

Expressão, purificação e ensaios de cristalização de celulasas fúngicas

Orientadora: Dra. Camila Ramos dos Santos

Laboratório Nacional de Biociências - LNBio

A celulose, composto orgânico mais abundante na face da Terra, é um polímero de centenas a milhares de unidades glicosídicas unidas por ligações β -1,4. As cadeias de celulose são lineares e estendidas sendo que as hidroxilas livres de uma cadeia fazem ligações de hidrogênio com as hidroxilas da outra cadeia, formando microfibrilas. A celulose contém regiões amorfas e regiões cristalinas, dependendo do padrão de interações, e é altamente resistente à temperatura, força mecânica e hidrólise. As celulasas são enzimas que clivam as ligações β -1,4 da celulose. Elas podem ser produzidas por plantas, participando da formação e remodelamento da parede celular, e por bactérias e fungos, com intuito de despolimerizar a cadeia de celulose. As celulasas são de vários tipos e elas operam sinergisticamente para a hidrólise da celulose. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivam regiões internas da cadeia, liberando cadeias menores; as exoglucanases (EC 3.2.1.91 – também denominadas celobiohidrolases) clivam extremidades das cadeias, produzindo o dissacarídeo celobiose; e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21 – também denominadas celobiasas) clivam a celobiose, produzindo glicose.

As celulasas têm uma gama de aplicações industriais, como na indústria alimentícia para produção de sucos de fruta, vinho e café; na indústria têxtil para processamento das fibras de algodão, finalização do produto (stoning) e em detergentes para lavagem; na indústria de papel e polpa para descoloração e modificação das fibras; na indústria de ração animal para melhorar a digestibilidade de produtos derivados de plantas, entre outros. Uma aplicação tecnológica que vem sendo atualmente estudada é na produção do bioetanol de segunda geração, impulsionada pela busca por fontes alternativas de energia. Enquanto o

etanol de primeira geração é produzido a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, o de segunda é produzido a partir de biomassa lignocelulósica. Para isso, é necessário o prévio tratamento da biomassa, para hidrólise da parede celular vegetal e liberação dos açúcares fermentáveis. Nesse caso, além das celulases, uma gama de outras enzimas é empregada, devido à variedade de polissacarídeos que compõem a parede celular. Essa abordagem permite a utilização de diversas fontes vegetais para produção de etanol, incluindo, por exemplo, a palha e o bagaço de cana-de-açúcar.

Para este trabalho foram escolhidas as seguintes enzimas: endoglucanases A e B de *Aspergillus nidulans*, endoglucanase 1 de *Penicillium echinulatum*, celobiohidrolase e β -glicosidase de *Humicola grisea* var *thermoidea*. O objetivo deste trabalho é a expressão, purificação e cristalização de pelo menos uma dessas proteínas. Com esses resultados, poderá ser feita realizada a determinação da estrutura da proteína. Esse tipo de trabalho contribui para o conhecimento mais aprofundado sobre as celulases, permitindo seu melhoramento do ponto de vista de eficiência e estabilidade. Com isso, será possível reduzir os custos com hidrólise, viabilizando a produção do etanol de segunda geração.

A seqüência de DNA que codifica cada uma dessas enzimas foi previamente clonada em vetor pET28a, o que levará à expressão da proteína em fusão com uma cauda de histidinas. O aluno de iniciação científica irá realizar os testes de expressão em cepas de *Escherichia coli* em diferentes condições; purificar as proteínas obtidas na fração solúvel por métodos cromatográficos, incluindo cromatografia de afinidade a metal imobilizado, de troca iônica e de exclusão molecular; realizar ensaios de cristalização com as proteínas obtidas na forma pura, usando o método de difusão de vapor. Tendo-se obtido cristais de qualidade, dados de difração de raios X serão coletados (LNLS) para a determinação da estrutura. A estrutura será analisada a fim de se propor os determinantes estruturais para eficiência e estabilidade, demonstradas através de estudos funcionais em andamento.