Universidade de São Paulo
FMRP - Departamento de Bioquímica e Imunologia
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Paula Zaghetto de Almeida

**Clonagem e expressão heteróloga de enzimas
do sistema celulolítico visando a degradação
de biomassa lignocelulósica**

Ribeirão Preto

2019

PAULA ZAGHETTO DE ALMEIDA

**Clonagem e expressão heteróloga de enzimas do sistema celulolítico visando
a degradação de biomassa lignocelulósica**

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Co-orientadora: Dra. Rosymar Coutinho de Lucas

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Almeida, Paula Zaghetto de

Clonagem e expressão heteróloga de enzimas do sistema celulolítico visando a degradação de biomassa lignocelulósica. Ribeirão Preto, 2019

126 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. Celulases. 2. *Trichoderma reesei*. 3. *Eubacterium cellulosolvens*. 4. *Anoxybacillus thermarum*. 5. Endoglucanase. 6. β -glucosidase. 7. Hidrólise.

Nome: Paula Zaghetto de Almeida

Título: Clonagem e expressão heteróloga de enzimas do sistema celulolítico visando a
degradação de biomassa lignocelulósica.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Instituição: FFCLRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha avó, Maria Aparecida Bertelli Zaghetto

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Nanci e Marco Antonio, irmãos, Renata e André, e sobrinhos, João e Lucas, por todo suporte e apoio que recebi durante todos estes anos.

Agradeço à minha orientadora, a Professora Maria de Lourdes T. M. Polizeli, pela acolhida, disponibilidade, e por contribuir com minha formação acadêmica desde o mestrado.

À minha co-orientadora Dra. Rosymar Coutinho de Lucas, por me apresentar ao mundo da biologia molecular, pelo tempo dedicado ao meu projeto e pela amizade.

Ao Professor José Luis Garcia Lopez e a Dra. Beatriz Gálan por me receberem em seu laboratório, pela disponibilidade de tempo, pelos ensinamentos e pelo auxílio com os experimentos, sem os quais não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório Alex Contato, Ana Silvia, Ana Vici, Emanuelle Neiverth, Enrico Spiropulos, Guilherme Aranha, Inaiá Ramos, José Carlos, Juliana Infante, Malena Martinez, Mariana Rocha, Marita Gimenez, Monica Nozawa, Rosy Lucas, Tássio Brito, Thiago Pasin e Vanessa Pinheiro pela ajuda com experimentos e convivência agradável.

Aos meus amigos, em especial a Vanessa Pinheiro e Juliana Infante, pelo companheirismo e paciência nesses anos não tão fáceis.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, em especial à Maria Ivone pela disponibilidade e ajuda.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de
compreender mais para temer menos”

Marie Curie

RESUMO

ALMEIDA, Paula Zaghetto de. **Clonagem e expressão heteróloga de enzimas do sistema celulolítico visando a degradação de biomassa lignocelulósica**. 2019. 126 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O Brasil possui um grande potencial para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica. Neste contexto para o desenvolvimento de um bioprocesso limpo e sustentável faz-se necessária a utilização de grandes quantidades de enzimas, sobretudo as celulases. As celulases são responsáveis pela quebra da cadeia de celulose em unidades de glucose. Para baratear e ampliar a produção destas enzimas uma das estratégias que podem ser adotadas é a expressão heteróloga. Neste trabalho foram expressas em *Escherichia coli* uma endoglucanase de *Trichoderma reesei* (TR), uma endoglucanase de *Eubacterium cellulosolvens* com a estrutura completa (MI+MII) e parcial (MII) e uma β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum* (BG). A enzima TR, que foi expressa com a cepa de *E. coli* Origami2, destacou-se por ter pH ótimo baixo, de 3,5 e temperatura ótima de 65°C, ter uma excelente estabilidade entre os pH 2,5 e 7, e ser ativada em 88% por Mn^{2+} . As endoglucanases MI+MII e MII se destacaram pela produção fácil e rápida, gerando grande quantidade de enzimas com baixo custo, possuem pH ótimo de 4,5 e temperatura de 45°C para MI+MII e 50°C para MII. Ambas em extrato bruto são estáveis nos pH de 4 a 7 e temperaturas de 40°C e 50°C por até 24 horas. A BG destacou-se, além da produção rápida e pouco dispendiosa, pela excelente tolerância ao produto, sendo a mesma ativada em concentrações de até 0,4 M de glucose. Seu pH ótimo foi de 7 e a temperatura de 65°C, o K_m de 0,35 mM de pNPG e $V_{máx}$ cerca de 7000 U/mg, variando pouco conforme as diferentes metodologias aplicadas. A BG foi estável entre os pH 5,5 a 8 e na temperatura de 50°C por até 48 horas. As enzimas TR e BG foram aplicadas na degradação de bagaço-de-cana e capim-elefante, *in natura* ou tratados por autohidrólise, juntamente com um extrato bruto de enzimas provenientes do cultivo de *Aspergillus brasiliensis*. Os melhores rendimentos foram obtidos na hidrólise com o capim-elefante *in natura*, resultando na produção até 30 μ mol/mL de açúcares redutores.

Palavras-chave: Celulases. *Trichoderma reesei*. *Eubacterium cellulosolvens*. *Anoxybacillus thermarum*. Endoglucanase. β -glucosidase. Hidrólise.

ABSTRACT

ALMEIDA, Paula Zaghetto de. **Cellulolytic system enzymes cloning and heterologous expression aiming the lignocellulosic biomass degradation**. 2019. 126 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Brazil has great potential for the biofuels production from lignocellulosic biomass. In this context, the development of a clean and sustainable bioprocess requires the use of large quantities of enzymes, especially cellulases. Cellulases are responsible for the breakdown of cellulose chain into glucose units. To increase the production of enzymes and turn the process cheaper one of the strategies that can be adopted is the heterologous expression. In this work, an endoglucanase from *Trichoderma reesei* (TR), another endoglucanase from *Eubacterium cellulosolvens*, with complete (MI+MII) and partial (MII) structure, and a β -glucosidase from *Anoxybacillus thermarum* (BG) were expressed in *Escherichia coli*. The enzyme TR, which was expressed with *E. coli* Origami2, stood out to have a low optimal pH of 3.5 and an optimal temperature of 65°C, to have an excellent pH stability, among 2.5 and 7, and to be activated in 88% by Mn^{2+} . The MI+MII and MII endoglucanases were characterized by easy and fast production, generating a large quantity of enzymes with low cost, having an optimum pH of 4.5, and an optimal temperature of 40°C for MI+ MII, and 50°C for MII. The crude extract of both were stable at pH 4 to 7, and 40°C and 50°C for up to 24 hours. The BG had a fast and inexpensive production, and an excellent tolerance to the product. BG was activated up to 0.4 M of glucose. Its optimum pH was 7 and the temperature was 65°C. The k_m was calculated as 0.35 mM pNPG and V_{max} about 7000 U/mg, varying little according to the methodology applied. BG was stable among pH 5.5 to 8 and at 50 ° C for up to 48 hours. The TR and BG were added to a crude extract of enzymes from *Aspergillus brasiliensis*, and applied in the degradation of sugarcane bagasse and elephantgrass, both in natura or treated by autohydrolysis. The best hydrolysis yields were obtained with elephantgrass in natura, resulting in the production up to 30 μ mol/mL of reducing sugars.

Keywords: Cellulases. *Trichoderma reesei*. *Eubacterium cellulosolvens*. *Anoxybacillus thermarum*. Endoglucanase. β -glucosidase. Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas para a obtenção do etanol 2G	2
Figura 2. Esquema hipotético do ataque hierarquico de hidrolases na parede celular do colmo e folhas de cana.....	3
Figura 3. Ação das celulasas nas regiões cristalina e amorfa da celulose	4
Figura 4. Estrutura simplificada de um celulosomo	5
Figura 5. Estrutura de cristalografia das celulasas	7
Figura 6. Estrutura simplificada da hemicelulose apontando as regiões de ação das principais enzimas envolvidas em sua degradação	10
Figura 7. Sistema de expressão heteróloga pET-29a utilizado neste trabalho	13
Figura 8. Purificação da endoglucanase Cel5A de <i>T. reesei</i>	31
Figura 9. Determinação da temperatura ótima da enzima TR.....	32
Figura 10. Determinação do pH ótimo nas condições de ensaio.....	32
Figura 11. Perfil cinético de TR pela equação de Hill	34
Figura 12. Estabilidade de TR frente a diversos pH.....	35
Figura 13. Resistência de TR à desnaturação térmica a 40°C	35
Figura 14. Etapas da construção de endoglucanase de <i>Eubacterium cellulosovens</i>	37
Figura 15. Sobrenadante do lisado celular	38
Figura 16. Deleção parcial de MII de MI+MII, sobrenadante do lisado celular parcialmente purificado de MI-MII e MI+MII e prova de atividade	39
Figura 17. Ensaio de determinação da temperatura ótima das enzimas MII e MI+MII.....	40
Figura 18. Determinação de pH ótimo para MII e MI+MII.....	41
Figura 19. Estabilidade frente ao pH de MII e MI+MII por 15 minutos e 24 horas	43
Figura 20. Inativação térmica de MII e MI+MII em diferentes temperaturas e períodos	44
Figura 21. Produção e purificação da β -glucosidase.....	46
Figura 22. Determinação do pH ótimo da atividade da BG	47
Figura 23. Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática de BG	47
Figura 24. Efeito da adição de diferentes concentrações finais de glucose na atividade enzimática	48
Figura 25. Efeito da adição de diferentes concentrações de xilose na atividade enzimática.....	49
Figura 26. Cinética de (A) Hanes-Woolf e (B) Lineweaver-Burk BG sem adição de açúcares (controle), com a adição de 0,2 M de xilose, e 0,1 M de glucose	50
Figura 27. Estabilidade de pH em diferentes tampões McIlvaine por 15 minutos e 24 horas	52
Figura 28. Inativação térmica de BG em diferentes tempos e temperaturas	53
Figura 29. Quantificação de enzimas do complexo hemicelulolítico secretadas por <i>A. brasiliensis</i>	54
Figura 30. Efeito da adição de BG, TR e BG+TR na hidrólise de capim elefante e cana-de-açúcar SP80 com e sem pré-tratamento por autohidrólise.....	55
Figura 31. Aplicação de diferentes proporções de BG e TR na hidrólise de capim-elefante in natura.	56
Figura 32. Proximidade das sequencias de β -glucosidase de <i>Anoxybacillus</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Famílias das principais hemicelulases.....	9
Tabela 2. Classificação das lacases de acordo com Sirim et al., 2011.	11
Tabela 3. Efeito de compostos na atividade enzimática.....	33
Tabela 4. Efeito de 2 mM de diferentes compostos químicos na atividade de MII e MI+MII.	42
Tabela 5. Valores de $V_{m\acute{a}x}$ e k_m obtidos através de diferentes modelos	50
Tabela 6. Efeito de 2 mM de diversos compostos na atividade enzimática	51

LISTA DE SIMBOLOS

A Ampère

C Celsius

g Grama

g Gravidade

kb Quilobase

kDa QuiloDalton

L Litro

m Mili

M Mol

nm Nanômetros

U Unidade enzimática

V Volts

μ Micro

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Extrato bruto de <i>Aspergillus brasiliensis</i>
BG	β -glucosidase de <i>Anoxybacillus thermarum</i>
CBM	<i>Carbohydrate Binding Module</i>
CMC	Carboximetilcelulose
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNS	Ácido dinitro-3,5 salicílico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
MI+MII	Endoglucanase de <i>Eubacterium cellulosolvens</i>
MII	Endoglucanase de <i>Eubacterium cellulosolvens</i> com estrutura parcial
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenediamina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TR	Endoglucanase de <i>Trichoderma reesei</i>

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Biomassa lignocelulósica e sua degradação	1
1.2 Celulases	3
1.3 AA9 e Swollenina	7
1.4 Hemicelulases	8
1.4.1 Enzimas degradadoras da xilana	9
1.4.2 Enzimas desramificadoras	9
1.5 Enzimas Deslignificantes	11
1.6 Expressão heteróloga.....	12
2.1 OBJETIVOS	15
2.2 Objetivo geral.....	15
2.3 Objetivos específicos.....	15
3.MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Origem e desenho das sequências gênicas	17
3.1.1 – Endoglucanase II de <i>Trichoderma reesei</i>	17
3.1.2 – Endoglucanase de <i>Eubacterium cellulosolvens</i>	17
3.1.3 – β -glucosidase de <i>Anoxybacillus thermarum</i>	18
3.2 Cepas utilizadas no trabalho.....	18
3.3 Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação e choque térmico	18
3.4 Seleção dos transformantes	19
3.5 Inserção dos genes no vetor de expressão pET29a(+)	20
3.6 Cultivo com indução por IPTG	20
3.7 Extração enzimática	20
3.8 Purificação.....	21
3.9 Atividade enzimática.....	21
3.9.1 Endoglucanases	21
3.9.2 β -glucosidase.....	22
3.9.3 Dosagens enzimáticas do extrato de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	23
3.10 Dosagem de Proteína.....	23
3.11 Eletroforese	23
3.11.1 Eletroforese de DNA em agarose.....	23
3.11.2 Eletroforese de proteínas em SDS-PAGE	24
3.11.3 Zimograma	24
3.12 Sequenciamento de N- terminal	24

3.13 Caracterização Enzimática	25
3.13.1 Determinação de pH e temperatura ótima	25
3.13.2 Estabilidade de pH e temperatura.....	25
3.13.3 Efeito de Íons	25
3.13.4 Efeito de glucose e xilose na atividade da β -glucosidase.....	26
3.13.5 Cálculo das constantes cinéticas	26
3.14 Aplicação de BG e TR na hidrólise de biomassa lignocelulósica	26
3.14.1 Pré-tratamento: autohidrólise	26
3.14.2 Hidrólises	27
3.15 Manutenção das cepas.....	27
3.16 Reprodutibilidade e estatística	27
4. RESULTADOS	29
4.1 Clonagem e expressão de domínio catalítico da endoglucanase II, Cel5A de <i>Trichoderma reesei</i>	29
4.1.2 Purificação de TR.....	30
4.1.3 – Caracterização Enzimática de TR	32
4.2. Clonagem e expressão de uma endoglucanase de <i>Eubacterium cellulosolvens</i>	36
4.2.1 Caracterização bioquímica de MI+MII e MII	40
4.3. Clonagem e expressão heteróloga e purificação de uma β -glucosidase de <i>Anoxybacillus</i> <i>thermarum</i>	45
4.3.1 Caracterização bioquímica da β -glucosidase de <i>Anoxybacillus thermarum</i>	46
4.4 Aplicação das enzimas BG e TR em hidrólise de biomassa	54
5. DISCUSSÃO.....	58
5.1 Expressão da endoglucanase EG-II de <i>Trichoderma reesei</i>	58
5.2 Expressão da endoglucanase Cel5A <i>Eubacterium cellulosolvens</i>	61
5.3 Comparação das endoglucanases expressas	62
5.4 Expressão da β -glucosidase de <i>Anoxybacillus thermarum</i>	63
5.5 Efeito das celulases expressas na degradação de biomassa.....	66
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXOS.....	82
Anexo I – sequência sintética de Endoglucanase II (Cel5A) de <i>Trichoderma reesei</i>	82
Anexo II – Sequência de Módulo I (inativo).....	83
Anexo III – Sequência de Módulo II.....	84
Anexo IV – Sequência de Módulo I + II.....	85
Anexo V – Sequência da β -glucosidase	87
Anexo VI- Sequenciamento do N-terminal das bandas resultantes da purificação de TR.....	88

Anexo VII– Sequência de módulo I-II.....	104
9. Apêndices.....	107
Apêndice I – Meio LB-(Luria-Bertani) (Bertani, 1951).....	107
Apêndice II – Terrific broth (Tartoff e Hobbs, 1987)	108
Apêndice III – Meio Vogel (Vogel, 1964).....	109

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa lignocelulósica e sua degradação

O Brasil é um grande produtor agrícola, e consequentemente, são abundantes os resíduos lignocelulósicos acumulados. Dentre suas principais culturas está a cana-de-açúcar, com uma produção prevista de 635,510 milhões de toneladas para a safra de 2018/2019, com um crescimento de 0,4% em comparação com a safra 2017/2018 (CONAB, 2018). A cada tonelada de cana são produzidos 260 kg de bagaço (considerando 50% de umidade) (SEABRA et al., 2010). Outra fonte de lignocelulose é o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), esta gramínea C4 possui uma produtividade de até 52 toneladas de massa seca por hectare por ano, comparado as 32 toneladas produzidas pela cana-de-açúcar (PEREIRA et al., 2016).

A parede celular vegetal possui diferentes composições de acordo com a espécie da planta, idade, tecido e tipo celular (CARPITA; MCCANN, 2000). A cana-de-açúcar, por exemplo, é composta de aproximadamente 39% de celulose, 27% de hemicelulose e 28% de lignina (LIMA et al., 2014).

Como sua composição é majoritariamente de polímeros de açúcares, esse resíduo pode ser reaproveitado para a produção de compostos de alto valor como o etanol de segunda geração (2G), aditivos alimentícios, ácidos orgânicos e enzimas (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

Estudos que visam a melhora da produção do etanol celulósico, ou etanol 2G, são conduzidos por diversos centros no mundo todo, visando a segurança da matriz energética para as próximas gerações, bem como a modo de estabelecer uma fonte renovável e menos danosa ao meio ambiente. A conversão da celulose ao etanol passa primeiro pela conversão da celulose em glicose (**Figura 1**), pode ser química ou enzimática. Conversões enzimáticas são vantajosas por serem específicas e não gerarem resíduos danosos ao meio ambiente (SAINI et al., 2018).

Figura 1. Etapas para a obtenção do etanol 2G (Adaptado de SAINI et al., 2018).

A conversão enzimática da celulose e hemicelulose em açúcares ainda é bastante onerosa. Uma estratégia para melhorar a eficiência desta conversão é o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica antes da digestão enzimática. Dentre os principais pré-tratamentos empregados temos os ácidos, básicos, enzimáticos ou físicos, como a explosão a vapor. Todos eles visam diminuir o grau de polimerização e recalcitrância da biomassa facilitando o acesso das enzimas ao substrato e dessa forma aumentar a conversão de celulose e hemicelulose a monossacarídeos após ação das hidrolases (RASTOGI, 2017).

Para a completa degradação da biomassa lignocelulósica é necessária a ação, em conjunto, de diversas enzimas. A **Figura 2** mostra uma representação hierárquica do ataque de enzimas à parede celular composta por microfibrilas de celulose (pontos pretos) que estão ligados ao xiloglucano e a compostos fenólicos (círculos cinza escuro). A arabinosilana é representada em cinza claro e está ligada ao xiloglucano por ácidos ferúlicos.

A quantidade de enzima necessária para atingir a completa hidrólise da biomassa lignocelulósica é bastante alta. Esta quantidade pode ser reduzida com, além de pré-tratamentos, a elaboração de coquetéis contendo enzimas auxiliares que favoreçam o sinergismo e resultem em uma conversão de biomassa mais eficiente (HU et al., 2013).

Figura 2. Esquema hipotético do ataque hierárquico de hidrolases na parede celular do colmo e folhas de cana. Em preto microfibrilas de celulose, em cinza escuro xiloglucano e compostos fenólicos, em cinza claro a arabinoxilana. Adaptado de Souza et al. (2012).

A construção de coquetéis enzimáticos é uma estratégia utilizada por indústrias para diminuir a quantidade de enzima necessária e, conseqüentemente, reduzir custos do bioprocessamento (LUCAS et al., 2015). O coquetel enzimático mais utilizado para a produção de etanol de segunda geração é o Cellic CTec3 da Novozymes que é composto por celulases, hemicelulases e enzimas auxiliares (LPMOs). Para cada tonelada de etanol produzido são necessários 50 kg de enzimas (Novozymes, 2012).

1.2 Celulases

São classificadas como celulases as enzimas que agem a degradação da celulose. A celulose é um homopolímero de glucose com ligações β -1,4 que possui um terminal redutor e um não redutor, e é bastante resistente à degradação. A recalcitrância deste material é devido aos inúmeros grupos hidroxila nos anéis de glucose, que contribuem para a formação massiva de pontes de hidrogênio intra e inter moleculares. De acordo com o grau de organização das ligações entre as cadeias de celulose, ela pode ser classificada como cristalina (altamente organizada) ou amorfa (menos organizada)

(**Figura 3**). Regiões amorfas absorvem água mais facilmente e são mais susceptíveis a ação das glucosil-hidrolases (GHs). As celulasas podem ser divididas em endoglucanases (EG), exoglucanases (CBH) e β -glucosidases (BG) (PAYNE et al., 2015; WEI; MCDONALD, 2016).

Figura 3. Ação das celulasas nas regiões cristalina e amorfa da celulose. Em azul, EG: endoglucanase, agindo na região amorfa da celulose, presa à região cristalina por um CBM (Carbohydrate-binding-module); Em laranja CBH: celobiohidrolase, agindo nas extremidades da região cristalina e liberando celobiose, que pode ser do tipo I – age na extremidade redutora ou do tipo II – age no terminal não redutor; Em amarelo BG: β -glucosidase, agindo na celobiose e liberando monômeros de glicose; Em roxo uma AA9 agindo na região cristalina da celulose deixando um ponto de ruptura da cadeia; Em rosa SWO: Swollenina, agindo entre as cadeias de celulose cristalina e deixando a estrutura menos coesa (PASIN et al., no prelo).

As celulasas podem ser produzidas e secretadas livres, não complexadas ou em complexos. Microrganismos anaeróbios produzem celulasas organizadas em complexos chamados de celulosomos como o ilustrado na **Figura 4**. A junção de celulasas nos celulosomos tem como objetivo melhorar a eficiência de hidrólise e assim gerar mais monossacarídeos metabolizáveis pelo microrganismo. Eles são compostos por uma região de ancoramento, não catalítica, e uma parte ativa, enzimática, que pode ser composta por diversos tipos de GHs, como celulasas e xilanases (ARTZI et al., 2017; HAITJEMA et al., 2017; SAINI et al., 2018).

Muitas celulasas e hemicelulasas possuem em sua estrutura um domínio de ligação ao substrato, chamado de CBM (*Carbohydrate Binding Module*). Estas estruturas se ligam sobretudo à parte cristalina da biomassa. Os CBMs não possuem qualquer

atividade catalítica, e não há evidências de que eles melhorem o rendimento da hidrólise (VÁRNAI et al., 2014).

Figura 4. Estrutura simplificada de um celulosomo, HLD: domínio hidrofílico; CBD: domínio de ligação à celulose; EG: endoglucanase; EX: exoglucanase; BG: β -glucosidase (Modificado de Saini et al., 2018).

As celulasas estão divididas em diversas famílias de GH, sobretudo na 5, 6, 7, 12, 45 para endo e exo celulasas, e 1 e 3 para as β -glucosidases (PAYNE et al., 2015). Algumas das principais enzimas estão descritas com maior detalhe abaixo:

As endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) agem nas ligações glicosídicas presentes majoritariamente na região amorfa da celulose (**Figura 3**). Elas estão distribuídas em 16 das 162 famílias de GHs. Estruturalmente são compostas de *loops* pequenos, desta forma as fendas do sítio ativo têm fácil acesso ao substrato (**Figura 5A**). As EG agem no interior da cadeia de celulose originando oligossacarídeos de cadeia longa. Ao se comparar com as outras celulasas, as EG possuem uma taxa de dissociação mais rápida, e são as que apresentam melhor resultado na liquefação da celulose, diminuindo o tamanho das cadeias, e consequentemente a viscosidade (BADIEYAN et al., 2012; BOYCE; WALSH, 2015; JUTURU; WU, 2014).

As exoglucanases ou celobiohidrolases agem no final da cadeia da celulose cristalina liberando celobiose (**Figura 3**). Essa classe de enzimas age processivamente na hidrólise de ciclodextrinas, e são divididas em EC 3.2.1.91, que atuam nos terminais não

redutores, e EC 3.2.1.176 que agem nos terminais redutores. A estrutura destas enzimas é composta por *loops* longos que normalmente formam um túnel em volta dos resíduos com atividade catalítica, desta forma o substrato é direcionado através dos túneis até encontrar o sítio ativo (**Figura 5B**) (OBENG et al., 2017; WILSON; KOSTYLEV, 2012).

As β -glucosidases (EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose à unidades de glicose. Diversas β -glucosidases também são capazes de catalisar a reação reversa por transglicosilação, onde moléculas de glucose são transferidas para a celobiose ou glucose para produzir diferentes oligossacarídeos. As BG são bastante susceptíveis à inibição pelo produto, especialmente em hidrólises contendo grande quantidade de biomassa, representando este um dos grandes desafios na conversão total da celulose a glucose. A adição de altas quantidades de BG em coquetéis enzimáticos tem o objetivo extra de reduzir a inibição causada pela celobiose nas celobiohidrolases e endoglucanases (ANDRÍC et al., 2010; SINGHANIA et al., 2013).

A causa mais descrita na literatura para a inibição pelo produto nas BG, é a inibição competitiva, mas também são citadas a inibição não-competitiva, e mecanismos mistos e não competitivos. A maioria das β -glucosidases pertence às famílias GH 1 e 3, mas também são encontradas nas famílias 5, 9 e 30. As BGs pertencentes a família GH 10 são de 10 a 1000 vezes mais tolerantes à glucose quando comparadas às enzimas classificadas como GH3. A análise estrutural destas enzimas revela que a tolerância à glucose está altamente relacionada a acessibilidade do sítio ativo (loops ao redor do sítio ativo então representados em azul claro na **Figura 5C**), ou seja, quanto mais acessível, mais facilmente a enzima é inibida (ANDRÍC et al., 2010; DE GIUSEPPE et al., 2014; SINGHANIA et al., 2013).

Figura 5. Estrutura de cristalografia das celulases. A -- Estrutura cristalográfica do túnel levando ao sítio catalítico da celobiohidrolase Th_Cel7A, realçando os laços do túnel (TEXTOR et al., 2012). B Diagrama da endoglucanase Cel5R mostrando a presença da dobra do barril TIM comum às celulases da família GH5. As 8 cadeias paralelas que formam uma estrutura em barril são mostradas em magenta. As 8 hélices α que circundam o β -barril são mostradas em ciano (GARG et al., 2016). C - Representação de BG com os loops que circundam o sítio ativo em azul claro. A molécula de glicerol que ocupa um subsítio é representada por esferas (verde - carbono, vermelho - oxigênio) (GUIUSEPPE et al., 2014).

Outra importante enzima do complexo celulolítico em fungos é a celobiose desidrogenase (CDH) - EC 1.1.99.18. Ela promove a oxidação da celobiose e alguns celoligossacarídeos. É uma flavo enzima extracelular que possui um domínio flavina contendo FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e um domínio heme com ligação ao citocromo b (*haem b-binding cytochrome*) (CAMERON; AUST, 2001). A CDH pode atuar de forma sinérgica com as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO), cujas bases estruturais deste fenômeno foram descritos por Tan et al. (2015), no qual o citocromo é responsável pela rápida transferência de elétron entre a CDH e a LPMO, esta redução inicia a ativação por oxigênio do centro cupríco da monooxigenase, levando a subsequente despolimerização da celulose.

1.3 AA9 e Swollenina

Auxiliary Activity 9 (AA9), ou enzima de Atividade auxiliar 9, é classificada como uma LPMO (*Lytic Polysaccharide Monooxygenases*) ou Monooxigenase Lítica de Polissacarídeos, e é uma enzima dependente de cobre que é adicionada na maioria dos

coquetéis industriais. As AA9 favorecem a ação das celulases convencionais durante a hidrólise de substratos lignocelulósicos. Elas promovem a quebra oxidativa das ligações do C1 ou C4, perturbando a cristalinidade da celulose, e possibilitando um melhor acesso das celulases à cadeia de celulose, melhorando assim, o rendimento da hidrólise. A oxidação promovida pelas LPMO é dependente de um doador de elétrons, esse doador pode ser o ácido ascórbico, a celobiose desidrogenase, a lignina, ou sistemas fotocatalíticos. A oxidação ocorre apenas na presença de O₂ ou H₂O₂ como co-substrato (BERTINI et al., 2018; MÖLLERS et al., 2017; MÜLLER et al., 2018; WALTON, DAVIES, 2016).

Swolleninas (SWOs) são proteínas não enzimáticas com alta homologia às expansinas vegetais. Esta classe de proteínas tem como propriedade desaglomerar as cadeias de celulose cristalina. As SWOs agem na quebra das ligações de hidrogênio presentes entre as cadeias de celulose, promovendo o afrouxamento da estrutura, e consequentemente, aumentando o acesso das celulases convencionais à estrutura de celulose, e consequentemente sua hidrólise. As SWO também podem agir na hemicelulose, promovendo uma melhor solubilização deste material, e desta forma, agindo sinergicamente com as hemicelulases (COSGROVE, 2000; GOURLAY et al., 2013; KANG et al., 2013; KIM et al., 2014; SANTOS et al., 2017).

1.4 Hemicelulases

São classificadas como hemicelulases todas as enzimas responsáveis pela despolimerização da hemicelulose, um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza. É um heteropolissacarídeo composto majoritariamente de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glucose e galactose) e ácidos acético e urônicos. Para obter a total degradação da hemicelulose se faz necessário a ação de um complexo enzimático atuando em conjunto, essas enzimas pertencem a diversas famílias de GHs como demonstrado na **Tabela 1**. As principais enzimas pertencentes a este complexo estão descritas a seguir (POLIZELI et al., 2005; SAHA, 2003).

Tabela 1. **Famílias das principais hemicelulases**

Enzima	Família
Endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.18)	GH5, 8, 10, 11, 43
Exo- β -1,4-xilosidase (EC 3.2.1.37)	GH3, 39, 43, 52, 54
α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	GH3, 43, 51, 54, 62
α -glucuronidase (EC 3.2.1.139)	GH4, 67
Acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72)	CE1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Feruloil esterase (EC 3.1.1.73)	CE1

Adaptado de Clifford, 2018. <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/3>

1.4.1 Enzimas degradadoras da xilana

A xilana é o maior constituinte da hemicelulose, sendo considerado um polímero de unidades de xilose unidas por ligações β -1,4, como demonstrado na **Figura 6**, e é a cadeia central da hemicelulose. Para a degradação da xilana à xilose duas enzimas principais são necessárias, a endo- β -1,4-xilanase e a exo- β -1,4-xilosidase:

- As endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.18), ou endoxilanases, catalisam a hidrólise da xilana a xilooligossacarídeos. Esta enzima age no interior da cadeia da xilana promovendo a quebra das ligações β -1,4;
- As exo- β -1,4-xilosidase (EC 3.2.1.37), ou β -1,4-xilosidase, agem partir do terminal não redutor da cadeia de xilana ou de xilooligossacarídeos (incluindo xilobiose), liberando desta forma unidades de D-xilose (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016; HEINEN et al., 2018; POLIZELI et al., 2005).

1.4.2 Enzimas desramificadoras

A remoção das ramificações ligadas a cadeia de xilana, como demonstrado na **Figura 6**, se faz pela ação de várias enzimas do complexo hemicelulolítico, como as discutidas a seguir:

- α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), ou arabinofuranosidase, cliva a arabinoxilana a partir do terminal não redutor, nas posições O-2 ou O-3, liberando assim oligômeros (JUTURU; WU, 2013);
- α -glucuronidase (EC 3.2.1.139) hidrolisa a ligação glicosídica 1-2 entre a xilana e a cadeia lateral de ácido 4-O-metil-D-glucurônico liberando ácido glucurônico (SHALLOM; SHOHAM, 2003);
- Acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72) que remove as substituições acetil presentes na xilana liberando ácido acético (TENKANEN et al., 1992);
- Feruloil esterase (EC 3.1.1.73), ou feruloil xilana esterase, hidrolisa a ligação ester entre a arabinose e o ácido ferúlico (DILOKPI MOL et al., 2016).

Figura 6. Estrutura simplificada da hemicelulose apontando as regiões de ação das principais enzimas envolvidas em sua degradação. Em rosa os substituintes o-acetil são clivados pela acetil xilana esterase; Em amarelo o resíduo de arabinofuranosil é removido pela arabinofuranosidase; Em verde o ácido ferúlico é desligado da cadeia pela feruloil esterase; Em azul o ácido glucurônico é removido pela ação da α -glucuronidase; A região não destacada, a estrutura linear, é clivada em seu interior pela endoxilanase; os xilooligossacarídeos resultantes da ação da endoxilanase são por fim hidrolisados a monômeros de xiloses, a partir de seu terminal não redutor, pela ação da β -xilanase (PASIN et al., no prelo).

1.5 Enzimas Deslignificantes

As enzimas deslignificantes são utilizadas como um pré-tratamento da biomassa para a produção de biocombustível. À medida que a lignina é rompida ou removida as fibrilas de celulose e hemicelulose ficam expostas, desta forma, as GHs podem ter um melhor acesso ao substrato. Além disso, as enzimas deslignificantes podem remover alguns inibidores do metabolismo de leveduras, principalmente compostos fenólicos, os quais interferem na fermentação durante a produção do bioetanol (KUDANGA; ROES-HILL, 2014).

A classe de enzimas deslignificantes mais importantes é a das lacases (EC 1.10.3.2). Elas são enzimas multicobre, e tem papel central na degradação da lignina e remoção de compostos fenólicos. Podem ser divididas de acordo com Sirim et al. (2011) conforme mostrado na **Tabela 2**. As lacases agem promovendo a oxidação de um elétron em uma ampla gama de substratos, sobretudo os fenilpropanóides da lignina (MATE; ALCALDE, 2017).

Outras enzimas importantes são as heme-peroxidases. Elas catalisam a degradação dependente de peróxido de hidrogênio dos compostos fenólicos (como a manganês peroxidase -EC 1.11.1.13) e não fenólicos (como a lignina peroxidase-EC 1.11.1.14) da lignina (PLÁCIDO; CAPAREDA, 2015).

Tabela 2. **Classificação das lacases de acordo com Sirim et al., 2011.**

Superfamília	Famílias homólogas	Proteínas	Estruturas
A (Basidiomicete)	4	201	13
B (Ascomicete)	6	421	6
C (Inseto)	8	168	0
G (Planta)	5	333	0

Adaptado de Sirim et al., (2011)

1.6 Expressão heteróloga

A expressão heteróloga de enzimas em sistemas recombinantes visa a superprodução de enzimas com uma consequente redução de custos. Uma ampla gama de sistemas de expressão heteróloga vem sendo empregados para a produção de celulasas recombinantes, sistemas em bactérias, leveduras, plantas e fungos filamentosos. Sistemas bacterianos procarióticos são os mais simples de manipular, de baixo custo e podem produzir altas concentrações de proteína, porém, algumas dificuldades são experienciadas na produção de proteínas inteiras e em alta quantidade (LAMBERTZ et al., 2014).

Para o presente trabalho foi selecionado o vetor pET29ac da Novagen (**Figura 7**). Os sistemas de expressão pET são desenvolvidos para a clonagem e expressão em *E. coli*. Os genes alvo são clonados sob controle do promotor de transcrição e iniciação de tradução do gene 10 do bacteriófago T7. A vantagem do uso desta família de vetores é sua transcrição pela T7 polimerase, que é altamente seletiva e ativa quando induzida, sendo que a proteína produto do gene alvo pode representar até 50% do total de proteínas produzidas pela célula. Como agente indutor é utilizado o IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e como marca de resistência é utilizado o antibiótico Kanamicina (NOVAGEN, 2003).

Figura 7. Sistema de expressão heteróloga pET-29a utilizado neste trabalho (NOVAGEN, 2003)

O uso de sistemas procariotos para a expressão de celulasas pode levar à formação de corpos de inclusão (forma insolúvel), ao dobramento incorreto da proteína e alteração no padrão de glicosilação. Alternativas como a diminuição da temperatura de cultivo e o uso de cepas como a Origami (DE3), que promove a formação de pontes de sulfeto, podem ser utilizadas como alternativas para a produção de proteínas ativas solúveis (LAMBERTZ et al., 2014; SONG et al., 2012).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Clonagem e expressão heteróloga de genes sintéticos de celulasas para sua caracterização e possível aplicação em bioprocessos lignocelulósicos.

2.2 Objetivos específicos

- Clonagem e expressão, purificação e caracterização bioquímica do sítio catalítico da endoglucanase Cel5A de *Trichoderma reesei*;
- Clonagem, expressão e caracterização bioquímica da endoglucanase Cel5A de *Eubacterium cellulosolvens* com estrutura completa e parcial;
- Clonagem, expressão, purificação e caracterização bioquímica de uma β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum* com ênfase na tolerância à glucose;
- Aplicação da endoglucanase de *T. reesei* e da β -glucosidase de *A. thermarum* expressas em *E. coli* na hidrólise de biomassa vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e desenho das sequências gênicas

Os genes sintéticos utilizados no trabalho foram baseados em artigos científicos e desenhados para a expressão no vetor pET29a (+). Todas as sequencias foram sintetizadas e ligadas ao vetor de alto número de cópias pUC57 pela empresa GenScript.

3.1.1 – Endoglucanase II de *Trichoderma reesei*

A sequência correspondente ao sítio catalítico da endoglucanase II de *Trichoderma reesei* (TR) foi baseada no trabalho de Lee et al. (2011), GenBank: JN172972.1. O gene foi desenhado para ser clonado entre os sítios NdeI e EcoRI, ao qual foi também adicionada uma cauda de histidinas no C-terminal e um stop códon logo após, conforme apresentado em **Anexo I**.

3.1.2 – Endoglucanase de *Eubacterium cellulosolvens*

A sequência utilizada para a clonagem e expressão da endoglucanase de *E. cellulosolvens* foi baseada no trabalho de Yoda et al. (2005). Esta enzima descrita neste artigo é constituída de um CBM (*Carbohydrate Binding Module*), seguida de um sítio catalítico (chamado de módulo I – MI), logo é encontrada uma região de linker, seguida por mais um CBM e um segundo sítio catalítico (chamado de módulo II-MII). A sequência gênica da endoglucanase foi desenhada para a síntese em duas partes: uma contendo o MI, e outra o MII. Os módulos foram clonados separadamente e depois unidos por um sítio de restrição de BamHI em comum adicionado às sequencias. Neste caso a cauda de histidina de ambas as construções foi adicionada no N-terminal. Uma lisina foi adicionada no começo da sequência de MI a fim de aumentar a expressão. As sequencias clonadas estão apresentadas nos **Anexos II, III e IV**. Um esquema demonstrando as etapas de clonagem está disponível na seção de resultados, **Figura 14**.

3.1.3 – β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum*

A sequência da β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum* (BG) clonada neste trabalho foi baseada na sequência genômica depositada por Poli et al. (2005) no GenBank, com número de acesso JXTH01000020. O gene foi sintetizado para ser clonado entre os sítios de restrição NdeI e XhoI. Uma cauda de histidina foi adicionada no C-terminal da sequência (**Anexo V**).

3.2 Cepas utilizadas no trabalho

Foram utilizadas neste trabalho as cepas de *Escherichia coli* DH10 β , BL21 (DE3) e Origami2 (DE3). A *E. coli* DH10 β , que foi preparada como quimiocompetente, foi utilizada para a multiplicação de vetores e transformação de produtos de ligação. A cepa BL21 (DE3) foi utilizada para a expressão dos genes de origem bacteriana (MI, MII e BG). A cepa Origami2 (DE3) foi utilizada para a expressão de TR.

Para o experimento de hidrólise de biomassa lignocelulósica foi cultivado o fungo *Aspergillus brasiliensis*, pertencente a coleção de Fungos Filamentosos da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, isolado da Mata Atlântica por Almeida et al. (2017).

3.3 Transformação de *E. coli* por eletroporação e choque térmico

As células DH10 β preparadas com cloreto de cálcio foram retiradas do freezer - 80°C e colocadas em banho de gelo por 10 minutos, em seguida as células foram colocadas em contato com os vetores ou produtos de ligação (cerca de 50 ng) e mantidas em gelo por mais 40 minutos. Para o choque térmico as células foram aquecidas em banho a 37°C, por 3 minutos, seguido de resfriamento em gelo por 2 minutos. Logo em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB (meio Luria-Bertani) (**Apêndice I**) e incubadas em agitação de 180 rpm, a 37°C, por 1 hora (BERTANI, 1951). O cultivo

resultante então foi plaqueado em meio LB+ágar contendo os antibióticos adequados e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), caso necessário.

As células BL21 (DE3) e Origami2 (DE3) foram crescidas *overnight* em LB. Em seguida 100 μ L deste cultivo foi transferido para 10 mL de meio fresco, e este inóculo foi incubado a 37°C até atingir a OD₆₀₀ de 0,6. As células resultantes foram centrifugadas e lavadas em água destilada gelada por 3 vezes. O *pellet* de células foi então ressuspensionado em 100 μ L de água e colocado em contato com o vetor de expressão. Essa mistura foi mantida em gelo por 15 minutos e em seguida eletroporada a 2,5 Volts e 200 R. Em seguida foi adicionado 1 mL de LB às células, que foram incubadas e plaqueadas da mesma forma como descrito acima para as células quimiocompetentes.

3.4 Seleção dos transformantes

A seleção das colônias transformantes foi realizada por PCR de colônias ou mini-preparação (mini-prep) de colônias. Para ambos os casos as colônias resultantes da transformação foram transferidas para uma nova placa para evitar falsos positivos ou propiciar uma maior quantidade de biomassa. Para a PCR de colônia com o vetor pET29a(+) foram utilizados os *primers* comerciais que flanqueiam as regiões T7 *promoter* e T7 *terminator*. Para o *template* de material genético da reação, uma amostra da colônia a ser checada foi coletada com o auxílio de um palito de dentes e diluída em 20 μ L de água MilliQ estéril. Deste, 1 μ L foi adicionado à reação de PCR. A DNA polimerase utilizada, tempo de anelamento e extensão, e temperatura variaram conforme o gene a ser analisado.

Para mini-preparações de colônias uma amostra de biomassa foi raspada de placa de cultivo e adicionada em 40 μ L de tampão de ruptura (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 10 mM, NaOH 0,1 M, SDS 1%), em seguida a reação foi neutralizada com 3 μ L de HCl 1 N e colocada em gelo. Logo foi adicionado 5 μ L de *loading buffer* e então os tubos foram colocados a – 80°C por 30 min, seguido de centrifugação à 13000 xg, por 10 minutos e análise do tamanho dos plasmídeos por eletroforese em gel de agarose.

3.5 Inserção dos genes no vetor de expressão pET29a(+)

Os genes, primeiramente foram multiplicados e purificados do vetor pUC57, utilizando kit comercial de mini-preparação (Roche), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, os genes foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas (New England Biolabs). O vetor pET29a(+) também foi digerido com as mesmas enzimas. Para a ligação, uma mistura do gene digerido + pET29a(+) em proporções de 3:1 até 5:1 foi unida por ligase (New England Biolabs), conforme as especificações do fabricante. O produto de ligação foi então transformado em células DH10 β .

3.6 Cultivo com indução por IPTG

Para a produção das proteínas de interesse os cultivos foram induzidos por IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo). Para a cepa BL21 (MI, MII, BG) foi colocado um pré-inóculo, de 10 mL, *overnight*, em meio LB + kanamicina 50 μ g/mL a 37°C e 180 rpm. No dia seguinte 1 mL deste cultivo foi transferido para 100 mL de meio fresco, também suplementado com kanamicina. Este cultivo foi acompanhado até que a OD₆₀₀ atingisse 0,6-0,8. Neste ponto então foi adicionado 0,4 mM de IPTG no cultivo que foi estendido por mais 4 horas.

Para a cepa origami (TR) o cultivo ocorreu em Terrific broth (**Apêndice II**) (TARTOFF; HOBBS, 1987). O pré-inóculo até o momento da indução ocorreu conforme o descrito para a cepa BL21. Após a indução, o cultivo foi mantido a 21°C, por 18 horas, para a produção proteica.

3.7 Extração enzimática

Após o cultivo, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 xg e ressuspendidas em 15 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. Em seguida as células foram rompidas por sonicação, com pulsos de 30 segundos, por 3 minutos, em

intensidade de 50%. Em seguida, os cultivos foram novamente centrifugados, a 7000 xg, por 15 minutos, para separação da porção solúvel e insolúvel do extrato. A fração do sobrenadante foi utilizada para os ensaios enzimáticos.

3.8 Purificação

As proteínas expressas foram purificadas em coluna de afinidade HisTrap Níquel 5 mL FastFlow no equipamento ÄKTA start. As amostras foram ligadas à coluna no mesmo tampão em que foram lisadas (fosfato de sódio, pH 7,4, 20 mM), em seguida a coluna foi lavada em tampão adicionado de 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol por 5 volumes de coluna. Em seguida, a proteína foi eluída em tampão contendo 500 mM de imidazol.

Para TR foi necessário um segundo passo de purificação, no mesmo sistema ÄKTA start. A fração com a enzima resultante do passo anterior foi dialisada e colocada novamente em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 e passada na coluna de troca iônica High Q (Biorad).

As proteínas derivadas de *E. cellulosolvens*, apesar de terem sido purificadas com sucesso, apresentaram baixa estabilidade, impossibilitando sua caracterização. Dessa forma os dados apresentados no trabalho são referentes ao lisado celular, sem purificação.

3.9 Atividade enzimática

3.9.1 Endoglucanases

A atividade de endoglucanase foi quantificada pela liberação de açúcares redutores utilizando o método de Miller (1959). Um volume de 50 µL do extrato enzimático foi incubado a 40°C com 50 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5), contendo CMC (carboximetilcelulose) 2%, durante 10 minutos a 45°C. A reação foi paralisada com 100 µL de DNS (ácido dinitro-3,5 salicílico) e então a amostra foi fervida

por 5 minutos. Finalmente, adicionou-se 1 mL de água destilada. A leitura ocorreu em leitor de placas a 540 nm. O branco foi composto da reação no tempo zero.

Para cálculo da atividade enzimática foi construída uma curva padrão com amostras em concentrações de 0 a 4 μmol de glucose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições do ensaio. A quantidade de unidades totais foi determinada pela multiplicação da atividade enzimática (U/mL) pelo volume em mL do extrato bruto ou enzima purificada.

3.9.2 β -glucosidase

Os ensaios para atividade da β -glucosidase foram realizados utilizando p -nitrofenil- β -D-glucosídeo (pNPG) como substrato, que ao ser clivado libera p -nitrofenol, que absorve o comprimento de onda de 410 nm.

Para os ensaios de temperatura, pH ótimo e estabilidade foram realizados micro-ensaios, que eram compostos de 15 μL de enzima, 15 μL de pNPG 30 mM, 50 μL de tampão McIlvaine pH 7 e 20 μL de água. A reação foi incubada em termociclador a 65°C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 100 μL de Na_2CO_3 0,3 M. Uma alíquota de 100 μL desta mistura foi então lida em espectrofotômetro, em microplaca, a 410 nm (MCILVAINE, 1921). O branco da reação foi constituído dos mesmos reagentes, porém, a enzima foi previamente inativada por fervura.

Para os ensaios de cinética enzimática e inibição pelo produto formado na reação foram realizados ensaios compostos de 300 μL de tampão McIlvaine pH 7, 50 μL de enzima, 80 μL de pNPG, 30 mM e 170 μL de água. A reação foi realizada em banho maria a 65°C, por 5 minutos, e paralisada com 600 μL de Na_2CO_3 0,3 M. A reação foi lida em cubeta a 410 nm.

Para cálculo de atividade foi utilizada curva padrão de p -nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de p -nitrofenol, por minuto, nas condições de ensaio.

3.9.3 Dosagens enzimáticas do extrato de *Aspergillus brasiliensis*

Para cálculo das dosagens distintas das descritas foram utilizados como substratos naturais xilana de beechwood 1 %, amido de batata 1 %, avicel 1 %, papel filtro (0,5x 3 cm), ácido poligalacturônico 0,5 %, xiloglucano 0,5 % e arabinana linear 1 %. Todos os ensaios ocorreram nas condições de hidrólise, tampão acetato 50mM pH 5, temperatura de 50°C e foram incubadas por 10 minutos em banho-maria, exceto para a dosagem de FPAse e Avicelase, em que as reações foram prolongadas para 30 minutos. O volume final das reações eram de 100 µL e foram dosadas conforme a metodologia de Miller, conforme descrito no item 3.9.1 para as endoglucanases.

Para dosagens com substratos sintéticos foram utilizados 4-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo 2 mM e o 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo 2 mM. As reações tinham como volume final 100 µL, foram incubadas em tampão acetato 50mM pH 5, temperatura de 50°C e foram incubadas por 5 minutos. A leitura se procedeu conforme descrito para β -glucosidase no item 3.9.2 para microreações.

3.10 Dosagem de Proteína

A medida de proteínas totais foi feita de acordo com Bradford (1976). Um volume de 100 µL de amostra enzimática foi incubada em temperatura ambiente com 1 mL do reagente de Bradford por 5 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. A curva padrão foi realizada com soro albumina bovina nas concentrações de 0 a 0,1 mg/mL.

3.11 Eletroforese

3.11.1 Eletroforese de DNA em agarose

Para confirmar o sucesso das digestões, PCRs e mini-preps foram efetuadas eletroforeses de DNA em gel de agarose 0,7%, 100 V em tampão TAE (tris-acetato-EDTA).

3.11.2 Eletroforese de proteínas em SDS-PAGE

A eletroforese de proteínas ocorreu segundo o método descrito por Laemmli (1970). Os géis de acrilamida foram utilizados na concentração de 10%, com gel de empilhamento na concentração de 5%, e foram polimerizados em placas de vidro (7,2x10,2 cm). As amostras foram preparadas com tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12 M, pH 6,75) na proporção de 1:1 e então fervidas por 5 minutos. A eletroforese ocorreu em tampão tris-glicina com 0,1% de SDS no pH 8,3, durante cerca de 1,5 horas, a 150 V.

3.11.3 Zimograma

Para a análise de atividade enzimática em gel foram realizados zimogramas. O gel foi polimerizado de acordo com o descrito por Laemmli (1970), com a adição extra de 0,5% de CMC. As amostras proteicas foram aplicadas de forma nativa, isto é, em tampão sem β -mercptoetanol e sem a fervura das mesmas. A eletroforese foi realizada em banho de gelo e então o gel cortado ao meio, metade corada com Comassie-Blue coloidal para a visualização das bandas. A outra metade foi lavada em tampão acetato 50 mM, pH 4, por 4 vezes de 10 minutos e então incubada a 50°C por uma hora para que houvesse a hidrólise do CMC. Para revelação da atividade, o gel foi mergulhado em solução de vermelho congo 0,1% e descorado em NaCl 0,5 M, até o aparecimento das bandas. Para melhor visualização das bandas foram adicionadas algumas gotas de ácido acético na água destilada em que o gel estava mergulhado.

3.12 Sequenciamento de N- terminal

Para sequenciamento do N-terminal as proteínas foram separadas por eletroforese e em seguida transferidas para membrana de PVDV (fluoreto de polivinilideno). As bandas foram recortadas e enviadas para o sequenciamento por degradação de Edman por 5 ciclos (EDMAN, 1950).

3.13 Caracterização Enzimática

3.13.1 Determinação de pH e temperatura ótima

Para a determinação de pH ótimo, a atividade enzimática ocorreu na presença de tampão McIlvaine e Tris-HCl 50 mM na faixa de 2,5 a 7 para MI+MII e MII, 2,5 a 7,5 para TR e 2,5 a 9 para BG (MCILVAINE, 1921). Para o ensaio de temperatura ótima as enzimas expressas foram incubadas nas temperaturas de 35 a 55 MI+MII e MII, 40 a 70 para TR, 55 a 80 para BG. Foi considerado 100% de atividade relativa o ponto com maior atividade para ambos os ensaios.

3.13.2 Estabilidade de pH e temperatura

Para verificação da estabilidade ao pH, as amostras foram incubadas em tampão McIlvaine na faixa de 2,5 a 8. Aliquotas foram retiradas após 15 minutos e 24 horas de incubação, em temperatura ambiente (25°C).

Para análise de resistência a desnaturação térmica as enzimas foram incubadas nas temperaturas de 40 e 50°C para MI+MII, 40 a 60°C para MII e BG, e 40°C para TR, por até 48 horas. Para a determinação da atividade residual de cada ponto foi realizada a dosagem enzimática antes do início do experimento, e esta foi considerada como 100%.

3.13.3 Efeito de Íons

Para determinar o efeito de íons e compostos na atividade dos catalisadores a reação enzimática ocorreu na concentração final de 2 e 5 mM de: $MgCl_2$, $MnCl_2$, KCl , Cl_2Fe , $(NH_4)_2SO_4$, EDTA, $AgNO_3$, $ZnSO_4$, $HgCl_2$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $AlCl_3$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $NaCl$. Foi considerado como 100% de atividade a reação enzimática livre da adição destes compostos.

3.13.4 Efeito de glucose e xilose na atividade da β -glucosidase

Para calcular o efeito da adição de glucose e xilose na atividade da β -glucosidase a reação enzimática ocorreu em quantidades crescentes de cada um dos compostos, de 0 a 1,5 M como concentração final na reação. Foi considerado 100 % de atividade do ponto livre de adição dos açúcares.

3.13.5 Cálculo das constantes cinéticas

Para cálculo das constantes cinéticas as enzimas TR e BG foram incubadas em concentrações crescentes de substrato, de até 3% de CMC e 3,6 mM de pNPG, respectivamente. Para BG o mesmo procedimento foi realizado com 0,1 M de glucose e 0,2 M de xilose, que são concentrações estimulatórias da atividade enzimática. Os dados de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados segundo Michaelis-Menten no software GraphPad Prism 5. Para BG também foi calculado, no mesmo software, as constantes cinéticas segundo Lineweaver-Burk.

3.14 Aplicação de BG e TR na hidrólise de biomassa lignocelulósica

3.14.1 Pré-tratamento: autohidrólise

Os substratos lignocelulósicos, bagaço de cana-de-açúcar variedade SP80 (*Saccharum officinarum* L.) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*) foram secos em estufa a 50°C até peso constante e em seguida moídos em moinho de facas. Depois deste processo os substratos foram ressuspensos em água destilada 5% (p/v) e colocados dentro de um reator de metal. Os reatores então foram mergulhados em banho de glicerina a 195°C por 10 minutos, seguido por resfriamento em banho de gelo. Os substratos então foram filtrados e a fração sólida lavada em água destilada e seca novamente até peso constante, que finalmente, foi utilizada nos experimentos e hidrólise.

3.14.2 Hidrólises

Para visualizar a ação das enzimas expressas no presente trabalho na degradação de biomassa lignocelulósica foram montadas reações de hidrólise, com substratos pré-tratados ou não. Para minimizar as variáveis foram escolhidas para aplicação a endoglucanase de TR e a BG. Tais enzimas foram aplicadas de forma a suplementar o extrato enzimático produzido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis*, quando crescido em casca de soja (1%) em meio Vogel, durante 5 dias de cultivo estático, a 30°C (VOGEL, 1956) (**Apêndice III**).

As reações de hidrólise ocorreram a 50°C, por 24 e 48 horas, tampão acetato de sódio 50 mM pH 5, em agitação de 50 rpm, com 5% de substrato lignocelulósico (p/v). Também foi adicionada azida de sódio 5 mM para prevenir o crescimento de microrganismos. As reações, cujo volume final foi de 1 mL, ocorreram em tubos tipo eppendorf de 2 mL. Os substratos lignocelulósicos, bagaço de cana-de-açúcar variedade SP80 (*Saccharum officinarum* L.) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*) foram utilizados, tanto *in natura*, quanto após auto-hidrólise. A quantidade do extrato de *A. brasiliensis* foi de 650 ou 900 µL, e as enzimas TR e BG variaram de 0-150 µL cada.

3.15 Manutenção das cepas

As cepas resultantes do presente trabalho estão preservadas a -80°C em glicerol 20% no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

3.16 Reprodutibilidade e estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados mostrados são o resultado da média dos pontos com desvio padrão

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem e expressão de domínio catalítico da endoglucanase II, Cel5A de *Trichoderma reesei*

O gene correspondente à endoglucanase II (Cel5A) de *Trichoderma reesei* (TR), conforme descrito por Lee et al. (2011), GenBank: JN172972.1 (**Anexo I**), foi sintetizado pela empresa GenScript inserida no vetor pUC57. O vetor recebido foi então transformado em células de *E. coli* DH10B quimiocompetentes. A seguir uma das cepas transformadas foi cultivada em LB contendo ampicilina 100 µg/mL para a multiplicação do vetor e então extração do mesmo por kit de miniprep (Roche). O vetor extraído foi digerido pelas enzimas NdeI e XhoI e então inserido no vetor pET-29a(+).

Em um primeiro momento o vetor foi inserido em *E. coli* BL21 (DE3), o que resultou na produção da proteína recombinante em corpos de inclusão, inativa. Para solucionar este problema o vetor foi transferido para a uma cepa derivada da BL21, a Origami2 (DE3) (Novagen), que possui mutações na glutatona redutase (*gor*) e tioredoxina redutase (*trxB*), que facilitam a correta formação de pontes dissulfeto.

O cultivo da cepa resultante em meio LB se mostrou pouco eficiente, com crescimento muito lento. O mesmo foi repetido em meio TB (terrific broth), que é tamponado e contém glicerol como fonte de carbono, e propiciou resultados satisfatórios. Para a produção o cultivo foi mantido a 37°C, 180 rpm, até a OD₆₀₀ de 0,6-0,8 e então induzido com 0,4 mM de IPTG. A temperatura de incubação então foi alterada para 21°C e o cultivo se estendeu *overnight*. A estratégia de redução da temperatura durante a fase de indução tem como objetivo reduzir a velocidade de crescimento e produção da proteína recombinante, propiciando um menor estresse ao microrganismo e consequentemente o correto dobramento da enzima de interesse, aumentando assim a quantidade de proteína solúvel recuperada.

Após o período de indução o cultivo foi centrifugado, as células ressuspensas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e então rompidas por sonicação. O lisado resultante foi novamente centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos para separar as proteínas solúveis das insolúveis (**Figura 8A-SB e PL**). A fração do sobrenadante, em

que a porção ativa da endoglucanase (TR) se encontrava, foi utilizada para os experimentos de purificação e ensaios enzimáticos descritos a seguir.

4.1.2 Purificação de TR

A purificação da enzima ocorreu em duas etapas, ambas realizadas no sistema Akta™Start. Na primeira etapa à purificação ocorreu por meio de afinidade, com uma coluna carregada com níquel (His-Trap fast flow GE). Após a lavagem e eluição da amostra na coluna pode-se notar que na mesma fração em que foi recuperada a atividade aparecia uma outra banda co-purificada (**Figura 8B e D-AF**). Este padrão de bandas levou a desconfiança de que a tradução da proteína poderia estar se iniciando em dois pontos distintos, já que ao se realizar um zimograma as duas bandas apresentavam atividade (**Figura 8B**). Para clarificar esta dúvida foi realizado o sequenciamento do N-terminal das duas bandas (**Figura 8C e Anexo VI**), o que comprovou o falso positivo do zimograma, sendo a banda de maior peso identificada como uma proteína endógena de *E. coli*, a alquil-hidroperóxido redutase subunidade F, que pode estar relacionada com o estresse gerado nas células durante a fase de indução.

Em uma segunda etapa de purificação o extrato resultante da etapa anterior foi submetido a uma cromatografia de troca iônica com a resina High Q da Biorad (**Figura 8D**). Na fração não ligada (NL) a enzima recombinante de TR foi recuperada já purificada, sendo que a proteína contaminante foi eluída (EL) em gradiente de sal.

Figura 8. Purificação da endoglucanase Cel5A de *T. reesei*. (A) em M: marcador de peso molecular; SB: sobrenadante do lisado do cultivo celular; PL: pellet do lisado celular. (B) Zimograma do eluato da cromatografia de afinidade por níquel com CMC 0.5% e vermelho congo para atividade de endoglucanase. (C) Membrana de PVDF com as bandas enviadas para a sequenciamento do N-terminal. (D) em AF: Eluato da cromatografia de afinidade por níquel; NL: Fração não ligada da cromatografia de troca iônica High Q (Biorad) contendo a proteína TR purificada; EL: Fração eluída no gradiente de sal.

4.1.3 – Caracterização Enzimática de TR

No ensaio de determinação da temperatura ótima para a atividade da enzima purificada quando na presença de CMC a 2 %, foi possível observar, conforme **Figura 9**, que a temperatura de 65 °C foi a que propiciou o melhor rendimento.

Figura 9. Determinação da temperatura ótima da enzima TR

Para a determinação do pH ótimo a enzima foi incubada a 65°C, CMC 2% em tampão McIlvane de diferentes pH. A enzima mostrou preferência por tampão ácido, sendo o pH 3 o ponto de melhor atividade catalítica (**Figura 10**).

Figura 10. Determinação do pH ótimo nas condições de ensaio

Foi também determinada a influência de íons e EDTA na atividade enzimática (**Tabela 3**). Vê-se que o manganês foi o íon que mais ativou TR com um incremento de cerca de 88% nas duas concentrações testadas. Cobre, cobalto, cloreto de sódio e bário também propiciaram incrementos significativos na atividade catalítica. O EDTA não apresentou influência significativa, já a prata foi o elemento químico que mais prejudicou a atividade de TR.

Tabela 3. Efeito de compostos na atividade enzimática.

Composto	2 mM		5 mM	
	Atividade relativa (%)	desvio	Atividade relativa (%)	desvio
MgCl₂	115,18	5,5	93,80	11,9
MnCl₂	188,18	3,1	184,85	2,6
KCl	117,64	3,1	119,03	4,8
Cl₂Fe	123,52	1,2	132,43	24,4
(NH₄)₂SO₄	129,40	9,6	115,48	3,4
EDTA	102,93	3,8	104,84	17,4
AgNO₃	34,03	30,7	42,56	26,1
ZnSO₄	112,18	4,5	113,90	19,0
HgCl₂	92,43	9,3	64,64	29,1
BaCl₂	139,91	14,59	117,06	17,2
CaCl₂	117,64	8,42	122,97	15,8
AlCl₃	126,04	17,7	121,79	7,2
CoCl₂	138,65	12,0	137,16	4,2
CuCl₂	156,29	23,4	148,98	16,4
NaCl	141,17	20,0	169,09	33,1

* Foi considerado como 100% o controle sem adição de nenhum composto

Para os ensaios de cinética enzimática a enzima foi incubada por 5 minutos a 65°C em tampão acetato de sódio 50 mM pH 3 em diversas concentrações de CMC de média viscosidade. Os dados da curva foram analisados pelo software Origin 2018 e pelo SigrafW, cujos resultados foram semelhantes (**Figura 11**). A equação de Hill foi o modelo cinético que melhor descreveu os dados, com um V_{máx} de 265,57 U/mg, um km de 8,81

mg/mL e um coeficiente $n = 2,3$, sendo, desta forma, considerada uma enzima não-michaeliana.

Figura 11. Perfil cinético de TR pela equação de Hill

A estabilidade de TR frente a diversos pH foi analisada em tampão McIlvaine (**Figura 12**). Foram retiradas amostras 5 minutos e 18 horas após a exposição ao tampão. O ponto de 5 minutos mostra uma possível ativação da enzima pelos sais presentes no tampão já que a média medida para todos os pH esteve acima dos 100%.

No ponto de 18 horas em exposição aos tampões vê-se que a enzima manteve a estabilidade em uma ampla faixa de pH (2,5-7), variando entre 79-93% de atividade residual. Nos pH de 7,5 e 8 a atividade apresenta uma queda considerável (74 e 57% da atividade inicial).

Figura 12. Estabilidade de TR frente a diversos pH

Foi testada a inativação térmica da enzima quanto a desnaturação térmica na temperatura de 40°C na ausência de substrato. Quando o mesmo teste foi realizado em temperaturas mais altas a desnaturação ocorreu muito rapidamente, não sendo possível coletar dados. Como mostrado na **Figura 13** TR foi pouco resistente, sendo que sua meia vida foi cerca de 5,5 horas.

Figura 13. Resistência de TR à desnaturação térmica a 40°C

4.2. Clonagem e expressão de uma endoglucanase de *Eubacterium cellulosolvens*

A sequência utilizada para a clonagem e expressão da endoglucanase de *E. cellulosolvens* foi baseado no trabalho de Yoda et al. (2005). A estrutura da enzima como no citado trabalho é composta por um CBM, um sítio catalítico, uma região linker, logo um segundo CBM e um segundo sítio catalítico. Como estratégia para a obtenção da enzima foi encomendada a síntese da enzima dividida em dois módulos para a posterior união por sítio de restrição (BamHI) assim como o esquematizado na **Figura 14 A**. O primeiro CBM e sítio catalítico foram chamados de MI (módulo I), o segundo CBM e sítio catalítico de MII (módulo II) e a união dos módulos de MI+MII. O desenho dos genes para a síntese foi baseado no alinhamento de sequências apresentado no citado trabalho de Yoda et al. (2005) e estão apresentados nos **Anexos II, III e IV**.

Os genes foram sintetizados pela empresa GenScript clonados no vetor pUC57. Assim como descrito para TR os genes foram transferidos para o vetor de expressão pET-29a(+) e transformados em *E. coli* BL21 (DE3). As colônias resultantes foram então cultivadas em LB a 37°C e induzidas com 0,4 mM de IPTG quando a OD₆₀₀ estava entre 0,6-0,8. O cultivo então se estendeu por mais 4 horas, seguido de centrifugação, ressuspensão das células em tampão fosfato 20 mM pH 7,4, lise por sonicação e novamente centrifugação para separar as proteínas solúveis das não solúveis.

Nos géis de proteína pode-se constatar alto nível de secreção das enzimas MI e MII (**Figura 15**), porém, apenas MII apresentou atividade enzimática. Após análise detalhada da sequência foi observado que o alinhamento em que foi baseado a construção dos genes sintéticos não correspondia ao gene completo, desta forma o final do sítio catalítico de MI foi cortado e clonado em MII, assim como o representado na **Figura 14B I e II**. Diversas tentativas foram feitas para a reconstituição da atividade do MI, sendo a inserção dos nucleotídeos faltantes por PCRs sucessivas utilizando primers longos ou por Gibson Assembly porém nenhuma tentativa de clonagem foi bem sucedida. Foi procedida a união do MI + o MII conforme o inicialmente planejado (**Figura 14 B-III**), o que resultou em uma enzima ativa (**Figura 16**). Como foi inserido um sítio de restrição de BamHI no meio do sítio ativo de MI foi necessário comprovar que a atividade provinda de MI+MII era resultante dos dois módulos e não apenas de MII. Para isso foi realizada uma deleção como esquematizada na **Figura 14B IV e V**. O vetor pET-29 (+), contendo

MI+MII foi digerido com as enzimas StyI e XhoI para a remoção da maioria da sequência correspondente ao sítio ativo de MII (**Figura 16A**). O vetor então foi tratado com Mung Bean Nuclease (New England Biolabs) para possibilitar a religação (o que ocasionou a deleção de algumas bases a mais conforme comprovado pelo sequenciamento em **Anexo VII**). Como nessa estratégia houve a remoção do stop códon TAA inserido antes do sítio XhoI, a proteína foi transcrita até o stop códon contido no vetor pET-29(+), o que resultou em um mutante com duas caudas de histidina.

O cultivo, indução e extração da enzima ocorreu como os demais transformantes, e foi obtido no final uma enzima ativa (**Figura 16B e C**), comprovando que o sítio de BamHI adicionado a MI não inativou este módulo, e desta forma a atividade proveniente de MI+MII é resultante dos dois módulos.

Figura 14. Etapas da construção de endoglucanase de *Eubacterium cellulosovens*

Figura 15. Sobrenadante do lisado celular. Em Ø: controle de *E.coli* BL21 com vetor pET-29(+) vazio; MI: cultivo expressando MI; MII cultivo expressando MII.

Figura 16. Deleção parcial de MII de MI+MII, sobrenadante do lisado celular parcialmente purificado de MI-MII e MI+MII e prova de atividade. Em A: Géis de agarose 0.7% representando a deleção de parte de MII da construção MI+MII. Em M: marcador de pares de bases; em D digestão de Pet29-MI+MII com PstI e XhoI liberando fragmento correspondente ao sítio catalítico de MII; em pET29 -MI-MII temos o plasmídeo delecionado religado e digerido com NdeI para confirmar o tamanho do gene. Em B: M - marcador de peso molecular; em MI-MII - construção com deleção da maior parte do sítio ativo de MII; MI+MII - enzima contendo os dois módulos, MI e MII. Em C: Atividade em placa contendo CMC 0,2% corado com vermelho congo após incubação a 37°C por 12 horas. Foi adicionado 0,25 µg em um volume de 10 µL de cada lisado celular.

4.2.1 Caracterização bioquímica de MI+MII e MII

Os dados aqui apresentados são correspondentes à fração solúvel do lisado celular sem purificação. As construções MI+MII e MII quando purificadas perdiam a estabilidade rapidamente tornando impossível sua caracterização.

Para o ensaio de verificação do efeito da temperatura as enzimas foram incubadas de 35 a 55°C em tampão acetato de sódio pH 5 com CMC 2% (**Figura 17**). A enzima MII apresentou um pico claro de maior atividade a 50°C. Já a MI+MII apresentou um pico a 45°C, também pode-se notar que a atividade a 35°C é maior que a 40°C, isso pode ocorrer devido a estrutura da enzima que é composta por dois sítios catalítico, sendo que dessa forma cada sítio apresenta uma temperatura ótima distinta.

Figura 17. Ensaio de determinação da temperatura ótima das enzimas MII e MI+MII

Para o ensaio de pH ótimo as enzimas foram incubadas no tampão McIlvaine de 2,5 a 7 com CMC 1% nas temperaturas selecionadas no experimento anterior. Ambas as construções tiveram um perfil parecido (**Figura 18**), sendo o pH ótimo estabelecido em 4,5.

Figura 18. Determinação de pH ótimo para MII e MI+MII

Para teste de efeito de íons e EDTA a reação enzimática ocorreu na presença de diferentes compostos, todos na concentração final de 2 mM (**Tabela 4**). As enzimas se mostraram extremamente sensíveis à adição destes compostos sendo completamente inibidas pela maioria deles. MII apresentou 34% de atividade residual após a exposição a prata, já MI+MII apresentou 22% a prata, 57% ao zinco e 9% ao cloreto de sódio.

Tabela 4. Efeito de 2 mM de diferentes compostos químicos na atividade de MII e MI+MII.

Compostos	MII		MI+MII	
	Atividade relativa (%)	desvio	Atividade relativa (%)	desvio
MgCl₂	-		-	
MnCl₂	-		-	
KCl	-		-	
CL₂Fe	-		-	
(NH₄)₂SO₄	-		-	
EDTA	-		-	
AgNO₃	34,67	1,2	22,61	4,2
ZnSO₄	-		57,28	4,2
HgCl₂	-		-	
BaCl₂	-		-	
CaCl₂	-		-	
AlCl₃	-		-	
CoCl₂	-		-	
CuCl₂	-		-	
NaCl	-		9,04	6,3

* Foi considerado como 100% a atividade da enzima sem a adição de compostos

Os ensaios de estabilidade frente a diferentes pH foram conduzidos em tampão McIlvaine, de 2,5 a 8, com alíquotas retiradas em 15 min e 24 horas de exposição aos pH (**Figura 19**). Mesmo em pouco tempo de exposição MII e MI+MII se mostraram pouco estáveis a pH ácido, MII mostrou-se estável a partir do tampão pH 4, já MI+MII a partir de 4,5. Há uma importante hiperativação das enzimas que ocorre em MII do pH 4 ao 6,5, chegando a 223% da atividade inicial, ou seja, uma ativação de 123%, no pH 5,5 após 24 horas de incubação ao tampão. Em MI+MII essa hiperativação é um pouco menos pronunciada, ocorrendo entre os pH 4,5 a 6,5, chegando a 60% para 24 horas de incubação e 52% para 15 minutos no pH de 5,5.

Figura 19. Estabilidade frente ao pH de MII e MI+MII por 15 minutos e 24 horas

Para a determinação da inativação térmica as enzimas foram incubadas na ausência de substrato em temperaturas de 40 a 60°C e alíquotas foram retiradas por diversos períodos (**Figura 20**). Ambas foram bastante estáveis nas temperaturas de 40 e 50°C. Uma leve hiperativação ocorre com as duas construções, e se mantem até o tempo de 5 horas. No tempo de 6 horas todos apresentaram queda na atividade, sendo que esta é recuperada para MII na alíquota de 24 horas para 110% da atividade inicial para 50°C, e 122% para 40°C. MI+MII mantém a queda na atividade e em 24 horas sua atividade é de 83% da inicial para a temperatura de 40°C, e de 70% para 50°C.

Para MII a 60°C, a meia vida é menor que 0,5 hora, sendo completamente desnaturada em duas horas, já MI+MII foi inativada antes da primeira alíquota em 0,5 hora.

Figura 20. Inativação térmica de MII e MI+MII em diferentes temperaturas e períodos

4.3. Clonagem e expressão heteróloga e purificação de uma β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum*

A sequência da β -glucosidase clonada (BG) neste trabalho foi baseada na sequência genômica depositada por Poli et al. (2005) no GenBank com número de acesso JXTH01000020. A sequência delimitada foi enviada para a síntese na empresa GenScript conforme **Anexo V**. O gene sintético foi enviado no vetor pUC57, que foi então digerido para a liberação do fragmento correspondente ao gene codificante da enzima, que então, foi ligado ao vetor de expressão pET29 (+). O então resultante pET29+BG foi transformado em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3).

Assim como previamente descrito uma colônia transformante foi cultivada em LB suplementado com Kanamicina a 37°C até a OD₆₀₀ de 0,6-0,8. Em seguida o cultivo foi induzido com 0,4 mM de IPTG e crescido por mais 4 horas. As células resultantes foram centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. O cultivo então foi lisado por sonicação e centrifugado novamente para a separação das frações solúvel e insolúvel (**Figura 21A**). Como controle o mesmo processo descrito foi realizado simultaneamente em uma colônia de *E. coli* BL21 transformada com o pET29 (+) sem inserção de genes.

A purificação da β -glucosidase ocorreu por afinidade em resina carregada com íons de níquel conforme descrito na metodologia (**Figura 21B**).

Figura 21. Produção e purificação da β -glucosidase. Em A – M: marcador de peso molecular; P Ø: controle da fração insolúvel do lisado celular de *E. coli* BL21 transformada com pET29 (+) vazio; S Ø: controle da fração solúvel do lisado celular de *E. coli* BL21 transformada com pET29 (+) vazio; P BG: Fração insolúvel do lisado celular de *E. coli* BL21 transformada com pET29+BG; S BG: Fração solúvel do lisado celular de *E. coli* BL21 transformada com pET29+BG contendo a enzima ativa. Em B – M: Marcador de peso molecular; BG: Enzima β -glucosidase purificada.

4.3.1 Caracterização bioquímica da β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum*

Para a determinação do pH ótimo BG foi incubada em pNPG nos tampões McIlvaine (2,5-8) e Tris-HCl 50 mM (8-9). A enzima teve alta atividade nos pH entre 6-7,5, com um discreto pico no pH 7 (**Figura 22**).

Figura 22. Determinação do pH ótimo da atividade da BG

Para a determinação da temperatura ótima (**Figura 23**), a enzima foi incubada entre 55 e 80°C. Houve pouca variação entre as temperaturas de 55-65°C, sendo estimada uma condição ótima de 65°C para atividade enzimática.

Figura 23. Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática de BG

Como uma das principais dificuldades enfrentadas na hidrólise de biomassa com alta concentração de sólidos é a inibição enzimática decorrente do acúmulo de produto, foi testado o efeito da adição de concentrações crescentes do produto da BG (glucose) na atividade enzimática frente ao pNPG. Como demonstrado na **Figura 24**, pode-se observar que a BG é extremamente tolerante ao produto, tendo sua atividade aumentada até a concentração de 0,4M na reação, tendo como concentração máxima estimulatória de 0,1M, com ativação de 50%. Na concentração máxima testada, de 1,5M a enzima permaneceu com 37% da atividade inicial, podendo então ser considerada uma enzima extremamente tolerante a altas concentrações do produto.

Figura 24. Efeito da adição de diferentes concentrações finais de glucose na atividade enzimática

Um outro monômero que se acumula durante as hidrólises e pode afetar a atividade da BG é a xilose. Foi testado o efeito da adição de xilose, nas concentrações finais na reação de 0,02 – 1,5 M, na atividade da BG frente ao pNPG (**Figura 25**). Mais uma vez a enzima demonstrou-se extremamente tolerante a altas concentrações de xilose, sendo que a mesma é estimulada até a concentração de 1M, e na concentração máxima testada (1,5 M) a enzima permaneceu com 74% de atividade residual. Entre as concentrações de 0,2-0,4 M de xilose a BG obteve a máxima estimulação, com aumento de 65% em relação a atividade inicial.

Figura 25. Efeito da adição de diferentes concentrações de xilose na atividade enzimática

Para melhor avaliar o efeito dos monômeros glucose e xilose sobre BG foi estudada a cinética da enzima na condição controle (sem adição de nenhum açúcar), e nas concentrações estimulatórias com glucose 0,1 M e xilose 0,2 M (**Figura 26**). Foram analisados os modelos de Michaelis-Menten, Hill, Hanes-Woolf e Lineweaver-Burk no software Origin 2018, os dados obtidos se encontram na **Tabela 5**.

Há um claro deslocamento de $V_{\text{máx}}$ e k_m nas condições testadas segundo todos os modelos analisados. De forma geral a um aumento do $V_{\text{máx}}$ quando são adicionados os açúcares e por consequência um aumento no k_m . Os valores de Michaelis-Menten e Hill foram os mesmos, já que o coeficiente $n=1$. Para o controle temos $V_{\text{máx}}$ 7019 U/mg e k_m 0,35 mM, para glucose 0,1 M temos $V_{\text{máx}}$ 11225 U/mg e k_m 0,591 mM e para xilose $V_{\text{máx}}$ 10752 U/mg e k_m 0,908 mM. Houve pouquíssima alteração desses dados para gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk e uma variação mais acentuada para o modelo de Hanes-Woolf, este último que gerou maiores valores de k_m e $V_{\text{máx}}$ para todas as condições e é o único modelo que prevê um maior $V_{\text{máx}}$ para a condição com xilose do que glucose, 14886 e 14026 respectivamente.

Figura 26. Cinética de (A) Hanes-Woolf e (B) Lineweaver-Burk BG sem adição de açúcares (controle), com a adição de 0,2 M de xilose, e 0,1 M de glucose

Tabela 5. Valores de $V_{m\acute{a}x}$ e k_m obtidos através de diferentes modelos

		$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	k_m (pNPG mM)
Michaelis-Menten	Controle	7019	0,355
	Glucose 0,1 M	11256	0,591
	Xilose 0,2 M	10752	0,905
Hill (n=1)	Controle	7019	0,355
	Glucose 0,1 M	11225	0,591
	Xilose 0,2 M	10752	0,908
Hanes-Woolf	Controle	7614	0,3689
	Glucose 0,1 M	14026	0,877
	Xilose 0,2 M	14886	1,41
Lineweaver-Burk	Controle	7555	0,348
	Glucose 0,1 M	11643	0,666
	Xilose 0,2 M	10788	0,9013

Foi realizado o teste de influência de diversos compostos na atividade enzimática (**Tabela 6**). A maior ativação da BG foi mediante ao agente quelante EDTA, com um aumento de 23% na atividade, seguida pelo ferro, com 19% de ativação. Quando exposta ao mercúrio a enzima se inativou completamente. BG também foi bastante sensível a prata e ao cloreto de sódio, com atividades residuais de 7 e 16% respectivamente.

Tabela 6. Efeito de 2 mM de diversos compostos na atividade enzimática

Ions	BG	
	Atividade relativa (%)	desvio
MgCl₂	103,51	5,9
MnCl₂	92,13	8,3
KCl	93,54	9,0
Cl₂Fe	119,94	6,8
(NH₄)₂SO₄	108,56	7,7
EDTA	123,31	4,4
AgNO₃	7,16	1,6
ZnSO₄	89,60	3,8
HgCl₂	-	-
BaCl₂	119,24	10,2
CaCl₂	108,14	3,1
AlCl₃	86,79	3,0
CoCl₂	100	6,5
CuCl₂	75,84	5,3
NaCl	16,85	1,6

* Controle, sem adição de íons, corresponde a 100%

Para o ensaio de estabilidade ao pH a BG purificada foi incubada em tampões McIlvaine (diluído 4x) em temperatura ambiente. Foram retirados dois pontos, 15 minutos e 25 horas após exposição aos tampões. Pode-se observar na **Figura 27** que a enzima é mais estável em pH próximo ao neutro. Também ocorreu uma hiperativação da enzima devido aos sais do tampão. Essa ativação foi vista na exposição por 15 minutos, de 126% à 138% do pH 4 ao pH 6,5. Na exposição prolongada de 24 horas houve hiperativação a partir do pH 6, com atividade máxima de 126% da atividade inicial no pH 6,5.

Figura 27. Estabilidade de pH em diferentes tampões McIlvaine por 15 minutos e 24 horas

Para determinar a inativação térmica, a BG purificada foi incubada nas temperaturas de 40, 50 e 60°C de 0,5 hora a 48 horas (**Figura 28**). A enzima se demonstrou extremamente termoestável. Nas temperaturas de 40 e 50°C até 24 horas a enzima se manteve sempre com cerca de 100% da atividade inicial, apresentando uma queda de 10% em 48 horas. Na temperatura de 60°C a atividade residual caiu a partir de 3 horas, mantendo 80% da atividade inicial no tempo 6 horas, 41% em 24 horas e 22% em 48 horas.

Figura 28. Inativação térmica de BG em diferentes tempos e temperaturas

4.4 Aplicação das enzimas BG e TR em hidrólise de biomassa

Para teste de eficiência em degradação de biomassa, as enzimas expressas foram adicionadas ao extrato bruto produzido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* em meio Vogel com casca de soja 1% como fonte de carbono. Algumas das principais enzimas do complexo hemicelulósico secretadas por *A. brasiliensis* (AB) nas condições descritas foram dosadas e estão representadas na **Figura 29**. O extrato se demonstrou rico em xilanases, pectinases e também possui uma boa quantidade de celulases.

Figura 29 Quantificação de enzimas do complexo hemicelulolítico secretadas por *A. brasiliensis*

Na **figura 30** a hidrólise, de volume final 1 mL, foi composta por 650 µL do extrato bruto de *A. brasiliensis* (AB), e 150 µL das enzimas TR e/ou BG. A hidrólise foi feita com 5% de substrato (p/v), em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5. A hidrólise foi mantida a 50°C, em agitação de 50 rpm durante 24 horas. O extrato AB continha 0,047 mg/mL de proteína, BG 0,6 mg/mL e TR 1,05 mg/mL. Nas condições da hidrólise, pH 5 e 50°C, TR tinha 6,16 U/mL e BG 41,25 U/mL.

Foi testada a hidrólise do capim-elefante e do bagaço de cana-de-açúcar SP80 *in natura* (sem pré-tratamento) e pré-tratados por autohidrólise (190°C por 10 minutos, 5%

de sólidos), sendo que apenas a fase sólida resultante da autohidrólise foi utilizada no experimento.

A adição das enzimas TR e BG em todas as condições testadas resultou em incremento da hidrólise quando comparada com a hidrólise composta apenas por AB. A concentração de açúcares redutores obtidos nos extratos pré-tratados foi menor do que os substratos *in natura*, possivelmente devido a remoção da hemicelulose, já que o extrato AB é rico em xilanases (**Figura 29**).

O capim-elefante *in natura* se mostrou mais susceptível a ação das enzimas, com a liberação de aproximadamente 27 μmol de açúcares redutores nos tratamentos adicionados de TR e/ou BG, e 20 no tratamento apenas com AB. O capim pré-tratado obteve a máxima liberação de açúcares redutores, 24 μmol , no tratamento com os três extratos. A hidrólise máxima do bagaço de cana de açúcar *in natura* foi obtida também no tratamento com as três enzimas, mas o resultado do tratamento com apenas AB+TR foi bastante semelhante, cerca de 13 μmol de açúcares para ambos os casos.

Figura 30. Efeito da adição de BG, TR e BG+TR na hidrólise de capim elefante e cana-de-açúcar SP80 com e sem pré-tratamento por autohidrólise

Para investigar melhor a hidrólise do capim-elefante in natura, foram testadas diferentes proporções de BG e TR, suplementando o extrato de AB, durante 24 e 48 horas de hidrólise. Neste experimento, que também ocorreu com 5% de sólido, pH 5 e 50°C, a quantidade de AB foi aumentada para 900 μL e as quantidades de BG-TR variaram conforme demonstrado na **Figura 31**.

A adição de 50 μL tanto de BG como de TR foi a condição que propiciou maior hidrólise do capim-elefante. Em 24 horas foram produzidos 27 μmol de açúcares e em 48 horas 30 μmol . Comparando com o tratamento sem a adição de BG e TR, há um incremento de 16% e 23% na produção de açúcares redutores em 24 e 48 horas respectivamente.

Figura 31. Aplicação de diferentes proporções de BG e TR na hidrólise de capim-elefante in natura

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho visa contribuir o entendimento do comportamento de modelos de expressão de genes sintéticos de celulasas em sistema de vetor do tipo pET. As celulasas, de origem genica eucariótica e procariótica, foram expressas, purificadas quando possível, e caracterizadas de acordo com seu comportamento bioquímico. Além destes, foi também analisada a aplicação das celulasas deste trabalho na degradação de biomassa lignocelulósica, moldando um possível bioprocesso para a obtenção de açúcares.

5.1 Expressão da endoglucanase EG-II de *Trichoderma reesei*

O gene correspondente a endoglucanase EG-II de *Trichoderma reesei* foi clonado com sucesso no vetor pET29a(+), tal gene foi composto de apenas o sítio catalítico, isto é, a região de CBM não estava presente. Só foi possível expressar a forma ativa da enzima quando esta produzida pela cepa de BL21 Origami 2 (DE3). Tal microrganismo possui mutações na glutathione redutase (gor) e tioredoxina redutase (trxB), que facilitam a correta formação de pontes dissulfeto (NOVAGEN). Segundo Lee et al. (2011), artigo no qual o gene com otimização de códons utilizado no presente trabalho foi originado, o sítio catalítico de TR possui oito cisteínas, sendo que todas elas estão envolvidas na formação de pontes dissulfeto. Nakazawa et al. (2008) também clonaram EG-II de *Trichoderma reesei* e a expressaram nas cepas BL21, Rosseta blue, Rosseta, Rosseta 2, Origami B, Origami 2, Rosseta-gami B, Rosseta-gami 2. Em teste em placa contendo CMC os genes clonados em células do tipo Origami e Rosseta-gami foram os que mais apresentaram atividade enzimática. *E. coli* Rosseta são utilizadas para expressar proteínas de origem eucariótica que possuem códons raramente expressos em procariotos, já células do tipo Rosseta-gami apresentam a facilidade de transcrição de códons raros bem como a característica de facilitar a formação de pontes dissulfeto da cepa Origami (Novagen). Já que no presente trabalho o gene sofreu otimização de códons não foi necessário a utilização desta cepa específica.

Durante a purificação de TR foi co-purificada uma proteína identificada pelo sequenciamento de N-terminal como a alquil-hidroperóxido redutase subunidade F. Sua

co-purificação pode ser explicada por uma interação hidrofóbica com TR. Na primeira tentativa de purificação o processo ocorria, desde a fase de ligação da proteína com a coluna de níquel, com 0,5 M de NaCl, o que, ao mesmo tempo que impede ligações não específicas com a coluna, favorece a exposição dos bolsões hidrofóbicos das proteínas, o que pode levar a interação entre elas. Para confirmar tal suspeita o processo de purificação foi repetido com a adição de sal somente após exaustiva lavagem da coluna. Neste segundo processo não houve interação entre as proteínas, sendo recuperada apenas a TR.

Tal artefato da purificação mostrou que a alquil-hidroperóxido redutase estava claramente hiper-produzida. Essa proteína está envolvida na proteção da célula contra espécies reativas de oxigênio (ROS), em *E. coli* a redução dos peróxidos ocorre via a subunidade C da alquil-hidroperóxido redutase (AhpC), cujo estado reduzido é restaurado pela subunidade F (AhpF) (Kamariah et al, 2005). Sistemas de expressão heteróloga baseados em promotores induzidos por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) levam a hiperexpressão de proteínas não essenciais a célula, o que acarreta em um “fardo biológico”. Este fardo se origina na combinação de estresses que incluem a competição pela maquinaria de expressão, reações secundárias devido a atividade da proteína recombinante ou toxicidade de seus substratos, produtos e intermediários (DVORAK et al., 2015).

A temperatura de maior atividade de TR foi a de 65°C, porém com pouca variação entre 50-65°C, indicando que ela pode ser usada em bioprocessos de com temperaturas mais amenas. O pH ótimo da enzima purificada foi o de 3, um pH bastante ácido, e apresenta boa atividade entre o pH 3-4,5.

O valor de pH ótimo difere do valor de 5,5 encontrado por Nakazawa et al. (2008), que expressou a mesma enzima, tal valor pode ter correlação com a temperatura mais baixa do ensaio, de 50°C, sais do tampão acetato de sódio, e tempo de reação que não foi especificado (no presente trabalho foi de 10 minutos). No mesmo artigo a enzima foi menos estável aos diferentes pH do que a do presente trabalho, sendo completamente estável somente no pH 6 após 30 minutos de exposição com aquecimento a 50°C. Em nosso trabalho apesar de não sofrer aquecimento (experimento efetuado a 25°C) a enzima teve um tempo de exposição prolongado, de 18 horas. Quanto a estabilidade térmica, o experimento de Nakazawa et al. (2008) teve a duração de apenas uma hora, porém, a 40°C

manteve 100% da atividade inicial neste período, no presente trabalho a enzima reteve 80% da atividade inicial no mesmo período, com uma meia vida de 5,5 horas.

Qin et al. (2008), ao tentar engenheirar a endoglucanase II de *Trichoderma reesei*, encontraram para a tipo selvagem um pH ótimo de 4,8, porém, novamente os ensaios ocorreram a 50°C, em 30 minutos de reação. Os autores não realizaram ensaio para determinar temperatura ótima.

Quanto ao efeito de íons e compostos a enzima se mostrou bastante estável, isto é, a presença de íons em bioprocessos diversos não devem prejudicar o desempenho da enzima. Destaca-se a excelente ativação por MnCl₂ (188% - 2mM), CuCl₂ (156% - 2 mM) e NaCl (169%-5 mM).

Os dados de km obtidos com o software Origin 2018 aponta uma V_{máx} de 265 U/mg e um km de 8,8 mg/mL. A TR não apresentou um perfil Michaeliano, os valores da cinética melhor foram descritos por uma curva sigmoide segundo a equação de Hill, apresentando um coeficiente de 2,3, e desta forma, tem aparente cooperatividade positiva.

A endoglucanase em questão trata-se de uma enzima monomérica, com somente um sítio ativo, e clonada sem seu CBM nativo. Embora descritas, enzimas monoméricas que exibem cooperatividade positiva, são extremamente raras, como é o clássico caso da glucoquinase (CÁRDENAS, 2014; MICHAEL, 2016). Porém, como postulado por Ricard et al. (1974), enzimas com esse perfil cinético “*mnemonical enzymes*” não são inibidas pelo excesso de produto, fato que ocorre com TR. Outro ponto é que não foi possível encontrar na literatura uma endoglucanase Cel5A que fosse descrita como tal.

Segundo Punekar (2018) um perfil cinético não-Michaeliano é possível de ocorrer quando diferentes isoformas de uma mesma enzima são analisadas em conjunto. Uma isoforma pode saturar antes que as outras, resultando em uma curva sigmoide. Como previamente discutido, a TR, uma enzima originalmente fúngica, foi neste trabalho expressa em *E. coli* Origami2. É sabido que em sistemas procariotos enzimas de origem eucariota nem sempre são enoveladas corretamente. Ainda que utilizada uma cepa que facilita a formação de pontes dissulfeto, é possível que o processamento da proteína de interesse não tenha sido completamente homogêneo, resultando em enzimas ativas com pequenas diferenças em modificações pós-traducionais. Como resultado, temos um *pool* de enzimas, e como consequência, um comportamento cinético irregular.

Distantes filogeneticamente o Km Cel5A da bactéria termofílica *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 para CMC foi calculado como 1,39 mg/mL com um V_{máx} de 294 U/mg (LIANG et al., 2011). A mesma enzima foi ativada 116% por MnCl₂ a 5 mM. A Cel5A de *Bacillus licheniformis* B-41361 foi ativada em 120% por 5 mM de MnCl₂ (BISCHOFF et al., 2007).

5.2 Expressão da endoglucanase Cel5A *Eubacterium cellulosolvens*

O gene sintético da endoglucanase Cel5A de *E. cellulosolvens* foi clonado conforme descrito por Yoda et al. (2005). Tal endoglucanase é composta por dois sítios ativos e dois CBMs. Foram com sucesso clonado ativo o segundo sítio catalítico com o segundo CBM (MII) e a endoglucanase completa (MI+MII). O primeiro sítio ativo com seu CBM foi recuperado inativo pelos motivos já apresentados na seção de resultados, desta forma aqui serão discutidos apenas os resultados relativos a MII e MI+MII.

As duas construções foram purificadas por afinidade em coluna contendo níquel, porém as mesmas apresentaram estabilidade muito baixa quando puras, as atividades dosadas durante a manhã não se repetiam horas mais tarde, nas mesmas condições, devido a precipitação das proteínas. No trabalho de Yoda et al. (2005) a endoglucanase Cel5A em diferentes construções é purificada, porém, não são feitos ensaios de caracterização detalhados, apenas um teste de hidrólise em diferentes substratos, o que leva a suspeita de que a precipitação das proteínas também poderia estar ocorrendo. Desta forma foi decidido trabalhar com o lisado celular sem que este tenha passado por nenhuma etapa de purificação. O MII e MI+MII contidas nos lisados foram bastante estáveis e não houve precipitação ou alterações na atividade durante todo o período dos experimentos. Outro aspecto importante é que a caracterização de MI+MII sofre a influência de dois sítios catalíticos distintos, e segundo Yoda et al. (2005), o módulo II parece ter maior atividade catalítica que o módulo I nas condições ensaiadas (37°C, pH 5).

O MII apresentou uma temperatura ótima de atividade de 50°C e pH de 4,5, já MI+MII 45°C e pH 4. Quanto a estabilidade de temperatura ambas foram muito estáveis nas temperaturas de 40 e 50°C sendo que em 24 horas MII ainda não apresentava queda na atividade em ambas as temperaturas e MI+MII reteve 83 e 70% da atividade inicial

para 40 e 50°C respectivamente. Ambas as enzimas foram hiperativadas nos ensaios de estabilidade ao pH, possivelmente pela maior maleabilidade da enzima após exposição prolongada a temperatura de 25°C (normalmente são armazenadas em gelo) e também pelos sais do tampão, sendo estável de 4,5-7 para MII e de 5 a 6,5 para MI+MII. Essa caracterização sugere que a estrutura do MI é menos estável quanto a temperatura e faixa de pH que o módulo II, possuindo uma menor temperatura ótima e pH ótimo mais ácido.

Quanto aos íons ambas as construções se mostraram extremamente sensíveis aos íons, com a atividade completamente inibida na presença grande maioria deles, uma diferença é que o MI+MII se mostrou menos sensível ao ZnSO_4 (57% de atividade residual) e ao NaCl (9%) que MII, que por sua vez, foi inativada.

Na literatura Park et al. (2018) isolaram uma cepa de *E. cellulosolvens* do rúmen de gado Holandês e clonaram a sequência correspondente a Cel5A em *E. coli* BL21 com o vetor pET41b. Neste trabalho o pH e temperatura ótimos foram compatíveis com o encontrado neste trabalho (pH 4, 50°C) e também a enzima foi bastante estável após a incubação em diferentes pHs e temperaturas. Quanto aos íons endoglucanase descrita por Park et al. (2018) foi ativada na presença de 1 mM de Ca^{2+} , K^+ , N^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} e inibida na presença de Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Hg^{2+} , porém, não foi completamente inativada em nenhum dos testes. Dificilmente uma inativação tão drástica como a encontrada no presente trabalho pode ser explicada com interações de inibição competitiva. Possivelmente o sítio de BamHI inserido por equívoco no catalítico de MII possa provocar a alta suscetibilidade a sais, provocando a desnaturação da enzima.

Como são poucas endoglucanases Cel5A caracterizadas na literatura, serão comparados os resultados obtidos neste trabalho com a TR, que apesar da enorme distância filogenética, também se trata de uma Cel5A, e serão discutidas em vias de aplicabilidade em bioprocessos.

5.3 Comparação das endoglucanases expressas

Com relação a facilidade de produção das enzimas, as derivadas de *Eubacterium cellulosolvens*, são mais vantajosas, pois a *E. coli* BL21 possui um crescimento mais rápido que a Origami, e cresce em meio mais barato, o LB, em comparação ao TB. O

cultivo após a indução com IPTG também é mais rápido, são quatro horas de indução para MII e MI+MII e indução overnight para TR. Dentre MII e MI+MII a construção menor é mais estável, ativa, e expressa em maior quantidade. Porém o pH ótimo de 4,5 de MI+MII pode ser vantajoso em aplicações de hidrólise de biomassa, que geralmente ocorrem em pH em torno de 5. A enzima de TR, apesar de ter pH ótimo 3 ainda apresenta atividade satisfatória em pH mais altos.

Quanto a estabilidade das enzimas é bastante problemático comparar uma enzima purificada com enzimas em um extrato. As construções MII e MI+MII não suportaram passar pelo processo de purificação, porém, se mostraram bastante robustas quando caracterizadas no lisado celular. A enzima de TR purificada foi estável a uma ampla faixa de pH e relativamente estável a temperatura de 40°C quando incubada na ausência de substrato.

Um fator preocupante quando as enzimas de *Eubacterium cellulosolvens* é a extrema sensibilidade aos íons, o que pode limitar sua aplicação em alguns bioprocessos. É sabido que durante a degradação da biomassa lignocelulósica alguns compostos podem ser liberados, sobretudo da lignina, podendo causar a inativação precoce das enzimas. Tal sensibilidade foi o que levou à seleção da enzima de TR para o teste de aplicação presente neste trabalho.

5.4 Expressão da β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum*

O gene sintético da β -glucosidase clonada (BG) neste trabalho foi baseada na sequência genômica depositada por Poli et al. (2005). A sequência pertencente ao microrganismo *Anoxybacillus thermarum* foi escolhida pela proximidade filogenética e semelhança bases de *Anoxybacillus* sp. DT3-1, que possui uma β -glucosidade extremamente tolerante a glucose, e também, por ser uma bactéria termofílica.

Na **Figura 32A** podemos ver a proximidade filogenética das β -glucosidasas de *Anoxybacillus* segundo alinhamento de Neighbor-joining realizado por Chan et al., 2016. Ao serem comparadas as sequências de *A. thermarum* e *Anoxybacillus* sp. DT3-1 (**Figura 32B**) vemos que as sequências apresentam 95,6% de similaridade, desta forma seriam esperadas características bioquímicas semelhantes para as enzimas.

Figura 32. Proximidade das sequencias de β -glucosidase de *Anoxybacillus*. A- Filogênia construída por Neighbor-Joining, mostrando os valores de bootstrap, com números de acesso ao uniprot (CHAN et al., 2016). B- Alinhamento entre as sequencias de *Anoxybacillus thermarum* e *Anoxybacillus* sp. DT3-1 pelo software online ExPASy.

A temperatura ótima no trabalho de Chan et al. (2016) foi de 70°C e o pH ótimo de 8,5. No presente trabalho encontramos uma temperatura um pouco mais baixa, 65°C, e pH mais neutro (7). A enzima BG e a de *Anoxybacillus sp.* DT3-1 apresentaram estabilidades de pH e temperatura bastante semelhantes. Quanto as constantes cinéticas a enzima do presente trabalho apresentou um K_m maior (0,35/0,22 mM) e um $V_{m\acute{a}x}$ muito maior do a estudada por Chan et al. (2016) (7552/923 U/mg).

Quanto aos ions a enzima do presente trabalho se demonstrou muito mais sensível ao NaCl. Outra diferença é que na presença de EDTA a BG é ativada em cerca de 20% já a de *Anoxybacillus sp.* DT3-1 tem sua atividade reduzida em 10%.

Quanto a tolerância a glucose quando a atividade realizada com pNPG a enzima de *Anoxybacillus sp.* DT3-1 não é afetada até 5 M de glucose, e mantem 93 e 43% nas concentrações de 10 e 15 M. A enzima do presente trabalho não é afetada até 0,4 M, na concentração de 1 M 61% e 1,5 M 36% de atividade residual. Vale a pena salientar que a solubilidade da glucose em água a 25°C é de 906 g/L, ou seja, cerca de 5 M, o que inviabiliza os experimentos como mostrados por Chan et al. (2016) que chega a fazer ensaios com até 20 M (3,6 kg de glucose/L) de concentração final, isso é, seria necessário fazer uma solução ainda mais concentrada para poder adicionar o tampão, pNPG e enzima ao ensaio e manter a molaridade desejada da glucose. Se for considerado o erro de uma casa decimal no trabalho com *Anoxybacillus sp.* DT3-1, as enzimas apresentariam um perfil semelhante de estimulação e tolerância a glucose, o que viria de acordo com a similaridade das sequencias.

Segundo classificação proposta por Cao et al. (2015) e expandida por Salgado et al. (2018), que leva em conta aspectos funcionais de tolerância e estimulação por glucose, a da β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum* pode ser classificada como do tipo III, que são estimuladas por baixas concentrações de glucose e inibidas por altas concentrações. Geralmente são pertencentes a família GH1, e a concentração de glucose de máxima estimulação varia entre 0,02 a 0,5 M.

A BG do presente trabalho foi estimulada pelos monômeros xilose e glucose sendo inibida pelos mesmos em concentrações bastante altas, acima de 1 e 0,4 M respectivamente. Estudos como o de Meleiros et al. (2017) e Yang et al. (2015) propõe que, além do sítio ativo, a glucose/xilose e substrato podem interagir com outros sítios presentes no túnel do substrato com afinidade variável. A estimulação acontece quando a

geometria destes sítios (que não o catalítico) quando ligados a glicose resultam em uma melhora da atividade catalítica, já a inibição ocorre quando a afinidade da glucose pelo sítio catalítico supera a afinidade por estes sítios não catalíticos.

5.5 Efeito das celulasas expressas na degradação de biomassa

Para teste de hidrólise em biomassa foram selecionadas as enzimas TR e BG. Ambas foram aplicadas sem sofrer processos de purificação. Ensaios preliminares mostraram que as enzimas sozinhas quando utilizadas para a hidrólise apresentam pouca eficiência, com baixíssima liberação de açúcares redutores. Isso se dá pela falta de outras enzimas do complexo de celulasas e hemicelulasas necessárias para facilitar o acesso e fornecer substrato a TR e BG. Para continuidade do experimento as enzimas selecionadas foram aplicadas na biomassa vegetal (Bagaço-de-cana SP80 e Capim-elefante) em conjunto com um extrato de enzimas produzido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* em meio Vogel em casca-de-soja. Este extrato específico foi selecionado por ter sido otimizado em nosso laboratório pela aluna de doutorado Juliana Infante da Conceição.

Como substrato das hidrólises as biomassas foram testadas na forma *in natura* (apenas secas e trituradas) e após pré-tratamento por autohidrólise. A autohidrólise tem como objetivo solubilizar a hemicelulose tornando a celulose mais disponível a ação das enzimas (MOSIER et al., 2005). Porém, como o discutido por Pielhop et al., (2015) após o tratamento é possível ocorrer a repolimerização da lignina (que fica na fração sólida utilizada nos experimentos), que acarreta em uma maior área de superfície da lignina, promovendo a ligação improdutiva de celulasas bem como a inativação das mesmas.

Como demonstrado nos resultados a hidrólise dos substratos pré-tratados foi menor do que a *in natura*. Uma hipótese para isso seria que a remoção da fração da hemicelulase, que é mais facilmente hidrolisada, diminuiria o rendimento em geral da produção de açúcares redutores, porém, foi realizado um teste (não mostrado) em que a hidrólise ocorria na presença do substrato sólido e fase líquida resultantes da autohidrólise e os resultados foram bastantes similares. Outra explicação possível é que esteja ocorrendo a repolimerização da lignina conforme discutido acima, acarretando um acesso ainda mais dificultado para as celulasas.

De forma geral a adição das enzimas TR e BG, em conjunto e separadamente, foi benéfica a hidrólise, aumentando o teor de açúcares redutores liberados. Os ensaios com capim-elefante apresentaram melhores resultados do que o com bagaço-de-cana SP80.

A concentração de celulose em capim-elefante varia de 35-47%, a de hemicelulose 4,3-9,1% e lignina de 4,4-11,6% (RENGSIRIKUL et al., 2013). Já para a cana de açúcar SP80 a concentração de lignina é da 18,6%, hemicelulose 17,1e um teor de fibra 42% (AZEVEDO et al., 2009). A maior concentração de lignina na cana pode ser a responsável pela maior recalcitrância deste substrato, e consequentemente menor hidrólise.

Para verificar a melhor proporção das enzimas TR e BG na hidrólise do capim elefante foi realizado um ensaio em que as concentrações das enzimas variavam de 10 a 100 µL em hidrólises de 1 mL, com atividades na concentração do ensaio, pH 5 e temperatura de 50°C 6,16 U/mL para TR e 41,25 U/mL para BG. Neste teste a hidrólise com o mesmo volume de cada uma das enzimas (50-50 µL) obteve um melhor resultado com a produção de 27 e 30 µg de açúcares redutores em 24 e 48 horas de hidrólise respectivamente, sendo economicamente vantajosa a hidrólise no menor tempo. Desta forma fica provado que as enzimas TR e BG aumentaram o rendimento da hidrólise de biomassa vegetal e que podem ser implementadas em bioprocessos visando a quebra da celulose.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram clonadas e expressas com sucesso uma endoglucanase Cel5A de *Trichoderma reesei*; uma endoglucanase Cel5A de *Eubacterium celulosolvens*, sendo que essa foi expressa de forma integral (completa), e pela metade, (com apenas um CBM e um sítio catalítico); e uma β -glucosidase de *Anoxybacillus thermarum*. A endoglucanase de *T. reesei* TR foi purificada e caracterizada, e obteve destaque quanto ao seu pH ótimo ácido (3,5), sua ativação por $MnCl_2$ (88%), sua alta atividade específica (248 U/mg) e sua ótima estabilidade ao pH. As endoglucanases de *E. celulosolvens* MI+MII (completa) e MII (parcial) se destacaram pela fácil produção, e no lisado celular apresentaram excelente estabilidade à temperatura e ao pH, alta susceptibilidade à inativação por íons. Apesar de serem parecidas elas apresentaram deslocamento quanto ao pH e temperaturas ótimos e estabilidade, sendo que a construção MII pode ser considerada mais resistente à desnaturação. A β -glucosidase de *A. thermarum* é produzida facilmente, possui excelente estabilidade térmica e boa estabilidade de pH, além de uma alta atividade específica (7500 U/mg). Ela destacou-se por sua excelente tolerância à glucose e xilose, sendo ativada em concentrações menores (até 0,4 e 1 M respectivamente) e pouco inibidas em alta concentração.

As enzimas expressas TR e BG foram aplicadas na hidrólise de biomassa suplementando um extrato de enzimas de *Aspergillus brasiliensis*. As celulases expressas aumentaram o rendimento da hidrólise. Os substratos *in natura* foram melhor hidrolisados pelas enzimas do que os pré-tratados por autohidrólise, possivelmente pela repolimerização da lignina. O capim-elefante se mostrou mais acessível às enzimas do que a cana-de-açúcar SP80, possivelmente devido a menor presença de lignina. Desta forma conclui-se que as celulases expressas no presente trabalho possuem características muito interessantes do ponto de vista biotecnológico podendo ser aplicadas em bioprocessos e agregando valores ao produto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. Z.; PEREIRA, M. G.; CARVALHO, C. C. D.; HEINEN, P. R.; ZIOTTI, L. S.; MESSIAS, J. M., JORGE, J.A.; POLIZELI, M. L. T. M. **Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest**. Biota Neotropica, v.17, 2017.

ANDRÍC, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. **Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis : I . Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes**. Biotechnology Advances, v.28, p.308–324, 2010.

ARTZI, L.; BAYER, E.A.; MORAÏS, S. **Cellulosomes : bacterial nanomachines for ismantling plant polysaccharides**. Nature Reviews Microbiology, v. 15, p.83–95, 2017.

AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; QUEIROZ, A. D.; CARNEIRO, P. C. S.; LANA, R. D. P.; BARBOSA, M. H. P.; FERNANDES, A. M.; RENNÓ, F. P. **Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação in vitro da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 32, p. 1443-1453, 2003.

BADIEYAN, S.; BEVAN, D. R.; ZHANG. **Study and design of stability in GH5 cellulases**. Biotechnology and Bioengineering, v. 109, n. 1, p. 31-44, 2012.

BERTANI, G. **Studies on lysogenesis I.: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli***. Journal of Bacteriology, v.62, p.293, 1951.

BERTINI, L.; LAMBRUGHI, M.; FANTUCCI, P.; GIOIA, L.; DE BORSARI, M.; SOLA, M.; BORTOLOTTI, C.A.; BRUSCHI, M. **Catalytic mechanism of fungal Lytic Polysaccharide Monooxygenases investigated by first-principles calculations**. Inorganic Chemistry, v. 57, p. 86-97, 2018.

BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; HUGHES, S. R. **Cloning and characterization of a recombinant family 5 endoglucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361**. Process Biochemistry, v.42, p. 1150-1154, 2007.

BOYCE A.; WALSH, G. **Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production**.

Applied Microbiology Biotechnology, v. 99, p.7515–7525, 2015.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry. v. 72, p. 248-254, 1976.

BURLACU A; CORNEA CP; ISRAEL-ROMING, F. **Microbial xylanase: a review.** Science Bulletin, p.335–342, 2016.

CAMERON, M. D.; AUST, S. D; **Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome.** Enzyme and Microbial Technology, v.28, p. 129-138, 2001.

CAO, L. C.; WANG, Z. J.; REN, G. H.; KONG, W. LI, L.; XIE, W.; LIU, Y. H. **Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration.** Biotechnology for Biofuels, v. 8, p. 202, 2015.

CÁRDENAS, M. L. **Understanding mechanisms of enzyme co-operativity: the importance of not being at equilibrium.** Perspectives in Science, v. 4, p. 10-16, 2015.

CARPITA, N.; MCCANN, M. **The cell wall.** In Biochemistry and Molecular Biology of plants, B.B. Buchanan, G. Wilhelm, and R.L. Jones, eds (Rockville, IL) American Society of Plant Physiologists), p. 52–108, 2000.

CHAN, C. S.; SIN, L. L.; CHAN, K. G.; SHAMSIR, M. S.; MANAN, F. A.; SANI, R. K.; GOH, K. M. **Characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Anoxybacillus sp.* DT3-1.** Biotechnology for Biofuels, v.9, p. 174, 2016.

CLIFFORD, C.B. Why Alternative Fuels from Biomass? 2018 Disponível em <<https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/3>>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** Brasília, , 35p, 2015.

COSGROVE, D. J. **Loosening of plant cell walls by expansins.** Nature, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 2000.

DILOKPIMOL, A.; MÄKELÄ, M.R.; AGUILAR-PONTES, M.V.; BENOIT-GELBER,

I.; HILDÉN, K.S.; DE VRIES, R.P. **Diversity of fungal feruloyl esterases : updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications**. Biotechnology for Biofuels, v. 9, p.231, 2016.

DVORAK, P.; CHRAST, L.; NIKEL, P. I.; FEDR, R.; SOUCEK, K.; SEDLACKOVA, M.; CHALOUPOKOVA, R.; LORENZO, V.; PROKOP, K.; DAMBORSKY, J. **Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying a synthetic metabolic pathway**. Microbial Cell Factories, v.14, p. 201, 2015.

EDMAN, P. **Method for determination of the amino acid sequence in peptides**. Acta Chemica Scandinavica, v.4, p. 283-293, 1950.

GARG, R.; SRIVASTAVA, R.; BRAHMA, V.; VERMA, L.; KARTHIKEYAN, S.;SAHNI, G. **Biochemical and structural characterization of a novel halotolerant cellulase from soil metagenome**. Scientific Reports, v.6, p.39634, 2016.

GIUSEPPE, P.O.; SOUZA, T.D.A.C.B.; SOUZA, F.H.M.; ZANPHORLIN, L.M.; MACHADO, C.B.; WARD, R.J.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.D.P.M.; MURAKAMI, M.T . **Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases**. Acta Crystallografica Section D, v.70, p.1631–1639, 2014.

GOURLAY, K.; HU, J.; ARANTES, V.; ANDBERG, M.; SALOHEIMO, M.; PENTTILÄ, M.; SADDLER, J. **Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass**. Bioresource Technology, v. 142, p. 498-503, 2013.

HAITJEMA, C.H.; GILMORE, S.P.; HENSKE, J.K.; SOLOMON, K.V., DE GROOT, R.; KUO, A.; MONDO, S.J., SALAMOV, A.A., LABUTTI, K., ZHAO, Z.; CHINIQUY, J.; BARRY, K.; BREWER, H.M.; PURVINE, S.O.; WRIGHT, A.T.; HAINAUT, M.; BOXMA, B.; ALLEN, T.; VAN HACKSTEIN, J.H.P.; HENRISSAT, B.; BAKER, S.E.; GRIGORIEV, I.V.; O'MALLEY, M.A. **A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics**. Nature Microbiology, v.2, p.1–8, 2017.

HEINEN, P.R.; BAUERMEISTER, A.; RIBEIRO, L.F.; MESSIAS, J.M.; ALMEIDA, P.Z.; MORAES, L.A.B.; VARGAS-RECHIA, C.G.; OLIVEIRA, A.H.C.; WARD, R.J.; FILHO, E.X.F.; KADOWAKI, M.K.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. **GH11 xylanase from *Aspergillus tamaritii* Kita : Purification by one-step chromatography**

and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. International Journal of Biological Macromolecules, v.108, p.291–299, 2018.

HOBBS, K. T. C.; TARTOFF, K. **Improved media for growing plasmid and cosmid clones.** Focus, v. 9, p.9-12, 1987.

HU, J.; ARANTES, V.; PRIBOWO, A.; SADDLER, J. N. **The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific.** Biotechnology for Biofuels, v. 6, n. 1, p. 112, 2013.

JUTURU, V.; WU, J.C. **Microbial cellulases: Engineering, production and applications.** Renew Sustainable Energy Reviews. v.33, p.188–203, 2014.

KANG, K.; WANG, S.; LAI, G.; LIU, G.; XING, M. **Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose.** BMC Biotechnology, v. 13, n. 1, p. 42, 2013.

KAMARIAH, N.; MANIMEKALAI, M. S. S.; NARTEY, W.; EISENHABER, F.; EISENHABER, B.; GRÜBER, G. **Crystallographic and solution studies of NAD⁺- and NADH-bound alkylhydroperoxide reductase subunit F (AhpF) from *Escherichia coli* provide insight into sequential enzymatic steps.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, v. 1847, p.1139-1152, 2015.

KIM, I. J.; LEE, H. J.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. **Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, n. 20, p. 8469-8480, 2014.

KUDANGA, T.; ROES-HILL, M. L. **Laccase applications in biofuels production : current status and future prospects.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, p.6525–6542, 2014.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v.227, p.680, 1970.

LAMBERTZ, C.; GARVEY, M.; KLINGER, J.; HEESEL, D.; KLOSE, H.; FISCHER, R.; COMMANDEUR, U. **Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review.** Biotechnology for Biofuels, v.7, p.135, 2014.

- LEE, T. M.; FARROW, M. F.; ARNOLD, F. H.; MAYO, S. L. **A structural study of *Hypocrea jecorina* Cel5A**. Protein Science, v.20, p.1935-1940, 2011.
- LIANG, C.; XUE, Y.; FIORONI, M.; RODRÍGUEZ-ROPERO, F.; ZHOU, C.; SCHWANEBERG, U.; MA, Y. **Cloning and characterization of a thermostable and halo-tolerant endoglucanase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 89, p. 315-326, 2011.
- LIMA, M.A.; GOMEZ, L.D.; STEELE-KING, C.G.; SIMISTER, R.; BENARDINELLI, O.D.; CARVALHO, M.A.; REZENDE, C.A.; LABATE AZEVEDO, E.R.; MCQUEEN-MASON, S.J.; POLIKARPOV, I. **Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production**. Biotechnology for Biofuels, v. 7, n. 1, p. 10, 2014.
- LUCAS, R. C., CEREIA, M., CORA, M.A. **Large scale production of cellulases for biomass degradation**. In Fungal Biotechnology for Biofuel. Ed. Roberto Nascimento. Capítulo 11, 2015.
- MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. **Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products**. Current Opinion in Food Science, v. 1, p. 44-49, 2015.
- MATE, D.M.; ALCALDE, M. **Laccase : a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology**. Microbial Biotechnology, v.10, p.1457–1467, 2017.
- MCILVAINE, T. C. **A buffer solution for colorimetric comparison**. Journal of Biological Chemistry, v.49, p.183-186, 1921.
- MELEIRO, L. P.; SALGADO, J. C. S.; MALDONADO, R. F.; CARLI, S.; MORAES, L. A. B.; WARD, R. J., JORDE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. **Engineering the GH1 β -glucosidase from *Hemicola insolens*: Insights on the stimulation of activity by glucose and xylose**. PloS One, v.12, p.e0188254, 2017.
- MICHEL, D.. **Conformational selection or induced fit? New insights from old principles**. Biochimie, v. 128, p. 48-54, 2016.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing**

sugars. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.

MÖLLERS, K.B.; MIKKELSEN, H.; SIMONSEN, T.I.; CANNELLA, D.; JOHANSEN, K.S.; BJERRUM, M.J.; FELBY, C. **On the formation and role of reactive oxygen species in light-driven LPMO oxidation of phosphoric acid swollen cellulose**. Carbohydrate Research, v. 448, p.182–186. 2017.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M. R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. Bioresource Technology, v.96, p.1986-1993, 2005.

MÜLLER, G.; CHYLENSKI, P.; BISSARO, B.; EIJSINK, V.G.H.; HORN, S.J. **The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail**. Biotechnology for Biofuels, v. 11, p.209, 2018.

NAKAZAWA, H.; OKADA, K.; KOBAYASHI, R.; KUBOTA, T.; ONODERA, T., OCHIAI, N.; OMATA, N.; OGASAWARA, W.; MORIKAWA, Y. **Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli***. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 81, p. 681-689, 2008.

NOVAGEN, I. **pET system manual**. 2002.

NOVOZYMES. **Cellulosic Ethanol: Novozymes Cellic Ctec3**. 2012. Disponível em http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosicethanol/CellicHTec3/Documents/CE_APP_Cellic_Ctec3.pdf

OBENG, E.M.; ADAM, S.N.N.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C.M.; MAAS, R.; JOSE, J. **Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices**. Bioresource Bioprocess. v.4, p.16, 2017.

PARK, T.; SEO, S.; SHIN, T.; CHO, B. W.; CHO, S.; KIM, B.; LEE, S.; HA, J. K.; SEO, J. **Molecular cloning, purification, expression, and characterization of β -1, 4-endoglucanase gene (Cel5A) from *Eubacterium cellulosolvens* sp. isolated from Holstein steers' rumen**. Asian-Australasian journal of animal sciences, v. 31, p. 607, 2018.

- PASIN, T. M.; ALMEIDA, P. A.; SCARCELLA, A. S. A.; INFANTE, J. C.; POLIZELI, M. L. T. M. **Bioconversion os agroindustrial residues to second-generation ethanol production.** In NANDA, S.; SARANGI, P. K.; VO, D. V. N. Biorefinery for Alternate Fuels and Chemicals. Springer Nature, no prelo.
- PAYNE C. M.; KNOTT B. C.; MAYES H. B.; HANSSON H.; HIMMEL M. E.; SANDGREN M.; STÅHLBERG J.; BECKHAM G. T. **Fungal cellulases.** Chemical Reviews, v.115, p. 1308–1448, 2015.
- PEREIRA, A. V.; LEDO, F. D. S.; MORENZ, M. J. F.; LEITE, J. L. B.; BRIGHENTI, A. M.; MARTINS, C. E.; MACHADO, J. C. **BRS Capiáçu: cultivar de capim-elefante de alto rendimento para produção de silagem.** Embrapa Gado de Leite-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). 2016.
- PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. **Ligninolytic enzymes : a biotechnological alternative for bioethanol production.** Bioresource Bioprocess. v.2, p.23, 2005.
- PIELHOP, T.; LARRAZÁBAL, G. O.; STUDER, M. H.; BRETHAUER S.; SEIDEL, C. M.; VON ROHR, P. R. **Lignin repolymerisation in spruce autohydrolysis pretreatment increases cellulase deactivation.** Green Chemistry, v.17, p. 3521-3532, 2015.
- POLI, A.; NICOLAUS, B.; CHAN, K. G.; KAHAR, U. M.; CHAN, C. S.; GOH, K. M. **Genome sequence of *Anoxybacillus thermarum* AF/04T, isolated from the Euganean hot springs in Abano Terme, Italy.** Genome Announcements, v.3, p.e00490-15, 2015.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- PUNEKAR, N. S. **Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms.** Springer, 2018.
- QIN, Y.; WEI, X.; SONG, X.; QU, Y. **Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum.** Journal of Biotechnology, v. 135, p. 190-195, 2008.

- RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. **Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.80 p.330-340, 2017.
- RENGSIRIKUL, K.; ISHII, Y.; KANGVANSACHOL, K.; SRIPICHITT, P.; PUNSUVON, V.; VAITHANOMSAT, P.; TUDSRI, S. **Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand.** Journal of Sustainable Bioenergy Systems, v.3, p.107, 2013.
- RICARD, J.; MEUNIER, J. C.; BUC, J. **Regulatory behavior of monomeric enzymes: 1. The mnemonical enzyme concept.** European journal of biochemistry, v. 49, n. 1, p. 195-208, 1974.
- SAINI, J.K.; SAINI, R.; TEWARI, L. **Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments.** 3 Biotech, v. 5 p. 337–353, 2015.
- SAHA, B.C. **Hemicellulose bioconversion.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.
- SANTOS, C.A.; FILHO, J.A.F.; DONOVAN A.O.; GUPTA, V.K.; TUOHY, M.G.; SOUZA, A.P. **Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation.** Microbial Cell Factories, v. 16, p. 83–93, 2017.
- SALGADO, J. C. S.; MELEIRO, L. P.; CARLI, S.; WARD, R. J. **Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases—A review.** Bioresource Technology, 2018.
- SEABRA, J. E.; TAO, L.; CHUM, H. L.; MACEDO, I. C. **A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering.** Biomass and Bioenergy, v. 34, n. 8, p. 1065-1078, 2010.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. **Microbial hemicellulases.** Current Opinion on Microbiology, v.6, p.219–228, 2003.

- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production**. *Bioresource Technology*, v. 127, p. 500-507, 2013.
- SIRIM, D.; WAGNER, F.; WANG, L.; SCHMID, R.D.; PLEISS, J. **The Laccase Engineering Database : a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases**. Database, p.1–7, 2011.
- SONG, J. M.; AN, Y. J.; KANG, M. H.; LEE, Y. H.; CHA, S. S. **Cultivation at 6–10 C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli***. *Protein expression and purification*, v.82, p. 297-301, 2012.
- SOUZA, A. P.; LEITE, D. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. **Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production**. *BioEnergy Research*, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013.
- TENKANEN, M.; PULS, J.; POUTANEN, K. **Two major xylanases of *Trichoderma reesei***. *Enzyme Microbial Technology*, v.14, p.566–574, 1992.
- TEXTOR, L. C.; COLUSSI, F.; SILVEIRA, R. L.; SERPA, V.; MELLO, B. L.; MUNIZ, J. R. C.; SQUINA, F.M.; PEREIRA, N.JR.; POLIKARPOV, I. **Joint X-ray crystallographic and molecular dynamics study of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum*: deciphering the structural features of cellobiohydrolase catalytic activity**. *The FEBS Journal*, v.280, p.56-69, 2013.
- VÁRNAI, A.; MÄKELÄ, M.R.; DJAJADI, D.T.; RAHIKAINEN, J.; HATAKKA, A.; VIKARI, L. **Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases: Occurrence in Nature, Function, and Relevance in Industrial Biomass Conversion**. In: *Advances in Applied Microbiology*. p 103–165, 2014.
- VOGEL, A. I. **A text-book of practical organic chemistry including qualitative organic analysis** (No. 547). Longmans, Green, 1956.
- WALTON, P.H.; DAVIES, G.J. **On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases**. *Current Opinion on Chemical Biology*, v.31, p.195–207, 2016.

WEI, L.; MCDONALD, A.G. **A Review on grafting of biofibers for biocomposites.** Materials (Basel) v. 9, p.303–325, 2016.

WILSON, D.B.; KOSTYLEV, M. **Cellulase Processivity.** Methods Molecular Biology, v.908, p.93–99, 2012.

YANG, Y.; ZHANG, X., YIN, Q.; FANG, W.; FANG, Z.; WANG, X., ZANGH, X.; XIAO, Y. **A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1 β -glucosidases.** Scientific Reports, v. 5, p.17296, 2015.

YODA, K.; TOYODA, A.; MUKOYAMA, Y.; NAKAMURA, Y.; MINATO, H. **Cloning, sequencing, and expression of a *Eubacterium cellulosolvens* 5 gene encoding an endoglucanase (Cel5A) with novel carbohydrate-binding modules, and properties of Cel5A.** Applied Environmental Microbiology., v.71, p.5787-5793, 2005.

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo I – sequência sintética de Endoglucanase II (Cel5A) de *Trichoderma reesei*

catatgggcggttagatTTTgCCggtgTTaatattgctggTTTTgacttcggttgCactac
 cgatggcacttGTgttacttCTaaggTctatcctccgcttaagaactTTtacgggatcca
 acaactatcctgatggaatagggcagatgcaacattTTtgTTaatgaagacgggatgaca
 atatttcgTTTgcctgTTggatggcaatatctggTcaacaataacctgggaggtaattt
 agatagTactctatctccaaatatgatcaattggTccaaggTTgtctatccttaggtg
 catattgtattgtcgatatacataaattatgctagatggaatggcggtattattggTcaa
 ggCGgtccaacaaacgcgcaatttacttCattgtggagccagTTggctagtaaatacgc
 gTcacagtccagggtTTggTTTggaattatgaatgagccacacgatgttaacattaata
 cctgggctgctaccgttcaagaagTTgtcacagcaattagaaatgctggcgctacgtcc
 cagTTtatcagTctacctggtaatgattggcaatctgctggTgctttcatttctgacgg
 cagTgccgctgcgTTgtcgcaagtaactaatccagatggctccacaactaatctaattt
 tcgacgtgcataagtatttggattcggataatagtggTactcatgcagagtgtactact
 aacaatatcgatggTgccttcagcccgctagcaacctggTTacgtcaaaacaatagaca
 agcaatattgacggaaaccggTggTggtaatgtacaaagTTgtattcaggatatgtgtc
 aacaaatacagTaccttaaccaaactcagatgtttacttaggctacgtTggctggggT
 gctggTtccttcgacagTacttacgtTTTgactgagacacctacatccagTggtaatag
 ttggaccgatacttctTTTggtatcttcttgcttagctagaaagggaggtagcggaagcg
 gaCaccaccaccaccaccactgagaattc

Anexo II – Sequência de Módulo I (inativo)

catatgaaacaccaccaccaccaccaccagggcactgaggctgcatccggggatattgt
 tcttttctccggcagcaaacaatgtggaattcacagactggggcgggtacggactggccga
 gcgcttatgagcttcagccgccgtatcagacaatgccctttgatctcaacaagaatttc
 gagatcaaagtggactacagcggcgctgatattgttctgatctttgcgcgttgggagca
 tggctctaaaccgcagatctgggcacagatctctccgtactatgtagttgacggaactg
 cagtattcacaaaagaacagatcgaaaagcatacgggaagcgatgacttcagcgatctg
 gattacatcggcgtaaaacccttaccctccgcagatgggtatgacagtgacaaaaattgt
 tgcacacctacacaagcggaagctccgatgatgtagacatcaatctcaagggtattgccg
 gtgagtgggcaaaccggcgtaacatcggatggaacctgggaaataccctggatgcctac
 gataccaaccgtttcaaaagctcaaagggacacaataatccggcagatatcgagacctg
 ctggggcaatccggtgaccacaaaggccatgatcgatgacatcaaggcacagggttca
 acgcagtcggtgtaccgggttacctgggatttcgagatcgatgacaacgacgggtacaaa
 gtgaacgaggcggtggatggctcgtgtcaaagaagtagtagactacgtcatggacaacga
 tctgtactgtatcctgaacggtcatcatgacaccgggtgagcagggtggctcaaagctt
 cactgcaaactacaacaagaacgtgaaaaagttcaaagctctctggaaacagattgca
 gccgagttcaaaaactatgacaacaagctggctttcgagggttcaatgagatgctcga
 cgagaagaacagctggaactatccgggaactgacgcagggtgatgccatcaacctctaca
 accaggcatthttagacggtgtacgtgccagcggcggaagaacggcaaacgtcctctg
 atctgcaacacttacgcaggatgtacagaggccggagcgcttaattctttcaagattcc
 gaatgatacgggttgataacgcgatcatcgctcagggtacatttctatcagcccacagggt
 actgcttcgacatgaatccgaatcaggggcagaacatggatgtggactacaagacctgc
 ggtggagagagcgcagctgatacactcgccatgatgctctacaagagattcacagagaa
 gggaattccctgtatcgctcggtgagttcgctgccagccacaagaagaacgatgataacc
 gtgcagagtgggttgactacgtagtaagaaagaccggtacatacggcggtgaaatgcttc
 tgggtgggacaacggcggcactttcggatcctaactcgag

Anexo III – Sequência de Módulo II

catatgcaccaccaccaccaccacggatccacaccgaactactccacaggactggacta
 ctacaacagcatgggtatctacaacagaaacaccatgcagttcgagtatccgaaggtag
 ctgacgcccttgtaaatgctgcaaacggcgagcaaaacccacaactgcaccgacaaag
 aaaccgacttccacaccgaagccgacagcaacactgaaacccacaaccaaactacaac
 aaaacctacaacgaaaccgaatccgacttcaggagctgattccggcgaaatcattttgt
 tctccggaagcaaccatgcggatttcaaagcctggggcgcgacgactggcccagcgca
 ttcgaaatttgcgcgaagtatgagccgatgaagcttgatctgaacaagaattttgagat
 caaagtggattacaacgggtgcggatattgttctgatttttcgcacgttgggataaggaca
 tctgggcacagatttctccgtactatgtttagacggaacagcagatttcacaaaagag
 cagatcgccaaggcctatggaagcgatgacttcagtgggtcttgattatatcgcggttaa
 accgctgccttccgaagaaggtgtgacagtgacaaaagtttccggaatctacacaaacg
 gaggttcggaagacgtagacatcaacctcaagggaattgcccggcgagtgggcaaacggc
 gtgaatatcggatggaacctgggtaataacctggatgcctacgacaccaaccgtttcac
 aaggacaaagggacacacaacatcctgctgatatcgagacctgctggggcaatccggtga
 ccacaaaggccatgatcgatgatataagggcacagggttcaacgcagtcctgtgtaccg
 gtaacctgggattatgagatcgacgacaacgacggctacaaagtaaacgaggcggtgat
 ggctcgtgtcaaagaagttgttgattacgtaattggacaatgatatgtactgtatcgtaa
 acgttcatcacgacaccgggtgagcagggtatggcttaaggcttccactgcaaactacgca
 aagaacgagaagaagttcaaagcactctggaacagattgcccgtgaattcaagaacta
 cgatcataagctggccttcgagggcttcaacgagatgctcgatgagaagaacagctgga
 actatccgggcgctgacgcaggtgaggtatcaacctctacaaccaggcatttgttgat
 gttgtacgcgccagcgggcggaagaacagcgaccgtcctctgatctgcaacacctacgc
 aggatgtacagaggcaggagctctcaactccttcgagattccgaacgataccgtagaga
 atgcgatcatcgctcagggttacttctatcagccgacaggctactgcttcgacatgaac
 ccgaatcaggggcagaacatggatgtggactacaagacctgcgggtggagagagcgcagc
 tgatacacttgccatgatgctctacaagagattcacagagaagggaattccctgtatcg
 tcgggtgagttcgctgccagccacaaacagaacgatgacaaccgtgcggcatgggtagac
 tacgtagtaagcaagaccggaaaatacggcgtgaaatgcttctggtgggataacgggtg
 aacattcacaccgaactactccacaggactggactactacaacagcatgggtatctaca
 acagaaacaccatgaagttcgagtatccgaaggtagctgacgcccttgtaaaagcagca
 aacggcggaacaatgcctaccgttgcacctacaaagaaaccgacagcaaacctacacc
 tacaagaagccgacttccacaccgaagcctacgggtgaaacctacacagacaccgaagc
 ctacaagaaaaccgggcaaacgcgtgaaatattccgcacttgacctcgacggaaacgta
 agctccggcaacctgatcccgtaaactcgag

Anexo IV – Sequência de Módulo I + II

catatgaaaaccaccaccaccaccaccagggcactgaggctgcatccggggatattgt
 tcttttctcggcagcaaacatgtggaattcacagactggggcggtacggactggccga
 gcgcttatgagcttcagccgccgtatcagacaatgccctttgatctcaacaagaatttc
 gagatcaaagtggactacagcggcgctgatattgttctgatctttgcgcgttgggagca
 tggctctaaaccgcagatctgggcacagatctctccgtactatgtagttgacggaactg
 cagtattcacaaaagaacagatcgcaaaagcatacgggaagcgatgacttcagcgatctg
 gattacatcggcgtaaaacccttaccctccgcagatgggtatgacagtgacaaaaattgt
 tgcacctacacaagcggaagctccgatgatgtagacatcaatctcaagggtattgccg
 gtgagtgggcaaaccggcgtaacatcggatggaacctgggaaataccctggatgcctac
 gataccaaccgtttcaaaagctcaaagggacacaataatccggcagatatcgagacctg
 ctggggcaatccggtgaccacaaaggccatgatcgatgacatcaaggcacagggttca
 acgcagtcctgtgtaccgggttacctgggatttcgagatcgatgacaacgacgggtacaaa
 gtgaacgaggcggtggatggctcgtgtcaaagaagtagtagactacgtcatggacaacga
 tctgtactgtatcctgaacgttcatcatgacaccgggtgagcagggtggctcaaagctt
 cactgcaaactacaacaagaacgtgaaaaagttcaaagctctctggaaacagattgca
 gccgagttcaaaaactatgacaacaagctggctttcgagggttcaatgagatgctcga
 cgagaagaacagctggaactatccgggaactgacgcagggtgatgccatcaacctctaca
 accaggcatthttagacggtgtacgtgccagcggcggaagaacggcacaacgtcctctg
 atctgcaacacttacgcaggatgtacagaggccggagcgcttaattctttcaagattcc
 gaatgatacgggttgataacgcgatcatcgctcagggtacatttctatcagcccacagggt
 actgcttcgacatgaatccgaatcaggggcagaacatggatgtggactacaagacctgc
 ggtggagagagcgcagctgatacactcgccatgatgctctacaagagattcacagagaa
 gggaattccctgtatcgctcggtgagttcgctgccagccacaagaagaacgatgataacc
 gtgcagagtgggttgactacgtagtaagaaagaccggtacatacggcggtgaaatgcttc
 tgggtgggacaacggcggcactttcggatccacaccgaactactccacaggactggacta
 ctacaacagcatgggtatctacaacagaaacaccatgcagttcgagtatccgaaggtag
 ctgacgcccttgtaaattgctgcaaacggcgagcaaaaccacaaactgcaccgacaaag
 aaaccgacttccacaccgaagccgacagcaacactgaaaccacaaacaaacctaacaac
 aaaacctacaacgaaaccgaatccgacttcaggagctgattccggcgaaatcattttgt
 tctccggaagcaaccatgcggatttcaaagcctggggcggcgacgactggcccagcgca
 ttcgaaatttcgccgaagtatgagccgatgaagcttgatctgaacaagaattttgagat
 caaagtggattacaacgggtgcggatattgttctgatttttcgcacggtgggataaggaca
 tctgggcacagattttctccgtactatgttgtagacggaacagcagtattcacaaaagag
 cagatcgccaaggcctatggaagcgatgacttcagtggtcttgattatatcgcggttaa
 accgctgccttccgaagaaggtgtgacagtgacaaaagtttccggaatctacacaaacg
 gaggttcggaagacgtagacatcaacctcaagggaattgccggcgagtgggcaaaccggc
 gtgaatatcggtatggaacctgggttaataccctggatgcctacgacaccaaccgtttcac
 aaggacaaaggacacacaatacctgctgatatcgagacctgctggggcaatccggtga
 ccacaaaggccatgatcgatgatatcaaggcacagggttcaacgcagtcctgtgaccg
 gtaacctgggattatgagatcgacgacaacgacggctacaaagtaaacgaggcggtggat
 ggctcgtgtcaaagaagttgttgattacgtaatggacaatgatatgtactgtatcgtaa
 acgttcatcacgacaccgggtgagcagggtggcttaagggttccactgcaaactacgca
 aagaacgagaagaagttcaaagcactctggaacagattgccgctgaattcaagaacta
 cgatcataagctggccttcgaggggttcaacgagatgctcgatgagaagaacagctgga

actatccgggcgctgacgcaggtgaggctatcaacctctacaaccaggcatttgttgat
gttgtagcgccagcgggcgaaagaacagcgaccgtcctctgatctgcaacacctacgc
aggatgtacagaggcaggagctctcaactccttcgagattccgaacgataccgtagaga
atgcgatcatcgctcaggttcacttctatcagccgacaggctactgcttcgacatgaac
ccgaatcaggggcagaaacatggatgtggactacaagacctgcggtggagagagcgcagc
tgatacacttgccatgatgctctacaagagattcacagagaagggaattccctgtatcg
tcggtgagttcgctgccagccacaaacagaacgatgacaacctgcggcatgggtagac
tacgtagtaagcaagaccggaaaatacggcgtgaaatgcttctggtgggataacggtgg
aacattcacaccgaactactccacaggactggactactacaacagcatgggtatctaca
acagaaacaccatgaagttcgagtatccgaaggtagctgacgcccttgtaaaagcagca
aacggcggaacaatgcctaccgttgcacctacaaagaaaccgacagcaaacctacacc
tacaagaagccgacttccacaccgaagcctacggtgaaacctacacagacaccgaagc
ctacaagaaaaccgggcaaacgcgtgaaatattccgcacttgacctcgacggaaacgta
agctccggcaacctgatcccgtaaactcgag

Anexo V – Sequência da β -glucosidase

catatgATTTCAGTTTCCGAAAGATTTTGTTTGGGGTGCTGCTACTTCATCATATCAGAT
 CGAAGGAACGGCAACTGGGGAAGATAAAATTTATTCGATTTGGGATCACTTTTCGCGCA
 TACCTGGTAAAGTAGCGAATGGGGATAATGGCGATATCGCAATTGATCATTACAATCGT
 TATGTTGAAGACATCGCATTAATGAAAGCGCTTCATTTGAAAGCGTATCGATTTTCGAC
 TAGTTGGGCGAGACTGTATTGTGAAACGCCAGGGAAGTTTAACGAGAAAGGTTTAGATT
 TTTATAAGCGTCTTGACATGAATTGCTAGAGAACGGTATCGAGCCAATGTTGACCATT
 TATCATTGGGATATGCCACAAGCCCTTCAAGAGAAAGGTGGCTGGGAAAATCGTGATAT
 TGTTCAATTATTTTCAAGAATACGCTGCTTTCCTTTATGAGAATCTTGGGGATGTCGTGA
 AAAATGGATTACGCATAATGAGCCATGGGTTGTCACCTATTTAGGATATGGAAATGGC
 GAACATGCCCCAGGGATTCAAACTTTACATCGTTTTTAAAAGCAGCACATCATGTTCT
 TCTCTCACACGGGGAAGCGGTAAGCGTTTCGAACAATCGGCCCGAAAGACGGAGAAA
 TTGGAATTACGTTGAATTTGACGCCAGGATATGCGGCGGATCCAAAAGATGAAAAGGCG
 GTTGATGCCGCTCGAAAATGGGACGGTTTTATGAATCGTTGGTTTTTAGATCCTGTATT
 TAAGGGACAATATCCAGCAGATATGTTAGAAGTGTATAAAGATTATTTACCAGATGTTT
 ACAAAGAGGGGGATTTACAAACGATTCAGCAACCGATCGACTTTTTTCGGATTTAACTAT
 TATTCAACAGCAACATTTAAAAGATTGGAAAAAAGGTGACCGTGAACCGATCGTATTTGA
 ACATGTGAGCACAGGAAGACCTGTGACGGATATGAATTGGGAAGTGAATCCAAACGGTT
 TGTTTGATTTAATGGTGCGATTGAAAAAAGATTATGGCGATATTCATTATACATTACA
 GAAAACGGTGCTGCATACAAAGATCGCGTCAACGAAAAAGGTGAAGTAGAAGACGATGA
 GCGAGTTGCTTATATACGAGAGCATTTAATCGCTTGCCATCGCGCGATTGAACAAGGCG
 TCAATTTAAAAGGATATTATGTATGGTCGCTGTTTCGATAATTTTGAGTGGGCATTTGGC
 TATGATAAGCGCTTTGGGATTGTATACGTGGATTATGAAACGCTAGAGCGCATCCCGAA
 AAAGAGTGCATTATGGTACAAGGAAACGATTATAAATAACGGATTAAAAGCAGAAAAAG
 ATAAAcaccaccaccaccactgactcgag

Anexo VI- Sequenciamento do N-terminal das bandas resultantes da purificação de TR

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Paula Zaghetto_TR G	Std Amount:	8.000 pmols
ID Code:		Sample Amount:	0.000 pmols
		Detector Scale:	0.005 AUFS
Comments:	MLDTN		

SEQUENCER INFORMATION

Name:	PROCISE	Model Number:	494
Method:	Pulsed liquid PVDF mod	Cartridge:	B
Operator:	Javier Varela		

sequencePro™

QUÍMICA DE PROTEÍNAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 1: Blank 1

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 4
28040 Madrid

PNA-SQP004-F01

Cycle 2:

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.13	4.13	3.462	8.000	P	12.67	12.67	2.128	8.000
N	4.67	4.67	3.184	8.000	M	13.24	13.24	2.007	8.000
S	5.31	5.31	1.939	8.000	V	13.54	13.54	2.153	8.000
Q	5.62	5.62	2.903	8.000	dptu	14.64	14.64	2.836	8.000
T	5.83	5.83	2.198	8.000	W	15.60	15.60	2.576	8.000
G	6.08	6.08	2.458	8.000	dpu	15.88	15.88	0.286	8.000
E	6.51	6.51	3.351	8.000	F	16.23	16.23	2.054	8.000
A	8.31	8.31	1.942	8.000	I	16.64	16.64	2.030	8.000
H	9.34	9.34	1.920	8.000	K	16.89	16.89	2.726	8.000
Y	10.43	10.43	2.026	8.000	L	17.11	17.11	2.051	8.000
R	11.61	11.61	1.557	8.000					

Monday, March 05, 2018 09:58:01

Paula Zaghetto_TR G - 02Mar2018 09:31:00 - Page 3 of 4

sequencePro™

QUÍMICA DE PROTEÍNAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 91
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 3:

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.10	4.13	0.611	1.413	M	13.20	13.24	10.327	41.173
N	4.63	4.67	0.177	0.444	V	13.50	13.54	0.439	1.631
S	5.28	5.31	1.287	5.312	dptu	14.63	14.64	16.613	46.854
T	5.72	5.83	1.624	5.909	W	15.58	15.60	0.064	0.199
G	6.04	6.08	1.462	4.757	dpu	15.87	15.88	2.144	59.855
E	6.47	6.51	0.216	0.516	F	16.23	16.23	0.367	1.430
A	8.27	8.31	0.685	2.822	I	16.64	16.64	0.284	1.118
H	9.29	9.34	0.104	0.433	K	16.89	16.89	0.168	0.494
Y	10.38	10.43	0.722	2.850	L	17.11	17.11	0.395	1.542
R	11.53	11.61	0.087	0.448					
P	12.63	12.67	0.236	0.888					

Monday, March 05, 2018 09:58:01

Paula Zaghetto_TR G - 02Mar2018 09:31:00 - Page 4 of 8

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 91
28040 Madrid

PNA-SQP004-F021

Cycle 4:

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.10	4.13	0.888	2.053	P	12.68	12.67	0.210	0.789
N	4.65	4.67	0.517	1.298	M	13.25	13.24	0.274	1.091
S	5.28	5.31	0.919	3.792	V	13.56	13.54	0.609	2.263
Q	5.60	5.62	0.379	1.044	dptu	14.68	14.64	11.497	32.426
T	5.80	5.83	0.470	1.710	dpu	15.93	15.88	1.743	48.673
G	6.04	6.08	1.660	5.403	F	16.29	16.23	0.438	1.706
E	6.46	6.51	0.595	1.421	I	16.72	16.64	0.312	1.230
A	8.27	8.31	0.792	3.262	K	16.98	16.89	0.409	1.201
H	9.31	9.34	0.123	0.514	L	17.19	17.11	11.688	45.598
Y	10.40	10.43	0.608	2.400					
R	11.57	11.61	0.089	0.459					

Monday, March 05, 2018 09:58:01

Paula Zaghetto_TR G - 02Mar2018 09:31:00 - Page 5 of 81

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 5
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 5:

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.09	4.13	13.895	32.111	P	12.67	12.67	0.458	1.722
N	4.64	4.67	0.599	1.506	M	13.24	13.24	0.130	0.519
S	5.28	5.31	0.678	2.796	V	13.55	13.54	1.134	4.212
Q	5.60	5.62	0.564	1.556	dptu	14.68	14.64	10.754	30.330
T	5.79	5.83	0.556	2.024	W	15.65	15.60	0.062	0.193
G	6.04	6.08	1.878	6.113	dpu	15.91	15.88	1.622	45.286
E	6.46	6.51	0.961	2.294	F	16.27	16.23	0.530	2.065
A	8.27	8.31	1.094	4.508	I	16.69	16.64	0.622	2.453
H	9.30	9.34	0.169	0.704	K	16.94	16.89	0.553	1.622
Y	10.40	10.43	0.572	2.258	L	17.16	17.11	1.631	6.365
R	11.56	11.61	0.061	0.312					

Monday, March 05, 2018 09:58:01

Paula Zaghetto_TR G - 02Mar2018 09:31:00 - Page 6 of 8

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 6:

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.10	4.13	2.479	5.729	P	12.60	12.67	0.496	1.865
N	4.65	4.67	0.971	2.439	M	13.15	13.24	0.188	0.751
S	5.29	5.31	0.625	2.578	V	13.45	13.54	1.536	5.708
Q	5.59	5.62	0.684	1.887	dptu	14.56	14.64	9.751	27.500
T	5.80	5.83	8.447	30.741	W	15.51	15.60	0.065	0.202
G	6.05	6.08	2.097	6.827	dpu	15.79	15.88	1.505	42.031
E	6.47	6.51	1.281	3.058	F	16.14	16.23	0.613	2.390
A	8.26	8.31	1.359	5.598	I	16.56	16.64	0.775	3.054
H	9.28	9.34	0.184	0.766	K	16.82	16.89	0.837	2.455
Y	10.36	10.43	0.593	2.343	L	17.04	17.11	1.341	5.231
R	11.50	11.61	0.154	0.793					

Mondav, March 05, 2018 09:58:01

Paula Zaahetto TR G - 02Mar2018 09:31:00 - Page 7 of 8

Cycle 7:

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.10	4.13	2.265	5.235	P	12.63	12.67	0.651	2.449
N	4.65	4.67	11.033	27.718	M	13.20	13.24	0.217	0.864
S	5.29	5.31	0.651	2.684	V	13.50	13.54	1.738	6.460
Q	5.60	5.62	0.733	2.022	dptu	14.61	14.64	10.810	30.487
T	5.81	5.83	1.438	5.232	W	15.55	15.60	0.027	0.084
G	6.05	6.08	2.492	8.111	dpu	15.84	15.88	1.465	40.907
E	6.47	6.51	1.683	4.017	F	16.20	16.23	0.612	2.383
A	8.28	8.31	2.013	8.291	I	16.62	16.64	1.015	4.002
H	9.28	9.34	0.315	1.312	K	16.87	16.89	1.027	3.012
Y	10.39	10.43	0.599	2.366	L	17.09	17.11	1.630	6.360
R	11.55	11.61	0.098	0.506					

Monday, March 05, 2018 09:58:02

Paula Zaghetto_TR G - 02Mar2018 09:31:00 - Page 8 of 1

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Paula Zaghetto_TR P	Std Amount:	8.000 pmols
ID Code:		Sample Amount:	0.000 pmols
		Detector Scale:	0.005 AUFS
Comments:	GVRFA		

SEQUENCER INFORMATION

Name:	PROCISE	Model Number:	494
Method:	Pulsed liquid PVDF mod	Cartridge:	A
Operator:	Javier Varela		

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 1: Blank 1

Monday, March 05, 2018 10:17:15

Paula Zaghetto TR P - 20Feb2018 11:26:07 - Page 2 of 8

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 91
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02:

Cycle 2: Standard 1

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.10	4.10	3.328	8.000	P	12.58	12.58	2.152	8.000
N	4.64	4.64	3.100	8.000	M	13.15	13.15	2.108	8.000
S	5.28	5.28	1.862	8.000	V	13.46	13.46	2.226	8.000
Q	5.58	5.58	2.868	8.000	dptu	14.57	14.57	3.025	8.000
T	5.79	5.79	2.154	8.000	W	15.53	15.53	2.615	8.000
G	6.03	6.03	2.474	8.000	dpu	15.81	15.81	0.268	8.000
E	6.45	6.45	3.340	8.000	F	16.15	16.15	2.068	8.000
A	8.25	8.25	1.992	8.000	I	16.57	16.57	2.019	8.000
H	9.39	9.39	2.322	8.000	K	16.81	16.81	2.913	8.000
Y	10.35	10.35	2.047	8.000	L	17.04	17.04	2.052	8.000
R	11.66	11.66	1.603	8.000					

Monday, March 05, 2018 10:17:15

Paula Zaghetto_TR P - 20Feb2018 11:28:07 - Page 3 of 8

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 91
28040 Madrid

PNA-SQP004-F021

Cycle 3:Residue 1

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.08	4.10	1.212	2.914	M	13.12	13.15	0.342	1.299
N	4.62	4.64	0.531	1.370	V	13.42	13.46	0.703	2.527
S	5.26	5.28	2.652	11.391	dpu	14.53	14.57	59.855	158.282
T	5.85	5.79	1.256	4.865	W	15.46	15.53	0.116	0.356
G	6.02	6.03	11.260	36.407	dpu	15.76	15.81	3.447	102.986
E	6.43	6.45	0.861	2.062	F	16.10	16.15	0.839	3.245
A	8.22	8.25	1.135	4.557	I	16.53	16.57	0.660	2.613
H	9.41	9.39	0.765	2.636	K	16.77	16.81	0.296	0.819
Y	10.32	10.35	1.660	6.486	L	17.00	17.04	0.847	3.301
R	11.60	11.66	0.621	3.100					
P	12.54	12.58	0.357	1.327					

Monday, March 05, 2018 10:17:15

Paula Zaquette TR P - 20Feb2018 11:28:07 - Page 4 of 8

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 6
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 4:Residue 2

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.07	4.10	2.069	4.974	P	12.53	12.58	0.615	2.288
N	4.62	4.64	0.969	2.502	M	13.10	13.15	0.234	0.888
S	5.25	5.28	3.183	13.674	V	13.40	13.46	9.195	33.050
Q	5.57	5.58	0.738	2.059	dptu	14.50	14.57	56.145	148.471
T	5.77	5.79	1.104	4.100	W	15.44	15.53	0.117	0.357
G	6.01	6.03	7.326	23.688	dpu	15.73	15.81	2.863	85.526
E	6.42	6.45	1.258	3.013	F	16.07	16.15	1.160	4.489
A	8.22	8.25	1.443	5.795	I	16.49	16.57	0.916	3.628
H	9.39	9.39	0.749	2.580	K	16.74	16.81	0.556	1.528
Y	10.31	10.35	2.070	8.091	L	16.97	17.04	1.310	5.105
R	11.59	11.66	0.627	3.128					

Monday, March 05, 2018 10:17:16

Paula Zaghetto_TR P - 20Feb2018 11-28-07 - Page 5 of 6

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 5:Residue 3

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.05	4.10	2.550	6.128	P	12.49	12.58	0.868	3.227
N	4.59	4.64	1.320	3.407	M	13.03	13.15	0.248	0.942
S	5.22	5.28	2.986	12.825	V	13.35	13.46	2.363	8.494
Q	5.52	5.58	0.818	2.281	dpu	14.46	14.57	62.858	166.221
T	5.73	5.79	1.228	4.559	dpu	15.70	15.81	3.115	93.063
G	5.97	6.03	7.712	24.935	F	16.04	16.15	1.303	5.041
E	6.39	6.45	1.490	3.570	I	16.45	16.57	0.992	3.930
A	8.18	8.25	1.591	6.389	K	16.71	16.81	0.620	1.704
H	9.34	9.39	0.772	2.658	L	16.94	17.04	1.450	5.651
Y	10.27	10.35	2.069	8.084					
R	11.54	11.66	3.401	16.969					

Monday, March 05, 2018 10:17:16

Paula Zaohetto TR P - 20Feb2018 11:28:07 - Page 6 of 8

SequencePro™

QUIMICA DE PROTEINAS (CIB-CSIC)
Ramiro de Maeztu, 91
28040 Madrid

PNA-SQP004-F02

Cycle 6:Residue 4

PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.06	4.10	2.784	6.692	P	12.52	12.58	0.930	3.458
N	4.60	4.64	1.658	4.280	M	13.10	13.15	0.236	0.894
S	5.24	5.28	2.613	11.225	V	13.39	13.46	1.443	5.186
Q	5.55	5.58	1.082	3.017	dpu	14.50	14.57	62.376	164.947
T	5.76	5.79	1.311	4.870	dpu	15.74	15.81	3.057	91.348
G	6.00	6.03	8.130	26.286	F	16.08	16.15	7.900	30.568
E	6.42	6.45	1.748	4.187	I	16.51	16.57	1.086	4.304
A	8.21	8.25	1.749	7.024	K	16.75	16.81	0.684	1.877
H	9.31	9.39	0.493	1.697	L	16.98	17.04	1.597	6.226
Y	10.31	10.35	2.014	7.870					
R	11.57	11.66	1.653	8.247					

Monday, March 05, 2018 10:17:16

Paula Zaehetto TR P - 20Feb2018 11:28:07 - Page 7 of 81

Cycle 7:Residue 5

PEAK	R.TIME	C.TIME	HEIGHT	PMOL HT	PEAK	R.TIME	C.TIME	HEIGHT	PMOL HT
D	(mins)	(mins)	(mV)		ID	(mins)	(mins)	(mV)	
D	4.07	4.10	2.919	7.017	P	12.53	12.58	0.964	3.583
V	4.61	4.64	1.985	5.123	M	13.10	13.15	0.243	0.923
S	5.25	5.28	2.598	11.160	V	13.40	13.46	1.424	5.119
Q	5.55	5.58	1.244	3.471	dpu	14.51	14.57	56.265	148.787
T	5.77	5.79	1.315	4.884	W	15.45	15.53	0.042	0.127
E	6.00	6.03	9.256	29.929	dpu	15.74	15.81	2.893	86.442
G	6.42	6.45	2.044	4.895	F	16.09	16.15	2.398	9.279
A	8.22	8.25	7.926	31.823	I	16.51	16.57	1.254	4.969
H	9.31	9.39	0.357	1.231	K	16.76	16.81	0.728	2.000
Y	10.31	10.35	2.178	8.513	L	16.98	17.04	1.937	7.548
R	11.57	11.66	1.150	5.740					

Anexo VII– Sequência de módulo I-II (deleção de parte do sítio ativo de MII) – a região de cobertura do sequenciamento que comprova a deleção está sublinhada

catatgaaaaccaccaccaccaccaccaggggcactgaggctgcatccggggatattgt
 tcttttctccggcagcaaacatgtggaattcacagactggggcggtacggactggccga
 gcgcttatgagcttcagccgccgtatcagacaatgccctttgatctcaacaagaatttc
 gagatcaaagtggactacagcggcgctgatattgttctgatctttgcgcgttgggagca
 tggctctaaaccgcagatctgggcacagatctctccgtactatgtagttgacggaactg
 cagtattcacaaaagaacagatcgcaaaagcatacgggaagcgatgacttcagcgatctg
 gattacatcggcgtaaaacccttaccctccgcagatgggtatgacagtgacaaaaattgt
 tgcattctacacaagcggaagctccgatgatgtagacatcaatctcaagggtattgccg
 gtgagtgggcaaacggcggtgaacatcggtatggaacctgggaaataacctggatgcctac
 gataccaaccgtttcaaaagctcaaagggacacaataatccggcagatatcgagacctg
 ctggggcaatccgggtgaccacaaaggccatgatcgatgacatcaaggcacagggttca
 acgcagtccgtgtaccgggttacctgggatttcgagatcgatgacaacgacgggtacaaa
 gtgaacgaggcggtggatggctcgtgtcaaagaagtagtagactacgtcatggacaacga
 tctgtactgtatcctgaacggtcatcatgacaccgggtgagcagggtatggctcaaagctt
 ccactgcaaaactacaacaagaacgtgaaaaagttcaaagctctctggaaacagattgca
 gccgagttcaaaaactatgacaacaagctggctttcgagggcttcaatgagatgctcga
 cgagaagaacagctggaactatccgggaactgacgcagggtgatgccatcaacctctaca
 accaggcatthttagacggtgtacgtgccagcggcggaagaacggcaaacgtcctctg
 atctgcaacacttacgcaggatgtacagaggccggagcgcttaattctttcaagattcc
gaatgatacgggttgataacgcgatcatcgctcagggtacattttctatcagcccacaggct
actgcttcgacatgaatccgaatcaggggcagaacatggatgtggactacaagacctgc
ggtggagagagcgcagctgatacactcgccatgatgctctacaagagattcacagagaa
gggaattccctgtatcgctcggtgagttcgctgccagccacaagaagaacgatgataacc
gtgcagagtgggttgactacgtagtaagaaagaccggtacatacggcggtgaaatgcttc
tgggtgggacaacggcggcactttcggtatccacaccgaactactccacaggactggacta
ctacaacagcatgggtatctacaacagaaacaccatgcagttcgagtatccgaaggtag
ctgacgcccttgtaaattgctgcaaacggcgaggcaaaaccacaaactgcaccgacaaag
aaaccgacttccacaccgaagccgacagcaaacactgaaaccacaaacaaacctacaac
aaaacctacaacgaaaccgaatccgacttcaggagctgattccggcgaaatcatthtgt
tctccgggaagcaaccatgcggatttcaaagcctggggcggcgacgactggcccagcgca
ttcgaaatttcgccgaagtatgagccgatgaagcttgatctgaacaagaattttgagat
caaagtggattacaacgggtgcggatattgttctgattttcgcacggtgggataaggaca
tctgggcacagattttctccgtactatgtttagacgggaacagcagatttcacaaaagag
cagatcgccaagg

Sequenciamento comprovando deleção

CGAATGATACGGTTGATAACGCGATCATCGCTCAGGTACATTTCTATCAGCCACAGGC
 TACTGCTTCGACATGAATCCGAATCAGGGGCAGAACANGGATGTGGACTACAAGACCTG
 CGGTGGAGAGAGCGCAGCTGATACTCGCCATGATGCTCTACAAGAGATTCACAGAGA
 AGGGAATTCCTGTATCGTCGGTGAGTTCGCTGCCAGCCACAAGAAGACGATGATAAC
 CGTGCAGAGTGGGTTGACTACGTAGTAAGAAAGACCGGTACATACGGCGTGAAATGCTT
 CTGGTGGGACAACGGCGGCACTTTTCGGATCCACACCGAACTACTCCACAGGACTGGACT
 ACTACAACAGCATGGGTATCTACAACAGAAACACCATGCAGTTCGAGTATCCGAAGGTA

GCTGACGCCCTTGTAATGCTGCAAACGGCGGAGCAAAACCCACAACCTGCACCGACAAA
GAAACCGACTTCCACACCGAAGCCGACAGCAACACTGAAACCCACAACCAAACCTACAA
CAAAACCTACAACGAAACCGAATCCGACTTCAGGAGCTGATTCCGGCGAAATCATTTTG
TTCTCCGGAAGCAACCATGCGGATTTCAAAGCCTGGGGCGGCGACGACTGGCCCAGCGC
ATTCGAAATTTGCGCCGAAGTATGAGCCGATGAAGCTTGATCTGAACAAGAATTTTGAGA
TCAAAGTGGATTACAACGGTGCGGATATTGTTCTGATTTTCGCACGTTGGGATAAGGAC
ATCTGGGCACAGATTTCTCCGTACTATGTTGTAGACGGAACAGCAGTATTCACAAAAGA
GCAGATCGCCAAGGGCACCACCACCACCACCACTGAGA

APÊNDICES

9. Apêndices**Apêndice I – Meio LB-(Luria-Bertani) (Bertani, 1951)**

Triptona.....	1 g
Extrato de Levedura.....	0.5 g
Cloreto de Sódio.....	0,5 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Apêndice II – Terrific broth (Tartoff e Hobbs, 1987)

Extrato de levedura.....	2,4 g
Triptona.....	2,0 g
Glicerol.....	0,4 mL
Tampão fosfato de potássio (0.17 M KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4).....	10 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Apêndice III – Meio Vogel (Vogel, 1964)

Sais de Vogel [50x].....	2 mL
Solução de biotina.....	20 µL
Casca de soja.....	1 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Solução de biotina

Biotina.....	0,05 g
Etanol 50%.....	100 mL

Sais de Vogel [50x]

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .5H ₂ O.....	15 g
KH ₂ PO ₄	20 g
NH ₄ NO ₃	10 g
MgSO ₄	1 g
Solução de elementos traços.....	0,5 mL
Clorofórmio.....	0,5 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Elementos traço

C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O.....	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄).6H ₂ O.....	1 g
CuSO ₂ .H ₂ O.....	0,25 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O.....	0,05g
Clorofórmio.....	1 mL
Água destilada q.s.p.....	95 mL