

6.5 Obtenção de novos produtores da enzima CBH1. Resultados e Discussões

Estes transformantes foram levados para produção em frasco de acordo com a seção 5.2.12, e analisados quando ao perfil das proteínas secretadas, atividade e concentração. O perfil de proteínas secretadas pelos transformantes 2, 7, 20, 25 e 26 após 96 horas de expressão pode ser visto na Figura 6.21.

Para estes clones testados, foi considerado que o transformante 2 da linhagem SMD1168, da nova transformação, foi o melhor produtor de enzimas ativas.

6.5.4 Expressão da enzima CBH para novos transformantes

O sobrenadante do meio de cultura, contendo o transformante 2 da linhagem SMD1168 da levedura *P. pastoris*, foi analisado, em gel desnaturante de poliacrilamida, quanto ao Perfil de proteínas excretada em função do tempo de expressão. A Figura 6.22 apresenta este Perfil proteico. A concentração de proteínas nesta amostra foi medida utilizando-se reagente Bradford. Estas concentrações podem ser vistas na Tabela 6.3.

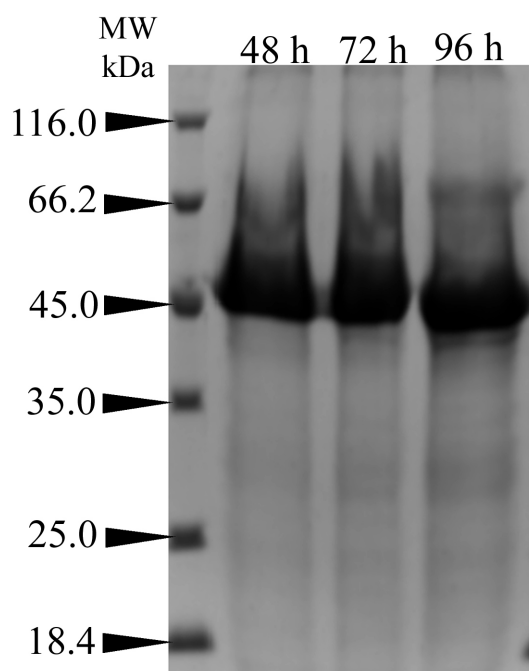


Figura 6.22: Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem SMD1168 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas com precipitante TCA. Gel corado com azul de coomassie.

A linhagem SMD1168 da levedura *P. pastoris* produtora da enzima CHB1.2 de *H. grisea*, apresentou pico de atividade após 72 horas de expressão. Esta atividade foi de $0,39 \pm 0,02$ U/mL (Figura 6.23).

Tabela 6.3: Concentrações totais de proteínas no sobrenadante de cultura após 24, 48, 72 e 96 horas de expressão para a enzima CBH1.2r (linhagem SMD1168). Quantificação via método de Bradford.

Tempo de Expressão	Concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
24h	$0,38 \pm 0,02$
48h	$0,41 \pm 0,02$
72h	$0,43 \pm 0,02$
96h	$0,49 \pm 0,01$

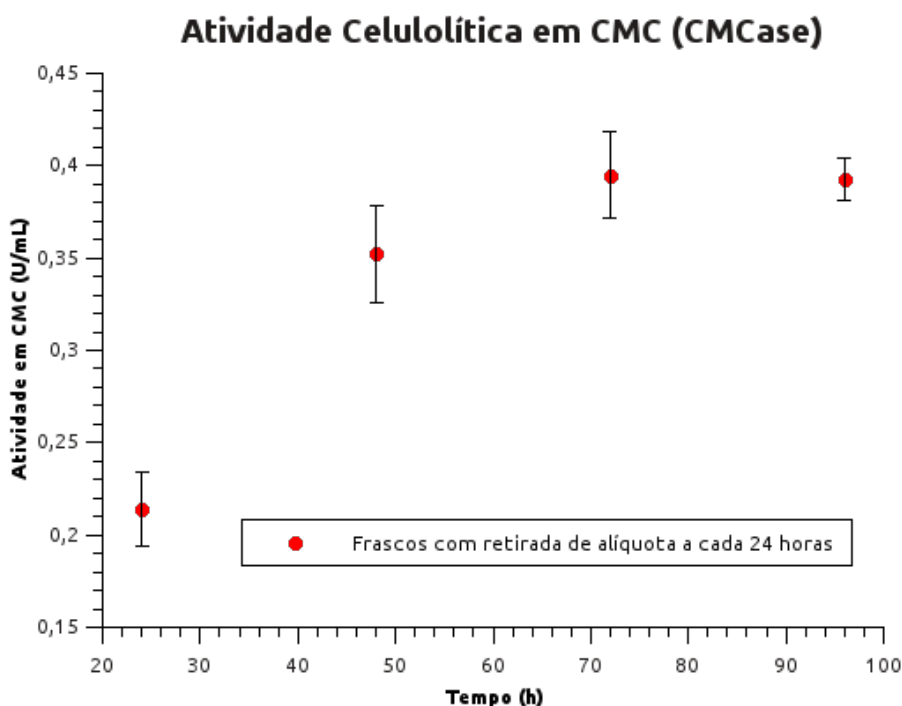


Figura 6.23: Perfil de atividade CMCase, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* (linhagem SMD1168) produtora da enzima CBH1.2 de *H. grisea*. Cultivo em meio BMMY-U a 30 °C e 200 rpm.

6.6 Lisozima e teste do novo difratômetro

Com o intuito de realizar a configuração inicial de parâmetros no difratômetro do laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da UFG, foram realizados ensaios manuais de cristalização da proteína Lisozima. Esta é uma proteína modelo para estudos de cristalização, sendo que sua estrutura e condições de cristalização são bem conhecidas. Foi utilizada uma amostra contendo a proteína com concentração de 70 mg/mL em solução contendo 100 mM de NaAc a pH 4.8. Como solução precipitante, foi utilizada a solução contendo 50 mM de NaAc a pH 4.8, 7,5% de NaCl, e 20% PEG 200. Os ensaios manuais de cristalização foram realizados utilizando o método hanging drop com: 1 μL de solução de contendo lisozima e 1 μL de solução precipitante (Figura 6.24 - A), e 2 μL de solução

de contendo lisozima e $1\mu\text{L}$ de solução precipitante (Figura 6.24 - B). Estes cristais foram obtidos após, aproximadamente, 24 horas.

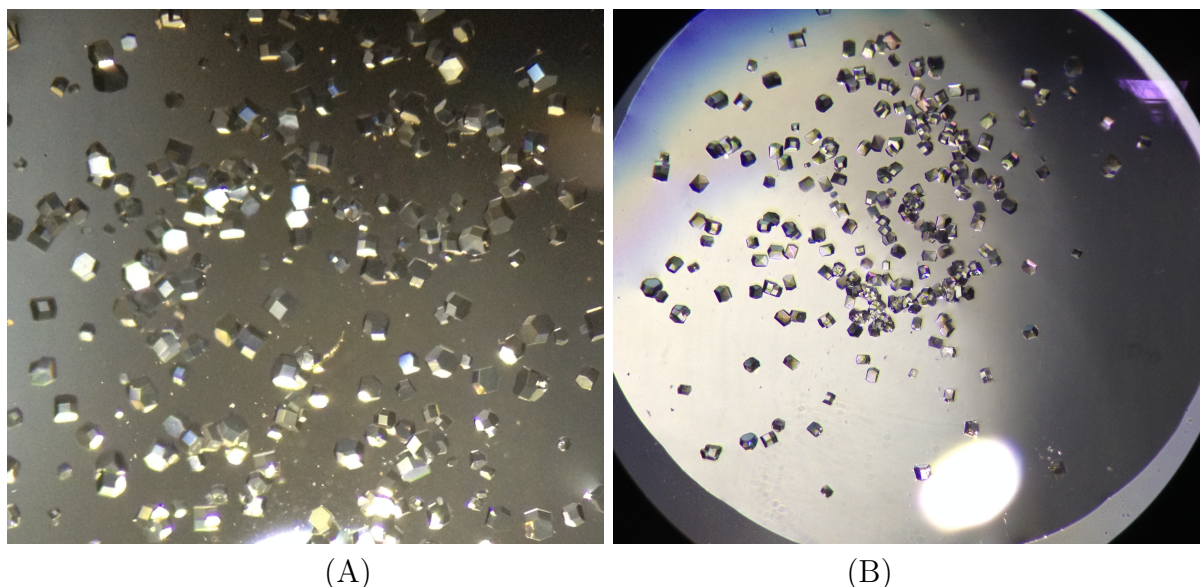


Figura 6.24: Cristais de lisozima obtidos em ensaios manuais. **A**: Concentração 1:1 de solução contendo lisozima e solução precipitante. **B**: Concentração 2:1 de solução contendo lisozima e solução precipitante.

6.7 Coleta de dados para cristal de Lisozima

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada utilizando-se fonte de cobre (Cu) com comprimento de onda de $1,54184\text{\AA}$. Um total de 1.995 imagens foram coletadas (Figura 6.25) utilizando um tempo de exposição de 15 segundos e um passo de $0,5^\circ$ para os ângulos phi e omega. O tempo total de exposição foi de 8,31 horas. As imagens foram integradas com o pacote de software Bruker SAINT utilizando o algoritmo “narrow-frame” (A Figura 6.25 apresenta uma das imagens coletadas). A integração dos dados através de uma célula unitária tetragonal produziu um total de 140.386 reflexões para um ângulo θ máximo de $26,18^\circ$ ($1,77\text{\AA}$ de resolução). As constantes finais da cela unitária encontradas no grupo espacial $P4_32_12$ do sistema cristalino tetragonal são: $\mathbf{a} = 78,5013 (17)\text{\AA}$, $\mathbf{c} = 37,1256 (9)\text{\AA}$, volume = $228785 (14)\text{\AA}^3$ que baseiam-se no refinamento de 9023 reflexões com $\sigma(I)$ acima de 20, com o ângulo 2θ variando de $4,705^\circ$ a $51,16^\circ$. Os dados foram corrigidos para efeitos de absorção utilizando o método multi-scan (SADABS).

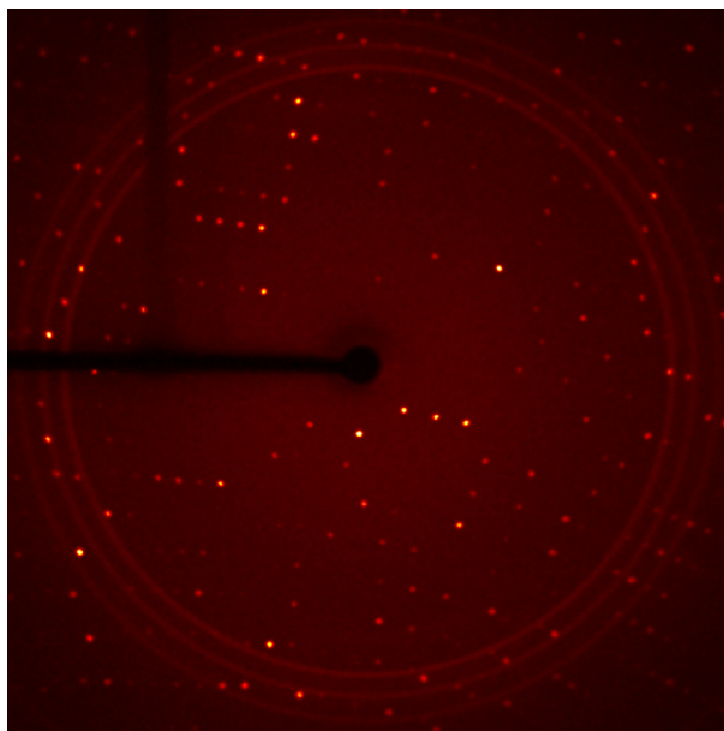


Figura 6.25: Imagem de difração do cristal de lisozima coletada no difratômetro KAPPA APEX DUO, no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da UFG.

6.8 Resolução de estrutura

O arquivo .hkl contendo as reflexões gerado após a integração das imagens foi importado utilizando-se do software CTruncate [111] (do pacote CCP4) que converte as intensidades em fatores de estrutura com seu desvio ($\sigma(F)$) associado em um arquivo de extensão .mtz. A Solução foi então realizada utilizando-se o método de substituição molecular através do softwar Phaser MR [112] (ainda do pacote CCP4) utilizando-se como modelo a base de dados do PDB (Protein Data Bank) 1HEW [113] considerando 95% de identidade sequencial. Após a solução, as modificações necessárias foram realizadas utilizando-se o software Coot [109], e o refinamento em espaço de fase, foi realizado com o software Refmac5 [107, 108] no CCP4. Após as etapas de refinamento, os seguintes fatores foram obtidos: $R_1=0,1840$, $R_{free}=0,2355$ e resolução de $1,77 \text{ \AA}$. A representação da estrutura final obtida para a proteína Lisozima pode ser vista na Figura 6.26. Todos os 129 resíduos da lisozima são visíveis no modelo.

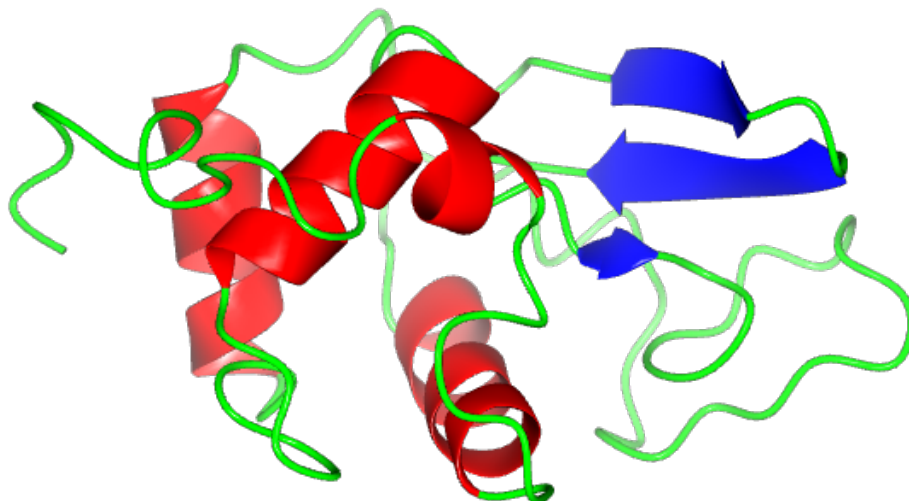


Figura 6.26: Representação da estrutura tridimensional obtida para a Lisozima. Figura gerada com o software Pymol [1].

Capítulo 7

Conclusão

O presente trabalho foi realizado com o objetivo geral de obter as estruturas tridimensionais das enzimas CBH1.2 e HXYN2 do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, e objetivos específicos de produzir tais enzimas, estabelecer protocolos de purificação, encontrar as condições de cristalização que forneceriam cristais de tamanhos e qualidade suficientes para análise por difração de raios X, entre outros.

Cada macromolécula possui condições próprias e específicas para se cristalizar, e em todos os casos é necessário um alto nível de pureza e altas concentrações o que pode levar a precipitação indesejada da macromolécula, por esta razão, a obtenção de cristais com qualidade, imprescindível para a obtenção da estrutura tridimensional, é sem dúvida o passo mais difícil entre todos estes objetivos listados.

Neste trabalho, foi realizado com sucesso a expressão das proteínas alvo utilizando um sistema de expressão heteróloga em *P. pastoris* com níveis de rendimento satisfatórios para a obtenção da quantidade de enzima necessária para os ensaios cristalográficos.

Protocolos de purificação para ambas as enzimas foram estabelecidos utilizando métodos de purificação por precipitação com sulfato de amônio, e processo de ultrafiltração com membranas de cortes de peso molecular. Também foi possível concentrar ambas as enzimas evitando sua precipitação utilizando as membranas de ultrafiltração.

Ensaio de cristalização robóticos foram realizados com a enzima CBH1.2r, onde foi encontrada uma condição de cristalização para esta enzima. Estes ensaios mostraram alta reprodutibilidade durante ensaios manuais realizados nas dependências do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da UFG, porém os cristais obtidos ainda

não são suficientes para análise no equipamento disponível neste mesmo laboratório. Ensaios de cristalização robóticos também foram realizados com a enzima HXYN2, porém para esta enzima ainda não foi encontrada uma condição que levasse a obtenção de cristais.

Devido a problemas técnicos com a manutenção dos clones, clones contendo o cDNA da enzima CHB1.2 foram perdidos, o que levou a realização de novos processos de clonagem desta enzima para obtenção de mais amostras para futuros ensaios bioquímicos e de cristalização. A clonagem e transformação foi realizada com sucesso, obtendo desta vez transformantes em uma linhagem da levedura *P. pastoris* que é deficiente na produção de algumas proteases, o que melhora a durabilidade das amostras, já que diminui o processo de degradação das proteínas por tais proteases presentes no sobrenadante do meio de cultura.

Afim de realizar a coleta de dados e configuração do equipamento instalado no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da UFG, foi realizada a cristalização da proteína Lisozima utilizando-se condições de cristalização disponíveis na literatura. Os cristais obtidos foram submetidos a coleta de dados no difratômetro Bruker KAPPA APEX DUO utilizando-se fonte de cobre (Cu) que forneceu dados de qualidade para resolução da estrutura tridimensional desta proteína até a resolução de 1,77 Å. O modelo final da estrutura apresentou índices $R_1 = 0,1840$ e $R_{free} = 0,2355$, indicando a boa aproximação do modelo obtido.

Capítulo 8

Perspectivas

As perspectivas para trabalhos futuros são de analisar os 22 transformantes obtidos que não foram testados quanto a produção em frascos. Serão realizados novos ensaios de cristalização com as enzimas obtidas dos transformantes da linhagem SMD1168. Para os atuais cristais agulhas da CBH, coletas de difração de raios X poderão ser realizadas, via colaboração com o Dr. Humberto D’Muniz Pereira, no Diamond Light Source, na Inglaterra. Serão realizados novos ensaios de cristalização com a enzima HXYN2 purificada através das membranas de ultrafiltração utilizando concentrações mais altas.

Será realizado o estudo de outras enzimas envolvidas no processo de degradação da celulose, tanto com enzimas do fungo *Humicola grisea* quanto com enzimas de outros fungos, como por exemplo, a enzima Endoglucanase de *Aspergillus nidulans*. Os grupos de pesquisa de Enzimologia e Biotecnologia de Fungos, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, já estão trabalhando na obtenção de transformantes com as novas enzimas.

Convém destacar que o Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás recentemente adquiriu um equipamento de cromatografia líquida de alta performance, modelo ÄKTA pure 25 Protein Purification System da empresa GE Health Care. O equipamento já encontra-se em funcionamento para purificação de proteínas utilizando as técnicas de gel filtração, troca iônica, interação hidrofóbica e cromatografia de afinidade.

Referências Bibliográficas

- [1] S. McNICHOLAS, E. POTTERTON, K. WILSON, and M. NOBLE, “Presenting your structures: the ccp4mg molecular-graphics software,” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 67, no. 4, pp. 386–394, 2011.
- [2] U. C. BUREAU, “World Population information. International Data Base.” <http://www.census.gov/population/international/data/idb/worldpopgraph.php>. Acessado em 07/04/2013.
- [3] S. IDSO, “Carbon dioxide and global change: Earth in transition,” 1989.
- [4] http://pt.wikipedia.org/wiki/Etanol_como_combust%C3%ADvel_no_Brasil.
- [5] http://economia.terra.com.br/noticias/noticia.aspx?idNoticia=200807152306_ABR_77211977.
- [6] <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2010/11/08/consumo-de-etanol-superou-o-de-gasolina-em-janeiro-deste-ano>.
- [7] T. RIPOLI and M. RIPOLI, “O setor sucroalcooleiro no Brasil. Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente,” *USP, ESALQ.*, vol. 1, p. 302, 2004.
- [8] N. E. D. M. BELTRÃO and M. I. P. D. OLIVEIRA, “Biossíntese e degradação de lipídios, carboidratos e proteínas em oleaginosas,” 2007. p. 52.
- [9] G. POMPEU, *Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando a produção de etanol*. PhD thesis, Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [10] “Biomcombustíveis de segunda geração: o futuro passa por aqui,” Agosto 2009.
- [11] R. DEKKER, “The enzymatic hydrolysis of biomass,” in *Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa 2*, 1985.
- [12] E. O. GOMEZ, R. T. G. SOUZA, G. J. M. ROCHA, E. ALMEIDA, and L. A. B. CORTEZ, “P&D para Produtividade Sustentabilidade,” in *Bioetanol de Cana-de-Açúcar*, ch. 9, São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2010.
- [13] R. E. QUIROZ-CASTAÑEDA and J. L. FOLCH-MALLOL, “Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization,” 2013.
- [14] L. LYND, P. WEIMER, W. ZYL, and I. PRETORIUS, “Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 66, pp. 506–577, 2002.
- [15] D. FENGEL and G. WEGENER, “Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions,” in *Walter de Gruyter: Berlin*, 1989.
- [16] L. P. RAMOS, “The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials,” *Quimica Nova*, vol. 26, p. 863, 2003.
- [17] Y. LU, B. YANG, D. GREGG, J. N. SADDLER, and S. D. MANSFIELD, “Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 98, p. 641, 2002.
- [18] J. ROUVINEN, T. BERGFORS, T. TEERI, J. K. KNOWLES, and T. A. JONES, “Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*,” *Science*, vol. 249, no. 4967, pp. 380–386, 1990.
- [19] T. PARKKINEN, A. KOIVULA, J. VEHEMAANPERA, and J. ROUVINEN, “Crystal structures of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B in complex with cello-oligomers show high flexibility in the substrate binding,” *Protein Science*, vol. 17, pp. 1383–1394, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [20] N. ARO, T. PAKULA, and M. PENTTILA, “Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, p. 719, 2005.
- [21] N. GILKES, B. HENRISSAT, D. KILBURN, R. C. J. MILLER, and R. A. J. WARREN, “Domains in microbial β -1-4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families,” *Microbiological Reviews*, vol. 55, pp. 303–315, 1991.
- [22] M. J. S. RUEGGER and TAUK-TOMISIELO, “Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil,” *Revista Brasileira de Botânica*, vol. 27(2), pp. 205–211, 2004.
- [23] R. A. PRADE, “Xylanases: from biology to biotechnology,” *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 101–132, 1996.
- [24] M. P. COUGHLAN, “Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases,” *Progress in Biotechnology*, vol. 7, pp. 111–139, 1991.
- [25] M. HESS, A. SCZYRBA, R. EGAN, T.-W. KIM, H. CHOKHAWALA, G. SCHROTH, S. LUO, D. S. CLARK, F. CHEN, T. ZHANG, and OTHERS, “Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen,” *Science*, vol. 331, no. 6016, pp. 463–467, 2011.
- [26] B. HENRISSAT and A. BAIROCH, “New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities,” *Biochem. J.*, vol. 293, pp. 781–788, 1993.
- [27] S. SUBRAMANIYAN and P. PREMA, “Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 22, no. 1, pp. 33–64, 2002.
- [28] A. SUNNA and G. ANTRANIKIAN, “Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 39–67, 1997.
- [29] T. COLLINS, C. GERDAY, and G. FELLER, “Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, no. 1, pp. 3–23, 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [30] S. B. LARSON, J. DAY, A. P. BARBA DE LA ROSA, N. T. KEEN, and A. MCPHERSON, “First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis,” *Biochemistry*, vol. 42, no. 28, pp. 8411–8422, 2003.
- [31] G. J. KLEYWEGT, J. Y. ZOU, C. DIVNE, G. J. DAVIES, I. SINNING, J. STAHLBERG, T. REINIKAINEN, M. SRISODSUK, T. T. TEERI, and T. A. JONES, “The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 angstrom resolution, and a comparison with related enzymes,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 272, no. 3, pp. 383–397, 1997.
- [32] F. VAN PETEGEM, T. COLLINS, M.-A. MEUWIS, C. GERDAY, G. FELLER, and J. VAN BEEUMEN, “The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution - structural adaptations to cold and investigation of the active site,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 9, pp. 7531–7539, 2003.
- [33] U. DEREWENDA, L. SWENSON, R. GREEN, Y. WEI, R. MOROSOLI, F. SHARECK, D. KLUEPFEL, and Z. S. DEREWENDA, “Crystal structure, at 2.6 Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1, 4-D-glycanases,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 33, pp. 20811–20814, 1994.
- [34] A. TÖRRÖNEN, A. HARKKI, and J. ROUVINEN, “Three-dimensional structure of endo-1, 4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site,” *The EMBO journal*, vol. 13, no. 11, p. 2493, 1994.
- [35] D. NURIZZO, J. P. TURKENBURG, S. J. CHARNOCK, S. M. ROBERTS, E. J. DODSON, V. A. MCKIE, E. J. TAYLOR, H. J. GILBERT, and G. J. DAVIES, “*Cellvibrio japonicus* α -L-arabinanase 43A has a novel five-blade β -propeller fold,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 9, no. 9, pp. 665–668, 2002.
- [36] T. COLLINS, M.-A. MEUWIS, I. STALS, M. CLAEYSSSENS, G. FELLER, and C. GERDAY, “A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 38, pp. 35133–35139, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [37] P. BIELY, “Microbial xylanolytic systems,” *Trends in Biotechnology*, vol. 3, no. 11, pp. 286–290, 1985.
- [38] P. BIELY, D. KLUEPFEL, R. MOROSOLI, and F. SHARECK, “Mode of action of three endo- β -1, 4-xylanases of *Streptomyces lividans*,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1162, no. 3, pp. 246–254, 1993.
- [39] P. BIELY, M. VRŠANSKÁ, M. TENKANEN, and D. KLUEPFEL, “Endo- β -1, 4-xylanase families: differences in catalytic properties,” *Journal of Biotechnology*, vol. 57, no. 1, pp. 151–166, 1997.
- [40] R. L. CAMPBELL, D. R. ROSE, W. W. WAKARCHUK, R. TO, W. L. SUNG, and M. YAGUCHI, “A comparison of the structures of the 20 kd xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Bacillus circulans*,” *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research Publication*, vol. 8, pp. 63–72, 1993.
- [41] A. TÖRRÖNEN and J. ROUVINEN, “Structural comparison of two major endo-1, 4-xylanases from *Trichoderma reesei*,” *Biochemistry*, vol. 34, no. 3, pp. 847–856, 1995.
- [42] G. W. HARRIS, R. W. PICKERSGILL, I. CONNERTON, P. DEBEIRE, J.-P. TOUZEL, C. BRETON, and S. PEREZ, “Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 29, no. 1, pp. 77–86, 1997.
- [43] A. TÖRRÖNEN and J. ROUVINEN, “Structural and functional properties of low molecular weight endo-1, 4- β -xylanases,” *Journal of Biotechnology*, vol. 57, no. 1, pp. 137–149, 1997.
- [44] W. W. WAKARCHUK, R. L. CAMPBELL, W. L. SUNG, J. DAVOODI, and M. YAGUCHI, “Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase,” *Protein Science*, vol. 3, no. 3, pp. 467–475, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [45] M. VARDAKOU, C. DUMON, J. W. MURRAY, P. CHRISTAKOPOULOS, D. P. WEINER, N. JUGE, R. J. LEWIS, H. J. GILBERT, and J. E. FLINT, “Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 375, no. 5, pp. 1293–1305, 2008.
- [46] J. ITO, Y. FUJITA, M. UEDA, H. FUKUDA, and A. KONDO, “Improvement of cellulose-degrading ability of a yeast strain displaying *Trichoderma reesei* Endoglucanase II by recombination of cellulose-binding domains,” *Biotechnology Progress*, vol. 20, no. 3, pp. 688–691, 2004.
- [47] M. SANDGREN, J. STÅHLBERG, and C. MITCHINSON, “Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes,” *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 89, no. 3, pp. 246–291, 2005.
- [48] A. GRASSICK, P. G. MURRAY, R. THOMPSON, C. M. COLLINS, L. BYRNES, G. BIRRANE, T. M. HIGGINS, and M. G. TUOHY, “Three-dimensional structure of a thermostable native cellobiohydrolase, CBH IB, and molecular characterization of the cel7 gene from the filamentous fungus, *Talaromyces emersonii*,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 271, no. 22, pp. 4495–4506, 2004.
- [49] C. DIVNE, J. STAHLBERG, T. REINIKAINEN, L. RUOHONEN, G. PETTERSSON, J. KNOWLES, T. T. TEERI, and T. JONES, “The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*,” *Science*, vol. 265, no. 5171, pp. 524–528, 1994.
- [50] I. G. MUÑOZ, W. UBHAYASEKERA, H. HENRIKSSON, I. SZABÓ, G. PETTERSSON, G. JOHANSSON, S. L. MOWBRAY, and J. STÅHLBERG, “Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (cbh58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 314, no. 5, pp. 1097–1111, 2001.
- [51] A. VARROT, S. HASTRUP, M. SCHULEIN, and G. DAVIES, “Crystal structure of the catalytic core domain of the family 6 cellobiohydrolase II, Cel6A, from *Humicola insolens*, at 1.92 Å resolution,” *Biochem. J.*, vol. 337, pp. 297–304, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [52] H. TANAKA, K. KOIKE, S. ITAKURA, and A. ENOKI, “Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*,” *Enzyme Microb Technol.*, vol. 45(5), pp. 384–390, 2009.
- [53] M. DASHTBAN, H. SCHRAFT, and W. QIN, “Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives,” *Int J Biol Sci.*, vol. 5(6), pp. 578–595, 2009.
- [54] C. FERGUS, “The cellulolytic activity of thermophilic fungi and actinomycetes,” *Mycologia*, vol. 61, pp. 120–129, 1969.
- [55] M. TANSEY, “Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles,” *Mycologia*, vol. 63, pp. 537–547, 1971.
- [56] H. YOSHIDA, S. ANRAKU, and S. HAYASHIDA, “Production and purification of a novel type of CMCase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78,” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 46, pp. 75–82, 1982.
- [57] V. CHAVES, “Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem,” Master’s thesis, Universidade Federal de Viçosa-MG, 1982.
- [58] E. H. D. PAULA, M. J. POCAS-FONSECA, and M. D. O. AZEVEDO, “The product of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cbh1. 2 gene is the major expressed protein under induction by lignocellulosic residues,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 6, pp. 631–635, 2003.
- [59] S. TAKASHIMA, A. Nakamura, H. MASAKI, and T. UOZUMI, “Purification and characterization of cellulases from *Humicola grisea*,” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 77–82, 1996.
- [60] M. J. POÇAS-FONSECA, B. D. LIMA, M. M. BRIGIDO, I. SILVA-PEREIRA, M. S. FELIPE, A. RADFORD, and M. O. AZEVEDO, “*Humicola grisea* var. *thermoidea* cbh1. 2: A new gene in the family of cellobiohydrolases is expressed and encodes a cellulose-binding domain-less enzyme,” *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 43, no. 2, p. 115, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [61] F. P. FARIA and F. M. Bastos, “Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 34, pp. 119–123, 2002.
- [62] F. P. FARIA and F. M. Bastos, “Heterologous expression of the hxyn2 gene from *Humicola grisea* in *Pichia pastoris*: genetic stability analysis,” in *XXIV Meeting on Genetic of Microorganisms*, (Gramado), 2004.
- [63] G. S. OLIVEIRA, C. J. ULHOA, M. H. L. SILVEIRA, J. ANDREAUS, I. SILVA-PEREIRA, M. J. POÇAS-FONSECA, and F. P. FARIA, “Production of the recombinant cellulase CBH1.2 from *Humicola grisea* by *Pichia pastoris* in shake flask culture,” in *XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM*, (NATAL/RN), 2009.
- [64] W. R. CARVALHO, F. BASTOS, and F. P. FARIA, “Biochemical characterization of recombinant HXYN2 purified from *Pichia pastoris* supernatant culture,” in *XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM*, (Curitiba/PR), 2007.
- [65] E. D. PAULA, L. P. RAMOS, and M. O. AZEVEDO, “The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse,” *Biores. Technol.*, vol. 68, pp. 35–41, 1999.
- [66] M. AZEVEDO, M. S. S. FELIPE, S. ASTOLFI, and A. RADFORD, “Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*,” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 136, pp. 2569–2576, 1990.
- [67] G. S. OLIVEIRA, C. J. ULHOA, M. H. L. SILVEIRA, J. ANDREAUS, I. SILVA-PEREIRA, M. J. POÇAS-FONSECA, and F. P. FARIA, “An alkaline thermostable recombinant *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 29, no. 1, pp. 19–26, 2013.
- [68] F. P. FARIA, *Clonagem, Caracterização e Expressão do gene de xilanase Hxyn2 do fungo Humicola grisea var. thermoidea*. PhD thesis, Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular, UnB, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [69] H. DALBØGE and H. HELDT-HANSEN, “A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes,” *Molecular and General Genetics MGG*, vol. 243, no. 3, pp. 253–260, 1994.
- [70] P. APEL, D. G. PANACCIONE, F. R. HOLDEN, and J. D. WALTON, “Cloning and targeted gene disruption of XYL1, a 1, 4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*,” *Molecular Plant Microbe Interactions*, vol. 6, pp. 467–467, 1993.
- [71] W. R. D. CARVALHO, *Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico Humicola grisea var. thermoidea e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas*. PhD thesis, Universidade Federal de Goiás, 2008.
- [72] J. L. CEREGHINO and J. M. CREGG, “Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 24, no. 1, pp. 45–66, 2000.
- [73] R. K. BRETTHAUER and F. J. CASTELLINO, “Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 30, no. 3, pp. 193–200, 1999.
- [74] C. DALE, A. ALLEN, and S. FOGARTY, “*Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals,” *Biopharm*, vol. 12(11), p. 36–42, 1999.
- [75] G. GELLISSEN, Z. A. JANOWICZ, U. WEYDEMANN, K. MELBER, A. W. M. STRASSER, and C. P. HOLLENBERG, “High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*,” *Biotechnology Advances*, vol. 10, no. 2, pp. 179–189, 1992.
- [76] M. ROMANOS, “Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 6, no. 5, pp. 527–533, 1995.
- [77] M. A. ROMANOS, C. A. SCORER, and J. J. CLARE, “Foreign gene expression in yeast: a review,” *Yeast*, vol. 8, no. 6, pp. 423–488, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [78] S. MACAULEY-PATRICK, M. L. FAZENDA, B. MCNEIL, and L. M. HARVEY, “Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system,” *Yeast*, vol. 22, no. 4, pp. 249–270, 2005.
- [79] R. DALY and M. T. W. HEARN, “Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production,” *Journal of Molecular Recognition*, vol. 18, no. 2, pp. 119–138, 2005.
- [80] A.-L. ZHANG, J.-X. LUO, T.-Y. ZHANG, Y.-W. PAN, Y.-H. TAN, C.-Y. FU, and F.-Z. TU, “Recent advances on the gap promoter derived expression system of *Pichia pastoris*,” *Molecular Biology Reports*, vol. 36, no. 6, pp. 1611–1619, 2009.
- [81] H. P. SØRENSEN, “Towards universal systems for recombinant gene expression,” *Microbial Cell Factories*, vol. 9, no. 1, p. 27, 2010.
- [82] J. M. CREGG, “Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.(1998) In: J. Fernandez and J. Hoeffler (Eds.), *Nature: The Palette for the Art of Expression*, Chapter 10.”
- [83] P. KOUTZ, G. R. DAVIS, C. STILLMAN, K. BARRINGER, J. CREGG, and G. THILL, “Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes,” *Yeast*, vol. 5, no. 3, pp. 167–177, 1989.
- [84] J. M. CREGG, “Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems.,” *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, vol. 389, p. 1, 2007.
- [85] J. CLARE, F. RAYMENT, S. BALLANTINE, K. SREEKRISHNA, and M. ROMANOS, “High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene,” *Nature Biotechnology*, vol. 9, no. 5, pp. 455–460, 1991.
- [86] C. WHITE, N. KEMPI, and E. KOMIVES, “Expression of highly disulfide–bonded proteins in *Pichia pastoris*,” *Structure*, vol. 2, no. 11, pp. 1003–1005, 1994.
- [87] P. LI, A. ANUMANTHAN, X.-G. GAO, K. ILANGOVAN, V. V. SUZARA, N. DÜZGÜNEŞ, and V. RENUGOPALAKRISHNAN, “Expression of recombinant

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- proteins in *Pichia pastoris*,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 142, no. 2, pp. 105–124, 2007.
- [88] W. R. CARVALHO, F. BASTOS, and F. P. FARIA, “Heterologous expression of Hxyn2r gene from the fungus *Humicola grisea* in *Pichia pastoris*: Optimization of HXYN2r production in flasks,” in *Anais of the VIII Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Biomass*, vol. 8, (Maringá), 2005.
- [89] B. D. CULLITY and S. R. STOCK, *Elements of X-ray Diffraction*, vol. 3. Prentice hall Upper Saddle River, NJ, 2001.
- [90] M. M. WOOLFSON, *An introduction to X-ray crystallography*. Cambridge University Press, 1997.
- [91] J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH, H. WYCKOFF, and D. C. PHILLIPS, “A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis,” *Nature*, vol. 181, no. 4610, pp. 662–666, 1958.
- [92] E. T. REICHERT and A. P. BROWN, *The differentiation and specificity of corresponding proteins and other vital substances in relation to biological classification and organic evolution: the crystallography of hemoglobins*. No. 116, Carnegie Institution of Washington, 1909.
- [93] J. B. SUMNER, “The isolation and crystallization of the enzyme urease preliminary paper,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 69, no. 2, pp. 435–441, 1926.
- [94] J. D. BERNAL and D. CROWFOOT, “X-ray photographs of crystalline pepsin,” *Nature*, vol. 133, no. 3369, pp. 794–795, 1934.
- [95] M. LEUNISSEN, “Protein crystallization,” 2001.
- [96] D. R. S. LIMA, I. M. F. LOPES, J. J. TAVAREZ, and R. RAMPAZZO, “Cristalografia de macromoléculas.” Universidade Federal de Alenas, 2009.
- [97] D. SHERWOOD and J. COOPER, *Crystals, x-rays and proteins: comprehensive protein crystallography*. Oxford University Press, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [98] P. MULLER, *Crystal Structure Refinement: A Crystallographer's Guide to SHELXL*. IUCr texts on crystallography, OUP Oxford, 2006.
- [99] J. SAMBROOK, D. W. RUSSELL, and D. W. RUSSELL, *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*, vol. 999. Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- [100] G. B. LLC, “Snapgene 2.3.5.” software.
- [101] M. DE OLIVEIRA AZEVEDO, M. S. S. FELIPE, M. DE MACEDO BRÍGIDO, M. A. QUEIROZ, and M. T. DE-SOUZA, *Técnicas básicas em biologia molecular*. Ed. Universidade de Brasilia, 2003.
- [102] G. L. MILLER, “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar,” *Analytical chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [103] M. M. BRADFORD, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 248–254, 1976.
- [104] U. K. LAEMMLI, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [105] S. F. D. S. GROTH, R. G. WEBSTER, and A. DATYNER, “Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 71, pp. 377–391, 1963.
- [106] H. BLUM, H. BEIER, and H. J. GROSS, “Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels,” *Electrophoresis*, vol. 8, no. 2, pp. 93–99, 1987.
- [107] G. N. MURSHUDOV, A. A. VAGIN, and E. J. DODSON, “Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method,” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 53, no. 3, pp. 240–255, 1997.
- [108] G. N. MURSHUDOV, P. SKUBÁK, A. A. LEBEDEV, N. S. PANNU, R. A. STEINER, R. A. NICHOLLS, M. D. WINN, F. LONG, and A. A. VAGIN, “Refmac5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- for the refinement of macromolecular crystal structures,” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 67, no. 4, pp. 355–367, 2011.
- [109] P. EMSLEY, B. LOHKAMP, W. SCOTT, and K. COWTAN, “Features and development of coot,” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 66, no. 4, pp. 486–501, 2010.
- [110] G. S. D. OLIVEIRA, “Expressão heteróloga do gene de celobiohidrolase (cbh 1.2) do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*,” Master’s thesis, Universidade Federal de Goiás, 2007.
- [111] C. C. PROJECT, “The ccp4 suite: Programs for protein crystallography,” *Acta Cryst*, vol. D50, no. 4, pp. 760–763, 1994.
- [112] A. J. MCCOY, R. W. GROSSE-KUNSTLEVE, P. D. ADAMS, M. D. WINN, L. C. STORONI, and R. J. READ, “Phaser crystallographic software,” *Journal of Applied Crystallography*, vol. 40, no. 4, pp. 658–674, 2007.
- [113] J. CHEETHAM, P. ARTYMIUK, and D. PHILLIPS, “Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy: Hen egg-white lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Å resolution,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 224, no. 3, pp. 613–628, 1992.