

ZAIRA BRUNA HOFFMAM

**“ESTUDOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DE
HEMICELULASES PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA”**

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ZAIRA BRUNA HOFFMAM

**“ESTUDOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DE
HEMICELULASES PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ZAIRA BRUNA HOFFMAM
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Funcional e
Molecular na área de concentração em
Bioquímica.

Orientador: Dr. Fabio Marcio Squina

Coorientador: Dr. Roberto Ruller

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

H675e

Hoffmam, Zaira Bruna, 1987-
Estudos funcionais e estruturais de hemicelulases para
potencial aplicação biotecnológica / Zaira Bruna Hoffmam.
– Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Fabio Marcio Squina.
Coorientador: Roberto Ruller.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hemicelulose. 2. Enzimas. 3. Enzimas -
Biotecnologia. 4. Xilanases. 5. Glicosideo hidrolases.
I. Squina, Fabio Marcio. II. Ruller, Roberto. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Functional and structural studies of hemicellulases for potential
biotechnological applications

Palavras-chave em Inglês:

Hemicellulose

Enzymes

Enzymes - Biotechnology

Xylanases

Glycoside hydrolases

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Fabio Marcio Squina [Orientador]

George Jackson de Moraes Rocha

Cláudio Chrysostomo Wemeck

Data da defesa: 20-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 20 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Marcio Squina _____

(Orientador)



Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Cláudio Chrysostomo Werneck

Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha

George Jackson de Moraes Rocha

Profa. Dra. Camila Caldana _____

Prof. Dr. Jörg Kobarg _____

DEDICATÓRIA

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”. Nesses versos de Cora Coralina quero dedicar especialmente o trabalho aqui apresentado aos meus pais, Ervina e Natanael, que me ensinaram essa verdade da vida sem conhecer poesias. Dedico a dissertação a todos que amo!

AGRADECIMENTOS

A Deus por direcionar minha vida, por ter me dado forças para realizar as tarefas que escolhi, ânimo para caminhar em meio a adversidades e sabedoria nas decisões.

À minha família, por sonhar meus sonhos e me ajudar a conquistá-los, de modo que meus Pais e Irmãos foram imprescindíveis para essa conquista. Meus Pais, Ervina e Natanael, pelo exemplo de caráter, por ter me ensinado desde cedo que o trabalho duro também é meio de conquistar a liberdade. À minha mãe por acreditar em mim incondicionalmente. Aos meus Irmãos por todo o auxílio, às minhas irmãs Zenia, Zione e Zogaide que sempre estiveram atentas as minhas necessidades e dispostas a ajudar e também ao Elpídio e ao Enio. Aos meus sobrinhos: Brisa, Isabella, Júlio, Maísa, Maurício, Sophia e Yasmin, pela alegria e pelo carinho.

Agradeço também a pessoas que minha vida recebeu de presente: Ao Érico, pela paciência com o trabalho sem fim do laboratório, pelo companheirismo, cuidado e amizade, e à sua Família, pela felicidade que me trazem. Alguns bons amigos fazem toda a diferença em nossas vidas. Amigos de infância, amigos da Bioquímica na UFV, amigos de Viçosa, de Campinas, só posso dizer muito obrigada porque minha vida é melhor por causa de vocês.

Ao Roberto Ruller pela amizade e pelo acompanhamento do trabalho dessa dissertação. Minha gratidão por ter me escolhido para o curso de bolsas de verão, que foi ponto fundamental para que eu pudesse vir para Campinas, pelos ensinamentos das técnicas do laboratório, pela empolgação com a ciência e pela preocupação e empatia com seus alunos.

Ao Fabio Squina por ter aceitado me orientar, pelo acompanhamento das tarefas, pelos ensinamentos e ao Mário Murakami pelos aconselhamentos e auxílios.

Um agradecimento especial aos amigos e companheiros de trabalho do laboratório. Ao Junio pela cooperação direta em todos os experimentos e pela amizade. Ao Leandro pela ajuda na história sem fim e pela colaboração na biologia computacional. Ao Douglas por ajudar a pensar na solução de problemas dos experimentos e pela atenção. Ao Rodrigo pela paciência sem fim com os pedidos de reagentes. Beto, Carla, Evandro, Fernanda Figueiredo e Gabriela obrigada por tornar o ambiente de trabalho mais agradável com a amizade de vocês, obrigada também por toda a cooperação nos experimentos. Aos amigos Fernanda Buchli, Fernanda Mandelli, Livia, Thabata e João um agradecimento especial pela agradável companhia e tudo mais. Agradeço também aos funcionários da Biologia Molecular do CTBE, Ana, Daniela, Douglas, Rebeca e Rodrigo pelo empenho em manter o ambiente de trabalho funcional e por atender as demandas. Agradeço aos

amigos do programa industrial, Beatriz, Deise, Diogo, Patrícia e Priscila pela convivência agradável e pelas colaborações.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), que aceitou o projeto de pesquisa dessa dissertação e forneceu a infraestrutura. Ao CNPEM por todas as *facilities*, especialmente as linhas de SAXS do LNLS e ao LEC do LNBio.

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Instituto de Biologia, e ao programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, aos quais agradeço na pessoa da Professora Carmen pela organização, e da Andréia por sempre nos socorrer com paciência e prestimosidade.

A FAPESP e ao CNPq pela bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro dos projetos.

RESUMO

O etanol de segunda geração, produzido a partir dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica, apresenta-se como uma alternativa promissora para tornar a matriz energética brasileira sólida e, em grande parte, renovável. A biomassa é composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. Celulose e hemicelulose devem ser hidrolisadas a açúcares monoméricos fermentescíveis para produzir etanol. Entretanto, a tarefa de propor um processo enzimático de hidrólise eficiente e de baixo custo com a finalidade de sacarificar a biomassa é desafiadora, pois os polissacarídeos que a compõem são complexos e recalcitrantes. Embora as hemiceluloses representem cerca de 30% dos açúcares do bagaço da cana-de-açúcar, uma das biomassas mais promissoras para a produção de etanol de segunda geração no Brasil, ainda poucos estudos são direcionados ao estudo da sacarificação dessa fração de polissacarídeos. Hemicelulases são glicosídeo hidrolases que catalisam a hidrólise dos polissacarídeos hemicelulósicos, e que em atuação sinérgica com celulases promove a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar de maneira mais eficiente que as classes de enzimas isoladamente.

A primeira parte dessa dissertação apresenta a caracterização bioquímica e biofísica de uma arabinofuranosidase GH51 do micro-organismo *Bacillus subtilis* 168. α -L-arabinofuranosidases são hemicelulases que hidrolisam terminais não redutores de polissacarídeos contendo arabinose. A AbfA mostrou-se robusta, atuando numa ampla faixa de temperatura, e capaz de liberar monômeros de arabinose hidrolisando 1,5- α -L-arabinoheptaose a partir da extremidade não-redutora. A análise dos dados de SAXS combinada com simulações de dinâmica molecular mostraram que a AbfA em solução é hexamérica, com cada subunidade contendo uma molécula com domínio catalítico em enovelado na forma de barril $(\alpha/\beta)_8$ seguido por um domínio acessório β -sandwich. Esses dados evidenciam que a estrutura quaternária pode ser importante para o desempenho de atividade das arabinofuranosidases da família 51.

A segunda parte da dissertação aborda uma avaliação da influência dos domínios de ligação a carboidratos na atividade de xilanases mesofílicas e termofílicas. Xilanases são hemicelulases que catalisam a hidrólise de ligações endo-1,4- β -D-xilosídicas na molécula de xilano. Fusões gênicas uniram *end-to-end* um CBM6 de *Clostridium thermocellum* aos domínios catalíticos xilanásicos das enzimas GH10 termofílica (de *Thermotoga petrophila*) e GH11 mesofílica (de *Bacillus subtilis* 168). O CBM6 alterou o padrão de hidrólise das quimeras termofílicas e aumentou a constante de eficiência da quimera mesofílica, quando comparadas as enzimas nativas respectivas. Além disso, na hidrólise da biomassa da cana-de-açúcar a xilanase quimérica mesofílica suplementou o coquetel comercial Accellerase 1500, liberando mais açúcares redutores. Dessa forma a fusão ao CBM6 mostrou-se uma alternativa para construir enzimas com melhor desempenho cinético.

ABSTRACT

The second generation ethanol, produced from lignocellulosic biomass polysaccharides, presents itself as a promising alternative to make the Brazilian energy matrix solid and largely renewable. Biomass is composed mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose and hemicellulose must be hydrolyzed in fermentable monomeric sugars to produce ethanol. However, the task of proposing a process for enzymatic hydrolysis efficient and low cost in order to saccharify the biomass is challenging because its polysaccharides are complex and recalcitrant, so it requires the presence of several different catalytic activities for hydrolysis. Although hemicelluloses represent about 30% of sugars from sugarcane bagasse, one of the most promising biomass for the production of second generation ethanol in Brazil, few studies are directed to the saccharification study of this polysaccharidic fraction. Hemicellulases are glycoside hydrolases that catalyze the hydrolysis of hemicellulosic polysaccharides and works synergistically with cellulases promoting the hydrolysis of sugarcane bagasse more efficiently than each one class of enzymes alone.

The first part of this dissertation presents the biochemistry and biophysics characterization of a GH51 arabinofuranosidase from microorganism *Bacillus subtilis* 168. α -L-arabinofuranosidases are hemicellulases that hydrolyze linkages in terminal nonreducing ends of polysaccharides containing arabinose. The AbfA showed itself robust, working in a wide temperature range, and able to release arabinose monomers hydrolyzing 1,5- α -L-arabinoheptaose from the non-reducing end. The analysis of SAXS data in combination with molecular dynamics simulations showed that AbfA solution is hexameric, with each subunit containing a molecule with catalytic domain coiled in the form of barrel (α/β)₈ followed by a β -sandwich domain accessory. These results evidence and corroborate data that the quaternary structure may be important for the activity of GH51 arabinofuranosidases family.

The second part of the thesis addresses an evaluation of the influence of carbohydrate-binding modules, non-catalytic domains of polysaccharides recognition, in the activity of mesophilic and thermophilic xylanases. Xylanases are hemicellulases that catalyze the hydrolysis of endo-1,4- β -D-xylosidic linkages in xylan molecule. Gene fusions joined end-to-end a CBM6 from *Clostridium thermocellum* to catalytic xylanasic domains of enzymes thermophilic GH10 (from *Thermotoga petrophila*) and mesophilic GH11 (from *Bacillus subtilis* 168). The CBM6 changed the hydrolysis pattern of thermophilic chimeras increased the efficiency constant of mesophilic chimera, when compared to the respective native enzymes. Furthermore, in the sugarcane biomass hydrolysis mesophilic chimeric xylanase supplemented the commercial cocktail Accellerase 1500, releasing more reducing sugars. In conclusion, the CBM6 fusion proved itself an alternative to construct enzymes with better kinetic performance.

LISTA DE ABREVIACOES

μ A - Microampere

AbfA - Arabinofuranosidase de *Bacillus subtilis*

Abfases - α -L-arabinofuranosidases

ADNS -  cido 3,5-dinitrosalicílico

APTS -  cido 8-aminopireno-1,3,6-trissulf nico

BL21 - *Escherichia coli* BL21

BSA - Albumina do soro bovino

CAZy - Banco de Dados de Enzimas Ativas em Carboidrato

CAZy - *Carbohydrate Active Enzymes*

CBM - Domínio de liga o a carboidratos

CBM - Módulo de Liga o a Carboidrato

CD - Dicro simo Circular

CXT - quimera da xilanase de *Thermotoga petrophila* com o CBM6 amino-terminal

DCCR - delineamento central composto rotacional

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNS -  cido 3,5-dinitrosalicílico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

DO – Densidade  tica

E.C. – *Enzyme Comission Number*

E.coli - *Escherichia coli*

FD - Fra o Desenovelada

GH - Glicosídeo hidrolases

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa - Kilodaltons

kb - kilobase

kV - kilovolt

LB - Meio Luria-Bertani

ORF - Sequência aberta de leitura

pb – Pares de base

PDB – *Protein Data Bank*

PCR - Rea o em cadeia da polimerase

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

SAXS - Espalhamento de raios X a baixo  ngulo

SOC - Meio de cultura para bactérias

XOS - Xilo-oligossacarídeos

XSC - Quimera da xilanase de *Bacillus subtilis* com o CBM6 carbóxi-terminal

XTC - Quimera da xilanase de *Thermotoga petrophila* com o CBM6 carbóxi-terminal

XTpet - Xilanase GH10 de *Thermotoga petrophila*

XynA - Xilanase GH11 de *Bacillus subtilis*

Sumário

I- Revisão Bibliográfica	13
1.1 Introdução	13
1.2 Reaproveitamento da biomassa da cana-de-açúcar: alternativa para o aumento da produção de bioetanol.....	13
1.3 A biotecnologia aplicada na degradação da biomassa vegetal.....	14
1.3.1 Produção de etanol de segunda geração.....	14
1.3.2 A composição complexa da parede celular requer um coquetel de enzimas para sacarificação.....	14
1.4 Endo-1,4-β-Xilano hidrolases	17
1.5 Arabinofuranosidases.....	19
1.6 Domínios de ligação a carboidratos (CBMs).....	20
1.7 O potencial biotecnológico das hemicelulases.....	21
1.8 A construção de enzimas quiméricas	22
II- Objetivo.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
III – Caracterização de uma α-L-arabinofuranosidase GH51 mesofílica de <i>Bacillus subtilis</i>	24
3.1 Introdução	24
3.2 Metodologia	25
3.2.1 Clonagem do gene da AbfA em vetor de expressão.....	25
3.2.2 Expressão da AbfA recombinante.....	27
3.2.3 Purificação.....	28
3.2.4 Otimizações de pH e temperatura	28
3.2.5 Atividade da AbfA sobre diferentes polissacarídeos.....	29
3.2.6 Eletroforese capilar de oligossacarídeos	30
3.2.7 Dicroísmo circular (CD).....	30
3.2.8 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	30
3.3 Resultados e Discussão	30
3.3.1 Otimizando as condições bioquímicas para a AbfA recombinante.....	30
3.3.2 Modo de ação	33
3.3.3 Caracterização do conteúdo de estrutura secundária por dicroísmo circular	34
3.3.4 AbfA apresenta arranjo hexamérico em solução.....	35

3.4 Conclusão.....	36
IV - Construção de quimeras para avaliação da influência dos domínios de ligação a carboidratos (CBMs) na atividade de xilanases.....	37
4.1 Introdução	37
4.2 Metodologia	37
4.2.1 Construção das ORFs quiméricas.....	37
4.2.2 Clonagem das construções em vetor de expressão.....	39
4.2.3 Expressão das proteínas recombinantes	39
4.2.4 Purificação.....	43
4.2.5 Caracterização bioquímico-cinética parcial	43
4.2.6 Cinética	44
4.2.7 Ensaio de ligação a carboidratos	44
4.2.8 Eletroforese capilar de carboidratos	45
4.2.9 Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar	45
4.3 Resultados e discussão	45
4.3.1 Construção e clonagem das quimeras	45
4.3.2 Testes de expressão e purificação	47
4.3.3 Confirmação da integridade da função do CBM6.....	49
4.3.4 Desempenho bioquímico-cinético.....	50
4.3.5 Caracterização dos produtos de hidrólise de xilano	56
4.3.6 Teste de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	57
4.4 Conclusão.....	58
V - Conclusão Final	60
VI - Referências	61

I- Revisão Bibliográfica

1.1 Introdução

Fato notório na sociedade global contemporânea a crescente convicção de que alternativas aos combustíveis fósseis devem ser buscadas com urgência em prol de um modelo econômico sustentável. Esta conscientização é reforçada por observações de retração das geleiras e aumento da gravidade das catástrofes climáticas. Além disso, a instabilidade no mercado internacional de energia, provocada pelo aumento da demanda energética intrínseca ao crescimento econômico dos países emergentes, corrobora para uma busca ampla e sistemática por fontes de energia que sejam alternativas viáveis aos derivados de petróleo (CERQUEIRA LEITE *et al.*, 2009^a; SOCCOL *et al.*, 2010). No primeiro tópico dessa dissertação o leitor encontrará as bases para entender o papel do bioetanol como uma alternativa promissora de combustível renovável para ser amplamente utilizado na matriz energética mundial e os gargalos dessa empreitada. O tópico traz ainda informações sobre o papel importante desempenhado pelas hemicelulases, enzimas que foram objeto dessa dissertação, que possuem valorosas aplicações biotecnológicas, dentre estas a produção de bioetanol de segunda geração. Os demais tópicos apresentam a metodologia empregada e os resultados obtidos com os trabalhos de mestrado explorando diferentes hemicelulases.

1.2 Reaproveitamento da biomassa da cana-de-açúcar: alternativa para o aumento da produção de bioetanol

O bioetanol de cana-de-açúcar é atualmente a opção de biomassa energética de maior produtividade por área plantada e de melhor balanço energético, que é a razão entre a energia que sai na forma de produto (etanol e energia mecânica, térmica e elétrica) e a energia fóssil consumida na cadeia produtiva. Somam-se a esse fato os dados de (MACEDO, 2005) que apontam para cada m³ de bioetanol consumido uma redução de 2,1 toneladas nas emissões de CO₂. Desse modo, investir na liderança brasileira na produção de etanol representa uma oportunidade estratégica em um cenário de crescente demanda global por energia limpa. Anualmente 20 bilhões de etanol são produzidos através da fermentação da sacarose, obtida a partir da moagem da cana-de-açúcar, e denominado de primeira geração, cujo processo de produção consiste em etapas de extração do caldo da cana-de-açúcar, fermentação, destilação e desidratação (SOCCOL *et al.*, 2010).

Do processo de produção do bioetanol de primeira geração emerge como resíduo uma grande quantidade de material, a biomassa de cana-de-açúcar, que é resultante dos procedimentos de limpeza, preparo (redução por meio de jogos de facas rotativas niveladoras e desfibramento através de jogos de martelos oscilantes) e extração do caldo de cana (por meio de ternos de moagem ou de difusores) (CERQUEIRA LEITE, 2009^b). A biomassa lignocelulósica é composta de duas

principais frações de polímeros, que são constituintes da parede celular da cana de açúcar: celulose, hemicelulose, além de uma macromolécula abundante, a lignina. Na composição do bagaço da cana-de-açúcar se tem, em média, 43% de celulose e 25% de hemicelulose, os quais se sacarificados a monossacarídeos e fermentados podem ser fonte de carbono para a produção de etanol, denominado etanol de segunda geração. Assim, uma tonelada de bagaço, com 50% de umidade, tem o potencial de produção, via hidrólise, de 186 litros de etanol (PANDEY *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2012). Cerca de 90% dessa biomassa lignocelulósica é utilizada nas usinas para queima e cogeração de energia elétrica (MACEDO, 2005). Se o restante de 8% fosse sacarificado e fermentado, a produção de etanol atual de cerca de 6000 litros por hectare cultivado de cana de açúcar passaria a 8200 L/ha. Deve-se considerar ainda a possibilidade de aumentar a eficiência do processo de cogeração de energia e destinar cerca de 50% do bagaço para a produção de bioetanol de segunda geração. Nessa perspectiva a produção de etanol poderia atingir cerca de 10.000 L/ha aumentando a produção de etanol brasileira para 70 bilhões de litros anuais sem aumento de área plantada de cana-de-açúcar (MACEDO, 2005; SOCCOL *et al.*, 2010).

1.3 A biotecnologia aplicada na degradação da biomassa vegetal

1.3.1 Produção de etanol de segunda geração

Para produzir etanol a partir dos polissacarídeos presentes na biomassa faz-se necessário um processo de hidrólise que transforme as cadeias dos polissacarídeos presentes na celulose e hemicelulose em hexoses e pentoses. A hidrólise de materiais lignocelulósicos pode ser realizada via processos químicos (hidrólise ácida) ou biológicos (hidrólise enzimática) (SOCCOL *et al.*, 2010). Comparativamente às rotas químicas, a rota enzimática se apresenta como uma alternativa mais adequada à produção de etanol celulósico, em virtude da possibilidade de se obter rendimentos glicosídicos elevados, ao mesmo tempo em que hidrolisados com reduzida toxicidade aos microrganismos da fermentação são obtidos (NAIK *et al.*, 2010). O uso de enzimas em processos industriais pode eliminar a aplicação de altas temperaturas, solventes orgânicos ou pHs extremos; e ainda pode garantir um aumento da especificidade sob substrato, pureza do produto e redução dos impactos ambientais. Embora notavelmente vantajosa em relação à hidrólise ácida, o alto custo para produzir enzimas ainda é um gargalo para viabilização da produção de bioetanol de segunda geração. A constituição complexa da parede celular das plantas, e conseqüentemente da biomassa, é um entrave à aplicação de uma tecnologia de hidrólise enzimática eficiente (KIM *et al.*, 2009).

1.3.2 A composição complexa da parede celular requer um coquetel de enzimas para sacarificação

As células vegetais possuem dois tipos de parede celular: primária e secundária. A parede celular primária, sintetizada durante os estágios iniciais de desenvolvimento, é composta por

celulose, hemicelulose, polissacarídeos pécicos e algumas proteínas (Figura 1.1). A parede celular secundária é depositada em células completamente desenvolvidas e em tecidos especializados, como as fibras do xilema. Em comparação à parede celular primária, a celulose da parede secundária possui maior grau de polimerização e cristalinidade, o que confere maior resistência à madeira. A dureza desse último tipo de parede é devida em grande parte à deposição dos polissacarídeos e acúmulo de compostos fenólicos (MINIC *et al.*, 2006). Estudos apontam a necessidade de um ataque sinérgico de vários tipos de enzimas, com diferentes atividades catalíticas, para tornar possível e viável economicamente a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis (GILBERT, 2010). A composição por celulose, hemicelulose e pectina varia entre as espécies de planta, o bagaço proveniente da cana-de-açúcar, por exemplo, é composto por cerca de 43% de celulose e 25% de hemicelulose (ROCHA *et al.*, 2012).

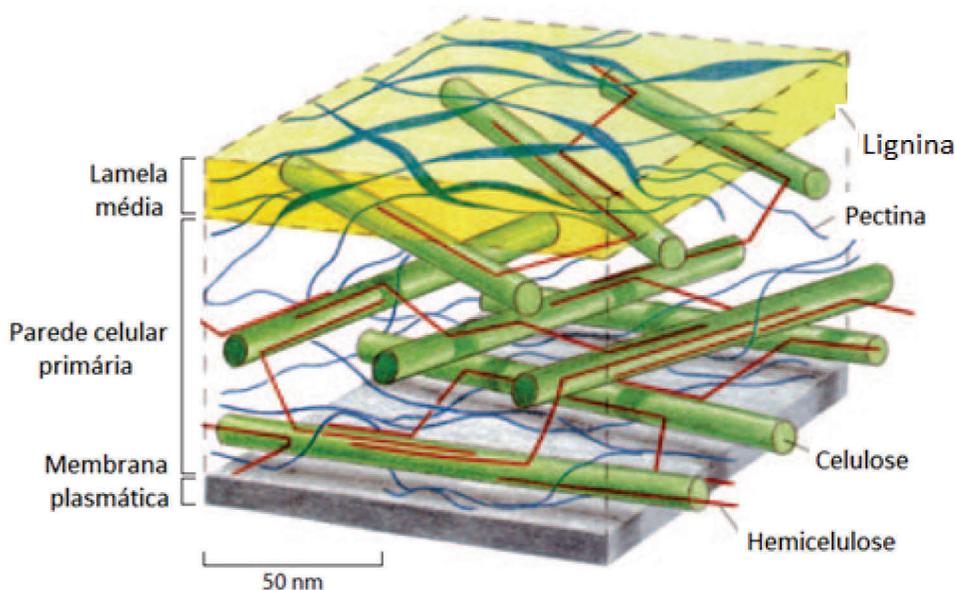


Figura 1.1: Parede celular primária. Adaptado de SCHELLER *et al.*, 2010.

A celulose, o maior componente, consiste em um polímero linear de resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicose. Apresenta-se na forma de microfibrilas e sua principal função é conferir rigidez à parede celular. A celulose é sintetizada na membrana plasmática e então posteriormente depositada na parede celular (MINIC *et al.*, 2006). Esse polissacarídeo que possui regiões de alta cristalinidade e regiões amorfas (não-cristalina) exibe resistência à hidrólise, sobretudo nas regiões cristalinas (ARANTES *et al.*, 2010). A hemicelulose, o segundo constituinte mais abundante da biomassa, é composta por um esqueleto de xilano, e quantidades menores de diversos polissacarídeos contendo glicose, arabinose e manose. A síntese desses polissacarídeos é realizada no complexo de Golgi e dessa organela são excretados para a parede celular. O xilano, presente em maior proporção na

hemicelulose, é formado por uma cadeia principal de resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-D-xilopiranosose substituída com L-arabinofuranose, ácido glicurônico, ácido 4-O-metilglicurônico e cadeias laterais acetil de extensões variadas. Já o xiloglucano tem como esqueleto principal resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicose substituído com xilose, galactose e L-fucose. Os constituintes da hemicelulose interagem com a celulose através de ligações de hidrogênio, contribuindo com o seu papel estrutural (LIMA *et al.*, 2004; GILBERT, 2010). Em menor quantidade estão presentes as pectinas que são heteropolissacarídeos compostos por homogalacturanas, ramnogalacturonas e xilogalacturonas. As cadeias helicoidais desses açúcares interagem com o Ca^{2+} formando zonas de junção que integram várias cadeias numa matriz de característica gelatinosa (VINCKEN *et al.*, 2003; MINIC *et al.*, 2006).

A degradação completa da parede celular até açúcares monoméricos, dada sua complexa constituição, é uma tarefa que depende da ação concertada de várias atividades catalíticas distintas, principalmente celulasas e hemicelulasas (Figura 1.2). As celulasas são responsáveis pela hidrólise da celulose. Essa terminologia congrega enzimas com diferentes atividades catalíticas que podem ser divididas em pelo menos outras três classes: endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (EC 3.2.1.21). As endo-1,4- β -glucanases atacam randomicamente as ligações internas das regiões de celulose amorfa, abrindo sítios de ação para as celobiohidrolases. As celobiohidrolases são também denominadas exoglucanases e removem monômeros e dímeros das extremidades da celulose, atuando inclusive sobre a forma cristalina. Por fim agem as β -glucosidases que hidrolisam a celobiose em duas moléculas de glicose (PÉREZ *et al.*, 2002).

Já o grupo das hemicelulasas congrega uma vastidão ainda mais ampla de classes de glicosídeo hidrolases. A completa degradação do xilano requer a cooperação de várias enzimas hidrolíticas, sobretudo endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), que tem a ação complementada sinergicamente por enzimas acessórias como α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), β -feruloil esterase (EC 3.1.1.73), β -glucuronidase (EC 3.2.1.139) e acetilxilano esterase (EC 3.1.1.72) (HOWARD *et al.*, 2003; GILBERT, 2010).

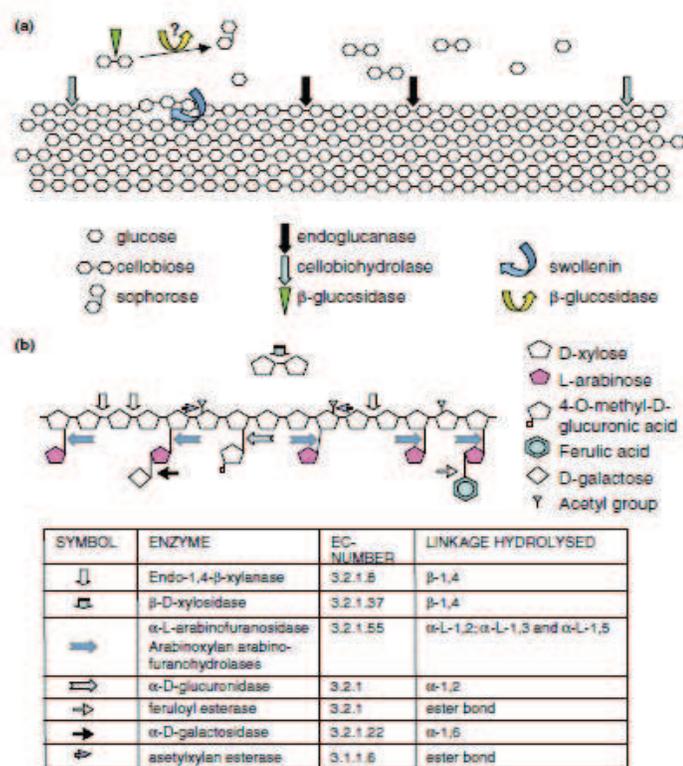


Figura 1.2: Degradação da celulose e hemicelulose. (a) Sistema celulolítico visto esquematicamente. (b) Esquema da degradação de um arabinoxilano. As enzimas estão listadas na tabela inserida. Extraído de ARO *et al.*, 2005.

1.4 Endo-1,4-β-Xilano hidrolases

Xilanases são glicosidases (O-glicosídeo hidrolases) que catalisam a hidrólise de ligações endo-1,4-β-D-xilosídicas em seu substrato, a molécula de xilano. O primeiro relato de xilanases é de 1955, e em 1961 houve o reconhecimento oficial pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, que as denominaram endo-1,4-β-xilanases (E.C. 3.2.1.8). Segundo dados Paes *et al.* (2012), obtidos do servidor *Carbohydrate Active Enzymes (CAZy)* (<http://www.cazy.org/>), constituem um grupo amplo de enzimas ocupando, com base em similaridades na sequência primária, 5 famílias de glicosídeo hidrolases (GH): 5,8,10,11,30. No entanto a maior parte das sequências conhecidas pertence às famílias GH10 e 11 (SHALLOM, D. *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2005). Tipicamente a família 10 tem alta massa molecular e baixo pI, com dobramento do tipo $(\alpha/\beta)_8$, amplamente denominado TIM barril. A família 11 abriga apenas xilanases que possuem menor versatilidade catalítica, ou seja, são mais seletivas com relação ao tipo de substrato (resíduos, tamanho e tipo de ligação). Apresenta como características baixa massa molecular, alto pI e estrutura dobrada em β-jelly roll, onde duas folhas β-pregueadas formam uma camada dupla envolvendo o sítio catalítico (COLLINS *et al.*, 2005). Uma ampla diversidade de organismos são produtores de xilanases incluindo bactérias, algas, fungos, protozoários e artrópodes (BEG *et al.*,

2001; COLLINS *et al.*, 2005) e também em microrganismos que vivem em ambientes extremos (MCCARTHY *et al.*, 2000).

A maioria dos xilanos ocorre como heteropolissacarídeos, contendo diferentes grupos substituintes no esqueleto de resíduos de β -xilopirranose e nas cadeias laterais originadas de ramificações. O grau e a diversidade de ramificações na cadeia de xilano variam. Relatos citam as ramificações por grupos L-arabinosil, D-galactosil, acetil, feruloil e glicuronil como mais comuns (BEG *et al.*, 2001; KNOB *et al.*, 2010). Tem-se conhecimento de que, entre os fatores que dificultam a ação das endo-1,4- β -xilanasas, estão a presença de eventuais substituições por arabinoses, assim como acetilação e ligações cruzadas com compostos fenólicos presentes também na parede celular vegetal. Diante dessa característica de diversidade do xilano e da hemicelulose, vários artigos relatam que para a hidrólise, as endo-1,4- β -xilanasas necessitam de auxílio de muitas outras hemicelulases, numa atuação concertada.

A hidrólise de ligações glicosídicas é realizada por meio de catálise ácida e requer dois resíduos de aminoácidos: um doador de prótons e um nucleófilo (base). Essa hidrólise pode ocorrer por meio de dois mecanismos que são diferenciados pela retenção ou pela inversão da configuração do carbono anomérico. Em ambos os mecanismos a posição do doador de prótons é idêntica, perto o suficiente para formar uma ligação de hidrogênio com o oxigênio glicosídico. Em enzimas que retêm a configuração, a base nucleofílica da catálise é “vizinha” do carbono anomérico do açúcar. As enzimas que invertem a configuração diferem justamente na distância dessa base, que é mais distante do alvo no substrato. Nesse caso, uma molécula de água pode se acomodar no espaço entre o nucleófilo e o açúcar (DAVIES *et al.*, 1995). As famílias GH 10 e 11 possuem dois resíduos de glutamato como doador de prótons e nucleófilo atuando, geralmente, pelo mecanismo de retenção (COLLINS *et al.*, 2005). No caso do mecanismo de retenção (Figura 1.3), na primeira etapa da reação o resíduo de glutamato chamado ácido/base age como um ácido protonando o substrato enquanto o outro resíduo de glutamato agindo como um nucleófilo provoca a partida do grupo de saída e a formação da glicosil-enzima intermediária. Na segunda etapa, o resíduo ácido/base age como uma base retirando um próton de uma molécula de água que ataca então o carbono anomérico da glicosil-enzima intermediária. Assim uma segunda substituição ocorre originando um produto em configuração β , a mesma do substrato (PAËS *et al.*, 2012).

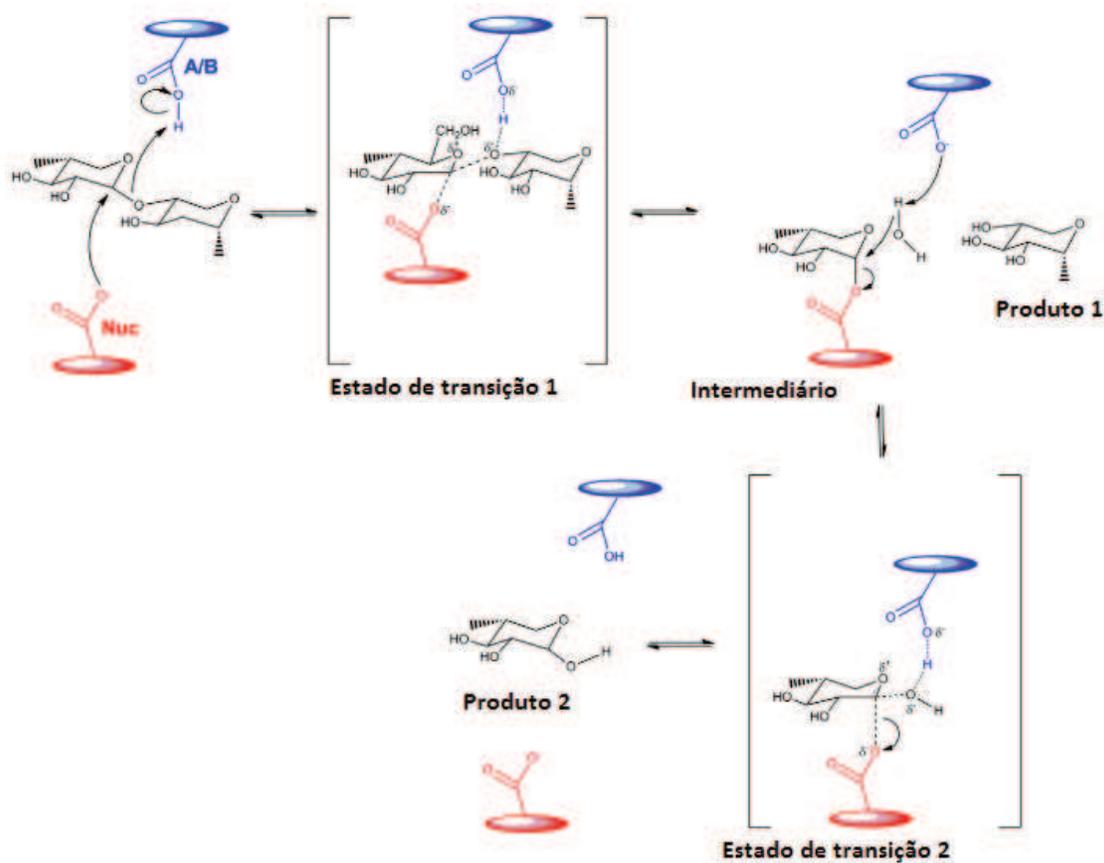


Figura 1.3: Mecanismo de retenção para hidrólise de uma ligação covalente O-glicosídica por uma xilanase. (a) O mecanismo de retenção, em que o oxigênio da ligação glicosídica é protonado por um catalisador ácido (A/B) e o ataque nucleofílico é promovido por uma base (Nuc). A glicosil-enzima resultante (Intermediário) é hidrolisada por uma molécula de água e a segunda substituição no carbono anomérico gera um produto com estereoquímica idêntica àquela do substrato. Adaptado de Paës *et al.* (2012).

1.5 Arabinofuranosidases

α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) são classificadas como exo-hidrolases que removem as cadeias laterais de polissacarídeos que contenham resíduos de arabinose em ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,5 ligados à cadeia principal, comumente composta por arabinose (arabinanas) ou xilose (arabinoxilanos). No CAZy (Carbohydrate-Active enzyme, <http://www.cazy.org/>) α -L-arabinofuranosidases são encontradas em seis famílias de glicosídeo hidrolases: 3, 10, 43, 51, 54 e 62 (NUMAN *et al.*, 2006). A arquitetura estrutural e a presença de domínios auxiliares implicam no reconhecimento de diferentes ligações e substratos. Essas famílias possuem estruturas tridimensionais características e hidrolisam eficientemente tipos diferentes de polissacarídeos contendo arabinoses. Como exemplo, pode-se citar a família GH62, que atua apenas sobre arabinoxilanos e não possui atividade em pNPA (substrato sintético específico para α -L-arabinofuranosidases). A família GH51 reúne tanto enzimas que possuem alta atividade em *sugar*

beet (arabinana substituída por arabinoses nas posições O-2 e O-3) e baixa atividade em arabinana desramificada (BEYLOT *et al.*, 2001), como enzimas que apresentam alta atividade em arabinana desramificada (debranched arabinan) e baixa atividade em *sugar beet* (TAYLOR *et al.*, 2006). Embora os mecanismos moleculares estruturais associados à essa diferença funcional permaneçam obscuros, Taylor e colaboradores (2006) trabalhando com uma arabinofuranosidase GH51 de *Clostridium thermocellum* demonstraram em oligossacarídeos curtos que as constantes cinéticas são similares ao hidrolisar ligações do tipo α -1,5 e α -1,3.

As arabinofuranosidases integram o quadro chamado de enzimas acessórias juntamente com arabinanases, mananases e acetil xilano esterases, dentre outras. Estudos recentes vêm demonstrando o papel essencial desse tipo de enzimas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, inclusive na redução dos custos de conversão de biomassa em biocombustíveis. Arabinofuranosidases são as enzimas mais estudadas para complementação sinérgica da atividade de xilanases. De fato ALVIRA *et al.* (2011) demonstraram que ao suplementar uma mistura comercial de celulases com uma arabinofuranosidase de *Aspergillus niger* e uma xilanase de *Aspergillus nidulans* taxas de hidrólise 10% maiores de açúcares redutores foram obtidas, mostrando o potencial dessa enzima para aumentar a eficiência de hidrólise. A possibilidade de hidrólise de diferentes tipos de ligação com a mesma eficiência torna a família GH51 uma ótima classe de enzimas para suplementação de coquetéis fúngicos e comerciais para degradação da biomassa, pois nela uma mistura complexa de polissacarídeos está presente. Nesse contexto estudos correlacionando função e estrutura dessa classe de enzimas com vistas ao esclarecimento dos mecanismos moleculares de sua atuação é de grande interesse biotecnológico.

1.6 Domínios de ligação a carboidratos (CBMs)

Uma das características mais significativas das enzimas que degradam a parede celular de plantas é sua complexa arquitetura molecular onde domínios catalíticos em muitos casos estão “anexados” a domínios não-catalíticos (CBMs) (GILBERT, 2010). Os domínios não-catalíticos de reconhecimento de polissacarídeos foram originalmente chamados de CBDs (*Cellulose-binding domains*) porque os primeiros exemplos descobertos desses domínios de proteínas se ligavam à celulose (BORASTON *et al.*, 2004). Similarmente às glicosídeo hidrolases, os CBMs são classificados em famílias pelo CAZy e atualmente existem cerca de 64 famílias de CBMs baseando-se na estrutura primária e na função biológica desempenhada. Certas famílias reconhecem apenas polissacarídeos cristalinos e o ligante é invariável (CBM1, CBM10, CBM20), enquanto outras contêm proteínas que se ligam a polissacarídeos hemicelulósicos cujo ligante é altamente variável (CBM6, CBM35) (GILBERT, 2010).

Sabe-se que os CBMs potencializam a atividade dos módulos catalíticos e embora nos últimos anos venha aumentando o conhecimento da comunidade científica sobre o funcionamento das glicosídeo hidrolases, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está esclarecido. Algumas hipóteses sugerem que os CBMs tenham uma ou mais das seguintes funções: aumentar a concentração de enzimas na superfície do substrato, provocar a ruptura não-hidrolítica do substrato ou modificar as interações superficiais entre enzima e polissacarídeo (PAËS *et al.*, 2012). Embora existam vários relatos da alteração e melhoria da atividade de celulasas pela ligação de um CBM à enzima (KIM *et al.*, 2010), pouco foi estudado em relação à xilanases e os poucos relatos por vezes ligam à xilanases CBMs que não são ligantes de polissacarídeos hemicelulósicos (VAN GOOL *et al.*, 2012).

1.7 O potencial biotecnológico das hemicelulasas

Embora o foco atual das aplicações de hemicelulasas em indústrias esteja voltado ao bioetanol de segunda geração, diversos outros produtos de maior valor podem ser obtidos a partir da hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica em uma biorrefinaria. Não somente etanol pode ser produzido, como também fumarato, succinato, malato, aspartato, glutarato, glutamato, hidróxibutirolactona, glicerol, sorbitol, xilitol e arabinitol, os quais podem ser convertidos, por via química ou biológica, em componentes de alto valor agregado, e com vastas aplicações na indústria têxtil, alimentícia, automobilística, entre outras. Outra possibilidade é a produção de xilooligosacarídeos por ação das endoxilanases sobre a hemicelulose. Esse composto tem alto valor nutracêutico, pois previne a proliferação de microrganismos patogênicos na microflora intestinal, facilitando absorção de nutrientes e prevenindo doenças. As enzimas xilanolíticas, por exemplo, são utilizadas por indústrias de papel em processos de branqueamento da polpa de celulose. O pré-tratamento da polpa *kraft* com xilanases reduz a utilização de compostos químicos tóxicos nos passos posteriores. Nas indústrias alimentícias as xilanases participam de processos de extração e clarificação de sucos, elevando a qualidade do produto final. Em cervejarias, xilanases, arabinofuranosidas e β -xilosidas são aplicadas para solubilização dos arabinoxilanos que causam turbidez na cerveja. Em indústrias de vinho, hemicelulasas são utilizadas juntamente com celulasas para reduzir a concentração de β -glucanos que aumentam a viscosidade do vinho e prejudicam a etapa de filtração. Outras aplicações potenciais de hemicelulasas incluem processos como fabricação de café, extração de óleos vegetais e amido, fabricação de detergentes, dentre outros (COUGHLAN *et al.*, 1993; KULKARNI *et al.*, 1999; SHALLOM, DALIA *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2005; KNOB *et al.*, 2010).

1.8 A construção de enzimas quiméricas

A hidrólise de biomassa lignocelulósica requer a ação coordenada de múltiplas enzimas. Dessa maneira, engenheirar enzimas multifuncionais e mais eficientes é um instrumento para reduzir o número de polipeptídios necessários na etapa de hidrólise e, conseqüentemente, reduzir os custos do processo (ADLAKHA *et al.*, 2011). Um aspecto chave na construção de enzimas quiméricas é preservar ou melhorar as características catalíticas das enzimas parentais. A fusão *end-to-end* é amplamente usada como mecanismo de construção de genes quiméricos, embora a união entre o N (amino) e o C (carbóxi) terminal das enzimas parentais possa originar enzimas sem funcionalidade devido a problemas no enovelamento ou mesmo impedimento estérico entre os domínios catalíticos das enzimas parentais. A inserção de um *linker* entre o sítio de fusão é amplamente usada para aumentar a flexibilidade entre os domínios e manter a funcionalidade das enzimas nativas (FAN *et al.*, 2009^a; FAN *et al.*, 2009^b; RIBEIRO *et al.*, 2011).

II- Objetivo

2.1 Objetivo geral

Estudos funcionais e estruturais de arabinofuranosidases e xilanases no desenvolvimento de enzimas multifuncionais com foco no aumento da eficiência de conversão de biomassas vegetais.

2.2 Objetivos específicos

a) Clonagem, expressão e caracterização bioquímica e biofísica de uma arabinofuranosidase GH51 de *Bacillus subtilis* 168 (tópico III).

b) Construção de enzimas multifuncionais e avaliação do perfil bioquímico das hemicelulases engenheiradas em comparação ao desempenho do correspondente nativo enzimas de ocorrência natural que foram modificadas (tópico IV).

- Construção das seguintes enzimas:

XTC: Módulo catalítico de uma endo-1,4- β -xilanase termofílica (GH10_ *Thermotoga petrophila*) fusionada ao CBM6 (*Carbohydrate Binding Module*), provindo da ORF que codifica uma endoxilanase GH10 de *Clostridium thermocellum*, por meio de um linker natural selecionado em uma laminarase de *Thermotoga petrophila*;

CXT: A construção anterior invertendo a posição do CBM6 para a região inicial do gene. A proteína quimérica possuirá o CBM6 na posição N-terminal;

XSC: Módulo catalítico de uma endo-1,4- β -xilanase mesofílica (GH11_ *Bacillus subtilis*) fusionada ao CBM6 (*Carbohydrate Binding Module*).

- Testes de expressão das proteínas quiméricas, expressão, purificação e caracterização bioquímica em comparação aos módulos individuais (tipo selvagem);
- Testes de hidrólise de biomassa.

III – Caracterização de uma α -L-arabinofuranosidase GH51 mesofílica de *Bacillus subtilis*

3.1 Introdução

α -L-arabinofuranosidases (Abfases) (EC 3.2.1.55) são enzimas que hidrolisam terminais não redutores de polissacarídeos hemicelulósicos contendo resíduos de arabinose (item 1.5, Revisão bibliográfica). Inácio *et al.* (2008) investigaram algumas propriedades bioquímicas de duas arabinofuranosidases de *Bacillus subtilis*, ambas pertencentes à família GH51, Xsa e AbfA. Os resultados obtidos apontaram que a Xsa foi mais ativa em arabinana ramificada (*sugar beet* fonecido pela Megazyme) que em arabinana linear. Esse resultado é esperado uma vez que o *sugar beet* possui mais resíduos de arabinose em terminais não-redutores. Entretanto, a outra arabinofuranosidase (AbfA) foi mais ativa em arabinana desramificada (*debranched arabinan*) que em *sugar beet*. Esse fato indica a existência de preferências distintas por polissacarídeos contendo arabinose em enzimas da mesma família de glicosídeo hidrolases e revela mecanismos moleculares ainda desconhecidos para a relação entre estrutura e função para essa família.

Apesar desses resultados de atividade em polissacarídeos, Taylor e colaboradores (2006) mostraram que uma enzima GH51 de *Clostridium thermocellum* mais ativa em *debranched arabinan* foi capaz de hidrolisar oligossacarídeos curtos que simulam tanto trechos da molécula de *sugar beet* quanto da molécula de *debranched arabinan* com constante de eficiência similares (K_{cat}/K_m). Esse resultado é ótimo do ponto de vista biotecnológico, principalmente para a hidrólise de biomassa, pois polissacarídeos compostos por vários tipos de ligações estão presentes. De fato, a AbfA de *Bacillus subtilis*, objeto de estudo desse tópico, mostrou ótima performance na complementação do coquetel de hidrolases produzido pelo fungo *Trichoderma harzianum* P49P11 (DELABONA *et al.*). AbfA conjuntamente com a enzima pectinase aumentaram a quantidade de açúcares liberados em experimentos de hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar.

Nesse contexto, estudos correlacionando aspectos estruturais e funcionais da família GH51 podem ser relevantes para aplicações biotecnológicas, fornecendo bases para que a engenharia de proteínas desenvolva nessa família de enzimas alta eficiência sobre diferentes tipos de ligações entre polissacarídeos. Desse modo, esse tópico trata de estudos fundamentais de bioquímica e biofísica, com a finalidade de caracterizar a AbfA de *Bacillus subtilis*.

3.2 Metodologia

3.2.1 Clonagem do gene da AbfA em vetor de expressão

As etapas a seguir relatadas foram executadas para a obtenção da sequência aberta de leitura da AbfA em vetor de expressão de proteínas pET28a[®], seguindo as orientações gerais de Sambrook *et al.* (1989).

3.2.1.1 Amplificação da sequência aberta de leitura

Iniciadores específicos para a sequência aberta de leitura codificante da AbfA de *Bacillus subtilis* foram desenhados e sintetizados (Sigma-Aldrich) (*Forward*: 5'-TATAGCTAGCATGAAAAAAGCGCGAAT-3' e *Reverse*: 5'-TATAGGATCCTTATGACTGTTTTTTCAG-3'). A sequência foi amplificada utilizando como molde o DNA genômico extraído de *Bacillus subtilis* linhagem 168 seguindo metodologia padrão da reação de PCR [1X tampão *Phusion*, 0,2 µM dNTP mix, 10pM de cada oligonucleotídeo, 5U de Taq polimerase *Phusion*, 50 ng de DNA genômico, 0,75 µL de DMSO 100% e H₂O q.s.p.].

3.2.1.2 Digestão do vetor de expressão

1µg de vetor pET28a[®] (Novagen) diluído em água MilliQ estéril foi adicionado a uma mistura contendo 1x tampão NE4, 20U da enzima *Bam*HI, 20U da enzima *Nhe*I (New England BioLabs), 100 ng/mL de BSA e H₂O q.s.p. em volume final de reação de 100µL. A reação de digestão foi incubada a 37°C por 1 hora e 30 min e então elevou-se a temperatura para 70°C por 10 min. Após a restrição o vetor foi desfosforilado, adicionou-se à mistura contendo o vetor digerido a enzima CIAP (1h e 30 min). A amostra proveniente de dupla digestão e desfosforilação com CIAP, foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, sob uma voltagem constante (90V) durante 50min para completa separação entre as formas linear e superenovelada. A banda correspondente à forma linear do vetor foi extraída do gel corado com brometo de etídio (0,5 ng/mL), após visualização em luz U.V., e purificada com o Kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O vetor linearizado foi ressuspensionado em água MiliQ e quantificado em Nanodrop, resultando em cerca de 20 ng/µL de DNA.

3.2.1.3 Digestão do fragmento de PCR

Os fragmentos amplificados na reação de PCR (3.2.1.1) prosseguiram em dupla digestão com *Nhe*I e *Bam*HI conforme item 3.2.1.2 para formar extremidades compatíveis com o vetor preparado. A quantificação em Nanodrop resultou em uma diluição em torno de 40,0 ng/µL de DNA para os fragmentos.

3.2.1.4 Ligação dos fragmentos clivados ao vetor pET28a[®]

As reações de ligação dos fragmentos da AbfA ao vetor pET28a[®] foram feitas com 10 ng de vetor (5,6kb) e quantidade do DNA variável e dependente do tamanho do inserto, segundo as recomendações do fabricante da enzima T4 DNA ligase Blue (Promega). A reação continha além do vetor e do inserto, 1x tampão de ligase, água MiliQ q.s.p. 20µL e T4 DNA (Promega) a 0.4 unidades Weiss/ µL. A reação foi incubada *overnight* em temperatura ambiente.

3.2.1.5 Transformação de células *Escherichia coli* DH5α competentes

Células de *E.coli* DH5α foram inoculadas em placa contendo meio LB sólido e incubadas a 37°C por 12 h. O pré-inóculo foi feito com uma colônia proveniente dessa placa inoculada em 5 mL de meio LB líquido e crescida a 37°C com agitação de 200 rpm. O volume de 5 mL foi transferido para 500 mL de meio LB líquido. A cultura cresceu a 37°C sob agitação constante de 200 rpm, até que sua D.O. em 600nm atingisse 0,4. Em seguida, transferiu-se toda cultura para tubos de centrifuga estéreis a 4°C. Após ser incubada no gelo por 10 min a cultura foi centrifugada 10 min a 4000 g. O sedimentado de células foi ressuscitado em 10 mL de uma mistura cálcio/glicerol (CaCl₂ 100 mM, glicerol 10%), incubado 15 min no gelo e novamente centrifugado 10 min a 4000 g. As células sedimentadas foram ressuscitadas em 4 mL da mistura cálcio/glicerol, distribuídas em alíquotas de 50µL e congeladas instantaneamente em N₂ líquido para armazenamento por até 60 dias a -80°C. A transformação das células foi feita nas alíquotas de 50µL de células competentes estocadas, descongeladas a 4°C. O produto da reação de ligação foi adicionado às células Ca²⁺ competentes. A mistura de células e DNA foi incubada 30 min em gelo. Após decorrido o tempo, a mistura foi submetida ao choque térmico (2min a 42 °C seguindo-se 2 min no gelo), regeneradas pela adição de 1mL de meio LB líquido SOC e incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação (200rpm). As células foram então centrifugadas por 2 min a 8000 g e o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de LB para plaqueamento em placas de petri contendo meio LB sólido e Kanamicina (50µg/mL).

3.2.1.6 Seleção e confirmação de clones positivos

Colônias foram selecionadas na placa de DH5α crescidas *overnight* em meio LB sólido seletivo e analisadas por meio da técnica de PCR de colônia para a identificação dos clones transformados recombinantes com pET28a+AbfA. A reação baseou-se na mistura em um volume final de reação de 30µL contendo 28 µL de um mix [1X tampão *Phusion*, 0,2 µM dNTP mix, 10pM de cada oligonucleotídeo, 5U de Taq polimerase *Phusion*, 0,75 µL de DMSO 100% e H₂O q.s.p.] e 2 µL de H₂O estéril onde foram lançadas as colônia selecionadas na placa individualmente. As reações prosseguiram em termociclador Vapoprotect (Eppendorf) nas condições: passo 1 - 98°C/3 min; passo 2 - 98°C/40 s, 55°C/40 s, 72°C/1 min 30 s; passo 4 - 72°C/ 15 min. O passo 2 foi repetido 30 vezes. O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1% utilizando como padrão o

marcador 1Kb *plus DNA Ladder* (Invitrogen) e as colônias positivas, cujas bandas eram coerentes com o tamanho esperado para o inserto clonado, foram inoculadas em 5mL de meio LB líquido e incubadas por 12 h a 37°C em agitação a 200 rpm. O DNA plasmidial dos clones confirmados foi extraído com o *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial foi digerido conforme item 3.2.1.2 com o objetivo de confirmar o tamanho do inserto e posteriormente sequenciado. Confirmada a clonagem o DNA plasmidial das construções corretas foi armazenado a 20°C para testes posteriores.

3.2.2 Expressão da AbfA recombinante

3.2.2.1 Transformação de Linhagem de expressão

Células de *E.coli* linhagem BL21 foram transformadas utilizando-se choque térmico. As células competentes foram preparadas e transformadas conforme já descrito anteriormente no item 3.2.1.5, alterando-se apenas a linhagem de trabalho. O DNA plasmidial utilizado para transformação foi proveniente do passo 3.2.1.6. O sistema de expressão do vetor pET28a é baseado no Operon Lac e no promotor T7 de origem viral, sendo considerado eficiente para expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*, além disso insere no fragmento clonado uma cauda de histidinas (*His-tag*) que permite a purificação por afinidade baseada em níquel com a recuperação de grande quantidade da proteína heteróloga em grau elevado de pureza.

3.2.2.2 Testes de expressão da proteína heteróloga

Uma colônia da linhagem de expressão transformada em *E.coli* foi selecionada em meio LB sólido seletivo foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo Kanamicina (50µg/mL) e incubada a 37°C e 200 rpm durante 12 horas. Esse pré-inóculo foi lançado em 50 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de kanamicina. Acompanhou-se a densidade ótica (D.O.) da cultura em comprimento de onda igual a 600 nm até que se atingisse D.O. de 0,8. Adicionou-se então concentração final de 0.5 mM de indutor IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) e coletou-se 1 mL da cultura para acompanhar a indução por meio de SDS-PAGE, utilizando o marcador de peso molecular *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas *Life Sciences*). Esse foi considerado o tempo zero. Amostras de 1mL também foram coletadas em tempos iguais a 2h e 5h. Atingido o tempo de 5h as culturas foram centrifugadas a 7000 g por 20 min e o sobrenadante descartado, uma vez que esse sistema de expressão não secreta as proteínas heterólogas. O precipitado foi ressuscitado em 5 mL de tampão de lise (50mM de fosfato de sódio pH 7,2, benzamidina 1mM, PMSF 1mM, NaCl 0,1M e lisozima 0,3 mg/mL). Essa mistura foi incubada a 30°C por 30 min e então sonicada em sonicador da marca Sonics 7 vezes por 10s com intervalos de 40 segundos utilizando-se 40% da amplitude do aparelho. O lisado foi novamente centrifugado a 16000 g por 30 min e os sobrenadantes de cada cultura transferidos para tubos de 15 mL. Amostras

de cada tempo coletado, do *pellet* e do sobredante do lisado ao fim do tempo de cultivo foram analisadas em SDS-PAGE 12%.

3.2.2.3 Expressão das proteína heteróloga em média escala

A linhagem apropriada de *E.coli* BL21 foi selecionada no teste de expressão e então 500mL de cultura foram ampliados segundo a metodologia do item 4.3.2.2.

3.2.3 Purificação

A purificação do sobrenadante de cultura lisada foi feita por passos de cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose e sequencialmente uma cromatografia de exclusão molecular. O sobrenadante do lisado obtido por meio da expressão, cerca de 20 mL, foi centrifugado a 16000 g por 20 min e incubado com 1 mL de resina de Níquel Sepharose *High Performance* (GE *Life sciences*) equilibrada previamente com tampão fosfato (20 mM, pH 7,4, 300mM NaCl, 20 mM imidazol) durante 1 h a 4°C. A purificação prosseguiu em condições atmosféricas com fluxo não controlado. A resina foi lavada com 15 mL de tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, 300mM NaCl, 40 mM imidazol e as proteínas recombinantes foram eluídas em 10 mL de tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, 300mM NaCl, 200 mM imidazol. As amostras da cromatografia de afinidade consideradas puras por verificação em SDS-PAGE foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em concentradores Vivaspin 20 (GE *Life sciences*) com massa de corte de 10 kDa até o volume ser reduzido a cerca de 2 mL. Esse volume foi injetado na coluna de exclusão molecular, que prosseguiu em tampão fosfato 20mM pH 7,4 50 mM de NaCl. As frações contendo as proteínas de interesse foram reunidas e concentradas. A absorção foi obtida a 280 nm em Nanodrop e a concentração molar das proteínas foi estimada por meio do coeficiente de extinção molar teórico calculado pelo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.2.4 Otimizações de pH e temperatura

Para otimizar *in vitro* as condições de reação para a AbfA um delineamento central composto rotacional (DCCR) seguindo a metodologia de superfície resposta foi executado. As variáveis independentes analisadas foram o pH e a temperatura (k=2) com três pontos centrais, totalizando 11 experimentos (Tabela 3.1). Para predizer o ponto ótimo, uma função polinomial de segunda ordem foi ajustada com os resultados experimentais obtidos:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_{21} + b_{22}X_{22}$$

onde Y é a resposta predita (atividade de arabinofuranosidase); X₁ e X₂ são as formas codificadas das variáveis analisadas (pH e temperatura, respectivamente); b₀ é uma constante; b₁ e b₂ são os coeficientes lineares; b₁₂ é o coeficiente de interação entre as variáveis independentes; b₁₁ e b₂₂ são os coeficientes quadráticos. Todos os ensaios enzimáticos de arabinofuranosidase (0.5µg/mL

nas reações) para o DCCR foram feitos usando p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (pNPA₆; Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,5 mM. As análises relacionadas com essa metodologia foram executadas utilizando o *software* STATISTICA (versão 10.0/ Statsoft).

Tabela 3.1: Desenho experimental para otimizar a atividade da AbfA por meio da metodologia de superfície de resposta. Os valores codificados do delineamento central composto rotacional são indicados entre parênteses.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade experimental (U/mg)
1	4,7 (-1)	17,0 (-1)	11,01
2	8,3 (1)	17,0 (-1)	5,43
3	4,7 (-1)	53,0 (1)	1,98
4	8,3 (1)	53,0 (1)	17,33
5	4,0 (-1,41)	35,0 (0)	0,00
6	9,0 (1,41)	35,0 (0)	9,78
7	6,5 (0)	10,0 (-1,41)	16,00
8	6,5 (0)	60,0 (1,41)	35,68
9	6,5 (0)	35,0 (0)	57,43
10	6,5 (0)	35,0 (0)	57,73
11	6,5 (0)	35,0 (0)	56,68

O pH ótimo também foi determinado em dois experimentos univariados independentes utilizando debranched arabinan e sugar beet como substratos (Megazyme International) (0,5% m/v). A temperatura univariada foi feita em debranched arabinan (0,5% m/v) no pH 6,0. A quantificação de açúcares redutores liberados desses polissacarídeos seguiu o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Todos os ensaios foram padronizados para o volume reacional de 100 μ L e as pipetagens foram executadas em um sistema robótico automatizado (liquid handler epMotion – Eppendorf Corp.).

3.2.5 Atividade da AbfA sobre diferentes polissacarídeos

A atividade da enzima recombinante foi testada em *sugar beet*, *debranched arabinan* e em *linear arabinan* (Megazyme International). Todos os substratos foram preparados a 0,5% (m/v) e os ensaios foram feitos em tampão citrato-fosfato pH 6,0 a 50°C. A quantidade de açúcares foi medida conforme o item 3.2.2.

3.2.6 Eletroforese capilar de oligossacarídeos

O substrato 1,5- α -L-Arabinoseptose (Megazyme International) foi derivatizado com ácido 8-aminopyreno-1,3,6-trissulfônico (APTS) por aminação reductiva. Os produtos de hidrólise da 1,5- α -L-Arabinoseptose foram analisados por eletroforese capilar no instrumento P/ACE MQD instrument (Beckman Coulter, Inc) equipado com detector de fluorescência induzida por *laser*. As condições de eletroforese foram 15 kV/70–100 μ A à temperatura de 20°C em tampão fosfato de sódio (40 mM; pH 2,5). Todos os oligômeros marcados com APTS foram excitados a 488 nm e suas emissões foram coletadas a 520 nm.

3.2.7 Dicroísmo circular (CD)

Espectros de dicroísmo circular no UV-distante foram coletados em um espectropolarímetro (Jasco International Co. Ltd.) equipado com uma unidade de controle de temperatura Peltier na faixa de comprimentos de onda entre 195-250 nm a diferentes temperaturas com taxa de aquecimento de 1°C por min, com o objetivo de monitorar mudanças na estrutura secundária. A proteína foi diluída apropriadamente para 0,2 mg/mL em tampão fosfato de sódio (50 mM pH 7,4). Os demais parâmetros utilizados foram padrões do aparelho.

3.2.8 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Experimentos de SAXS com a AbfA recombinante foram realizados para determinar seu estado e arranjo oligomérico em solução. Os dados foram coletados na linha de Luz Síncrotron SAXS2 no LNLS com o auxílio de colaboradores. Duas concentrações foram coletadas, 1 e 6 mg/mL (verificadas como monodispersas), em tampão fosfato de sódio (20 mM; 50 mM de NaCl; pH 7,4). O comprimento de onda foi fixado em 1,48 Å e um detector MarCCD de 165 mm foi utilizado para gravar os padrões de espalhamento. A distância da amostra ao detector foi configurada em 1022,5 mm originando vetores de espalhamento de 0,013 a 0,33 Å⁻¹. Os padrões de SAXS foram integrados utilizando o *software* Fit2D e as curvas foram escalonadas pela concentração de proteína. A massa molecular e o número subunidades em solução foram estimadas usando o procedimento implementado na ferramenta SAXSmow (disponível em <http://www.if.sc.usp.br/~saxs/>) (FISCHER *et al.*, 2010).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Otimizando as condições bioquímicas para a AbfA recombinante

A AbfA foi clonada com êxito no vetor pET28a. A proteína heteróloga foi expressa e uma banda única foi obtida no SDS-PAGE após os passos de purificação em coluna de níquel e exclusão molecular (Figura 3.1). Essa enzima purificada foi submetida aos ensaios bioquímicos e biofísicos a seguir apresentados.

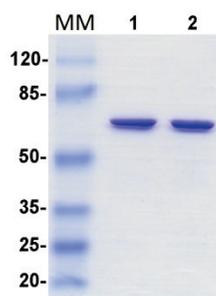


Figura 3.1: Etapas de purificação cromatográfica da AbfA recombinante. MM indica o marcador de massa molecular e a banda única é a AbfA (59,5 kDa) após passos de purificação em coluna de afinidade baseada em níquel (pista 1) e polimento em gel filtração (pista 2).

O modelo ajustado, para prever as melhores condições de reação para a AbfA, investigando simultaneamente uma faixa de pH e uma faixa de temperatura de acordo com a metodologia de superfície de resposta em valores codificados foi:

$$Y_{\text{Atividade (U/mg)}} = 57,28 - 27,8\text{pH}^2 - 17,33T^2$$

Essa equação foi reparametrizada para incluir apenas os termos significativos no modelo polinomial, observando apenas os coeficientes com *p*-valor menor que 0,05 (alfa *a priori* de 5%) no teste t. A análise de variância para esse modelo é dada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Análise de variância do modelo quadrático para a atividade de AbfA (U/mg).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F*
Regressão	4882,2	2	2441,1	42,5
Resíduo	459,9	8	57,5	
Total	5342,1	10		

Coefficiente de correlação = 0,92

* $F_{0,05; 2,8} = 4,46$

Como o $F_{\text{calculado}}$ (42,5) foi maior que o F_{tabelado} , H_0 é rejeitada, ou seja, o modelo é capaz de prever o comportamento experimental da atividade da AbfA. Foi também determinado o coeficiente de correlação para o modelo igual a 92%. Uma validação foi feita no ponto ótimo, pH=6,6 (codificado 0,065) e T(°C)=37,0, e confirmou a boa correlação dos valores preditos pelo modelo aos valores experimentais Tabela 3.1, com diferença menor que 10% entre o valor predito pelo modelo e o valor medido experimentalmente no ponto ótimo. Como pode ser visto na superfície de resposta e nas linhas de contorno Figura 3.2 mais de 90% da atividade da AbfA recombinante foi detectada na faixa de temperatura entre 35°C e 50°C. Esse resultado está de acordo com o que foi obtido com a curva univariada de temperatura, onde apenas pequenas diferenças foram observadas na faixa citada utilizando arabinana desramificada como substrato. Essa

observação é valiosa para processos biotecnológicos uma vez que a atividade se mantém em torno do ótimo em uma faixa ampla de temperatura mesofílica, ideal para a utilização na suplementação de coquetéis de enzimas fúngicas.

Em adição, curvas univariadas de pH (Figura 3.2) foram feitas usando *debranched arabinan* e *sugar beet* como substratos e os resultados novamente mostram a atividade ótima em pH 6,5, o mesmo obtido com a superfície de resposta. Inácio e colaboradores (2008) reportaram atividade ótima para a AbfA em pH 8,0. Esse valor diverge tanto daquele obtido com a superfície de resposta (em pNPA) quanto do obtidos com as curvas univariadas de pH em polissacarídeos. Em ambos experimentos o pH ótimo obtido foi de 6,5 e está amplamente de acordo com aqueles já relatados para outras arabinofuranosidases GH51 na literatura como para *Penicillium chrysogenum* (pH5.0) (SAKAMOTO *et al.*, 2003), *Pseudomonas cellulosa* (pH 5.5) (BEYLOT *et al.*, 2001), *Thermotoga petrophila* (pH 6.0) (DOS SANTOS *et al.*, 2011), *Thermobacillus xylanilyticus* (pH 5.6-6.2) (DEBECHE *et al.*, 2000) e outros (NUMAN *et al.*, 2006).

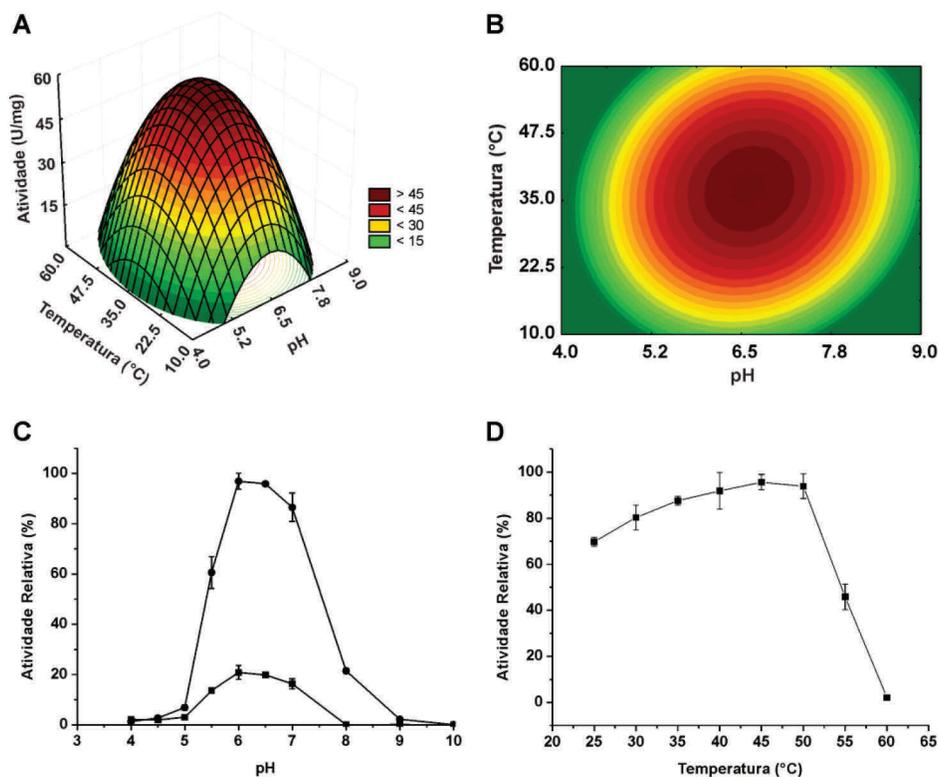


Figura 3.2: Otimização de pH e temperatura. A e B: Superfície de resposta da atividade da AbfA (U/mg) e linhas de contorno, respectivamente. O ponto ótimo foi temperatura a 37°C e pH 6,6, com todos os ensaios feitos no substrato pNPA. C: Perfil de curvas univariadas de pH utilizando polissacarídeos como substratos. O melhor pH ficou em torno de 6,5 tanto em *sugar beet* (quadrados) quanto em *debranched arabinan* (círculos). A maior atividade foi detectada em *debranched arabinan* independente do pH. D: Perfil de temperatura univariado utilizando *debranched arabinan* como substrato.

3.3.2 Modo de ação

Inácio *et al.* (2008) encontraram a maior atividade da AbfA de *Bacillus subtilis* em arabina linear (Megazyme). Testou-se outros polissacarídeos e apenas em três atividade foi detectada (Tabela 3.3) embora pequenos níveis de atividade tenham sido encontrados em xilano *beechwood* e *rye* arabinóxilano. A maior atividade foi encontrada em *debranched arabinan*.

Tabela 3.3: Atividade na hidrólise de diferentes polissacarídeos.

Polissacarídeo	Glicose equivalente ($\mu\text{mol/mL}$)
<i>Debranched Arabinan</i>	1.66 \pm 0,05
Arabinana linear	0.59 \pm 0,02
<i>Sugar beet</i>	0.40 \pm 0,05

Com o objetivo de avaliar a atividade de AbfA sobre resíduos terminais de arabinose, os produtos de quebra de arabinoheptaose foram identificados por CE (Figura 3.3). Na ausência de enzima (controle negativo) apenas o pico da arabinoheptaose é identificado. Durante a reação de hidrólise o primeiro produto formado é a arabinohexaose, indicando que a hidrólise ocorre no resíduo terminal. Esse resultado demonstra a atividade exo-hidrolítica dessa enzima, também demonstrado anteriormente para uma arabinofuranosidase termoestável de *Thermotoga petrophila*. A arabinohexaose é então hidrolisada em arabinopentaose e assim consecutivamente até liberar apenas arabinose como produto final.

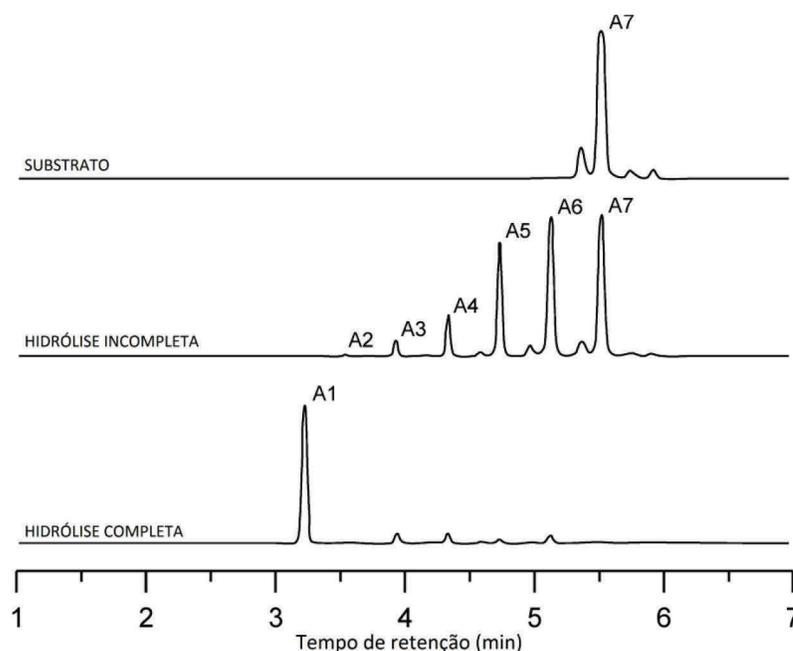


Figura 3.3: Eletroforese capilar dos produtos de hidrólise da 1,5- α -L-Arabinose. O cromatograma mostra os produtos de hidrólise incompleta e após hidrólise total apenas arabinose é identificada.

3.3.3 Caracterização do conteúdo de estrutura secundária por dicroísmo circular

A figura 3.4 mostra o espectro de absorção da luz polarizada no UV-distante pela AbfA em solução. Um mínimo negativo em torno de 220 nm foi observado bem como uma banda positiva com máximo em 198 nm, o que caracteriza a predominância de folhas- β na estrutura. De fato a deconvolução dos dados coletados por meio da interface *web* do *software* K2d (<http://www.embl.de/~andrade/k2d/>) resultou em conteúdos de estrutura secundária de 7% α -hélice, 45% de folhas- β e 48% de enovelamento randômico. A análise mostrou características de proteínas que possuem estrutura com uma mistura de folhas- β e α -hélices em consonância com o conteúdo de estrutura secundária publicados para uma GH51 de *Geobacillus stearothermophilus* (HOVEL *et al.*, 2003), *Clostridium thermocellum* (TAYLOR *et al.*, 2006) e *Thermotoga petrophila* (SOUZA *et al.*, 2011).

A termoestabilidade da estrutura secundária da AbfA também foi estudada por meio de dicroísmo circular. Durante o aquecimento de 20 a 100°C mudanças significativas ocorreram nos espectros de CD acima de 50°C indicando desnaturação. O enovelamento/desenovelamento da AbfA foi monitorado a 219 nm como função da temperatura e o resultado é exibido na Figura 3.4. A curva de desnaturação térmica apresenta um comportamento sigmoidal com uma transição única e temperatura de *melting* a 53,5°C. Isso indica que embora essa enzima possua estrutura quaternária (item 3.3.4) durante o desenovelamento não ocorre primeiramente dissociação dos oligômeros seguida de desnaturação do protômero. A perda dos níveis “hierárquicos” de organização estrutural

ocorre simultaneamente. Esse resultado corrobora com os obtidos por simulações de dinâmica molecular feitas em diferentes condições de temperatura, que demonstraram a alta estabilidade do arranjo hexamérico da AbfA.

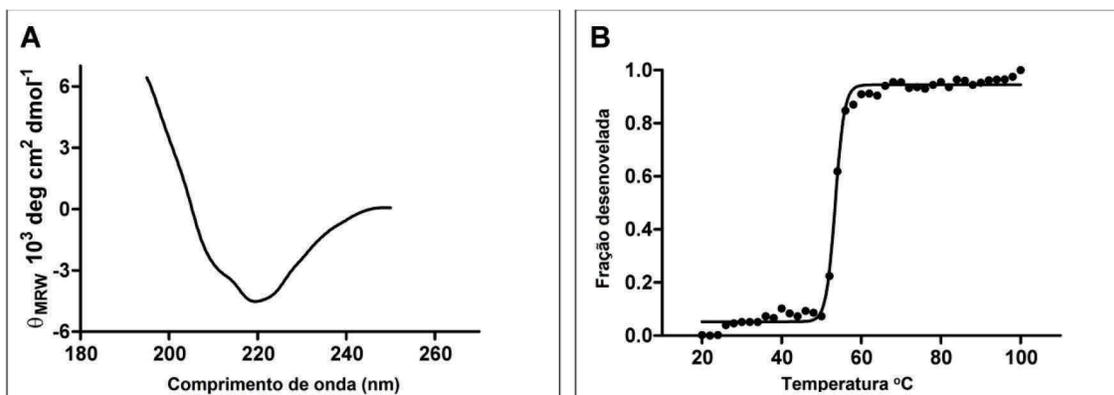


Figura 3.4: Espectro de dicroísmo circular no UV-distante (A) e Desnaturação térmica (B). A análise do conteúdo de estrutura secundária mostrou características de proteínas que contem tanto α -hélices quanto folhas- β . A desnaturação térmica mostra temperatura crítica em 53.5°C.

3.3.4 AbfA apresenta arranjo hexamérico em solução

Com base na estimativa massa molecular usando o SAXSMOW e na análise dos dados de espalhamento construção dos envelopes (pacote de programas ATSAS), compreendemos que a AbfA constituía um arranjo hexamérico em solução. Para obter uma “forma” mais refinada, foi construído um modelo inicial com base nas estruturas do PDB com maior identidade de sequência e que se estruturavam em hexâmeros. Uma vez definida a estrutura tridimensional, a sequência primária foi sobreposta na conformação alvo. A estrutura monomérica foi reconstruída utilizando o servidor I-Tasser e superimposta na estrutura hexamérica. Simulações de dinâmica molecular com modelos simplificados forneceram um amplo conjunto de conformações distintas, permitindo a comparação entre as curvas teóricas construídas com o programa CRY SOL (SVERGUN *et al.*, 1995) e a curva experimental. O parâmetro de referência do CRY SOL é o χ^2 , que indica quão bom é o acordo entre o modelo teórico e a curva experimental, valores mais baixos de χ^2 indicam um melhor ajuste. Como reportado por Taylor *et al.* (2006) e Sousa *et al.* (2011) a conformação encontrada mostra a AbfA em solução formando um trímero de dímeros. A organização hexamérica das subunidades corrobora com estudos prévios de Inácio *et al.* (2008), quando um gel nativo levou os autores a sugerir organizações oligoméricas com massa superiores a 250 kDa para a AbfA em sua conformação biológica. Como observado por Sousa *et al.* (2011) essa organização hexamérica parece ser de ocorrência natural para a família GH51 e necessária para a função da enzima.

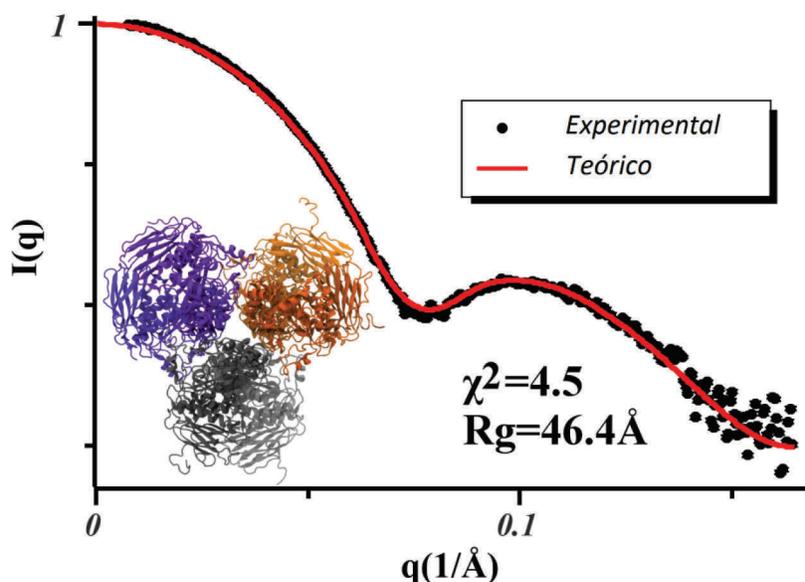


Figura 3.5: Perfil de espalhamento de raios X a baixo ângulo para a AbfA. Curva experimental de espalhamento (círculos pretos com barras de erros) e curva teórica de espalhamento gerada usando CRY SOL para o melhor ajuste obtido. A intensidade é representada como função do momento de transferência (q) e está em escala logarítmica. No interior do gráfico é mostrada uma representação do arranjo hexamérico da AbfA com os monômeros que compõem o trímero de dímeros em cores escuras e claras. Esboço preparado usando VMD.

3.4 Conclusão

Uma arabinofuranosidase mesofílica do micro-organismo *Bacillus subtilis* linhagem 168 que possui promissora aplicação biotecnológica na suplementação de coquetéis de hidrolases fúngicas foi expressa e caracterizada quanto aos aspectos bioquímicos e biofísicos para correlacionar aspectos estruturais e funcionais. A AbfA obteve a maior atividade em pNPA e reteve em torno de 90% de atividade entre 35-50°C. Análise por EC mostrou que a enzima foi capaz de liberar monômeros de arabinose hidrolisando 1,5- α -L-arabinoheptaose a partir da extremidade não-redutora. Além disso, a temperatura de desnaturação térmica foi encontrada em 53,5°C por experimentos de dicroísmo circular. A análise dos dados de SAXS combinada com simulações de dinâmica molecular mostraram que a AbfA em solução é hexamérica, com cada subunidade contendo uma molécula com domínio catalítico em enovelado na forma de barril $(\alpha/\beta)_8$ seguido por um domínio acessório β -sandwich. Esses resultados evidenciam e corroboram dados de que a estrutura quaternária pode ser importante para o desempenho de atividade das arabinofuranosidas da família 51.

IV - Construção de quimeras para avaliação da influência dos domínios de ligação a carboidratos (CBMs) na atividade de xilanases

4.1 Introdução

É notável que CBMs são capazes de auxiliar enzimas, aumentando a eficiência de domínios catalíticos. Entretanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre é pouco esclarecido e poucos são os relatos da influência dos CBMs para a atividade de xilanases (HERVÉ *et al.*, 2010). Esse capítulo trata da ligação de um CBM da família 6, proveniente de *Clostridium thermocellum*, específico para polissacarídeos compostos por resíduos de monômeros de cinco carbonos a duas xilanases, uma termofílica (GH10), proveniente do micro-organismo *Thermotoga petrophila*, e a outra mesofílica (GH11) nativa de *Bacillus subtilis*. A xilanase GH10 é altamente eficiente em altas temperaturas e fora anteriormente estudada no Laboratório de Enzimologia Molecular do CTBE (SANTOS *et al.*, 2010). A xilanase GH11 é capaz de hidrolisar em temperaturas moderadas (RULLER *et al.*, 2008).

Dessa maneira esse capítulo propõe, por meio de abordagem metodológica que utiliza fusões gênicas, uma avaliação bioquímica geral da influência dos CBM6 na catálise de xilanases em temperaturas medianas e altas. Com esse objetivo, três quimeras gênicas foram construídas: a xilanase de *Thermotoga petrophila* com o CBM6 na posição N-terminal da cadeia polipeptídica (CXT), a xilanase de *Thermotoga petrophila* com o CBM6 na posição C-terminal (XTC) e, por fim, a xilanase de *Bacillus subtilis* com o CBM6 na posição C-terminal.

4.2 Metodologia

4.2.1 Construção das ORFs quiméricas

As enzimas quiméricas foram formadas por uma variação da técnica de fusão "end-to-end" descrita na literatura (FAN, WAGSCHAL, CHEN, *et al.*, 2009). Essa metodologia de engenharia de enzimas multifuncionais originalmente consiste em fusionar genes de enzimas diferentes por meio de um *linker* buscando criar uma única enzima. A fusão dos genes foi feita através da metodologia de PCR *overlap* (HECKMAN *et al.*, 2007), ilustrada na Figura 4.1. Foram desenhados *primers* com sequências complementares, comumente denominados "megaprimers", que efetuaram a fusão dos módulos catalíticos na execução dos ciclos da reação em cadeia da polimerase.

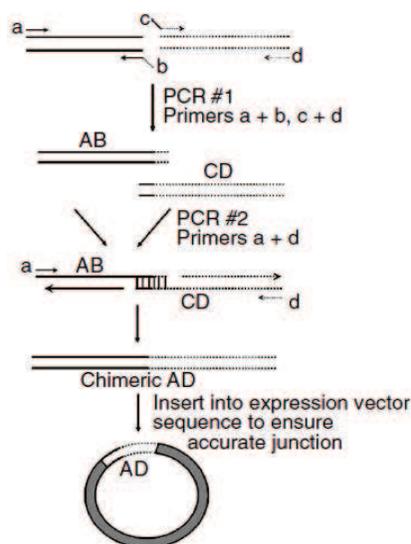


Figura 4.1: A estratégia de quimerigênese usando metodologia *overlapping* PCR. A primeira reação de PCR serve para amplificar os módulos individuais com os primers complementares. Na segunda reação de PCR misturam-se as seqüências amplificadas na primeira etapa e então ocorre o anelamento entre as regiões complementares (adaptado de HECKMAN *et al.*, 2007).

Nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 foram esquematizados os passos de reação de PCR executados para fundir os diferentes segmentos individuais de DNA selecionados para compor as construções quiméricas. A Tabela 4.1 contém a seqüência dos *primers* utilizados seguindo a nomenclatura da figuras. As reações em todos os passos foram feitas em termociclador Vapoprotect (Eppendorf) com volumes dimensionados para um total de reação de 50 μ L contendo 1X tampão *Phusion* (New England Biolabs), 0,2 mM dNTP mix, 10pM de cada oligonucleotídeo, 5U de Taq polimerase *Phusion*, 1,5 μ L de DMSO 100%, 50ng de cada um dos fragmentos (conforme explicação na legenda das Figuras 4.2, 4.3 e 4.4) e H₂O q.s.p.

Os ciclos foram constituídos de quatro passos, passo1 (98°C/2'), passo 2 (98°C/40'' , 49°C*/40', 72 °C/1'30''), passo 3 (98°C/40'' , 55°C*/40', 72 °C/1'30''), passo 4 (72°C/15'). No passo 2 a temperatura de 49°C sofreu um acréscimo de 1°C seguindo um gradiente *touch up* de temperatura até 56°C. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 1% utilizando como padrão o marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). As bandas excisadas do gel de agarose, moldes para os passos posteriores componentes da técnica de PCR *overlap*, foram purificadas com o *Kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

Tabela 4.1: Sequência dos primers construídos para as reações de PCR overlap.

PRIMER	SEQUÊNCIA	
a	5' ATATATGCTAGCTCTCAAAATGTATCTCTGAG	3'
b	5' ACTTCCCCGGTGATTGTTTCTTTCTTCTATCTTTT	3'
c	5' GAAACAATCACCGGGAAGT	3'
d	5' TTCATAGGTCACCTCGGGAC	3'
e	5' ACTTCCCCGGTGATTGTTTCAAAAGTGAACCAGTCTATGT	3'
f	5' TATATAGGATCCTCAAAAAGTGAACCAGTCTATGT	3'
g	5' ATATATGCTAGCCGTATTGAAGCGGAAGATTA	3'
h	5' ACTTCCCCGGTGATTGTTTCAAAAGTGAACCAGTCTATGT	3'
i	5' GTCCCGAGGTGACCTATGAATCTCAAAATGTATCTCTGAG	3'
j	5' TCGGCAGGATCCTCATTTTCTTTCTTCTATCTTTT	3'
k	5' ATATATGCTAGCAGCACAGACTACTGGCAAAA	3'
L	5' ACTTCCCCGGTGATTGTTTCCCACACTGTTACGTTAGAAC	3'
m	5' ACTTCCCCGGTGATTGTTTCAAAAGTGAACCAGTCTATGT	3'
n	5' TATATAGGATCCTCAAAAAGTGAACCAGTCTATGT	3'

4.2.2 Clonagem das construções em vetor de expressão

A clonagem dos fragmentos quiméricos foi efetuada idem item 3.2.1, mudando-se apenas os fragmentos amplificados que nesse caso são provenientes das reações de PCR *overlap*.

4.2.3 Expressão das proteínas recombinantes

4.2.3.1 Transformação de Linhagens de expressão

Análogo ao item 3.2.2.1, porém para as proteínas quiméricas foram testadas as linhagens de expressão *E.coli* BL21 pRARE 2 e Rosetta-gami 2.

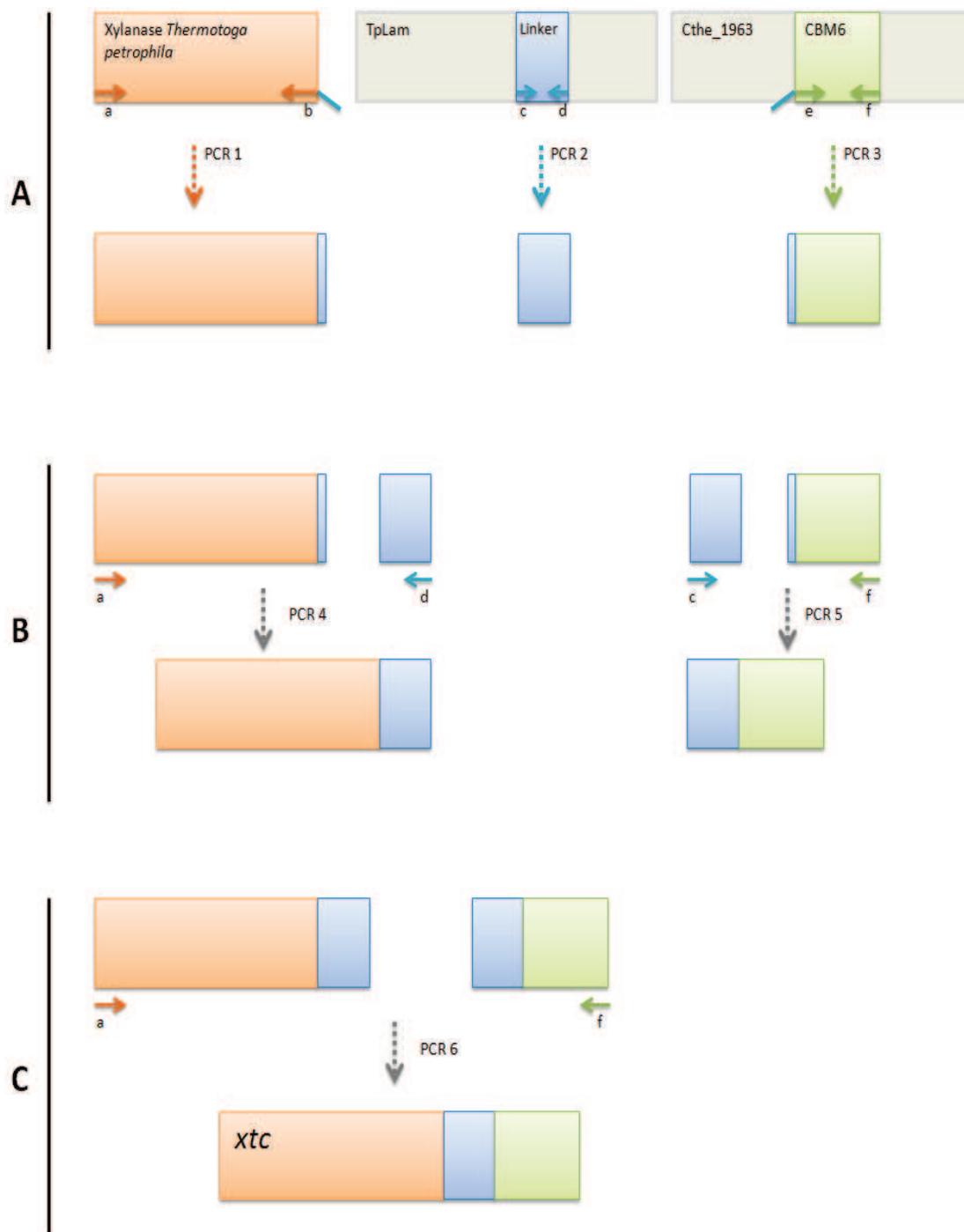


Figura 4.2: O esquema ilustra a construção da ORF (*xtc*) para codificar a proteína quimérica Xilanase_Thermotoga petrophila+CBM6 (XTC). Os moldes de DNA utilizados na amplificação foram para o PCR 1: pET28a+xilanase de *Thermotoga petrophila*; PCR 2: pET28a+laminarase de *Thermotoga petrophila*; PCR 3: pET28a+Cthe_1963; PCR 4: fragmentos purificados dos produtos dos passos 1 e 2; PCR 5: fragmentos purificados dos produtos dos passos 2 e 3; PCR 6: fragmentos purificados dos produtos dos passos 4 e 5. A tabela 4.1 apresenta a sequência dos primers codificados pelas letras a-f. Os clones em pET28a foram obtidos em trabalhos anteriores nos laboratórios de enzimologia molecular do CTBE.

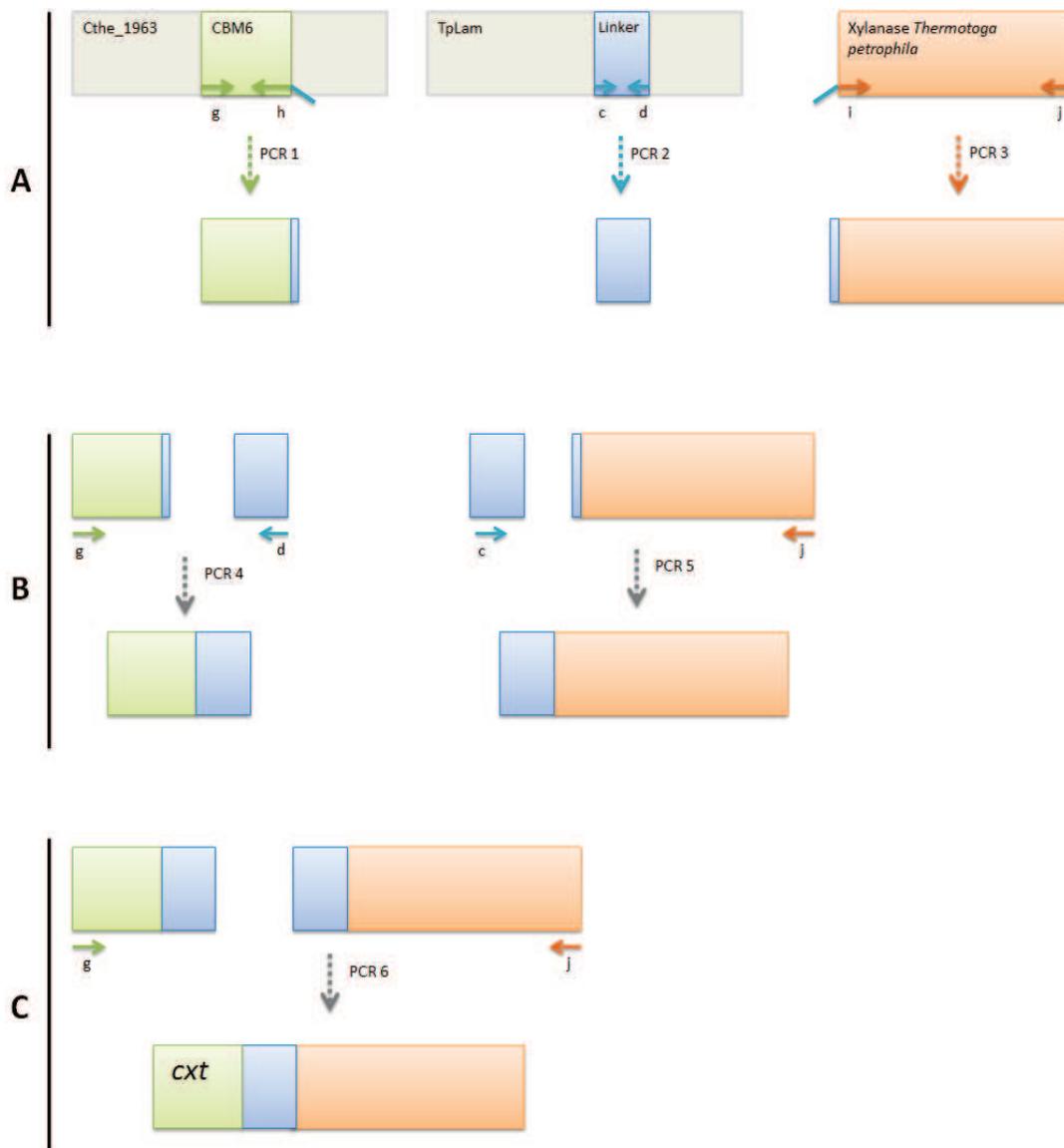


Figura 4.3: O esquema ilustra a construção da ORF (cxt) para codificar a proteína quimérica **CBM6+Xilanase *Thermotoga petrophila* (CXT)**. Os moldes de DNA utilizados na amplificação foram para o PCR 1: pET28a+Cthe_1963; PCR 2: pET28a+laminarase de *Thermotoga petrophila*; PCR 3: pET28a+xilanase de *Thermotoga petrophila*; PCR 4: fragmentos purificados dos produtos dos passos 1 e 2; PCR 5: fragmentos purificados dos produtos dos passos 2 e 3; PCR 6: fragmentos purificados dos produtos dos passos 4 e 5. A tabela 4.1 apresenta a sequência dos *primers* codificados pelas letras c-d e g-j. Os clones em pET28a foram obtidos em trabalhos anteriores nos laboratórios de enzimologia molecular do CTBE.

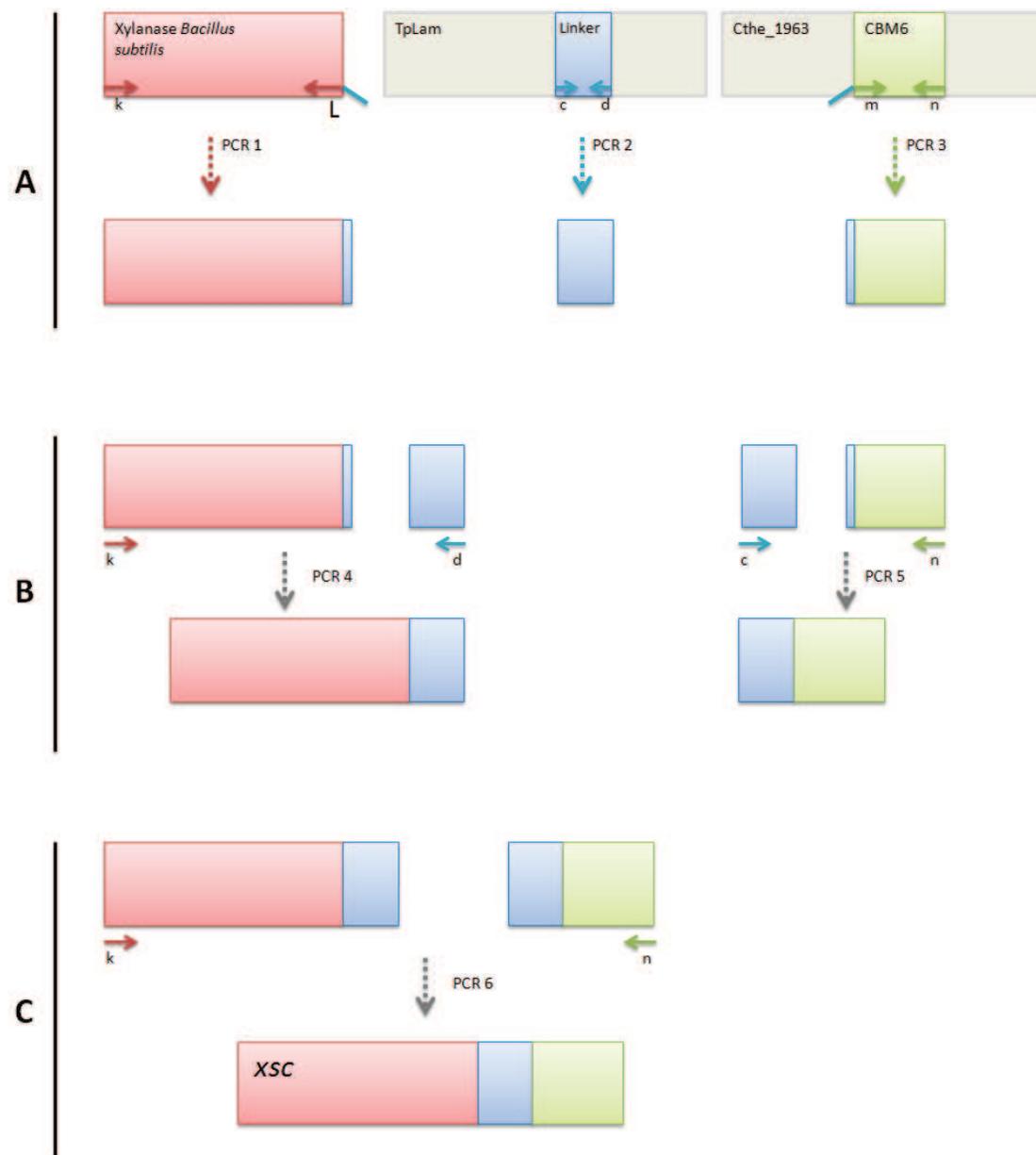


Figura 4.4: O esquema ilustra a construção da ORF (XSC) para codificar a proteína quimérica Xilanase *Bacillus subtilis*+CBM6 (XSC). Os moldes de DNA utilizados na amplificação foram para o PCR 1: pET28a+xilanase de *Bacillus subtilis*; PCR 2: pET28a+laminarase de *Thermotoga petrophila*; PCR 3: pET28a+Cthe_1963; PCR 4: fragmentos purificados dos produtos dos passos 1 e 2; PCR 5: fragmentos purificados dos produtos dos passos 2 e 3; PCR 6: fragmentos purificados dos produtos dos passos 4 e 5. A tabela 4.1 apresenta a sequência dos *primers* codificados pelas letras c-d e k-n. Os clones em pET28a foram obtidos em trabalhos anteriores nos laboratórios de enzimologia molecular do CTBE.

4.2.3.2 Testes de expressão das proteínas heterólogas e expressão em média escala

Conforme 3.2.2.

4.2.4 Purificação

A purificação seguiu de modo geral o que já foi descrito no item 3.2.3, embora um passo a mais tenha sido acrescentado na purificação da quimera termofílica. Para essas enzimas, o sobrenadante do lisado obtido por meio da expressão, cerca de 20 mL, foi aquecido a 80°C e então centrifugado a 16000 g por 20 min antes da incubação com a resina de Níquel Sepharose. Os parâmetros físico-químicos estimados para cada uma das proteínas e utilizados para a quantificação das proteínas purificadas estão na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros físico-químicos das proteínas recombinantes

	Xilanase <i>Thermotoga petrophila</i>			Xilanase <i>Bacillus subtilis</i>	
	XTC	CXT	XTC	XSC	
Número de resíduos	351	497	497	207	353
Massa molecular (Da)	41189,9	57037,0	57037,0	22762,6	38610,0
Ponto isoeletrico	6,03	5,23	5,23	9,25	5,44
Coefficiente de extinção molar teórico (M ⁻¹ cm ⁻¹)	83310	106230	106230	82850	105770

4.2.5 Caracterização bioquímico-cinética parcial

4.2.5.1 Atividade em diferentes substratos

Os testes de atividade foram baseados na detecção de açúcares redutores pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). A análise do perfil de atividade das xilanases nativas e das quimeras em diferentes substratos foi feita em uma reação composta por 40µL de tampão, 50µL de substrato e 10µL de amostra contendo as enzimas a 1µM, para as termofílicas e 2µM para as mesofílicas. Após o tempo de 10 min de incubação a 70°C (XTpet, XTC, CXT) ou 50°C (XynA, XSC) adicionou-se à mistura de reação 100µL do reagente de DNS. Então a amostra foi fervida por 5 min, resfriada em banho de gelo por 2 min, e a absorvância foi quantificada utilizando-se 100µL de amostra em leitor de microplacas Infinite 200 (TECAN®). O valor da absorvância foi correlacionado a uma curva padrão de açúcar redutor (xilose). A unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de produto por minuto. Foram testados como substratos xilano de trigo vermelho (Oat Spelt Xylan), Rye Arabinoxilano,

Xilano Beechwood e Arabinoxilano de trigo, todos os polissacarídeos em concentração de 0,5% (5g/L).

4.2.5.2 pH ótimo

O melhor pH foi obtido utilizando-se o sistema de tampões ácido cítrico 0,1M/ Na₂HPO₄ 0,1M/ glicina 0,1M nos seguintes valores de pH: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0. Utilizou-se como substrato xilano beechwood (0,5% m/v). A reação enzimática prosseguiu adicionado-se 40μL de cada tampão, 50μL de substrato e 10μL de enzimas na concentração descrita em 4.2.5.1. Após 10 min de incubação a quantificação dos açúcares redutores foi feita conforme item 4.2.5.1.

4.2.5.3 Temperatura ótima

O perfil de atividade enzimática em diferentes temperaturas foi obtido em tampão ácido cítrico 0,1M/ Na₂HPO₄ 0,1M/ glicina 0,1M no melhor pH de cada uma das enzimas, pH 6,0 (XynA, XSC), pH 6,5 (XTpet), pH 7,0 (XTC e CXT). A reação enzimática prosseguiu adicionado-se 40μL de tampão, 50μL de substrato e 10μL de enzimas. Foram testadas as temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C para as mesofílicas e temperaturas de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 e 99°C para as termofílicas. A quantificação dos açúcares redutores foi feita conforme item 4.2.5.1.

4.2.6 Cinética

Os ensaios de cinética para as enzimas foram feitos em xilano beechwood. Foram testadas 12 concentrações de substratos em duas faixas diferentes para cada grupo de enzimas: 0,1 e 6 mg/mL (XTpet, XTC, CXT) e 0,25 a 24 mg/mL (XynA, XSC) e as reações seguiram em pH 6,5 a 80°C para o primeiro grupo e pH 6,0 e 50°C para o segundo grupo. A análise de cada um dos resultados foi feita no software GraphPad Prism 5 ajustando os dados a uma regressão não-linear segundo o modelo cinético de Michaelis-Menten.

4.2.7 Ensaio de ligação a carboidratos

Essa metodologia avalia a capacidade de ligação de um CBM a um determinado substrato. Para tanto 50μg de proteínas foram incubadas com 6mg de substrato em tampão de melhor atividade. Incubou-se a mistura por 1 h a 4°C sob agitação branda. Após esse tempo a amostra foi centrifugada (12000 g por 10 min) e o sobrenadante concentrado para verificação em SDS-PAGE (fração não-ligada). O precipitado de substrato foi ressuspenso em tampão com 1 M de NaCl e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente ressuspenso. Essa etapa de lavagem foi repetida três vezes. Ao final, o precipitado foi ressuspenso em 100 μL

de tampão de amostra e aquecido por 10 min a 95°C, com a finalidade de desnaturar as proteínas. Essa fração (Fração ligada) foi também verificada por meio de SDS-PAGE.

4.2.8 Eletroforese capilar de carboidratos

Os produtos obtidos da hidrólise de xilano *beechwood* de cada uma das enzimas em diferentes tempos foram identificados por eletroforese capilar de carboidratos no instrumento P/ACE MQD instrument (Beckman Coulter, Inc) equipado com detector de fluorescência induzida por *laser*. Os ensaios de hidrólise foram feitos nas temperaturas ótimas de cada uma das enzimas em 100 µL contendo o substrato na concentração de 0,5% m/v e tampão apropriado. Os sobrenadantes da reação foram derivatizados com ácido 8-aminopyreno-1,3,6-trisulfônico (APTS) por aminação redutiva. As condições de eletroforese foram 15 kV/70–100 µA à temperatura de 20°C em tampão fosfato de sódio (40 mM; pH 2,5). Todos os oligômeros marcados com APTS foram excitados a 488 nm e suas emissões foram coletadas a 520 nm.

4.2.9 Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar

Esse ensaio foi feito com a finalidade de avaliar a capacidade das xilanases mesofílicas de suplementar a atividade do coquetel Accellerase 1500 (Genencor) na hidrólise de biomassa. Para tanto, 50 mg de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado foram pesados em microtubos de 2mL. O volume de reação de hidrólise foi de 1 mL composto por 500 µL tampão fosfato 100 mM pH 6,0, 10µL do coquetel acelerase seguindo as recomendações do fabricante (200µL/ g biomassa), enzimas na diluição de 2µM, azida sódica 0,2% m/v e H₂O q.s.p. Após 24 horas de hidrólise a reação foi centrifugada por 10 min a 14 000 g e o sobrenadante foi apropriadamente diluído para quantificação dos açúcares redutores pelo método de DNS descrito anteriormente.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Construção e clonagem das quimeras

A Figura 4.5 apresenta os passos de amplificação que foram executados para a construção da Xilanase *Thermotoga petrophila*+CBM6 (xtc), CBM6+*Xilanase Thermotoga petrophila* (cxt) e Xilanase *Bacillus subtilis*+CBM6 (xsc). Fragmentos do tamanho esperado foram obtidos e então clonados apropriadamente clonados no vetor de expressão (pET28a). A seleção de clones transformados recombinantes está apresentada na Figura 4.6. Clones que foram positivos para a presença de bandas relativas a cada construção foram identificados e tiveram o DNA plasmidial extraído. A clonagem foi então confirmada por digestão (Figura 4.7) e sequenciamento.

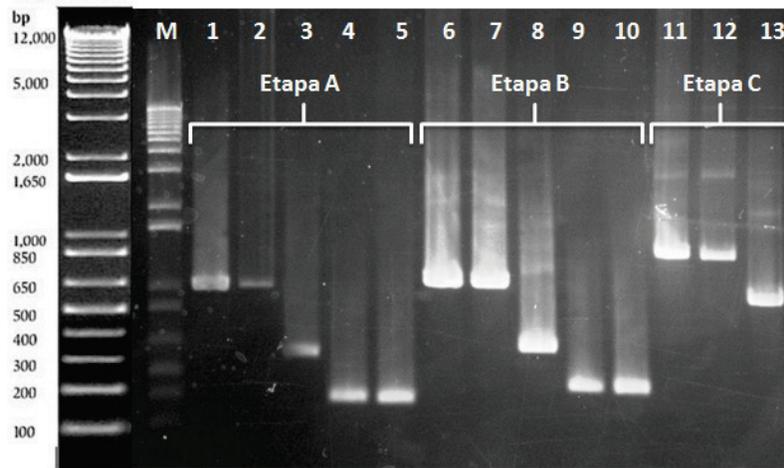


Figura 4.5: Fragmentos amplificados para construção das ORFs *xtc*, *ext* e *xsc* quiméricas utilizando a técnica de PCR *overlap*. As etapas A, B e C das Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 estão destacadas no gel. M-marcador. 1-Xilanase *Thermotoga petrophila* amplificada com primers a,b (984 pb). 2-Xilanase *Thermotoga petrophila* amplificada com primers i,j (984 pb). 3-xilanase de *Bacillus subtilis* amplificada com primers k, L (552 pb). 4-CBM6 amplificado com primers g,h (363 pb). 5-CBM6 amplificado com primers m,n (363 pb). 6,7,8,9,10,11-os fragmentos anteriores adicionados de 78 pb do *linker*, resultantes dos passos de PCR 4 e 5 representados nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4. 11-fragmento de 1425 pb referente à ORF quimérica *xtc*. 12- fragmento de 1425 pb referente à ORF quimérica *ext*. 13-fragmento de 993 pb referente à ORF quimérica *xsc*.

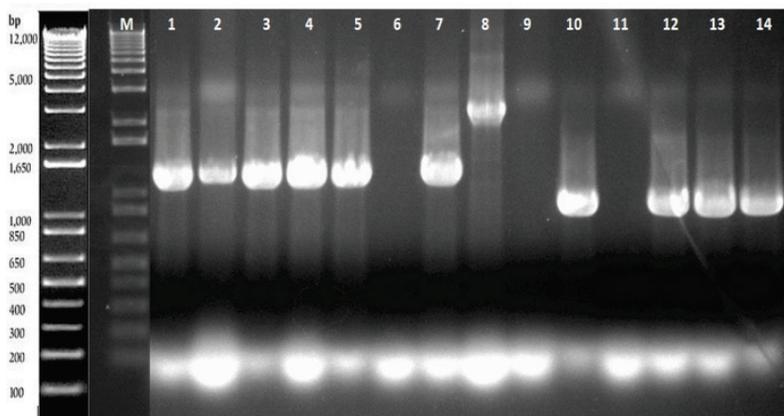


Figura 4.6: PCR de colônia para seleção de clones transformados recombinantes. M-marcador. 1-5 bandas (1425 pb) amplificadas dos clones positivos para a presença da construção pET+*xtc*. 7-bandas (1425 pb) amplificadas dos clones positivos para a presença da construção pET+*ext*. 10,12,13,14- bandas amplificadas dos clones positivos para a presença da construção pET+*xsc* (993 pb).

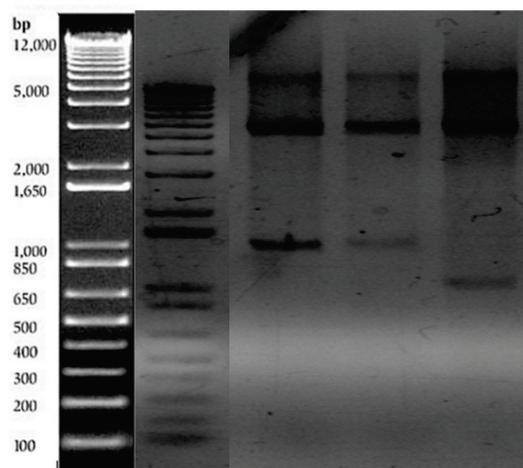


Figura 4.7: Digestão do DNA plasmidial extraído dos clones positivos selecionados por PCR de colônia. As setas indicam as bandas dos fragmentos liberados do vetor com as enzimas *NheI* e *BamHI*. M-marcador. 1-xtc (1425 pb).2-ext (1425 pb).3-xsc (993 pb).

4.3.2 Testes de expressão e purificação

Na Figura 4.8 são apresentados os resultados dos testes de expressão das enzimas em *E.coli* BL21 pRARE2 e Rosetta-gami 2(DE3)pLysS para as proteínas XTpet, XTC e CXT. Quantidade satisfatória de proteína solúvel para todas as enzimas testadas foi encontrada no sobrenadante das células lisadas ao fim do tempo de indução (quatro horas a 37°C). Como aparentemente em todos os casos a linhagem contendo o plasmídeo pRARE2 apresentou melhores resultados, tanto pela visualização das bandas em SDS-PAGE quanto de massa celular, esta linhagem foi escolhida para expressão das proteínas apresentadas no gel e também de XynA e XSC.

A purificação por afinidade (Figuras 4.9 e 4.10) apresentou bandas em SDS-PAGE com elevado grau de pureza para todas as proteínas. As amostras das proteínas termofílicas foram aquecidas a 80°C durante 5 min antes de serem submetidas à purificação por afinidade baseada em níquel, de modo que a maioria das proteínas endógenas da *E.coli* BL2e 1 pRARE2 fossem retiradas da amostra por desnaturarem quando aquecidas à essa temperatura e precipitarem. Vale ressaltar que as proteínas quiméricas denominadas termofílicas nesse trabalho (XTpet, XTC e CXT), tanto o domínio catalítico de xilanásico quanto o CBM6, são derivadas de micro-organismos termofílicos (*Thermotoga petrophila* e *Clostridium thermocellum*) e portanto resistem solúveis e ativas à etapa de aquecimento. A estratégia de aquecimento, purificação em níquel e homogeneização em exclusão molecular permitiu a obtenção de grau elevado de pureza e então a continuidade dos trabalhos de caracterização bioquímico-cinética para comparação e avaliação das mudanças nos parâmetros globais provocadas pela ligação do domínio de ligação a carboidratos ao domínio catalítico tanto da xilanase de *Thermotoga petrophila* como de *Bacillus subtilis*. A estratégia de purificação para as

proteínas mesofílicas, embora estas não tenham sido aquecidas por não resistirem a essa etapa, também permitiu obter as proteínas em grau de pureza elevado para os ensaios bioquímicos.

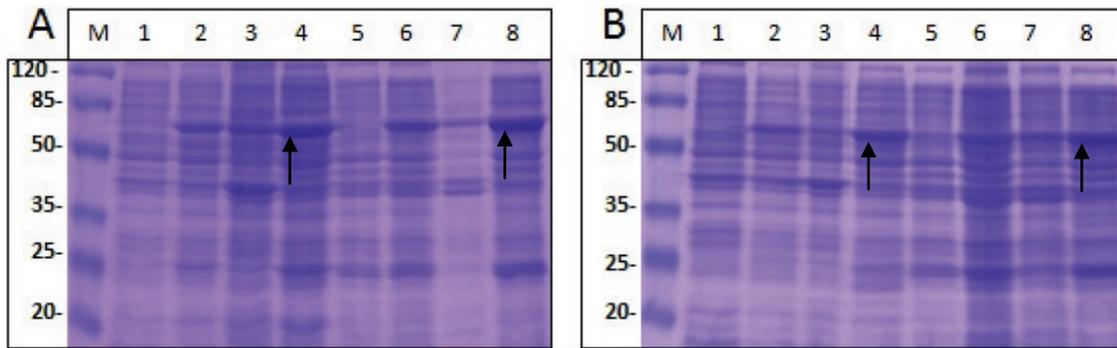


Figura 4.8: Testes de expressão das quimeras xilanase de *Thermotoga petrophila*+CBM6 (XTC) (A) e CBM6+xilanase de *Thermotoga petrophila* (B) em *E.coli* pRARE2 e Rosetta-gami 2(DE3)pLysS. 1,2,3,4 referem-se ao *time course* em *E.coli* pRARE2. 5,6,7,8 referem-se ao *time course* em Rosetta-gami 2(DE3)pLysS. M: marcador, 1: extrato das células antes da indução com IPTG; 2: tempo de 2 h de indução com IPTG, 3: proteínas insolúveis precipitadas com os restos celulares após lise, 4: extrato de proteínas solúveis expressas. 5,6,7,8 são análogos porém resultados para Rosetta-gami 2(DE3)pLysS. As setas indicam as bandas de super expressão das proteínas quiméricas. Ambas com massa molecular de 57 kDa.

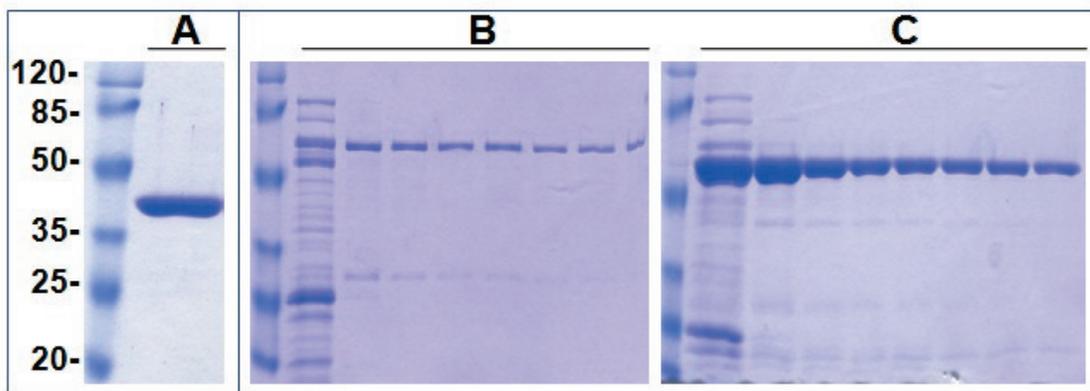


Figura 4.9: Purificação em coluna de afinidade das proteínas termofílicas XTpet, XTC e CXT. As amostras das proteínas termofílicas foram aquecidas a 80°C durante 5 min antes de serem submetidas à purificação por afinidade baseada em níquel, de modo que a maioria das proteínas endógenas da *E.coli* fossem retiradas da amostra por desnaturarem quando aquecidas à essa temperatura. A: purificação da xilanase nativa de *Thermotoga petrophila* (42kDa). B: purificação da xilanase de *Thermotoga petrophila*+CBM6 (XTC) 57kDa. C: purificação da quimera CBM6+xilanase de *Thermotoga petrophila* (CXT) 57kDa. As frações com elevado grau de pureza foram ainda submetidas à exclusão molecular.

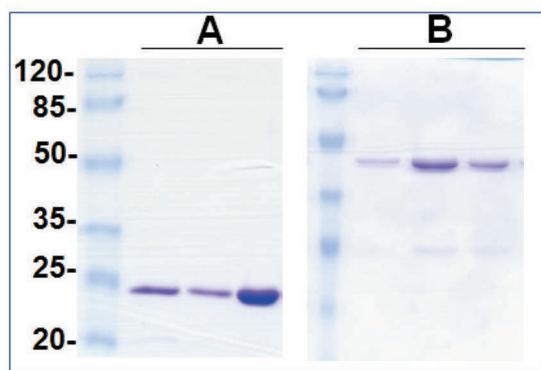


Figura 4.10: Purificação em coluna de afinidade das proteínas mesofílicas XynA e XSC. A: purificação da xilanase nativa de *Bacillus subtilis* (XynA) (22,7 kDa). B: purificação da xilanase de *Bacillus subtilis*+CBM6 (XSC) (38,6 kDa). As frações com elevado grau de pureza foram ainda submetidas à exclusão molecular.

4.3.3 Confirmação da integridade da função do CBM6

A fusão de proteínas pode ocasionar em perda da função por mal enovelamento. Além disso o tipo de polissacarídeo ligante da família CBM6 é altamente variável (GILBERT, 2010). Nesse sentido, testes para avaliar o funcionamento do CBM6 após a função foram feitos precedendo a caracterização bioquímica. Esses testes consistiram em verificar a capacidade de ligação das proteínas quiméricas a dois tipos de xilano, xilano *beechwood* e xilano extraído de cana, sempre em comparação ao módulo nativo. Na Figura 4.11, o resultado para o xilano *beechwood* mostra que apenas a XTpet resiste na fração solúvel após incubação com o substrato. O perfil para as xilanases quiméricas (XTC e CXT) é diferente, ambas desaparecem após a incubação.

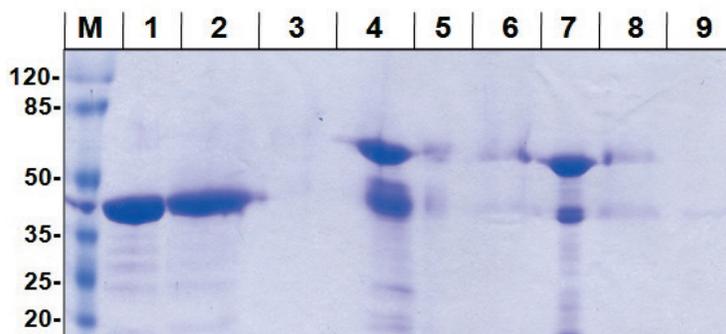


Figura 4.11: Ensaio de ligação ao substrato xilano *beechwood*. As frações 1,2 e 3 referem-se à XTpet, fração não-ligada ao substrato e fração eluída após 3 lavagens com tampão e aquecimento com agente redutor, respectivamente. As frações 4,5 e 6 são análogas para a XTC e as frações 7,8 e 9 são análogas para a CXT. Observa-se o desaparecimento as proteínas na fração ligada ao substrato apenas para as proteínas quiméricas.

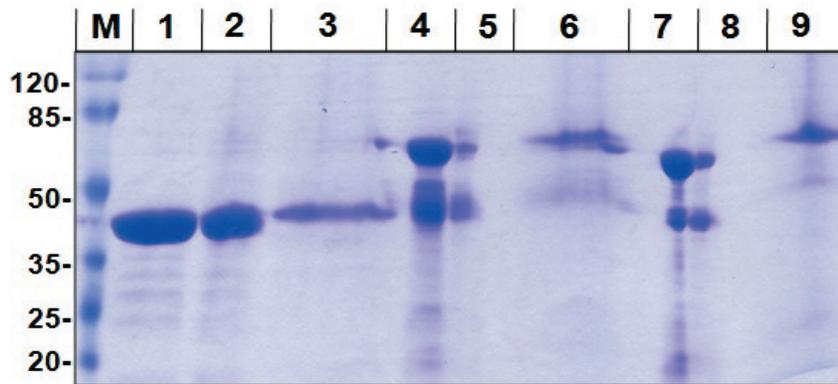


Figura 4.12: Ensaio de ligação ao substrato xilano de cana. As frações 1,2 e 3 referem-se à XTpet, fração não-ligada ao substrato e fração eluída após 3 lavagens com tampão e aquecimento com agente redutor, respectivamente. As frações 4,5 e 6 são análogas para a XTC e as frações 7,8 e 9 são análogas para a CXT. Observa-se tanto redução expressiva das proteínas quiméricas na fração ligada, diferentemente da XTpet, quanto a presença de proteínas na fração ligada.

O resultado para xilano de cana é apresentado na Figura 4.12. Novamente um perfil diferente é observado para a fração não-ligada da XTpet em comparação com as xilanases quiméricas. As enzimas são encontradas também nas frações ligadas. Logo, com esses resultados podemos afirmar que o CBM6 é capaz de se ligar a polissacarídeos hemicelulósicos derivados de xilose, no caso xilano *beechwood* e xilano de cana.

4.3.4 Desempenho bioquímico-cinético

Inicialmente uma avaliação geral do desempenho das xilanase nativas (Figura 4.13 e 4.14), e das quimeras foi feita em xilano proveniente de diferentes fontes vegetais e portanto, com diferentes propriedades tanto em sua composição estrutural (monossacarídeos constituintes e substituições na cadeia principal) quanto em propriedades físico-químicas (solubilidade). Os melhores resultados de atividade são encontrados em xilano *beechwood*, seguido do xilano *oat spelt* e do *rye* arabinoxilano. O xilano *beechwood* é composto apenas por resíduos de xilopiranosose. Já o xilano *oat spelt* e o *rye* arabinoxilano são substituídos possuem a cadeia principal de resíduos de xilopiranosose substituída nos carbonos 2,3 e 4 (IZYDORCZYK *et al.*, 1995). As xilanases reconhecem a ligação β -1,4 entre resíduos de xilopiranosose e portanto o melhor desempenho em xilano *beechwood* coaduna com o esperado. Já nos arabinoxilanos a atividade é menor.

O desempenho dos dois grupos de quimeras foi notavelmente distinto frente a esse painel de substratos. No caso das quimeras termofílicas a xilanase nativa (XTpet) apresentou o melhor desempenho de hidrólise seguida das quimeras com CBM6, sendo a quimera com o CBM6 na posição C-terminal a de pior desempenho. No caso das enzimas mesofílicas ocorreu o contrário. O desempenho da xilanase fusionada ao CBM6 foi melhor que o da xilanase nativa (XynA). Embora quantitativamente diferente entre os substratos, o perfil de atividade foi mantido em todos. As

proteínas que hidrolisaram mais o xilano *beechwood* mantiveram essa condição nos demais polissacarídeos. Além de indicar preliminarmente diferenças no papel do CBM6 frente a temperaturas distintas de catálise, esse painel demonstra que não há aparentemente dentre esses xilanos algum substituinte que promova restrições estéricas significativas nas famílias GH10 e GH11, já que o perfil de atividade é análogo entre os substratos.

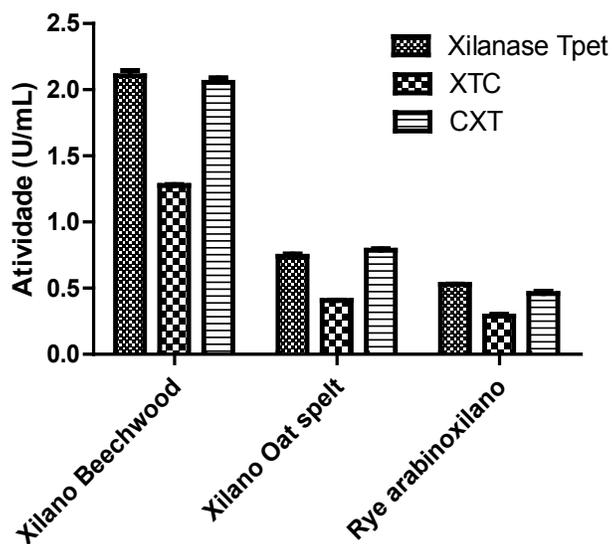


Figura 4.13: Atividade das enzimas termofílicas em xilano proveniente de diferentes plantas. As reações enzimáticas foram feitas com as proteínas na mesma concentração molar.

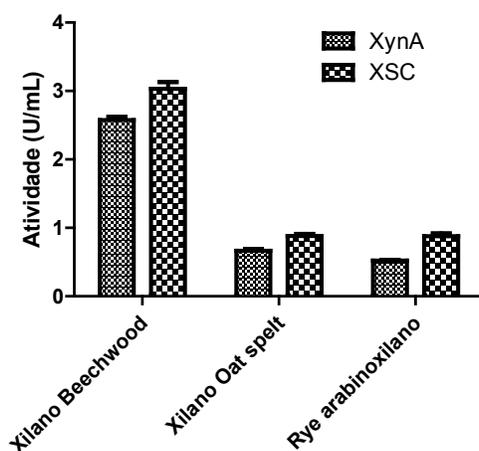


Figura 4.14: Atividade das enzimas mesofílicas em xilano proveniente de diferentes plantas. As reações enzimáticas foram feitas com as proteínas na mesma concentração molar.

Prosseguindo com a caracterização bioquímica, as curvas de temperatura para a XTpet e as quimeras XTC e CXT, respectivamente, no substrato xilano *beechwood* são apresentadas na Figura

4.15. As três proteínas recombinantes avaliadas apresentam aumento de atividade em temperaturas crescentes até cerca de 95°C. Ocorre aumento da atividade entre 50 e 95°C com a melhor temperatura em 95°C e redução acentuada da atividade hidrolítica após essa temperatura. O aumento da energia cinética favorece a catálise enzimática, aumentando o número de colisões favoráveis entre sítio ativo e substrato, até o ponto em que provoca o rompimento das interações eletrostáticas que mantêm a estrutura da enzima, e então ocorre a desnaturação. Esses valores foram semelhantes ao relatado na literatura para endo-1,4- β -xilanases desse tipo. ZHENGQIANG *et al.* (2001) encontraram, para o mesmo tipo de xilanase, no micro-organismo *Thermotoga maritima* os valores ótimos de pH igual a 6,1 e temperatura de 90°C. Não há diferenças acentuadas de comportamento entre a proteína nativa e as proteínas quiméricas, a XTpet apresenta apenas uma inclinação na atividade relativa ligeiramente superior às quimeras, indicativo de que as quimeras preservaram o comportamento da XTpet e esse resultado é positivo, pois diferenças estruturais poderiam comprometer a eficiência de catálise das quimeras e do mesmo modo os perfis cinéticos.

Para as xilanases mesofílicas (Figura 4.16) a análise do perfil univariado de atividade em diferentes temperaturas também revela o melhor desempenho entre 45-50°C, o mesmo valor encontrado por Ruller *et al.* (2008). A XSC possui também perfil semelhante a xilanase nativa, mais uma vez o CBM6 não afetou a curva de temperatura.

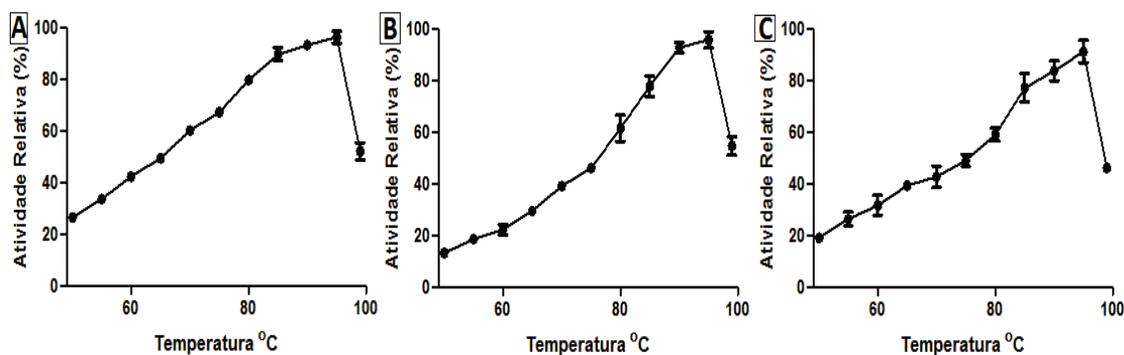


Figura 4.15: Curva de atividade da xilanase de *Thermotoga petrophila* (A), xilanase de *Thermotoga petrophila*+CBM6 (B) e CBM6+xilanase de *Thermotoga petrophila* (C) em diferentes temperaturas. A medidas de atividade foram feitas em xilano *beechwood* fixando-se o pH em 6,5.

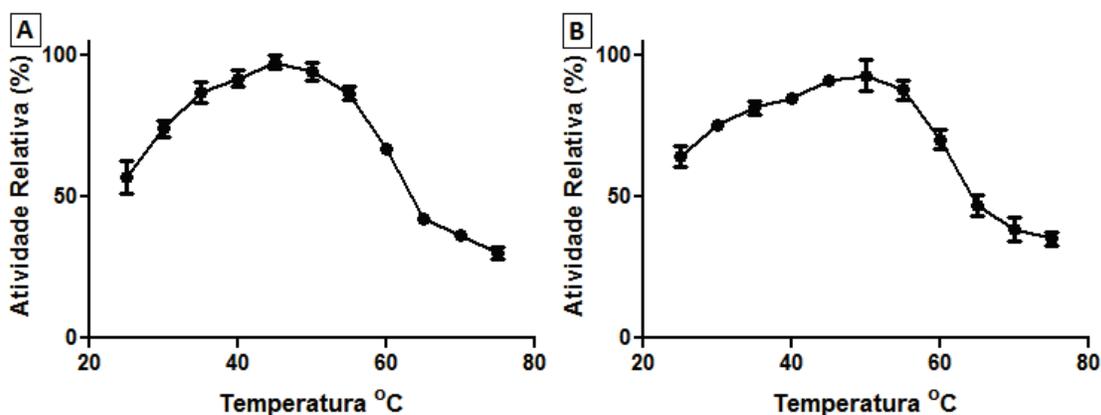


Figura 4.16: Curva de atividade da xilanase de *Bacillus subtilis* (A), xilanase de *Bacillus subtilis*+CBM6 (B) em diferentes temperaturas. A medidas de atividade foram feitas em xilano *beechwood* fixando-se o pH em 6,0.

A Figura 4.17 apresenta as curvas de pH para a xilanase termofílica nativa e as quimeras XTC e CXT, respectivamente, no substrato xilano *beechwood*. O pH melhor de atividade ficou para todas as proteínas foi observado entre 6,0 e 7,0, embora o desvio-padrão nessa região impeça a determinação de valores exatos. O melhor pH situado em pH ligeiramente ácido é esperado pelo fato do mecanismo catalítico das hidrolases necessitar tanto de um doador de prótons quanto de um nucleófilo (DAVIES *et al.*, 1995). Não há atividade significativa abaixo de pH 4,0 tanto devido à protonação dos grupos ionizáveis presentes nos resíduos de aminoácidos do sítio ativo responsável pela catálise quanto pela desnaturação por interferência nas interações que estabilizam a estrutura nativa das enzimas. Não há diferenças acentuadas de comportamento entre a proteína nativa e as proteínas quiméricas. O melhor pH para a XynA e a XSC (Figura 4.18) também foi caracterizado e o resultado foi uma faixa ligeiramente mais ácida, de 5,5 a 6,5. As curvas para a xilanase nativa e as quimeras foram semelhantes.

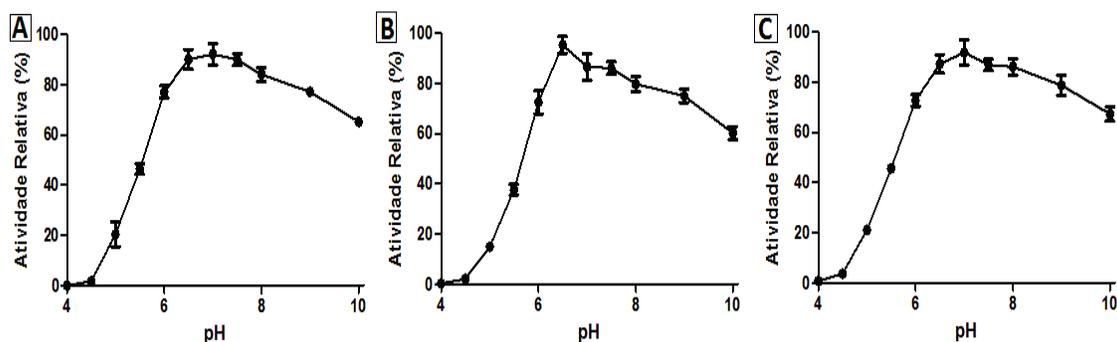


Figura 4.17: Curva de atividade da xilanase de *Thermotoga petrophila* (A), xilanase de *Thermotoga petrophila*+CBM6 (B) e CBM6+xilanase de *Thermotoga petrophila* (C) em diferentes pHs. A medida de atividade foi realizada em xilano *beechwood* fixando-se temperatura em 80°C.

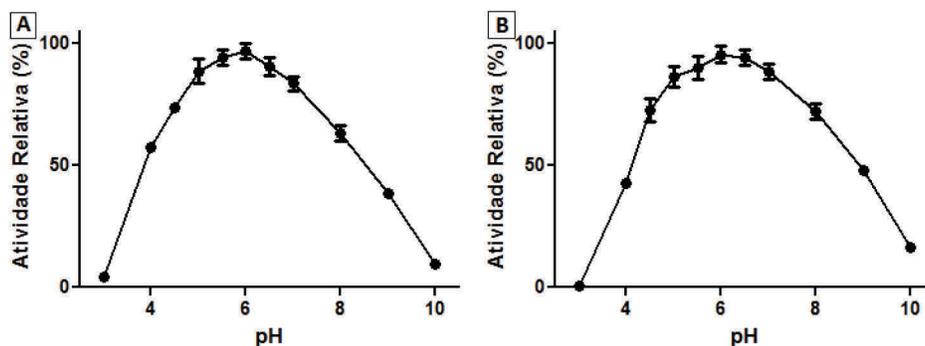


Figura 4.18: Curva de atividade da xilanase de *Bacillus subtilis* (A), xilanase de *Bacillus subtilis*+CBM6 (B) em diferentes pHs. A medida de atividade foi realizada em xilano *beechwood* fixando-se temperatura em 50°C.

A avaliação final do desempenho bioquímico-cinético foi feita por meio da medida da atividade das enzimas em diferentes concentrações de xilano *beechwood* para a determinação das constantes cinéticas. Os parâmetros cinéticos calculados são apresentados na Tabela 4.3 e os perfis cinéticos nas Figuras 4.19 e 4.20. Em todos os casos os dados experimentais ajustaram-se bem ao modelo de Michaelis-Menten, todos os coeficientes de correlação foram superiores a 0,95.

Nas xilanases termofílicas, embora o K_M seja praticamente o mesmo tanto para a xilanase nativa quanto para as enzimas quiméricas, houve redução da V_{MAX} , dessa forma as constantes de eficiência foram similares para a xilanase nativa e para a quimera CXT e houve redução nesse parâmetro para a XTC. Esse resultado corrobora os dados da Figura 4.13, onde a XTC teve o pior resultado de atividade no painel de substrato, e as outras duas enzimas tiveram resultado semelhante. Nesse caso podemos afirmar que o CBM6 fusionado não influenciou na atividade da xilanase termofílica quando fusionado na porção N-terminal e diminuiu ligeiramente a atividade quando fusionado na porção C-terminal da proteína.

A constante de eficiência da xilanase mesofílica fusionada ao CBM6 foi cerca de 65% maior que a encontrada para a enzima nativa XynA, indicativo de que nesse caso o CBM6 melhorou o desempenho cinético. Pode ser observado que a enzima XSC apresenta um K_M quase 30% menor que a XynA. Resultado semelhante foi encontrado por Santos *et al.* (2012) num trabalho de caracterização de uma GH5-CBM3 (celulase) de *Bacillus subtilis*. Esses autores deletaram o CBM3 da celulase quimérica nativa e mediram os parâmetros cinéticos da enzima nativa e do domínio catalítico sem o CBM3 e também detectaram menores K_M e V_{MAX} para a sequência nativa em comparação ao domínio catalítico isolado (SANTOS *et al.*, 2012). Esses resultados mais uma vez coadunam com o painel de substratos (Figura 4.14). Há, portanto, diferenças entre a capacidade de o CBM6 auxiliar a catálise entre os diferentes tipos de xilanase e de temperatura de catálise. A fusão a domínios de ligação a carboidratos pode ser adotada como estratégia para que a engenharia

de proteínas desenvolva enzimas mais eficientes e o resultado é personalizado, ou seja, cada caso deve ser analisado isoladamente e nem sempre a fusão a CBMs irá aumentar a eficiência de um domínio catalítico.

Tabela 4.3: Parâmetros cinéticos para a xilanase nativa e quimeras.

	K_M (mg mL ⁻¹)	V_{MAX} (U/mL)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_M (s ⁻¹ mg ⁻¹ mL)
XTpet	1,047	2,88	4800	4584
XTC	1,032	2,14	3566	3455
CXT	1,039	2,63	4383	4218
XynA	5,837	2,367	236,9	40,6
XSC	4,044	2,675	268,1	66,4

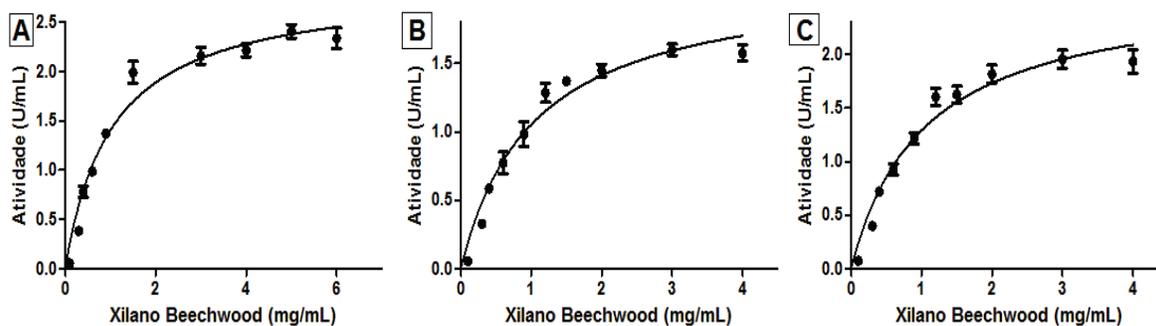


Figura 4.19: Perfil cinético da xilanase de *Thermotoga petrophila* (A), xilanase de *Thermotoga petrophila*+CBM6 (B) e CBM6+xilanase de *Thermotoga petrophila* (C) a pH 6,5 e 80°C. O substrato utilizado foi o Xilano *beechwood* variando-se a faixa de concentração entre 0,1 a 6,0 mg/mL, com análise em 12 pontos.

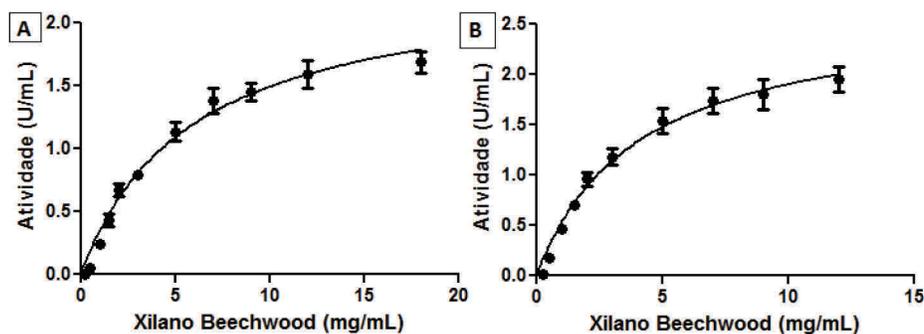


Figura 4.20: Perfil cinético da xilanase de *Bacillus subtilis* (A), xilanase de *Bacillus subtilis*+CBM6 (B) a pH 6,0 e 50°C. O substrato utilizado foi o Xilano *beechwood* variando-se a faixa de concentração entre 0,25 a 24,0 mg/mL, com análise em 12 pontos.

4.3.5 Caracterização dos produtos de hidrólise de xilano

Como complementação das verificações cinéticas, a caracterização dos produtos de hidrólise do xilano *beechwood* foi feita por meio de eletroforese capilar de carboidratos. Surpreendentemente as quimeras termofílicas em tempos curtos apresentaram padrão diferente da xilanase nativa, um pico de xilotriose (X3) no tempo de 10 min (Figura 4.21). (SANTOS *et al.*, 2010) sugerem que a mudança conformacional induzida pela temperatura em uma alça da estrutura da xilanase GH10 de *Thermotoga petrophila* seja crítica para o padrão de produtos originados da atividade dessa enzima. Assim, o CBM6 parece restringir essa mudança conformacional. Xilo-oligossacarídeos (XOS) são de relevância nutricional por suas propriedades nutracêuticas (GONÇALVES *et al.*, 2012). A mudança no padrão de xilo-oligossacarídeos, com a tendência a formar oligossacarídeos mais curtos, pode ser relevante biotecnologicamente, pois tempos menores seriam gastos para a obtenção desses açúcares. Logo, embora a fusão ao CBM6 não tenha apresentado melhoria cinética no caso das enzimas termofílicas, essa mudança inesperada torna essa fusão a CBMs uma alternativa para a engenharia de proteínas no caso de necessidades personalizadas, como a produção de XOS.

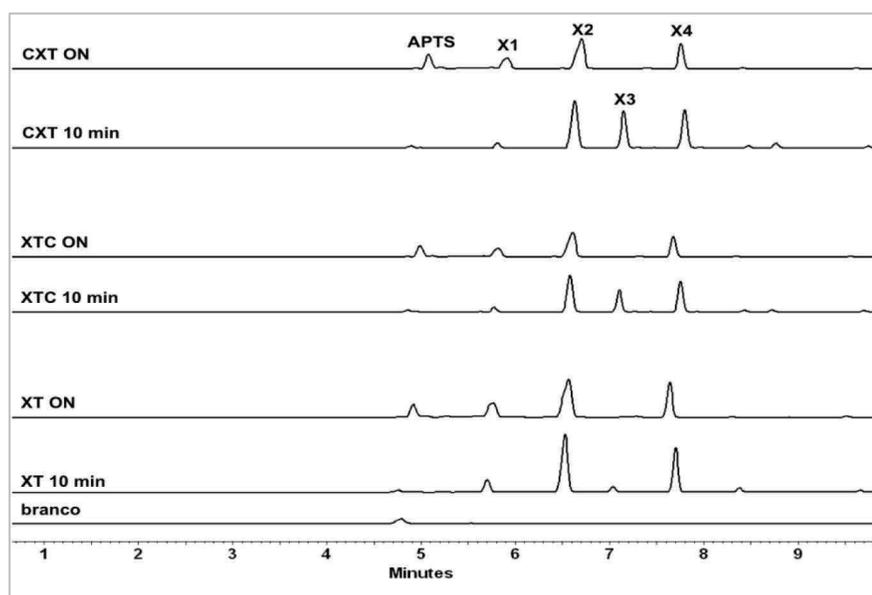


Figura 4.21: Eletroforese capilar dos produtos de hidrólise de xilano *beechwood* pelas enzimas termofílicas. O cromatograma mostra os produtos de hidrólise incompleta (10 min) e hidrólise *overnight*. Verifica-se que as quimeras (XTC e CXT) possuem um pico significativamente maior de xilotriose (X3) em comparação com a xilanase nativa (XT) indicando que a fusão com o CBM6 modificou o padrão de hidrólise incompleta (10 min).

No caso das enzimas mesofílicas não houve mudança no padrão de hidrólise do xilano (Figura 4.22). Os picos identificados foram típicos da família GH11: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3) e xilotetose (X4), os mesmos obtidos por (GONÇALVES *et al.*, 2012) para uma

GH11 de *Penicillium funiculosum*. Pode-se verificar que o padrão da família GH11 sem CBM6 (XSC) é muito semelhante ao da família GH10 (enzimas termofílicas) fusionada ao CBM6 no tempo de 10 minutos. Portanto, conclui-se que o CBM6 pode alterar os produtos característicos de uma família de xilanases.

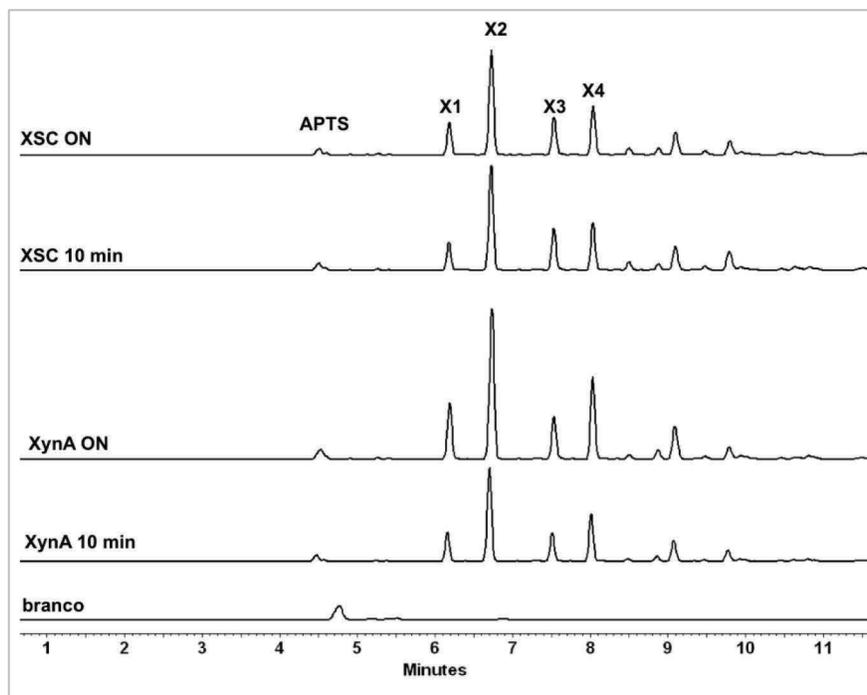


Figura 4.22: Eletroforese capilar dos produtos de hidrólise de xilano *beechwood* pelas enzimas mesofílicas. O cromatograma mostra os produtos de hidrólise incompleta (10 min) e hidrólise *overnight*. A quimera (XSC) apresentou padrão de hidrólise semelhante a XynA em todos os tempos verificados.

4.3.6 Teste de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Diante dos resultados cinéticos positivos para a Xilanase mesofílica quimérica, decidiu-se testar a capacidade dessa enzima e sua análoga nativa na hidrólise da biomassa da cana-de-açúcar, visto que o arabinoxilano é um polissacarídeo abundante nessa espécie vegetal (SOUZA *et al.*, 2012). Adotou-se como estratégia a suplementação do coquetel comercial *accelerase* 1500, pois esse coquetel é rico em celulasas e a suplementação com xilanases em outro trabalho apresentou resultados positivos (SONG *et al.*, 2012). A Figura 4.23 traz os dados de açúcares redutores liberados a partir dos polissacarídeos de bagaço explodido deslignificado (BED). A quantidade de açúcares redutores proveniente da hidrólise com *Accelerase*+XSC, 17% superior ao experimento com coquetel *Accelerase* apenas, foi estatisticamente diferente pelo teste t, a 5% de significância, da média da hidrólise apenas com *Accelerase*. Isso não ocorreu para a xilanase nativa (XynA), cuja média também não foi estatisticamente diferente da *Accelerase*+XSC. A suplementação com a

XSC mais uma vez apresentou um resultado positivo, indicando que essa enzima também possui melhor desempenho ao hidrolisar os polissacarídeos da biomassa da cana-de-açúcar.

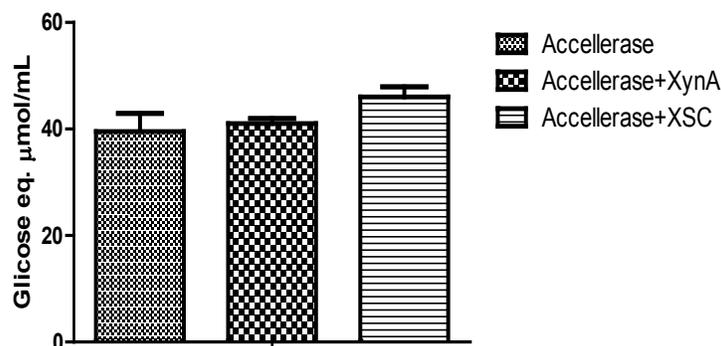


Figura 4.23: Hidrólise de BED suplementando Accellerase 1500 com XynA e XSC. As enzimas foram suplementadas na mesma concentração molar. O teste t apontou diferença entre as médias de açúcares redutores liberados da hidrólise apenas com Accellerase daquela contendo Accellerase+XSC, a 5% de significância.

4.4 Conclusão

Embora o papel dos CBMs na atividade catalítica de glicosídeo hidrolases ainda seja uma questão controversa, existem relatos, por exemplo, o de Kim *et al.* (2010) onde a fusão desses módulos a celulasas aumentou cerca de três vezes o desempenho do módulo catalítico. Com base nessas observações as quimeras de xilanases ligadas ao CBM6 foram desenhadas para trazer pilares à tarefa de construir enzimas com melhor desempenho funcional.

A metodologia de PCR *overlap* mostrou-se adequada para as fusões gênicas propostas. Após purificação das proteínas e determinação do comportamento em diferentes pHs e temperaturas verificou-se que, embora a fusão *end-to-end* por vezes origine em mal enovelamento (RIBEIRO *et al.*, 2011) ou impedimento estérico entre os domínios, o domínio catalítico xilanásico preservou essas características bioquímicas das enzimas parentais em todas as quimeras. Com relação ao domínio CBM existem relatos da capacidade de ligação da família de CBM6 a xilano, porém particularmente o CBM6 de *Clostridium thermocellum*, escolhido nesse trabalho pelas propriedades termofílicas do micro-organismo de origem, não foi ainda caracterizado. Como essa família apresenta grande diversidade entre os substratos a capacidade de ligação das quimeras a dois tipos de xilano foi também verificada (GILBERT, 2010). As quimeras termofílicas se mostraram capazes de ligar tanto a xilano *beechwood* como a xilano de cana, mostrando tanto que esse tipo de CBM é capaz de se ligar aos substratos analisados quanto o fato da fusão *end-to-end* aparentemente não ter afetado o desempenho desse domínio.

A caracterização da atividade em diferentes substratos, para as enzimas termofílicas, mostrou redução da atividade para a xilanase com o CBM6 na posição C-terminal, ainda que a fusão *end-to-end* não tenha comprometido totalmente a atividade houve interferência no desempenho catalítico. A enzima com o CBM6 N-terminal apresentou praticamente os mesmos valores de atividade que o módulo nativo da xilanase, indicando que para essa xilanase em altas temperaturas não houve melhoria no desempenho pela fusão do CBM6. Os dados cinéticos apontaram na mesma direção. Os valores de K_M foram preservados, mas houve redução da velocidade máxima (para a XTC) e conseqüentemente diminuição da constante de eficiência, parâmetro indicativo de desempenho em um determinado substrato. No caso da CXT não houve mudança significativa no desempenho, corroborando os dados de atividade em diferentes substratos. Desse modo, pode-se concluir que para a xilanase GH10 de *Thermotoga petrophila* (altas temperaturas) não houve colaboração do CBM6 no desempenho cinético, embora o padrão de oligossacarídeos identificado por eletroforese capilar, com a produção de X3 apenas pelas quimeras, indique uma mudança na clivagem que pode ser positiva do ponto de vista biotecnológico devido a fusão ao CBM6.

A quimera mesofílica obteve um desempenho melhor que a xilanase GH11 nativa de *Bacillus subtilis* em todos os testes realizados. O painel de substratos indicou melhoria na atividade hidrolítica que foi confirmada pela determinação das constantes cinéticas, a constante de eficiência (K_{cat}/K_M) foi significamente menor para a XSC. Além disso, na hidrólise da biomassa da cana-de-açúcar, rica em arabinoxilanos, a xilanase quimérica suplementou o coquetel comercial Accellerase 1500, liberando mais açúcares redutores, com resultados percentuais superiores aos encontrados por Song e colaboradores (2012) para esse mesmo tipo de experimento feito com uma xilanase desenvolvida por várias etapas de evolução dirigida. Logo, essa xilanase possui uma aplicação biotecnológica imediata, a suplementação de coquetéis fúngicos para hidrólise de biomassa, cujos açúcares podem ser fermentados para a produção, dentre uma vasta gama de compostos químicos, bioetanol de segunda geração.

V - Conclusão Final

As hemicelulases podem de fato contribuir significativamente para a hidrólise da biomassa vegetal (DELABONA *et al.*; ALVIRA *et al.*, 2011). Quaisquer esforços no sentido de otimizar a composição de coquetéis que produzam açúcares fermentescíveis a partir de biomassa devem servir-se dessa capacidade.

Esse trabalho trouxe como contribuição à ciência a caracterização da enzima arabinofuranosidase (AbfA) de *Bacillus subtilis*. Com bom desempenho na suplementação do coquetel do fungo *Trichoderma harzianum* P49P11 a família GH51 à qual pertence a AbfA ainda é pouco estudada. A otimização de pH e temperatura permite considerar a AbfA uma enzima versátil, que reteve em torno de 90% de atividade entre 35-50°C, dado esse importante para experimentos de bioprocessos. A EC mostrou que a enzima foi capaz de liberar monômeros de arabinose hidrolisando 1,5- α -L-arabinoheptaose a partir da extremidade não-redutora. E dentre os demais resultados do tópico III, dados de SAXS e desnaturação térmica conjuntamente com simulações de dinâmica molecular mostraram que a AbfA possui um arranjo hexamérico, formando um trímero de dímeros que se mantém até a temperatura de *melting*, evidência de que a estrutura quaternária pode ser importante para o desempenho da família GH51. Logo, esforços de engenharia de proteínas no sentido de evoluir essa enzima ou construir quimeras para redução de custos com polipeptídeos devem levar em consideração a importância dessa estrutura hexamérica.

Ainda como contribuição à ciência os estudos do tópico IV de construção de enzimas artificiais com a fusão de domínios nativos trouxeram luz à questão de como os domínios de ligação a carboidratos podem ser úteis à biotecnologia e aos engenheiros de proteínas. Os resultados indicaram que os CBMs podem melhorar o desempenho de xilanases, embora esse fator não seja regra e cada enzima a ser otimizada deva ser estudada isoladamente. O CBM6 em questão mostrou-se capaz não só de aumentar a constante de eficiência da xilanase de *Bacillus subtilis*, como de modificar o padrão de clivagem de substrato da xilanase de *Thermotoga petrophila*. Sabe-se que o grande custo da elevada e diversificada carga enzimática necessária para hidrolisar os polissacarídeos da biomassa são o principal entrave para tornar o etanol de segunda geração uma tecnologia viável economicamente. Os testes de hidrólise de biomassa, em que a xilanase+CBM6 mesofílica apresentou melhor resultado que aqueles apenas com o coquetel comercial ou a suplementação com a xilanase nativa, indicam que os domínios de ligação a carboidratos são úteis para otimização de carga enzimática, uma vez que quantidades menores de enzimas podem ser utilizadas em coquetéis recombinantes de enzimas isoladas ou na suplementação de coquetéis, comerciais ou fúngicos *in house*.

VI - Referências

- ADLAKHA, N.; RAJAGOPAL, R.; KUMAR, S.; REDDY, V. S.; YAZDANI, S. S. **Synthesis and Characterization of Chimeric Proteins Based on Cellulase and Xylanase from an Insect Gut Bacterium.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 14, p. 4859-4866, July 15, 2011 2011.
- ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. **Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw.** *Bioresource Technology*, v. 102, n. 6, p. 4552-4558, 2011.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.** *Fems Microbiology Reviews*, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. **Microbial xylanases and their industrial applications: a review.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, n. 3, p. 326-338, 2001.
- BEYLOT, M. H.; MCKIE, V. A.; VORAGEN, A. G.; DOESWIJK-VORAGEN, C. H.; GILBERT, H. J. **The Pseudomonas cellulosa glycoside hydrolase family 51 arabinofuranosidase exhibits wide substrate specificity.** *Biochem. J.*, v. 358, n. 3, p. 607-614, Sep 15, 2001 2001.
- BORASTON, A. B.; BOLAM, D. N.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. **Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition.** *Biochem. J.*, v. 382, n. 3, p. 769-781, Sep 15, 2004 2004.
- CERQUEIRA LEITE, R. C. D.; VERDE LEAL, M. R. L.; BARBOSA CORTEZ, L. A.; GRIFFIN, W. M.; GAYA SCANDIFFIO, M. I. **Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?** *Energy*, v. 34, n. 5, p. 655-661, 2009^a.
- CERQUEIRA LEITE, R. C. (Ed.) **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil.** Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. ed. 2009^b.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases.** *Fems Microbiology Reviews*, v. 29, n. 1, p. 3-23, Jan 2005.
- COUGHLAN, M. P.; TUOHY, M. G.; FILHO, E. X. F.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKA, M.; HUGHES, M. M. ENZYMOLOGICAL ASPECTS OF MICROBIAL HEMICELLULASES WITH EMPHASIS ON FUNGAL SYSTEMS. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Ed.). *Hemicellulose and Hemicellulases*. London: Portland Press, 1993. p. 53-84.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B. **Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.** *Structure*, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.
- DEBECHE, T.; CUMMINGS, N.; CONNERTON, I.; DEBEIRE, P.; O'DONOHUE, M. J. **Genetic and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable α -L-Arabinofuranosidase from Thermobacillus xylanilyticus.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 4, p. 1734-1736, April 1, 2000 2000.

DELABONA, P. D. S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; PAIXÃO, D. A. A.; FARINAS, C. S.; CAIRO, J. P. L. F.; LIMA, D. J.; SQUINA, F. M.; RULLER, R.; PRADELLA, J. G. D. C. **Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase.** *Bioresource Technology*, n. 0.

DOS SANTOS, C.; SQUINA, F.; NAVARRO, A.; OLDIGES, D.; LEME, A.; RULLER, R.; MORT, A.; PRADE, R.; MURAKAMI, M. **Functional and biophysical characterization of a hyperthermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila*.** *Biotechnology Letters*, v. 33, n. 1, p. 131-137, 2011.

FAN, Z.; WAGSCHAL, K.; CHEN, W.; MONTROSS, M. D.; LEE, C. C.; YUAN, L. **Multimeric Hemicellulases Facilitate Biomass Conversion.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 6, p. 1754-1757, March 15, 2009 2009^a.

FAN, Z.; WAGSCHAL, K.; LEE, C. C.; KONG, Q.; SHEN, K. A.; MAITI, I. B.; YUAN, L. **The construction and characterization of two xylan-degrading chimeric enzymes.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 3, p. 684-692, 2009^b.

FISCHER, H.; DE OLIVEIRA NETO, M.; NAPOLITANO, H. B.; POLIKARPOV, I.; CRAIEVICH, A. F. **Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale.** *Journal of Applied Crystallography*, v. 43, n. 1, p. 101-109, 2010.

GILBERT, H. J. **The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction.** *Plant Physiology*, v. 153, n. 2, p. 444-455, June 1, 2010 2010.

GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T. M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L. B.; CITADINI, A. P. S.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; PAES LEME, A. F.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M. **Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides.** *Bioresource Technology*, v. 119, n. 0, p. 293-299, 9// 2012.

HECKMAN, K. L.; PEASE, L. R. **Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension.** *Nat. Protocols*, v. 2, n. 4, p. 924-932, 2007.

HERVÉ, C.; ROGOWSKI, A.; BLAKE, A. W.; MARCUS, S. E.; GILBERT, H. J.; KNOX, J. P. **Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 34, p. 15293-15298, August 24, 2010 2010.

HOVEL, K.; SHALLOM, D.; NIEFIND, K.; BELAKHOV, V.; SHOHAM, G.; BAASOV, T.; SHOHAM, Y.; SCHOMBURG, D. **Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 [alpha]-L-arabinofuranosidase.** *EMBO J*, v. 22, n. 19, p. 4922-4932, 2003.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. **Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production.** *African Journal of Biotechnology* v. 2, 2003.

INÁCIO, J. M.; CORREIA, I. L.; DE SÁ-NOGUEIRA, I. **Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*.** *Microbiology*, v. 154, n. 9, p. 2719-2729, September 1, 2008 2008.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS, C. G. **Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties.** *Carbohydrate Polymers*, v. 28, n. 1, p. 33-48, 1995.

KIM, E. S.; LEE, H. J.; BANG, W. G.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. **Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 5, p. 1342-1353, 2009.

KIM, T.-W.; CHOKHAWALA, H. A.; NADLER, D.; BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Binding modules alter the activity of chimeric cellulases: Effects of biomass pretreatment and enzyme source.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 107, n. 4, p. 601-611, 2010.

KNOB, A.; TERRASAN, C.; CARMONA, E. **β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 389-407, 2010.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** *Fems Microbiology Reviews*, v. 23, n. 4, p. 411-456, Jul 1999.

LIMA, D. U.; LOH, W.; BUCKERIDGE, M. S. **Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 389-394, May 2004.

MACEDO, I. D. C. *A Energia da Cana-de-Açúcar* São Paulo, Brazil: UNICA (São Paulo Sugarcane Agroindustry Union), 2005. Disponível em: <<http://www.Portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia&SubSecao=publicações&SubSecao=livros>>.

MCCARTHY, A. A.; MORRIS, D. D.; BERGQUIST, P. L.; BAKER, E. N. **Structure of XynB, a highly thermostable [beta]-1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution.** *Acta Crystallographica*, v. 56, 2000.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINIC, Z.; JOUANIN, L. **Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 7-9, p. 435-449, 2006.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. **Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

NUMAN, M.; BHOSLE, N. **α -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006.

PAËS, G.; BERRIN, J.-G.; BEAUGRAND, J. **GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications.** *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 564-592, 5// 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse.** *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 69-80, Aug 2000.

PÉREZ, J.; MUNÕZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. **Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview.** *Int Microbiol*, 2002.

RIBEIRO, L. F.; FURTADO, G. P.; LOURENZONI, M. R.; COSTA-FILHO, A. J.; SANTOS, C. R.; NOGUEIRA, S. C. P.; BETINI, J. A.; POLIZELI, M. D. L. T. M.; MURAKAMI, M. T.; WARD, R. J. **Engineering Bifunctional Laccase-Xylanase Chimeras for Improved Catalytic Performance.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 50, p. 43026-43038, December 16, 2011 2011.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. **Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production.** *Industrial Crops and Products*, v. 35, n. 1, p. 274-279, 1/ 2012.

RULLER, R.; DELIBERTO, L.; FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. **Thermostable variants of the recombinant xylanase a from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution show reduced heat capacity changes.** *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 70, n. 4, p. 1280-1293, 2008.

SAKAMOTO, T.; KAWASAKI, H. **Purification and properties of two type-B α -L-arabinofuranosidases produced by *Penicillium chrysogenum*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1621, n. 2, p. 204-210, 2003.

SANTOS, C. R.; MEZA, A. N.; HOFFMAM, Z. B.; SILVA, J. C.; ALVAREZ, T. M.; RULLER, R.; GIESEL, G. M.; VERLI, H.; SQUINA, F. M.; PRADE, R. A.; MURAKAMI, M. T. **Thermal-induced conformational changes in the product release area drive the enzymatic activity of xylanases 10B: Crystal structure, conformational stability and functional characterization of the xylanase 10B from *Thermotoga petrophila* RKU-1.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 403, n. 2, p. 214-219, 2010.

SANTOS, C. R.; PAIVA, J. H.; SFORÇA, M. L.; NEVES, J. L.; NAVARRO, R. Z.; COTA, J.; AKAO, P. K.; HOFFMAM, Z. B.; MEZA, A. N.; SMETANA, J. H.; NOGUEIRA, M. L.; POLIKARPOV, I.; XAVIER-NETO, J.; SQUINA, F. M.; WARD, R. J.; RULLER, R.; ZERI, A. C.; MURAKAMI, M. T. **Dissecting structure–function–stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis* 168.** *Biochemical Journal*, v. 441, n. 1, p. 95-104, Jan 1, 2012 2012.

SAMBROOK, J.; FITSCH E.F.; MANIATIS T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press 1989.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. **Hemicelluloses.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, n. 1, p. 263-289, 2010.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. **Microbial hemicellulases.** *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. D. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; SILVA BON, E. P. D.; MORAES, L. M. P. D.; ARAÚJO, J. D. A.; TORRES, F. A. G. **Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SONG, L.; SIGUIER, B.; DUMON, C.; BOZONNET, S.; O'DONOHUE, M. **Engineering better biomass-degrading ability into a GH11 xylanase using a directed evolution strategy.** *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, p. 3, 2012.

SOUZA, A.; LEITE, D. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M.; BUCKERIDGE, M. **Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production.** *BioEnergy Research*, p. 1-16, 2012/11/01 2012.

SOUZA, T. A. C. B.; SANTOS, C. R.; SOUZA, A. R.; OLDIGES, D. P.; RULLER, R.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M.; MURAKAMI, M. T. **Structure of a novel thermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1.** *Protein Science*, v. 20, n. 9, p. 1632-1637, 2011.

SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. **CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates.** *Journal of Applied Crystallography*, v. 28, n. 6, p. 768-773, 1995.

TAYLOR, E. J.; SMITH, N. L.; TURKENBURG, J. P.; D'SOUZA, S.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. **Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*.** *Biochem J*, v. 395, n. 1, p. 31-37, April 1, 2006 2006.

VAN GOOL, M. P.; VAN MUISWINKEL, G. C. J.; HINZ, S. W. A.; SCHOLS, H. A.; SINITSYN, A. P.; GRUPPEN, H. **Two GH10 endo-xylanases from *Myceliophthora thermophila* C1 with and without cellulose binding module act differently towards soluble and insoluble xylans.** *Bioresource Technology*, v. 119, n. 0, p. 123-132, 9// 2012.

VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. F. **If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture.** *Plant Physiology*, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, Aug 2003.

ZHENGQIANG, J.; KOBAYASHI, A.; AHSAN, M. M.; LITE, L.; KITAOKA, M.; HAYASHI, K. **Characterization of a thermostable family 10 endo-xylanase (XynB) from *Thermotoga maritima* that cleaves p-nitrophenyl-[beta]-xyloside.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 5, p. 423-428, 2001.

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: Estudos Funcionais De Hemicelulases Microbianas Com Potencial Aplicação Biotecnológica Em Biorrefinarias De Biomassas Hemicelulósicas

Pesquisador responsável: Fabio Marcio Squina

Experimentador: Zaira Bruna Hoffmam

Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, [X]-mestrado, []-doutorado, []-doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

A cana-de-açúcar é atualmente a opção de biomassa energética de maior produtividade de bioetanol por área plantada. Tem-se buscado alternativas viáveis para aumentar expressivamente a produção de etanol sem aumento da área plantada, com o intuito de tornar a matriz energética brasileira sólida e renovável. Consensualmente, a mais promissora é produzir etanol a partir da biomassa gerada como resíduo na produção do álcool de primeira geração. Para tanto, é necessário hidrolisar essa biomassa e liberar açúcares fermentescíveis. Porém, dada a recalcitrância dos resíduos, é complexa a tarefa de propor um processo de hidrólise eficiente, de baixo custo e que não gere compostos tóxicos que diminuam o rendimento da etapa de fermentação posterior.

Nesse sentido hidrolisar completamente a biomassa depende da ação concertada (sinérgica) de várias atividades catalíticas distintas, principalmente celulasas e hemicelulasas, com as quais se espera obter níveis sinérgicos de rendimento para sacarificação destes polímeros complexos. Além disso, a presença de enzimas mesofílicas e extremofílicas em um coquetel multienzimático garantiria atividade sobre substratos lignocelulósicos numa faixa ampla de temperatura e de pH. Isso implicaria em versatilidade para os processos de hidrólise, e, conseqüentemente, resultados mais significativos e menores custos para o processo, tendo em vista que praticamente todos os coquetéis comerciais disponíveis atuam principalmente em temperas ótimas variando entre 50 e 55oC numa faixa de pH em torno de 6,0. Estas condições podem tornar o processo de hidrólise limitado às condições ótimas para as enzimas disponíveis, dificultando alterações em etapas do processo na tentativa de otimizar a produção de etanol em abordagens em estudos de hidrólise seguido de sacarificação ou com baixos ou dispendiosos rendimentos para SSF (sacarificação e fermentação simultâneas), pois o crescimento e fermentação alcoólica feito pelas leveduras disponíveis atualmente se dá em temperaturas brandas, a aproximadamente 30oC (longe da temperatura ótima dos coquetéis comerciais).

A partir dessas premissas esse projeto propõe um estudo que proporciona correlacionar a estrutura e função de algumas hemicelulasas-chave (4 enzimas hemicelulásicas mesofílicas e hipertermofílicas) para montagem de um complexo hemicelulolítico versátil, com diferentes atividades catalíticas e atuante em ampla faixa de pH e temperatura. Para tanto, as enzimas serão clonadas em diferentes sistemas de expressão e terão seus parâmetros bioquímico-cinéticos determinados. Esses dados servirão como base para a construção de quimeras protéicas a partir de endoxilanasas mesofílicas e hipertermofílicas, com o auxílio de técnicas como overlap PCR e extensão end-to-end e serão ligados posteriormente a domínios de ligação a carboidratos (CBM6) provindos da bactéria anaeróbica etanolgênica (Clostridium thermocellum). As construções gênicas serão então expressas e caracterizadas, em seguida o complexo de enzimas quiméricas e módulo catalíticos (tipo selvagem) terão suas atividades comparadas por diferentes ensaios e em condições variadas de (pH, temperatura e tipos de substratos). Estas enzimas serão estudadas bioquimicamente (V_{máx}, K_M, K_{cat}) e biofisicamente (dicroísmo circular, calorimetria por DSC) em trabalhos de colaboração com outros laboratórios deste centro de pesquisa.

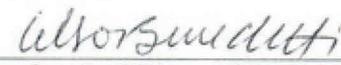
Serão feitas combinação de misturas enzimáticas frente à degradação de compostos ligno-hemicelulósicos em diferentes condições de preparo. A análise de sinergia destes componentes será avaliada por meio de planejamentos experimentais baseado em mistura com diferentes combinações enzimáticas. Estes resultados poderão direcionar a melhor combinação de novos coquetéis que poderão contribuir para o aumento do rendimento focado no processo de hidrólise de biomassas vegetais e substratos sintéticos.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 15.2.12

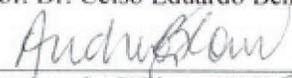
Parecer final: [X]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, favor comentários anexo.

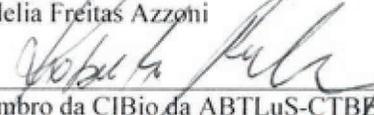

 Presidente de CIBio – ABTLuS-LNBio
 Jörg Kobarg

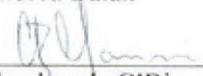

 Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
 Fabio Squina


 Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
 Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
 Sindelia Freitas Azzoni


 Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
 Andrea Balan


 Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
 Roberto Ruller


 Membro da CIBio – ABTLuS-SGT
 Carolina Barbosa Marini