

JOSÉ CARLOS DE OLIVEIRA FILHO

**DOMÍNIOS FUNCIONAIS EM Cel9B DE *Thermobifida fusca* E  
PROSPECÇÃO DE CELULASES BACTERIANAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

JOSÉ CARLOS DE OLIVEIRA FILHO

**DOMÍNIOS FUNCIONAIS EM Cel9B DE *Thermobifida fusca* E  
PROSPECÇÃO DE CELULASES BACTERIANAS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de abril de 2011.

---

Prof. Arnaldo Chaer Borges  
(Coorientador)

---

Prof. Rodrigo Pires do Nascimento  
(Coorientador)

---

Prof<sup>a</sup> Maria Cristina Baracat-Pereira

---

Pesq. Inês Helena Tristão de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

"Lâmpada para os meus pés é tua palavra, e luz para o meu caminho."

Salmos 119:105

Dedico aos meus pais, José Carlos e Selma, familiares e mestres, por terem ensinado-me o caminho e serem os responsáveis por esta conquista.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sido meu auxílio nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, José Carlos de Oliveira e Selma Aparecida Silva de Oliveira, pelo amor incondicional, e por todo esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus queridos irmãos, Juerly Israel de Oliveira Reis e Jalom Calebe de Oliveira Silva, pelo amor e companheirismo; e ao meu sobrinho, Arthur Lopes Reis, pela admiração.

Aos meus avós Antônio Eduardo, Maria Aparecida, José Reis (*in memoriam*) e Branca Luciano, pelo amor e cuidado.

Aos demais familiares que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial à minha prima querida, Luciana, que me acompanhou “de perto” em Viçosa nos últimos anos.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV, e ao seu Departamento de Microbiologia pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Célia Alencar de Moraes que, nestes 10 anos de convivência, incentivou-me de maneira ímpar e demonstrou como levar minha profissão de maneira ética, compromissada e séria.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges pela constante presença e valiosos ensinamentos ao longo da minha formação.

Aos professores Maurício Dutra Costa e Rodrigo Pires do Nascimento, pelos aconselhamentos durante o trabalho.

À professora Maria Cristina Baracat-Pereira e à Dra. Inês Helena Tristão de Oliveira, pela participação na banca examinadora da tese.

Ao professor David B. Wilson e à Diana Irwin, da Universidade de Cornell, pela oportunidade concedida nos Estados Unidos e pelos exemplos a serem seguidos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia da UFV, pelo ambiente científico rico e diverso.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial: Alessandra, Ana Paula, Andressa, Eliana, Gabriel, Marcelo, Marta, Margarete e Thiago, por toda ajuda e incentivo, e também aos amigos de Ithaca: Anthony, Ashwana, Erin, Maxim, Lei, Thu e Ya, pela convivência.

Aos amigos de longa data Uelinton e Esther, por me receberem em Ithaca e por me ajudarem em tudo que foi necessário.

À equipe de trabalho BIOMM Bioetanol, Bárbara, Dayane, Helberth Layane, Maria Lúcia e Mariana, pelo incentivo na correção deste trabalho.

Aos irmãos da Igreja Cristã Maranata das cidades de Viçosa e Montes Claros, em Minas Gerais e da cidade de Rochester, em Nova Iorque, pelas orações e por serem extensão da minha família.

Em especial, à Alessandra Gonçalves Melo por me tornar uma pessoa melhor, por todo amor e pela compreensão.

## BIOGRAFIA

JOSÉ CARLOS DE OLIVEIRA FILHO, filho de José Carlos de Oliveira e Selma Aparecida Silva de Oliveira, nasceu em 30 de Abril de 1981, em Coronel Fabriciano, Estado de Minas Gerais.

Em Fevereiro de 2000, iniciou o Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, tornando-se bacharel em Janeiro de 2004.

Ainda em 2004, ingressou no Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em Outubro de 2006.

Também em Outubro de 2006, iniciou o seu curso de Doutorado no mesmo Programa e Universidade. Esteve em *Cornell University* para um programa de Estágio no Exterior, no período de Julho de 2009 a Outubro de 2010. Sua defesa de Tese ocorreu em 18 de Abril de 2011.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Linhagens e plasmídeos utilizados .....	13
3.2. Obtenção dos variantes derivados de E1 .....	13
3.3. Confirmação da sequência de DNA.....	17
3.4. Análise da expressão da enzima.....	18
3.5. Produção, extração, separação e purificação das enzimas obtidas .....	19
3.5.1. Enzimas com peptídeo sinal para secreção extracelular ...	19
3.5.2. Enzimas com cauda de histidina no terminal carboxílico ...	20
3.6. Espectrometria de massa .....	21
3.7. Atividade enzimática de E1 e seus variantes.....	22
3.8. Ensaio de ligação enzima/substrato.....	23
3.9. Modelagem molecular e validação do modelo .....	24
3.10. Isolamento de bactérias celulolíticas .....	25
3.11. Prospecção de celulasas no banco de bactérias .....	25
3.12. Amplificação do rDNA 16S.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1. Papel do domínio catalítico e dos dois domínios de ligação a carboidratos, das famílias 2 e 4, presentes em Cel9B provenientes de <i>T. fusca</i> .....	27

4.1.1. Obtenção da enzima tipo selvagem e formas variantes....	27
4.1.2. Atividade enzimática de E1 e seus variantes.....	34
4.1.3. Ensaio de ligação aos substratos de E1 e seus variantes	41
4.1.4. Modelo da estrutura tridimensional gerado para CBM4 de <i>T. fusca</i> .....	45
4.2. Diversidade de atividade celulolítica em bactérias isoladas de mata de eucalipto e mata do Belvedere.....	49
4.2.1. Banco de bactérias celulolíticas.....	49
5. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## RESUMO

OLIVEIRA FILHO, José Carlos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011. **Domínios funcionais em Cel9B de *Thermobifida fusca* e prospecção de celulases bacterianas.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Coorientadores: Arnaldo Chaer Borges, Maurício Dutra Costa e Rodrigo Pires do Nascimento.

*Thermobifida fusca* Cel9B, também denominada de E1, é uma endoglucanase muito ativa sobre carboxi-metil celulose. É composta pelo domínio catalítico (CD) da família 9 ligado a um domínio de ligação a carboidrato da família 4 (CBM4), seguido por um domínio tipo imunoglobulina na extremidade amina e um domínio de ligação a carboidrato da família 2 (CBD2), ligado ao CD por um linker na extremidade carboxílica da proteína. Para estudar o papel do domínio catalítico e dos dois domínios de ligação a carboidratos presentes nessa enzima, foram construídas três formas variantes, clonadas e expressas em *Escherichia coli*. As massas moleculares de E1 e suas formas variantes foram determinadas por espectrometria de massa, e os valores obtidos foram correspondentes àqueles preditos *in silico* a partir da sequência de DNA. A enzima tipo selvagem e suas formas variantes foram purificadas e ensaios enzimáticos e de ligação foram realizados sobre vários substratos. O domínio catalítico mostrou as maiores atividades sobre os substratos celulósicos, porém a presença de CBD2 melhorou seu desempenho enzimático sobre celulose microcristalina e celulose amorfa tratada com ácido fosfórico, substratos nos quais detectou-se ligação de CBD2. Adicionalmente, a presença desse domínio auxiliou na degradação de xiloglucana. CBD2 apresentou ligação a  $\alpha$ -quitina, porém E1 não possui atividade sobre esse polímero. CBM4 interferiu negativamente na degradação dos substratos celulósicos e também xiloglucana porque sua presença diminuiu a atividade enzimática nesses casos. Por outro lado, a presença de CBM4 melhorou o desempenho enzimático do CD de Cel9B sobre xilana, porém sua ligação a esse substrato não foi detectada. O alinhamento de membros da família de CBM4 de *Cellulomonas fimi*, *Thermotoga maritima* e *T. fusca* mostrou que resíduos

de aminoácidos aromáticos envolvidos na ligação ao substrato estão presentes em posições conservadas em E1 e o modelo gerado para sua estrutura mostrou região potencial para ligação de substrato. Neste trabalho foi obtido também um banco de bactérias celulolíticas provenientes do solo da mata do Belvedere, crescimento secundário de mata Atlântica, e do solo de mata de eucalipto, plantada na mesma região. O meio ágar arginina glicerol foi o mais eficaz para o isolamento de bactérias celulolíticas a partir do solo de mata do Belvedere ou mata de eucalipto, porém o meio ágar extrato de solo demonstrou um maior potencial para isolamento de microrganismos diversos, uma vez que proporcionou o crescimento exacerbado de fungos, não presentes nas mesmas condições nos outros meios. Os isolados mostraram diversidade de características macro e microscópicas, sendo em sua maioria organismos Gram positivos, e das 317 bactérias isoladas, 57 foram detectadas como produtoras de celulases pelo teste de celulose azure. O isolado 103 possui o conjunto de celulases mais ativas contra esse substrato, nas condições testadas. Este isolado é o candidato para continuação dos estudos nesta linha de pesquisa no laboratório de Microbiologia Industrial da Universidade Federal de Viçosa. A diversidade de enzimas celulolíticas obtidas pode propiciar o uso de seus determinantes genéticos em evolução direcionada às características requeridas para processos industriais de bioconversão de resíduos celulósicos.

## ABSTRACT

OLIVEIRA FILHO, José Carlos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2011. **Functional domains in *Thermobifida fusca* Cel9B and prospecting for bacterial cellulases.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges, Maurício Dutra Costa and Rodrigo Pereira Nascimento.

*Thermobifida fusca* Cel9B, also known as E1, is a very active endoglucanase against carboxymethyl cellulose. The enzyme is comprised of several domains as follows: a catalytic domain (CD) which belongs to the family 9, a family 4 carbohydrate binding domain (CBD) followed by an Ig-like domain linked to CD in the N-terminus, and finally in the C-terminus, a family 2 CBD linked to the CD via a linker. To study the carbohydrate binding domains, 3 mutant genes of Cel9B were constructed, cloned, and expressed in *Escherichia coli*. The molecular weights of the native and the variant forms of E1 were determined by mass spectrometry, and the values are in good agreement with those predicted from the DNA sequence. The activity and binding capabilities of purified native and mutant enzymes were assayed against several substrates. The catalytic domain showed the greatest activities against cellulosic substrates, however CBD2 improved its performance against microcrystalline cellulose and phosphoric acid swollen cellulose, substrates that showed binding to CBD2. Additionally, the forms containing CBD2 showed better enzymatic performance against xyloglucan. CBD2 was able to bind to  $\alpha$ -chitin, even though E1 did not show any activity against this polymer. CBM4 interfered negatively on the degradation of cellulosic substrates and also of xylocan, as the enzyme constructs that contained this domain decreased the enzymatic activities. On the other hand, CBM4 improved CD enzymatic performance of E1 against xylan albeit the binding to this substrate was not detected. The alignment of CBM4 sequences from *Cellulomonas fimi*, *Thermotoga maritima* and *T. fusca* showed that aromatic amino acid residues involved in ligand binding are present in conserved positions in this domain in E1 and the model generated for its structure showed a putative region for ligand binding. Also in this work, we obtained a cellulolytic bacterial collection from Belvedere forest soil, a

secondary growth of Atlantic forest, and from eucalyptus forest soil, planted in the same region. The medium arginine glycerol agar was the best to isolate cellulolytical bacteria either from Belvedere forest or from eucalyptus forest, but the soil extract agar demonstrated the best potential to isolate diverse microorganisms as it was observed exacerbated fungi growth, not seen in the same conditions in the other media. The isolated bacteria showed diversity of macro and microscopic characteristics, with the majority being Gram positive microorganisms. From the 317 isolated bacteria, 57 were detected as cellulase producers by the cellulose azure test, with isolate 103 having the most active cellulases against this substrate, under the tested conditions. This isolate is a strong candidate for further studies in this research line in the Industrial Microbiology laboratory at Federal University of Viçosa. The diversity of cellulolytic enzymes seen in this work may be used in directed evolutionary studies towards developing desired characteristics in industrial processes for the bioconversion of cellulosic residues.

## 1. INTRODUÇÃO

A escassez das reservas de combustíveis fósseis impulsionou a comunidade científica, nos últimos anos, a buscar novas tecnologias que possam suprir a demanda energética mundial futura. Mesmo que novas jazidas de Petróleo possam estender em alguns anos a disponibilidade deste combustível para o mundo, há uma especulação que sua exaustão ocorra até o ano de 2050.

Diante disso há uma necessidade de iniciativas políticas, com o investimento de capital público e privado, para desenvolver substituintes do Petróleo que sejam economicamente viáveis, a fim de sustentar as atividades onde serão empregados. Muito provavelmente aqueles países que conseguirem organizar uma matriz energética de maneira eficiente terão seu desenvolvimento econômico e social garantidos.

Em adição às questões políticas e econômicas, existe uma preocupação ambiental para que esta transição possa ser feita com o uso de tecnologias limpas. Este novo cenário mundial é formado com a discussão de ambientalistas e a pressão da sociedade para escolha de alternativas que permitam reduzir a emissão de gases do efeito estufa. Assim sendo, o desenvolvimento de novas formas de energia pode trazer reflexos importantes na qualidade de vida das próximas gerações, pois pode estabelecer uma sociedade mais sustentável do ponto de vista ecológico, além da geração de novos empregos, com a criação de um setor industrial.

A queima de combustíveis fósseis libera significantes quantidades de CO<sub>2</sub>, o principal gás envolvido no efeito estufa. Desse modo, o carbono fóssil é transferido para a atmosfera à medida em que esses combustíveis são utilizados. Por isso, a produção de energia a partir da biomassa pode ser vista como uma prática que atenua este processo porque o carbono resultante de sua queima tem sua origem na atmosfera recente. O benefício líquido desta prática é igual à quantidade de carbono que seria emitida pela queima do combustível fóssil menos qualquer emissão derivada do processo de produção do biocombustível.

Entretanto, maiores reduções no impacto ecológico provocado pela geração e o consumo de energia serão alcançadas por meio do desenvolvimento de uma matriz polifásica, com várias estratégias que incluem energia geotérmica, das marés, solar, eólica, hídrica, nuclear e de biomassa. Dentre estas, a biomassa destaca-se por ser a única fonte renovável de energia capaz de produzir combustível baseado em cadeia carbônica, e por isto necessita de desenvolvimento biotecnológico.

Atualmente, já existem modelos industriais que buscam dominar tecnologias envolvidas na conversão da biomassa em matéria prima, para produção de energia e/ou de produtos químicos de alto valor agregado. Estas indústrias denominadas de biorrefinarias se preocupam principalmente com mínimos gastos e emissões de poluentes. Têm o potencial de promover o crescimento econômico sustentável porque podem utilizar resíduos orgânicos urbanos, agroflorestais e industriais como matéria-prima para geração de energia.

Neste contexto, o Brasil encontra-se em posição privilegiada devido às suas altas produtividades agrícola e industrial, geradoras de resíduos que podem ser utilizados como substrato por estas empresas. Além disso, possui disponibilidade de recursos naturais e clima favorável para produção de biomassa com finalidade específica de produção de energia, sem comprometer o setor de produção de alimentos. O fato de o país ter sido o pioneiro mundial, na década de 70, na produção de biocombustíveis, estimulou o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o aproveitamento dos resíduos gerados por esta atividade, ou seja, dos carboidratos complexos presentes na parede celular desses vegetais. Logo, as pesquisas relacionadas ao etanol celulósico têm sido realizadas, em sua maioria, para o aproveitamento da biomassa da cana-de-açúcar, fonte primária de açúcar no processo fermentativo. No entanto, há a possibilidade de expansão da biomassa vegetal aproveitável, por meio da pesquisa que capacite a hidrólise da parede celular de plantas de outras culturas já estabelecidas e amplamente cultivadas no país.

Uma tomada de decisão ambiciosa e fora de qualquer paradigma é necessária para que o Brasil possa aproveitar o seu potencial de produção de biomassa no setor energético. A obtenção de celulases com as

características requeridas para processos industriais de bioconversão de resíduos celulósicos, como os de excedentes da exploração industrial do eucalipto, representa um dos principais desafios da pesquisa para viabilizar processos de implantação de biorrefinarias. Dados recentes comprovam o potencial que o eucalipto possui para produção de biocombustíveis. A composição de sua casca possui o dobro de açúcares fermentáveis e menor número de pentoses inibitórias ao processo de fermentação, em relação ao bagaço da cana.

A proposta deste trabalho é de complementar esforços para o aproveitamento da incrível adaptação do eucalipto em clima e solo brasileiros, com a finalidade de produzir biocombustíveis e outras biomoléculas a partir desta biomassa. Os produtos finais obtidos a partir da biomassa degradada podem, eventualmente, substituir aqueles obtidos pela indústria química, de uma maneira geral, impactando de maneira positiva a qualidade de vida da população mundial pelo uso de tecnologias ambientalmente limpas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A celulose, um homopolissacarídeo linear composto de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4), é a biomassa mais abundante da natureza (Feng et al., 2007). Embora altamente cristalina, a estrutura da celulose não é uniforme, apresentando regiões menos ordenadas denominadas de paracristalinas ou amorfas (Hon, 1994). Naturalmente, as fibras de celulose têm uma orientação paralela, com todos os terminais reduzidos da cadeia voltados para a mesma extremidade do cristal (Gardner e Blackwell, 1974) e são envolvidas por outros polímeros tais como lignina e hemiceluloses. A lignina é uma estrutura polifenólica complexa, de difícil degradação, enquanto as hemiceluloses são polissacarídeos não-celulósicos, incluindo xilanas, mananas e glucanas (Martins et al., 2008; Kumar et al., 2008), constituídos de xilose, manose e glicose, respectivamente.

A importância da hidrólise da celulose no contexto da conversão da biomassa de plantas para a produção de biocombustíveis e de outros compostos é bem reconhecida (Hahn-Hägerdal et al., 2006; Sticklen, 2008; Rubin, 2008). Contudo, a degradação enzimática desta fração ainda representa um gargalo no processo de produção sustentável de energia de segunda geração, em razão do alto custo da conversão do material lignocelulósico e das limitações impostas ao processo enzimático (Himmel, et al., 2007; Kumar et al., 2008). Além disso, o aproveitamento da biomassa celulósica é dificultado pela presença dos demais polímeros citados acima e também porque a parede celular vegetal possui estrutura, configuração e composição variadas, dependendo do grupo taxonômico ao qual as plantas pertencem, do tipo e da idade celular (Lynd et al., 2002; Bothast e Schlincher, 2005; Ding e Himmel, 2006).

Na natureza, a degradação enzimática da celulose desempenhada pelos microrganismos é um mecanismo fundamental para a conversão de biomassa e ciclagem do carbono na biosfera (Himmel et al., 1997). Adicionalmente, as plantas estão sujeitas à ação de patógenos capazes de

romper a barreira da parede celular, para invadir outros tecidos celulares. Por esse motivo, durante o processo de evolução, as plantas evoluíram propriedades estruturais e químicas que dificultam a degradação de sua parede celular por ação enzimática, resultante da atividade de microrganismos patogênicos ou degradadores de matéria orgânica (Himmel et al., 2007).

O estudo das estratégias utilizadas por microrganismos na degradação da celulose em nichos distintos tem contribuído para ampliar o conhecimento sobre a diversidade de enzimas envolvidas no processo de sacarificação. A prospecção de novas proteínas e genes codificadores de celulasas tem sido realizada em ecossistemas distintos, tais como: florestas (Saadoun et al., 2007), pilhas de compostagem (Mayende, et al., 2006), árvores em decomposição (Rivas et al., 2003), silagem mofada (Yu et al., 2007), e entre os habitantes do aparelho digestório de peixes (Ray et al., 2010), coelhos (Feng et al., 2007) e cupins (Brune, 2007).

Muitas dessas estratégias têm utilizado a abordagem metagenômica, proporcionando uma visão holística da diversidade genética, da composição das espécies, suas relações filogenéticas e seu significado ecológico (Furrie, 2006; Gill et al., 2006; Martín et al., 2006; Whitham et al., 2006). Além disso, os trabalhos de prospecção podem levar à descoberta de novas enzimas ou outras moléculas bioativas com potencial de aplicação e inovação na indústria biotecnológica (Lorenz et al., 2002; Lee et al., 2004; Langer et al., 2006; Schmeisser et al., 2007). O isolamento e a caracterização de novas celulasas provenientes de *Bacteria* têm sido amplamente explorados recentemente porque bactérias possuem frequentemente enzimas mais complexas, organização genética simplificada e maiores taxas de crescimento em relação aos fungos. Além disso, as bactérias ocupam uma ampla variedade de nichos ambientais e industriais, evoluindo linhagens celulolíticas extremamente resistentes aos estresses ambientais (Maki et al., 2009).

O modelo clássico para a degradação da celulose desempenhado por microrganismos aeróbios foi estabelecido com base no sistema enzimático secretado por *Trichoderma reesei* (Martinez et al., 2008). O processo de degradação da celulose contempla a ação sinérgica de três tipos de enzimas

livres no meio, denominadas genericamente de celulases. O modelo propõe que as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) atuem em regiões amorfas das fibras, criando sítios para as celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91) agirem em regiões cristalinas das fibras, produzindo celobiose. O terceiro tipo, as  $\beta$ -glicosidases, (E.C. 3.2.1.21) clivam a celobiose em duas moléculas de glicose e evitam assim a inibição das celobiohidrolases pelo produto final (Béguin, 1990; Hahn-Hägerdal et. al., 2006; Himmel et. al., 2007; Kumar et. al., 2008; Ximenes et al., 1996).

As celulases são reunidas em um banco de dados denominado CAZy, *Carbohydrate Active Enzymes*, entre as 120 famílias estabelecidas para Glicosil-hidrolases. Encontram-se classificadas em 14 famílias (5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 61 e 74), com base nas sequências de aminoácidos que formam o domínio catalítico dessas enzimas. Em uma mesma família, todos os membros apresentam basicamente o mesmo dobramento protéico, mas suas especificidades por substratos podem ser diferentes. Por exemplo, as famílias 10, 26, 51 e 74 contêm principalmente outros tipos de Glicosil-hidrolases, porém alguns membros possuem atividade de celulases (Wilson, 2008). As demais famílias possuem em sua maioria membros com atividade celulolítica, porém as informações disponíveis nesse banco de dados são continuamente atualizadas e reanalisadas, de modo que novas famílias são frequentemente expandidas ou criadas (Henrissat 1991, 1998; Henrissat e Coutinho, 2001; Cantarel et al., 2009).

A hidrólise de ligações glicosídicas acontece via catálise geral ácida, na qual há o requerimento da participação de um resíduo catalítico ácido, que desempenha o papel de doador de próton, e de outro resíduo catalítico básico, que atue como nucleófilo (Sinnott 1990). Essa hidrólise ocorre por meio de dois mecanismos principais, que levam à retenção ou à inversão da configuração anomérica do carbono no ponto de clivagem (Davies e Henrissat, 1995). A diferença entre estes dois mecanismos está no posicionamento do resíduo catalítico básico, mais distante do substrato em enzimas que causam inversão. Como resultado, uma molécula de água é acomodada entre o resíduo básico e o açúcar, que ao ser ativada pelo nucleófilo, ataca o carbono anomérico do carboidrato rompendo a ligação

glicosídica, com conseqüente e simultânea protonação do resíduo ácido. No mecanismo de retenção, ocorre o ataque nucleofílico do carbono anomérico feito pelo resíduo básico, seguido da desprotonação do resíduo catalítico ácido, pelo ataque nucleofílico feito pelo par de elétrons da ligação glicosídica, rompendo assim essa ligação (McCarter e Withers, 1994). Em uma família de Glicosil-hidrolases, o mecanismo de retenção ou inversão é conservado em todos os seus membros, sem exceção conhecida (Henrissat 1998; Cantarel et al., 2009).

Todas as enzimas classificadas como endocelulases que tiveram suas estruturas determinadas possuem o domínio catalítico aberto, como esperado, pelo fato de se ligarem no interior das moléculas de celulose (Juy et al., 1992). Por outro lado, todas as exocelulases possuem o sítio ativo dentro de uma cavidade que atravessa a molécula, consistente com a atividade processiva demonstrada por essas enzimas (Rouvinen et al., 1990). O acúmulo das informações sobre a estrutura tridimensional nas diversas famílias de celulases permitiu o agrupamento das enzimas relacionadas em um nível hierárquico mais alto. Os clãs estabelecidos possuem conservados o dobramento protéico, a maquinaria catalítica, o mecanismo catalítico e a estereoquímica do substrato (Henrissat et al., 1995; Henrissat e Davies 1997; Rabinovich et al., 2002).

Além do domínio catalítico diretamente envolvido na clivagem da ligação glicosídica, as celulases apresentam domínios de ligação ao substrato que são responsáveis pela adsorção da enzima à celulose. (Bolam et al., 1998). Na degradação de celulose, o entendimento deste mecanismo é fundamental por se tratar de um substrato insolúvel, requerendo a ação de enzimas hidrofílicas com afinidade e reatividade na interface substrato/enzima. O desempenho das enzimas está intimamente relacionado ao processo de adsorção e à presença de substâncias não reativas no meio, como a lignina (Xu et. al., 2008).

Quando as enzimas são testadas contra substratos solúveis, de baixo peso molecular, seguem a cinética de Michaelis-Menten. Entretanto, quando ensaios são realizados com o uso de celulosas insolúveis, as propriedades enzimáticas são muito diferentes, devido à heterogeneidade deste substrato. Neste caso, as celulases não demonstram uma cinética de Michaelis-

Menten, apesar de haver um aumento da atividade com o aumento da concentração do substrato (Wilson e Irwin, 1999).

Os domínios de ligação à celulose têm um importante papel na conversão da biomassa, porque geralmente favorecem a ocorrência da atividade enzimática (Irwin et al., 1998; Tomme et al., 1995). Há indícios que alguns desses domínios são capazes de alterar a estrutura da celulose e da quitina, aumentando assim a acessibilidade ao substrato (Din et al., 1991; Gao et al., 2001; Vaaje-kolstad et al., 2005). Em geral, a interação com o substrato é desempenhada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em posições conservadas, capazes de estabelecer predominantemente interações de van der Waals entre a enzima e o substrato. Em adição, a presença de resíduos de aminoácidos polares possibilita a formação de ligações de hidrogênio com o carboidrato, estabilizando melhor a estrutura (Guillén et al., 2010).

Esses domínios de ligação são frequentemente encontrados em enzimas com atividade sobre carboidratos, mas também podem ser observados independentemente ou como parte dos celulosomos (Boraston et al., 2004, Demain et al., 2005). Atualmente, os domínios são classificados dentre as 59 famílias de módulos de ligação a carboidratos (CBMs), estabelecidas com base na similaridade da sequência de resíduos de aminoácidos apresentada (Cantarel et al., 2009). As famílias de CBMs apresentam especificidades de ligação ao substrato diferenciadas, porém a vasta maioria desses módulos, nas diferentes famílias, dobra-se na forma de sanduíche  $\beta$ , contendo duas folhas  $\beta$  antiparalelas que compõem a superfícies dessas proteínas (Gilbert, 2010).

Embora, em algumas famílias, a ligação do domínio ao substrato *in vitro* ocorra de forma irreversível (Henrissat, 1994; Din et al., 1995), as celulasas *in situ* devem ser capazes de estabelecer um processo dinâmico de adsorção e desorção, permitindo assim a hidrólise processiva e/ou a relocação enzimática para novos locais acessíveis (Linder e Teeri 1997; Jervis et al., 1997; Liu et al., 2009).

Novos processos degradativos foram elucidados com o estudo de outros microrganismos celulolíticos que desempenham papel ecológico similar (Wackett, 2008). Dentre os microrganismos anaeróbios, o sistema

evolvido por *Clostridium thermocellum* tornou-se o modelo. A maioria dos microrganismos celulolíticos anaeróbios produzem grandes complexos multienzimáticos denominados celulosomos, que são fixos à membrana externa dos microrganismos por meio de uma proteína denominada *scaffoldin*. Esta proteína liga-se a proteínas homólogas presentes na camada superficial, em sua extremidade carboxílica, por meio de módulos que se conectam, denominados *coesin* e *dockerin*. A montagem das unidades catalíticas no complexo é feita de maneira similar, por meio da conexão de módulos complementares presentes nas enzimas e ao longo dessa proteína de sustentação. Domínios de ligação à celulose estão presentes separadamente, permitindo a ligação de todo o complexo com o substrato (Maki et al, 2009).

Os actinomicetos têm recebido atenção especial, porque assim como a maioria dos celulolíticos aeróbios são capazes de degradar celulose de maneira similar à dos fungos, organismos produtores da maioria das enzimas comercialmente disponíveis (Béguin, 1990). Além disso, suas celulases apresentam características desejáveis para aplicação biotecnológica, mais vantajosa em relação às celulases fúngicas, tais como alta atividade em temperaturas e pHs extremos (Coelho e Nascimento, 2008). As seqüências dos genomas de vários actinomicetos já foram determinadas (Lee et al., 2006; Lykids et al., 2007; Takarada et al., 2008), totalizando 12 % do total de genomas sequenciados até a presente data (<http://www.genomesonline.org>), e o potencial biotecnológico desses organismos foi confirmado em relação à presença de genes de glicosil-hidrolases (Galperin, 2008).

Dentre os actinomicetos, destaca-se o microrganismo termófilo *Thermobifida fusca*, capaz de crescer bem a 50 °C utilizando celulose como fonte única de carbono. Vários genes já foram identificados, compondo um conjunto complexo de sete celulases, uma xiloglucanase, uma  $\beta$ -(1,3) glucanase, três xilanases e duas quitinases (Lao et al., 1991; Jung et al., 1993; Irwin et al., 1993, 1994; Blanco et al., 1997; Irwin et al., 2000, 2003; Kim et al., 2004; McGrath e Wilson, 2006), além de dois módulos de ligação a carboidratos secretados independentemente (Moser et al., 2008).

Os domínios catalíticos das celulases de *T. fusca* pertencem a quatro diferentes famílias, com dois representantes nas famílias 5 (Cel5A, Cel 5B), 6 (Cel6A, Cel6B) e 9 (Cel9A, Cel9B) e apenas um representante da família 48 (Cel 48A). Cel6B e Cel48A são exocelulases que atuam em terminais não reduzidos e reduzidos dos resíduos de açúcar, respectivamente. As outras proteínas são endoglucanases (Wilson, 2004).

Nos modelos tradicionalmente conhecidos para degradação de celulose, microrganismos aeróbios e anaeróbios utilizam uma endoglucanase processiva central (Brás et al., 2011; Wilson, 2008). Em todos os exemplos bem documentados, essas enzimas processivas são pertencentes à família 9, que é a segunda maior família de celulases ([www.cazy.org](http://www.cazy.org) em 30 de março de 2011). Esta característica é conferida pela presença do domínio de ligação a carboidrato da família 3c, rigidamente ligado ao domínio catalítico da família 9, na extremidade carboxílica da proteína (Sakon et al., 1997). As proteínas que apresentam essa arquitetura modular são classificadas como pertencentes ao tema B. Adicionalmente, a família 9 é subdividida em tema A quando o domínio catalítico não apresenta módulos acessórios; tema C quando não há módulos acessórios mas um domínio tipo imunoglobulina está presente na região do terminal amina e tema D quando ambos estão presentes, ou seja, contêm um domínio tipo imunoglobulina e também pelo menos um módulo de ligação a carboidratos (Gilad et al., 2003).

Em *Clostridium phytofermentans*, a deleção do único gene que codificava uma celulase da família 9 resultou na perda da capacidade de crescimento em celulose. Esse mutante, quando crescido em hemicelulose, apresentou expressão inalterada dos outros genes relacionados à degradação de celulose (Tolonem et al., 2009). Esta foi a primeira evidência descrita que apenas uma única celulase pode ser essencial para a degradação de celulose (Wilson, 2009). Adicionalmente, genes codificadores de endoglucanases processivas, Cel48A e Cel9B, foram identificados como essenciais em *Ruminococcus albus* para a degradação de celulose (Devillard et al., 2004).

O estudo das árvores filogenéticas revela que a capacidade celulolítica é amplamente distribuída entre muitos gêneros do domínio

*Bacteria*, com uma considerável concentração em membros da ordem *Actinomycetales* e *Clostridiales*, ao contrário de uma distribuição homogênea apresentada pelos diferentes grupos de fungos, no domínio *Eucarya*, presente desde as ordens mais primitivas como as dos *Chytridiomycetes*, até as mais derivadas, como as dos *Basidiomycetes* (Lynd et al., 2002). Há indícios que *Archaea* apresenta este potencial genético completamente diferente do conhecido até o momento, tendo em vista a ausência de glicosil-hidrolases no genoma de *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997), um organismo capaz de fermentar glicose e hidrolisar amido (Henrissat e Coutinho, 2001). A análise dos genomas de *Cytophaga hutchinsonii*, *Fibrobacter succinogenes* e *Postia placenta* evidenciou novas estratégias adotadas pelos microrganismos para degradar celulose.

*C. hutchinsonii* e *F. succinogenes* são organismos Gram negativos, filogeneticamente relacionados, aeróbios e anaeróbios, respectivamente, que apresentam forte capacidade de adesão à fibra de celulose, porém não possuem genes que codificam celulasas processivas, nem proteínas essenciais para montagem dos celulosomos. Adicionalmente, a maioria das celulasas codificadas são endoglucanases sem domínios de ligação ao substrato (Xie et al., 2007; Zverlov e Schwarz, 2008). Um possível mecanismo, similar ao demonstrado por *Bacteroides thetaiotaomicron* para degradar amido, foi proposto devido à presença de genes homólogos a esse sistema nessas bactérias. Dessa maneira, ocorreria o transporte das fibras de celulose para o periplasma, com o auxílio de proteínas na membrana externa (Wilson, 2008, 2009).

No fungo *P. placenta*, exocelulasas e domínios de ligação a carboidratos são ausentes. Quando cultivado em celulose como fonte única de carbono, expressa uma única endoglucanase e várias hemicelulasas, além de regular positivamente a expressão de redutases e oxidases potencialmente envolvidas na geração de  $Fe^{2+}$  e  $H_2O_2$ . Esses produtos gerados podem então reagir, formando radicais hidroxil que são oxidantes altamente reativos, capazes de despolimerizar a celulose (Martinez et al., 2009)

Além da geração de conhecimentos que possam ser aproveitados pela indústria para resolver problemas e nortear direções estratégicas, o

estudo de celulases de origem bacteriana mostrou a ocorrência de famílias de celulases bacteria- e/ou fungo-específicas. Como a diversidade no coquetel enzimático leva a uma degradação mais eficiente da biomassa, é possível que, no futuro, sua composição sejam híbrida, ou seja, terá a presença de enzimas de origem fúngica e bacteriana.

A denominada região de mata Atlântica constitui um dos 6 biomas continentais do Brasil em que a diversidade biológica e o potencial biotecnológico continuam praticamente inexplorados, especialmente quanto à prospecção de genes codificadores de celulases e proteínas com atividade celulolítica. Atualmente, há uma expectativa de que a prospecção nesse bioma possa revelar a existência de novos genes, enzimas e metabólitos bioativos associados à existência de uma rica diversidade de organismos ainda não explorados nesse ambiente. Portanto, tornam-se importantes as atividades de prospecção de novos determinantes genéticos de origem bacteriana, relacionados à degradação de biomassa.

Este trabalho teve como objetivo elucidar o papel dos módulos de ligação ao carboidrato pertencentes às famílias 2 e 4, presentes em Cel9B, proveniente de *Thermobifida fusca*. Para isto, diferentes formas dessa proteína foram produzidas em *Escherichia coli*, com a deleção de CBD2 ou CBM4 ou ambos, além do tipo selvagem. Ensaios de atividade enzimática e de ligação dessas proteínas e suas formas variantes foram realizados em diferentes substratos. Adicionalmente, trabalhos de prospecção de celulases foram realizados em área de crescimento secundário de mata Atlântica e regiões próximas plantadas com eucalipto, com o intuito de acessar a diversidade dos determinantes genéticos de celulases presentes em bactérias, especialmente em actinomicetos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens e plasmídeos utilizados.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Stratagene) foi utilizada como hospedeira para replicação e obtenção do DNA plasmidial, de acordo com instruções do fabricante. *Streptomyces lividans* TKM31 e o vetor *shuttle* pIJ702, com algumas modificações, foram utilizados para expressar E1 tipo selvagem anteriormente (Irwin et al., 1993). *E.coli* BL21 RPIL DE3 (Stratagene) e o vetor pET-26b+ (Novogene) foram utilizados para expressar E1 tipo selvagem e suas formas variantes.

#### 3.2. Obtenção dos variantes derivados de E1.

A sequência original do DNA que codifica E1 tipo selvagem foi inserida no vetor pET 26b+ e denominada pJZ1. Apenas o códon de início, GTG em *T. fusca*, foi trocado para ATG em *E. coli*. Esta construção de 9.026 pb (Figura 1) foi obtida anteriormente e serviu como molde para o desenho dos primers, utilizando-se o programa Lasergene PrimerSelect (DNASTAR), para obtenção dos variantes (Tabela 1).

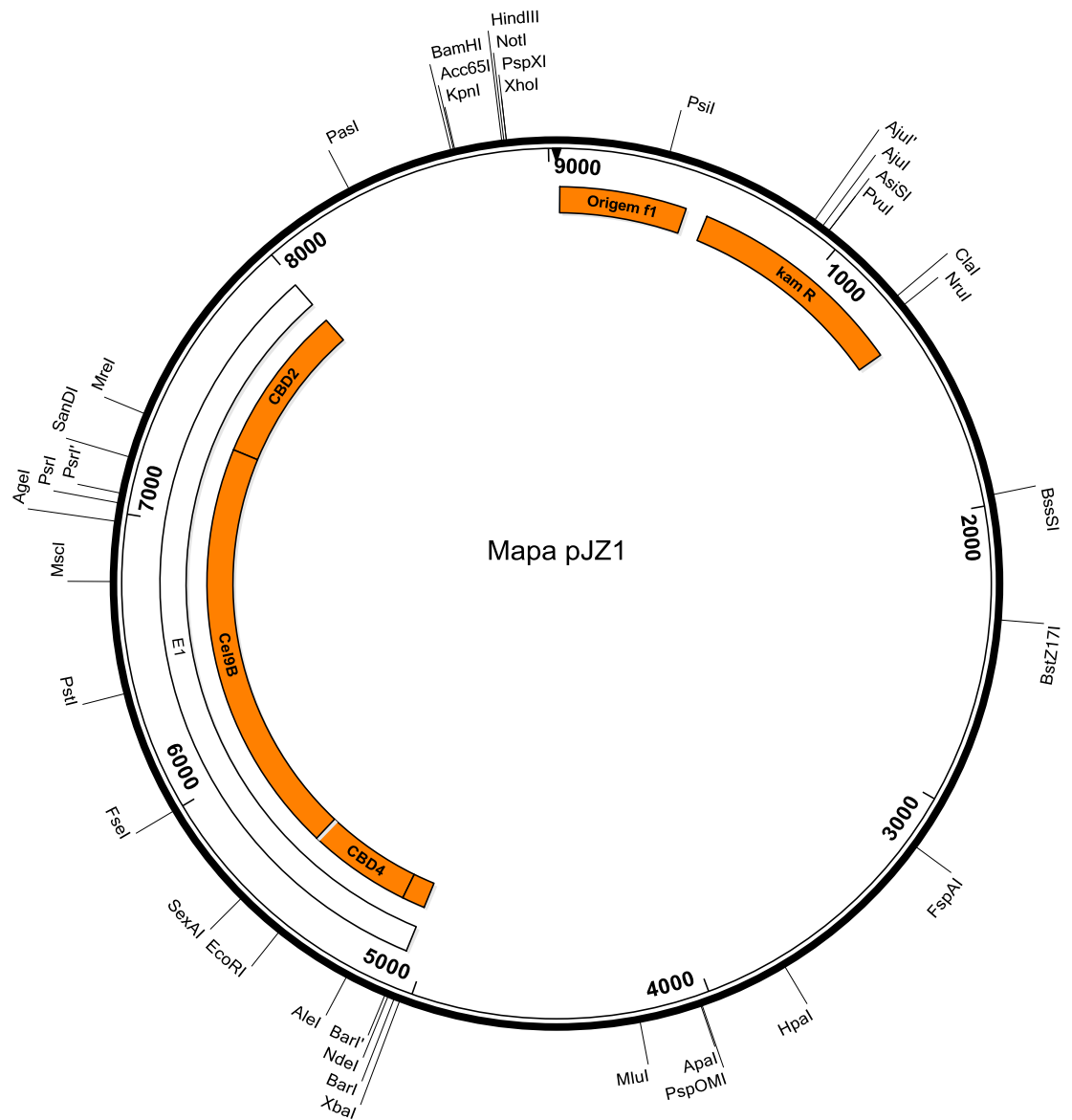


Figura 1: Mapa genético de pJZ1, obtido pela inserção de E1 em pET26b+ nos sítios *NdeI* e *BamHI*. CBM4 (domínio de ligação a celulose família 4), Cel9B (domínio catalítico da enzima) e CBD2 (domínio de ligação a celulose família 2) são domínios da celulase *cel9b* de *T. fusca*. Kam R = Gene de resistência à canamicina; Origem f1= Origem de replicação do plasmídeo.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados neste trabalho e sua posição 5' inicial em pJZ1. P1 a P7 foram utilizados no sequenciamento de DNA. P1 e P8 a P11 foram utilizados na obtenção das formas variantes de E1

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Posição</b>
P1	5'-ATACATATGCTTAGGAGACCCAGATCTCGATCCCCC-3'	5066
P2	5'-CGCGTCAACCAGGTCGGCTACC-3'	5636
P3	5'-GCGCTCCCAGCTCGCCGACAC-3'	6166
P4	5'-GACGACGAAGAGGTCTTCCG-3'	6704
P5	5'-CGGACCGGGCGACGACGAGA-3'	7357
P6	5'-GCCACGATGCGTCCGGCGTAGAG-3'	4936
P7	5'-CTCAGCTTCCTTTCCGGGCTTTGTTAG-3'	8901
P8	5'-CTACTCGAGTCAGGCGTCGTCCTGGTCGGCGATGAAG-3'	7309
P9	5'-GAACATATGGTCTACGAACCCGACACCGGACCGC-3'	5597
P10	5'-GTACTCGAGGGCGTCGTCCTGGTCGGCGATGA-3'	7311
P11	5'-CCTCTCGAGGCCGATGGAGCAGACCGCGCCGTTGACGGTGAAC-3'	7957

A primeira forma variante que codifica E1 sem CBD2 foi obtida por meio da amplificação de pJZ1 com os *primers forward* 5'-ATACATATGCTTAGGAGACCCAGATC-3' (P1) e *reverse* 5'-CTACTCGAGTCAGGCGTCGTCCTGGTCGGCGATGAAG-3' (P8).

A segunda forma variante que consiste apenas do CD de Cel9B foi obtida por meio da amplificação de pJZ1 com o *primer forward* 5'-GAACATATGGTCTACGAACCCGACACCCGGACCGC-3' (P9) e o *primer reverse* 5'-GTAICTCGAGGGCGTCGTCCTGGTCGGCGATGA-3' (P10). P9 também foi utilizado para obter outra variante, com o *primer reverse* 5'-CCTCTCGAGGCCGATGGAGCAGACCCGCGCCGTTGACGGTGAAC-3' (P11). Essa forma consiste de E1 sem CBM4.

Os locais exatos na sequência de DNA que codificam o início e o término de cada domínio foram determinados por comparações a dados de sequência de DNA depositados no NCBI, *National Center for Biotechnology Information*. Em cada *primer forward* foi adicionado um sítio de restrição para *NdeI upstream* à região selecionada, exceto para M1 porque a sequência já estava presente *upstream* ao peptídeo sinal em pJZ1. Em contrapartida, em cada *primer reverse* foi adicionado um sítio de restrição para *XhoI downstream* à região selecionada. O sítio de *XhoI* em pET-26b+ permite a fusão do gene clonado na mesma sequência de leitura que codifica 6 histidinas seguidas. Dessa maneira, uma cauda de histidina foi posicionada na extremidade carboxílica dos variantes CD e M2. Isso não ocorreu em M1 porque um códon de parada foi acrescentado *upstream* à sequência de reconhecimento da enzima de restrição *XhoI*. Três ou quatro desoxinucleotídeos foram inseridos aleatoriamente na posição 5' em todas as sequências dos *primers* para servir de superfície de contato no reconhecimento e na ação da enzima de restrição.

As reações de amplificação foram feitas em microtubos de 200 µl contendo tampão 1x (Finnzymes), 50 ng de DNA, 1 unidade de DNA polimerase de alta fidelidade (Finnzymes), 200 µM de cada dNTP, 300 nM de cada primer e água milliQ para um volume final de 50 µl. Por se tratar de DNA proveniente de organismo de alto conteúdo G+C, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) a 3 % em cada tubo da reação.

As condições programadas no termociclador foram as seguintes:

98 °C por 2 minutos

- |                                |   |               |
|--------------------------------|---|---------------|
| 1) 98 °C por 10 segundos       | } | 30 a 35 vezes |
| 2) 68 °C por 25 segundos       |   |               |
| 3) 72 °C por 15 segundo por Kb |   |               |
| 4) 72 °C por 5 minutos         |   |               |
| 5) 4 °C por 5 minutos          |   |               |

Os amplicons obtidos foram digeridos por *NdeI*+ *XhoI*, purificados do gel (Qiagen) e ligados aos vetores clivados com as mesmas enzimas de restrição (Biolab), de acordo com recomendações dos fabricantes dos produtos. A reação de ligação foi usada para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, obtidas pelo tratamento com RbCl. As células foram devidamente identificadas e armazenadas em 20 % de glicerol a -70 °C.

### 3.3. Confirmação da sequência de DNA.

As sequências de DNA de todas as formas variantes e do tipo selvagem foram confirmadas para assegurar que nenhuma mutação havia ocorrido no processo da PCR. As sequências foram determinadas no *Cornell Biotechnology Resource Center*, utilizando um sequenciador automático Perkin Elmer/ Applied Biosystems.

Sete *primers*, P1 a P7, foram desenhados para determinar a sequência do DNA de E1 e suas diferentes formas variantes obtidas (Tabela 1), em diferentes posições de pJZ1 (Figura 1).

P1 está localizado no início do peptídeo sinal e foi o mesmo *primer forward* utilizado para obter M1. Isto foi possível porque o sítio de restrição para *NdeI* foi utilizado em pET26+ para gerar pJZ1. Logo a sequência referente ao sítio de reconhecimento da enzima estava presente no DNA molde.

Nos *primers* P8, P9, P10 e P11, a inserção dos sítios de restrição e dos desoxinucleotídeos extras para ancorar a enzima geraram uma extremidade não complementar à sequência original. Este fato impossibilitou a reação de sequenciamento com o uso dos mesmos, logo novos *primers*, P2 a P7, foram obtidos para esta finalidade.

P2, P3 e P4 estão localizados na porção inicial, mediana e distal do domínio Cel9B, respectivamente. P5 está localizado na parte inicial do *linker* de CBD2. P6 e P7 estão posicionados no vetor pET26b+, downstream e upstream a E1, respectivamente. Apenas P7 é um *primer reverse*. Todos os demais geraram sequências *forward* de E1.

### 3.4. Análise da expressão da enzima.

Após confirmação da sequência correta obtida pela sequenciamento do DNA, os plasmídeos foram transferidos para *E. coli* BL21 RPIL DE3, por transformação de células competentes obtidas pelo tratamento com RbCl.

O primeiro teste de expressão foi feito em pequena escala. As culturas iniciadoras foram incubadas por 12 a 16 horas, a 37 °C, em meio Luria Bertani (LB) adicionado de 0,5 % de glicose e 60 µg/mL de canamicina. Como o meio LB pode conter pequenas quantidades de lactose em sua formulação, glicose foi adicionada a este com a finalidade de assegurar a inibição da expressão do gene clonado no vetor de expressão pET.

Teste em diferentes densidades óticas (D.O.) para indução do *lac operon*, diferentes concentrações de *isopropil-β*-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), diferentes temperaturas e diferentes meios de cultura foram realizados para conhecer as melhores condições de expressão das proteínas. O inóculo foi feito com 3,3 % da cultura iniciadora. A expressão da proteína foi feita por 12 a 16 horas após a indução.

Quando a proteína possuía peptídeo sinal em sua sequência, 2 mL da cultura foram transferidos para um Eppendorf e centrifugados por 2 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi acrescido de 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Concomitantemente, parte do sobrenadante foi concentrado pela adição de 10 % de ácido tricloro-acético. A mistura foi deixada em gelo por uma hora e após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em tampão corante. O pH foi corrigido pela adição de Tris não-tamponado 1 M. As amostras foram testadas em gel de poli-acrilamida 12 % contendo SDS, para visualizar a banda de proteína induzida.

Quando a proteína possuía cauda de histidina na extremidade carboxílica, 2 mL da cultura foram transferidos para um Eppendorf, centrifugados a 12.000 g por 2 minutos. Testes foram realizados para definir o tampão e concentração de sais utilizados na ressuspensão da proteína. As células foram então lisadas com o uso do sonicador e a suspensão formada foi novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores para remoção dos sedimentos celulares. O sobrenadante foi testado em gel de poliacrilamida 12 % contendo SDS, submetido à eletroforese por 2 horas a 90 volts, para visualizar a banda de proteína induzida esperada.

### **3.5. Produção, Extração, Separação e Purificação das enzimas obtidas.**

#### **3.5.1. Enzimas com peptídeo sinal para secreção extracelular.**

As culturas de *E.coli* contendo os plasmídeos desejados foram incubadas por 12 a 16 horas, a 37 °C, em 35 mL de LB adicionado de 0,5 % de glicose e 60 µg/mL de canamicina. Após este período, 33 mL desta cultura foram transferidos para 1 L de M9 adicionado de 0,5 % de glicose e 60 µg/mL de canamicina. A cultura foi incubada a 30 °C, em agitação vigorosa até alcançar a D.O. de 0,7 a 0,8. Neste momento, foi adicionado 0,8 mM de IPTG ao meio de cultura para induzir a expressão da proteína clonada por 12 a 16 horas, na mesma temperatura e aeração.

O sobrenadante foi recolhido por centrifugação durante 45 minutos a 4000 g e adicionado de PMSF e Sulfato de Amônio, em uma concentração final de 0,1 mM e 1,1 M, respectivamente. Após esta etapa, o sobrenadante foi novamente centrifugado nas mesmas condições e aplicado em uma coluna de 25 mL de resina hidrofóbica Phenyl Sepharose (Sigma), previamente equilibrada com solução de Sulfato de Amônio 1,2 M. A coluna era lavada com as seguintes soluções:

- 1) 60 mL de sulfato de amônio 1 M;
- 2) 60 mL de sulfato de amônio 0,6 M + NaCl 10 mM + fosfato de sódio 5 mM, pH 6;

3) 60 mL de sulfato de amônio 0,3 M + 5 mM de NaCl + fosfato de sódio 5 mM, pH 6.

Logo após, a eluição da proteína de interesse foi feita com aproximadamente 100 mL de 5 mM fosfato de sódio pH 6. Amostras dos tubos que apresentaram alta absorvância a 280 nm foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % contendo SDS. As frações mais puras foram combinadas para serem aplicadas em resina de troca iônica.

A amostra combinada foi então ajustada com Bis-Tris 0,02 M, pH 5,1 e posteriormente diluída para alcançar a condutividade de 0,2 mmho. Essa condutividade garantia que as proteínas presentes na amostra fossem aderidas à resina. Logo em seguida, a suspensão foi aplicada em 20 mL de Q Sepharose (Sigma) previamente equilibrada com 0,01 M de Bis-Tris pH 5,1. A coluna foi lavada com 60 mL de 0,01 M de Bis-Tris pH 5,1 e a eluição foi feita em gradiente crescente de 0,2 a 0,6 M de NaCl diluído na mesma solução. Novamente, as amostras dos tubos que apresentaram alta absorvância a 280 nm foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % contendo SDS. As frações mais puras foram combinadas.

Logo em seguida, a preparação enzimática foi concentrada com uso de dispositivos (Millipore), segundo recomendações do fabricante, que tinham a capacidade de reter a proteína de acordo com o tamanho do poro da membrana escolhida (30 kDa). A preparação enzimática foi armazenada em acetato de sódio 5 mM, pH 5,5 com 10 % de Glicerol e mantida a - 20 °C.

### **3.5.2. Enzimas com cauda de histidina no terminal carboxílico.**

As culturas de *E. coli* contendo os plasmídeos desejados foram incubadas por 12 a 16 horas, a 37 °C, em 15 mL de LB adicionado de 0,5 % de glicose e 60 µg/mL de canamicina. Após este período, 10 mL desta cultura foram transferidos para 300 mL de LB adicionado de 0,5 % de glicose e 60 µg/mL de canamicina. A cultura foi incubada a 25 °C, sob agitação vigorosa, até alcançar a D.O. de 0,7 a 0,8. Neste momento, foi adicionado 0,4 mM de IPTG ao meio de cultura para induzir a expressão da proteína clonada por 12 a 16 horas, na mesma temperatura e aeração.

As células foram recolhidas por centrifugação durante 30 minutos a 6000 g e ressuspendidas em 20 mL do tampão de ligação, constituído de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, imidazol 20 mM e NaCl 0,5 M. As células foram rompidas no *French Pressure Cell* (SLM Aminco), por aplicação do correspondente a 10.000 lb/in<sup>2</sup>, por três vezes. O extrato foi recolhido em um tubo contendo 1 mM de PMSF, mantido em cuba com gelo e incubado a 50 °C por 30 minutos. A suspensão foi incubada a 55 °C por 30 minutos. A remoção dos *debris* celulares foi feita por centrifugação durante 30 minutos a 6000 g. O extrato foi filtrado com o auxílio de suportes, contendo membranas com poros de 0,45 µm de diâmetro e então sonicado durante 1 minuto, por 3 vezes. O extrato tinha o pH reestabelecido para seu valor inicial pela adição de mais tampão de ligação e foi então aplicado em uma coluna de 2 mL de resina de afinidade carregada com níquel (Invitrogen), previamente equilibrada com o tampão de ligação. A coluna foi lavada com 15 mL de tampão de ligação e a eluição foi feita em gradiente crescente de 20 a 400 mM de imidazol diluído no mesmo tampão.

As amostras dos tubos que apresentaram alta absorvância a 280 nm foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %, contendo SDS. As frações mais puras foram combinadas e a troca de tampão das frações combinadas foi feita conforme citado anteriormente. Eventualmente, foi necessária mais uma etapa de purificação utilizando Q Sepharose (Sigma) como descrito acima. A solução de fosfato de Sódio 5 mM, pH 7,6 contendo 10 % de Glicerol foi escolhida para armazenar a preparação enzimática, mantida a - 20 °C.

### **3.6. Espectrometria de massa.**

As preparações enzimáticas foram enviadas para *Cornell Proteomics and Mass Spectrometry Core Facility* para determinação da massa molecular. Os espectros de massa foram adquiridos em modo de íon positivo no instrumento Waters Synapt HDMS. O detector usado para determinação da massa molecular foi um Q-TOF.

### 3.7. Atividade enzimática de E1 e seus variantes.

Para comparar as atividades enzimáticas de E1 e suas formas variantes, os ensaios foram realizados por um período de tempo fixo, variando-se as concentrações de proteínas utilizadas para cada substrato. Os ensaios em triplicata foram realizados em volume final de reação de 0,4 mL, na presença de acetato de sódio 5 mM, pH 5,5, a 50 °C. Os ensaios de atividade de celulases são não-lineares, devido parcialmente à heterogeneidade e insolubilidade do substrato.

A concentração final dos substratos utilizados e os tempos de ensaio foram: 2,5 mg/mL de xiloglucana por 30 minutos, 5 mg/mL de xilana por 16 horas, 2,5 mg/mL de celulose amorfa tratada com ácido fosfórico por 16 horas, 10 mg/mL de carboxi-metil celulose por 2 horas, 2,5 mg/mL de celulose microcristalina bacteriana por 16 horas, 5 mg/mL de galactomanana por 16 horas, 2,5 mg/mL de alfa- e beta-quitina por 16 horas.

As atividades das enzimas tipo selvagem e seus variantes foram determinadas em pontos percentual de degradação enzimática para os diferentes substratos, a saber: 5 % em xiloglucana, 10 % em xilana, 25 % em celulose amorfa tratada com ácido fosfórico, 7,5 % em carboxi-metil celulose e 6 % em celulose microcristalina bacteriana. Para as enzimas que não alcançaram os alvos de degradação, a atividade foi calculada em um ponto mais baixo, arbitrariamente.

Para cálculo da cinética enzimática, os valores da quantidade ( $\mu$ moles) de proteínas utilizadas ( $X$ ) foram plotados em um gráfico versus os valores da quantidade de produto formado ( $Y$ ), e ajustados à equação  $Y = m_1 X / (m_2 + X)$ , usando o program KaleidaGraph (Synergy Software), onde  $m_1$  e  $m_2$  são constantes definidas pelo ajuste dos dados à curva. A curva obtida foi utilizada para determinar a quantidade de enzima necessária para alcançar o alvo de degradação. Neste ponto a atividade enzimática foi calculada como  $\mu$ moles de produto por minuto por  $\mu$ moles de enzima. Os alvos de degradação foram escolhidos de maneira a permitir uma comparação mais justa entre os diferentes tipos enzimáticos. Dessa maneira, foram procurados pontos onde as atividades não aconteciam tão

rapidamente, como na parte inicial da curva, e nem tão lentamente, como na parte final da curva.

Curvas-padrão foram feitas com o uso do reagente DNS, ácido dinitrosalicílico (Ghose, 1987), e solução-padrão de glicose (Sigma). O fator calculado para glicose ( $F_g$ ) guarda uma relação constante com o fator calculado pra celobiose ( $F_c = F_g/1,47$ ). Isto foi demonstrado ao longo dos anos no laboratório do Dr. Wilson (Diana Irwin – comunicação pessoal). Logo, este coeficiente foi utilizado para calcular a quantidade de celobiose produzida pela degradação enzimática nos diferentes tipos de celuloses ensaiados. Para a degradação de xilana, o mesmo reagente foi utilizado com a determinação da curva padrão, utilizando solução diluída de xilose como açúcar redutor.

Para a determinação da atividade em xiloglucana, o reagente PAHBAH, Hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico (Lever, 1972), e solução padrão de glicose (Sigma) foram utilizados para a obtenção da curva padrão. A massa molecular média dos xiloglucana oligossacarídeos (XGO) considerada foi de 1293 Da, calculada a partir dos dados fornecidos pelo fabricante do produto e confirmada anteriormente por análises de espectrometria de massa (Irwin et al., 2003). A relação aproximada entre a curva-padrão de glicose e a quantidade de XGOs produzidos foi determinada, sendo que nmoles de XGOs = 0,481.(nmoles de equivalente glicose).

A concentração das proteínas utilizadas em cada ensaio foi determinada pela absorvância a 280 nm, utilizando NanoDrop (Thermo Scientific). Para isto, os coeficientes de extinção molar e a massa molecular foram determinados a partir da composição de aminoácido predita para cada enzima a partir de sua sequência de DNA, utilizando o programa Protean (DNASTAR).

### **3.8. Ensaio de ligação enzima/substrato.**

A enzima E1 e suas formas variantes foram testadas quanto à sua ligação aos seguintes substratos: celulose microcristalina bacteriana 2,5 mg/mL; celulose amorfa tratada com ácido fosfórico 2,5 mg/mL; xilana 25

mg/mL;  $\beta$ -glucano de cevada ( $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 glucana) 2,5 mg/mL;  $\beta$ -1,3 glucana (comercialmente disponível como *Pachyman*) 2,5 mg/mL;  $\beta$ -1,6 glucana (comercialmente disponível como *Pustulan*) 2,5 mg/mL;  $\alpha$ -quitina 2,5 mg/mL e  $\beta$ -quitina 25 mg/mL. Os ensaios de ligação foram realizados em tubos Eppendorf de baixa adesão de proteínas em volume final de 0,5 mL, em triplicata, na presença de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5. Foi escolhido apenas um ponto de excesso de substrato. A concentração da enzima utilizada no ensaio foi determinada pela lei de Lambert-Beer como aquela que rendesse uma absorvância em torno de 0,8. Os tubos foram colocados em um homogeneizador (Clay Adams) a 4 °C por 1 hora e então centrifugados por 5 minutos a 12000 g. A seguir, 300  $\mu$ L da parte superior do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo Eppendorf com uma ponteira que possuía sua extremidade longa e delgada. Os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições e com o uso do mesmo tipo de ponteira, 150  $\mu$ L da parte superior do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. A quantidade de proteína não ligada ao substrato foi determinada pela leitura da absorvância a 280 nm. Reações-controles, sem o substrato e somente com o substrato, foram incubadas nas mesmas condições para cada ensaio realizado.

### **3.9. Modelagem molecular e validação do modelo**

As coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica com maior percentagem de identidade (*Protein Data Bank* – PDB: 1GU3, resolução de 2,3 Å) foram utilizadas como molde para a construção do modelo estrutural da CBM4. Após o alinhamento das sequências primárias, o modelo foi criado com o auxílio do software *Modeller* 9v8 (Marti-Renom et al., 2007). A validação estereoquímica da estrutura foi realizada utilizando o software PROCHECK (Laskowski et al., 1998), pelo qual, são verificados diversos parâmetros, tais como: comprimentos e ângulos de ligação, quiralidade, planaridade das ligações peptídicas, dentre outros. A visualização 3D da estrutura foi realizada através do programa *PyMOL* (<http://www.pymol.org>).

### **3.10. Isolamento de bactérias celulolíticas.**

Com o objetivo de isolar bactérias celulolíticas, especialmente actinomicetos, amostras de solo foram coletadas na camada de 0-20cm, na mata do Belvedere da Universidade Federal de Viçosa (mata Atlântica secundária) e em matas de eucalipto na mesma região. Em cada local, foram escolhidos, aleatoriamente, 10 pontos para obtenção de uma amostra composta, evitando-se a camada de serrapilheira.

Para o isolamento das bactérias, foram utilizados três meios de cultivos adicionados de nistatina (50 µg/mL) e ciclohexamida (75 µg/mL) para inibir o crescimento de fungos. O meio ágar arginina glicerol foi preparado de acordo com Demain e Davies (1999). O meio ágar extrato solo foi utilizado, sendo o extrato preparado com solo extra obtido nos mesmos pontos da amostragem de acordo com Hamaki et al. (2005). O meio ágar amido caseína foi modificado pela substituição do amido por celulose (4 g/L), logo foi denominado ágar celulose caseína. Após a coleta, a amostra foi deixada em placas de Petri esterilizadas, à temperatura ambiente, por 16 a 18 dias, para diminuir o número de bactérias não-filamentosas. Diluições seriadas em duplicata foram realizadas, submetidas a 50 °C por 10 minutos e plaqueadas nos meios de cultura. As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. Colônias típicas de actinomicetos e outras bactérias foram repicadas sucessivas vezes no meio ágar arginina glicerol suplementado com glicose (1 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e triptona (5 g/L) para obtenção das culturas puras que foram armazenadas no mesmo meio líquido adicionado de 20 % de glicerol a - 70 °C.

### **3.10. Prospecção de celulasas no banco de bactérias.**

A prospecção da atividade de celulase foi feita em todos os isolados obtidos, utilizando o substrato cromogênico celulose-azure (Lai et al., 2006). Os isolados foram crescidos em meio líquido basal (Cresswell et al., 1988) acrescido de celulose microcristalina (20 g/L) e Glicose (1 g/L), e incubados a 28 °C, em agitação moderada por 4 dias. Após este período de crescimento, o tubo foi centrifugado a 5000 g por 5 minutos. A presença de

celulase foi verificada em 240  $\mu$ L do sobrenadante das culturas e 60  $\mu$ L da celulose azure 5 g/L em 50mM de tampão Acetato pH 5,0. A mistura foi feita em duplicata, em tubos Eppendorfs que foram incubados a 37 °C por 6 horas. Após esse período a mudança de coloração no sobrenadante foi avaliada visualmente e os tubos foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para placas de microtitulação e a leitura de absorvância foi feita em 595 nm. A hidrólise do substrato libera o corante hidrossolúvel associado à fibra de celodextrina e aumenta a absorvância do sobrenadante na faixa de comprimento de onda utilizada neste experimento. Reações controle foram realizadas com celulases comerciais provenientes de *Trichoderma* e *Aspergillus niger* nas concentrações de 0,5, 1,5 e 4 U/mL. Como alguns sobrenadantes exibiam coloração, controles negativos foram feitos com a escolha aleatória de sobrenadantes testados sem o substrato cromogênico. Celulose azure também foi incubada na ausência de extrato enzimático.

### **3.11. Amplificação do rDNA 16S.**

Preparação de DNA foi realizada de acordo com procedimentos descritos em Sambrook e Rusell (2001). A amplificação do rDNA 16S foi feita com primers específicos para bactérias (Dojka et al., 2000).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Papel do domínio catalítico e dos dois domínios de ligação a carboidratos, das famílias 2 e 4, presentes em Cel9B proveniente de *T. fusca*.

#### 4.1.1. Obtenção da enzima tipo selvagem e formas variantes.

Quatro formas diferentes de Cel9B, uma endocelulase não processiva proveniente de *T. fusca*, também denominada de E1, foram obtidas, expressando diferentes porções deste gene, além do tipo selvagem em *E. coli*. A primeira forma variante, denominada M1, codifica a parte inicial da enzima E1, contendo seu peptídeo sinal, o domínio de ligação da família 4 e o domínio catalítico da família 9 (M1= CBM4+ Cel9B). As outras duas formas variantes, M2 e CD, não foram secretadas pela ligação desses mutantes com o peptídeo sinal de Cel6A, um peptídeo sinal eficiente para secreção de Cel9A em *E. coli* (Li et al, 2007). Logo, foram produzidas fusionadas, na extremidade carboxílica, com 6 resíduos de histidina. CD codifica apenas o domínio catalítico de E1 (CD= Cel9B) e M2 codifica o domínio catalítico ligado por uma alça ao domínio de ligação a carboidrato da família 2 (M2= Cel9B+ CBD2).

Todas as sequências de DNA foram confirmadas pelo sequenciamento e nenhum erro de DNA polimerase foi encontrado, assegurando-se assim a exata sequência de aminoácidos nas proteínas posteriormente expressas.

A expressão da proteína E1, codificada em pJZ1, mostrou os melhores resultados para sua indução com 0,8 mM de IPTG, na D.O. de 0,7 a 0,8, a 30 °C em meio mínimo M9 por 16 horas. Estas mesmas condições foram as melhores também para expressar M1. Já M2 e CD tiveram as melhores condições para sua expressão com 0,4 mM de IPTG, na D.O. de 0,7 a 0,8, a 25 °C em meio LB por 16 horas.

Os parâmetros enzimáticos preditos *in silico* para E1 e suas formas variantes estão mostrados na Tabela 2. A partir da análise dessas características, foi possível seguir uma estratégia experimental de purificação dessas proteínas. E1 e M1 foram purificadas por meio de cromatografia de interação hidrofóbica, seguida de cromatografia de troca iônica. Já CD e M2 foram purificadas por cromatografia de afinidade, seguida de cromatografia de troca iônica, quando necessário.

No processo de purificação de E1 e de suas formas variantes, não foi necessária a utilização de Glicerol nos tampões de eluição porque não houve agregação das proteínas. Este procedimento foi adotado para garantir a purificação de outras celulasas de *T. fusca*, quando agregação foi observada (Zhang et al, 1995; Li et al, 2007). Outro fator importante observado no processo de obtenção das proteínas foi sua solubilidade em NaCl. O pico de eluição em Q-Sepharose foi observado em torno de 0,4 M de NaCl para formas com peptídeo sinal e para as formas com cauda de histidina, o tampão utilizado continha 0,5 M de NaCl. As proteínas mantinham-se solúveis nestas condições. Porém na dessalinização das amostras, as proteínas com cauda de histidina precipitaram-se na solução de 5 mM de acetato de sódio pH 5,5. A solução escolhida nestes casos para o armazenamento foi 5 mM de fosfato de sódio pH 7,6.

As massas moleculares determinadas por espectrometria de massa foram correspondentes àquelas preditas *in silico* (Tabela 2). As Figuras 2 a 5 mostram os picos e as respectivas massas obtidas das preparações enzimáticas. Os resultados alcançados confirmam as formas enzimáticas esperadas.

Tabela 2: Parâmetros enzimáticos calculados para E1 e suas formas variantes obtidos a partir da sequência de DNA, utilizando o programa Protean (DNASTAR). E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2

	<b>E1</b>	<b>M1</b>	<b>CD</b>	<b>M2</b>
<b>Massa molecular (KDa)</b>	101,147	78,552	63,736	86,462
<b>Comprimento (número de resíduos de aminoácidos)</b>	941	722	584	804
<b>Coefficiente de extinção molar (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)</b>	209920	158220	121990	173690
<b>Ponto isoelétrico (pI)</b>	3,95	3,98	4,32	4,2
<b>Carga no pH=7,0</b>	-84,93	-68,06	-45,04	-61,91

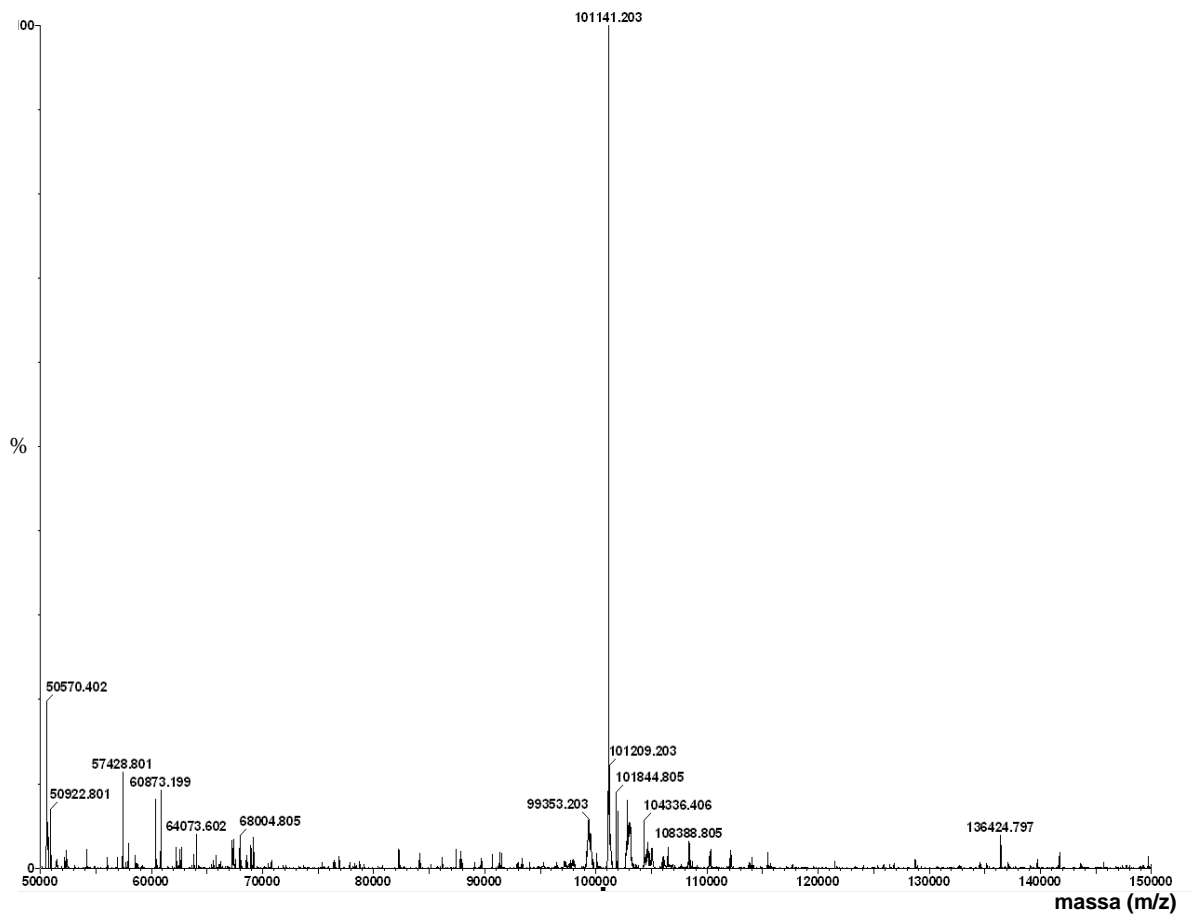


Figura 2: Espectro de massa com ionização por *electrospray* de E1 em detector Q-TOF. E1 representa celulase tipo selvagem da família 9B proveniente de *T. fusca*.

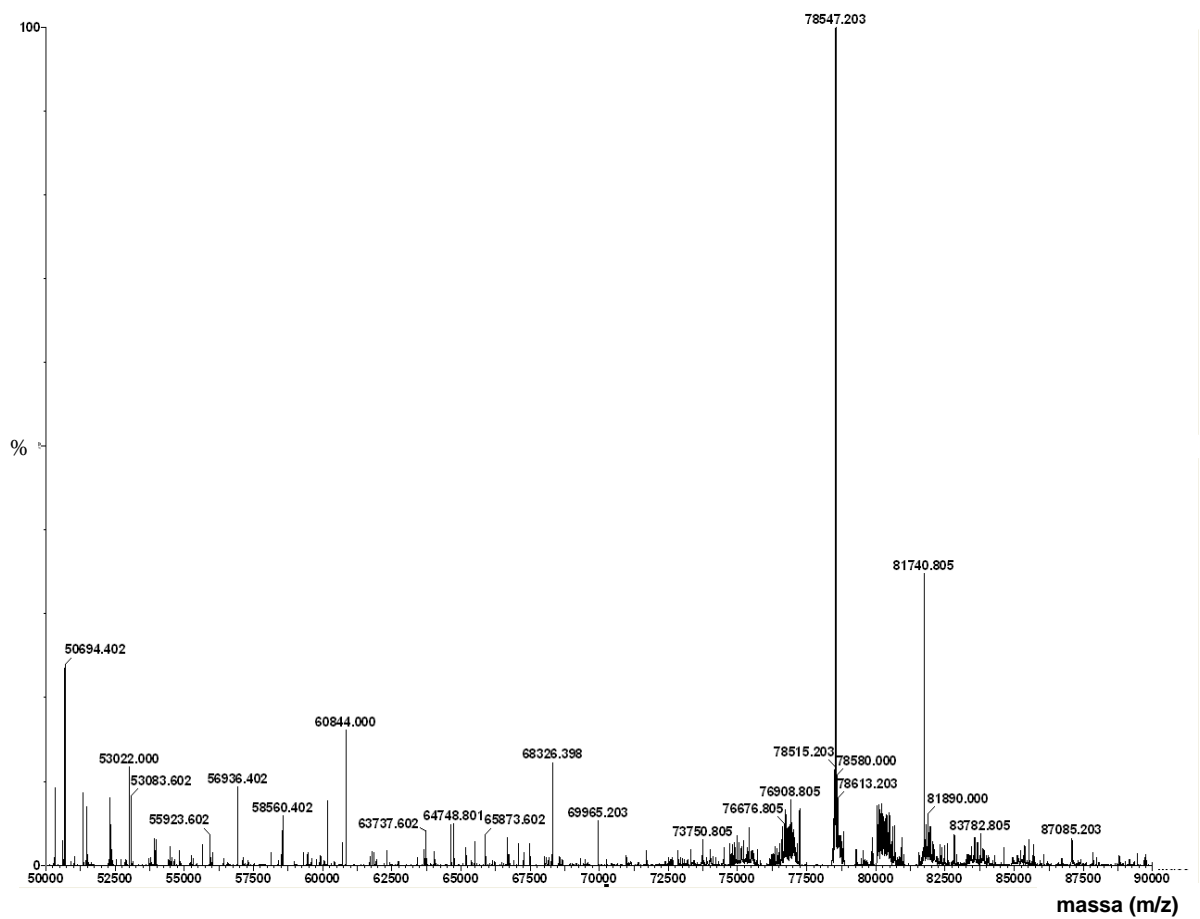


Figura 3: Espectro de massa com ionização por *electrospray* de Mutante1 (M1) em detector Q-TOF. M1 representa Cel9B+ CBM4 de E1 proveniente de *T. fusca*.

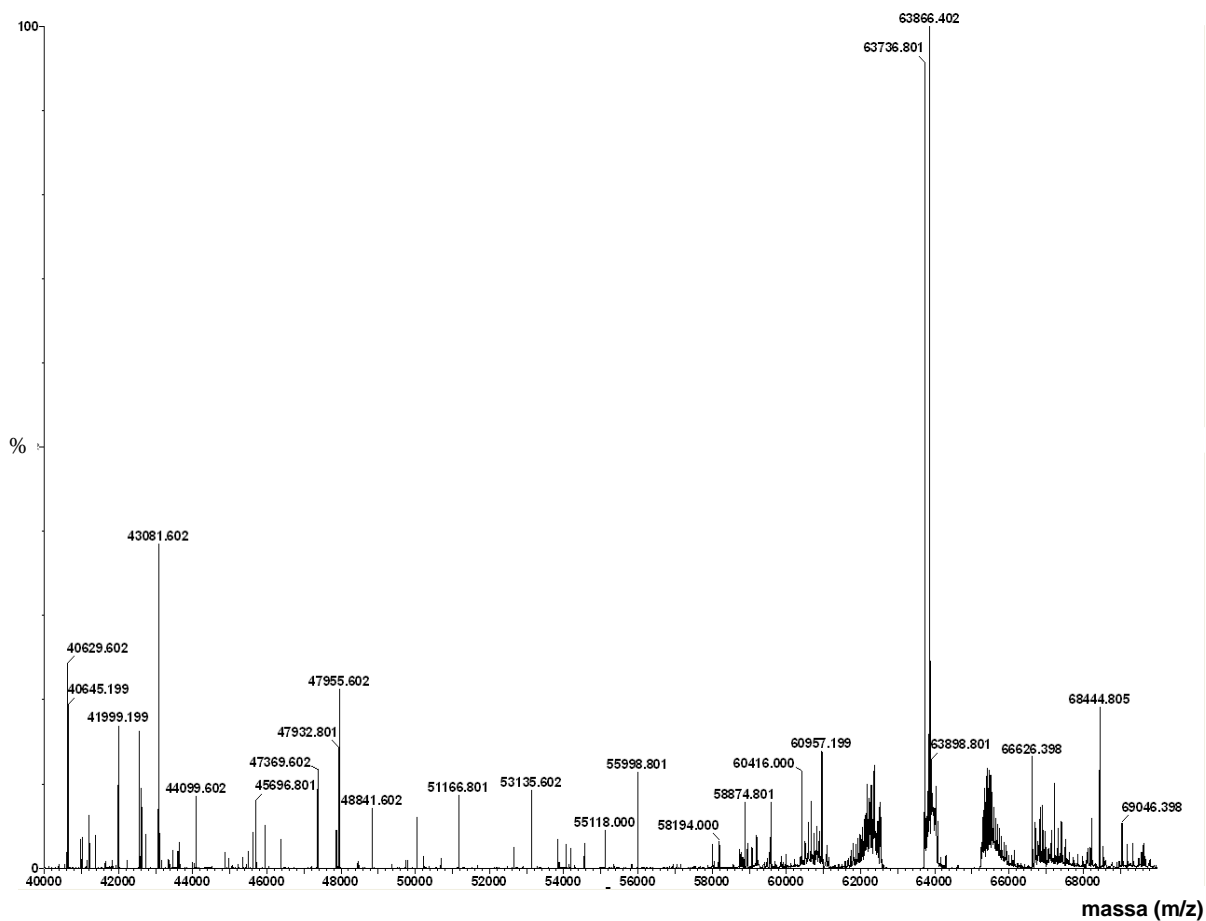


Figura 4: Espectro de massa com ionização por *electrospray* de Domínio Catalítico (CD) em em detector Q-TOF de E1 proveniente de *T. fusca*.

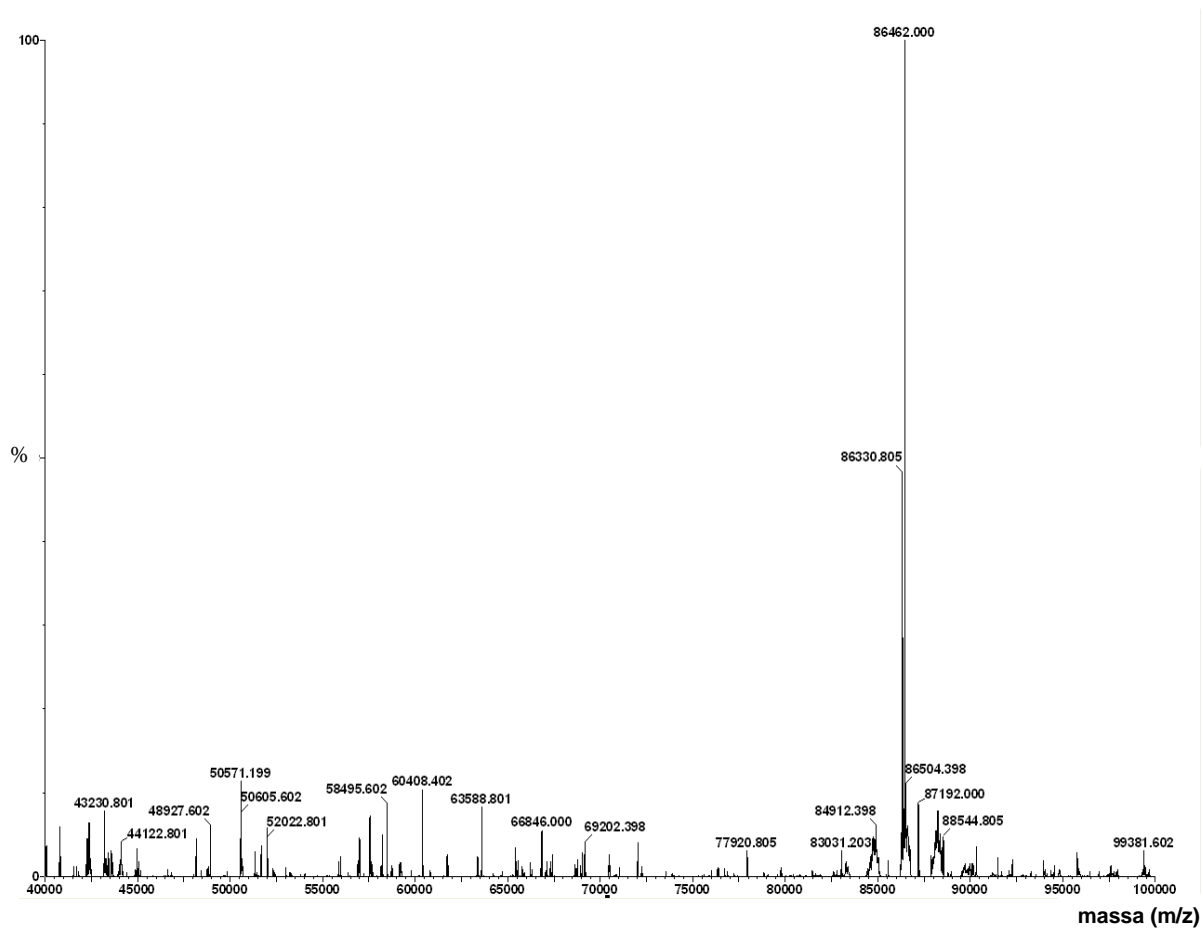


Figura 5: Espectro de massa com ionização por *electrospray* de Mutante2 (M2) em detector Q-TOF. M2 representa Cel9B+ CBD2 de E1 proveniente de *T. fusca*.

#### 4.1.2. Atividade enzimática de E1 e seus variantes.

O tipo selvagem de Cel9B havia sido expresso anteriormente em *Streptomyces* e essa preparação enzimática foi a utilizada para os ensaios de atividade enzimática, uma vez que comparações entre as formas purificadas de *E. coli* e *Streptomyces* mostraram performances enzimáticas semelhantes sobre celulose bacteriana microcristalina e celulose amorfa tratada com ácido fósfórico (resultados não mostrados). As formas variantes foram sempre expressas em *E. coli*.

A análise da atividade enzimática de E1 e seus variantes mostra que a presença de CBM4 inibe a atividade enzimática na maioria dos substratos celulósicos testados. Nas condições testadas, não houve atividade detectada usando galactomanana,  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina como substratos (resultados não mostrados). Galactomanana é um heteropolissacarídeo consistido de resíduos de manose unidos por ligação  $\beta$ -1,4 como cadeia central, ramificada por ligações  $\alpha$ -1,6 que ligam resíduos de galactose a esse polímero. Quitina é um polímero linear que apresenta N-acetil glicosaminas, unidas por ligações  $\beta$ -1,4, como unidade repetida.

Em celulose microcristalina bacteriana, a atividade foi avaliada em 6 % de degradação do substrato. Ficou demonstrado que a presença de CBM4 interfere negativamente na atividade de E1 sobre este substrato porque a sua remoção em M2 aumentou a atividade enzimática e a sua presença diminuiu a mesma, a ponto do alvo de degradação não ser atingido em M1 (Figura 6). Os níveis de degradação foram semelhantes entre CD e M2, demonstrando assim que CBD2 em E1 não é indispensável para degradar substratos cristalinos.

As atividades das enzimas em 25 % de degradação de celulose amorfa tratada com ácido fosfórico foram próximas entre si (Figura 7). Isto indica que a presença dos domínios de ligação à celulose não são indispensáveis para a melhoria da atividade em substrato desordenado como este, mas também a presença destes não atrapalha o desempenho enzimático, neste caso.

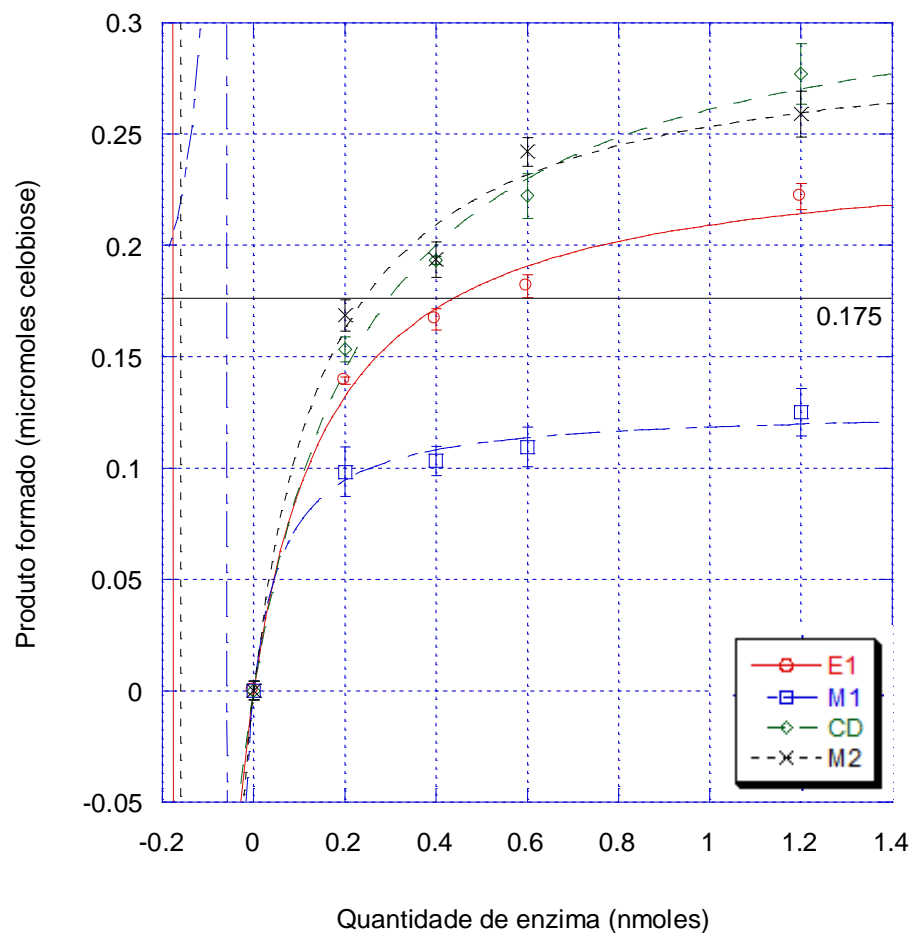


Figura 6: Atividade enzimática de celulase E1 proveniente de *T. fusca* e seus tipos mutantes em celulose microcristalina bacteriana. O alvo de degradação para cálculo da atividade foi estabelecido em 6 % de degradação do substrato (0,175  $\mu$ moles de celbiose). E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2.

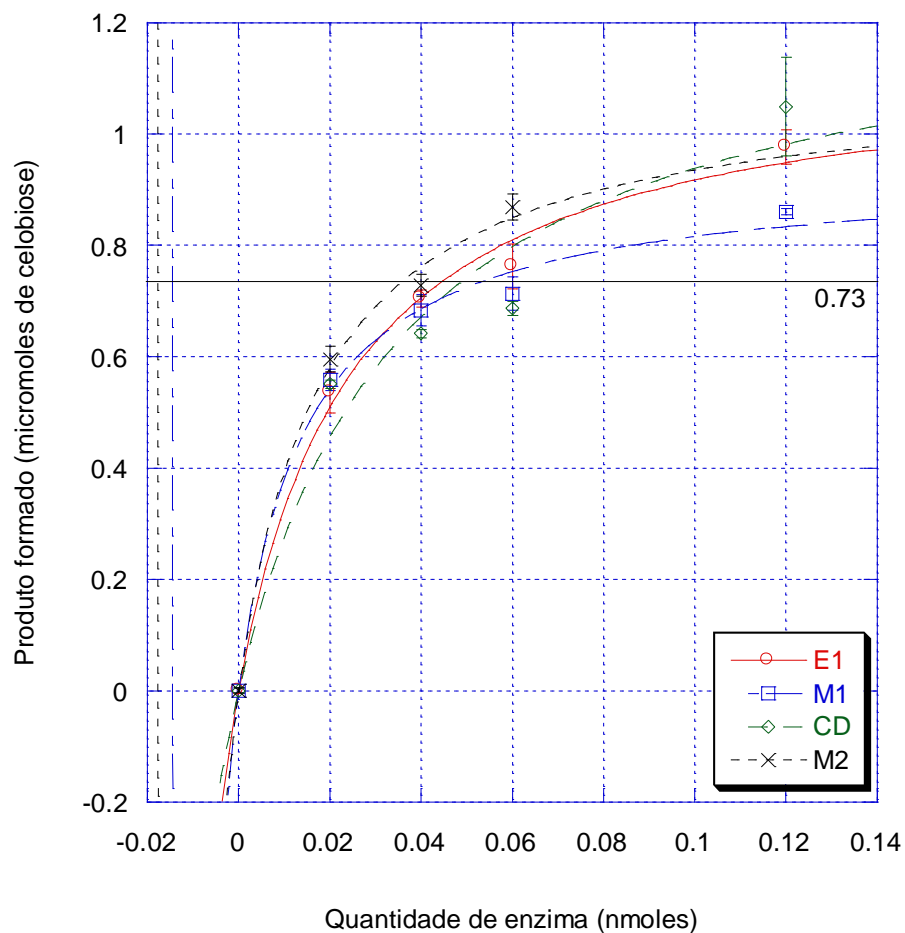


Figura 7: Atividade enzimática de celulase E1 proveniente de *T. fusca* e seus tipos mutantes em celulose amorfa tratada com ácido fosfórico. O alvo de degradação para cálculo da atividade foi estabelecido em 25 % de degradação do substrato (0,73 μmoles de celbiose). E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2.

Outro substrato celulósico modificado utilizado para avaliar a atividade de E1 e suas formas variantes foi carboxi-metil celulose (Figura 8) que possui um grau de substituição de 0,7. Isso significa que a substituição do grupo hidroxil pelo grupo metil, no resíduo de glicose ocorre com uma frequência de 70 %. Nessas condições, com o baixo grau de substituição (<1) esse substrato é solúvel em água porém forma estruturas compactas tipo celulose, com regiões microcristalinas (Kulicke et al., 1996). A comparação das atividades foi feita em 7,5 % de degradação do substrato e o melhor desempenho foi observada pelo CD (Figura 8). Isto pode ser explicado pelo menor tamanho da proteína, uma vez que as substituições no substrato podem representar impedimento estérico para atuação enzimática. Esses resultados podem indicar efeito negativo de dos domínios de ligação ao substrato, além daquele conferido pelo tamanho molecular das proteínas.

A atividade de E1 sobre xilana e xilogucana havia sido detectada anteriormente (Calza et al., 1985 e Irwin et al., 2003), logo estes substratos não celulósicos foram testados (Figuras 9 e 10).

A cinética enzimática de E1 e suas formas variantes sobre xilogucana mostrou que a presença de CBD2 alterou positivamente a atividade enzimática, uma vez que M2 foi a forma com melhor desempenho. Porém, o tipo selvagem da enzima teve o pior desempenho, apesar da presença de CBD2 (Figura 9). Uma possível explicação para esta observação pode ser a falta de acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima selvagem na forma nativa. Foi observado que as formas variantes da enzima mostraram as maiores atividades (Figura 9).

O papel de CBM4 pode ser a degradação de xilana. A degradação em 10 % deste substrato mostrou as melhores atividades para E1 e M1, formas que contêm CBM4 (Figura 10). Os resultados indicam que este papel pode estar relacionado ao posicionamento correto dos aminoácidos na estrutura de E1 na forma nativa, de modo a permitir um maior acesso do substrato ao sítio ativo para reação enzimática. Isso pode ser inferido devido ao fato de M2 apresentar a menor atividade mas a presença de CBD2 aumentar um pouco mais a atividade da enzima em E1 (Figura 10).

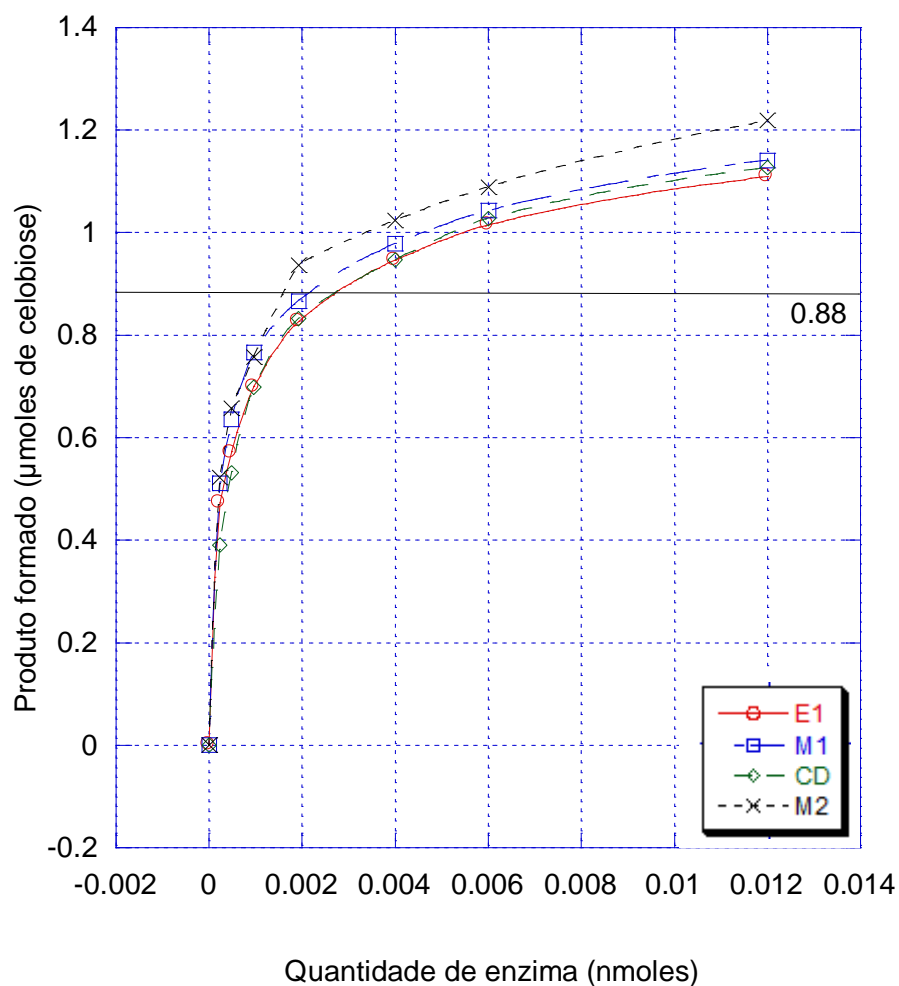


Figura 8: Atividade enzimática de celulase E1 proveniente de *T. fusca* e seus tipos mutantes em carboxi-metil celulose. O alvo de degradação para cálculo da atividade foi estabelecido em 7,5 % de degradação do substrato (0,880 μmoles de celobiose). E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2.

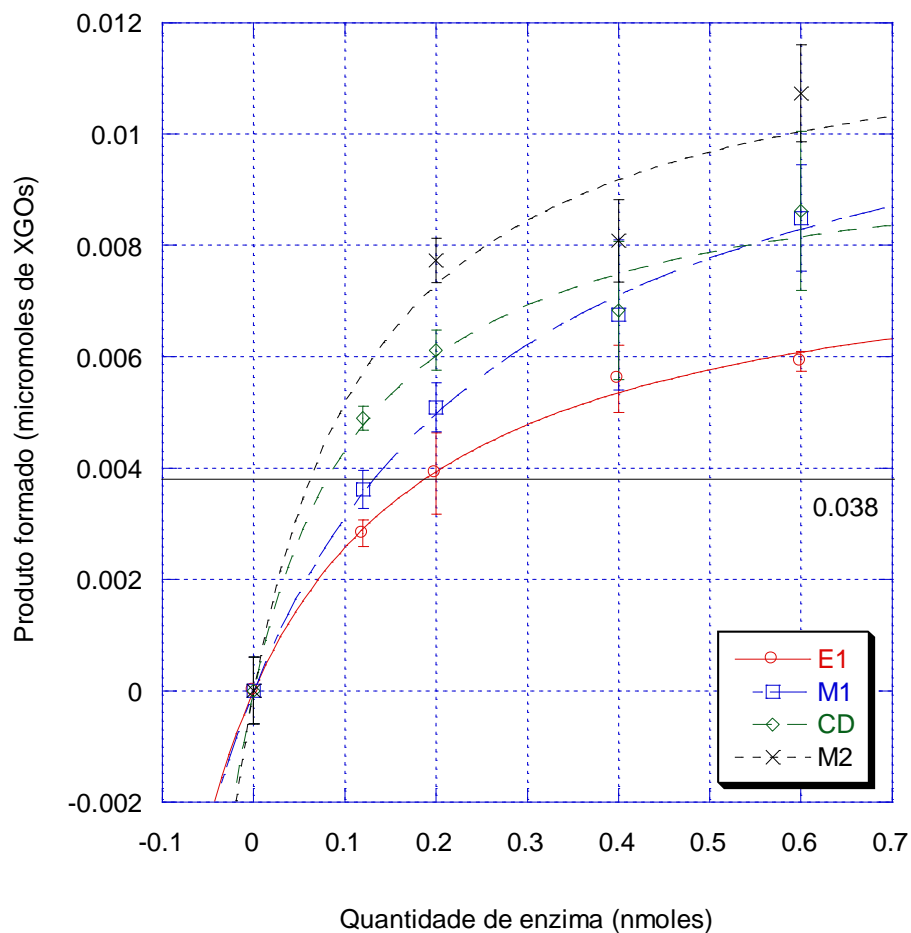


Figura 9: Atividade enzimática de celulase E1 proveniente de *T. fusca* e seus tipos mutantes em xiloglucana. O alvo de degradação para cálculo da atividade foi estabelecido em 5 % de degradação do substrato (0,038  $\mu$ moles de XGO). E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2; XGO= xiloglucana-oligossacarídeo.

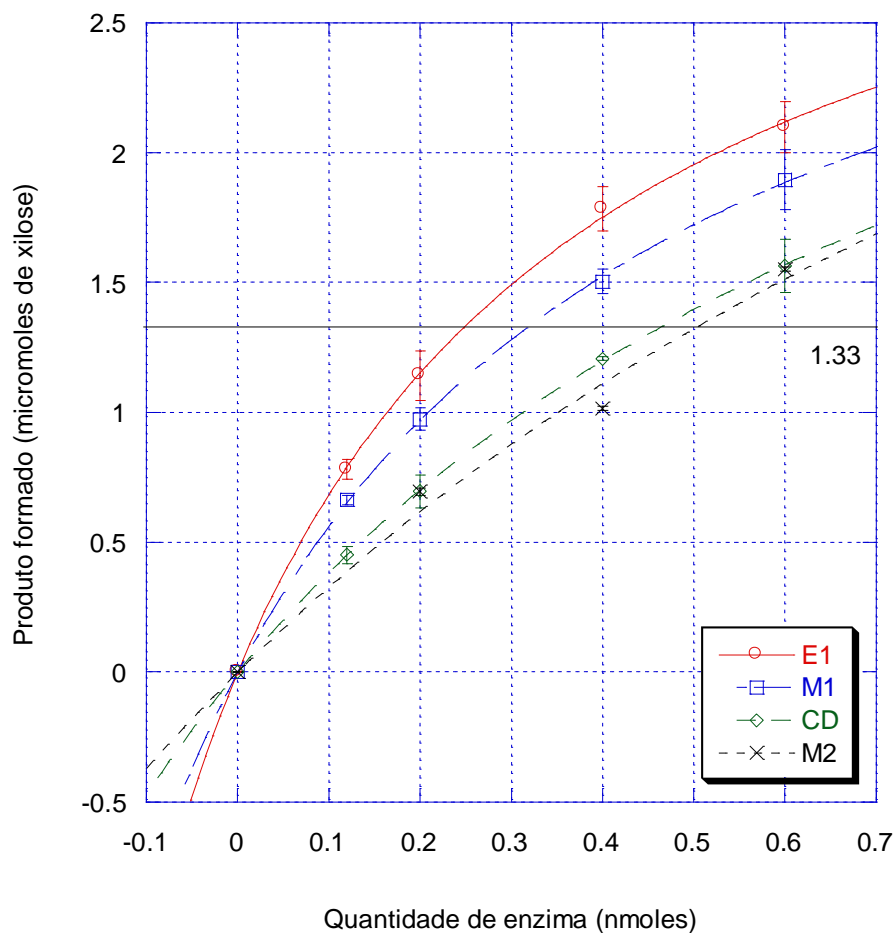


Figura 10: Atividade enzimática de celulase E1 proveniente de *T. fusca* e seus tipos mutantes em xilana. O alvo de degradação para cálculo da atividade foi estabelecido em 10 % de degradação do substrato (1,33  $\mu$ moles de xilose). E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2.

De maneira geral, em substratos celulósicos, as formas que continham CBM4 apresentaram a menor atividade enzimática (exceto M1 sobre carboxi-metil celulose). Isso pode indicar que a presença desse domínio não está relacionada à degradação de celulose (Tabela 3).

Os resultados consolidados na Tabela 3 mostram que o grau de cristalinidade do substrato é diretamente proporcional ao grau de dificuldade de sua degradação para os substratos celulósicos. Sendo assim, observam-se maiores atividades em carboxi-metil celulose, seguida de celulose amorfa tratada com ácido fósfórico e por último celulose microcristalina bacteriana. Os substratos não celulósicos apresentaram atividades maiores do que em Celulose Microcristalina, mostrando assim a grande recalcitrância deste substrato e a permissividade da enzima para substratos presentes na parede celular vegetal.

Outros polissacarídeos que envolvem a celulose na parede celular vegetal representam um fator complicante na obtenção de uma matriz fermentescível porque podem impedir o acesso ao substrato. Logo, o fato de E1 ser ativa contra xilana e xiloglucana coloca esta enzima em posição de destaque porque esta pode ser uma característica importante e desejável na seleção de componentes de coquetéis enzimáticos para degradação de biomassa.

#### **4.1.3. Ensaio de ligação aos substratos de E1 e seus variantes.**

De todos os substratos testados apenas  $\alpha$ -quitina, celulose microcristalina bacteriana e celulose amorfa tratada com ácido fosfórico foram capazes de se ligar a E1. Resultados abaixo de 10 % foram considerados como negativos para esta análise (Tabela 4).

O resultado observado em  $\alpha$ -quitina pode ser explicado pela semelhança estrutural deste polímero com celulose. Possuem o mesmo tipo de ligação entre seus monômeros  $\beta$ -1,4, com a diferença estrutural nos grupos hidroxila localizados na posição 2, que na quitina foram substituídos por grupos acetamino. Apesar de se ligarem a todas as formas variantes das enzimas, CBD2 parece estar mais envolvido na ligação substrato (Tabela 4).

Tabela 3: Consolidação dos resultados das atividades específicas em micromoles de produto por minuto por micromoles de enzima, demonstradas por E1 e seus tipos mutantes nos substratos testados. O cálculo da atividade foi feito em um ponto determinado como um alvo de degradação, estabelecido para cada caso. E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2.

	<b>Celulose microcristalina</b>	<b>Celulose pré-tratada</b>	<b>C.Metil-celulose</b>	<b>xilana</b>	<b>xiloglucana</b>
<b>E1</b>	0.424	17.68	271,6	5.54	6.84
<b>M1</b>	0.37*	14.34	349,2	4.35	9.5
<b>CD</b>	0.635	15.84	488,9	2.97	15.63
<b>M2</b>	0.744	21.72	271,6	2.73	20.43

\*: alvo de degradação não alcançado.

Tabela 4: Consolidação dos resultados dos ensaios de ligação de E1 e suas formas variantes nos substratos testados. Os resultados estão expressos em percentagem, em relação ao ensaio controle realizado em ausência de substrato (100 %) e ausência da proteína (0 %). E1= Tipo selvagem; M1= CBM4+ Cel9B; CD= Cel9B; M2= Cel9B+ CBD2.

	<b>E1</b>	<b>M1</b>	<b>CD</b>	<b>M2</b>
<b>Celulose microcristalina</b>	74,4 %	8,1 %	7,4 %	68,5 %
<b>Celulose amorfa</b>	80,1 %	6,4 %	7,9 %	71,8 %
<b><math>\alpha</math>-quitina</b>	56,4 %	24,9 %	12,8 %	47 %
<b><math>\beta</math>-quitina</b>	8,5 %	10,4 %	8,9 %	5,6 %
<b>Xilana</b>	2,8 %	1,5 %	5,6 %	3,7 %
<b><math>\beta</math>-1,3 glucana</b>	8,3 %	4,4 %	0 %	3,4 %
<b><math>\beta</math>-1,6 glucana</b>	8,2 %	-	-	-
<b><math>\beta</math>-glucano de cevada</b>	2,6 %	-	-	-

- : ensaio não realizado

Ainda de acordo com estes resultados, conclui-se que CBM4 também possui um papel na ligação de E1 a este substrato, uma vez que sua presença em M1 praticamente dobrou a ligação de  $\alpha$ -quitina à enzima, comparada com resultado mostrado por CD (Tabela 4). Apesar da ligação ao substrato, não houve detecção de atividade enzimática sobre  $\alpha$ -quitina nas condições testadas (resultados não mostrados).

Não houve ligação de  $\beta$ -quitina em E1 e suas formas variantes apesar de sua relação estrutural à  $\alpha$ -quitina (Tabela 4). A diferença entre estes polímeros é a disposição das cadeias poliméricas, antiparalelas em  $\alpha$ -quitina e paralelas em  $\beta$ -quitina. Como resultado,  $\alpha$ -quitina estabelece maior número de ligações de hidrogênios intermoleculares e torna-se um material mais densamente compactado (Campana-Filho et al., 2007).

Tanto em celulose microcristalina bacteriana, como em celulose amorfa tratada com ácido fosfórico houve ligação de E1 e de suas formas variantes. Em ambos os casos, CBD2 foi o domínio responsável por esta ligação porque M2 apresentou resultados de 68 e 72 %, respectivamente, enquanto E1 apresentou 74 e 80 % de ligação, respectivamente. Os resultados de ligação para M1 e CD, nestes dois substratos foi considerado negativo porque mostrei resultados abaixo de 10 % (Tabela 4).

Domínios que se ligam à celulose cristalina têm superfície hidrofóbica planar, composta predominantemente de resíduos de aminoácidos aromáticos, que interagem com uma das superfícies planares dos cristais de celulose (Simpson et al., 2000).

Entre os vários substratos testados, não foi avaliado aquele capaz de se ligar a CBM4. Não houve ligação detectada em xilana (Tabela 4), porém, a atividade de E1 diminui consideravelmente quando CBM4 é removido (Tabela 4 e Figura 10). Já foi demonstrado que membros da família de CBM4 foram capazes de se ligar a  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3 oligossacarídeos,  $\beta$ -glucana. e xilana (Hachem et al., 2000 e Boraston et al., 2002).

Em CBD2, houve a ligação à celulose amorfa e microcristalina (Tabela 4). A presença de CBD2 mostrou as maiores atividades enzimáticas sobre estes substratos (Tabela 3 e Figura 6 e 8), sugerindo assim o papel desse domínio na degradação desses substratos.

#### 4.1.4. Modelo da estrutura tridimensional gerado para CBM4 de *T.fusca*.

As ligações N-C $\alpha$  e C $\alpha$ -C podem sofrer rotações em ângulos torsionais denominados  $\phi$  (phi) e  $\psi$  (psi), respectivamente. O gráfico de Ramachandran mostra a distribuição dos ângulos torsionais associados a cada aminoácido (Ramachandran et al., 1963). O diagrama de Ramachandran do modelo de CBM4 mostra que 89,2 % dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 9,2 % na região adicional permitida e somente 0,8 % dos resíduos encontram-se na região generosamente permitida ou na região não permitida (Figura 11). Os resíduos de glicina (13 no total) possuem como cadeia lateral um átomo de hidrogênio, logo, o C $\alpha$  não possui quiralidade e são representados por triângulos no gráfico de Ramachandran. Os aminoácidos que estão em destaque no gráfico (Figura 11), Ala 16 e Val 84, estão distantes do potencial sitio de ligação desse domínio de Cel9B de *T. fusca*.

O modelo estrutural de CBM4 obtido nesse estudo mostra uma estrutura clássica tipo *jelly roll* (Figura 12). As duas folhas  $\beta$  estão dispostas de maneira a criar um sulco em forma de U (*U-shaped*) onde se encontra o sitio de ligação ao carboidrato. Esta estrutura é altamente conservada em famílias de CBM (Boraston et al. 2002).

O alinhamento da sequência de aminoácidos de CBM4 de *T.fusca*, *C. fimi* e *T. maritima* mostra que dois dos três resíduos aromáticos conservados envolvidos na ligação do substrato encontram-se presentes em CBM4 de *T. fusca* (Figura 13), porém este não se ligou a resíduos de glicose unidos por ligação  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,3 ( $\beta$ -glucano de cevada e  $\beta$ -1,3 glucana - Pachyman) como demonstrado para CBM4 dos outros dois organismos, respectivamente (Boraston et al., 2002). A orientação dos resíduos aromáticos pode ser responsável pela especificidade e pela ligação a diferentes substratos nas famílias de CBM (Guillén et al., 2010).

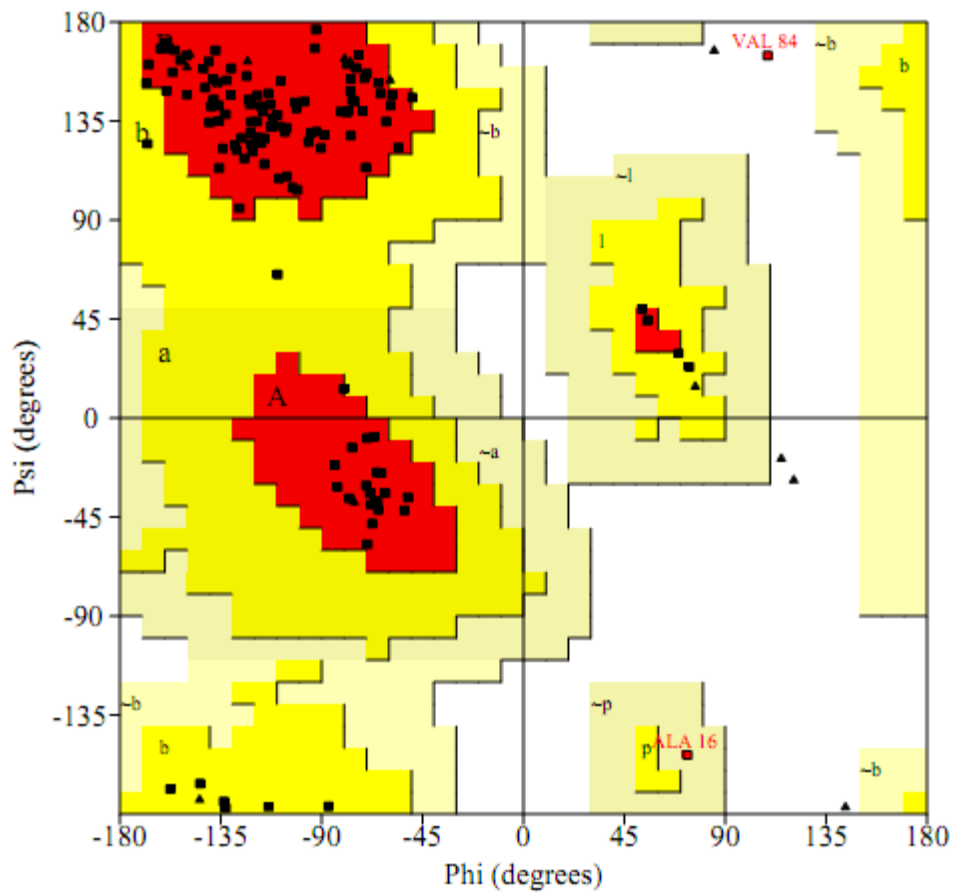


Figura 11: Gráfico de Ramachandran do modelo estrutural da CBM4, presente em Cel9B, proveniente de *T.fusca*. Em vermelho, região favorável; em amarelo, região adicional permitida; em bege, região generosamente permitida; em branco, região não-permitida.

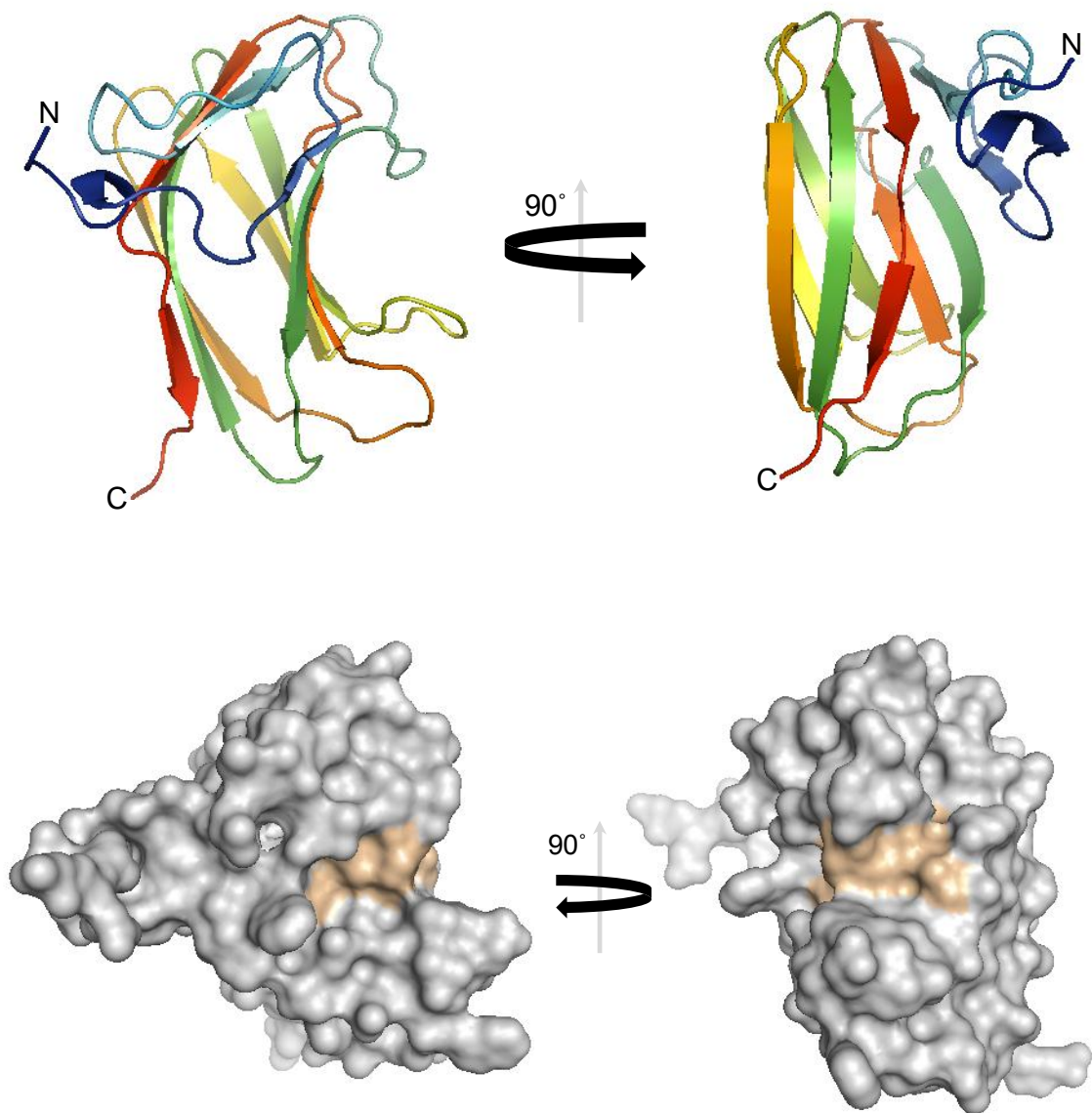


Figura 12: Estrutura tridimensional do modelo criado para a CBM4 presente em Cel9B, proveniente de *T. fusca*. (a) modelo de fitas. (b) superfície topográfica de CBM4 calculada usando o programa *PyMOL*. O sítio de ligação ao substrato em potencial está destacado em laranja claro .

	10	20	30	40	50
<b>T.maritima</b>	--QINNGTFD	EPIVNDQANN	PDEWFIWQAG	DYGISGARVS	DYGVRDGYAY
<b>C. fimi</b>	-----TFD	D-----G	PEGWVAYG--	-----TDG	PLDTSTGALC
<b>T. fusca</b>	VNQIRNGDFS	S-----G	TAPWWGT---	-----ENI	QLNVTDGMLC
	60	70	80	90	100
<b>T.maritima</b>	ITIADPGTDT	WHIQFN-QWI	GLYRGKTYTI	SFKAKADTPR	PINVKILQNH
<b>C. fimi</b>	VAVPAGSAQ-	YGVGVVNLGV	AIEEGTTYTL	RYTATASTDV	TVRALVGQNG
<b>T. fusca</b>	VDVPGGTVNP	WDVIIGQDDI	PLIEGESYAF	SFTASSTVPV	SIRALVQEPV
	110	120	130	140	150
<b>T.maritima</b>	DPW <sup>Y</sup> TNYFAQT	VNLTADWQTF	TFTYTHP---	----DDADEV	VQISFELGEG
<b>C. fimi</b>	APY <sup>Y</sup> GTVLDT	PALTSEPRQV	TETFTASATY	PATPAADDPE	GQIAFQLGGF
<b>T. fusca</b>	EPW <sup>Y</sup> TTQMDER	ALLGPEAETY	EFVFTS----	----NVDWDD	AQVAFQIGGS
	160				
<b>T.maritima</b>	TAT--TIYFD	DVTVSPQ			
<b>C. fimi</b>	SADAWTFCLD	DVALDSE			
<b>T. fusca</b>	D-----	-----			

Figura 13: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de CBM4 presentes em laminarinase de *Thermotoga maritima* e em celulases de *Cellulomonas fimi* e *Thermobifida fusca*. Resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na proteínas destacados em amarelo estão envolvidos na ligação ao substrato.

## **4.2. Diversidade de atividade celulolítica em bactérias isoladas de mata de eucalipto e mata do Belvedere, crescimento secundário de mata Atlântica.**

### **4.2.1. Banco de bactérias celulolíticas.**

O isolamento de bactérias celulolíticas provenientes do solo pode revelar novas estratégias de degradação utilizadas por estes microrganismos e também pode levar à descoberta de novos tipos de enzimas vantajosas para aplicação biotecnológica. Após 7 dias na estufa a 28 °C, foram selecionadas 317 colônias bacterianas com características macroscópicas relacionadas aos actinomicetos tais como crescimento em erupções, colônias ressecadas e de diferentes colorações. A coleção final contém 175 isolados provenientes da mata do Belvedere e 142 isolados provenientes da mata de eucalipto.

Independentemente da origem do solo, o meio ágar arginina glicerol foi mais eficiente na recuperação e crescimento dos microrganismos presentes na amostra (Tabela 5). Entretanto, priorizou-se o isolamento das colônias obtidas em ágar celulose caseína porque continha apenas caseína e celulose como fontes de carbono. Após as repicagens, foram obtidos 173 isolados neste meio de cultura, sendo 100 provenientes da mata de eucalipto e 73 da mata do Belvedere. A utilização do meio ágar arginina glicerol suplementado com triptona, glicose e extrato de levedura rendeu 120 isolados, sendo 26 provenientes da mata de eucalipto e 94 da mata do Belvedere. Apenas 24 isolados foram obtidos em ágar extrato de solo, sendo 16 oriundos da mata de eucalipto e 8 da mata do Belvedere.

Em todos os meios de cultura utilizados, houve contaminação por fungos em algumas placas mesmo com a utilização dos antibióticos para a inibição destes organismos. Esta contaminação foi excessiva em ágar extrato de solo, o que pode significar que esse meio provê nutrientes para maior número e diversidade de microrganismos. Por essa razão, este meio deve ser futuramente trabalhado para obtenção de organismos do solo exigentes de fatores desconhecidos aí presentes.

Tabela 5: Contagem bacteriana obtida em amostra solo composta de 10 pontos da mata do Belvedere, da Universidade Federal de Viçosa, e da mata de Eucalipto, localizada em região próxima.

	<i>Mata do Belvedere</i>	<i>Mata de eucalipto</i>
<b>Ágar arginina glicerol</b>	1,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g de solo	4,6 x 10 <sup>5</sup> UFC/g de solo
<b>Ágar celulose caseína</b>	5,1 x 10 <sup>5</sup> UFC/g de solo	5,1 x 10 <sup>4</sup> UFC/g de solo

De acordo com contagens realizadas nas diferentes diluições, observou-se que houve maior abundância das colônias selecionadas na mata do Belvedere, independente do meio de cultura utilizado no isolamento (Tabela 5). Não foi possível realizar contagem em ágar extrato de solo devido à turbidez apresentada pelo meio e também por causa da contaminação excessiva por fungos. Vale ressaltar que parte da área da mata de eucalipto amostrada havia sido perturbada para aproveitamento da madeira. Logo, a maior disponibilidade de matéria orgânica pode ter ativado metabolicamente um grupo específico de microrganismos, influenciando os resultados. De qualquer forma, esta é uma das diferenças entre os dois ecossistemas escolhidos, tendo em vista que a derrubada de árvores é prática comum no plantio de eucalipto para aproveitamento comercial.

A observação de algumas colônias ao microscópio mostrou que a maioria das colônias isoladas constitui-se de células Gram positivas, predominantemente bacilos. A segunda forma mais observada foram as hifas ramificadas, típicas de actinomicetos.

O sequenciamento do rDNA 16S de algumas colônias confirmou a presença de espécies dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*. Provavelmente o choque térmico aplicado antes do plaqueamento favoreceu também as espécies de *Bacillus* que também são capazes de formar esporos em deprivação nutricional (Earl et al., 2008).

Das 317 bactérias isoladas, 264 foram capazes de crescer em meio líquido basal (Cresswell et al., 1988) acrescido de celulose microcristalina (20 g/L) e Glicose (1 g/L). Os sobrenadantes destas culturas foram testados para prospecção da atividade de celulase e 57 foram tidos como positivos. Dentre estes, 38 foram sobrenadantes provenientes de culturas isoladas da mata do Belvedere e 19 da mata de eucalipto. Não se pode descartar a existência de bactérias celulolíticas não indentificadas por esta metodologia porque existem outras estratégias de degradação de celulose além da secreção extracelular da enzima. Dificilmente estes isolados são capazes de produzir celulosomas porque esta característica foi observada apenas em microrganismos anaeróbios até a presente data. Porém não se pode descartar a possibilidade de estratégias ecológicas desconhecidas de degradação de matéria orgânica. As análises das sequências dos genomas

de *Cytophaga hutchinsonii* e *Fibrobacter succinogenes*, mostraram que organismos aeróbios e anaeróbios respectivamente, são capazes de degradar celulose sem a secreção da enzima e sem a utilização dos celulosomos (Wilson, 2008).

Neste trabalho, o ponto de corte para considerar uma cultura como produtora de celulase foi definido como o valor da absorvância igual ou maior que 0,2. A hidrólise do substrato libera o corante hidrossolúvel associado à fibra de celodextrina e aumenta a absorvância do sobrenadante na faixa de comprimento de 595 nm.

Considerando este ponto, os resultados foram positivos para 57 isolados, sendo eles: 14, 21, 23, 49, 54, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 85, 86, 87, 92, 95, 100, 102, 103, 104, 109, 115, 118, 119, 120, 121, 125, 127, 129, 130, 142, 143, 144, 153, 154, 155, 159, 171, 174, 175, 176, 177, 189, 190, 220, 223, 249, 261, 265, 269, 274, 276, 285, 296, 305, 318 e 328. Dentre esses isolados 38 foram provenientes da mata do Belvedere e 19 da mata de eucalipto (Tabela 6).

Entretanto, dentre os resultados positivos, destacaram-se 20 sobrenadantes das culturas, que mostraram densidade ótica acima de 0,287, sendo estes 14, 23, 61, 62, 64, 65, 86, 95, 100, 102, 103, 104, 129, 130, 154, 171, 269, 276, 318 e 328 (Tabela 7).

O resultado mais expressivo foi a absorvância de 0,587 demonstrada pelo sobrenadante do isolado 103, proveniente do solo da mata do Belvedere. A quantidade de corante liberado no sobrenadante pode ser correlacionada com a produção de glicose e concentração de enzima (Lai et al., 2006). Portanto, esse resultado pode ser explicado pela concentração de enzimas neste sobrenadante ou pela atividade específica da enzima presente. Este isolado é Gram positivo e possui crescimento em forma de hifas, podendo se tratar de um actinomiceto. Seu crescimento não foi expressivo em meio líquido, comparado com os demais quanto à massa de células formada após os dias de incubação. Em uma escala de um a três, recebeu o menor valor para avaliação de sua massa micelial, não obstante tenha apresentado o maior valor de degradação de celulose azure.

Tabela 6: Isolados selecionados como produtores de celulasas pelo teste de celulose azure e sua procedência.

<b>Origem</b>	<b>Isolados</b>
<b>Mata do Belvedere</b>	14, 102, 103, 104, 109, 115, 118, 119, 120, 121, 125, 127, 129, 130, 142, 143, 144, 153, 154, 155, 159, 171, 174, 175, 176, 177, 223, 249, 261, 265, 269, 274, 276, 285, 296, 305, 318, 328
<b>Mata de eucalipto</b>	21, 23, 49, 54, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 85, 86, 87, 92, 95, 100, 189, 190, 220

Tabela7: Densidade ótica (D.O.) dos isolados considerados como melhores produtores de celulases pelo teste de celulose azure.

<b>Isolado</b>	<b>D.O.</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>CRESCIMENTO</b>	<b>OBSERVAÇÃO</b>
14	0,318	ACC-M	+++	Massa ressecada marrom
23	0,287	ACC-E	++	Esporos brancos
61	0,375	ACC-E	++	Bege com branco
62	0,301	ACC-E	++	Micélio aéreo
64	0,301	ACC-E	+	Massa não ressecada
65	0,360	ACC-E	+	Massa ressecada
86	0,305	ACC-E	++	Esporos laranja
95	0,332	ACC-E	++	
100	0,288	ACC-E	+++	
102	0,296	ACC-M	++	
103	0,587	ACC-M	+	Erupções brancas
104	0,336	ACC-M	++	
129	0,336	ACC-M	+++	Esporos marrons
130	0,360	ACC-M	+	Cor amarela
154	0,332	ACC-M	+++	Branco com cinza
171	0,398	ACC-M	++	
269	0,289	AAG-M	+	Borda clara, centro branco
276	0,350	AAG-M	++	Erupção cinza
318	0,307	AAG-M	+++	Erupção cinza
328	0,341	AAG-M	++	

Os valores de D.O. correspondem à media da duplicata.

O crescimento foi avaliado subjetivamente como: (+) pouco, (++) intermediário; (+++) muito.

Assim sendo, esta característica torna este isolado bastante interessante porque pode tratar-se de um sistema com falhas de regulação na produção de celulases ou da produção de uma celulase bastante ativa. Por isto, este isolado é o candidato para continuação dos estudos nesta linha de pesquisa no laboratório de Microbiologia Industrial da Universidade Federal de Viçosa.

A coleção aqui obtida mostra diversidade de características entre os isolados. A identificação de seus componentes após a amplificação dos rDNAs 16S será o próximo passo na caracterização filogenética para estudar diversidade. A identificação das famílias de celulases cujas atividades já foram detectadas servirá o propósito de gerar determinantes com propriedades catalíticas requeridas no processo de conversão da biomassa. Há expectativa da caracterização e isolamento de determinantes genéticos diversos que podem então servir de molde para evolução direcionada dessas enzimas, a fim de melhorar parâmetros enzimáticos que permitam sua aplicação industrial de forma sustentável.

## 5. CONCLUSÕES

A presença dos domínios de ligação ao substrato em Cel9B, endocelulase proveniente de *Thermobifida fusca* não aumentou significativamente a atividade catalítica dessa enzima em substratos celulósicos, mostrando assim o papel desempenhado pelo próprio domínio catalítico na degradação desses substratos.

O domínio de ligação a carboidratos da família 2, presente em Cel9B de *T. fusca*, melhorou o desempenho enzimático em celulose microcristalina e celulose amorfa tratada com ácido fosfórico, substratos nos quais houve ligação desse domínio. Adicionalmente esse domínio liga-se à  $\alpha$ -quitina, porém E1 não mostrou atividade sobre este substrato. A presença desse domínio auxilia na degradação de xiloglucana.

O domínio de ligação a carboidratos da família 4, presente em Cel9B de *T. fusca*, interfere negativamente na degradação de substratos celulósicos, porém a presença desse domínio auxilia na degradação de xilana, mas sua ligação a esse substrato não foi detectada. Além disso, não foi detectada ligação a nenhum dos substratos testados porém o modelo gerado para sua estrutura mostrou região potencial para ligação de substrato e o alinhamento de sua sequência de aminoácidos demonstrou resíduos aromáticos em posições conservadas envolvidas na ligação ao substrato em *C. fimi* e *T. maritima*.

Esses resultados autorizam recomendar a determinação experimental da estrutura de CBM4 em Cel9B de *T. fusca* porque este domínio apresenta afinidade diferenciada pelos substratos quando comparado aos outros membros de sua família.

O meio ágar arginina glicerol foi o mais eficaz para o isolamento de bactérias celulolíticas a partir do solo de mata do Belvedere ou mata de eucalipto, porém o meio ágar extrato de solo demonstrou potencial diferenciado para isolamento de microrganismos diversos, uma vez que proporcionou o crescimento diferencial de fungos, não presentes nas mesmas condições, nos outros meios.

Houve diversidade no isolamento das bactérias celulolíticas em características macro e microscópicas além da diversidade de atividade de celulasas detectada por celulose azure, um substrato cromogênico. O isolado 103 possui o conjunto de celulasas mais ativas contra esse substrato, nas condições testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Béguin, P.B. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Reviews of Microbiology*. **44**:219-248.
- Blanco, J., Coque, J.J., Velasco, J., Martin, J.F. (1997). Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo-beta-1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose-binding ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **48**:208–217.
- Bolam, D.N.; Ciruela, A.; Mcqueen-Mason, S.; Simpson, P.; Williamson, M.P.; Rixon, J.E.; et al. (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemistry Journal*. **331**:775-781.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*. **382**:769–781.
- Boraston, A.B., Nurizzo, D., Notenboom, V., Ducros, V., Rose, D.R., Kilburn, D.G., Davies, G.J. (2002). Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related  $\beta$ -1,4 and  $\beta$ -1,3 glucan-binding modules. *Journal of Molecular Biology*. **319**:1143–1156.
- Bothast, R.J., Schlicher, M.A. (2005). A biotechnological process for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **67**:19-25.
- Brás, J.L.A., Cartmell, A., Carvalhoc, A.L.M., Verzéc, G., Bayer, E.A., Vazanae, Y., Correia, M.A.S., Prates, J.A.M., Ratnaparkheb, S., Boraston, A.B., Romão, M.J., Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J. (2011). Structural insights into a unique cellulose fold and mechanism of cellulose hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**:1-6.
- Brune, A. (2007). Wood worker's digest. *Nature*. **450**:487-488.
- Calza, R. E., Irwin, D. C. e Wilson, D. B. (1985) Purification and characterisation of two 8-1,4- endoglucanases from *Thermomonospora fusca*. *Biochemistry* **24**: 7797-7804.
- Campana-Filho, S.P.; Britto, D.; Curti, E.; Abreu, F.R.; Cardoso, M.B.; Battisti, M.V.; Sim, P.C.; Goy, T.C.; Signini, R.; Lavall, R.L. (2007) Extração, estrutura e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. *Química Nova* **30**: 644-650.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*. **37**:D233–D238.

Coelho, R.R.R., Nascimento, R.P. (2008). Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: *Enzima em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. pp.71-94.

Cresswell, M.A., Attwell R.W., Dempsey, M.J. (1988). Detection of cellulolytic actinomycetes using cellulose-azure. *Journal of Microbiological Methods* **8**:299-302.

Davies, G., Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Current Biology*. **3**:853-859.

Demain, A.L., Newcomb, M., Wu, J.H.D. (2005). Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **69**:124-154.

Demain, A.L., Davies, J.E. (1999). Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2nd ed. *ASM Press*, Washington, D.C. 830p.

Devillard, E., Goodheart, D.B., Karnati, S.K.R., Bayer, E.A., Lamed, R., Miron, J., Nelson, K.E., Morrison, M. (2004). *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel9B, both of which possess a novel modular architecture. *Journal of Bacteriology*. **186**:136–145.

Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C.J., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G. (1991). Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bioresources Technology*. **9**:1096–1099.

Din, N., Coutinho, J.B., Gilkes, N.R., Jervis, E., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Ong, E., Tomme, P., Warren, R.A.J. (1995). Interaction with cellulases from *Cellulomonas fimi* with cellulose. In: Petersen, S.B., Svensson, B., Pedersen, S. (Eds.), *Carbohydrate Bioengineering*. Elsevier, Amsterdam, pp. 261-270.

Ding, S.Y., Himmel, M.E. (2006). The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 597-606.

Dojka, M.A., Harris, J.K., Pace, N.R. (2000). Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 1617-1621.

Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. **16**:269-275.

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 cellulose genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **75**:319-328.

Furrie, E. (2006). A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *GUT*. **55**:141-143.

Galperin, M.Y. (2008). The quest of biofuels fuels genome sequencing. *Environmental Microbiology*. **10**:2471-2475.

Gao, P.J., Chen, G.J., Wang, T.H., Zhang, Y.S., Liu, J. (2001). Non-hydrolytic disruption of crystalline structure of cellulose by cellulose binding domain and linker sequence of cellobiohydrolase I from *Penicillium janthinellum*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. **33**:13–18.

Gardner, H.K., Blackwell, J. (1974). The structure of native cellulose. *Biopolymers*. **13**: 1975-2001.

Gill S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. **312**:1355-1359.

Gilad, R., Rabinovich, L., Yaron, S., Bayer, E.A., Lamed, R., Gilbert, H.J., Shoham, Y. (2003) Cel I, a noncellulosomal family 9 enzyme from *Clostridium thermocellum*, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose. *Journal of Bacteriology*. **185**: 391-398.

Gilbert H.J. (2010). The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiology*. **153**: 444-455.

Guillén, D., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology Biotechnology*. **85**: 1241–1249.

Hachem, M.A., NordbergKarlsson, E., Bartonek-Roxa, E., Raghothama, S., Simpson, P.J., Gilbert, H.J., Williamson, M.P. Holst, O. (2000). Carbohydrate-binding modules from a thermostable *Rhodothermus marinus* xylanase: cloning, expression and binding studies. *Biochemical Journal*. **345**:53–60.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Microbiology*. **24**: 549-556.

Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Sen, K., Shibai, H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **99**: 485-492.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. **280**: 309-316.

Henrissat, B. (1994). Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose*. **1**: 169-196.

Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P. Davies, G. (1995). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **92**: 7090-7094.

Henrissat, B., Davies, G. (1997). *Current Opinion in Structural Biology*. **7**: 637-644.

Henrissat, B. (1998). Glycosidase families. *Enzymology of cell-wall degradation*. **26**: 153-156.

Henrissat, B., Coutinho, P. (2001). Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods in Enzymology*. **330**:183-201.

Himmel, M.E., Karplus, P.A., Sakon, J., Adney, W.S., Baker, J.O., Thomas, S.R. (1997). Polysaccharide hydrolase folds diversity of structure and convergence of function *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **63**: 315-325.

Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*. **315**: 804-807.

Hon, S.N.D. (1994). Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose*. **1**: 1-25.

Irwin, D., Walker, L., Spezio, M., Wilson, D. (1993). Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnology and Bioengineering*. **42**: 1002–1013.

Irwin, D., Jung, E., Wilson, D.B. (1994). Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 763–770.

Irwin, D., Shin, D., Zhang, S., Barr, B.K., Sakon, J., Karplus, P.A., Wilson, D.B. (1998). Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*. **180**: 1709–1714.

Irwin, D.C., Zhang, S., Wilson, D.B. (2000). Cloning, expression and characterization of a Family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *European Journal of Biochemistry*. **267**: 4988–4997.

Irwin, D.C., Cheng, M., Xiang, B., Rose, J.K., Wilson, D.B. (2003). Cloning, expression and characterization of a family-74 xyloglucanase from *Thermobifida fusca*. *European Journal of Biochemistry*. **270**: 3083–3091.

Jervis, E.J., Haynes, C.A., Kilburn, D.G. (1997). Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *Journal of Biological Chemistry*. **272**: 24016–24023

Jung, E.D., Lao, G., Irwin, D., Barr, B.K., Benjamin, A., Wilson, D.B. (1993). DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of an exoglucanase gene and an endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 3032–3043.

Juy, M., Amit, A.G., Alzari, P.M. et al (1992). Three-dimensional structure of a thermostable bacterial cellulose. *Nature*. **357**: 89-91.

Kim, J.H., Irwin, D., Wilson, D.B. (2004). Purification and characterization of *Thermobifida fusca* xylanase 10B. *Canadian Journal Microbiology*. **50**: 835–843.

Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.K., Badger, J.H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weidman, J.F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes, S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R., Venter, J.C. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*. **390**: 364-370.

Kulicke, W.-M., Kull, A.H., Kull, W., Thielking, H., Engelhardt, J. Pannek, J-B. 1996. Characterization of aqueous carboxymethylcellulose solutions in terms of their molecular structure and its influence on rheological behavior. *Polymer* **37**: 2723–2731.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **35**: 377-391.

Lai, T.E., Pullammanappallil, P.C., Clarke, W.P. (2006). Quantification of cellulose activity using cellulose-azure. *Talanta*. **69**: 68-72.

Langer, M., Gabor, E.M., Liebeton, K., Meurer, G., Niehaus, F., Schulze, R., Eck, J., Lorenz, P. (2006). Metagenomics: An inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnology Journal*. **1**: 815–821.

Lao, G., Ghangas, G.S., Jung, E.D., Wilson, D.B. (1991). DNA sequences of three  $\beta$ -1,4-endoglucanase genes from *Thermomonospora fusca*. *Journal of Bacteriology*. **173**: 3397–3407.

Laskowski, R.A., MacArthur M.W., Thornton, J. M. (1998) Validation of protein models derived from experiment. *Current Opinion in Structural Biology* **8**: 631-639.

Lee, J.H., O'Sullivan, D.J. (2006) Sequence analysis of two cryptic plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO 10A and construction of a shuttle cloning vector. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 527-535.

Lee, S., Won, K., Lim, H.K., Kim, J., Choi, G.J., Cho, K.Y. (2004). Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **65**: 720-726.

Lever M (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* **47**: 273–279

Li Y.C., Irwin D.C., Wilson D.B. (2007) Processivity, substrate binding, and mechanism of cellulose hydrolysis by *Thermobifida fusca* Ce19A. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3165–3172.

Linder, M., Teeri, T.T. (1997). The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*. **57**: 15-28.

Liu, Y.-S., Zeng, Y., Luo, Y., Xu, Q., Himmel, M.E., Smith, S.J., Ding, S.-Y. (2009). Does the cellulose-binding module move on the cellulose surface? *Cellulose*. **16**: 587–597.

Lorenz, P., Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews*. **3**: 510-516.

Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology*. **13**:572-577.

Lykidis, A., Mayromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., Dibartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., Richardson, P., Wilson, D.B., Kyrpides, N. (2007). Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifidafusca* YX. *Journal of Bacteriology*. **189**: 2477-2486.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66**: 506-577.

Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of biological Sciences*. **5**: 500-516.

Marti-Renom, M.A., Capriotti, E, Shindyalov I, Bourne, P. Structural Comparison and Alignment. *In: Structural Bioinformatics*. 2nd ed. New Jersey. USA: *Wiley-Blackwell*, 2009.

Martín, H.G., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K.W., McHardy, A.C., Yeates, C., He, S., Salamov, A.A., Szeto, E., Dalin, E., Putnam, N.H., Shapiro, H.J., Pangilinan, J.L., Rigoutsos, I., Kyrpides, N.C., Blackall, L.L., McMahon, K.D., Hugenholtz, P. (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnology*. **24**: 1263-1269.

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. *Bioresource Technology*. **99**: 1417-1424.

Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G.J., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackon, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putna, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barbote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., Brettin, T. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*. **26**: 553-560.

Mayende, L., Wilhelmi, B.S., Pletschke, B.I. (2006). Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost. *Soil Biology and Biochemistry*. **38**: 2963-2966.

McCarter, J.D., Withers S.G. (1994). Mechanism of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*. **4**: 885-892.

McGrath, C.E., Wilson, D.B. (2006). Characterization of a *Thermobifida fusca*  $\beta$ -1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation. *Biochemistry*. **45**: 14094–14100.

Moser, F., Irwin, D., Chen, S., Wilson, D.B. (2008). Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. *Biotechnology and Bioengineering*. **100**: 1066-1077.

Rabinovich, M.L., Melnick, M. S., Bolobova, A. V. (2002). The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes. *Biokhimiya*. **67**: 1026-1050.

Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. Sasisekharan, V. (1963) Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Journal of Molecular Biology* **7**: 95-99.

Ray, A.K., Roy, T., Mondal, S., Ring, E. (2010). Identification of gut-associated amylase, cellulose and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquaculture Research*. **41**: 1462-1469.

Rivas, R., Sánchez, M., Trujillo, M.E., Zurdo-Piñeiro, J.L., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2003). *Xylanimonas cellulositytica* gen. nov., sp. Nov., a xylanolytic bacterium isolated from decayed tree (*Ulmusnigra*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**: 99-103.

Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J.K., Jones, T.A. (1990) Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*. **249**: 380-386.

Rubin, E.D. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature Reviews*. **454**: 841-845.

Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooshef, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y., Falcón, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Nealson, K., Friedman, R., Frazier, M., Venter, J.C. (2007). The Sorcerer II global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical pacific. *PLOS Biology*. **5**: 398-431.

Saadoun, I., Rawashdeh, R., Dayeh, T., Ababneh, Q., Mahasneh, A. (2007). Isolation, characterization and screening for fiber hydrolytic enzymes-producing *Streptomyces* of Jordanian forest soils. *Biotechnology*. **1**: 120-128.

Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D.B., Karplus, P.A. (1997). Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nature Structural Biology*. **4**: 810-818.

Sambrook, J., Rusell, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schmeisser, C., Steele, H., Streit, W.R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **75**: 955-962.

Simpson, P.J., Xie, H., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Williamson, M.P. (2000). The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *The Journal of Biology Chemistry*. **275**: 41137-41142.

Sinnott, M.L. (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*. **90**: 1171- 1202.

Sticklen, M.B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*. **9**: 433-443.

Takarada, H., Kosugi, M.K., Matsuo, Y., Fijusawa t., Omata, S., Kishi, E., Shimizu, A., Tsukatani, N., Tanikawa, S., Fujita, N., Harayama, S. (2008) Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *Journal of Bacteriology* **190**: 4139-4146.

Tomme P, Warren A.J., Miller R.C., Jr., Kilburn D.G., Gilkes N.R. (1995). Cellulose-binding domains: classification and properties. *In: Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates*. Saddler JN, Penner, M.H., editors. Washington, DC: *American Chemical Society*. p142–163.

Tolonen, A.C., Chilaka, A.C., Church, G.M. (2009). Targeted gene inactivation in *Clostridium phytofermentans* shows that cellulose degradation requires the family 9 hydrolase Cphy 3367. *Molecular Microbiology*. **74**: 1300–1313.

Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., van Aalten, D.M., Synstad, B., Eijsink, V.G. (2005). Thenon-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *Journal of Biological Chemistry*. **280**: 28492–28497.

Wackett, L.P. (2008). Microbial ethanol for fuel and food. An annotated selection of world wide web sites relevant to the topics in environmental microbiology. *Environmental Microbiology*. **10**: 278-279.

Whitham, T.G., Bailey, J.K., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Bangert, R.K., LeRoy, C.J., Lonsdorf, E.V., Allan, G.J., DiFazio, S.P., Potts, B.M., Fischer, D.G., Gehring, C.A., Lindroth, R.L., Marks, J.C., Hart, S.C., Wimp, G.M., Wooley S.C. (2006). A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics*. **7**: 510-523.

Wilson,D.B., Irwin, D. (1999). Genetics and properties of cellulases. *In: Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology: Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. G.T.T Sao e T. Scheper, Eds. Berlin: *Springer-Verlag*, Vol. 65:1–21.

Wilson, D.B. (2004). Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. *The Chemical Record*. **4**: 72–82.

Wilson, D.B. (2008). Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1125**: 289-297.

Wilson, D.B. (2009). Evidence for a novel mechanism of microbial cellulose degradation. *Cellulose*. **16**: 723-727.

Xie, G., Bruce, D.C., Challacombe, J.F., Chertkov, O., Detter, J.C., Gilna, P., Han, C.S., Lucas, S., Misra, M., Myers, G.L., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Thompson, L.S., Brettin, T.S., Henrissat, B., Wilson, D.B., McBride, M.J. (2007). Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 3536–3546.

Ximenes, E.A., Felix, C.R., Ulhoa, C.J. (1996). Production of cellulases by *Aspergillus fumigates* and characterization of one  $\beta$ -glucosidase. *Current Microbiology*. **32**: 119-123.

Xu, F., Ding, H., Osborn, D., Tejirian, A., Brown, K., Albano, W., Sheehy, N., Langston, J. (2008). Partition of enzymes between the solvent and insoluble substrate during the hydrolysis of lignocelluloses by cellulases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **51**: 42-48.

Yu, R., Wang, L., Duan, X., Gao, P. (2007). Isolation of cellulolytic enzymes from moldy silage by new culture-independent strategy. *Biotechnology Letters*. **29**: 1037-1043.

Zhang, S. Lao, G, Wilson, D.G. (1995) Characterization of a *Thermonospora fusca* exocellulose. *Biochemistry* **34**: 3386-3395.

Zverlov, V.V., Schwarz, W.H. (2008). Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems – *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1125**: 298–307.