

NOME: SILVANA RODRIGUES PIRES

TÍTULO: Estudo de uma Endoglicanase B de *Aspergillus niger*

AUTORES: SILVANA RODRIGUES PIRES, JOSÉ HUMBERTO DE QUEIROZ, THIAGO RODRIGUES DUTRA, VALÉRIA MONTEZE GUIMARÃES, SEBASTIÃO TAVARES DE REZENDE

AGÊNCIA FINANCIADORA (se houver): FAPEMIG

PALAVRA CHAVE: ETANOL; BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA; CLONAGEM

#### RESUMO

A parede celular de plantas é um complexo estrutural composto de polissacarídeos, e representa uma abundante fonte de biomassa a ser utilizada como fonte de energia renovável. A completa hidrólise da biomassa requer a ação combinada de muitas endo e exoenzimas, atuando sobre os polissacarídeos formadores da celulose, hemicelulose e lignina. Desta forma, os monossacarídeos liberados poderão ser utilizados, como substrato de baixo custo, para geração de biocombustível. A celulose é o principal constituinte da biomassa. É formada de polímeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura cristalina, compacta e muito resistente ao ataque enzimático. Celulases são enzimas que atuam em sinergia para degradar a rígida estrutura do complexo lignocelulósico. Os três maiores grupos de celulases são: endo-1,4- $\beta$ -D-glicanases (EC 3.2.1.4), que catalisam a hidrólise aleatória de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 no interior da cadeia de celulose; exo-1,4- $\beta$ -D-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176) que atuam processivamente nos terminais da cadeia de celulose removendo dímeros (celobiose) e as 1,4- $\beta$ -D-glicosidases (EC 3.2.1.21), enzimas que catalisam a formação de resíduos de D-glicose a partir dos celobioligossacarídeos. Embora as celulases sejam produzidas por uma gama de microrganismos, a maioria apresenta grandes restrições que dificultam ou oneram o seu uso para as indústrias. Para superar estas restrições a biologia molecular é uma poderosa ferramenta na produção enzimática, capaz de tornar o processo viável e potencialmente aplicável a nível industrial. Entre outros microrganismos o fungo *Aspergillus niger*, tem sido amplamente pesquisado e representa uma das maiores fontes para a produção industrial de celulases. Neste contexto, o presente trabalho realizou o estudo de uma endoglicanase B produzida pelo fungo filamentosamente *Aspergillus niger*. Seu cultivo foi realizado em meio indutor da atividade de endoglicanase. Através de estudos na literatura, foi proposta uma estratégia de clonagem. A partir da sequência obtida, foi realizada a caracterização *in silico* da endoglicanase. Foram executadas análises computacionais com o fragmento sequenciado, como predição de peptídeo sinal e estudo de modificações pós-traducionais. Foram realizados ainda, alinhamentos múltiplos de sequência com outras celulases, com o intuito de caracterizar a proteína clonada. Após a realização da clonagem, as colônias transformantes foram confirmadas por PCR, sendo obtida uma banda de aproximadamente 904 pb, confirmativa da clonagem do fragmento que codifica para a endoglicanase B de *A. niger*. Em seguida, foi predita a sequência deduzida de aminoácidos da endoglicanase B de *A. niger* clonada. Estudos anteriores comprovam a grande similaridade de sequência entre os membros desta família (família 12 das glicosil-hidrolases) e a presença de resíduos conservados. Os alinhamentos múltiplos de sequência com outras celulases indicaram a presença de domínios conservados entre os membros da família 12 das glicosil-hidrolases presentes na sequência clonada e serão essenciais para posteriores estudos tanto de expressão, quanto de caracterização bioquímica da proteína. Foi realizada a pesquisa de peptídeo sinal presente na sequência identificando que o peptídeo sinal não foi clonado. Assim, a endoglicanase B de *A. niger* foi clonada sem o peptídeo sinal que a direcionaria para uma região específica da célula, quando a proteína fosse excretada. O estudo de Modificações Pós-traducionais indicou a predição de três sítios de N-glicosilação, cinco sítios de fosforilação caseína quinase, um sítio de fosforilação tirosina quinase e seis sítios de N-meristoilação para a AncEGLB. A presença de possíveis Modificações Pós-traducionais, como as preditas para a endoglicanase B de *A. niger* faz com que esta proteína seja um possível alvo de regulação quando for expressa. A partir deste alinhamento, foi construído um dendrograma, no qual as endoglicanases B foram agrupadas em ramos separadas das demais celulases, indicando domínios conservados presentes. Assim, o trabalho realizado visou o desenvolvimento de estudos futuros, uma vez que, o fragmento clonado poderá ser expresso em microrganismos, como *Pichia pastoris*, e posteriormente, serem realizados experimentos de caracterização bioquímica e aplicações industriais da proteína expressa. Estes estudos poderão contribuir para o estabelecimento de um processo para a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis ou serem aplicados em outros setores da indústria, nos quais as celulases tem se mostrado essenciais.