diversos fungos produtores de celulases descritos no Brasil, destaca-se a linhagem de *P. echinulatum* denominada 2HH, isolada no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, a partir do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum*. Por meio de sucessivos ciclos de mutação e seleção, novas linhagens foram selecionadas pela capacidade de hidrolisar celulose, visando desta forma, a obtenção de linhagens com melhor perfil para a produção de celulases. Estas linhagens selecionadas apresentam níveis de secreção superiores à linhagem parental e comparáveis aos de outras linhagens hiper-secretoras, como a RUT-30 de *T. reesei*, possuindo, portanto alto potencial biotecnológico (Dillon *et al.*, 1992; Fachini *et al.*, 1995; Mandelli *et al.*, 1995).

A cepa que originou a linhagem utilizada neste trabalho foi obtida e selecionada após tratamento com peróxido de hidrogênio e luz Ultra Violeta (UV), sendo utilizado como fator de seleção a resistência ao fungicida benomil (Fachini *et al.*, 1995; Mandelli *et al.*, 1995). O mutante obtido apresentou níveis de secreção superiores à linhagem parental, somada a uma ligeira diminuição do tempo de crescimento, quando induzido sob agitação, comparável aos relatados para a linhagem QM 9414 de *T. reesei* (Dillon *et al.*, 2006).

Na tentativa de se obter novos mutantes de *P. echinulatum* que apresentem maior produção de celulases quando comparados à linhagem parental, foram utilizadas técnicas de mutação e seleção pelo tratamento de conídios com dois agentes distintos (peróxido de hidrogênio e 1,2,7,8-diepoxioctane), resultando no isolamento de dois novos mutantes: 9A02S1 (DSM 18942), que apresentou melhor secreção em cultura de frasco agitado, sendo utilizada para a realização deste trabalho e o mutante 9A02D1 que apresentou melhor produção em meio semi-sólido (Dillon *et al.*, 2006).

Utilizando técnicas de fusão de protoplasto Dillon *et al.* (2008), obtiveram uma grande variabilidade genética de clones que foram selecionados quanto à produção e atividade enzimática. Algumas das novas cepas selecionadas apresentaram maior atividade de FPAse e β -Glicosidases, quando comparadas às estirpes parentais, tanto em cultura sólida como submersa.

Trabalhos posteriores relacionados à otimização da produção enzimática, utilizando a linhagem selvagem 2HH e o mutante 9A02S1, sugerem que a quantidade de celulase secretada pode ser aumentada utilizando-se diferentes concentrações de metilxantinas como cafeína e teofilina no meio de cultura (Camassola & Dillon, 2006). Experimentos de indução e produção de celulases foram realizados com o mutante de *P. echinulatum* 9A02S1 utilizando lactose e celulose em associação e isoladamente, em diferentes concentrações. Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de reduzir a quantidade de celulose comercial no meio de cultura em 75%, resultando em uma similar secreção enzimática, diminuindo o custo para a produção destas enzimas (Sehnem *et al.*, 2006).

Camassola *et al.* (2004), caracterizaram o complexo celulolítico secretado pelo fungo *P. echinulatum*, pela atividade sobre papel filtro (FPA) e atividade de β -glicosidase. Ambas as atividades mostraram valores máximos entre pH 4 e 5. Em tampão citrato as atividades foram ligeiramente superiores aos valores encontrados com tampão acetato nos mesmos pHs. A melhor estabilidade térmica das duas atividades foi encontrada a 55°C, sendo que a atividade em papel de filtro foi significativamente reduzida em temperaturas mais elevadas.

Comparados os sistemas secretórios de celulases de *P. echinulatum* e *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L FG, Novozymes), utilizando diferentes substratos

celulolíticos, foi observado que ambos complexos enzimáticos mostraram-se semelhantes, nas atividades de celulases totais. As análises de substratos hidrolisados demonstraram que a β -glicosidase de *P. echinulatum* têm maior atividade do que Celluclast 1.5L FG, enquanto o último parece ter maior atividade de celobiohidrolase. (Martins *et al.*, 2008).

Identificado como um potencial produtor de celulase para processos de bioconversão, a produção de enzimas por *P. echinulatum* (9A02S1) foi realizada utilizando processos de SSF (*Solid-State Fermentation*), variando-se o substrato de crescimento entre cana de açúcar e farelo de trigo. Os melhores resultados foram obtidos com a mistura dos substratos, sendo alcançados títulos enzimáticos superiores aos obtidos em fermentação submersa, com esta mesma linhagem mutante (Camassola *et al.*, 2007).

Na tentativa de aprimorar a produção enzimática do fungo *P. echinulatum*, foram desenvolvidas metodologias para o pré-tratamento biológico da cana de açúcar, utilizando o fungo *Pleurotus sajor caju* PS 2001. Após pré-tratado o substrato foi reutilizado para fermentação em cultura submersa e avaliada a atividade das diferentes enzimas. Apesar das vantagens ambientais oferecidas por este tipo de tratamento prévio, a atividade enzimática obtida com o pré-tratamento foi menor que a encontrada com o tratamento controle, realizado com bagaço de cana não pré-tratado. (Camassola *et al.*, 2009).

2. Justificativa

Ao longo das últimas três décadas, grandes avanços têm sido realizados nos estudos de clonagem, caracterização estrutural, análise de expressão e mesmo de produção heteróloga de genes de celulases de fungos filamentosos. Entretanto, à exceção dos modelos de *Trichoderma reesei* e *Humicola insolens*, pouco desse conhecimento atingiu a escala industrial. Ademais, o processo de produção em larga escala das celulases desses microrganismos é patenteado por indústrias multinacionais, encarecendo o produto final e dificultando o seu acesso aos países em desenvolvimento. Estimativas do Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior apontam para um montante de cerca de US\$ 57 milhões FOB (*Free On Board*), gastos no ano de 2008 com a importação de celulases industriais para processos de biopolimento e bioestonagem de tecidos, para a composição de detergentes para roupas e formulação de ração animal entre outros (Fonte Alice Web). Assim, a implementação de abordagens alternativas para a produção de enzimas recombinantes eficientes que possam ser utilizadas por lavanderias e indústrias têxteis de pequeno e médio porte, adquire relevância estratégica para os setores de desenvolvimento científico e tecnológico.

O fungo *P. echinulatum*, isolado e melhorado geneticamente no Brasil, pelo grupo de pesquisa em processos enzimáticos da Universidade de Caxias do Sul, mostrou-se muito promissor, tanto do ponto de vista de ciência básica, já que muito pouco se conhece a respeito de sua biologia molecular, como pelo aspecto biotecnológico. Tal fato motivou a aproximação entre pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular da UnB e do Laboratório de Enzimas e Biomassa da Universidade de Caxias do Sul. Foi também estabelecido cooperação com as empresas Química Comércio e Exportação de

Caruaru – PE e a Karsten de Blumenau – SC. A Química Comércio e Exportação de Caruaru já está realizando ensaios com celulasas recombinantes de *Humicola grisea* var. *thermoidea* produzidas por linhagens industriais de *S. cerevisiae* desenvolvidas em nosso laboratório e com um complexo enzimático total de *P. echinulatum*. Tais estudos-piloto apontam para um grande potencial desse último como microrganismo industrial, particularmente para utilização na indústria têxtil, justificando nossa proposta de trabalho.

3. Objetivos

3.1 Geral

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum*.

3.2 Específicos

- Construção de uma biblioteca de cDNA do fungo *P. echinulatum*, cultivado sob condições de indução das enzimas do complexo lignocelulolítico;
- Seqüenciamento automático de clones aleatórios da biblioteca de cDNA;
- Isolamento e caracterização de um clone de cDNA potencial, relacionado a endoglicanase denominada EGL1 de *P. echinulatum*;
- Clonagem do cDNA obtido em vetor de expressão integrativa para *P. pastoris*;
- Transformação do vetor de expressão integrativo em *P.pastoris*;
- Seleção, por ensaios em micro-fermentação em placa de *Deep Well*, de clones de *Pichia pastoris* produtores de endoglicanases;
- Otimização das condições de cultivo em frasco visando o aumento da produção enzimática;
- Caracterização bioquímica da enzima recombinante presente no sobrenadante da cultura.

4. Material e Métodos

4.1 Microrganismos utilizados

4.1.1 Linhagem de *Penicillium echinulatum*

A linhagem 9A02S1 (DSM 18942) de *P. echinulatum*, utilizada neste trabalho, foi obtida a partir de uma cultura da linhagem selvagem 2HH, tratada com peróxido de hidrogênio e 1,2,7,8-diepoxi octano, utilizando como fator de seleção a resistência ao fungicida benomil. (Dillon *et al.*, 2006) (Fungo gentilmente cedido pelo prof. Dr. Aldo J. P. Dillon da Universidade de Caxias do Sul).

4.1.2 Linhagens de Levedura *Pichia pastoris* (*Komagataella*)

4.1.2.1 *Pichia pastoris* linhagem GS115 (*K. phaffii*) (Invitrogen) – *his4*.

As linhagens *his4* possuem uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) que permitir a seleção do vetor de expressão contendo o gene *HIS4* funcional após transformação.

4.1.2.2 *Pichia pastoris* linhagem SMD 1168 (*K. pastoris*) (Invitrogen) – *his4, pep4*

As linhagens *his4, pep4* possuem uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) e uma mutação no gene que codifica para proteinase A (*PEP4*), permitindo a seleção do vetor de expressão contendo o gene *HIS4* após transformação, sendo protease deficiente.

4.1.3 Linhagens de *Escherichia coli*

As linhagens bacterianas utilizadas para manipulação de DNA foram DH5- α e XL1Blue (Tabela 1). Tanto as células hospedeiras quanto as transformadas foram cultivadas em meio LB (Item: 4.2.3.1) e estocadas a -80 °C, em glicerol 35%.

Tabela 1. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

| Linhagem | Genótipo | Fornecedor |
|-----------------|--|-------------------|
| DH5- α | <i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 gyrA96 thi-1 relA1</i> <i>ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15)</i> | Stratagene |
| XL1 Blue | Tet ^r <i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac [F' proAB lacI^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i> | Stratagene |

4.2 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo de microrganismos foram preparados com água destilada e ajustado o pH com ácido clorídrico e ou hidróxido de sodio 1M e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos a 1 atm a menos que especificado outro método.

4.2.1 Soluções e meios para cultivo de fungos filamentosos

4.2.1.1 Meio para indução de celulasas de *P. echinulatum* (MPIC)

| | |
|--|---------------|
| BCA ou BMS | 0,1% (p/v) |
| Peptona | 1,0 g |
| Tween 80 | 1,0 mL |
| Meio de sais (M9) A | q.s.p 1000 mL |
| Ajustar pH para 7,0 | |
| (BCA) Bagaço de cana explodido a vapor | |
| (BMS) Bagaço de cereal moído | |

4.2.1.2 Meio para produção de micélio *P. echinulatum* (MPM)

| | |
|---------------------|---------------|
| Extrato de levedura | 5,0 g |
| Peptona | 2,0 g |
| Glicose | 10,0 g |
| Meio de sais (M9) A | q.s.p 1000 mL |
| Ajustar pH para 7,0 | |

4.2.1.3 Meio BDA para crescimento e produção de esporos de *P. echinulatum*

| | |
|------------------|---------------|
| BDA | 37 g |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |

4.2.1.4 Solução de Elementos Traço

| | |
|---|---------------|
| KCl | 26 mg |
| CuSO ₄ -5H ₂ O | 400 mg |
| FeSO ₄ -7H ₂ O | 714 mg |
| Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O | 800 mg |
| ZnSO ₄ -7H ₂ O | 8 mg |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |
| pH ajustado para 2,0 | |

4.2.1.5 Solução de Sais

| | |
|---|---------------|
| Na ₂ B ₄ O ₇ -10H ₂ O | 40 mg |
| MgSO ₄ -7H ₂ O | 10 g |
| KH ₂ PO ₄ | 76 g |
| Sol. Elementos Traço | 50 mL |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |

4.2.2 Soluções e meios para cultivo de leveduras *P. pastoris*

4.2.2.1 Meio YPD (Meio extrato de levedura peptona glicose)

| | |
|---------------------|----------|
| Extrato de levedura | 1% (p/v) |
| Peptona de caseína | 2% (p/v) |
| Glicose | 2% (p/v) |

4.2.2.2 Meio YPD-Ágar

Meio YPD adicionado de ágar bacteriológico a 1,5 % (p/v).

4.2.2.3 Meio YPDS-Ágar (Meio extrato de levedura peptona glicose com sorbitol)

| | |
|---------------------|-----------|
| Extrato de levedura | 1 % (p/v) |
| Peptona de caseína | 2 % (p/v) |
| Glicose | 2 % (p/v) |
| Sorbitol | 1 M |

| | |
|---------------------|-----------|
| Ágar bacteriológico | 2 % (p/v) |
|---------------------|-----------|

4.2.2.4 MD (Meio mínimo com glicose)

| | |
|---------|----------------------------|
| Biotina | 4×10^{-5} % (v/v) |
| YNB | 1,34 % (p/v) |
| Glicose | 2 % (p/v) |

4.2.2.5 MD-Ágar

Meio MD adicionado de ágar bacteriológico a 1,5 % (p/v).

4.2.2.6 MM (Meio mínimo metanol)

| | |
|---------|----------------------------|
| Biotina | 4×10^{-5} % (v/v) |
| YNB | 1,34 % (p/v) |
| Metanol | 0,5 % (v/v) |

4.2.2.7 Meio BMGY (Meio complexo tamponado com glicerol)

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Extrato de levedura | 1 % (p/v) |
| Peptona de caseína | 2 % (p/v) |
| Tampão fosfato pH 6.0 | 100 mM |
| Biotina | 4×10^{-5} % (v/v) |
| YNB | 1,34 % (p/v) |
| Glicerol | 1 % (v/v) |

4.2.2.8 Meio BMMY (Meio complexo tamponado com metanol)

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Extrato de levedura | 1 % (p/v) |
| Peptona de caseína | 2 % (p/v) |
| Tampão fosfato pH 6.0 | 100 mM |
| Biotina | 4×10^{-5} % (v/v) |
| YNB | 1,34 % (p/v) |
| Metanol | 0,5% (v/v) |

4.2.2.9 Meio BMGluY (Meio complexo tamponado com glicose)

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Extrato de levedura | 1 % (p/v) |
| Peptona de caseína | 2 % (p/v) |
| Tampão fosfato pH 6.0 | 100 mM |
| YNB | 1,34 % (p/v) |
| Biotina | 4×10^{-5} % (v/v) |
| Glicose | 2 % (p/v) |

4.2.2.10 Meio MGY (Meio mínimo com glicerol)

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Tampão fosfato pH 6.0 | 100 mM |
| YNB | 1,34 % (p/v) |
| Biotina | 4×10^{-5} % (v/v) |
| Glicerol | 1 % (v/v) |

4.2.2.11 Meio mínimo-Ágar CMC + Metanol (Detecção de atividade em placa, *P. pastoris*)

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Biotina | 4×10^{-5} % (v/v) |
| YNB | 1,34 % (p/v) |
| Metanol 100% | 0,5 % (v/v) |
| CMC low viscosity (Sigma) | 1% (p/v) |

4.2.3 Meios e soluções para cultivo de *Escherichia coli*

4.2.3.1 Meio Luria-Bertani (LB)

| | |
|----------------------|---------------|
| Peptona de caseína | 10 g |
| Extrato de Levedura | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |
| pH ajustado para 7,2 | |

4.2.3.2 Meio LB-Ágar

| | |
|---|-------|
| Meio LB adicionado de ágar bacteriológico | 1,5 % |
|---|-------|

4.2.3.3 Meio SOB

| | |
|----------------------|---------------|
| Bacto-Triptona | 20,0 g |
| Extrato de Levedura | 5,0 g |
| NaCl | 0,6 g |
| KCl | 0,5 g |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |
| pH ajustado para 7,2 | |

4.2.3.4 Meio SOC

| | |
|-----|--------|
| SOB | 100 ml |
|-----|--------|

Suplementado para uma concentração final com:

| | |
|-------------------|---------|
| Glicose | 20,0 mM |
| MgCl ₂ | 5,0 mM |
| MgSO ₄ | 5,0 mM |

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

4.2.3.5 Meio 2XYT ou 2YT para o “Screening” do banco cDNA

| | |
|---------------------|---------------|
| Peptona de caseína | 16 g |
| Extrato de levedura | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| Ágar | 15 g |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |
| Ajustar pH 7,2 | |

4.2.3.6 Meio mínimo para bactéria (M9)

Solução A

| | |
|--|--------------|
| KH ₂ PO ₄ | 15 g |
| Na ₂ HPO ₄ + 2H ₂ O | 30 g |
| NaCl | 2,5 g |
| NH ₄ Cl | 5 g |
| H ₂ O | q.s.p 500 mL |

Solução B

| | |
|------------------|--------------|
| Ágar | 7,5 g |
| H ₂ O | q.s.p 450 mL |

Soluções suplementares

| | |
|---------------------|--|
| Glicose | 20 % (v/v) (autoclavar) |
| Cloreto de Cálcio | 1 M (esterilizar com filtro 0,22 µm) |
| Sulfato de Magnésio | 1 M (esterilizar com filtro 0,22 µm) |
| Solução de Tiamina | 1 % (v/v) (esterilizar com filtro 0,22 µm) |

Após autoclavadas as soluções A e B, são misturadas na proporção de 50 mL da solução A para 450 mL da solução B. Quando a temperatura da mistura chegar a aproximadamente 60°C, adicionar as soluções suplementares (5 mL glicose; 50 µL cloreto de cálcio; 500 µL de sulfato de magnésio; 250 µL de tiamina).

4.2.3.7 Solução IPTG 1M (Estoque)

| | |
|------------------|------------|
| IPTG | 1,226 g |
| H ₂ O | q.s.p 3 mL |

4.2.3.8 Solução X-gal 2% (481 mM)

| | |
|------------------|-------|
| X-gal | 0,2 g |
| Dimetilformamida | 10 mL |

Adicionar 500 μ L desta solução a 200 mL de meio de cultura resfriado (cerca de 45°C).

4.2.3.9 Solução de ampicilina 50 mg/mL (Estoque)

| | |
|------------------|-------------|
| Ampicilina (USB) | 0,5 g |
| H ₂ O | q.s.p 10 mL |

Dissolver 0,5 g de ampicilina em 7 mL de H₂O, (poderá ser necessária a adição de algumas gotas de NaOH, para auxiliar na diluição) posteriormente, completar para 10 mL com H₂O destilada e homogeneizar, esterilizar por filtração em membrana milipore 0,22 μ m. Estocar a -20°C.

4.2.3.10 Solução de Vermelho do Congo 1% “Congo Red” (Estoque)

| | |
|------------------|--------------|
| Congo red | 5 g |
| H ₂ O | q.s.p 500 mL |

4.2.4 Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinante

4.2.4.1 Soluções para a extração de DNA plasmidial (mini-preparação)

4.2.4.2 Solução 1 (Tampão Tris – EDTA)

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

4.2.4.3 Solução 2 (Solução de Lise alcalina)

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

Preparada no momento do uso.

4.2.4.4 Solução 3 (Solução de Neutralização)

| | |
|-------------------------|--------------|
| Acetato de Potássio 5 M | 60,0 mL |
| Ácido acético glacial | 11,5 mL |
| H ₂ O | q.s.p 100 mL |

4.2.4.5 Solução de lise (Extração de DNA genômico)

| | |
|-------------------|----------------|
| Tris-HCl (pH 8,0) | 10 mM |
| EDTA (pH 8,0) | 250 mM |
| Proteinase K | 200 μ g/mL |

Triton 100X 0,5% (v/v)

4.2.4.6 Tampão de corrida para gel de eletroforese

4.2.4.7 Tampão Tris-Borato EDTA (TEB) 10X

| | |
|----------------------|---------------|
| Tris base | 108 g |
| Ácido Bórico | 55 g |
| EDTA (0,5M; pH 8,0) | 20mL |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |
| pH ajustado para 8,4 | |

4.2.4.8 Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

| | |
|----------------------|---------------|
| Tris-base | 242g |
| EDTA (0,5 M) | 100mL |
| Ácido acético | 57,1mL |
| H ₂ O | q.s.p 1000 mL |
| pH ajustado para 8,5 | |

4.2.4.9 Tampão de Amostra (5X) para análise de DNA por eletroforese

| | |
|--------------------|--------------|
| TEB 10X | 25 % (v/v) |
| Glicerol | 50 % (v/v) |
| Azul de Bromofenol | 0,25 % (p/v) |
| Xilenocianol | 0,25 % (p/v) |

4.2.4.10 Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante

4.2.4.10.1 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 | |

4.2.4.10.2 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.

4.2.4.10.3 Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

| | |
|------|--------|
| Tris | 18,2 g |
|------|--------|

Água destilada q.s.p. 100 mL
 Ajustar o pH com HCl para 8,8

4.2.4.10.4 Tris-HCl 1 M pH 6,8

Tris 12,1 g
 Água destilada q.s.p. 100 mL
 Ajustar o pH com HCl para 6,8

4.2.4.10.5 Persulfato de Amônio (P.A.) 10% (P/V)

P.A. 1 g
 Água destilada q.s.p. 10 mL

4.2.4.10.6 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%.

4.2.5 Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática (DNS)

4.2.5.1 Tampão Tris-HCl 1M pH 7,0 (1M estoque)

Tris 12,1 g
 Água destilada q.s.p. 100 mL
 Ajustar o pH com HCl para 7,0

4.2.5.2 Reagente DNS (Miller, 1959)

Ácido Dinitrosalicílico 10g
 NaOH 2M 200mL
 Tartarato de Sódio e Potássio 300g
 Água destilada q.s.p. 1000 mL

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.

4.3 Marcadores de massa molecular

Marcadores para DNA

1 Kb Plus ladder (Gibco)

1 Kb Plus ladder (Invitrogen)

DNA do fago λ digerido com *Hind* III (Invitrogen)

Marcadores para proteínas

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences);

Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs);

Bench Marker (Invitrogen).

4.4 Endonucleases de restrição e tampões e de reação

Foram empregadas diferentes enzimas de restrição fornecidas juntamente com seus tampões otimizados pelos fabricantes. O uso de cada enzima seguiu as instruções de cada fabricante.

4.5 Oligonucleotídios sintéticos

Os Oligonucleotídios sintéticos utilizados foram confeccionados pela *DNAgency* (CA, USA) e *IDT (Integrated DNA Technologies)*. (Tabela2)

Tabela 2: *Primers* utilizados para amplificação, seqüenciamento, técnica de RACE e clonagem do cDNA de endoglicanase de *P. echinulatum*.

| Oligonucleotídio | Seqüência 5' → 3' |
|-------------------------|---|
| Xho1/Kex II | CTCGAGAAAAGAGAGGCTCCGCCAGCCTCGCGCTCAATC |
| End/Eco R I | GAATTCTCACAGACACTGCGAGTAGTAGTC |
| H2M-F3 | ATGCACCAACTACCTGACTC |
| H2M-R162 | ATACCAGTGATGGCACTCTC |
| H2M-R154 | GTAATGACTTTGCCATAGTAGCG |
| END-189 RACE | AGGCTGCATCCGGGCTAGCAGTC |
| END-440 RACE | GGCGTCGATGGCGGCCTGAT |
| M13 forward | GTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 reverse | AACAGCTATGACCATG |
| SP6 universal | ATTTAGGTGACACTATAG |
| T7 Terminator | GCTAGTTATTGCTCAGCGG |

4.6 Condições de cultivo de fungos

4.6.1 Cultivo de *Penicillium echinulatum*

Esporos do fungo *P. echinulatum*, foram obtidos de placas Petri contendo meio BDA (Merck), incubadas por sete dias a 28 °C. Utilizando uma espátula, estes esporos foram raspados com o auxílio de solução salina (0,9% NaCl), formando uma suspensão na concentração de $2,2 \times 10^8$ conídios por mL. Um volume de 300 μ L desta suspensão foi inoculado em 150 mL de meio para a produção de micélio (MPM), obtendo-se uma concentração final de $4,4 \times 10^5$ esporos por mL. Este meio foi incubado por 24 h, 28 °C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, o micélio foi coletado em papel de filtro esterilizado, lavado com água esterilizada e transferido para o meio de indução de celulases (MIC), contendo bagaço de cana explodido a vapor (BCA) ou palha de cereal moído (BMS) como única fonte de carbono, incubado por 19 h, 28 °C com agitação de 200 rpm, visando à indução de diferentes genes do complexo lignocelulolítico de *P. echinulatum*.

4.6.2 Cultivo de *Pichia pastoris*

4.6.2.1 Indução e expressão de recombinantes em frasco

Usando uma colônia isolada, fez-se um pré-pré-inóculo em 25 ml de meio mínimo em *Erlenmeyer* de 250 mL. Crescidas a 30 °C sob agitação até uma OD_{600} de 2-6 (aproximadamente 16-18 horas). Para o pre-inóculo uma alíquota destas células crescidas (0,5mL) foi semeado em *Erlenmeyer* de 1L com 100 mL de meio BMGY e crescidos até uma OD_{600} 6 (aproximadamente 18 horas). Posteriormente as células foram coletadas por centrifugação a 1500 \times g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi desprezado. Para o inóculo, o número de células foi ajustado para

OD₆₀₀ 1 em um volume final de 100 mL de meio de indução BMMY + casaminoacido 1% em *Erlenmeyer* de 1 L. Adicionou-se metanol 100 % para uma concentração final no meio de cultura de 1 %, a cada 24 horas de crescimento mantendo a indução dos transformantes. A cada tempo de indução foram retirados 2 mL de cada cultura. Após a medição da OD₆₀₀ as células foram centrifugadas e descartadas, sendo o sobrenadante utilizado para medição da atividade enzimática e análise do perfil protéico em gel SDS-PAGE.

4.6.2.2 Otimização das condições de cultivo de *P. pastoris* em frasco.

Primeiramente foram realizadas fermentações em frasco para se escolher a melhor fonte de nitrogênio entre YNB e uréia (na mesma concentração), sendo utilizadas as mesmas condições de indução em frasco descritas anteriormente.

Para a otimização foi realizado um planejamento fatorial envolvendo três variáveis limitantes no crescimento e na produção da proteína heteróloga – densidade celular inicial (OD₆₀₀), concentração de fonte de nitrogênio e concentração do indutor metanol. Estes fatores limitantes foram variados em três distintas concentrações na formulação do meio BMMY sendo realizadas duas repetições de cada tratamento. As condições foram variadas nas faixas especificadas na tabela 3. Foram escolhidos para cada variável dois valores extremos (um máximo e um mínimo) e determinou-se o ponto central de cada fator. A variável escolhida como resposta da produção enzimática foi a atividade enzimática sobre CMC após 72 horas de indução. Os experimentos foram conduzidos em 25 mL de meio em *Erlenmeyers* de 250 mL. Após pré-inóculo em meio BMGY por 24 horas, as células foram centrifugadas e resuspensas em meio BMMY com

as devidas modificações propostas pela otimização. O cultivo foi realizado em agitador orbital a 220 rpm e temperatura de 30 °C.

Tabela 3. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2³) para otimização da produção enzimática.

| Fatores | Nível Inferior (-1) | Nível Superior (+1) |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| % Metanol | 0,5 | 1 |
| OD₆₀₀ inicial | 1 | 10 |
| % Fonte de Nitrogênio | 1,34 | 4,02 |

4.7 Obtenção dos RNAs Total e Mensageiro (*P. echinullatum*)

Decorrido o tempo necessário para a indução, o micélio foi coletado por filtração, sendo o RNA total extraído empregando-se o reagente TRIzol® (GibcoBRL) de acordo com as instruções do fabricante, posteriormente tratado com DNase I (Promega). A amostra obtida foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, para verificação de sua integridade e quantificada em espectrofotômetro *GeneQuant* (Biochrom). A fração Poli - A⁺ foi purificada utilizando-se o Kit *Micro-FastTracKTM 2.0 Kit* (Invitrogen), por cromatografia em coluna de oligo (dT) celulose, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, essa fração foi precipitada pela adição de acetato de sódio e etanol absoluto e coletada por centrifugação, sendo sua integridade verificada em gel de agarose 0,8%. Toda a manipulação foi realizada em condições livres de RNases.

4.8 Obtenção das moléculas de cDNA

Para a síntese das moléculas de DNA complementares a partir dos mRNAs obtidos foi utilizada a técnica de transcrição reversa. Brevemente, as amostras de mRNA foram misturadas a oligonucleotídeos poli-T (iniciadores de polimerização), 500 μ M de cada dNTP (dATP; dCTP; dTTP; dGDP), tampão de reação específico para a enzima MML-V (*Gibco BRL*) e incubadas a 37 °C por uma hora. Em seguida o sistema foi tratado com duas unidades de RNase H a 37 °C por 20 min. Posteriormente, uma alíquota da reação foi submetida à reação de polimerização em cadeia (PCR) típica, empregando-se como iniciadores oligonucleotídeos poli-T e uma mistura de hexanucleotídeos.

4.9 Construção da Biblioteca de cDNA

Para a construção de uma biblioteca de expressão com as moléculas de cDNA obtidas no item anterior, foi utilizado o kit “*SuperScript™Plasmid System with Gateway®Technology for cDNA Synthesis and Cloning*” (Invitrogen), segundo instruções do fabricante, utilizando o plasmídeo pSPORT1, sendo o cDNA clonado nos sítios de *Sal I/Not I*. (Figura 12). O sistema de ligação foi transformado por eletroporação utilizando células de *E. coli* XL1 Blue e DH5- α .

4.10 Plasmídeo utilizados

4.10.1 Plasmídeo pSPORT 1 (Invitrogen)

Para a clonagem dos cDNAs em bactéria e manipulação dos genes de interesse foi utilizado o plasmídeo pSPORT1 (Figura 12). Esse plasmídeo de 4,1 kb possui o gene de resistência à ampicilina como marca de seleção, promotor induzível do gene *lac* (*lacZ*), por 1mM de Isopropil-tio- β -galactosídeo (IPTG), origem de replicação oriundo do plasmídeo pUC. Apresenta a seqüência do gene *lacOPZ*, que possibilita a seleção branco/azul e as seqüências M13 (para anelamento dos oligonucleotídeos universal e reverso) flanqueando o sitio de policlonação. A primeira seleção dos clones recombinantes foi realizada pela detecção de atividade de β -galactosidase, na presença de X-gal e IPTG em placa de Petri.

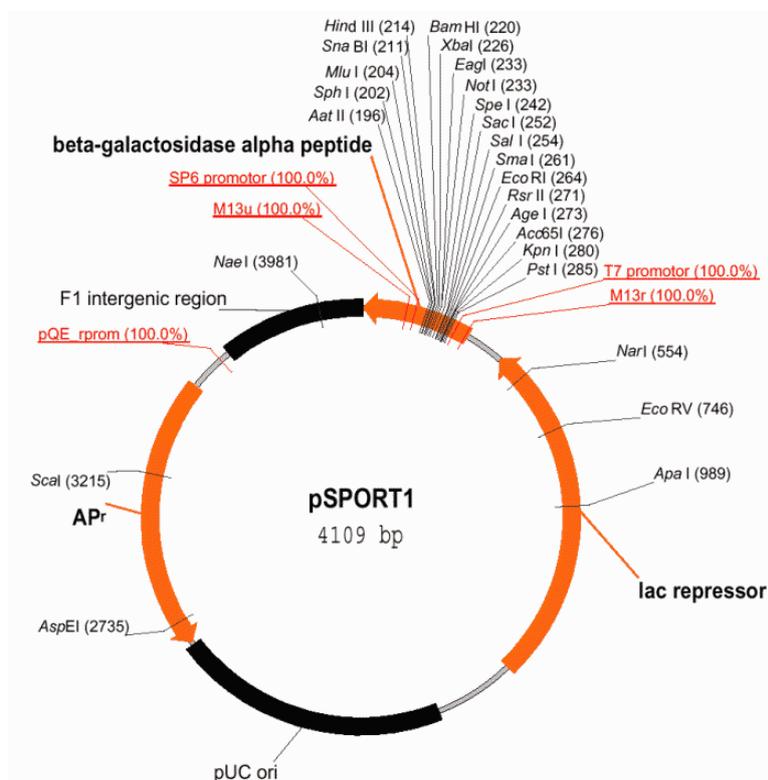


Figura 12. Representação esquemática do mapa físico do vetor pSPORT1 (Invitrogen).

4.10.2 Plasmídeo pPIC9 (Invitrogen)

Utilizado para construção do vetor de expressão e vetor controle negativo para integração e/ou recombinação em *P. pastoris*. Esse plasmídeo de 8 kb possui o gene de resistência à ampicilina como marca de seleção para bactérias e o gene *HIS4* como marca de seleção para levedura, promotor induzível do gene *AOX1*, ativado por metanol, origem de replicação para *E. coli* pBR322 e origem de replicação para Bacteriófago ϕ 1, terminador e sinal de poliadenilação do gene *AOX1*, sinal de secreção da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fator α), flanqueando o sitio de policlonagem. Possui as seqüências para anelamento de oligonucleotídeos 5'*AOX1* e 3'*AOX1* (Figura 13)

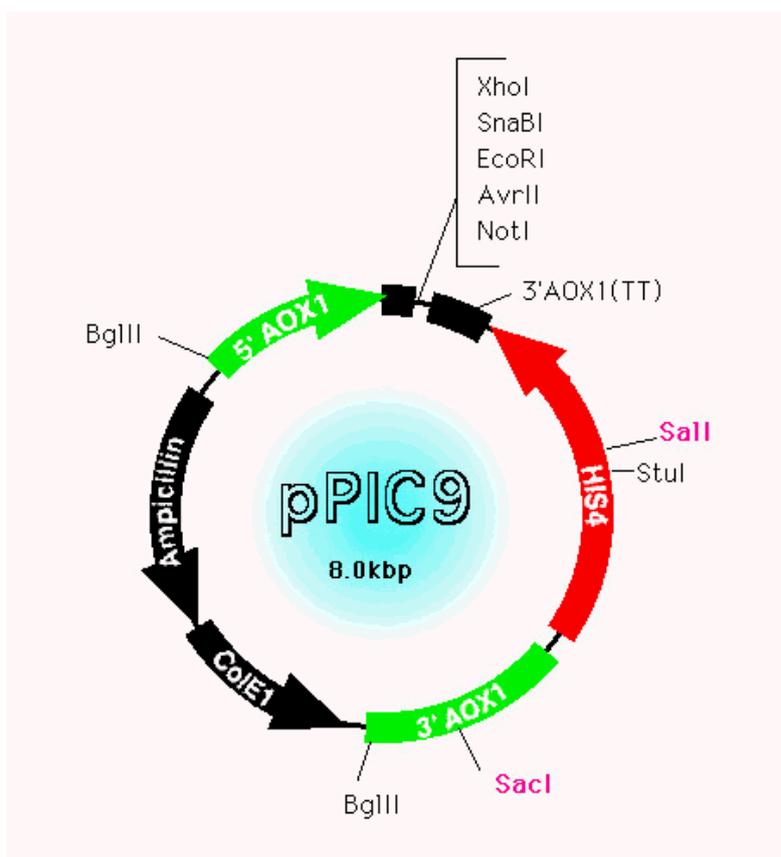


Figura 13. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9 (Invitrogen).

4.10.3 Plasmídeo pGEM-T (Promega).

Utilizado para clonar os produtos de PCR e transformação bacteriana para análise, seqüenciamento e classificação do cDNA *egl1*. Esse plasmídeo de 3 kb possui o gene de resistência à ampicilina como marca de seleção, origem de replicação do fago f1, parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino terminal da enzima β -galactosidase, sítio múltiplo de clonagem e sítios para os primers T7, SP6 e M13 Universal e M13 Reverso, flanqueando a região de clonagem (Figura 14).

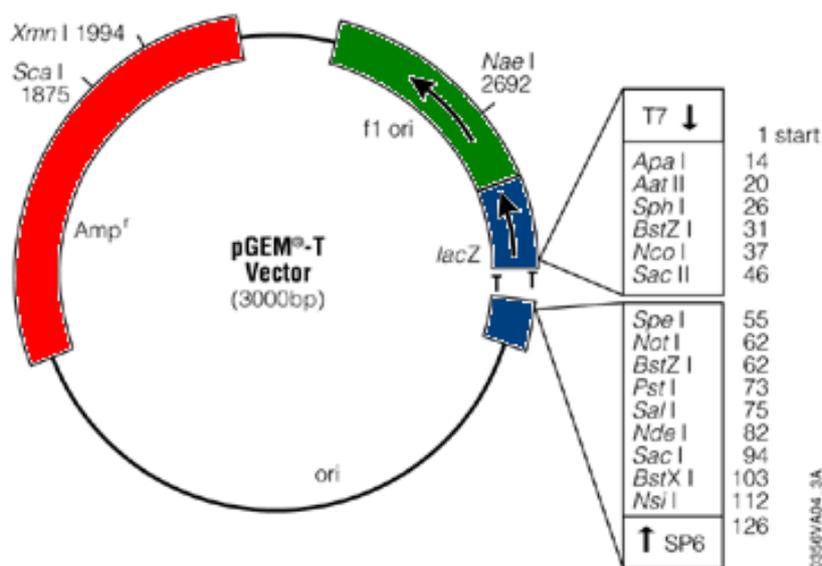


Figura 14. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM-T (Promega).

4.11 Transformação de células competente (bactéria e levedura)

4.11.1 Transformação de células de *E. coli* por Eletroporação

Para a eletroporação das células de *E. coli* foi utilizado o aparelho “GENE Pulser II” (Biorad[®]) de acordo com as instruções do fabricante. Os sistemas de transformação foram preparados contendo 100 μ L de células eletrocompetentes e 5 μ L de DNA (sistema de ligação). Após montado o sistema, este foi transferido para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm), já previamente resfriada. Ajustadas as condições de eletroporação (2,5 KV, 25 μ F, 200 Ω), o sistema foi submetido a um pulso elétrico. Imediatamente após a descarga elétrica foi adicionado 1mL de meio SOC no interior da cubeta e homogeneizado com as células eletroporadas. Esta suspensão foi retirada da cubeta e colocada em um tubo Falcon de 50 mL esterilizado, sendo o processo repetido mais duas vezes, totalizando 3 mL de meio de cultura. As células foram então incubadas por uma hora a 37°C, sob agitação 200 rpm. Decorrido este tempo, as células foram semeadas em placas contendo o meio LB ágar acrescido de ampicilina 200 μ g/mL e incubadas durante a noite a 37 °C. Após este período as células foram coletadas com o auxílio de uma espátula esterilizada e estocadas em glicerol 35 % a -80 °C e ou selecionados distintos clones e extraído seu DNA plasmidial para posterior avaliação.

4.11.2 Transformação de *E. coli* por choque térmico

Uma alíquota de células termo competente previamente preparada foi utilizada para cada sistema de ligação. As células foram retiradas do freezer a -80 °C e deixadas no gelo até que descongelassem. Em seguida, foram adicionados 5 μ L do sistema de ligação às células, estas foram novamente incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a 37 °C, por 5 minutos, novamente incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente foram adicionados 900 μ L

de meio LB ao sistema que foi incubado a 37 °C por 1 hora. Decorrido este tempo, estas células foram semeadas em 3 placas contendo meio LB-ágar contendo o antibiótico adequado e incubadas a 37 °C durante a noite.

4.11.3 Transformação de *P. pastoris* por Eletroporação

Uma colônia da levedura *P. pastoris*, foi crescidas em 5 mL de meio YPD em *Erlenmeyer* de 125 mL por 24 horas a 30 °C sob agitação (200 rpm). Deste pré-inoculo, cerca de 0,2 mL foram adicionados a 100 mL de meio YPD e crescidos durante a noite até atingirem uma $OD_{600} \sim 1,3-1,5$. Em seguida, as células foram centrifugadas a $1500 \times g$ por 5 min a 4 °C e ressuspensas em 100 mL de água estéril gelada (4 °C). Este procedimento foi novamente repetido sendo as células ressuspensas em 50 mL de água estéril gelada. Após esta ultima centrifugação, as células foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1M gelado. Novamente centrifugado (mesmas condições anteriores), as células foram ressuspensas em 0,8 mL de sorbitol 1M gelado, e mantidas no gelo até o momento do uso. Para a eletroporação, 80 μ L das células foram misturadas com 5-10 μ g do DNA plasmidial (previamente linearizado) e 320 μ L de sorbitol 1M gelado. A suspensão foi então transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada. As células foram eletroporadas nas seguintes condições para o eletroporador da BioRad “GENE Pulser II” (BioRad®): 7,5 KV/cm, 25 μ F e 400 Ω . O tempo de eletroporação foi de aproximadamente 10 ms. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol (1M) gelado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo de *Eppendorff* de 1,5 mL estéril. As células foram espalhadas em placa de Petri previamente preparadas com meio de cultura MD sem histidina para seleção dos transformantes com o vetor

contendo a marca auxotrófica *HIS4*. Finalmente, as placas foram incubadas a 30 °C até o aparecimento de colônias recombinantes, em geral em torno de 48 horas.

4.12 Preparo de células Bacterianas competentes

4.12.1 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico (CaCl₂)

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por Cohen (1972) com algumas modificações. As células da linhagem de *E. coli* desejada foram crescidas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e ressuspenas em 10 mL de CaCl₂ 100 mM estéril e gelado. Em seguida as células foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições e resuspenças em 1 mL de solução de CaCl₂ 100 mM estéril e gelado. Posteriormente, as células foram aliquotadas em volumes de 80 ou 100 µL em tubos *Eppendorff* e estocadas a -80 °C.

4.12.2 Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação.

O preparo de células de *E. coli* competentes para eletroporação foi realizado inoculando-se uma colônia isolada da bactéria em 50mL de meio SOB e crescidas durante a noite a 37°C e 250 rpm. Em seguida 500 µL da cultura foram inoculados em 200 mL de meio SOB, seguindo-se de incubação nas mesmas condições descritas anteriormente até uma OD₆₀₀ de 0,8. Posteriormente as células foram centrifugadas a

3.000g durante 10 min a 4°C, o sedimento foi ressuspensionado em 40 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ao final, as células foram ressuspensionadas em 1 mL de glicerol 10% e aliqüotadas em volumes de 100 µL e estocadas a -80°C.

4.13 Seleção de clones recombinantes (bactéria) (*Screening* primário)

Para uma varredura inicial, uma aliqüota das células armazenadas a -80°C foi descongelada e semeada em placa para *Screening* de 22 x 22 cm, contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina 200 µg/mL, X-gal (0,004%) e IPTG 1mM/mL, sendo incubadas durante a noite. A seleção foi realizada pela distinção do fenótipo das células crescidas entre brancas e azuis.

4.14 Seleção de clones com atividade celulolítica em placas *deep well* (96 Well) (*Screening* de levedura) (Boettner *et al.*, 2002)

Em uma placa de *deep well* foram adicionados 800 µL de meio BMGY a cada poço, e em cada um deles foi inoculada uma colônia escolhida aleatoriamente das placas de transformação. A placa foi vedada com filme adesivo plástico e incubada em *shaker* a 30 °C e 200 rpm. Após 72 horas a placa foi centrifugada a 1280 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Foram adicionados a cada poço 800 µL de meio BMMY + 0,5% (V/V) metanol 100%. A placa foi novamente fechada com o adesivo plástico e incubada em *shaker* nas mesmas condições descritas anteriormente por mais 72 horas. Foi adicionado metanol para uma concentração final de 0,5 %, a cada 24 horas as culturas. Decorrido este tempo estas foram centrifugadas a 1280 x g por 10 minutos, uma

alíquota de 50µL do sobrenadante de cada transformante foi retirada para análise da atividade.

4.15 Extração de DNA plasmidial em pequena escala para seqüenciamento.

Selecionados diferentes clones de interesse se procedeu a extração do seu DNA plasmidial para posterior seqüenciamento. Para tanto os clones foram incubados em 4 mL de meio LB, acrescido de ampicilina 200 µg/mL, por 16 h, 37°C a 200 rpm. Posteriormente o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit “*Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System*” (PromegaTM), conforme especificações do fabricante.

4.16 Seqüenciamento e análise das seqüências de DNA

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático *MegaBACE* 1000 (Molecular Dynamics). Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles dos *primers* apropriados e o kit “*DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing*”(MJ Research, INC). Os DNAs utilizados no seqüenciamento foram quantificados por espectrofotometria utilizando o *GeneQuant* (Biochrom) e analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etideo (EtBr) 0,3 µg. A qualidade das seqüências obtidas na reação de seqüenciamento automático foi analisada utilizando-se as ferramentas de bioinformática: PHRED; Cross-match e CAP3, disponíveis na página: www.unb.br/ib/cel/biomol. Após a análise de qualidade, as seqüências que apresentaram qualidade igual ou superior a PHRED ≥ 20 e tamanho ≥ 100 nucleotídeos, foram analisadas pelo programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), contra a base de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.17 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Método de lise alcalina; caseiro)

Foi inoculado uma colônia de bactéria em 4 mL de meio LB, contendo ampicilina 200 µg/mL e incubado por aproximadamente 16 a 18 horas a 200 rpm, 37°C. Posteriormente foram centrifugados 3 mL da suspensão bacteriana (10.000 x g por 2 minutos), descartado o sobrenadante e o sedimento celular resuspenso em 200 µL de solução Tris-EDTA, adicionaram-se 360 µL de Solução 2 e homogeneizou-se por inversão, foram adicionados 300µL de Solução 3, misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min, posteriormente foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min, transferido o sobrenadante para outro tubo contendo 750 µL de isopropanol, novamente homogeneizado por inversão, centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de solução TE. Foram adicionados 2 µL de RNase 4 mg/mL e incubado a 37 °C por 30 min, posteriormente foi adicionado 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e misturou-se por inversão. Após nova centrifugação a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 750 µL de etanol 100% gelado. Após inversão por várias vezes, o tubo foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado pela adição de 500 µL de etanol 70% gelado, centrifugado novamente a 10.000 x g por 10 min, descartado o sobrenadante, sendo o *pellet* seco à temperatura ambiente por mais 10 min e ressuspenso em 50 µL de TE ou água ultra pura (Milli-Q).

4.18 Extração de DNA plasmidial em média escala (midi-prep) (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

Primeiramente um pré-inoculo em meio LB (5 mL) contendo ampicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi realizado partindo de uma colônia isolada e crescido por 16 horas a 200 rpm, 37°C. Decorrido este tempo foi realizado o inoculo de 50 μL do pré-inoculo em 50 mL meio LB contendo 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, em erlenmeyer de 250mL (0,1% do volume final da midi-prep) e crescido entre 16 e 18 horas a 200 rpm, 37°C. Decorrido este tempo o meio foi centrifugado (10.000 x g por 2 minutos), descartado o sobrenadante, o sedimento celular foi resuspense em 2mL de solução Tris-EDTA, adicionaram-se 3,6 mL de Solução 2 e homogeneizou-se por inversão, foi adicionado 3 mL de Solução 3, misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min, posteriormente foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min, transferido o sobrenadante para outro tubo contendo 7,5 mL de isopropanol, novamente homogeneizado por inversão, centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspense em 1,5 mL de solução TE. Foi adicionado 2 μL de RNase 4 mg/mL e incubado a 37°C por 30 min, posteriormente foi adicionado 110 μL de acetato de amônio 7,5 M e misturou-se por inversão (Pode-se optar por utilizar 200 μL de clorofane por 2X + indicado). Após nova centrifugação a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 750 μL de etanol 100% gelado. Após inversão por várias vezes, o tubo foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado com de 500 μL de etanol 70%, centrifugado novamente a 10.000 x g por 10 min, descartado o sobrenadante, sendo o precipitado seco à temperatura ambiente e em seguida resuspense em 50 μL de TE ou água ultra pura (Milli-Q).

4.19 Análise de Ácidos Nucléicos por eletroforese em Gel de Agarose (Sambrook *et al.*, 2001)

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação da qualidade do DNA e ou RNA. A agarose foi preparada em concentrações adequadas (por exemplo 0,8% (p/v)) em tampão de corrida TEB 1X ou TAE 1X. Como marcadores moleculares para DNA foram utilizados 1 kb ladder (INVITROGEN) e ou DNA de fago λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III (λ *Eco* / *Hind*) ou apenas *Hind* III (λ *Hind*).

4.20 Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

Após digestão dos plasmídios com as enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos de DNA e cDNA contendo as seqüências de interesse foram aplicados em gel de agarose 0,8% e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando-se o kit “*Wizard®SVGEL and PCR Clean-Up System*” (Promega), conforme as especificações do fabricante.

4.21 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para a amplificação de DNA por meio de PCR os sistemas foram montados com um volume final de 50 μ L, como descrito: cerca de 10 ng de DNA genômico como molde (ou cerca de 0,1 - 1 ng de DNA plasmidial), 0,2 μ M de cada um dos iniciadores, 0,2 mM de uma solução de dNTPs; tampão de *Taq* DNA polimerase para uma concentração final de 1X, cloreto de magnésio (na concentração ótima para cada par de oligos), 2 U de *Taq* DNA polimerase; Cenbiot).

Os sistemas de amplificação foram homogeneizados e posteriormente recobertos com 20 μ L de óleo mineral. Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador *Minicycler MJ Research*, modelo PTC-150. A amplificação foi executada por 35 ciclos onde o DNA foi desnaturado a 94 °C por 1 min, anelado a temperatura ideal para cada par de oligonucleotídeo por 1 min e alongado a 72 °C por 2 min. Após a amplificação, cerca de 1/5 do sistema de reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

4.22 Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)

Os sistemas de ligação foram montados de modo que a razão molar entre vetor e inserto ficasse entre 1:3 e 1:8. A enzima T4 DNA Ligase foi utilizada com os tampões de reação fornecidos pelos fabricantes. Os sistemas foram incubados a 4°C por pelo menos 14 horas antes de serem utilizados para transformação de bactérias.

4.23 Caracterização bioquímica da enzima EGL1

4.23.1 Diálise e liofilização do sobrenadante

Após centrifugação, o sobrenadante de uma cultura de *P. pastoris* recombinante 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 kDa. 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 três horas

para evitar a dissolução dos mesmos devido a atividade da endoglicanase. Uma alíquota de 50 μ L do sobrenadante dialisado foi utilizada para determinação da atividade enzimática. O restante desse sobrenadante foi alicotado em volumes de 1 mL em eppendorf de 1,5 mL e concentrado por liofilização. O material liofilizado foi ressuspenso em água destilada em 1/100 do volume inicial e utilizado nos testes posteriores.

4.23.2 Ensaio enzimático

A atividade de endoglicanase 1 foi determinada por ensaio colorimétrico de detecção de açúcares redutores gerados 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), com modificações. Os ensaios de atividade de EGL1 foram realizados nas seguintes condições: 50 μ L de CMC 2 % (p/v), em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7 e 50 μ L de amostra contendo a enzima. A mistura foi incubada a 60 °C por 30 min e em seguida adicionou-se 300 μ L de reagente DNS. As amostras foram fervidas por 10 minutos e após o resfriamento a absorvância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III. As leituras de absorvância foram convertidas em quantidade de equivalente de glicose, por meio da curva de calibração obtida pela leitura da absorvância de diferentes concentrações de glicose (10 a 100 μ g) com o reagente DNS (Figura 15). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco de leitura no aparelho a solução contendo o tampão de reação 50 μ L e 50 μ L substrato (CMC 2%); tratados como descrito anteriormente. Como controle da concentração inicial de açúcares redutores no meio de cultivo, o tampão da enzima foi aquecido por 30 min a 60°C e posteriormente

adicionado de 50 μL da amostra contendo a enzima e 300 μL de DNS, seguido de 10 min de fervura. Uma unidade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μmol de equivalente de glicose por minuto de reação.

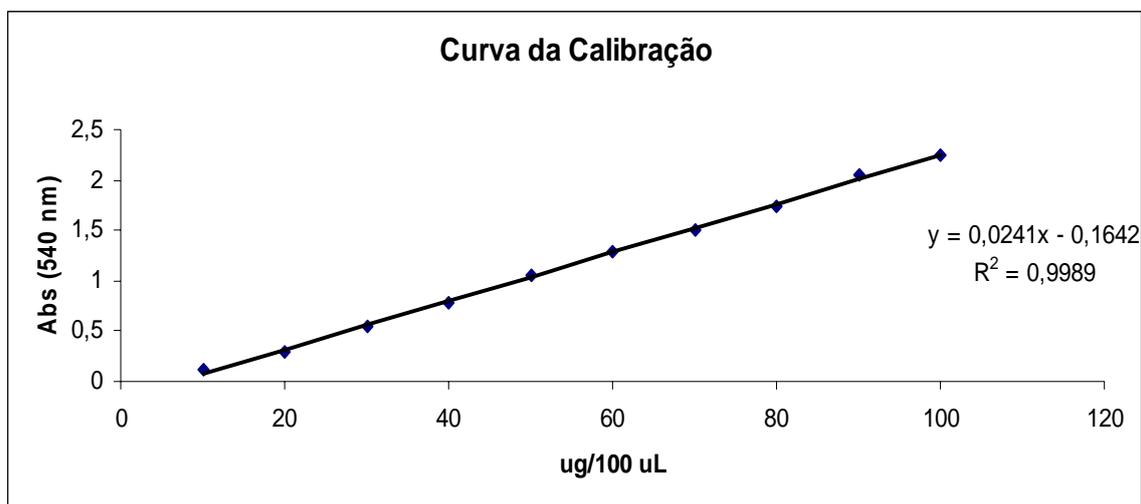


Figura 15. Curva padrão de glicose utilizada para se medir a quantidade de açúcares redutores nos ensaios enzimáticos. A equação da curva é $y = 0,0241x - 0,1642$ $R^2 = 0,9989$.

4.23.3 Atividade enzimática em diferentes pHs

O efeito da variação do pH na atividade enzimática foi avaliado realizando-se os ensaios com 50 μL de tampão em diferentes valores de pH (100 mM concentração final) e 50 μL de sobrenadante de cultura contendo a enzima de interesse, na temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos (Tabela 4).

Tabela 4. Composição dos tampões utilizados no ensaio de atividade em diferentes pH (Estoque).

| Tampão | pH(s) |
|------------------------|---------------------|
| Citrato de Sódio 0,5 M | 2,0 e 3,0 |
| Acetato de Sódio 0,5 M | 4,0, 5,0 e 6,0 |
| Tris-HCl 0,5 M | 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0 |

4.23.4 Atividade enzimática em diferentes temperaturas e estabilidade térmica

Os ensaios para verificação da influência da temperatura sobre a atividade enzimática foram realizados nas temperaturas de 10, 30, 40, 50, 60 e 70°C por 30 minutos em pH 7,0 (pH ideal da enzima). Para o ensaio de estabilidade térmica alíquotas da enzima foram pré-incubadas nas temperaturas de 50, 60 e 70°C, durante 0, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. A atividade remanescente da enzima foi detectada fazendo-se o ensaio na temperatura e pH ideal para enzima por 30 minutos. A reação foi composta por 50 µL da enzima pré-incubada na respectiva temperatura e 50 µL de uma solução de CMC 2% (p/v) em tampão Tris-HCl pH 7,0.

4.23.5 Atividade enzimática sobre diferentes substratos

A atividade da endoglicanase 1 recombinante foi testada utilizando-se os substratos celulose microcristalina (Sigmacell tipo 20 - Sigma), papel de filtro (Whatman N° 1), MUC (4-metilumbeliferil-β-D-celobiosídeo) e pNPG (p-nitrofenil-β-D-glicosídeo). Os ensaios com sigmacell e papel de filtro foram feitos medindo-se a quantidade de açúcares redutores produzidos, nas mesmas condições das reação dos ensaios realizados com CMC, sendo substituído por 50 µL de solução sigmacell 2% (p/v) e por uma tira de 3 cm X 0,2 cm de papel de filtro (*Whatman* n° 1), respectivamente. No ensaio com sigmacell, os tubos foram agitados a cada 15 minutos, para manter o substrato em suspensão.

Para a atividade em pNPG, inicialmente foi estabelecida uma curva padrão do experimento utilizando uma solução de pNP (p-nitrofenil-glucopiranosídeo), nas concentrações 0, 0,12, 0,24, 0,36, 0,48, 0,60, 0,72, µmol/ml. O ensaio foi realizado

utilizando 500 μL de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,0, e 1 mL de solução de carbonato de sódio 1M. A absorvância foi lida a 405 nm e determinada a equação da curva padrão por regressão linear, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol/ml}$ de p-NP/mL de ensaio

O ensaio com pNPG foi realizado adicionando-se 500 μL de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,0, 250 μL de amostra contendo atividade de endoglicanase e 250 μL de pNPG 4 mM. O sistema foi incubado por 10 minutos a 42 °C e em seguida foram adicionados 1 mL de carbonato de sódio 1 M pH 9,0, para parar a reação. Posteriormente as absorvâncias foram medidas a 405 nm. O ensaio com MUC foi feito com 250 μL de MUC 2 mM, 50 μL de tampão Tris-HCl 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.

4.23.6 Detecção da atividade enzimática em placa de Petri

Os clones foram crescidos por 96 horas a 30°C em meio mínimo metanol para levedura *P. pastoris* (+ 0,5% metanol) contendo 0,5% (p/v) de carboximetilcelulose (*Low viscosity sodium Salt SIGMA*). Posteriormente procedeu-se à retirada das colônias crescidas e a coloração da placa com vermelho do congo (*Congo red*) 0,5% (p/v) por 15 min. Decorrido este tempo o excesso de corante foi retirado e a placa descorada utilizando uma solução de 1M NaCl até o surgimento dos halos de hidrolise.

4.23.7 Efeito de íons

O efeito de íons sobre a atividade de EGL1 foi verificado adicionando ao sistema de reação, 25 mM do sal correspondente, e determinando-se a atividade nas condições ótimas de temperatura e pH. Foram utilizados os íons Mg^{++} , Mn^{++} , Al^{+++} , Hg^{++} , Co^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} , Ca^{++} , Zn^{+++} .

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

4.24.1 Condições de eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo descrito por Silva-Pereira (2003). Amostras do sobrenadante contendo a enzima recombinante foram concentradas por liofilização e ou precipitação e ressuspensas em tampão de amostra desnaturante de proteína para um volume final de 20 μ L. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel separador de 12% contendo 0,15% de CMC (p/v) e concentrador de 4%. A eletroforese foi realizada por 8 horas em voltagem de 80 a 250 V. Como marcador de massa molecular para proteínas foi utilizado o “BenchMark Protein Ladder” (Invitrogen).

4.24.2 Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma)

Após o processo de eletroforese o gel de SDS-PAGE 12% contendo 0,15% de CMC (*Low viscosity sodium Salt SIGMA*), foi tratado para revelar a atividade enzimática conforme descrito por Sun *et al.* (2008) (com modificações). O gel foi retirado do sistema de eletroforese e lavado duas vezes em solução de isopropanol 25% em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 durante 20 minutos, para remover o SDS. Para a renaturação da enzima o gel foi lavado com água destilada, e posteriormente incubado

em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 + 5 mM de β -mercaptoethanol (pequenas quantidades auxiliam no dobramento de proteínas complexas) a 4°C durante a noite. Decorrido este tempo é descartada a solução e o gel é lavado em água destilada por duas vezes durante 2 minutos cada. O gel foi transferido para uma nova solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 e deixado a temperatura ambiente por mais 2 horas e incubado por mais 3 horas a 60°C em banho pré-aquecido. A atividade enzimática foi detectada corando-se o gel com solução de Congo Red 0,5% (p/v) durante 30 minutos, seguido de descoloramento com cloreto de sódio 1 M. Após a detecção da região de degradação do substrato no gel foram adicionados 200 μ L de HCl 0,2 M à solução de NaCl para fixação da cor, permitindo um maior contraste para a visualização da atividade enzimática em gel.

4.24.3 Coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

Um gel preparado nas mesmas condições descritas anteriormente foi utilizado para visualização do perfil protéico por coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Após corrida eletroforética o gel foi submerso em solução corante por 4 horas, sob agitação. Decorrido este tempo o mesmo foi descorado utilizando a solução descorante (metanol 30% (v/v); ácido acético glacial 7% (v/v)) pelo tempo necessário para a visualização das bandas de proteína.

4.25 Precipitação de proteína com TCA e acetona

Um mililitro do sobrenadante das fermentações foi precipitado com 250 μL de TCA 100 %.(concentração final 20%) Após ser incubado no *freezer* por 1 hora, foi centrifugado a 8000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 1 mL de acetona gelada e novamente centrifugado a 8000 x g por 30 minutos. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e ressuspensão em 20 μL de tampão de amostra 2X. No caso de amostras com o pH ácido (amostra com coloração amarela) acrescentou-se 2 μL de tampão de corrida (eletroforese) pH 8,8. As amostras foram estocadas a -20 °C até a análise em gel SDS-PAGE.

4. 26 Predição da estrutura 3D da endoglicanase 1 de *P.echinulatum*

A seqüência de aminoácidos predita foi analisada pelo programa *Blast Form* utilizando mecânica molecular (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>) sendo utilizadas para comparação somente seqüências com estrutura tridimensional existente em banco de dados (PDB). Baseada na análise da seqüência de aminoácidos da EGL 1 de *P. echinulatum*, foi escolhida a endoglicanase que melhor apresentou identidade com a seqüência identificada neste trabalho, para a predição da estrutura 3D da endoglicanase 1 de *P. echinulatum*, o programa ESyPred3D Web Server 1.0 (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie /urbm/bioinfo /esyPred/>) foi empregado. A visualização da sobreposição das estruturas foi realizada pelo programa PyMol (www.pymol.org).

4.27 Adição de um “dATP” para ligação em vetor pGEN-T (técnica de *A-tailing*)

Primeiramente foi calculado a quantidade de inserto a ser utilizado para ligação em vetor pGEN-T (quantidade de vetor a ser utilizado em ng, multiplicado pelo tamanho do fragmento a ser ligado em Kb, dividido pelo tamanho do vetor em Kb) (multiplicar o resultado por 5, excesso molar). Para a adição de um “A” nas extremidades 3’ OH livres pela técnica de *A-tailing* o valor obtido anteriormente para o sistema foi multiplicado por 2 (evitar possíveis perdas durante o processo de adição de “A”) e utilizado para compor o sistema contendo um volume final de 10 μ L, como descrito: cerca de 216 ng do fragmento a ser ligado, dATP para uma concentração final de 0,2 mM; tampão de *Taq* DNA polimerase para uma concentração final de 1X, cloreto de magnésio para a concentração final de 2 mM, 5 U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot).

Para a adição do dATP o sistema foi reagido em termociclador *Mastecycler personal Eppendorf*, modelo AG. O sistema foi mantido por 30 minutos a temperatura de 70 °C . Posteriormente 5 μ L desta reação foram utilizados para a montagem do sistema de ligação para vetor pGEM-T.

4.28 Ferramentas de bioinformática

Análise de cromatograma, via *Phred*, com a ferramenta PHPH (Megabace ou ABI) (<http://adenina.biomol.unb.br/>)

Análise de restrição: NEBcutter V2.0 - (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Alinhamento: ClustalW - (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

Análise de oligo nucleotídeo (*primers*) - Oligo Analyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>)

Busca e análise de seqüência: GenBank (NCBI) - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Cálculo do conteúdo de G+C: *NUCLEIC CPG ISLANDS* cpgplot, cpgreport, geecee, newcpgreport, Newcpgseek - (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/>)

Cálculo de massa molecular – (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)

Famílias de enzimas e classificação - CAZy ~ Carbohydrate-Active enZymes
(http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html)

Predição de sítios de *O*-glicosilação - NetOGlyc 3.1
(Server<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)

Predição de sítios de *N*-glicosilação - NetNGlyc 1.0 Server
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

Similaridade entre proteínas

FASTA/SSEARCH/GGSEARCH/GLSEARCH - *Protein Similarity Search*
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html>)

Tradução conceptual: *Translates a nucleotide sequence to a protein sequence*
(<http://expasy.org/tools/#translate>)

5 Resultados e Discussão

5.1 Obtenção do RNA total e RNA poli (A)⁺

O fungo *P. echinulatum* foi cultivado em meio para a produção de micélio, coletado em papel de filtro, lavado em água esterilizada e inoculado em meio MIC contendo fonte de carbono específica na concentração de 0,1% (BCA ou BMS) para promover a indução do sistema celulolítico do fungo *P. echinulatum*.

Decorridas 19 horas de indução, conforme descrito na metodologia, procedeu-se à extração do RNA total. A análise da qualidade e a quantificação do RNA total foram realizadas por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e espectrofotometria (GeneQuant), respectivamente. O perfil eletroforético de uma alíquota da preparação dos RNAs pode ser observado na figura 16, onde podemos visualizar as bandas relativas aos RNAs 28S e 18S, indicativo da integridade do RNA total obtido.

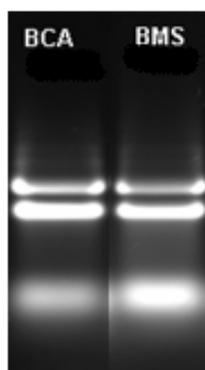


Figura 16. Perfil eletroforético da preparação de RNA total de *P. echinulatum*. Cerca de 4 μ g de cada amostra foram analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,3 μ g/mL.

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando 1 μ L da preparação de RNA. A razão entre absorvância a 260/280nm, que reflete a qualidade da amostra,

revelou que os RNAs obtidos apresentam qualidade adequada para a realização das etapas posteriores. O fracionamento do mRNA foi realizado como descrito em materiais e métodos, utilizando-se o RNA total obtido a partir de micélio crescido e induzido em meio contendo BCA como fonte de carbono. Estudos realizados por De-Paula *et al.* (1999, 2003) mostraram que substratos lignocelulósicos complexos, como BCA, são bons indutores de celulasas em *Humicola grisea* var. *thermoidea*, sendo utilizado este protocolo para a obtenção do micélio para a extração do RNA total. Outro fato associado à escolha da fonte de carbono está relacionado a utilização de BCA para a indução do complexo celulolítico de *P. echinulatum* por outros autores (Camassola *et al.*, 2007, Camassola *et al.*, 2009).

5.2 Construção de Biblioteca de cDNA de *Penicillium echinulatum* sob indução para o sistema celulolítico usando BCA como fonte de carbono.

A biblioteca de cDNA foi construída empregando-se o Kit “SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (*Invitrogen*). Cerca de 3µg do mRNA obtido conforme descrito acima foram empregados como molde na síntese da primeira fita de cDNA, sendo esta e as demais etapas realizadas exatamente de acordo com as recomendações do fabricante.

5.3 Screening da biblioteca de cDNA de *P. echinulatum*.

Primeiramente se optou por realizar a seleção de clones positivos pela atividade celulolítica de hidrólise em placa sendo avaliados inicialmente 2892 clones bacterianos. Uma vez observado a formação de discretos halos de hidrólise em todos os clones inoculados, 48 destes clones foram selecionados ao acaso, para a extração de DNA

plasmidial e posterior seqüenciamento. De todos os clones seqüenciados, foi possível obter somente quatro seqüências de qualidade (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100 nucleotídeos), sendo que nenhuma destas exibia similaridade com genes de celulasas depositados no GenBank. Duas das seqüências obtidas apresentavam similaridade com uma proteína de choque térmico; outra exibia similaridade com uma ATPase e a última não apresentou similaridade com qualquer seqüência descrita no banco de dados. Devido ao insucesso deste processo de *screening*, foi utilizada a metodologia de hibridação de clones em membrana de nylon para a seleção de clones positivos. Utilizando esta metodologia também não obtivemos êxito na seleção de clones que aportassem genes de celulasas.

Em função dos resultados obtidos em placas de *screening* e à limitação da metodologia empregada na seleção dos clones, onde celulose microcristalina foi utilizada como substrato, sendo esta altamente insolúvel, somada ao insucesso na utilização das técnicas de hibridação de colônia, decidimos optar por uma metodologia alternativa para a seleção dos clones de cDNAs de celulasas. Para tanto, realizamos um *screening* por meio de seqüenciamento aleatório de clones, objetivando além da seleção de clones contendo seqüências homologas a genes de celulase, a construção do transcriptoma parcial do fungo *Penicillium echinulatum*.

5.4 Seqüenciamento automático de clones selecionados aleatoriamente a partir da biblioteca de cDNA de *P. echinulatum*.

Tendo em vista o desconhecimento sobre a Biologia Molecular de *P. echinulatum* e o baixo número de seqüências nucleotídicas descritas para o gênero *Penicillium*, um fungo de grande interesse biotecnológico, iniciamos a caracterização

parcial do transcriptoma deste fungo por meio do seqüenciamento automático de clones de uma biblioteca de cDNA, geradas sob condições de indução para genes de celulases.

A metodologia básica para a amplificação da biblioteca, seleção, cultivo dos clones recombinantes (coloração branca no sistema X-Gal/IPTG), extração e análise do DNA plasmidial foi a mesma previamente descrita em nosso laboratório (Felipe *et al.*, 2005, Procópio, 2006). Uma cultura dos clones bacterianos recombinantes portando plasmídios a serem seqüenciados foi obtida e mantida como estoque em glicerol 35% e armazenada a -80°C. A figura 17 mostra o perfil eletroforético típico dos DNAs plasmidiais obtidos a partir de uma placa com 96 clones da biblioteca de cDNA de *P. echinulatum*.

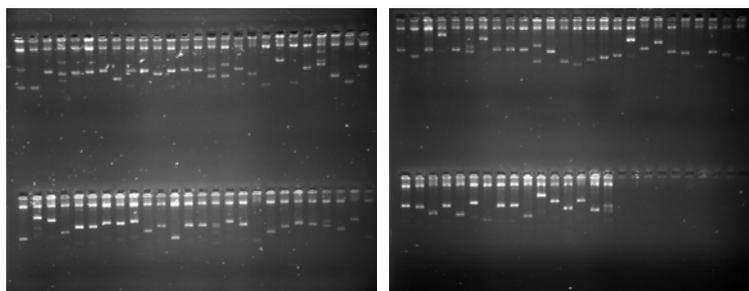


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3 µg/mL), ilustrando o perfil característico de DNAs plasmidiais preparados a partir de clones isolados e selecionados aleatoriamente da biblioteca de cDNA de *P. echinulatum* (Placas de *deep weel*).

5.4.1 Geração de *Expressed Sequence Tags (ESTs)*.

A partir do DNA plasmidial extraído, foram utilizados cerca de 200 ng para as reações de seqüenciamento, que procederam conforme descrito anteriormente, utilizando-se o iniciador M13 reverso. As seqüências obtidas após análise pelo *pipeline* da página do Projeto Transcriptoma de *Paracoccidioides brasiliensis*

(<http://adenina.biomol.unb.br>), constituído pelos programas PHRED, Cross-match e CAP3, foram comparadas pelos programas BLASTN e BLASTX contra a base de dados do NCBI. Foram submetidas ao seqüenciamento automático 12 placas contendo 96 clones de cDNA cada (1152 clones ao todo). Destas, apenas 287 seqüências de qualidade foram geradas (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100 nt), correspondendo a 54,67% do total de seqüências geradas. Essa baixa eficiência na geração de seqüências com essa biblioteca deveu-se tanto a problemas da nossa estrutura de seqüenciamento, bem como a um grande número de DNAs plasmidiais constituídos apenas por vetor sem inserto de cDNA, apesar da seleção prévia de clones brancos. A figura 18 mostra o agrupamento das seqüências após a análise pelo programa CAP 3.

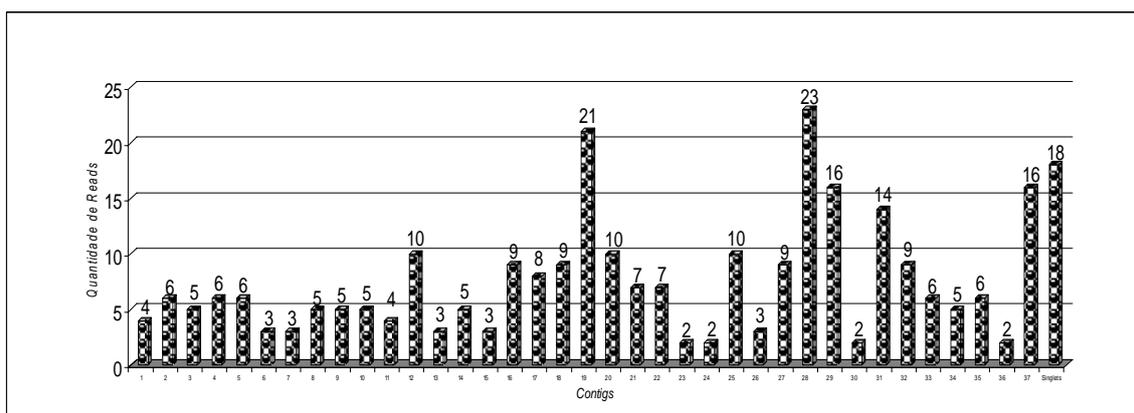


Figura 18. Distribuição do número de seqüências em cada *contig* e seqüências únicas que permaneceram como *singlets*.

Conforme apresentado na figura 18, 269 ESTs foram agrupadas em 37 *contigs*, que apresentam a seguinte composição: *contigs* 23; 24; 30 e 36 constituídas por 2 seqüências cada; *contigs* 6; 7; 13; 15 e 26, por 3 seqüências cada; *contigs* 1 e 11 por 4 seqüências cada; *contigs* 3; 8; 9; 10; 14 e 34, por 5 seqüências cada; *contigs* 2; 4; 5; 33 e 35 constituídas por 6 seqüências cada; *contigs* 21 e 22 por 7 seqüências cada; *contig* 17

por 8 seqüências cada; *contigs* 16; 18; 27 e 32 por 9 seqüências cada. *contig* 12; 20 e 25 constituídas por 10 seqüências cada; *contig* 31 por 14 seqüências, *contig* 28 por 23 seqüências, *contig* 19 por 21 seqüências, *contigs* 29 e 37 por 16 seqüências cada. Posteriormente procedeu-se à análise de similaridade destas seqüências em bancos de dados (NCBI) sendo os resultados principais mostrados na tabela 5. Relacionado as seqüências *Singlets* que totalizaram 18, estas apresentaram o seguinte perfil após análise de similaridade: Doze foram identificadas como proteínas hipotéticas; uma como Kinase sub-unidade reguladora (cAMP-dependente), duas como proteína predita, uma como proteína de citoplasma, uma como proteína (Nop14) rRNA e uma sem similaridade no banco de dados no NCBI.

Tabela 5. Análise de similaridade das *contigs* obtidas após corrido *pipeline* de análise (PHRED; Cross-match e CAP3). As seqüências 72 obtidas foram analisadas pelo programa BLASTn e BLASTx, contra a base de dados do NCBI. (Seqüências de fungos).

| Contigs formados | Blastn nr | | Blastx nr | |
|--------------------------|---|--|---|--|
| | Anotação | e-value Porcentagem de corbetura | Anotação | e-value Porcentagem de corbetura |
| Contig 1 (4 ESTs) | <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 hypothetical protein (An09g00590) partial mRNA | 4e-07 75% | hypothetical protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82] | 2e-14 52% |
| Contig 2 (6 ESTs) | <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 hypothetical protein AN0358.2 partial mRNA | 2e-04 72% | extracellular SCP domain protein Pry1 [<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293] | 3e-25 57% |
| Contig 3 (5 ESTs) | <i>Ustilago maydis</i> 521 hypothetical protein (UM02458.1) partial mRNA | 0.10 81% | conserved hypothetical protein [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500] | 5e-04 25% |
| Contig 4 (6 ESTs) | <i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51 hypothetical protein (CHGG_06573) partial mRNA | 0,094 78% | hypothetical protein SNOG_07419 [<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15] | 0,16 27% |
| Contig 5 (6 ESTs) | hypothetical protein [<i>Podospora anserina</i> DSM 980] | 0,008 89% | hypothetical protein NCU04429 [<i>Neurospora crassa</i> OR74A] | 0.30 24% |
| Contig 6 (3 ESTs) | <i>Magnaporthe grisea</i> 70-15 predicted protein (MGG_04105) partial mRNA | 3e-45 83% | stress response RCI peptide, putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357] | 2e-25 94% |
| Contig 7 (3 ESTs) | <i>Penicillium brasilianum</i> strain IBT 20888 endo-1,4-beta-D-glucanase (cel5c) gene, complete cds | 3e-52 67% | cellulase, putative [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1] | 6e-38 63% |
| Contig 8 (5 ESTs) | <i>Ajellomyces capsulatus</i> NAM1 predicted protein (HCAG_03354) partial mRNA | 0,34 88% | histidine kinase [<i>Aspergillus parasiticus</i>] | 0,61 25% |
| Contig 9 (5 ESTs) | <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 conserved hypothetical protein (AFUA_1G05370) | 0,095 92% | SUN domain protein (Adg3), putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357] | 0,61 25% |
| Contig 10 (5 ESTs) | <i>Septobasidium burtii</i> translation elongation factor 1 alpha (TEF1) gene, partial cds | 0,006 86% | hypothetical protein MGL_2613 [<i>Malassezia globosa</i> CBS 7966] | 0,18 38% |
| Contig 11 (4 ESTs) | <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_01942) partial mRNA | 1e-38 68% | conserved hypothetical protein [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624] | 2e-46 55% |
| Contig 12 (10 ESTs) | <i>Penicillium decumbens</i> strain 114-2 swollenin gene, complete cds | 3e-76 81% | swollenin [<i>Penicillium decumbens</i>] | 2e-41 91% |

| | | | | |
|---------------------|---|---------------|---|--------------|
| Contig 13 (3 ESTs) | <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130 hypothetical protein (CC1G_09809) partial mRNA | 0,74 86% | hypothetical protein SNOG_01444 [<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15] | 1.1 46% |
| Contig 14 (5 ESTs) | potassium channel, putative [<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224] | 1e-37 71% | ion channel, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] | 1e-57 53% |
| Contig 15 (3 ESTs) | <i>Podospora anserina</i> DSM 980 hypothetical protein (PODANSg6691) partial mRNA | 0,19 87% | predicted protein [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624] | 0,012 28% |
| Contig 16 (9 ESTs) | hypothetical protein [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88] | 0,008 93% | predicted protein [<i>Postia placenta</i> Mad-698-R] | 0,009 25% |
| Contig 17 (8 ESTs) | <i>Neurospora crassa</i> OR74A hypothetical protein NCU01791 partial mRNA | 0,36 90% | hypothetical protein CHGG_07610 [<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51] | 0,52 29% |
| Contig18 (9 ESTs) | <i>Neurospora crassa</i> OR74A thioredoxin I partial mRNA | 8e-15 38% | thioredoxin, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] | 0,10 81% |
| Contig 19 (21 ESTs) | 18S ribosomal RNA gene, partial sequence | 0,81 92% | transcriptional regulator, LysR family [<i>Enterocytozoon bieneusi</i> H348] | 0,002 30% |
| Contig 20 (10 ESTs) | Cytochrome b subunit of succinate dehydrogenase, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] | 2e-26 74% | Cytochrome b subunit of succinate dehydrogenase, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] | 9e-14 70% |
| Contig 21 (7 ESTs) | hypothetical protein [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624] | 7e-73 74% | SUN domain protein (Uth1), putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357] | 6e-57 72% |
| Contig 22 (7 ESTs) | <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_05538) partial mRNA | 7e-45 45% | integral ER membrane protein Scs2, putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357] | 8e-43 51% |
| Contig 23 (2 ESTs) | <i>Penicillium sp.</i> CCF3812 18S ribosomal RNA gene | 0,0 99% | hypothetical protein NCU04867 [<i>Neurospora crassa</i> OR74A] | 0,17 73% |
| Contig 24 (2 ESTs) | Soil fungal sp. DM2-454 gene for 28S rRNA, partial sequence | 1e-67 100% | unnamed protein product [<i>Kluyveromyces lactis</i>] | 9e-11 81% |
| Contig 25 (10 ESTs) | 5.8S ribosomal RNA gene <i>Penicillium sp</i> | 0,0 100% | Mitochondrial protein of unknown function <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 6e-22 76% |
| Contig 26 (3 ESTs) | RING finger protein [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] | 4e-12 83% | hypothetical protein AN6609.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4] | 3e-08 74% |
| Contig 27 (9 ESTs) | <i>Lophodermium indianum</i> ; 5.8S ribosomal RNA gene | 1,2 100% | membrane transporter [<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP] | 4.3 29% |
| Contig 28 (23 ESTs) | hypothetical protein [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88] | 7e-10 97% | conserved hypothetical protein [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357] | 2e-15 40% |

| | | | | |
|---------------------|---|---------------|---|--------------|
| Contig 29 (16 ESTs) | <i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51 hypothetical protein (CHGG_07385) partial mRNA | 0,34 81% | hypothetical protein AN9135.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4] | 2e-15 40% |
| Contig 30 (2 ESTs) | hypothetical protein [<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51] | 0,002 84% | hypothetical protein CHGG_06069 [<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51] | 5,0 40% |
| Contig 31 (14 ESTs) | <i>P.chrysogenum</i> mitochondrion genes | 0,0 84% | ATP synthase subunit A; ATPase subunit 6 [<i>Penicillium chrysogenum</i>] | 1e-43 90% |
| Contig 32 (9 ESTs) | <i>Podospora anserina</i> genomic DNA chromosome 4 | 6e-04 82% | hypothetical protein UM02137.1 [<i>Ustilago maydis</i> 521] | 9,9 42% |
| Contig 33 (6 ESTs) | hypothetical protein [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624] | 7e-149 77% | MFS lactose permease, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] | 1e-98 77% |
| Contig 34 (ESTs) | hypothetical protein [<i>Gibberella zeae</i> PH-1] | 2e-61 71% | Formaldehyde dehydrogenase [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>] | 1e-74 62% |
| Contig 35 (6 ESTs) | <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1 mitochondrial metallochaperone Sco1 Putative (ACLA_035570), partial mRNA | 2e-118 81% | mitochondrial metallochaperone Sco1, putative [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1] | 2e-86 70% |
| Contig 36 (2 ESTs) | cytochrome P450 alkane hydroxylase, putative [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1] | 3e-09 81% | <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1 cytochrome P450 alkane hydroxylase, putative (ACLA_082210), partial mRNA | 4e-05 77% |
| Contig 37 (16 ESTs) | <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 MFS quinate transporter (AFUA_4G00990), partial mRNA | 3e-123 78% | MFS quinate transporter, putative [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1] | 2e-92 89% |

5.5 Obtenção e caracterização do cDNA *egl1* da molécula de cDNA de *Penicillium echinulatum*

5.5.1 Obtenção do cDNA.

O cDNA *egl1* que codifica a endoglicanase 1 (EGL1) de *Penicillium echinulatum* foi identificado em uma coleção de ESTs geradas pelo seqüenciamento aleatório de clones de uma biblioteca de cDNA (Tabela 5, *contig 7*) a qual foi construída a partir de mRNA de *P. echinulatum*, cultivado sob condição de indução para enzimas do sistema celulolítico. Após isolamento do clone bacteriano portando o cDNA e da obtenção do respectivo DNA plasmidial, este foi seqüenciado e confirmado como correspondente ao cDNA de uma endoglicanase de *P. echinulatum*.

A análise da seqüência obtida revelou que o cDNA *egl1* não se encontrava completo, faltando parte da região relativa ao peptídeo sinal da enzima. O cDNA obtido apresentou 1185pb e codifica uma proteína predita de 395 resíduos de aminoácidos.

Com o intuito de confirmar este fato, posteriormente foram realizados alinhamentos múltiplos utilizando-se a seqüência protéica predita para EGL1 e os melhores *hits* de endoglicanases encontrados no banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Após o alinhamento destas seqüências, foi utilizando o programa *SignalP* (*ExPASy Proteomics tools* <http://expasy.org/tools>) para a predição da região correspondente ao peptídeo sinal de cada seqüência e sua posterior comparação com a seqüência EGL1 de *P. echinulatum* (Figura 19).

A análise do alinhamento múltiplo sugere que o peptídeo sinal da seqüência EGL1 não está de fato completo e que a proteína madura provavelmente inicia em dois resíduos de prolina. Os resíduos anteriores às prolinas (QSIRRVLT) são possivelmente parte do peptídeo sinal nativo desta endoglicanase de *P. echinulatum*.

```

P.e -----QSIRRVLTPP-
1- MRFTQLFIAVSTASLALAPP-
2- MKTT--TLVAALLPLVAPPN-
3- MKAS--TII CALLPLAAVPN-
4- MKAS--TII CALLPLAVAPPN-
5- MRIGSLIMAASAAGLVHAYPR-
6- MRISNLIVAASAASMVSALPS-
7- MKLS--LLAVLALPLALAP--
8- MRIANLIMAASAAGLVSAYPT-
9- MKLGSVLVALSAARLTSAPLA
10- MRISNLIMAASAAGLVSALPV-

```

Figura 19. Alinhamento múltiplo da região correspondente ao possível peptídeo sinal da proteína predita a partir do cDNA *egl1* de *P.echinulatum* com seqüências de diferentes endoglicanases depositadas em banco de dados NCBI (1 – 10). Os resíduos de aminoácidos em negrito e azul cian sinalizam a região de clivagem para a liberação da proteína madura. Os resíduos em azul cian sinalizam o início da proteína madura nas diferentes endoglicanases. O resíduo em vermelho sinaliza o início da proteína madura EGL1 de *P.echinulatum*.

Visando a posterior clonagem do cDNA *egl1* (região correspondente à proteína madura, sem peptídeo sinal) em fase com a seqüência do peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* presente no vetor de expressão para *P. pastoris* pPIC9, iniciadores específicos foram desenhados contendo em suas extremidades sítios para enzimas de restrição apropriadas, além da seqüência de reconhecimento para a clivagem do produto de expressão pela protease Kex II de *P. pastoris*. As características destes iniciadores estão descritas na tabela 2. O DNA plasmidial contendo o cDNA *egl1* clonado foi usado como molde em uma PCR contendo os iniciadores descritos na tabela 2, utilizando-se uma DNA polimerase de alta fidelidade (*Platinum Taq High Fidelity* - Invitrogen) para obtenção de um amplicon compatível para a clonagem no vetor pPIC9. Conforme esperado, o fragmento de DNA amplificado apresentou o tamanho de aproximadamente 1,2 Kb (Figura 20).

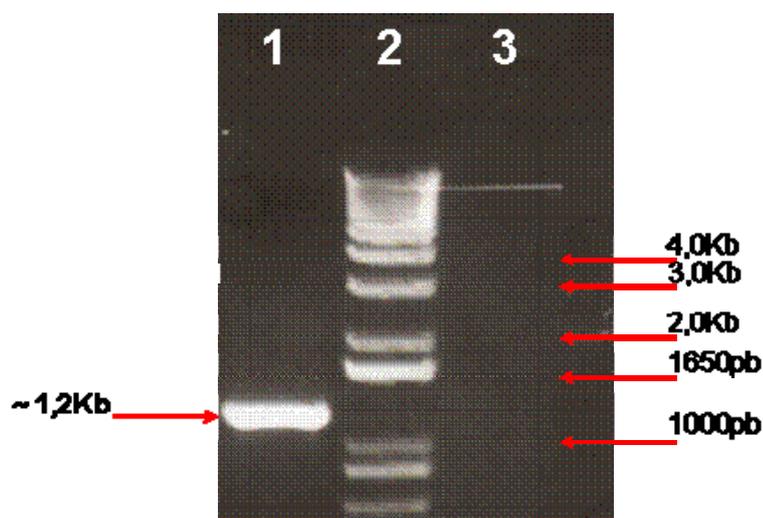


Figura 20. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao cDNA *egl1* de *P. echinulatum*, analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3 $\mu\text{g/mL}$). Coluna 1: produto de amplificação obtido a partir do DNA plasmidial contendo o cDNA *egl1* de *P. echinulatum*; Coluna 2: Marcador de massa molecular 1Kb *plus DNA ladder* (Invitrogen); Coluna 3: Controle negativo da reação (reação sem molde).

Uma vez que a Taq DNA Polimerase de alta fidelidade gera produtos de amplificação com extremidades abruptas, adicionalmente foi feito o “*A-tailing*” no produto de amplificação do cDNA *egl1*. Esse procedimento visa à adição das extremidades de adenina necessárias para a clonagem no vetor pGEM-T (Promega). Esta clonagem consiste de uma etapa intermediária que antecede a construção do vetor de expressão para *P. pastoris*. Após a ligação deste inserto no pGEM-T, o produto da ligação foi usado para a transformação de células competentes de *E. coli* (DH5 α). A figura 21, descreve a estratégia de obtenção do plasmídeo recombinante denominado pGEM-T-*egl1*/P.e.

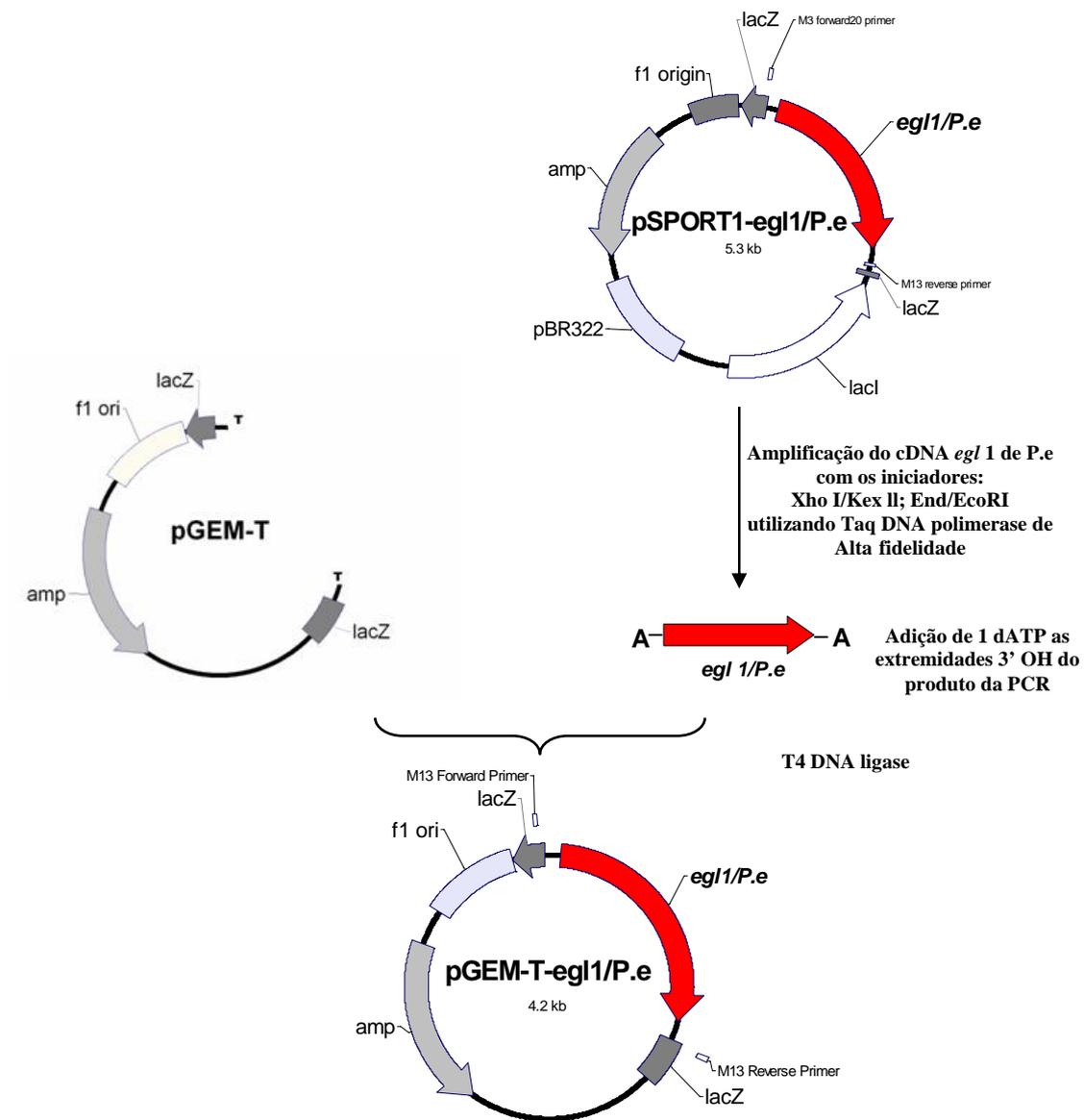


Figura 21. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pGEM-T-egl1/P.e. O cDNA *egl1*, previamente purificado, foi utilizado para uma reação de *A-tailing* para a adição de terminais (dATP) nas extremidades 3'OH. Após a adição este cDNA foi ligado ao vetor pGEM-T, utilizando a enzima T4 DNA ligase. Estes plasmídeos foram seqüenciados empregando-se os iniciadores Xho I/Kex II; End I/EcoR I e M13 *forward*; M13 *reverse*.

5.5.2 Características da seqüência de nucleotídeos e da seqüência protéica deduzida do cDNA *egl1* de *P. echinulatum*.

Após a obtenção da construção molecular pGEM-T-egl1/P.e (Figura 21), o cDNA *egl1* foi novamente seqüenciado e analisado por meio de diferentes ferramentas

de Bioinformática (<http://expasy.org>) que estão disponíveis em rede no Laboratório de Biologia Molecular (UnB) bem como as ferramentas encontradas na rede mundial de computadores (Item: 4.28).

Empregando-se estas ferramentas, pode ser identificado um cDNA de 1161pb que codifica uma proteína predita (EGL1) que apresenta 387 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular teórica de 41,1 kDa, ponto isoelétrico teórico de 4,99 e apresenta apenas um sítio potencial de N glicosilação. A proteína predita é formada por três diferentes domínios: um domínio catalítico; um domínio de ligação a celulose (CBD, *Cellulose Binding Domain*) altamente conservado, envolvido na ligação da enzima ao substrato; e uma região de conexão entre os dois domínios anteriores (dobradiça). A análise da seqüência do domínio catalítico de EGL1 sugere que a enzima de *P. echinulatum* seja uma endoglicanase alcalina da família 5A de Glicosil hidrolases (EC 3.2.1.4) (Endo-1,4-beta-glicanase) (Figura 22). A seqüência de EGL1 de *P. echinulatum* apresenta 78% de similaridade com as proteínas de *Penicillium brasilianum*, 66% com a de *Aspergillus clavatus* NRRL1 e *Neosartorya fischeri* NRRL 181, 65% com a de *Aspergillus fumigatus* Af293, 64% com a de *Penicillium chrysogenum*, 66% com a de *Aspergillus fumigatus*, 62% com a de *Aspergillus terreus* e 59% com a de *Aspergillus niger* (Figura 23). O domínio de ligação ao carboidrato da EGL1 de *P. echinulatum* pertence à família I dos CBDs e apresenta 84% de similaridade com o CBD de *Penicillium marneffe* ATCC 18224; *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus clavatus* NRRL 1. Segundo Takada *et al.*, (2002), poucas proteínas da família 5A apresentam o domínio de ligação a celulase.

```

1 ccgccagcctcgcgctcaatcagtagcacaactgagccctccatgccaggcttgccagt 60
1 P P A S R S I S S T T E A L H A R L A S 20

61 cgcacggcagtggtgaagtaatcagaccagataccggttggtgatccacttctctcgcc 120
21 P H G S G E V I R P D T V G D P L L L A 40

121 gttgacgatgtagtgcttaacatcttccgagtgccatttttgatggagcgggtgatcccc 180
41 V D D V V L N I F R V P F L M E R L I P 60

181 aactcaatgactgctagcccggatgcagcctatctcaagggtcttacagacactatcaac 240|
61 N S M T A S P D A A Y L K G L T D T I N 80

241 ttcatacctcgcctcgggtgcgcatgccattgtcgcacccgcataactatggacgctactat 300
81 F I T S L G A H A I V D P H N Y G R Y Y 100

301 ggcaaagtcattacctcgacgagcgcacttcaaggcgttctggacgactggtgccaacag 360
101 G K V I T S T S D F K A F W T T V A K Q 120

361 tttgcatcaaatgacaaggctcatcttgataccaacaacgagttcaacaccgaggaccaa 420
121 F A S N D K V I F D T N N E F N T E D Q 140

421 tcgactgtctacgacatgaatcagccgccatcgacgccatccgagctgccggcgcaacc 480
141 S T V Y D M N Q A A I D A I R A A G A T 160

481 tcacaatacatcttctcgaaggaactcctggaccggcgccctggacctgggtcagcgtc 540
161 S Q Y I F V E G N S W T G A W T W V S V 180

541 aactcgggattggccaacctgaccgacccccagaacaagatcgtctacgagatgcaccaa 600
181 N S G L A *N L T D P Q N K I V Y E M H Q 200

601 tacctcgactctgacggttccggtacctcgggcacctgcgccagctccaccatcggaag 660
201 Y L D S D G S G T S G T C A S S T I G K 220

661 gagcgcgtcacatccgcaacccaatggctcaaggacaacaacaagctcgggttctcgggc 720
221 E R V T S A T Q W L K D N N K L G F L G 240

721 gagttcgcggcggtgccaattctgtgtgagagtgccatcactggtatgctcgactac 780
241 E F A G G A N S V C E S A I T G M L D Y 260

781 atgcaagccaacagtgacgtctggctgggtgcttctcgtgggtggctgccggaccgtgggtg 840
261 M Q A N S D V W L G A S W W A A G P W W 280

841 ggcaattatttcgcctccatggagccgccatcaggagcgggatacacttattactacaag 900
281 G N Y F A S M E P P S G A G Y T Y Y Y K 300

901 atcctgtcgaactatttccctggttaagagcactggcggcggtcgcgactaccactacg 960
301 I L S N Y F P G K S T G G G S T T T T T 320

961 actgccctgctacaacgaccactaaggcgcctgttactaccaccaccaccacgaccgcc 1020
321 T A P A T T T K A P V T T T T T T A 340

1021 cctgctaccactactgctactggagcgcgactgctgcacactgggctcagtgccggcga 1080
341 P A T T T A T G G A T A A H W A Q C G G 360

1081 gttgatattcgggaccacggcgtgtgccagtcctgatacctgcaaggtgcagaatgac 1140
361 V G Y S G P T A C A S P Y T C K V Q N D 380

1141 tactactcgcagtgctgtgaGAAAGTGTCTTCAAGGTGATCCAGGATTCAAGTTCTGCC 1200
381 Y Y S Q C L * 386

1201 TAGAAATGTTTTGACATATTCGTTTTTCTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1258

```

Figura 22. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos de *P. echinulatum* cDNA *egl1* que codifica uma putativa endoglicanase. Aminoácidos estão representados abaixo da seqüência de nucleotídeos. O domínio de ligação ao carboidrato (CDB) está sublinhado. Um potencial sitio de N-glicosilação é indicada (* N). Resíduos conservados do sitio ativo de EGL1 são mostrados em vermelho (resíduos catalíticos glutamato), azul (resíduos aromáticos) e verde (resíduos polares), como descrito anteriormente para a família GH5 (Sakon *et al.*, 1996; Leggio e Larsen, 2002).

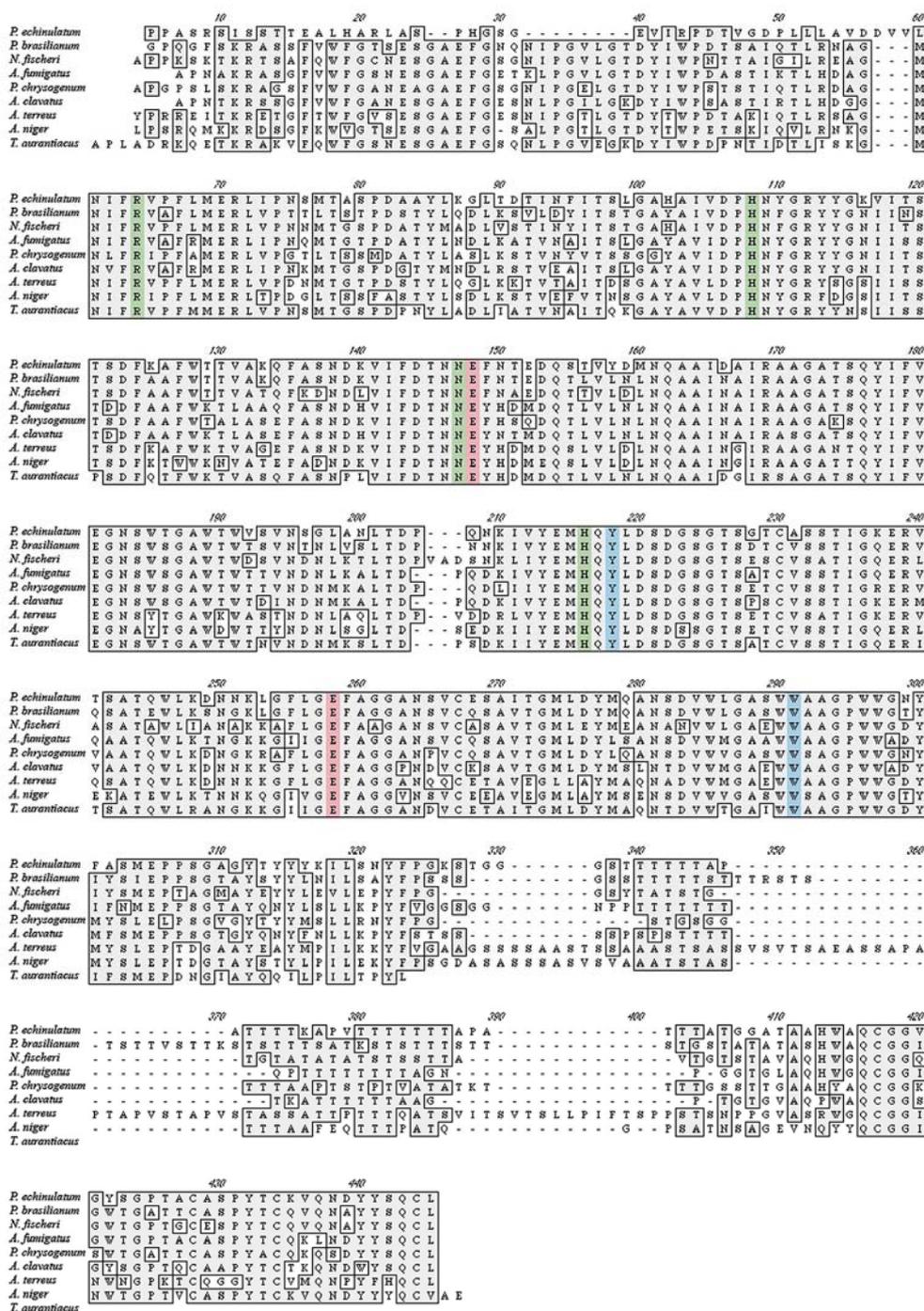


Figura 23. Alinhamento múltiplo (ClustalW) de *Penicillium echinulatum* EGL1 com outras seqüências de glicosil hidrolases da família 5 (GH5). O esquema de cores é o mesmo utilizado na Figura 22. Os números de acesso das seqüências são: *Penicillium echinulatum* (este trabalho, FJ998421), *Aspergillus clavatus* (XP_001268256), *Aspergillus fumigatus* (XP_751043), *Aspergillus niger* (XP_001397982), *Aspergillus terreus* (XP_001214181), *Neosartorya fischeri* (XP_001261834), *Penicillium brasilianum* (ACB06750), *Penicillium chrysogenum* (CAP85523), *Thermoascus aurantiacus* (AAL88714).

5.5.3 Predição da estrutura 3D da endoglicanase 1 de *P.echinulatum*

Com base na seqüência de aminoácidos deduzida, foi possível realizar a predição da estrutura 3D da EGL1. A seqüência de aminoácidos foi analisada pelo programa *Blast Form* (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>) utilizando como padrão de comparação as seqüências com estruturas tridimensionais já descritas. Pela comparação e análise da seqüência de EGL1 foi escolhida entre as estruturas já descritas, a endoglicanase de *Thermoascus aurantiacus* (Leggio and Larsen, 2002) como molde para a predição da estrutura 3D. A modelagem baseada na estrutura da cadeia A desta proteína (PDB 1GZJ) apresentou 49,9% de identidade. O RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre o modelo e a proteína molde foi de 0,288 Å. O calculo de refinamento da estrutura predita, foi realizado utilizando o potencial intramolecular (somatório das energias ligadas e não ligadas dentro da própria molécula). O programa ESyPred3D Web Server 1.0 (Lambert *et al.*, 2002) foi empregado para a realização da predição. (Figura 24).

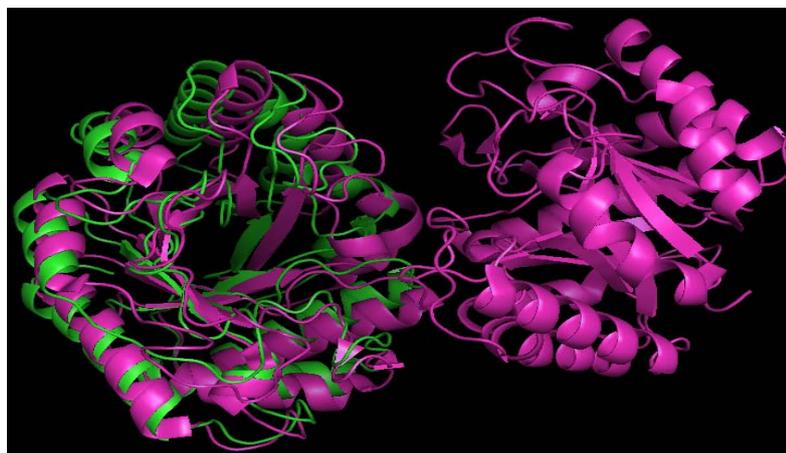


Figura 24. Sobreposição das estruturas terciárias preditas: 1GZJ de *T. aurantiacus* (Magenta) e EGL1 de *P. echinulatum* (verde), ilustrando as conformações coincidentes (desvio observado de 0,288 Å). A proteína de *T. aurantiacus* apresenta duas cadeias, a EGL1 de *P. echinulatum* foi modelada tendo como molde a cadeia A desta proteína. Ambas são formadas por folhas (β/α)₈. A estrutura tridimensional da endoglicanase de *T. aurantiacus* encontra-se em banco de dados de proteínas sob o número de acesso PDB 1GZL. A visualização da sobreposição das estruturas foi realizado pelo programa PyMol.

5.6 Expressão heteróloga do cDNA *egl1* em *Pichia pastoris*

5.6.1 Construção do vetor de expressão

A utilização de vetores integrativos é mais desejável do que o uso de sistemas episomais de expressão, pois estes tendem a ter baixo número de cópias em *P. pastoris* somado a uma baixa estabilidade (Daly & Hearn, 2005). Os vetores com base no promotor AOX são muito utilizados para dirigir a expressão de diversas proteínas e podem levar a produção da proteína de interesse a atingir até 30% do total de proteínas expressas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Desta forma, para analisar a expressão do cDNA *egl1* de *P. echinulatum* em *P. pastoris* sob controle do promotor induzível AOX1, foi construído o vetor de expressão pPIC9-*egl1*/P.e. A estratégia para a construção deste vetor é mostrada na figura 25. O vetor pGEM-T-*egl1*/P.e foi digerido com as enzimas *Xho* I ou *Eco*R I e o cDNA *egl1*, previamente purificado, e contendo os mesmos sítios de restrição nas extremidades 5' e 3', foi ligado ao vetor. Posteriormente, a construção molecular resultante, pPIC9-*egl1*/P.e, foi digerido com as enzimas *Bgl* II e *Stu* I, liberando as seqüências de integração no genoma de *P. pastoris*.

Após a purificação do vetor linearizado, o mesmo foi ligado ao cDNA *egl1* purificado utilizando-se a enzima T4 DNA ligase. A clonagem do cDNA *egl1* foi direcionada de modo a entrar em fase com o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* codificado pelo vetor. Após transformação bacteriana (choque térmico), foram selecionados quatro clones transformantes, e posteriormente submetidos à extração do DNA plasmidial. Este DNA foi digerido com as enzimas *Xho* I e *Eco*R I, liberando o fragmento de cDNA correspondente ao cDNA *egl1*.

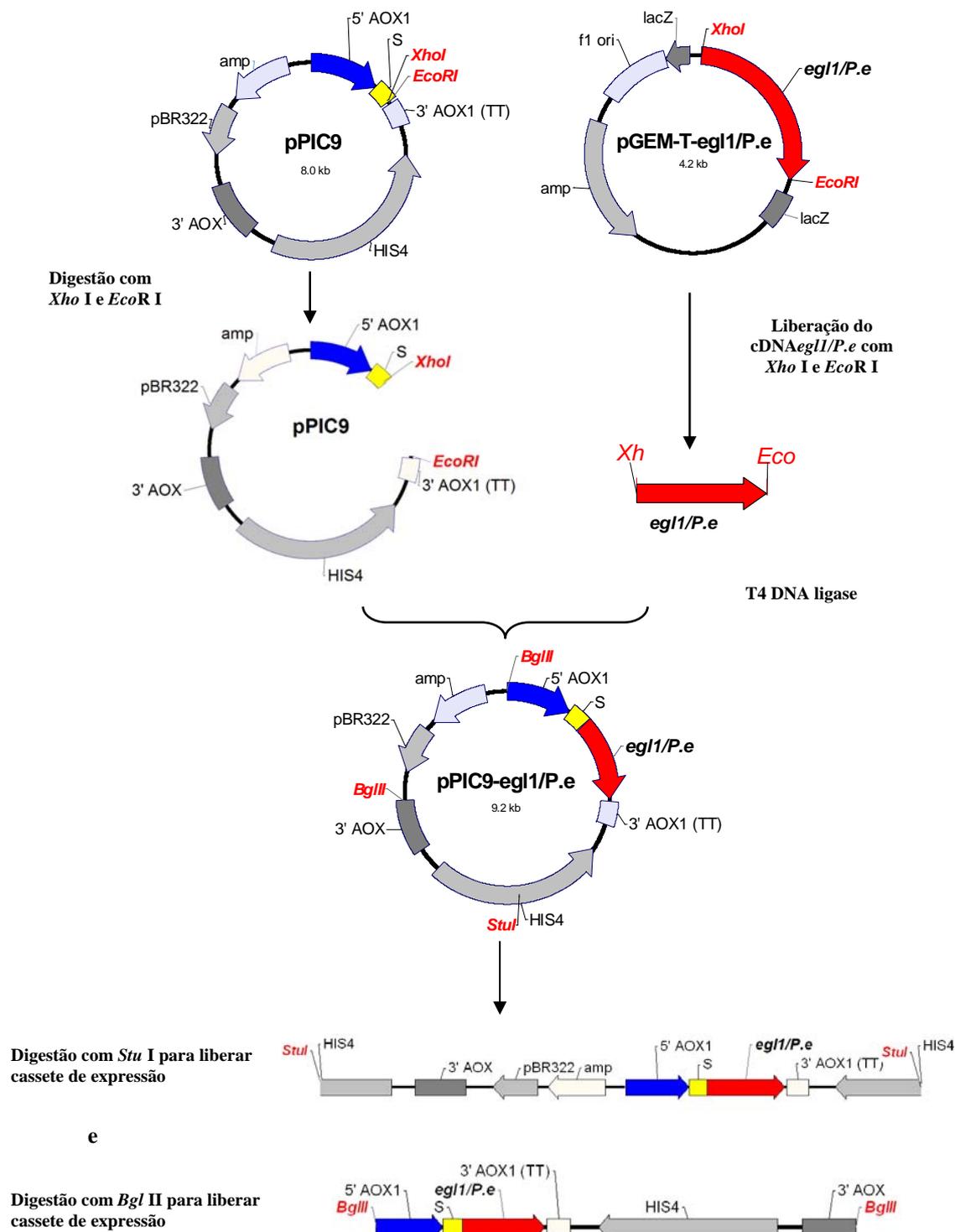


Figura 25. Representação esquemática da estratégia utilizada para a construção do vetor pPIC9-egl1/P.e. O vetor pGEM-T-egl1/P.e e o vetor pPIC9-egl1/P.e foram digeridos com as enzimas *Xho* I e *Eco* R I. O cDNA *egl1* foi purificado e ligado ao vetor pPIC9-egl1/P.e. O vetor construído, pPIC9-egl1/P.e, foi digerido com as enzimas *Bgl* II e *Stu* I para liberar as seqüências de integração no genoma de *P. pastoris*.

A análise do perfil de restrição comprovou a presença do inserto no vetor de expressão e a integridade do mesmo (Figura 26). Confirmada a clonagem, esse vetor foi denominado pPIC9-egl1/P.e.

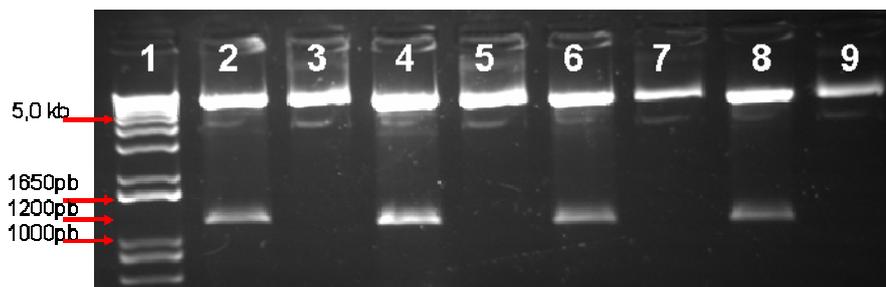


Figura 26. Análise de restrição para confirmação da construção do vetor pPIC9-egl1/P.e em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo (0,3µg/mL). Coluna 1: Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); Colunas 2; 4; 6; 8 Plasmídeo pPIC9-egl1/P.e digeridos com as enzimas *Xho* I e *EcoR* I, clones 1; 2; 3; 4. Colunas 3; 5; 7; 9: Plasmídeo intacto clones 1; 2; 3; 4.

Visando a integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris*, o vetor pPIC9-egl1/P.e foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl* II ou *Stu* I. A digestão com *Bgl* II promove a liberação do cassete de integração de aproximadamente 6,7 kb e de um segundo fragmento de aproximadamente 2,5 kb, correspondente ao restante do vetor (Figura 27). A digestão com *Stu* I serviu para linearização do vetor (Figura 27). Após a digestão, esses fragmentos contendo o cassete de expressão e a marca auxotrófica *HIS4* expõem nas extremidades seqüências do *locus AOX1*, (*Bgl* II) e seqüências do *locus HIS4* (*Stu* I), para direcionar a integração, que pode ocorrer tanto *locus HIS4* quanto no *locus AOX1* por substituição e inserção.

Como controle negativo das análises de expressão da proteína heteróloga, o vetor pPIC9 original foi também digerido com as enzimas *Bgl* II ou *Stu* I e usado para transformação de *P. pastoris*. Foi montado assim um vetor que foi digerido com as

enzimas *Stu* I ou *Bgl* II para a transformação das linhagens de levedura denominadas GS115 e SMD 1168. Após a digestão, os vetores foram identificados como pPIC9-*egl1*/P.e/*Bgl*III; pPIC9-*egl1*/P.e/*Stu*I, pPIC9/int/*Bgl*III e pPIC9/int/*Stu*I. Sendo os dois últimos utilizados como vetores para controle negativo (sem o cDNA *egl1*).

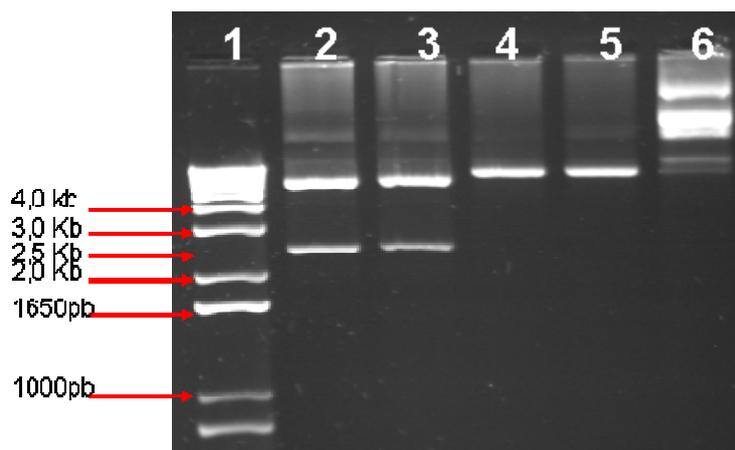


Figura 27. Digestão enzimática do vetor pPIC9-*egl1*/P.e. para transformação em *P.pastoris*, analisada em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etideo 0,3µg/mL. Coluna 1: Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); Colunas 2 e 3: Plasmídeo pPIC9-*egl1*/P.e./*Bgl*III digerido com a enzima *Bgl* II. Coluna 4 e 5: Plasmídeo pPIC9-*egl1*/P.e./*Stu*I digerido com a enzima *STU* I.

5.6.2 Transformação de *P. pastoris* e detecção da atividade enzimática

As linhagens GS115 e SMD1168 de *P. pastoris* foram transformadas com o vetor de expressão construído anteriormente devidamente linearizados. Pela presença do gene histinol desidrogenase (*HIS4*) nos vetores pPIC9, que complementa a mutação auxotrófica *his4* das linhagens GS115 e SMD1168, os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo-ágar (MD-ágar) sem

histidina. Os controles negativos (linhagens transformadas com o vetor sem inserto) também foram utilizados para transformar as mesmas linhagens de *P. pastoris*.

Cada transformação resultou em aproximadamente 400 transformantes. Para seleção dos clones expressando a enzima EGL1, foram utilizados 96 clones de cada sistema (total de 384 clones avaliados) submetidos a crescimento em meio líquido em placas *deep well*. Os transformantes foram inoculados em meio contendo metanol (BMMY) que induz eficientemente o promotor *AOX1*. Os transformantes expressando a enzima recombinante foram selecionados pela análise do sobrenadante da cultura após a formação de açúcares redutores empregando-se o método de DNS. Dos transformantes testados, 100% apresentaram atividade enzimática, porém em níveis variados. A variação na atividade enzimática dos clones transformados com o cassete de expressão é consistente com o uso de vetores integrativos e com o fato de que os diversos eventos de recombinação que governam a integração genômica das construções recombinantes podem também afetar os níveis de expressão heteróloga e levar à variação clonal. Neste caso, a integração do DNA exógeno pode ocorrer em múltiplas inserções e em diferentes *loci* (*AOX1* ou *HIS4*), devido à organização da cromatina nos sítios de integração (Gerasimova & Corces, 2001).

Não foi detectada atividade enzimática nos sobrenadantes das culturas dos controles negativos (dados não mostrados). Quatro transformantes (um de cada sistema: AOXGS115; AOXHIS4; AOXSM1168; HIS4SM1168) que exibiram as maiores atividades enzimáticas foram analisados quanto à produção da enzima após 48 horas de indução em 25 mL de meio BMMY sob agitação. Como pôde ser observado, o clone C4 da linhagem SM1168 contendo o plasmídeo pPIC9-egl1/P.e/StuI foi identificado como apresentando a maior atividade enzimática dentre os clones de cada sistema. Este clone

passou a ser denominado como C4/SMD1168-egl1/P.e/*StuI* denominado C4, e é correspondente ao clone com integração do cassete de expressão no *locus HIS4*, do genoma da linhagem protease menos SMD1168. Procedeu-se então a identificação, foi realizada a identificação do fenótipo do clone C4 com relação à utilização de metanol durante os processos fermentativos: Mut^S (*Metanol utilization slow*) ou Mut⁺ (*Metanol utilization plus*), em placas de petry contendo meio mínimo com e sem metanol. O clone C4 foi identificado como sendo Mut⁺. Foram também realizados testes de estabilidade mitótica, sendo o clone considerado estável mitoticamente após a passagem em meio com e sem histidina por 10 vezes, alternadamente. Tendo em vista estes resultados, o clone C4, Mut⁺ foi utilizado para testes de produção e caracterização enzimática.

Para a produção enzimática inicial pelo clone C4 foram realizadas fermentações segundo o protocolo padrão de fermentação para *P. pastoris*. Após 120 horas de cultivo foram obtidos títulos de atividade de aproximadamente 0,06 unidades internacionais por mL de enzima (UI/mL), no sobrenadante da cultura (Figura 28).

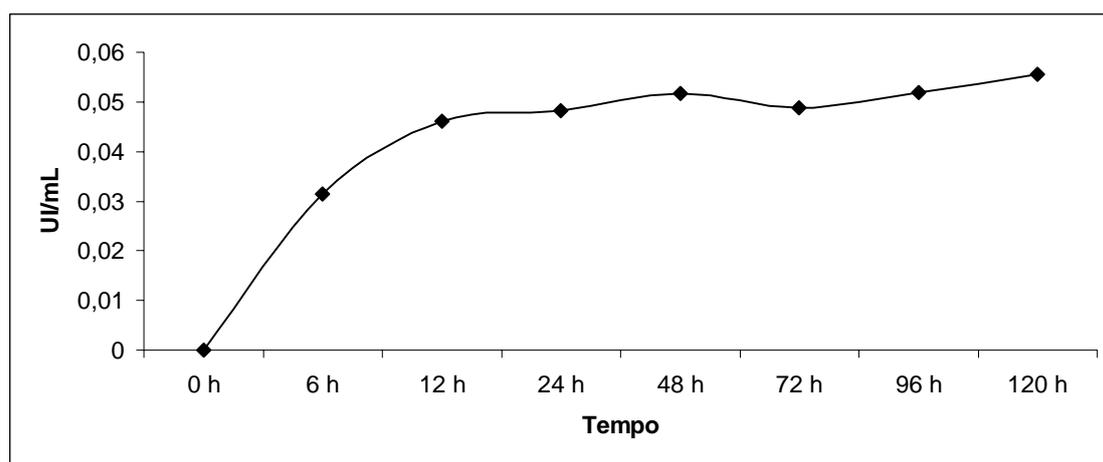


Figura 28. Curva de atividade enzimática da endoglicanase 1 de *P. echinulatum* produzida por *Pichia pastoris* em sistema heterólogo. Cultivo em frasco agitado a 220 rpm, 30°C, por 120 horas de indução. As amostras foram coletadas inicialmente de 6 em 6 horas e posteriormente a cada 24 horas.

5.7 Otimização da produção enzimática Clone C4.

A redução de custos na produção enzimática pelo melhoramento dos meios de fermentação é uma etapa fundamental visando à aplicação industrial. A otimização é feita, tradicionalmente, variando-se um parâmetro e mantendo-se os outros constantes. No entanto, esta abordagem consome mais tempo e é incapaz de detectar o melhor meio, devido principalmente à ausência da análise de interações entre os diferentes fatores (Damaso *et al.*, 2004). Uma das estratégias mais utilizadas para identificar a significância relativa dos diferentes parâmetros e encontrar as condições ótimas é baseada em experimentos estatísticos como os planejamentos fatoriais.

Desta forma, para aumentar a produção e atividade enzimática, foi realizado um planejamento experimental para a otimização do meio de cultivo do clone C4/SMD1168-egl1/P.e/StuI/Mut⁺ por um período de 120 horas de indução. Primeiramente, foram realizados testes para a escolha da melhor fonte de nitrogênio entre uréia e YNB (fonte de nitrogênio padrão nos experimentos de fermentação de *P. pastoris*). Não foram observadas diferenças significativas na densidade celular e na atividade enzimática produzida (dados não mostrados).

Posteriormente, foi realizado um planejamento fatorial 2³ variando a densidade celular inicial (OD₆₀₀), concentração de metanol e concentração da fonte de nitrogênio, descritos como fatores importantes na expressão protéica em *P. pastoris* (Macauley-Patrick *et al.*, 2005), sendo analisada a influência de cada fator e a interação entre eles na produção da enzima. A variável “resposta” foi a atividade enzimática em 72 horas de indução (máxima atividade). Nesses experimentos foi utilizado o YNB como fonte de nitrogênio, embora não tenha ocorrido diferença estatística entre as fontes testadas anteriormente, este apresentou uma discreta tendência para a melhora da atividade. A

figura 29 representa o perfil cinético de produção enzimática nos distintos tempos e meios. A tabela 6 apresenta os resultados das atividades enzimáticas obtidas em cada experimento em 72 horas de indução.

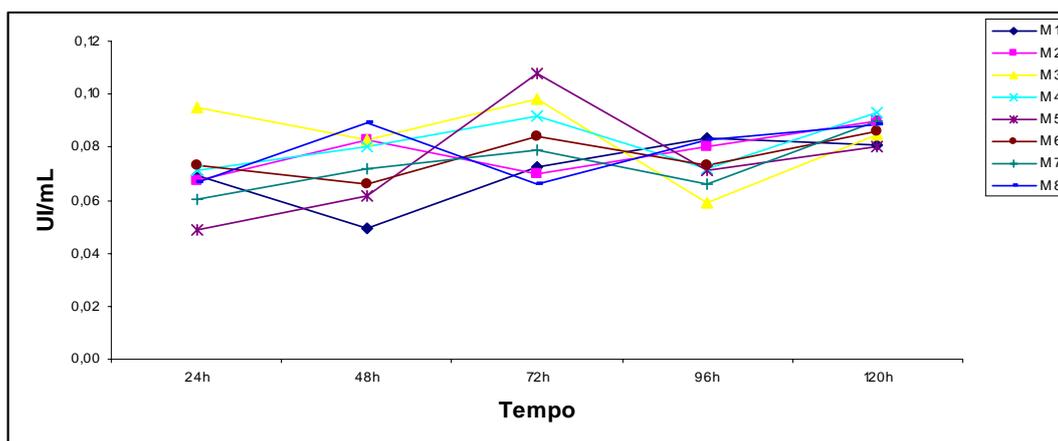


Figura 29. Perfil de atividade enzimática obtida a partir do planejamento fatorial completo (2^3), visando a produção da enzima recombinante EGL1 de *P. echinulatum* expressa em sistema heterólogo de *P. pastoris* em cultivo de frasco agitado (220 rpm, 30°C, por 120 horas de indução). Valores de atividade estão expressos em unidades internacionais por mL (UI/mL) de meio de cultivo. M1 a M8 (tabela 5): representam os distintos meios de cultivo utilizados no planejamento fatorial. Experimento realizado em duplicata.

Tabela 6. Resultado do planejamento fatorial completo (2^3), Experimento realizado em duplicata. Valores de atividade obtidos no tempo de 72 horas.

| Experimento | % Fonte de Nitrogênio | % Metanol | OD ₆₀₀ inicial | Atividade enzimática (UI/mL) |
|-------------|-----------------------|-----------|---------------------------|------------------------------|
| M1 | 4,02 | 1 | 10 | 0,07271 |
| M2 | 1.34 | 1 | 10 | 0,07002 |
| M3 | 4,02 | 0,5 | 10 | 0,09840 |
| M4 | 1.34 | 0,5 | 10 | 0,09173 |
| M5 * | 4,02 | 1 | 1 | 0,10768 |
| M6 | 1.34 | 1 | 1 | 0,08375 |
| M7 | 4,02 | 0,5 | 1 | 0,07904 |
| M8 | 1.34 | 0,5 | 1 | 0,06627 |

*Meio que apresentou maior produção de atividade enzimática em 72 horas de fermentação. Este meio foi utilizado para a produção da enzima recombinante.

A partir dos resultados do planejamento experimental foi possível realizar a análise de variância (ANOVA), a qual é apresentada na tabela 7. Na análise de variância para a atividade enzimática como variável “resposta”, os diferentes fatores avaliados não apresentaram significância individualmente. A interação da densidade celular inicial vs % metanol apresentou significância estatística ($p < 0,05$), mostrando que com o aumento ou diminuição de ambos fatores a atividade enzimática pode ser aumentada (Figura 30). Embora a variável YNB não apresente níveis estatísticos significativos, a observação do comportamento desta variável nos distintos meios de cultivo nos sugere que esta deva ser posteriormente avaliada em novos experimentos (Figura 31). Quando analisadas as variáveis metanol e YNB, foi possível observar que independentemente da concentração de metanol utilizada a atividade enzimática permanece constante no decorrer dos experimentos em concentrações altas de YNB. Tal dado permite sugerir a utilização de concentrações menores desta variável, barateando o processo produtivo (Figura. 32).

Analisando-se os valores de atividade encontrados após a otimização do meio de cultivo, observamos um incremento na atividade enzimática relativa na ordem de 179,47% utilizando-se o meio M5. O modelo estatístico apresentou um ajuste adequado aos resultados experimentais, já que explica 97,42 % (R^2) da variação dos dados.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática (UI/mL).

| Fatores | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Média Quadrática | F ₀ | P |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| % Metanol (1) | 0,000000 | 1 | 0,000000 | 0,001349 | 0,971498 |
| OD ₆₀₀ inicial (2) | 0,000004 | 1 | 0,000004 | 0,012284 | 0,914181 |
| Nitrogênio (3) | 0,000531 | 1 | 0,000531 | 1,727493 | 0,221240 |
| * 1 e 2 | 0,002186 | 1 | 0,002186 | 7,118755 | 0,025702 |
| 1 e 3 | 0,000013 | 1 | 0,000013 | 0,042032 | 0,842121 |
| 2 e 3 | 0,000187 | 1 | 0,000187 | 0,608390 | 0,455417 |
| Erro | 0,002764 | 9 | 0,000307 | | |
| Total | 0,005684 | 15 | | | |

*($p < 0,05$).

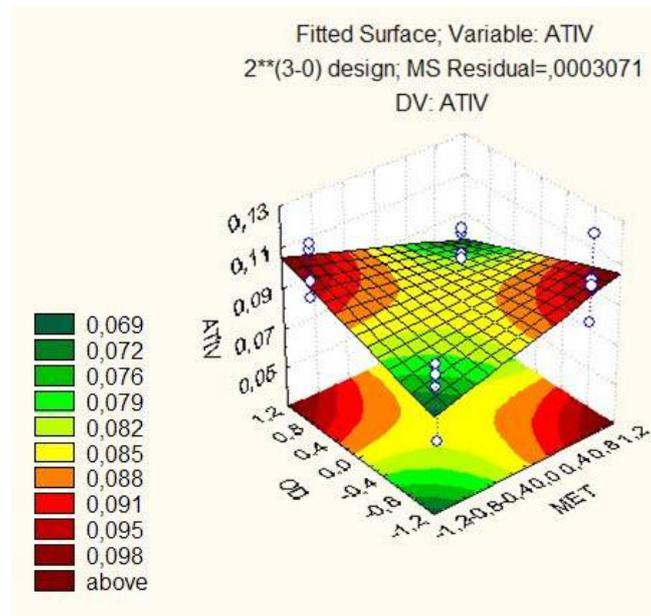


Figura 30. Gráfico da interação entre os parâmetros, densidade celular inicial e % metanol. Valores encontrados apresentaram significância estatística para a variável “resposta” atividade ($p < 0,05$). Dados obtidos para o cultivo utilizando o meio M5 em 72 horas de indução.

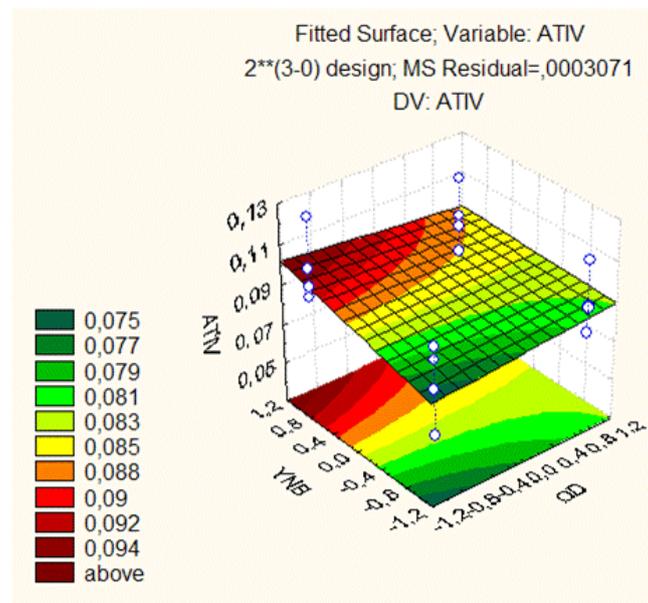


Figura 31. Gráfico da interação entre os parâmetros, densidade celular inicial e % YNB. Valores encontrados não apresentaram significância estatística para a variável “resposta” atividade ($p > 0,05$). Dados obtidos para o cultivo utilizando o meio M5 em 72 horas de indução.

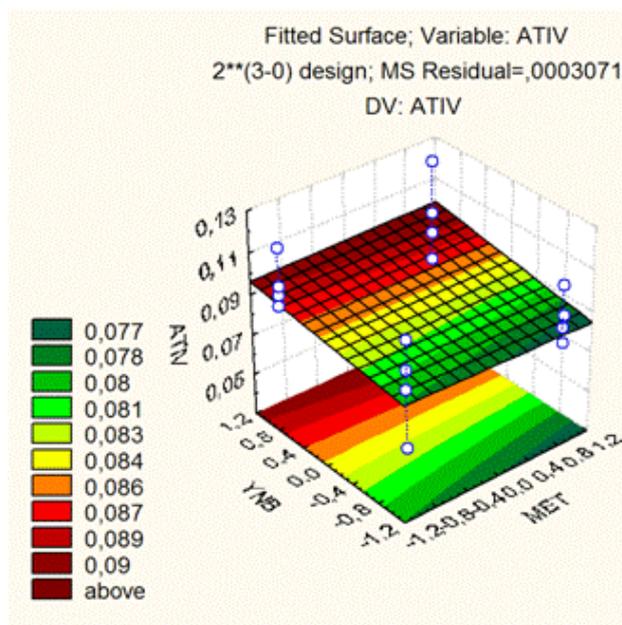


Figura 32. Gráfico da interação entre os parâmetros, YNB e % metanol. Valores encontrados não apresentaram significância estatística para a variável “resposta” atividade ($p > 0,05$). mas sugestionam a possibilidade de aumento de atividade com o aumento dá variável metanol. Dados obtidos para o cultivo utilizando o meio M5 em 72 horas de indução.

Outros autores, também utilizando o planejamento estatístico com o objetivo de otimizar parâmetros para a produção de proteínas heterólogas, encontraram distintas variáveis que se mostraram significativas. Damaso *et al.* (2004) analisaram a expressão de β -1,4-xilanase em *P. pastoris* e otimizaram a expressão por meio de um planejamento fatorial 2^3 utilizando as mesmas variáveis que em nossos experimentos. Os autores concluíram que a densidade celular inicial era o fator mais importante para aumentar a produção desta enzima. Neste caso, não houve influência do metanol ou da fonte de nitrogênio na produção. Hong *et al.* (2002) observaram que concentrações elevadas de metanol foram prejudiciais para a expressão heteróloga de lacase. Por outro lado, Daly & Hearn (2005), utilizando concentrações elevadas de metanol aumentaram os níveis de expressão de β -2-glicoproteína-I humana. Empregando as mesmas variáveis, Araújo

(2008) aperfeiçoou a produção de quimosina B em *P. pastoris*, encontrando as mesmas interações significativas obtidas neste trabalho para a produção da EGL1 de *P. echinulatum*.

Testes iniciais baseados na análise dos dados obtidos com os experimentos de otimização possibilitaram a formulação de um meio de cultura onde as concentrações dos constituintes estão ajustadas a valores intermediários aos utilizados no processo de otimização, resultando em um incremento na atividade enzimática (dados não mostrados).

Os experimentos realizados no presente trabalho são apenas estudos preliminares, havendo a necessidade de se estender os valores dos parâmetros analisados e alterar as variáveis para se chegar a um meio de cultivo ótimo para a indução que promova maiores títulos enzimáticos.

5.8. Detecção da atividade da enzima endoglicanase 1 em placa

Selecionado o clone C4, procedeu-se à detecção da atividade enzimática da proteína recombinante em meio sólido, pela formação de halo de hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) em placa, revelado pela coloração com vermelho do Congo (*Congo red*) após 96 horas de crescimento a 30°C. O clone transformante C4 e um clone controle SMD1168/int/*StuI* (transformado apenas com o vetor não contendo o cDNA *egl1*) denominado (C27) foram crescidos em meio MM+metanol 0,5% com 0,5% CMC como mostrado na figura 33 painel 1. Após os procedimentos para a detecção da hidrólise de CMC em placa, um halo de hidrólise foi observado apenas na região de crescimento do clone contendo o cDNA *egl1* de *P. echinulatum*, conforme mostrado na figura 33 painel 2.

A formação do halo de hidrólise devido à atividade enzimática do clone contendo o cDNA *egl1*, de *P. echinulatum*, corrobora o fato de que a atividade celulolítica produzida por *P. pastoris* tenha sido devido à expressão do cDNA *egl1* e que esta enzima é produzida e secretada de forma ativa também em meio sólido.

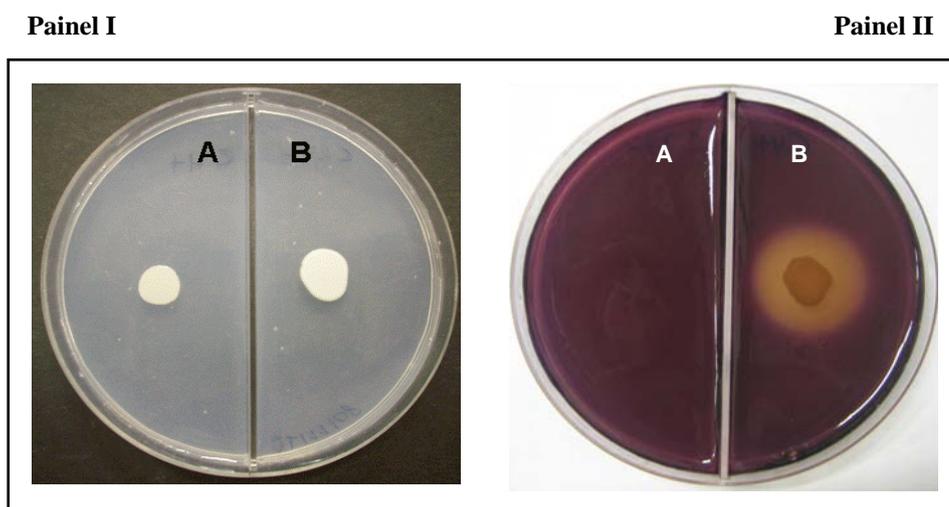


Figura 33. Formação de halo de hidrólise em placa. Painel I, crescimento de transformantes de *P. pastoris*: (A) clone C27 (controle negativo) e (B) clone C4 (portando o cDNA *egl1*). Painel II: Halo de hidrólise de CMC, revelado com vermelho do congo. (A) clone C27 (controle negativo) e (B) clone C4 (portando o cDNA *egl1*). O cultivo foi realizado em meio mínimo-agar 0,5% CMC + Metanol 0,5% por 96 Horas.

5.8.1 Cinética de produção da endoglicanase *P. echinulatum* recombinante

O clone C4 foi cultivado em meio líquido (M5) com o objetivo de se determinar a cinética de secreção da enzima, e também para a obtenção de uma quantidade suficiente de enzima para posterior caracterização bioquímica. Foram retiradas amostras nos tempos 6; 12; 24; 48; 72; 96 e 120 horas de cultivo, e estas foram analisadas para a detecção da atividade enzimática sobre CMC, segundo procedimento de Mandels *et al.* (1976), baseada na formação de açúcares redutores. Embora existam distintos métodos para detectar a formação de açúcares redutores, a literatura tem mostrado a preferência por duas principais metodologias para a detecção destes açúcares nas análises de

atividade enzimática: atividade de endoglicanase e ou FPAse. Uma utiliza o método de Somogyi-Nelson (Ding *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2002; Picard *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Byeong-Cheol *et al.*, 2008), enquanto outros grupos utilizaram o método de Mandels *et al.* (1976), no qual o DNS é empregado (Takashima *et al.*, 1997; Camassola *et al.*, 2004; Camassola & Dillon, 2006; Dillon *et al.*, 2006; Sehnem *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008; Wonganu *et al.*, 2008). Um terceiro método utilizado para avaliar principalmente a ação de endoglicanases é a viscosimetria (Molhoj *et al.*, 2001). Também existem métodos que envolvem a análise de alta performance utilizando cromatografia de detecção HPAEC-PAD (CarboPAC) (Koseki *et al.*, 2008; Wang & Jones, 1995). No presente trabalho, optamos por avaliar a atividade enzimática utilizando o método de Mandels *et al.* (1976), com o uso do reagente DNS, por ser a metodologia anteriormente utilizada para a caracterização do complexo celulolítico de *P. echinulatum* (Camassola *et al.*, 2004), para fins de comparação dos dados.

A cultura do clone controle de *P. pastoris* C27 (sem o cDNA *egl1*) também foi avaliada. Os clones C4 e C27 apresentaram o mesmo perfil de crescimento no meio de cultivo M5 nas primeiras horas de crescimento. Decorridas 48 horas do início da fermentação, as culturas apresentaram uma pequena diferença na taxa de crescimento celular, mantendo a mesma cinética de crescimento até 120 horas (dados não mostrados). Os níveis de expressão enzimática do transformante C4 aumentaram gradualmente acompanhando o aumento da densidade celular, chegando ao maior valor de atividade de enzima no tempo de 72 horas, onde títulos enzimáticos de aproximadamente 0,107 UI/mL foram obtidos (Figura 34). Em 96 horas de cultivo, a atividade enzimática apresentou um ligeiro declínio, provavelmente devido à ação de proteases liberadas no meio de cultura em resposta a baixa disponibilidade de nutrientes (Mattanovich *et al.*,

2004). Outro fator que pode estar envolvido na diminuição da atividade enzimática esta relacionado ao estresse metabólico das células hiperprodutoras de proteínas heterólogas, por limitação de outros processos celulares competindo por seus substratos (Mattanovich *et al.*, 2004).

Camassola *et al.* (2004) caracterizaram o complexo celulolítico de *P. echinulatum*, avaliando as atividades de FPAases e β -Glicosidase. Neste trabalho Camassola obteve títulos enzimáticos para FPAases cerca de 0,78 UI/mL sobre papel de filtro.

As medidas de FPAase são utilizadas para medir a atividade total de um determinado complexo enzimático, avaliando-se a atividade conjunta de distintas enzimas que somadas resultam em uma atividade única. A atividade encontrada para a enzima EGL1 de *P. echinulatum* produzida de forma heteróloga neste trabalho, embora apresente títulos enzimáticos relativamente baixos, são representativos da atividade de apenas uma enzima para a degradação do substrato CMC.

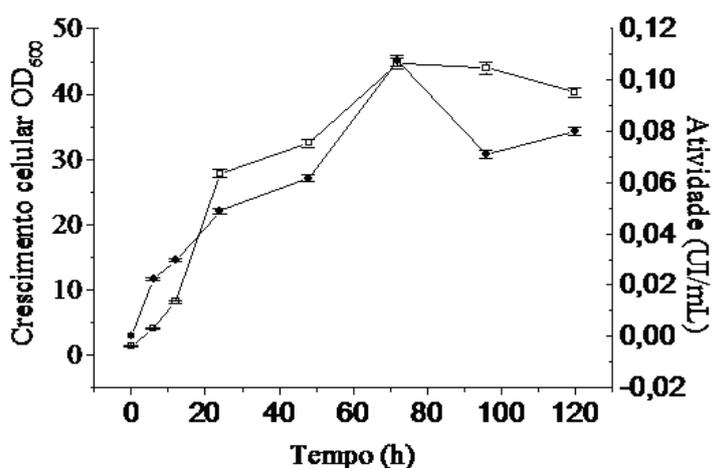


Figura 34. Cinética de crescimento celular do clone C4 e da atividade enzimática em CMC. O clone C4 foi crescido em 100 mL de meio M5. Amostras do sobrenadante foram coletadas em 8 diferentes tempos e avaliado o crescimento celular (□) e a atividade enzimática (■). Experimentos realizados em triplicata.

5.9 Caracterização bioquímica da endoglicanase EGL1 recombinante.

As endoglicanases são precursoras de uma cascata de ações para a degradação da celulose, diminuindo rapidamente o grau de polimerização e complexidade do substrato, gerando celo-oligossacarídeos que são alvos das celobiohidrolases e β -glicosidases (Teeri, 1997). Neste sentido torna-se fundamental a caracterização da endoglicanase de *P. echinulatum* expressa de forma heteróloga em *P.pastoris*.

As endoglicanases também têm mostrado atividade na separação de hemicelulose e celulose da lignina, uma vez que algumas endoglicanases apresentam atividade sobre xiloglicanas (Suda & Giorgini, 2003; Lynd *et al.*, 2002).

Para a caracterização bioquímica da endoglicanase recombinante, foi utilizado o sobrenadante da cultura de crescimento celular após centrifugação para a remoção de células. O sobrenadante foi obtido pelo crescimento celular do clone C4 em 100 mL meio M5 por 72 horas. Os ensaios enzimáticos foram realizados com CMC por 30 minutos nas condições pré-estabelecidas para análise da formação de açúcares redutores utilizando o reagente DNS (Mandels *et al.*, 1976).

5.9.1 Atividade enzimática da EGL1 recombinante em diferentes valores de pH

A enzima EGL1 expressa de forma heteróloga em *P. pastoris* apresentou maior atividade em pH 7,0 mantendo cerca de 84% da atividade relativa em pH 6,0, cerca de 88% em pH 8,0 e pH 9 (tampão Tris-HCl 100 mM). Embora não tenha havido diferença estatística na atividade enzimática entre estes valores de pH 5 a 9, houve uma variação no percentual de atividade relativa (Figura 35). Em ensaio realizado com tampões de diferentes composições, pode ser observada uma variação na atividade enzimática. Em

tampão acetato pH 6,0 (100 mM) a enzima apresentou menor atividade relativa cerca de 77% comparada a atividade encontrada em tampão Tris-HCl (100 mM) no mesmo pH aproximadamente 83%, indicando que a composição do tampão pode afetar a atividade enzimática (dados não mostrados).

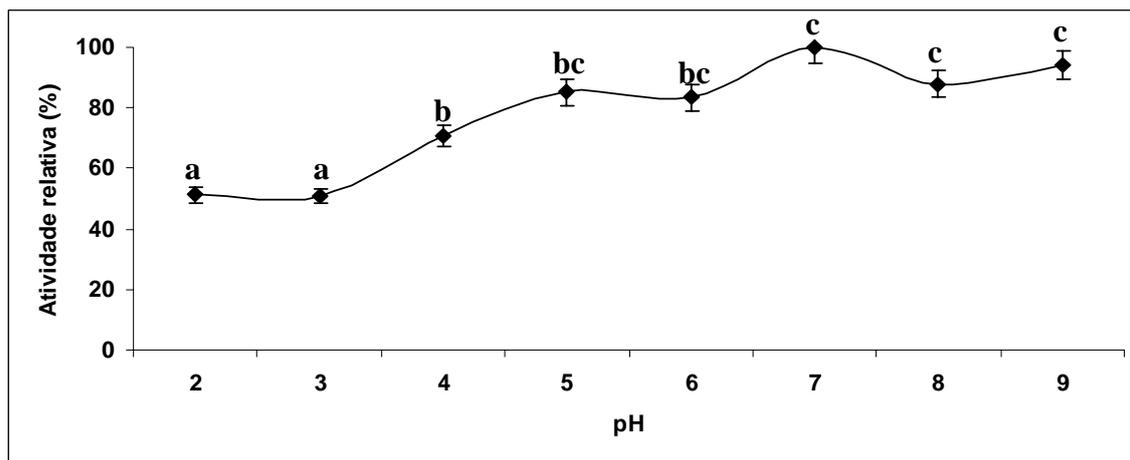


Figura 35. Efeito do pH na atividade enzimática de EGL1 recombinante expressa em *P. pastoris*. A atividade foi expressa em porcentagem relativa em relação ao tratamento controle. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que cada letra indica diferença estatística ($p < 0,05$).

5.9.2 Atividade enzimática de EGL1 recombinante em diferentes temperaturas

O ensaio para se determinar a temperatura ótima, foi realizado nas temperaturas de 10; 30; 40; 50; 60; 70°C em tampão Tris-HCl pH 7 (100 mM), sendo observado uma variação estatística significativa ($p < 0,05$) nas atividades enzimáticas encontradas nas distintas temperaturas. A maior atividade foi obtida a temperatura de 60°C, seguido pelos valores de atividade relativa nas temperaturas de 50 e 70°C de ~80% e ~73% respectivamente. Nas temperaturas menores a atividade enzimática relativa ficou abaixo dos 40% (Figura 36).

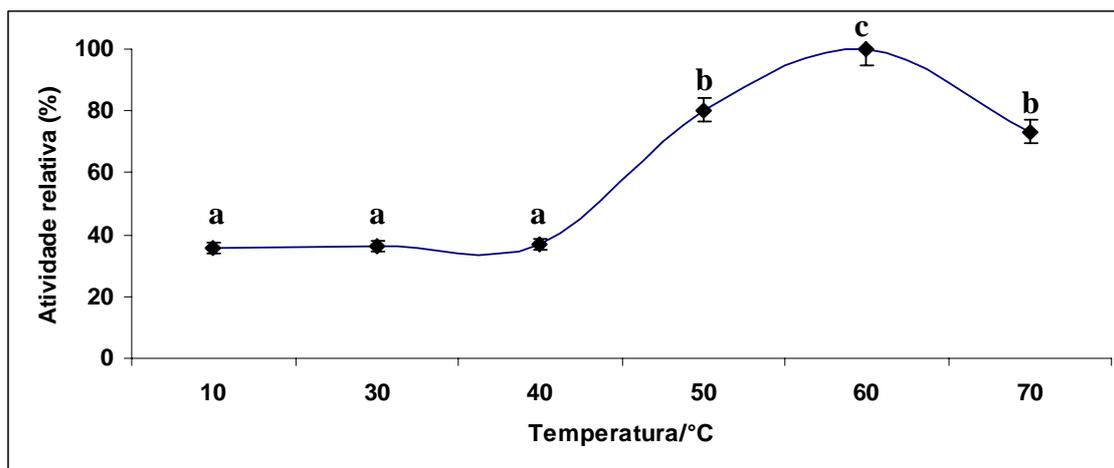


Figura 36. Efeito da temperatura na atividade enzimática de EGL1 recombinante, expressa em *P. pastoris*. A atividade foi expressa em porcentagem relativa em relação a o tratamento controle. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que cada letra indica diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.9.3 Estabilidade térmica de EGL1 recombinante

O ensaio para determinar a estabilidade térmica de EGL1 foi realizado em pH 7,0 em tampão Tris-HCl (100mM). Das temperaturas escolhidas para os ensaios (50, 60 e 70°C), observamos que a enzima apresentou maior atividade na faixa de temperatura de 50 a 60°C e um decréscimo na atividade à temperatura de 70°C, embora mantendo cerca de 83% de atividade após 1 hora de pré-incubação nesta temperatura (Figura 37). Estes resultados sugerem que a enzima EGL1 de *P. echinulatum* exibe propriedades semelhantes àquelas de enzimas termotolerantes, mantendo alta atividade por um longo período de tempo (Wonganu *et al.*, 2008). A atividade enzimática na temperatura de 50°C não variou significativamente durante as primeiras 24 horas de análise. Já os tratamentos realizados a 60°C confirmaram o experimento anterior onde a temperatura ideal foi estabelecida. A maior atividade entre os experimentos de termoestabilidade foi

observada a 60°C, sendo que em uma hora de pré-tratamento térmico, foi observada uma elevação na atividade enzimática, embora não diferindo estatisticamente, sugerindo que a enzima possa ser ativada por tratamento térmico. Após 24 horas de pré-tratamento térmico a 60°C, a atividade enzimática final resultou em aproximadamente 98% da atividade inicial. Quando realizado o pré-tratamento a 70°C, a enzima apresentou um comportamento distinto dos anteriores. Pode ser observada uma redução na atividade residual após a primeira hora de pré-tratamento, chegando a cerca de 84% da atividade inicial e decaindo gradualmente durante o tempo de pré-incubação. Após os tempos de 4 e 24 horas de pré-tratamento, a enzima apresentou atividade residual de cerca de 35% e 0,07% da atividade inicial, respectivamente. Os ensaios enzimáticos foram realizados por 30 minutos na temperatura de 60°C, pH 7,0 em tampão Tris-HCl (100mM), após diferentes tempos de pré-incubação.

Estes resultados indicam a temperatura de 60°C, como sendo a temperatura ótima para atividade de EGL1 de *P. echinulatum*.

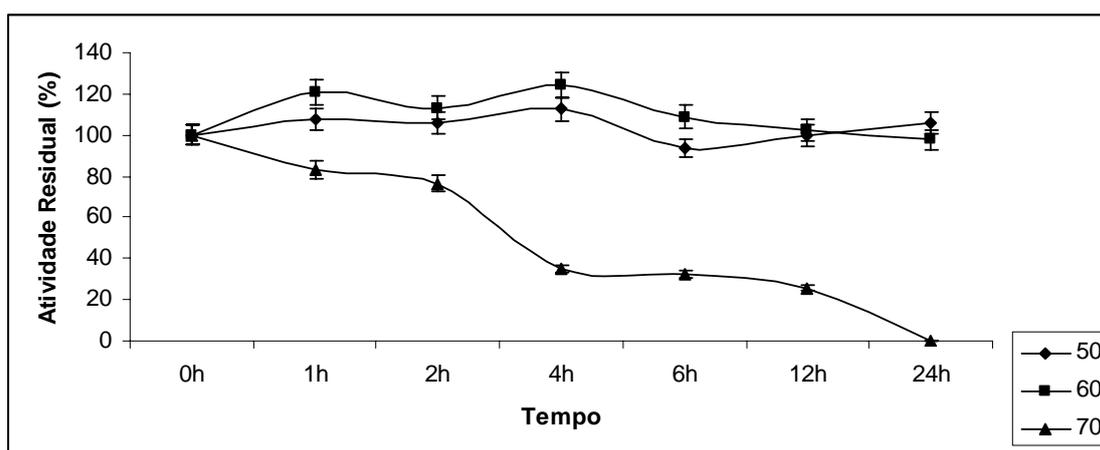


Figura 37. Estabilidade térmica da enzima recombinante EGL1 expressa em *P. pastoris*. Os ensaios para análise da termoestabilidade foram realizados em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 por um período de 24 horas e a atividade enzimática determinada utilizando o reagente DNS. A atividade foi expressa em porcentagem residual com relação à atividade encontrada à temperatura de 60°C e pH ótimo de 7,0 (tratamento controle). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos com os testes para a caracterização de pH, temperatura ótima e estabilidade térmica, não estão de acordo com os encontrados para a caracterização do complexo enzimático de *P. echinulatum* (Camassola *et al.*, 2004), no qual foi utilizado todo complexo celulolítico e não uma enzima isolada, sendo atribuídos valores ótimos de pH entre 4 e 5 em tampão citrato 50 mM e maior estabilidade térmica à temperatura de 55°C. Para a atividade de FPAases, os autores sugerem que uma temperatura de 60°C possa ser a ideal.

Os dados encontrados para a endoglicanase recombinante EGL1, produzida de forma heteróloga, referentes a pH, temperatura ótima e estabilidade térmica, mostram valores superiores aos relatados por estes autores. A temperatura sugerida para atividade de FPAases na reação é a mesma encontrada para a atividade de EGL1 recombinante expressa em *P.pastoris*. Existem indícios de uma modificação no pH ótimo do complexo enzimático de *P. echinulatum* de acordo com o tempo de indução do sistema celulolítico deste fungo, sugerindo a produção de diferentes enzimas. Nas primeiras horas de indução é observada a atividade CMCase em pH alcalino no meio de cultivo, seguido da expressão de outras enzimas ácidas com o aumento do tempo de indução (Dillon, comunicação pessoal).

Outros complexos enzimáticos no gênero *Penicillium* também tem sido estudados. Jorgensen *et al.* (2003) encontrou três distintas endoglicanases no extrato bruto de *P. brasilianum*. Bhat & Wood (1989) encontraram oito distintas endoglicanases no extrato de *P. piniphilum*. Baseado nestes dados e avaliando o tempo de indução utilizado neste trabalho para a extração do RNA total e construção da biblioteca de cDNA, fica evidente que a biblioteca foi construída sob a indução do sistema

celulolítico, mas possivelmente o tempo de indução não tenha sido o ideal para a total expressão deste sistema.

Segundo Camassola *et al.* (2004), a alta estabilidade térmica do complexo de *P. echinulatum* é uma característica desejada para a aplicação em processos de hidrólise enzimática, produção de xarope de glicose, exibindo um grande potencial para a sua utilização na indústria têxtil e produção de álcool combustível. Associado a estes fatos os valores de pH encontrados para a endoglicanase recombinante expressa de forma heteróloga em *P.pastoris* vem ao encontro das características desejadas pela indústria têxtil, onde a utilização de celulases alcalinas são preferidas, pois evitam a redeposição de corante durante os processos de descolorimento dos tecidos de algodão, sendo esta uma característica ótima para a realização deste processo (Anish *et al.*, 2007; Raul *et al.*, 2008). Características semelhantes também foram encontradas por outros autores utilizando *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga para endoglicanase de diferentes microrganismos (Shibuya & Kikuchi, 2008; Ding *et al.*, 2001).

5.9.4 Atividade enzimática de EGL1 recombinante sobre diferentes substratos

A atividade de EGL1 recombinante foi testada sobre celulose microcristalina e papel de filtro, sendo os dados comparados com a atividade obtida para CMC. Os resultados apresentados na figura 38 mostram que a enzima recombinante presente no sobrenadante da cultura do clone C4 de *P. pastoris*, apresentou uma atividade sobre papel de filtro de cerca de 0,065 UI/mL e sobre celulose microcristalina de aproximadamente 0,033 UI/mL. Estas atividades foram comparadas aos valores relativos com a atividade encontrada para o substrato CMC, a qual foi de aproximadamente 0,111 UI/mL. Embora a enzima EGL1 apresente o domínio de ligação a celulose (CBD), que é

importante para a atividade enzimática de celulases em substratos cristalinos (Linder & Teeri, 1996), as endoglicanases tem atividade preferencial sobre regiões amorfas da fibra de celulose, o que explica a maior atividade encontrada sobre CMC e papel filtro. Na celulose microcristalina, as fibras são mais organizadas (compactadas) exibindo uma maior resistência ao ataque de endoglicanases. Porém, estas enzimas podem apresentar um forte efeito sinérgico de degradação desse substrato quando associadas a celobiohidrolases (CBH) (Takashima *et al.*, 1999).

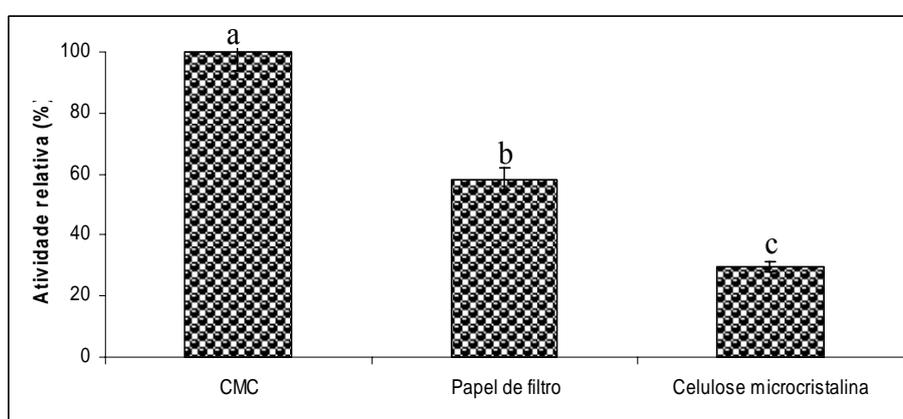


Figura 38. Resultado da atividade enzimática sobre distintos substratos. Atividade de EGL1 sobre celulose microcristalina e papel de filtro, comparada com a atividade obtida utilizando CMC nas mesmas condições de ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que cada letra indica diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Adicionalmente foram realizados ensaios enzimáticos sobre os substratos sintéticos pNPG (p-nitrophenyl- β -D-glucoside) e MUC (4-metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo). Esses ensaios foram realizados com o sobrenadante da cultura do transformante C4, bem como com o sobrenadante da cultura do clone controle C27. Estes extratos foram utilizados sem terem sido fervidos e logo após a fervura a 100°C por 5 minutos. Não foi detectada atividade de EGL1 sobre o substrato pNPG, o que coincide com os dados de Takashima *et al.* (1997).

Já quando utilizado o substrato MUC, foi detectada atividade, sendo o celobiosídeo clivado da molécula de 4-metilumbeliferona, gerando um produto fluorescente. Este resultado indica que a enzima apresenta atividade sobre celo-oligosacarídeos curtos, apesar de apresentar atividade enzimática preferencial por cadeias longas de celo-oligosacarídeos.

O efeito encontrado sobre diferentes substratos sugere que a enzima EGL1 apresente as atividades de endoglicanase e exoglicanase simultaneamente. Enzimas com dupla atividade já foram descritas por outros autores (Tomme *et al.*, 1996; Kim and Kim, 1995; Meinke *et al.*, 1995). Recentemente, tal fenômeno foi demonstrado para a celobiohidrolase CBH 1.2 de *Humicola grisea* expressa em *P. pastoris* (manuscrito em preparação). A atividade sobre MUC pode ser comprovada pela emissão de fluorescência quando a reação é exposta a luz ultravioleta (Figura 39)

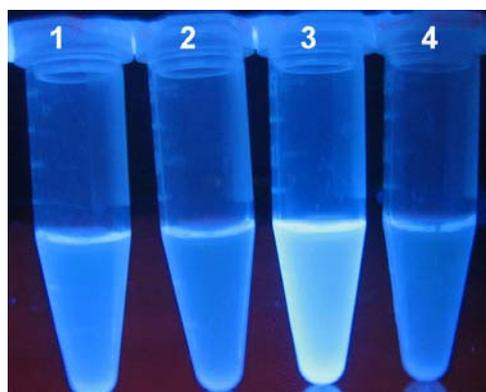


Figura 39. Ensaio de atividade enzimática sobre o substrato MUC. Reações contendo sobrenadante de cultivo dos clones C4 e C27 (controle negativo) foram testados quanto a emissão de fluorescência quando exposta a luz ultravioleta, após reação térmica a 40°C por 1 hora. *Eppendorf* 1 e 2: clones C4, C27 fervidos; *Eppendorf* 3 e 4: clones C4 e C27 não fervido respectivamente.

5.9.5 Efeito de íons sobre a atividade de EGL1 recombinante

O efeito de íons sobre a atividade da enzima recombinante EGL1 foi verificado adicionando ao sistema de reação 4 mM do sal correspondente, e determinando a atividade nas condições ótimas de pH e temperatura. Uma segunda reação foi realizada com uma concentração maior do sal para se observar o comportamento da enzima.

Os resultados observados quando utilizado 4 mM dos sais indicam que a atividade enzimática foi pouco afetada. A maior interferência foi observada quando o íon Ca^{++} foi adicionado ao sistema, resultado este que é contrário aos encontrados na literatura. Com a adição dos íons Cu^{++} , Mg^{++} , Zn^{+++} , Al^{+++} a atividade enzimática diminuiu para cerca de 85 a 90% da atividade padrão (reação sem a adição de íons) (dados não mostrados).

Picard *et al.* (2007) trabalharam com a caracterização do complexo enzimático de *Penicillium* sp, analisando a interferência de íons (Ag^+ , Cu^{++} , Mg^{++} ; NH_4^+ , Ca^{++} , Zn^{++} ; Ba^{++} , Co^{++} , Hg^{++} , Fe^{+++} , Mn^{++} , Pb^{++} , Ni^{++}) sobre a atividade relativa. Embora utilizando concentrações maiores dos íons (10mM) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados com a concentração de 4 mM utilizada neste trabalho.

A literatura descreve a propriedade de inibição da atividade enzimática pelo íon mercúrio. A adição de mercúrio na reação ocasionou um aumento na atividade enzimática em percentual relativo de atividade, resultado que contradiz a literatura relacionada ao estudo de diferentes enzimas e ou complexos enzimáticos (Ding *et al.*, 2002; De-Marco & Felix, 2007; Picart *et al.*, 2007; Galdino, 2008). Com o propósito de avaliar melhor este resultado, foram utilizadas diferentes concentrações do íon mercúrio para observar as concentrações inibitórias da atividade da EGL1 recombinante. Foram utilizadas as concentrações 4; 6; 8; 12; 16; 20; 25 e 30 mM do íon mercúrio na reação, e

analisada a atividade enzimática após 30 minutos de incubação em pH e temperatura ideal. Realizadas as reações pôde ser observado que a atividade enzimática diminui com o aumento da concentração do íon na solução. Verificou-se que a maior atividade enzimática ocorreu na concentração de 4mM do íon na reação, apresentando valores superiores ao obtido com atividade da reação padrão (dado não mostrado), e diminuiu até sua total inibição na concentração de 25 mM. Esta concentração foi utilizada como parâmetro para uma nova avaliação da interferência de íons na atividade da enzima recombinante EGL1. A inibição da atividade enzimática provocada pelo íon mercúrio pode indicar a importância do grupamento tiol da cadeia lateral de alguns aminoácidos na função da enzima, como referido anteriormente por Gupta *et al.* (2003) e Ramirez-Zanvala *et al.* (2004).

Realizadas as reações utilizando os mesmos íons, agora na concentração determinada como inibitória da atividade enzimática para o íon mercúrio (25 mM), foi possível observar um comportamento distinto com relação à atividade enzimática relativa, conforme mostrado na tabela 8. O padrão observado anteriormente não se mostrou reprodutível com o aumento na concentração de alguns íons. Comparando estatisticamente os dados obtidos com as duas concentrações pode ser observado que as atividades não diferiram significativamente com os íons Mg^{++} , Al^{+++} , Co^{++} , Mn^{++} e Cu^{++} . Por outro lado a utilização dos íons Ca^{++} , Hg^{++} , Zn^{+++} e Fe^{+++} , apresentaram uma variação estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos realizados. Quando avaliada a atividade relativa em função da reação padrão, podemos observar que com a adição dos íons Zn^{+++} , Fe^{+++} e Cu^{++} ocorreu uma diminuição na atividade que anteriormente se mostrava próxima à padrão, apresentando percentuais inferiores a 55% da atividade relativa. O efeito inibitório de Cu^{++} e Zn^{++} sobre a atividade de xilanases e celulasas é

uma característica comum em distintos processos (Paradis *et al.*, 1993; Romaniec *et al.*, 1992). Além disso, algumas glicosil hidrolases da família 5 aparentemente são inibidas na presença de Fe^{+++} , Cu^{++} e Zn^{++} (BERA-Maillet *et al.*, 2000), dados estes que corroboram os obtidos com estes íons para a atividade de EGL1 de *P. echinulatum*. A inibição destas enzimas por cátions metálicos geralmente sugere a presença de pelo menos um grupo sulfidrílica no sítio ativo, geralmente o aminoácido cisteína. Este grupo quando oxidado por cátions desestabiliza a conformação espacial da enzima (Rouvinen *et al.*, 1990), ou leva à formação de ligações dissulfeto em uma posição irregular da proteína alterando sua conformação (Ohmiya *et al.*, 1994). Seis resíduos de cisteína existentes no domínio catalítico de EGL1 poderiam fornecer potenciais sítios reativos para estes cátions metálicos, justificando a observada inibição enzimática.

Com o aumento da concentração do íon cálcio na reação, a atividade enzimática apresentou um acréscimo altamente significativo, quando comparado a atividade padrão. Comparando os resultados obtidos com as duas concentrações de cálcio utilizadas (4 mM e 25 mM) com a reação padrão, é observado uma diminuição na atividade enzimática com a utilização da concentração menor do íon e uma elevação significativa desta atividade quando utilizado a concentração de 25mM apresentando um índice de significância de $p < 0,01$, chegando ao percentual de 364,03% acima da atividade padrão, evidenciando uma alta correlação entre o Ca^{++} e a atividade da enzima (Tabela 8). Possivelmente este estímulo deva-se a existência na seqüência de aminoácidos de um provável sítio de ligação para cálcio (Ca^{++} -binding). Segundo Da Silva & Reinach, (1991), os sítios de ligação ao cálcio podem apresentar uma pequena variação na composição dos 6 aminoácidos que compõem o sítio ativo, normalmente esses são formados por: Posição 1 ou X Ácido aspártico (D); Posição 3 ou Y, Ácido aspártico ou

Asparagina (D ou N); Posição 5 ou Z, Ácido aspártico, Serina ou Asparagina (D,S ou N); Posição 7 ou Y, (mais variável); Posição 9 ou X, Ácido aspártico, Serina, Ácido glutâmico, Treonina ou Glicina (D, S, E, T ou G); Posição 12 ou Z, Ácido glutâmico ou Ácido aspártico (E ou D) todos ocorrendo preferencialmente nesta ordem. A posição 12 ou posição Z é considerada como a posição de especificidade do sítio. A substituição dos resíduos da posição 12 ou Z por um aminoácido não negativo diminui muito a afinidade levando até a inativação do sítio, como nas possíveis substituições destes aminoácidos por Alanina (A) (Da Silva *et al.*, 1995).

Na seqüência de aminoácidos de EGL1 de *P.e*, identificamos os aminoácidos conservados nas posições de 1 a 9, apresentando a substituição de um Ácido glutâmico ou Ácido aspártico por uma Alanina na posição 12, esta substituição pode promover uma redução significativa na ligação do íon ao sítio promovendo uma diminuição na especificidade e/ou a inativação do mesmo como já relatado por Da Silva *et al.* (1995) e Gifford *et al.* (2007).

Como algumas enzimas apresentam atividade mesmo na ausência de Ca^{++} , a adição deste íon pode estabilizar a conformação da enzima, aumentando a afinidade pelo substrato e a termoestabilidade, como descrito anteriormente por Chauvaux *et al.* (1990). O íon cálcio parece aumentar a estabilidade de muitas proteínas, incluindo endo-beta-1,4-glicanases, mas há relatos de que algumas endoglicanases necessitam da presença de cálcio para a sua atividade enzimática (Chauvaux *et al.*, 1990). Uma forte dependência de cálcio tem sido relatada para algumas endoglicanases bacterianas, onde tem sido demonstrado que o cálcio têm um efeito direto sobre as propriedades enzimáticas, ou um efeito estabilizador na estrutura terciária da enzima (Welfle *et al.*, 1995).

Resultados semelhantes foram encontrados por Molhoj *et al.* (2001) quando caracterizaram uma endoglicanase de *Brassica napus*, utilizando concentrações de cálcio superiores as utilizadas neste trabalho (40mM).

Tabela 8. Efeito de distintos íons na atividade de EGL1 de *P. echinulatum*.

| Íon 25 mM | Atividade relativa% |
|--------------------|---------------------|
| Padrão | 100 |
| Mg ⁺⁺ | 93,45 |
| *Mn ⁺⁺ | 123,5 |
| Al ⁺⁺⁺ | 82,25 |
| *Hg ⁺⁺ | 0 |
| Co ⁺⁺ | 120,5 |
| *Cu ⁺⁺ | 55,13 |
| *Fe ⁺⁺⁺ | 34 |
| **Ca ⁺⁺ | 364,03 |
| *Zn ⁺⁺⁺ | 26,73 |

Os experimentos foram realizados em triplicata. Íons precedidos pelo símbolo * diferem estatisticamente do tratamento padrão ($P < 0,05$). Íons precedidos pelo símbolo ** diferem estatisticamente do tratamento padrão ($P < 0,01$).

5.10 Determinação da massa molecular da EGL1 recombinante

Para a determinação da massa molecular da enzima recombinante EGL1 expressa em *P. pastoris* foi utilizado o sobrenadante do meio de cultura do clone C4 (clone contendo o inserto de cDNA P.e *egl1*) e do controle negativo clone 27 (vetor vazio). Um mililitro foi precipitado como descrito anteriormente e ressuspenso em 20µL de tampão de amostra (2X) e submetido à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie brilliant Blue G-250*. Conforme

mostrado na figura 40A, foi possível identificar uma banda correspondente a uma proteína com cerca de 42 kDa que se aproxima ao tamanho esperado conforme previsto pela sequência do respectivo cDNA. A proteína EGL1 apresenta um tamanho semelhante à de outras endoglicanases isoladas de diferentes microrganismos (Fierobone *et al.*, 1991, Wang and Richard, 1995, Ding *et al.*, 2001, Takada *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2007).

Para uma confirmação adicional da atividade da enzima recombinante foi realizado um zimograma com os sobrenadantes precipitados anteriormente, sendo a eletroforese realizada em condições não desnaturantes. Após a eletroforese, o gel foi corado com vermelho do congo e descorado com uma solução de NaCl evidenciando um halo de hidrólise correspondente à atividade da proteína EGL1 (Figura 40B). Nenhuma atividade foi observada para o clone controle.

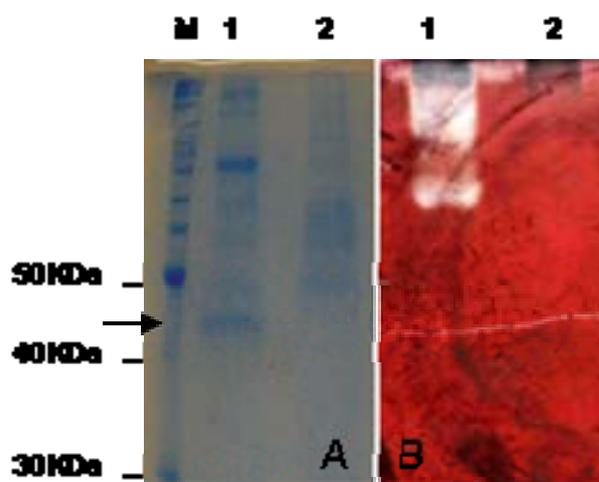


Figura 40. SDS-PAGE e atividade de endoglicanase em gel do sobrenadante de cultura do recombinante de *P. pastoris* expressando o cDNA *egl1*. (A) Gel corado com Coomassie blue-G250. As amostras foram preparadas como descritos em métodos. Coluna 1 e 2: Sobrenadante da cultura dos clones de *P. pastoris* contendo o vetor de expressão pPIC9/Pe-egl1 e o vetor de expressão pPIC9 (controle negativo), respectivamente. M: marcador de massa molecular (BenchMarker Protein Ladder da GIBCO). (B) Zimograma. Uma eletroforese similar contendo 0.15% CMC foi realizado. A proteína foi renaturada e o gel corado com uma solução de 0.1% vermelho do Congo, como descrito em métodos. A seta indica uma proteína de aproximadamente 42 KDa que coincide com a massa molecular teórica estimada para a EGL1 de *P. echinulatum* (painel A). No painel B e observada a formação de um arraste pela hidrólise de CMC devido à migração da enzima no gel.

Apesar de termos obtido o tamanho esperado para a proteína EGL1, vale ressaltar que este resultado não se mostrou reprodutível, necessitando de mais testes para que possamos de fato afirmar que a proteína EGL1 de *P. echinulatum* realmente apresenta a massa predita por programas computacionais. Para esclarecermos esta dúvida, a proteína EGL1 terá que ser purificada do sobrenadante da cultura e posteriormente caracterizada.

6. Resultados Principais e Perspectivas

Os principais dados obtidos nesse trabalho com o estudo e análise do clone recombinante C4 de *P. pastoris* expressando o cDNA *egl1* de *P. echinulatum* que codifica a endoglicanase 1 (EGL1) são descritos abaixo.

1. O cDNA de aproximadamente 1,2 kb selecionado corresponde a uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum*, denominado cDNA *egl1*; (pg. 78)
2. A enzima EGL1 recombinante produzida de forma heteróloga em *P. pastoris* apresenta uma massa molecular estimada de aproximadamente 41,1 kDa; (pg. 79)
3. Após a otimização das condições de cultivo, a atividade enzimática aumentou a níveis significativos (0,107 UI/mL), correspondendo a cerca de 180% da atividade relativa inicial; (pg. 91)
4. O cDNA *egl1* clonado em vetor de expressão para *P. pastoris* e transformado nessa levedura, gerou clones com capacidade de expressar a enzima de interesse de forma funcional; (pg. 95)
5. A enzima EGL1 recombinante possui atividade ótima em pH 7,0, na temperatura de 60 °C, apresentado o comportamento de uma enzima termoestável, mantendo cerca de 98% de sua atividade após 24h de incubação a 60 °C; (pg. 98)

6. A enzima recombinante EGL1 quando incubada a 70°C apresenta aproximadamente 84% de atividade residual após uma hora, diminuindo para cerca de 35% após 4 horas de pré-incubação; (pg. 100)

7. A endoglicanase 1 produzida por *P. pastoris*, com termoestabilidade a 60°C, apresenta bom potencial para utilização em processos industriais; (pg. 100)

8. A enzima recombinante EGL1 produzida, apresentou uma atividade relativa de aproximadamente 58%, sobre papel filtro, enquanto que a atividade relativa sobre celulose microcristalina foi de apenas 29%, quando comparado com a atividade em Carboximetil celulose (CMC), a qual foi considerada como valor de referência nesta análise (100%); (pg. 104)

9. A EGL1 recombinante foi capaz de hidrolisar o substrato sintético MUC, indicando que a enzima tem atividade sobre diferentes oligossacarídeos inclusive oligossacarídeos pequenos possivelmente por apresentar as atividades de endoglicanase e celobiohidrolase simultaneamente; (pg. 105)

10. Analisada a interferência de íons sobre a atividade da enzima, foi possível observar que a EGL1 de *P. echinulatum* expressa em *P. pastoris* tem sua atividade estimulada pelo íon Ca^{++} , sendo os maiores títulos enzimáticos obtidos com a concentração de 25 mM deste íon; (pg. 106)

11. Foi possível localizar um provável sitio de ligação ao cálcio na seqüência de aminoácidos da endoglicanase EGL1, o qual apresenta variação da seqüência proposta; (pg. 109)

12. A EGL1 de *P. echinulatum* apresenta atividade mesmo na ausência de Ca^{++} , de modo que a adição deste íon provavelmente estabiliza a conformação da enzima, aumentando a afinidade pelo substrato e possivelmente a sua termoestabilidade; (pg.110)

13. Os valores de atividade obtidos de 0,462 UI/mL, com a utilização deste íon cálcio, correspondem a 770% sobre a atividade relativa inicial, antes da otimização do meio de cultivo e 431,77% de atividade relativa após a otimização do meio de cultivo; (pg. 110)

14. O cDNA *egl1* é o único cDNA de *P. echinulatum* seqüenciado e caracterizado até o momento;

15. No conjunto, os resultados deste projeto mostram que a levedura *P. pastoris* pode ser usada como plataforma genética para a produção de EGL1 de *P. echinulatum*; sendo a enzima expressa de forma ativa.

Acreditamos que nossos resultados enfocam uma nova vertente para o estudo do fungo *P. echinulatum*, principalmente na área molecular para este microrganismo. Desta forma pretendemos aprofundar nossas pesquisas bem como desenvolver novos estudos tanto para a elucidação de algumas questões ainda em aberto como também para dar continuidade à caracterização não só dos genes do complexo celulolítico, bem como a elucidação de seus mecanismos de regulação. Neste sentido, nossas perspectivas de continuidade dos estudos são:

1. Obtenção da região do peptídeo sinal nativo do cDNA *egl1* de *P. echinulatum*, para a construção de um cassete de expressão contendo o peptídeo nativo e posterior comparação entre diferentes construções: Clones portando o gene com peptídeo sinal

nativo e clones com a construção já existente portando o peptídeo sinal de *S.*

cerevisiae (fator α);

2. Purificação da endoglicanase recombinante produzida por *P. pastoris*, e posterior caracterização das propriedades bioquímicas;

3. Utilização da proteína purificada ou não em processos industriais como constituinte de formulações enzimáticas para processos têxteis (estonagem e amaciamento de tecidos), produção de álcool combustível e detergentes entre outros;

4. Obtenção dos cDNAs completos das seqüências de celulases (celobiohidrolases, betaglicosidase e swolleninas) que foram obtidas da biblioteca de cDNA construído e analisado parcialmente neste trabalho e posterior clonagem e transformação em levedura, para a obtenção de novos clones expressando as respectivas enzimas de interesse;

5. Caracterização bioquímica das novas celulases obtidas e formulação de uma mistura enzimática específica para teste em distintos processos;

6. Construção de uma nova biblioteca de cDNA utilizando micélio induzido (maior tempo de indução) para o sistema celulolítico de *P. echinulatum* (Já em andamento).

7. Referências Bibliográficas

- Altschul S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894. *J. Mol. Biol.* **3**: 403-410.
- Anish, R., Rahman, M. S., Rao, M. A. (2007). Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. In biopolishing of denims. *Biotechnol. Bioeng.* **96**: 48 – 56.
- Araújo, J. A. (2008). Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília.
- Brás, F. N., Fernandes, A. P., Ramos, M. J.(2009). Docking and molecular dynamics on the stereoselectivity in the enzymatic synthesis of carbohydrates. *Theor. Chem. Account.* **122**: 283 – 296.
- Béguin, P. and Aubert, J. P. (1994).The biological degradation of cellulose. *FEMS. Microbiol. Rev.* **13**: 25-58.
- Belgith, H., Ellouz-Chaabouni, S., Gargouri, A. (2001). Biostonig of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. *J. Biotechnol.* **89**: 257 – 262.
- Béra-Maillet, C., Arthaud, L., Abad, P. and Rosso, M.N. (2000) Biochemical characterization of MI-ENG1, a family 5 endoglucanase secreted by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 3255-3263.
- Bhat, K. M., Wood, T. M. (1989). Multiple forms of endo-1,4-B-D-glucanase in the extracellular cellulase of *Penicillium pinophilum*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1242 – 1248.

- Bisaria, V. S. and Ghose, T. K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrates microorganisms, enzymes and products. *Enzyme. Micro. Tech.* **3**: 90 – 104.
- Bischoff, K. M., Rooney, A. P., Li, X. L., Liu, S., Hughes S. R. (2006). Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* **28**:1761 – 1765.
- Boettner, M., Prinz, B., Holz, C., Stahl, U., Lang, C. (2002). High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **99**: 51-62.
- Boisset, C., Chanzy, H., Schulein, M., Henrissat, B. (1997). An ultrastructure study of the interaction of a fungal endoglucanase from *humicola insolens* with cotton fibres. *Cellulose.* **4**: 7 – 20.
- Brown, J.A., Collin, S.A. and Wood, T.M. (1987). Isolamento and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulose and β -glucosidase production. *Enz. Micro. Tech.* **9**: 169 – 175.
- Byeong-Cheo, S., Kim, K.Y., Yoon, J. J., Sim, S.H., Lee, K., Kim, Y.S., Kim, Y.K., Cha, C.J. (2008). Functional Analysis of a Gene Encoding Endoglucanase that Belongs to Glycosyl Hydrolase Family 12 from the Brown-Rot *Basidiomycete Fomitopsis palustris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 404 – 409.
- Camassola, M., Bittencourt, L. R., Shenem, N. T., Andreus, J., Dillon, A. J. P.(2004). Characterization of the Cellulase Complex of *Penicillium echinulatum*. *Biocatal. Biotransformation.* **22**: 391- 396.
- Camassola, M. and Dillon, A. J. P. (2006). Effect of methylxanthines on production of cellulases *Penicillium echinulatum*. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 478 – 485.

- Camassola, M., Dillon, A. J. P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 2196 – 2204.
- Camassola, M., Dillon, A. J. P. (2009). Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products.* **29**: 642 – 647.
- Cavaco-Paulo, A. M. (1995). Influência da Agitação Mecânica e da composição Enzimática no Tratamento do Algodão com Celulases. Tese de Doutor. Escola de Engenharia Universidade do Minho.
- Cavaco-Paulo, A., Almeida, L., Bishop. (1996). Cellulase activities and finishing effects. *Textile Chemist and Colorist.* **28**: 28 – 32.
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 329 - 332.
- Chauvaux, S., Beguin, P., Aubert, J.P., Bhat. K.M., Gow, L.A., Wood, T.M. and Bairoch, A. (1990) Calcium-binding affinity and calcium-enhanced activity of *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. *Biochem. J.* **265**: 261 – 655.
- Coutinho, P.M., Henrissat, B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", In: Gilbert, H. J., Davies G., Henrissat, B., Svensson, B. edit: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12.
- Cowling, E. B. (1963). Structural features of cellulose. In: Reese, E.T. *Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials.* The Macmillan Company, New York.

- Cregg, J. M., Cereghino, G. P. L. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS. Microbiol. Rev. **24**: 45-66.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. **16**: 23-52.
- Csiszár, E., Urbánszki, K., Szakács, G. (2001). Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulose and xylanase. Enzymes. 11: 1065 – 1072.
- Da Silva, A. C. R., Kendrick-Jones, J., and Reinach, F. C.(1995). Determinants of ion specificity on EF-hand sites. Conversion of the Ca²⁺/Mg²⁺ site of smooth muscle myosin regulatory light chain a Ca²⁺ -specific site. J. Biologi. Chemistry. **270**: 6773 – 6778.
- Daly, R., Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recongnit. **18**: 119 – 138.
- Damaso, M. C. T., Almeida, M. S., Kurtenbach, E., Martins, O. B., Pereira, N. J., Andrade, C. M. M. C., Albano, R. M. (2004). Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces laniginosus* in *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microbiol. **10**: 6064-6072.
- 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. , 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

- De-Marco & Felix, C. (2007). Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential. Brazilian Archives Of Biology Technology, **50**: 21 – 29.
- Dillon, A. J. P., Paesi-Toresan, S. and Barp, L. B. (1992). Isolation of cellulose-producing mutants from *Penicillium sp.* strains denominated 3MUV3424. Rev. Brasileira de Genética, **15**: 491 – 498.
- Dillon, A. J. P. (2004). Celulasas. In: Enzimas como Agentes Biotecnológicos. Suraia Said, Rosemeire C. L. R. Pietro – Ribeirão Preto, (eds). Legis Summa, 412 p.
- Dillon, A. J. P., Zorgi, C., Camassola, M., Henriques, J. A. P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulose and β -glucosidase activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. **70**: 740–746.
- Dillon, A. J. P., Camassola, M., Henriques, J. A. P., Fungaro, M. H. P., Azevedo, A. C. S., Velho, T. A. F., Laguna, S. E. (2008). Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. Enzyme. Micro. Tech. **43**: 403–409.
- Ding, S. J., Ge, W., Buswell, J. A. (2001). Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea* Purification, characterization, cloning and expression. Eur. J. Biochem. **268**: 5687 – 5695.
- Ding, S., Ge, W., Buswell, J. A. (2002). Secretion, purification and characterization of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in Yeast *Pichia pastoris*. Enzyme. Micro. Tech. **31**: 621 – 626.
- Elifantz, H., Waidner, L. A., Michelou, V. K., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L. (2008). Diversity and abundance of glycosyl hydrolase family 5 in the North Atlantic Ocean. FEMS. Microbiol. Ecol. **63**: 316 – 327.

- Fachin, V. L., Meneghetti, L. R., Dillon, A. J. P. (1995). Isolamento de mutantes para a produção de celulases na linhagem 3427 de *Penicillium* sp. Brazilian Journal of Genetics, **18**: 230.
- Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhão, A. Q., Torres, F., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M. P., Albuquerque, P., Tavares, A. H. F. P., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., PbGenome Network, Pereira, M., Jesuino, R. S. A., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A. S., Almeida, N. F., Walter, M. E. M. T., Soares, C. M. A., Carvalho, M. J., Brigido, M. M. (2005). Transcriptional Profiles of the Human Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in Mycelium and Yeast Cells. J. Biol. Chem. **280**: 24706–24714.
- Feng, Y., Duan C. J., Pang, H., Mo, X. C., Wu, C. F., Yu, Y., Hu, Y. L., Wei, J., Tang, J. L., Feng, J. X. (2007). Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. Appl. Microbiol. Biotechnol. **75**: 319 – 328.
- Ferrarese, L. L., Gattolin, T. S., Casadoro, G. (1998). Secretion, purification and activity of two recombinant pepper endo-L-1,4-glucanases expressed in the yeast *Pichia pastoris*. FEBS. Letters. **422**: 23 – 26.
- Fierobe, H. P., Gaudin, C., Belaich, A., Loutfi, M., Faure, E., Bagnara, C., Baty, D., Belaich, J. P. (1991). Characterization of Endoglucanase A from *Clostridium cellulolyticum*. J. Bacteriol. **173**: 7956 – 7962.
- Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (1983). Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. Appl. Environmental. Microbiol. **46**: 1301 – 1310.

- Galdino, A. S. (2008). Clonagem e expressão de uma α -amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido. Tese de doutoramento. Universidade de Brasília.
- Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 741-750.
- Gellissen, G., Hollenberg, C. P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene.* **190**: 87 – 97.
- Gerasimova, T. I., Corces, V. G. (2001). Chromatin insulators and boundaries: Effects on transcription and nuclear organization. *Ann. Rev. Genet.* **35**: 193-208.
- Gifford, J.L., Walsh, M.P. and Vogel, H.J. (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* **405**: 199 – 221.
- Goellner, M., Wang, X., Davis, E. L. (2001) Endo- β -1,4-Glucanase Expression in Compatible Plant–Nematode Interactions. *Plant. Cell.* **13**: 2241–2255.
- Gulrajani, M. L., Roy, P., Agarwal, R., Chand, S. (1998). Enzymatic treatment of cotton Knits. *Indian Journal of Fibre & Textile Research.* **23**: 242 – 249.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process. Biochemistry.* **38**: 1599 – 1616.
- Haakana, H. , Miettinen-Oinonen, A., Joutsjoki, V., Mäbtyka, A., Suominen, P., Vehmaanpera, J. (2003). Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. *Enzyme. Micro. Tech.* **34**: 159-167.

- Haegeman, A., Jacob, J., Vanholme, B., Kyndt, T. and Gheysen, G. (2008). A family of GHF5 endo-1,4-beta-glucanases in the migratory plant-parasitic nematode *Radopholus similis*. *Plant. Pathology*. **57**: 581–590.
- Heikinheimo, L., Miettinen-Oinonen, A., Cavaco-Paulo, A., Buchert, J. (2003). Effect of Purified *Trichoderma Reesei* Cellulases on Formation of Cotton Powder from Cotton Fabric. *J. Appl. Polym. Sci.* **90**: 1917–1922.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**: 309-316.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., Mattanovich, D. (2004). Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **85**: 367-375.
- Hong, F., Meinander, N. Q., Jonsson, L. J. (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **79**: 438-449
- Huang, H., Yang, P., Luo, H., Tang, H., Shao, N., Yuan, T., Wang, Y., Bai, Y., Yao, B. (2008). High-level expression of a truncated 1,3-1,4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**: 95 – 103.
- Imèn, M., Saloheimo, A., Onnela, M.L. and Penttilä, M.E. (1997). Regulation of cellulose gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1298 – 1306.

- Jahic, M. (2003). Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris*. PhD Thesis, Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- Joglekar, A. V., Karanth, N. G. (1984). Studies on cellulose production by a mutant *Penicillium fuculosum* UV – 49. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 1079 – 1084.
- Jorgensen, H., Eriksson, T., Borjesson, J., Tjerneld, F., Olsson, L. (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilium* IBT 20888. *Enzyme. Micro. Tech.* **32**: 851 – 861.
- Kim, C. H. and Kim, D. S. (1995). Purification and specificity of a specific endo-beta-1,4-D-glucanase (Avicelase-II) resembling exo-cellobiohydrolase from *Bacillus circulans*. *Enzyme. Micro. Tech.* **17**: 248 – 254.
- Koseki, T., Mese, Y., Fushinobu, S., Masaki, K., Fujii, T., Ito, K., Shiono, Y., Murayama, T., Iefuji, H. (2008). Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 1279 – 1285.
- Krogh, K.B.R.M., Kastberg, H., Jørgensen, C.I., Berlin, A., Harris, P.V., Olsson, L. (2009). Cloning of a GH5 endoglucanase from genus *Penicillium* and its binding to different lignins. *Enzyme. Micro. Tech.* **44**: 359 – 367.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., Kubicek-Pranz, E.M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme. Micro. Tech.* **15**: 90 – 99.

- Kundu, A.B., Ghosh, B.S., Dutta, A.K., Ghosh, U.K., Sengupta, S., Ghosh, B.L. (1996) Biopolishing of jute-cotton union fabric. *Indian journal of Fibre & Textile research*, **21**: 127 – 130.
- Kurtzman, C. P. (2005). Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 973–976.
- Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., Depiereux, E. (2002) ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*. **9**:1250-1256.
- Leggio, L. L., Larsen, S. (2002). The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. *FEBS. Letters*. **523**: 103 -108.
- 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**: 12251-12255.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. V and Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 506 – 577.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., Mcneil, B., Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. **22**: 249-270.
- Mandelli, J. Rocha, R.C.S., Zanrosso, A.L., Dillon, A.J.P. (1995). Produtos de fusão entre *Trichoderma* sp. e *Pencillium* sp. para a produção de celulases. *Brazilian Journal of Genetics* 18 (3 – Supplement): 231.

- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C. (1976) Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 21–33.
- Martins, L. F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A. J. P., Ramos, L. P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour. Technol.* **99**: 1417–1424
- Matsui H, Ogata K, Tajima K, Nagamine T, Nakamura M, Aminov RI, Benno Y. (2001). Cloning, Expression, and Characterization of a Cellulase Gene from *Prevotella ruminicola*. *Ani. Sci. J.* **5**: 421 - 426.
- Mattanovich, D, Gasser, B., Hohenblum, H., Sauer, M. (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.* **113**: 121-135.
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer M., Kleinheinz M., Sauer M., Altmann, F. and Gasser, B. (2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb. Cell. Fact.* **8**: 29
- McCloskey, S. G. and Jump, J. M. (2005). Bio-Polishing of Polyester and Polyester/cotton Fabric. *Textile Research Journal.* **75**: 480 – 484.
- Meinke, A., Damude, H. G., Tomme, P., Kwan, E., Kilburn, D. G., Miller, R. C Warren, R. A. J., Gilkes, N. R. (1995). Enhancement of the endo-B-1,4 glucanase activity of an exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop. *J. Biol. Chem.* **270**: 4383 – 4386.
- Messner, R. and Kubicek, C. P. (1988). Intracellular precursors of endo-B-glucanase in *Trichoderma reesei*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **50**: 227 – 232.

- Miller, L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Ana. Chem.* **31**: 426-428.
- Molhoj, M., Ulvskov, P., Degan, D. F. (2001). Characterization of a Functional Soluble Form of a *Brassica napus* Membrane-Anchored Endo-1,4- β -Glucanase Heterologously Expressed in *Pichia pastoris*. *Plant. Physiol.* **127**: 674 – 684.
- Motomitsu, K., Yuji, H., Shinya, F., Masafumi, H., Takane, K., Kenji., Y. (2009). Conversion of inverting glycoside hydrolases into catalysts for synthesizing glycosides employing a glycosynthase strategy. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* **21**: 23 – 39.
- Nascimento, R. M. (2008). Purificação e caracterização parcial de uma β -D-glicosidase de *Artemia franciscana* com ação sobre celobiose e lactose. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Oikawa, T., Tsukagawa, Y., Soda, K. (1998). Endo- β -Glucanase Secreted by a Psychrotrophic Yeast: Purification and Characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **9**: 1751 – 1756.
- Ohmiya, Y., Takeda, T., Nakamura, S., Sakai, F. & Hayashi, T. (1995) Purification and properties of a wall-bound endo-1,4-b-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant. Cell. Physiol.* **36**: 607- 614.
- Opasiri, R., Pomthong, B., Akiyama, T., Nakphaichit, M., Onkoksoong, T., Cairns, M. K., Cairns, J. R. K. (2007). A Stress-Induced Rice (*Oryza sativa* L.) β -glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase Family 5 containing a fascin-like domain. *Biochem. J.* **408**: 241 – 249.
- Paradis, F.W., Zhu, H., Krell, P.J., Phillips, J.P., Forsberg, C.W.(1993) The xynC gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 codes for a xylanase with two similar catalytic domains. *J. Bacteriol.* **175**: 7666-7672.

- Picart, P. D. and Pastor, F. I. J. (2007). Cellulases from two *Penicillium sp.* strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization Journal compilation ^a 2007 The Society for Applied Microbiology. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**: 108–113.
- Poças-Fonseca, M. J., Silva-Pereira, I., Rocha, B. B. and Azevedo, M. O. (2000). Substrate-dependent differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. *Can. J. Microbiol.* **46**: 749-752.
- Procópio, L. S. (2006). Análise do transcriptoma parcial do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* recuperado após infecção de macrófagos peritoneais murinos. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.
- Radford, A., Stone, P. J., Taleb, F. (1996). Cellulase and amylase complexes. In: Brambl R, Marzluf GA, Edt. *The mycota III. Biochemistry and molecular biology*. Berlin, Heidelberg: Springer - Verlag. 269 – 294.
- Ramirez-Zanvala, B., Mercado-Flores, Y. Hernandez-Rodriguez, C., Villa-Tanaca, L. (2004). Purificação and characterization of lysine aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **235**: 369 – 375.
- Rau, M., Heidemann, C., Pascoalim, A. M., Filho, E. X. F., Camassola, M., Dillon, A. J., Chagas, C. F., Andreus, J. (2008). Application of cellulases from *Acrophialophora nainiana* and *Penicillium echinulatum* in textile processing of cellulosic fibres. *Biocatal. Biotransformation.* **26**: 383 – 390.
- Romaniec, M.P., Fauth, U., Kobayashi, T., Huskisson, N.S., Barker, P.J. and Demain, A.L. (1992) Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.* **283**: 69-73.

- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J.K. and Jones, T.A. (1990) Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*. **249**: 380-386.
- Sá-Pereira, P. Duarte, J. C., Ferrara, M. A., Lacerda, P. S. B., Alves, F. C. (2008). In: *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Elba P. S. Bom, Maria Antonieta Ferrara, Maria Luísa Corvo. Edit. Interciência LTDA. pp 506.
- Sadder, J. N., Hogan, C. M. and Louis-seize, G. (1985). A comparison between the cellulases system of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 139 – 145.
- Sakon, J., Adney W. S., Himmel, M. E., Thomas, S. R and Karplus, P. A. (1996) Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose. *Biochemistry*. **35**: 10648–10660.
- Sandgren, M., Stahlberg, J., Mitchinson, C. (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. **3**: 249 – 291.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schimper, C. B., Ibanescu, C., Keckeis, R., Bechtold, T. (2008) Advantages of a two-step enzymatic process for cotton–polyester blends. *Biotechnol. Lett.* **30**: 455 – 459.
- Schutter, K., D., Yao-Cheng, L., Tiels, P., Hecke, A. V., Glinka, S., Weber-Lehmann J., Rouze, P., Peer, Y. V., Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* 1 – 9.

- Sehnem, N. T., Bittencourt, L. R., Camassola, M., Dillon, A. J. P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Appl. Microbial. Cell. Physiology*. **72**: 163 – 167.
- Silva, A. C. R., Reinach, F. C. (1991). Calcium Binding Induces Conformational Changes In Muscle Regulatory Proteins. *Trends In Biochemistry*. **16**: 53-57.
- Shibuya, H., Kikuchi, T. (2008). Purification and Characterization of Recombinant Endoglucanases from the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **72** : 1325 – 1332.
- Smant, G., Stokkermans, J. P. W. G., Yan, Y., De Boer, J. M., Baum T. J., Wang, X., Husseyi, R. S., Gommers, F. J., Henrissat, B., Davis, E.L., Helder, J., Schots, A., Bakker, J. (1998). Endogenous Cellulases In Animals: Isolation Of B-1,4-Endoglucanase Genes From Two Species Of Plant-Parasitic Cyst Nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **95**: 4906 – 4911.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, B. J. T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subrananian, A., Birkenbirgir, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. **190**: 55-62.
- Strauss, J., Horvath, H. K., Abdllah, B. M., Kindermann, J., Mach, R. L., and Kubicek, C. P. (1999). The function of *CreA*, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-trascriptional level. *Mol. Microbiol*. **32**:169-178.
- Suda, C. N. K., Giorgini, J. F. (2003). Multiple forms of endo-1,4- β -glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophyla* L. *J. Experim. Bot*. **54**: 2045-2052.

- Sun, X., Liu, Z., Zheng, K. X. S., Qu, Y. (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. **42**: 560–567.
- Suto, M. and Tonita, F. (2001) Induction and catabolite repression mechanisms of cellulose in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 305 – 311.
- Takada, G., Kawasaki, M., Kitawaki, M., Kawaguchi, T., Sumitani, J., Izumori, K., Arai, M. (2002). Cloning and transcription analysis of the *Aspergillus aculeatus* No. F-50 Endoglucanase 2 (*cmc2*) Gene. *J. Biosci. Bioeng.* **94**: 482 – 485.
- 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**: 245-250.
- Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. and Uozumi, T. (1999) Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from *Humicola grisea*. *J. Biotechnol.* **67**: 85 – 97.
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *TIBTECH.* **15**: 160 – 167.
- Tomme, P. E., Kwan, N. R., Gilkes, D. G., Kilburn, D. G., Warren, R. J. A. (1996). Characterization of CenC an enzyme from *Cellulomonas fimi* with endo- and exoglucanase activities. *J. Bacteriol.* **178**: 4216 – 4223.
- Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., Grinna, L. (1987). High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* **5**: 1305-1308.

- Vasconcelos, A., Cavaco-Paulo, A. (2006). Enzymatic removal of cellulose from cotton/polyester fabric blends. *Cellulose*. **13**: 611 – 618.
- Velho, T. A. F. (2000). Transformação do fungo *Penicillium echinulatum* : Expressão Heteróloga do gene da B-glicosidase I de *Trichoderma reesei*. Dissertação de Mestrado Universidade de Caxias do Sul.
- Verenich, S., Arumugam, K., Shim, E., Pourdeyhimi B. (2008). Treatment of Raw Cotton Fibers with Cellulases for Nonwoven Fabrics. *Textil Reseach Jornal*. **6**: 540 – 548.
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K and Mikata, K. (1995). The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeast Based on the Partial Sequences of 18s and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (*Saccharomycetaceae*). *Biosci. Biotech. Biochem*. **59**: 439 – 444.
- Yoda, K., Toyoda, A., Mukoyama, Y., Nakamura, Y., Minato, H. (2005). Cloning, Sequencing, and Expression of a *Eubacterium cellulosolvens* 5 Gene Encoding an Endoglucanase (Cel5A) with Novel Carbohydrate-Binding Modules, and Properties of Cel5A. *Appl. Environment. Microbiol*. **71**: 5787–5793.
- Zeilinger, S., Haller, M., Kubicek, C. P. (2000). Molecular characterization of cellulose negative mutant of *Hypocrea jecorina*. *Biochem. Biophys. Res. Commum*. **277**: 581 – 588.
- Wang, H., Jones, W. R. (1995). Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase-encoding gene from the phytopatogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Gene*. **158**: 125 – 128.
- Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Politz, O. and Borriss, R. (1995) Influence of Ca²⁺ on conformation and stability of three bacterial hybrid glucanases. *Eur. J. Biochem*. **229**: 726–735.

- Wilson, D.B. (2009). Cellulases and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 295 – 299.
- Wonganu, B., Pootanakit, K., Boonyapakron, K., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L. (2008). Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*, *Protein. Expres. Purif.* **58**: 78–86.
- Wu, S., Ding, S., Zhou, R., Li, Z. (2007). Comparative characterization of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase I (EG1) with its truncated catalytic core (EG1-CM), and their impact on the bio-treatment of cellulose-based. Fabrics. *J. Biotechnol.* **130**: 364 – 369.