**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

LUANA DE FÁTIMA ALVES

**Criação de uma enzima multifuncional feruloil esterase/acetil-xilano esterase
por desenho racional**

**Ribeirão Preto
2016**

LUANA DE FÁTIMA ALVES

**Criação de uma enzima multifuncional feruloil esterase/acetil-xilano esterase
por desenho racional**

**Dissertação apresentada à Faculdade
De Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre
em Ciências.**

**Área de Concentração: Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward**

**Ribeirão Preto
2016**

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.

Alves, Luana de Fátima

Criação de uma enzima multifuncional feruloil esterase/acetil-xilano esterase por desenho racional. Ribeirão Preto/SP, 2016.

101p. :il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

1. Acetil-xilano esterase. 2. Feruloil esterase. 3. Arabinoxilano. 4. cana-de-açúcar. 5. Lignocelulose

LUANA DE FÁTIMA ALVES

Criação de uma enzima multifuncional feruloil esterase/acetil-xilano esterase por
desenho racional

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.
Área de Concentração: Bioquímica

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Selma e Milton, com eterna gratidão

À minha irmã Lorena, com amor

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que contribuíram, de modo especial (e único), para a conclusão deste trabalho. Com ensinamentos, sugestões, críticas, puxões de orelha, ajudas na bancada... Com a convivência agradável e divertida ao longo dessa caminhada... Com a amizade, carinho e presença confortante nos momentos difíceis...

A Deus, causa primária de todas as coisas, que me dá força e plenas condições.

Aos meus pais, agradeço pelo amor incondicional, pela paciência, pelo carinho, pelo incentivo... Obrigada por sempre sonharem junto comigo, sem medir esforços! Amo vocês! Ló, obrigada por ser uma irmã tão amiga! Pelas conversas, pela cumplicidade, pelo carinho e pelos momentos agradáveis em casa.

Ao meu orientador, Prof. Richard John Ward pela orientação, atenção, disponibilidade, pelos ensinamentos e pela oportunidade e confiança para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, a qual fomentou este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, Matheus Pinheiro, Gustavo, Lara, André Justino, Matheus Barreto, Gilvan, Leonardo, Maria Eugênia, agradeço por terem tornado melhor todos os dias de trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, ajudas e pela disponibilidade! Aprendi muito com todos vocês! Um agradecimento especial é Letícia, por ter me acolhido muito carinhosamente no início, me ensinado muito e me ajudado mais ainda!

Aos amigos do corredor da Bioquímica, Ivana, Daniel, Elise pela disponibilidade e ajuda e pelos dedos de prosa. Agradeço à Raquel Fonseca pela disponibilidade em sempre ajudar. Obrigada, Rach, por me dar uma grande força em algumas clonagens!! À Luana Meleiro pelas aulas de cinética.

Obrigada ao Eduardo por ajudar nos experimentos de espectrometria de massas, sempre com boa vontade e bom humor. Obrigada ao professor Beto pelas dicas e ajuda em muitos experimentos.

Agradeço à Flávia, Fabinho e Aline por terem me acolhido tão gentilmente em minhas vindas a Ribeirão Preto antes de iniciar o mestrado.

Ao Lucas por todo o carinho, por ser sempre um ótimo companheiro, amigo e incentivador.

Aos amigos André, Sarah, Ana Carla e Alinne pela amizade em Ribeirão Preto, que mantivemos desde a época da faculdade.

*"Não sei como o mundo me julgará. Para mim mesmo,
sou como um garoto brincando na praia,
divertindo-me aqui e ali por achar uma
pedra mais polida ou uma concha mais bonita que as outras,
enquanto o grande oceano da verdade permanece
desconhecido na minha frente" (Isaac Newton)*

"Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele, e ele tudo fará." (Salmo 37)

RESUMO

Alves, L.F. **Criação de uma enzima multifuncional feruloil esterase/acetil-xilano esterase por desenho racional**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 2016.

A parede celular das plantas inclui componentes polissacarídeos complexos, e a sacarificação destes polímeros necessita da ação de conjuntos de enzimas que atuem em sinergia. Enzimas podem formar complexos multi-enzimáticos que possuem mais de uma atividade catalítica derivada de domínios distintos de uma mesma cadeia polipeptídica. O objetivo deste trabalho foi construir uma enzima bifuncional com os domínios catalíticos: acetilxilano esterase (Axe) e feruloil esterase (Fae) para desconstrução de material lignocelulósico de cana-de-açúcar. Para isso, dois diferentes domínios catalíticos: acetilxilano esterase (Axe) e feruloil esterase (Fae) oriundos de *Clostridium thermocellum* foram fundidas para criar a quimera feruloil esterase/acetil-xilano esterase (FaeAxe). O desenho racional da quimera foi feito utilizando-se de métodos computacionais, que permitiram a criação de um modelo estrutural da enzima. A construção da quimera foi feita por *overlap PCR*, clonada em vetor pET-SUMO e expressa em *Escherichia coli*. As duas enzimas parentais (Fae e Axe) foram clonadas em vetor pET28 e expressas em *E. coli*. Durante a etapa de expressão, observou-se que todas as enzimas foram expressas na forma solúvel. As enzimas feruloil esterase e acetilxilano esterase têm como substrato o polímero arabinoxilano, cuja degradação é uma etapa chave na sacarificação de biomassa. Dessa forma, as atividades da quimera, bem como das enzimas parentais foram testadas contra polímeros arabinoxilano de trigo e arabinoxilano de cana-de-açúcar após a hidrólise pela endoxilanase GH11 de *Bacillus Subtilis* e analisadas por meio de espectrometria de massas. A atividade desacetilase da enzima parental acetil-xilano esterase e da quimera FaeAxe foram confirmadas, evidenciando que a quimera preservou essa atividade catalítica. A atividade da enzima feruloil esterase e da quimera FaeAxe na remoção de ácido ferúlico dos oligossacarídeos gerados pela endoxilanase GH11 não foi observada.

Palavras chave: 1. Acetil-xilano esterase. 2. Feruloil esterase. 3. Arabinoxilano. 4. Cana-de-açúcar. 5. Lignocelulose

ABSTRACT

Alves, L.F. **Construction of a multifunctional enzyme feruloyl esterase/acetyl xylan esterase by rational design.** 2016. Thesis (Master) - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 2016.

The plant cell wall is comprised of a matrix of polysaccharides and saccharification of these polymers requires the joint action of diverse enzymes. Enzymes may form multi-enzymatic complexes that have more than one catalytic activity derived from different domains of a single polypeptide chain. The aim of this work was to construct a bifunctional enzyme with two catalytic domains: acetyl xylan esterase (Axe) and feruloyl esterase (Fae) for degradation of sugar cane lignocellulosic material. The two different catalytic domains: acetyl xylan esterase (Axe) and feruloyl esterase (Fae) from *Clostridium thermocellum* were fused to generate a bifunctional chimera feruloyl esterase/acetyl xylan esterase (FaeAxe). A molecular model was created by rational design using a 3D-structure guided strategy. The fusion was created using overlap PCR, and the resulting product was cloned into the pETSUMO vector. The chimeric protein and the parental enzymes were expressed in *Escherichia coli* and purified and the enzymes were expressed in soluble form. Xylanases, feruloyl esterases and acetyl xylan esterases degrade arabinoxylan polymers and their activity is a key step in the saccharification of biomass. The catalytic properties of the chimera and of the parental enzymes were tested against wheat and sugarcane arabinoxylan polymers after hydrolysis by GH11 endoxylanase from *Bacillus subtilis* and analyzed by mass spectroscopy. The deacetylase activity of acetyl-xylan esterase parental enzyme and FaeAxe chimera were confirmed, showing that the chimera kept the deacetylase activity. After hydrolysis by GH11 endoxylanase from *Bacillus subtilis* the feruloyl esterase and FaeAxe chimera activities on ferulic acid removal were not observed.

Keywords: 1. Acetyl-xylan esterase. 2 . Feruloyl esterase. 3. Arabinoxylan. 4. Sugarcane. 5. Lignocelluloses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do xilano.	3
Figura 2. Principais enzimas envolvidas na hidrólise do xilano.	4
Figura 3. Modelo hipotético de ataque sequencial de enzimas hidrolíticas da parede celular das folhas e colmo de cana-de-açúcar.	8
Figura 4. Sequência do domínio Axe sintético.	11
Figura 5. Mapa da construção plasmidial pUC57/Axe.....	12
Figura 6. Mapa do vetor pET28a.....	13
Figura 7. Estrutura das enzimas parentais visualizadas no software <i>PyMOL</i>	21
Figura 8. Esquema da <i>overlap PCR</i> na construção da quimera FaeAxe.	23
Figura 9. Esquema do sítio múltiplo de clonagem do vetor pETSUMO.....	27
Figura 10. Digestão da construção pUC57/Axe e do vetor pET28a.	35
Figura 11. PCR de colônia da ligação pET28a/Axe.	36
Figura 12. Gel SDS-PAGE da expressão de Axe em <i>E. coli</i> Rosetta DE3.....	37
Figura 13. Purificação da acetil-xilano esterase.....	37
Figura 14. Expressão da feruloil esterase.	38
Figura 15. Purificação da feruloil esterase.	39
Figura 16. Purificação da endoxilanase GH11.	39
Figura 17. Ponto de união das enzimas feruloil esterase e acetil-xilano esterase. ...	40
Figura 18. Gráfico de Ramachandran para a quimera FaeAxe.	41
Figura 19. Amplificação dos fragmentos constituintes da quimera FaeAxe.	42
Figura 20. Fusão dos fragmentos de DNA via <i>overlap PCR</i>	43
Figura 21. Digestão do vetor pET28a e PCR de colônia da clonagem de FaeAxe em pET28a.....	44
Figura 22. Testes de expressão da quimera FaeAxe em pET28a.	45
Figura 23. Amplificação do fragmento de FaeAxe e digestão do vetor pETSUMO. ...	46
Figura 24. PCR de colônia de FaeAxe em pETSUMO.....	47
Figura 25. Expressão da quimera FaeAxe em vetor pETSUMO.....	48
Figura 26. Purificação da quimera FaeAxe fusionada com SUMO.	48
Figura 27. Princípio do ensaio acoplado.	49
Figura 28. Cromatograma das amostras dos substratos comerciais após digestão com a endoxilanase GH11.	51

Figura 29. Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos das amostras comerciais após a digestão com a endoxilanase GH11 de <i>Bacillus subtilis</i>	53
Figura 30. Espectro da relação m/z dos íons moleculares obtidos a partir da amostra de arabinoxilano acetilado de cana-de-açúcar após digestão com a endoxilanase GH11 de <i>Bacillus subtilis</i>	57
Figura 31. Interconversão espontânea de grupos acetil.....	64
Figura 32. Mecanismo catalítico da feruloil esterase.....	71
Figura 33. Espectros de MS/MS dos xilooligossacarídeos com um e dois grupos O-acetil (Xil_4Ac_n).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados na PCR de colônia	16
Tabela 2. Características dos clones das enzimas parentais.....	18
Tabela 3. Expressão das enzimas parentais.....	19
Tabela 4. Características das enzimas parentais para construção de FaeAxe	20
Tabela 5. Iniciadores utilizados na amplificação dos segmentos da quimera	24
Tabela 6. Iniciadores utilizados para clonagem em pETSUMO	28
Tabela 7. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados após o tratamento dos substratos comerciais xilano de <i>birchwood</i> , xilano de <i>oat spelts</i> , arabinoxilano de trigo de baixa viscosidade (<i>Wheat low viscosity</i>) e xilano de <i>beechwood</i> com a endoxilanase GH11 de <i>Bacillus subtilis</i>	54
Tabela 8. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados após o tratamento dos substratos arabinoxilano acetilado de cana-de-açúcar e arabinoxilano insolúvel de trigo (<i>Insoluble wheat arabinoxylan</i>) com a endoxilanase GH11 de <i>Bacillus subtilis</i>	59
Tabela 9. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados pelas enzimas Axe e quimera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir do substrato arabinoxilano acetilado de cana-de-açúcar	62
Tabela 10. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados pela pela enzima Fae e quimera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir do substrato arabinoxilano insolúvel de trigo (<i>Insoluble wheat arabinoxylan</i>).....	66
Tabela 11. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados pelas enzimas Fae, Axe e quimera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir de arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar gerados	68
Tabela 12. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados pela pelas enzimas Fae, Axe e quimera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir de arabinoxilano solúvel de parede de cana-de-açúcar	69

LISTA DE ABREVIACÕES

Axe – Acetil-xilano esterase

BRENDA - *B*Raun*s*chweig *E*Nzyme *D*Atabase

BSA – Albumina bovina sérica

CAZy – Carbohydrate Active enZyme

CBM – carbohydrate binding domain

CE – Carboidrato esterase

DI – Água deionizada

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxinucleotídeo trifosfato

DMSO – Dimetilsulfóxido

FAXX – (*O*-{5-*O*-[(*E*)-feruloyl]- α -*L*-arabinofuranosyl}-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- β -*D*-xylopyranosyl - (1 $\rightarrow$ 4)-*D*-xylopyranose)

FAX₃ – (5-*O*-[(*E*)-feruloyl]-[*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- α -*L*-arabinofuranosyl-[1 $\rightarrow$ 3]]-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*D*-xylopyranose)

Fae – Feruloil esterase

FaeAxe – Quimera acetil-xilano esterase/feruloil esterase

GH – Glicosídeo hidrolase

HEPES - ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfônico

IMAC – Cromatografia de afinidade por metal imobilizado

IPTG – isopropil- β -*D*-tiogalactopiranosídeo

LB – Luria Bertani

OD – Densidade ótica

PAX₃ – (5-*O*-[(*E*)-*p*-coumaroyl]-[*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- α -*L*-arabinofuranosyl-[1 $\rightarrow$ 3]]-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*D*-xylopyranose)

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDB – *Protein Data Bank*

PMSF – fluoreto de metil sulfonila

RNA – ácido ribonucleico

Rpm – rotações por minuto

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SUMO - *Small Ubiquitin-like MOdifier*

TAE - Tris-acetato/EDTA

ULP1 - *Ubiquitin-like-specific protease 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biomassa lignocelulósica	1
1.2. Enzimas envolvidas na degradação da biomassa.....	3
1.2.1. Acetil-xilano esterases	4
1.2.2. Feruloil esterases.....	6
1.3. Modelo sequencial de hidrólise de biomassa	6
1.4. Produção de enzimas multidomínios.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. METODOLOGIA	11
3.1. Clonagem das enzimas parentais	11
3.1.1. Clonagem da acetil-xilano esterase de <i>C. thermocellum</i>	11
3.1.1.1. Estratégia de clonagem e síntese do domínio Axe.....	11
3.1.1.2. Propagação da construção pUC57/Axe.....	13
3.1.1.3. Purificação de DNA plasmidial.....	14
3.1.1.4. Digestão da construção pUC57/Axe e do vetor pET28a	14
3.1.1.5. Eletroforese em gel de agarose.....	15
3.1.1.6. Purificação do DNA a partir de bandas no gel	15
3.1.1.7. Subclonagem do domínio Axe em vetor de expressão bacteriano pET28a.	15
3.1.1.8. <i>Screening</i> dos transformantes.....	16
3.1.1.9. Sequenciamento de DNA	17
3.1.2. Clonagem da feruloil esterase de <i>C. thermocellum</i> e da xilanase GH11 de <i>Bacillus subtilis</i>	18
3.2. Expressão das enzimas parentais.....	18
3.3. Purificação das enzimas parentais	19
3.4. Construção da quimera FaeAxe	20
3.4.1. Definição das enzimas para a construção da quimera bifuncional FaeAxe.....	20
3.4.2. Desenho racional e modelagem da estrutura tridimensional de FaeAxe ..	20

3.4.3.	Avaliação do modelo de FaeAxe por <i>Ramachandran Plot</i>	22
3.4.4.	Construção da quimera FaeAxe por <i>overlap PCR</i>	22
3.4.4.1.	Amplificação dos fragmentos.....	23
3.4.4.2.	<i>Overlap PCR</i>	25
3.4.5.	Digestão do gene da quimera FaeAxe e do vetor pET28a	25
3.4.6.	Clonagem do fragmento FaeAxe no vetor pET28a	26
3.4.7.	Expressão da quimera FaeAxe em vetor pET28a	26
3.5.	Clonagem da quimera FaeAxe em vetor pETSUMO.....	27
3.5.1.	Amplificação do fragmento da quimera FaeAxe.SUMO.....	28
3.5.2.	Digestão e clonagem do fragmento FaeAxe no vetor pETSUMO.....	28
3.5.3.	Expressão da quimera FaeAxe em pETSUMO.....	29
3.5.4.	Purificação da enzima quimérica	29
3.5.5.	Expressão e purificação da protease ULP1 (<i>Ubiquitin-like-specific protease 1</i>) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.6.	Quantificação das enzimas parentais e da enzima quimérica.....	30
3.7.	Análise de substratos naturais comerciais por espectrometria de massas	31
3.8.	Extração de arabinoxilano acetilado a partir de bagaço de cana-de-açúcar ...	32
3.8.1.	Pré-extração da biomassa	32
3.8.2.	Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar	32
3.8.3.	Extração dos polissacarídeos acetilados com DMSO.....	32
3.8.4.	Análise de arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e de arabinoxilano insolúvel de trigo (<i>Insoluble wheat arabinoxylan</i>) por espectrometria de massas.....	33
3.9.	Análise do padrão de clivagem da acetil-xilano esterase, feruloil esterase e quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e arabinoxilano insolúvel de trigo (<i>Insoluble wheat arabinoxylan</i>) após clivagem pela endoxilanase GH11	34
3.10.	Análise do padrão de clivagem da acetil-xilano esterase, feruloil esterase e quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano solúvel e arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar após clivagem pela endoxilanase GH11	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1.	Subclonagem da acetil-xilano esterase em pET28a.....	35
4.2.	Expressão e purificação das proteínas parentais	36
4.2.1.	Expressão e purificação da acetil-xilano esterase	36

4.2.2.	Expressão e purificação da feruloil esterase.....	38
4.2.3.	Purificação da enzima endoxilânase GH11	39
4.3.	Desenho racional da quimera FaeAxe	40
4.3.1.	Validação dos modelos por <i>Ramachandran Plot</i>	40
4.4.	Construção do gene da quimera FaeAxe	42
4.4.1.	Amplificação dos fragmentos	42
4.4.2.	<i>Overlap PCR</i>	43
4.5.	Digestão e clonagem de FaeAxe no vetor pET28a	43
4.6.	Sequenciamento do gene da quimera FaeAxe	44
4.7.	Testes de expressão da quimera FaeAxe em pET28a.....	44
4.8.	Clonagem de FaeAxe no vetor pETSUMO.....	46
4.8.1.	Amplificação dos fragmentos da quimera FaeAxe e digestão do vetor pETSUMO.....	46
4.8.2.	Clonagem do fragmento de FaeAxe em pETSUMO	47
4.9.	Expressão e purificação da quimera FaeAxe fusionada com SUMO	47
4.10.	Análise dos oligossacarídeos gerados pela endoxilânase GH11 a partir dos substratos comerciais através de espectrometria de massas (LC-MS).....	49
4.11.	Análise dos oligossacarídeos gerados pela endoxilânase GH11 a partir do substrato arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e do arabinoxilano insolúvel de trigo (<i>Insoluble wheat arabinoxylan</i>) (Megazyme – Bray, Irlanda) através de espectrometria de massas (LC-MS).....	57
4.12.	Análise do padrão de clivagem da acetil-xilano esterase e da quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise com a endoxilânase GH11	60
4.13.	Análise do padrão de clivagem da feruloil esterase e da quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano insolúvel de trigo (<i>Insoluble wheat arabinoxylan</i>) após hidrólise com a endoxilânase GH11	65
4.14.	Análise do padrão de clivagem da feruloil esterase, acetil-xilano esterase e da quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano solúvel e arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar após hidrólise com a endoxilânase GH11	67
4.15.	Caracterização dos oligossacarídeos substituídos por grupos acetil através de MS/MS	72
5.	CONCLUSÕES.....	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

7. APÊNDICES	86
--------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biomassa lignocelulósica

Dentre todos os recursos renováveis, a biomassa é uma matéria-prima atraente por algumas razões principais: é um recurso que pode ser desenvolvido de forma sustentável no futuro; parece ter propriedades apreciáveis no âmbito ambiental, como por exemplo, nenhuma liberação líquida de dióxido de carbono, e também parece ter significativo potencial econômico, prevendo o aumento do preço dos combustíveis fósseis no futuro (BALAT; BALAT, 2009). Estima-se que, em 2050, com o crescimento da população e a demanda por energia, a bioenergia possa contribuir com 25% a 33 % da oferta global (ZHANG et al., 2013). Estudos destinados a avaliar os potenciais de bioenergia sugerem que a biomassa lignocelulósica pode vir a ser a maior fonte global de energia renovável, diminuindo assim, a dependência por combustíveis fósseis (BENTSEN; FELBY, 2012; BERNDES; HOOGWILK; VAN DEN BROEK, 2003; CARROLL; SOMERVILLE, 2009).

A lignocelulose, o principal componente da biomassa, consiste em aproximadamente 50% da matéria produzida a partir da fotossíntese e é composta por três tipos de polímeros: a celulose, a hemicelulose e a lignina, que interagem por forças não-covalentes e por ligações covalentes cruzadas (PÉREZ et al., 2002). A celulose e a hemicelulose são macromoléculas derivadas de diferentes açúcares, enquanto a lignina é um polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanóides. A composição e porcentagens desses polímeros variam de uma espécie de plantas para outra; assim como a composição dentro de uma espécie de plantas pode variar com a idade, estágio de crescimento, condições sob as quais a planta cresce (oferta de água e nutrientes, por exemplo) (JEFFRIES, 1994).

Na maioria das plantas, a celulose compõe cerca de 30-50% da biomassa por peso, seguida da hemicelulose, com 10-40% e da lignina, com 5-30% (MCKENDRY, 2002). A celulose é um polímero linear constituído por subunidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 com um grau de polimerização que pode variar de algumas centenas de unidades até mais que uma dezena de milhares de unidades de D-glicose. Os grupamentos hidroxila das unidades de D-glicose

interagem entre si por pontes de hidrogênio de forma ordenada, resultando em uma compacta estrutura cristalina (SUN et al., 2015).

As hemiceluloses são também polímeros de polissacarídeos, porém derivadas de vários açúcares e ácidos urônicos. Geralmente, hemiceluloses são heteropolímeros ramificados, com um grau de polimerização em torno de 200. O conteúdo e a estrutura química das hemiceluloses são variados nas diferentes partes da planta. O xilano é o componente mais abundante nas hemiceluloses, e seu esqueleto é comosto por resíduos β -D-xilopiranosídeos ligados por ligações glicosídicas β -(1,4), carregando vários substituintes, incluindo acetilação, (4-O-metil) ácido glucurônico, arabinose, entre outros (Figura 1). Essas substituições também variam de acordo com a espécie e o tipo de parede celular (KOUTANIEMI et al., 2012; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Em monocotiledôneas o esqueleto de xilano é substituído com resíduos de L-arabinofuranosil através de ligações α (1 $\rightarrow$ 2) e/ou α (1 $\rightarrow$ 3) e esses resíduos podem ser esterificados com ácido *p*-cumárico ou ácido ferúlico na posição 5-O. Além disso, tecidos vegetais em monocotiledôneas contêm ácidos urônicos D-glicopiranosil (GlcA) ligados em posição α (1 $\rightarrow$ 2), os quais são parcialmente metilados na posição 4-O (MeGlcA). No xilano de dicotiledôneas, o principal monossacarídeo substituinte é o α (1 $\rightarrow$ 2)-GlcA e/ou α (1 $\rightarrow$ 2)-MeGlcA. No entanto, o substituinte mais abundante são os grupamentos acetil, sendo que 50-70% dos resíduos de xilose são acetilados, enquanto nas monocotiledôneas esse grau é diminuído (GONÇALVES; EVTUGUIN; DOMINGUES, 2008; PROZIL et al., 2012; XIONG; CHENG; PAULY, 2013). Um estudo em *Arabidopsis thaliana* mostrou que resíduos alternados de xilopiranosil são acetilados (BUSSE-WICHER et al., 2014). Os grupos acetil são esterificados na posição 2-O e/ou 3-O dos resíduos xilopiranosil e estão presentes em ambas mono- e dicotiledôneas, especialmente nas partes lignificadas da planta.

A lignina é um heteropolímero amorfo, não solúvel em água, que consiste de unidades de fenilpropano unidas entre si por diferentes tipos de ligações (PÉREZ, 2002). O polímero é sintetizado a partir da combinação da oxidação de alcoóis *p*-hidroxicinamil monolignóis, especialmente alcoóis *p*-hidroxicinamil, coniferil e sinapil (RALPH et al., 2004). Vestígios de hidroxicinamil aldeídos, acetatos, *p*-cumaratos, *p*-hidroxibenzoatos, e tiramina ferulatos também foram observados (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Figura 1. Diagrama esquemático do xilano. As setas indicam a posição das referidas ligações dos possíveis substituintes no esqueleto do xilano. Adaptado de TAYLOR et al., 2006.

1.2. Enzimas envolvidas na degradação da biomassa

Devido à natureza diversa da parede celular vegetal, uma ampla variedade de atividades enzimáticas é necessária para sua despolimerização. A celulose é o material mais recalcitrante dentro das paredes celulares das plantas. O esquema clássico de degradação da celulose inclui as endo-1,4-beta-glucanases (por exemplo, as glicosídeo hidrolases da família 5 - GH5) que clivam as ligações internas da cadeia de celulose (CANTAREL et al., 2009), as exo-1,4-beta-glucanases ou celobiohidrolases (GH7 e GH6) que liberam moléculas de celobiose a partir de qualquer das extremidades: redutoras ou não redutoras de uma cadeia de celulose, as β -glicosidases (GH3) que hidrolisam a celobiose em duas moléculas de glicose, entre outras enzimas pertencentes também a outras famílias (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

As enzimas necessárias à degradação da hemicelulose podem ser divididas em dois grupos de acordo com suas funções. Um grupo é composto pelas principais enzimas que clivam a cadeia principal de xilano, tais como as endo-beta-1,4-xilanases (GH10, GH11) e β - xilosidases (GH43 e GH3); o outro grupo abrange as enzimas acessórias, tais como α -L-arabinofuranosidases (GH3, GH10, GH43, GH51,

GH54, e GH62), acetil-xilanos esterases (CE1-CE7) e ácido ferúlico esterases (CE1), α -glucuronidasas (GH67), que removem as cadeias laterais e quebram ligações cruzadas entre xilano e outros polímeros, aumentando a acessibilidade das principais enzimas à cadeia principal de xilano e, subsequentemente, proporcionando a hidrólise de fibras de celulose (Figura 2) (GLASS et al., 2013; WILLIAMSON; FAULDS; KROON, 1998).

Figura 2. Principais enzimas envolvidas na hidrólise do xilano. As atividades enzimáticas envolvidas na degradação do polímero são demonstradas e exemplificadas com as principais famílias de enzimas. Adaptado de GLASS et al., 2013.

1.2.1. Acetil-xilano esterases

Acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72) são enzimas que hidrolisam especificamente as ligações éster dos grupos O-acetil ligados aos polímeros de resíduos xilopiranosil e xilo-oligossacarídeos como acetilglucuronoxilano gerados pela ação de endoxilanasas (BIELY, 2012; BIELY et al., 2013a). A ação dessas enzimas na cadeia principal de xilano leva à criação de sítios mais propensos à ação das endoxilanasas; a presença de acetil-xilano esterases aumenta a velocidade da

despolimerização do acetil-xilano pelas endoxilanases (BIELY et al., 1986, 2013a; KORMELINK; VORAGEN, 1993).

Essas enzimas pertencem à família das Carboidrato esterases (CEs). Enzimas pertencentes à família CE mostram uma grande diversidade na especificidade e estrutura de seus substratos, o que faz com que sejam classificadas em 16 diferentes famílias CE no banco de dados CAZy (CANTAREL et al., 2009). Em termos de especificidade pelo substrato, as 16 famílias CE são representadas por acetil-xilano esterases, acetil esterases, quitina desacetilases, peptidoglicano desacetilases, feruloil esterases, pectina acetil esterases, pectina metilesterases, glucoronil esterases, entre outras. Até agora, as acetil-xilano esterases foram encontradas em quatro famílias CE (1, 4, 5 e 6) definidas no banco de dados CAZy. A acetil-xilano esterase de *Clostridium thermocellum* pertence à Família 4 das Carboidrato esterases (CE4) (BIELY et al., 2007), que inclui, além de membros com atividade O-desacetilase, tal como a acetil-xilano esterase de *C. thermocellum*, também enzimas quitina-desacetilases, peptidoglicano N-acetilglucosamina desacetilases, xilanases, entre outras (COUTINHO E HENRISSAT, 1999).

A acetil-xilano esterase de *C. thermocellum* é derivada da xilanase Xyn11A (FERNANDES et al., 1999) que compreende, na porção N-terminal, um domínio endoxilanase (família GH11 glicosídeo hidrolase) seguida por um domínio de ligação a carboidratos (família CBM6), um domínio *dockerin*, que dirige a enzima para o celulosoma (TAYLOR et al., 2006).

A maioria das acetil-xilano esterases descritas, apresentam uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser-His-Asp (GHOSH et al., 2001; TAYLOR et al., 2006), no entanto, as enzimas agrupadas na família CE4 têm sido reportadas com a tríade catalítica His-His-Asp, bem como sendo enzimas metal-dependentes (BLAIR; VAN AALTEN, 2004; BLAIR et al., 2005; TAYLOR et al., 2006). No caso da acetil-xilano esterase de *C. thermocellum*, a enzima mostra uma coordenação distinta ao íon metálico, utilizando um aspartato, uma histidina e quatro moléculas de água, diferente da tríade His-His-Asp, a mais clássica observada na família CE4, além de preferência por Co^{2+} (TAYLOR et al., 2006).

1.2.2. Feruloil esterases

Feruloil esterases (EC 3.1.1.73), também conhecidas como ácido ferúlico esterases são uma subclasse das esterases de ácido carboxílico (EC 3.1.1.1), que são capazes de hidrolisar as ligações éster entre ácido ferúlico e polissacarídeos presentes na parede celular de plantas (GONG et al., 2013). O ácido ferúlico é esterificado no C5-hidroxil da α -L-arabinose do xilano (GRABBER et al., 1998) e as feruloil esterases desempenham um papel vital na deslignificação e despolimerização de cadeias de polissacarídeos, uma vez que a ligação éster de ácido ferúlico dificulta substancialmente o acesso de outras enzimas à biomassa (WONG et al., 2013).

A feruloil esterase (FAE) de *Clostridium thermocellum* está localizada no celossoma desse organismo. Esse complexo multiprotéico possui múltiplas funções, incluindo atividades de xilanase, mananase, quitinase, acetil-xilano esterase, pectato liase e β -glicosidase (BLUM et al., 2000). Os domínios de feruloil esterase são componentes das xilanases multimodulares 10A e 10B (Xyn10A e Xyn10B) e são exemplos típicos de enzimas bifuncionais, que compreendem dois módulos catalíticos separados; um hidrolisa as ligações glicosídicas do esqueleto xilano e o outro, feruloil esterase hidrolisa a ligação éster entre cadeias laterais de arabinose e ácido ferúlico (BLUM et al., 2000; PRATES et al., 2001b).

1.3. Modelo sequencial de hidrólise de biomassa

Um modelo de hidrólise da parede celular das folhas e do colmo de cana-de-açúcar foi proposto por Souza (2013), levando em conta que existe uma variedade de ligações nas paredes celulares de cana que precisam ser quebradas para produzir açúcares para fermentação e produção de bioetanol.

Pré-tratamentos da parede celular que utilizam água e/ou substâncias químicas a fim de tornar o esqueleto e cadeias laterais destes polissacarídeos suscetíveis à hidrólise por exo- e endoenzimas podem levar a perdas significativas de polissacarídeos, diminuindo o rendimento de açúcares disponíveis para posterior fermentação (BOHN; FALES, 1991). Por exemplo, tratamentos com ácidos

concentrados podem causar severa degradação da celulose, por isso esses pré-tratamentos são menos atrativos (ALVIRA et al., 2010). Pré-tratamento com CO₂ supercrítico (SC-CO₂) aumenta a área de superfície acessível dos materiais lignocelulósicos, no entanto, CO₂ pode formar ácido carbônico na presença de umidade, o que pode favorecer a hidrólise dos polímeros (SUN et al., 2016). Na explosão por vapor hemiceluloses e lignina são decompostas e removidas do material lignocelulósico (PAN et al., 2006), mas inibidores como alguns compostos aromáticos podem ser formados sob as condições desse pré-tratamento e dificultar processos de fermentação posteriores (SUN et al., 2016).

Segundo Souza (2013), na ausência de um pré-tratamento geral que iria quebrar diversas ligações de éster (acetil ésteres e ésteres fenólicos), a parede celular intacta teria que ser tratada primeiramente com pectinases (endopoligalacturonase, pectina-metil-esterase, α -arabinofuranosidase, e β -galactosidase), juntamente com liquenase. A fim de libertar totalmente as pectinas, feruloil esterase pode ser necessária. O restante da arquitetura da parede, que consiste principalmente de celulose, interligada com arabinoxilanos e xiloglucanos seria então, tratada com feruloil e acetil-esterases a fim de romper as pontes entre ácido ferúlico e hemiceluloses e para remover os grupos acetil que podem interferir com a clivagem enzimática dos polissacarídeos. Neste modelo, celulose restante se torna disponível para o ataque enzimático por endo- β -glucanase, celobiohidrolases e β -glucosidases (Figura 3).

Figura 3. Modelo hipotético de ataque sequencial de enzimas hidrolíticas da parede celular das folhas e colmo de cana-de-açúcar. A parede é mostrada em um corte transversal. Os pontos pretos representam microfibrilas de celulose que se aglutinam para formar uma macrofibrila. Xiloglucanos são representados pelos círculos cinza escuros. Em cinza claro, está representado o arabinoxilano. Adaptado de SOUZA *et al.* 2013.

1.4. Produção de enzimas multidomínios

A engenharia de enzimas multidomínios, que são capazes de catalisar duas ou mais reações, têm sido uma estratégia potencial para reduzir os custos de enzimas nos processos industriais, bem como simplificar as operações de produção e de purificação das enzimas recombinantes. Além disso, quando as enzimas são fundidas, a proximidade física entre os domínios catalíticos pode aumentar a velocidade das reações, e frequentemente essas enzimas têm um melhor desempenho em comparação com as atividades das enzimas parentais (FONSECA-MALDONADO *et al.*, 2014; FURTADO; RIBEIRO; LOURENZONI, 2013; FURTADO *et al.*, 2013b; RIBEIRO *et al.*, 2011a). Um aspecto fundamental para a construção de quimeras é a preservação ou melhoria das características catalíticas em relação às proteínas parentais (ADLAKHA *et al.*, 2011).

Com o passar dos anos, genes que codificam proteínas com funções relacionadas frequentemente têm sido submetidos à fusão, gerando enzimas multifuncionais (DOI; KOSUGI, 2004). Nesse contexto, a criação de enzimas bifuncionais que atuam em materiais lignocelulósicos tem demonstrado ser uma opção prática para a melhoria de diversos processos envolvidos (FAN; YUAN, 2010; FAN et al., 2009; FONSECA-MALDONADO et al., 2014; FURTADO; RIBEIRO; LOURENZONI, 2013; FURTADO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2011a; XUE et al., 2009).

A criação de enzimas multifuncionais tem sido feita através de múltiplas estratégias, buscando obter enzimas funcionais e com vantagens catalíticas quando comparadas aos domínios individuais. O desenho racional busca por sítios superficiais em uma enzima que sejam mais favoráveis para a inserção de outra enzima, a fim de obter uma quimera com o mínimo de perturbação das estruturas parentais, bem como evitar impedimento estérico ou orientações não-favoráveis dos sítios ativos (FURTADO et al., 2013a; RIBEIRO et al., 2011b). Fusões *end-to-end* unem as extremidades C-terminal de uma enzima ao N-terminal de outra (KIM; LEE; KIM, 2000), no entanto, esse tipo de estratégia muitas vezes resulta em quimeras não-funcionais, devido a incapacidade de interação direta entre os domínios e dobramento incorreto (HUA et al., 2004). A inserção de um *linker* peptídico que crie uma conformação estendida dando mais flexibilidade a estrutura, geralmente ajuda a reter as propriedades das enzimas parentais, contornando esse problema (FAN et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Construção e caracterização de uma quimera bifuncional acetil-xilano esterase (Axe) e feruloil esterase (Fae) ativa na degradação de biomassa lignocelulósica.

2.2. Objetivos específicos

- Desenho racional da quimera bifuncional FaeAxe e construção da enzima via *overlap* PCR;
- Clonagem e expressão das enzimas parentais e da quimera FaeAxe;
- Busca por substratos adequados às enzimas;
- Avaliação da atividade enzimática das enzimas parentais e da quimera em substrato extraído de bagaço de cana-de-açúcar e em substrato comercial.

3. METODOLOGIA

3.1. Clonagem das enzimas parentais

3.1.1. Clonagem da acetil-xilano esterase de *C. thermocellum*

3.1.1.1. Estratégia de clonagem e síntese do domínio Axe

A sequência de nucleotídeos que codifica o domínio CE4 da Xilanase 11A (designado Axe) foi submetida a uma análise de sítios de restrição pelo programa NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), disponível online, e optou-se pela inserção de Axe no vetor pET28a entre os sítios de restrição *Nde*I e *Not*I com cauda de Histidina N-terminal. O domínio Axe foi sintetizado pela empresa Gen Script com otimização de códons raros para *Escherichia coli* (Figura 4). O gene sintetizado teve inserção das sequências de restrição para *Nde*I e *Not*I, apresenta 638pb e foi fornecido pela empresa no vetor pUC57 (Figura 5).

```
CATATGCCGAACGCTAAACTGGTGGCTCTGACCTTTGATGACGGCCCGGATAATGTGCTGACCGCTCGTGTGCTGGATAAA  
CTGGATAAATACAACGTGAAAGCGACCTTTATGGTGGTTGCCAGCGTGTTAATGATTGACGGCGGCCATTATCCGTCGC  
ATGGTGAACAGCGGCCATGAAATCGGTAATCACAGCTGGTCTTATAGTGGCATGGCCAACATGTCCCCGGATCAGATCCGT  
AAATCAATTGCCGACACCAATGCAGTTATTCAAAAATACGCAGGTACCACGCCGAAATTTTCCGTCCGCCGAACCTGGAAA  
CCTCTCCGACGCTGTTTAAACAATGTCGATCTGGTCTTCGTGGGCGGTCTGACCGCTAACGACTGGATTCCGTCCACCACCG  
CCGAACAGCGTGCAGCTGCGGTTATTAATGGCGTCCGCGATGGTACCATTATCCTGCTGCATGATGTCCAACCGGAACCG  
CACCCGACCCCGGAAGCCCTGGATATTATCATTCCGACGCTGAAAAGCCGCGGTTATGAATTTGTACCCTGACGGAACGTG  
TTCACCCTGAAAGGTGTCCCGATTGACCCGAGCGTGAAACGTATGTATAACTCTGTTCCGTAAGCGGCCGC
```

Figura 4. Sequência do domínio Axe sintético. A sequência mostrada corresponde ao domínio já com códons otimizados para *E. coli*. CATATG – Sítio de restrição de *Nde*I, GCGGCCGC – Sítio de restrição de *Not*I, TAA – Códon de parada.

Figura 5. Mapa da construção plasmidial pUC57/Axe. O domínio Axe foi clonado em pUC57 por EcoRV. A sequência em azul indica bases de proteção adicionadas pelo Genscript.

O vetor pET28a (Figura 6) possui 5369pb, utiliza o promotor do bacteriófago T7 RNA polimerase, induzível por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e marcador de resistência a canamicina. Além disso, apresenta uma sequência nucleotídica na região 5' ou 3' do sítio múltiplo de clonagem que codifica seis histidinas, chamada *His.Tag*, o que permite a fusão de uma cauda de histidinas na região N- ou C- terminal da proteína heteróloga. Isso facilita a purificação de proteínas recombinantes de fusão a essa *His.Tag* por cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC).

3.1.1.3. Purificação de DNA plasmidial

Após a transformação e plaqueamento da cultura em meio LB sólido contendo ampicilina, uma colônia sobrevivente foi selecionada e inoculada em 5 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e cultivada a 37°C, sob agitação de 180 rpm, por 18h. Os plasmídios foram recuperados através de extração plasmidial utilizando o Kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen - Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. Esse procedimento tem como fundamento a desestabilização da parede celular bacteriana, lise da membrana plasmática, desnaturação de proteínas e a precipitação diferencial do DNA. O DNA cromossomal é desnaturado, enquanto o DNA plasmidial circular (que tem um tamanho menor) permanece inalterado e em solução. A purificação do DNA plasmidial ocorre por afinidade através de uma membrana de sílica presente em uma coluna. A quantidade do DNA foi estimada por meio de espectrofotometria utilizando o Nanodrop 2000c (Thermo Scientific – Waltham, EUA), no comprimento de onda de 260nm.

3.1.1.4. Digestão da construção pUC57/Axe e do vetor pET28a

Para a subclonagem de Axe em pET28a, foi realizada a digestão da construção pUC57/Axe para a liberação do inserto e ligação desse fragmento ao vetor pET28a. Cerca de 1 µg da construção pUC57/Axe foi incubada com 2,5U de *NdeI* (Biolabs - Ipswich, EUA) e 2,5U de *NotI* (Biolabs - Ipswich, EUA), tampão 1X (Tampão 3: 50mM Tris-HCl pH 7.9, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) e 0,1mg/mL de BSA (albumina sérica bovina) em um volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37°C por 1,5 horas. Da mesma maneira, o vetor pET28a foi digerido. Para a confirmação da digestão, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1%.

3.1.1.5. Eletroforese em gel de agarose

Juntamente com marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega – Madison, EUA), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-acetato 0,04 mol/L, EDTA 0,001 mol/L pH 8,0) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), a 90V, por 45 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio para visualização em aparelho transiluminador UV.

3.1.1.6. Purificação do DNA a partir de bandas no gel

Após a confirmação das digestões pelo aparecimento de bandas de tamanho esperado no gel de agarose, os fragmentos de interesse, o vetor pET28a linearizado (5369pb) e o inserto liberado da construção pUC57/Axe (638pb) foram puncionados do gel e purificados utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega - Madison, EUA) seguindo as indicações do fabricante. Nesse procedimento, o DNA é adsorvido em uma membrana de sílica enquanto as impurezas são eficientemente lavadas com tampões adequados. Os DNAs foram eluídos com água livre de RNase e quantificados no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific – Waltham, EUA).

3.1.1.7. Subclonagem do domínio Axe em vetor de expressão bacteriano pET28a

Para a subclonagem, inserto e vetor de expressão linearizado foram incubados com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen – Carlsbad, EUA) em uma razão inserto/vetor de 3:1 em tampão de ligação 1X (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT) em um volume final de 20µL. A reação foi incubada a 22°C por 1 hora. O produto de ligação foi introduzido em *E. coli* DH5α eletrocompetentes, por eletroporação, como já descrito no item 3.1.1.2. As colônias sobreviventes em meio sólido suplementado com canamicina (40 µg/mL) foram

submetidas a uma PCR de colônia para confirmação da presença do vetor com inserto.

3.1.1.8. **Screening dos transformantes**

A busca por transformantes positivos foi feita através da técnica de PCR de colônia. A PCR de colônia procede como uma reação de PCR convencional, exceto por usar como molde o DNA total presente nas colônias bacterianas isoladas após transformação. A reação é iniciada por um processo de ruptura celular inicial a 95°C, que libera o DNA celular, incluindo o plasmídeo nelas inserido, seguido pela desnaturação do DNA, e etapas de anelamento dos iniciadores e extensão do fragmento pela DNA polimerase. As PCRs de colônia foram feitas em volume final de 20µL contendo 0,5 µM dos iniciadores direto e reverso (T7 promoter e T7 terminator, ver Tabela 1) 0,5 mM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), 2,5U da enzima *Pfu* DNA polimerase (Thermo Cientific – Waltham, EUA) em tampão 1X da reação (200mM Tris-HCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1mg/mL BSA, 1% Triton X-100, 20mM MgSO₄, pH 8.8). Em cada tubo foram adicionadas colônias isoladas diferentes. As reações foram conduzidas em termociclador *MyCycler Thermal Cycler* (Bio-Rad – Hercules, EUA). A reação de PCR teve um ciclo inicial de ruptura celular e desnaturação da dupla fita de DNA a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos para anelamento dos iniciadores à sequência de DNA molde e extensão da fita dupla (95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos), 1 ciclo final de extensão por 5 minutos a 72°C. O DNA plasmidial dos clones positivos foi purificado com o Kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen – Hilden, Alemanha) e os clones foram sequenciados.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na PCR de colônia

Iniciadores	Sequências (5' - 3')
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

3.1.1.9. Sequenciamento de DNA

Após a purificação do DNA plasmidial, realizou-se o sequenciamento de nucleotídeos a fim de garantir a correta inserção de Axe no plasmídeo pET28a, bem como verificar a ausência de mutações ou deleções. O sequenciamento foi feito de acordo com o kit *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystem – Foster City, EUA). Para cada amostra foi preparada uma reação com 300 ng de DNA, 0,25 µM de iniciadores, 8 µL de tampão de sequenciamento 2,5X (Tris 200 mM, MgCl₂ 5mM, pH 9,0) e 1 µL da solução Mix Big Die (deoxinucleosídeos trifosfatos: dATP, dCTP, dITP e dUTP: terminador A-Dye marcado com dicloro[R6G], terminador C-Dye marcado com dicloro[ROX], terminador G-Dye marcado com dicloro [R110], terminador T-Dye marcado com dicloro [TAMRA], AmpliTaq DNA polimerase com pirofosfatase termoestável), em um volume final de reação de 20 µL. Os iniciadores escolhidos foram T7 *promoter* e T7 *terminator*, complementares a regiões específicas do vetor pET28a.

A reação foi incubada em termociclador *MyCycler* (Bio-Rad – Hercules, EUA), nas seguintes condições de termociclagem: 2 minutos a 96°C, 40 ciclos de (30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C). As amostras foram precipitadas, ressuspendidas em tampão e aplicadas em gel de sequenciamento padrão. A corrida foi monitorada em aparelho sequenciador automático ABI 3500xL (Thermo Scientific – Waltham, EUA). As sequências obtidas no sequenciamento foram comparadas com a sequência de DNA de Axe fornecida pela empresa que sintetizou o gene através do software SeqScanner v1.0 (Applied Biosystems – Foster City, EUA), disponível para download em (<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html>).

3.1.2. Clonagem da feruloil esterase de *C. thermocellum* e da xilanase GH11 de *Bacillus subtilis*

Os clones das enzimas feruloil esterase de *Clostridium thermocellum* (Fae) e da endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis* já se encontravam disponíveis no laboratório e foram usados para continuidade deste trabalho. A Tabela 2 resume as principais características dos clones: vetor de expressão bacteriano no qual está clonado, tamanho do fragmento, local de inserção no vetor (sítios de restrição).

Tabela 2. Características dos clones das enzimas parentais

Enzima	Feruloil esterase	Endoxilanase
Vetor	pET28a	pET28a
Sítio de restrição N-terminal	<i>SalI</i>	<i>NheI</i>
Sítio de restrição C-terminal	<i>XhoI</i>	<i>BamHI</i>
Calda de Histidina	C-terminal	N-terminal
Número de nucleotídeos	825	555
Referência	(ARRUDA, 2015)	(RIBEIRO et al., 2011b)

3.2. Expressão das enzimas parentais

Os clones contendo os insertos correspondentes aos domínios catalíticos individuais (acetil-xilano esterase, feruloil esterase e xilanase) foram expressos em *E. coli* Rosetta DE3 a 37°C em meio de cultura LB suplementado com antibióticos, na presença do indutor isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). O IPTG foi adicionado após as culturas atingirem densidade óptica (600nm) de 0,6. As variáveis para cada enzima são mostradas na Tabela 3. Alíquotas em tempos crescentes de expressão foram retiradas para a análise em gel de poliácridamida desnaturante. Tampão de amostra (60mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% glicerol, 2% β -Mercaptoetanol, 2% SDS, 0,5% de azul de bromofenol) foi adicionado às amostras, que foram fervidas por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 5% (gel de empacotamento) e 12% (gel de resolução) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Tabela 3. Expressão das enzimas parentais

Enzima	Feruloil esterase	Xilanase	Acetil-xilano esterase
Peso molecular (kDa)	33,72	22,97	24,99
Meio de cultura	LB	LB	LB
Antibióticos	Can*/Clo**	Can*/Clo**	Can*/Clo**
DO para indução (nm)	0,4 - 0,6	0,4 - 0,6	0,4 - 0,6
Concentração de IPTG (mM)	0,5	0,5	0,5
Tempo de expressão (horas)	4	4	15
Condições da expressão	37°C, 180 rpm	37°C, 180 rpm	37°C, 180 rpm
*Canamicina (40 µg/mL) **Cloranfenicol (36 µg/mL)			

3.3. Purificação das enzimas parentais

A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC, do inglês, *Immobilized-metal Affinity Chromatography*) utilizando a resina *HisLink™ Protein Purification* (Promega – Madison, EUA). As culturas induzidas segundo o item 3.2 foram centrifugadas a 6.000 rpm por 30 minutos a 4°C e as células coletadas foram ressuspensas em 10 mL de tampão de lise (20 mM HEPES pH 7.4; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol; 1 mM PMSF e 1% Triton X-100). As amostras foram sonicadas em ciclos de 10 segundos a uma potência de 50% com intervalos de 10 segundos a cada pulso em sonicador *Sonic Dismembrator* (Thermo Scientific – Waltham, EUA). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes foram submetidos à cromatografia de afinidade por níquel. As purificações procederam por lavagens com concentrações crescentes de imidazol: tampão de lavagem 1 (20 mM HEPES pH 7.4; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol); tampão de lavagem 2 (20 mM HEPES pH 7.4; 500 mM NaCl; 40 mM imidazol) e, quando necessário, tampão de lavagem 3 (20 mM HEPES pH 7.4; 500 mM NaCl; 80 mM imidazol). Finalmente as proteínas foram eluídas com tampão de eluição (20 mM HEPES pH 7.4; 500 mM NaCl; 300 mM imidazol). Todas as frações foram coletadas e as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para análise.

3.4. Construção da quimera FaeAxe

3.4.1. Definição das enzimas para a construção da quimera bifuncional FaeAxe

Selecionou-se enzimas parentais que apresentassem maior compatibilidade para ter funções catalíticas quando unidas. Foram comparados: pH ótimo, temperatura ótima de atividade, inibidores, cofatores (essenciais para manter as atividades enzimáticas na quimera). A busca por domínios compatíveis foi feita a partir das enzimas depositadas no banco de dados BRENDA (**BR**aunschweig **EN**zyme **D**atabase – <http://www.brenda-enzymes.org>). As enzimas com maior probabilidade de compatibilidade escolhidas foram uma feruloil esterase de *Clostridium thermocellum*, a qual tem estrutura tridimensional já resolvida disponível (PDB: 1GKK) (PRATES et al., 2001a), fato que facilitou a criação de um modelo através de modelagem computacional para desenho racional da quimera; e uma acetil-xilano esterase também de *C. thermocellum* (PDB: 2C71) (TAYLOR et al., 2006). A Tabela 4 resume as principais características levadas em consideração para a escolha das enzimas:

Tabela 4. Características das enzimas parentais para construção de FaeAxe

Enzima	Número		Temperatura		Cofatores	Inibidores
	EC	pH ótimo	ótima			
Feruloil esterase	3.1.1.73	4 – 6	50 - 60 °C	-	-	
Acetil-xilano esterase	3.1.1.72	5,5	40°C	Co ²⁺	EDTA	

3.4.2. Desenho racional e modelagem da estrutura tridimensional de FaeAxe

As estruturas tridimensionais das enzimas parentais foram obtidas no *Protein Data Bank* – PDB e analisadas utilizando o programa *Swiss PDB Viewer* (GUEx; PEITSCH, 1997) e *PyMOL* (*The PyMOL Molecular Graphics System*, Versão 1.8, Schrödinger, LLC) (Figura 7).

O ponto de união entre as duas enzimas foi definido de forma a obter-se uma estrutura com a menor perturbação da conformação nativa e preservar os sítios ativos livres de impedimento estérico. São excluídas alças próximas ao sítio catalítico e aos sítios de outros ligantes/cofatores. Devem ser evitadas alças muito longas, evitando mobilidade elevada na proteína quimérica, e possíveis sobreposições de sítios catalíticos. Desse modo, optou-se por inserir o domínio acetil-xilano esterase, através de seus aminoácidos N- e C- terminais, em uma alça da enzima feruloil esterase, entre os aminoácidos Prolina 853 e Asparagina 854. Depois de definido o ponto de união das enzimas, a predição estrutural da quimera foi feita através do programa de modelagem computacional *Modeller* (SALI; BLUNDELL, 1993).

Figura 7. Estrutura das enzimas parentais visualizadas no software *PyMOL*. **A**, estrutura da feruloil esterase com aminoácidos do sítio catalítico marcado (Ser954, Asp1018, His1058) e ponto de união com a enzima acetil-xilano esterase marcado (Pro853 e Asn854). **B**, estrutura da acetil-xilano esterase com aminoácidos do sítio ativo marcados (Asp487, Asp488, His539, Tyr543, Asn580) e ponto de inserção na enzima feruloil esterase, nesse caso, as extremidades C- e N-terminal (Lys480 e Leu684). Nota-se a distância entre os pontos de união entre as enzimas e os seus respectivos sítios catalíticos.

3.4.3. Avaliação do modelo de FaeAxe por *Ramachandran Plot*

A estrutura da quimera FaeAxe gerada por desenho racional foi submetida a uma análise por meio do gráfico de Ramachandran de seu esqueleto carbônico, através do programa *PDBsum* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>), disponível online. Os ângulos ϕ (ângulo entre $C\alpha - N$) e ψ ($C\alpha - C$) do modelo foram determinados e seus valores representados em um gráfico de Ramachandran contra valores de ϕ e ψ permitidos.

3.4.4. Construção da quimera FaeAxe por *overlap PCR*

Depois de definidos os pontos de união das duas enzimas através do desenho racional, a sequência de DNA gerada foi submetida a uma análise de sítios de restrição presentes na sequência pelo programa *NEBcutter V2.0* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) disponível online, e optou-se pela inserção de FaeAxe no vetor pET28a entre os sítios de restrição *NcoI* e *XhoI* com cauda de Histidina C-terminal.

A quimera bifuncional FaeAxe foi construída utilizando-se a técnica de *overlap PCR* (BRYKSIN; MATSUMURA, 2010; HECKMAN; PEASE, 2007; SHEVCHUK et al., 2004). A metodologia da *overlap PCR* consiste em uma rodada de PCRs iniciais para gerar segmentos de DNA sobreponíveis, que são então utilizados como molde de DNA em outra PCR para gerar um segmento de DNA completo. Para a primeira rodada de amplificações, *primers* quiméricos (contendo sequências de DNA comuns aos fragmentos a serem fusionados nas suas extremidades 5' e 3') são utilizados para amplificar os fragmentos de DNA a serem fusionados. Esses fragmentos que contêm extremidades em comum são então utilizados como *mega-primers* em uma segunda reação de PCR, a *overlap PCR* propriamente dita, onde essas extremidades comuns se anelam e por intermédio da enzima DNA polimerase, os segmentos de DNA são fusionados, gerando o fragmento completo. O esquema do processo da *overlap PCR* utilizado para construção da quimera FaeAxe está representado na Figura 8. Dessa maneira, este protocolo consistiu de uma primeira etapa, em que foram amplificados os fragmentos de DNA que compõem a quimera e

de uma segunda etapa, a *overlap PCR*, na qual os fragmentos foram submetidos a uma segunda reação de PCR para gerar o fragmento completo.

Figura 8. Esquema da *overlap PCR* na construção da quimera FaeAxe. As fitas representam segmentos de DNA com extremidades comuns gerados por amplificação (acima) e depois de fusionados via *overlap PCR* (abaixo). Em vermelho, fragmentos correspondentes a enzima feruloil esterase e em verde correspondente a acetil-xilano esterase. As setas F1, F2, F3, R1, R2 e R3 representam o local de anelamento dos iniciadores correspondentes. Em azul, o local dos sítios de restrição presente nos iniciadores F1 e R3.

3.4.4.1. Amplificação dos fragmentos

Foram desenhados iniciadores quiméricos específicos para amplificação por PCR de cada segmento de DNA [Fae(1), Axe e Fae(2), mostrados na Figura 8]. A Tabela 5 apresenta os iniciadores utilizados nessas amplificações, incluindo os sítios de restrição acima descritos (sequências sublinhadas).

Tabela 5. Iniciadores utilizados na amplificação dos segmentos da quimera

Iniciadores	Sequências (5' - 3')
QuimFA F1	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAATCTTTTAAATATGAGTCG
QuimFA R1	GGTCAGAGCCACCAGTTTCGGATCATAACCGTATGG
QuimFA F2	CCATACGGTTATGATCCGAACTGGTGGCTCTGACC
QuimFA R2	AATGTTATATTTTTTGTTCGGAACAGAGTTATACAT
QuimFA F3	ATGTATAACTCTGTTCCGAACAAAAATATAACATT
QuimFA R3	ATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTCATGGAAGAAATATGG

O par de *primers* F1 e R1 foi usado para amplificar o fragmento 1 [Fae(1)], de 203 pares de bases, que corresponde à região N-terminal da enzima feruloil esterase. O par F2 e R2 foi usado para amplificar o fragmento 2 (Axe), de 648 pares de bases, e corresponde à enzima acetil-xilano esterase. O par F3 e R3, amplificou o fragmento 3 [Fae(2)], de 714 pares de bases, referente à região C-terminal de feruloil esterase.

As reações de PCR foram feitas em volume final de 20µL contendo 0,5 µM dos iniciadores direto e reverso (respeitando os pares), 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), 20 ng de DNA molde (clones das enzimas parentais em pET28a), 1U da enzima *Phusion High-Fidelity* DNA polimerase (Thermo Scientific – Waltham, EUA) em tampão HF 1X (200mM TAPS-HCl, 50 mM KCl, 1mM mercaptoetanol, 2mM MgCl₂, pH 9.3). As reações de PCR tiveram um ciclo inicial de 98°C por 30 segundos; 30 ciclos para anelamento dos iniciadores à sequência de DNA molde e extensão da fita dupla (98°C por 10 segundos, 65° por 15 segundos e 72°C por 1 minuto), 1 ciclo final de extensão por 10 minutos a 72°C. Para a confirmação das amplificações realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1%, as bandas de interesse foram puncionadas do gel e o DNA purificado utilizando o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega – Madison, EUA).

3.4.4.2. **Overlap PCR**

A *overlap PCR* foi feita com os três fragmentos como molde de DNA em proporções equimolares (1:1:1) e com os iniciadores das extremidades da quimera (F1 e R3). A reação de PCR foi feita em volume final de 50 µL contendo 0,5 µM dos iniciadores direto e reverso (F1 e R3), 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), DNA molde (103 ng do fragmento 1, 328 ng do fragmento 2 e 362 ng do fragmento 3), 1U da enzima *Phusion High-Fidelity* DNA polimerase (Thermo Scientific – Waltham, EUA) em tampão HF 1X (200 mM TAPS-HCl, 50 mM KCl, 1 mM mercaptoetanol, 2 mM MgCl₂, pH 9.3). A reação teve um ciclo inicial de 98°C por 30 segundos; 30 ciclos para anelamento dos iniciadores à sequência de DNA molde e extensão da fita dupla (98°C por 10 segundos, 55° por 15 segundos e 72°C por 1 minuto), 1 ciclo final de extensão por 10 minutos a 72°C. A amplificação do fragmento foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 1%. E o restante da reação de *overlap PCR* foi submetido a purificação utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega – Madison, EUA) e quantificados no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific – Waltham, EUA).

3.4.5. **Digestão do gene da quimera FaeAxe e do vetor pET28a**

Para a clonagem da quimera FaeAxe em vetor pET28a, foi realizada a digestão do fragmento gerado por *overlap PCR* com as enzimas *NcoI* e *XhoI* (Biolabs – Ipswich, EUA)). Cerca de 2 µg do fragmento foram incubadas com 5U de *NcoI* e 5U de *XhoI*, em tampão CutSmart 1X (Biolabs – Ipswich, EUA) (50 mM acetato de potássio pH 7.9, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 0.1mg/mL de BSA) em um volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37°C por 1,5 horas. Da mesma maneira, o vetor pET28a foi digerido. Para a confirmação da digestão do vetor, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1%. O fragmento correspondente ao vetor pET28a foi puncionado do gel e purificado pelo Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega – Madison, EUA). A digestão do fragmento gerado por *overlap PCR* foi purificada pelo Kit *DNA Clean e Concentrator™-5* (Zymo Research – Irvine, EUA). O vetor pET28a linearizado e o

fragmento gerado por *overlap PCR* digerido foram quantificados no NanoDrop 2000c (Thermo Scientific – Waltham, EUA).

3.4.6. Clonagem do fragmento FaeAxe no vetor pET28a

O inserto e vetor de expressão linearizado foram incubados com 1,5 U da enzima T4 DNA Ligase (Biolabs – Ipswich, EUA) em uma razão inserto/vetor de 3:1 em tampão de ligação 1X (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT) em um volume final de 20µL. A reação foi incubada a 22°C por 1 hora e então transformada em bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes. A eletroporação ocorreu da mesma forma como descrito no item 3.1.1.2, exceto que o antibiótico para seleção utilizado foi canamicina (40µg/mL). Como descrito no item 3.1.1.8, foi realizado um *screening* para identificação de clones positivos e posterior sequenciamento dos clones identificados (item 3.1.1.9).

3.4.7. Expressão da quimera FaeAxe em vetor pET28a

Um clone contendo o inserto correspondente a quimera FaeAxe foi expresso em *E. coli* Rosetta DE3 em meio de cultura LB na presença do indutor isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). O IPTG foi adicionado após as culturas atingirem densidade óptica (600nm) de 0,6. Diferentes testes de expressão foram feitos: indução na presença de 0,1, 0,5 e 1mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo), a 37°C por 4h; e indução na presença de 0,1 mM de IPTG a 18°C por 16h. Alíquotas em tempos crescentes foram retiradas para a análise em gel de poliacrilamida desnaturante. Após o tempo final da expressão, as células foram coletadas, sonificadas e centrifugadas conforme item 3.3. Após sonicação, o pellet foi separado do sobrenadante para monitoramento da solubilidade da proteína por SDS-PAGE

3.5. Clonagem da quimera FaeAxe em vetor pETSUMO

O vetor pETSUMO possui 5.6 Kb, utiliza o promotor do bacteriófago T7 RNA polimerase, induzível por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e marcador de resistência a canamicina, além de uma *His.Tag* na extremidade N-terminal da proteína SUMO (Figura 9). SUMO (**S**mall **U**biquitin-like **M**odifier) é uma proteína de 13 kDa isolada de *Saccharomyces cerevisiae* que, quando fusionada a proteínas heterólogas, pode aumentar a expressão e solubilidade das proteínas recombinantes. A estrutura terciária da proteína SUMO é especificamente reconhecida e clivada por uma protease conhecida como ULP1 (*Ubiquitin-like-specific protease 1*), também isolada de *Saccharomyces cerevisiae*, dessa maneira, quando SUMO é fundida ao N-terminal da proteína de interesse, a clivagem por ULP1 resulta na produção da proteína recombinante nativa.

Figura 9. Esquema do sítio múltiplo de clonagem do vetor pETSUMO. O esquema mostra a posição da *His.tag* e a sequência e posição da proteína de fusão SUMO, bem como o sítio de clivagem da protease ULP1.

Iniciadores de DNA foram desenhados, visto que, foi preciso inserir a quimera em sítios de restrição diferentes daqueles já dos antigos iniciadores, para que a enzima fosse expressa em uma fase de leitura correta. A quimera foi inserida no vetor pETSUMO entre os sítios de restrição *SacI* e *XhoI*, sublinhados na Tabela 6.

Tabela 6. Iniciadores utilizados para clonagem em pETSUMO

Iniciadores	Sequências (5' - 3')
FaeAxe.SUMO F1	AACTGAGCTCATGTCTTTTAAATATGAGTCGGC
FaeAxe.SUMO R1	CATACTCGAGTCATTCATGGAAGAAATATGGAA

3.5.1. Amplificação do fragmento da quimera FaeAxe.SUMO

A reação de PCR foi feita em volume final de 20 µL contendo 0,5 µM dos iniciadores direto e reverso, 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), 20 ng de DNA molde (clone da quimera FaeAxe em pET28a), e a reação ocorreu como já descrito em 3.4.4.2.

3.5.2. Digestão e clonagem do fragmento FaeAxe no vetor pETSUMO

Duas microgramas do fragmento foram incubadas com 5U de *SacI* (Biolabs – Ipswich, EUA) e 5U de *XhoI* (Biolabs – Ipswich, EUA), em tampão FastDigest 1X (Biolabs – Ipswich, EUA) em um volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Da mesma maneira, o vetor pETSUMO foi digerido. Para a confirmação da digestão do vetor, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1%. O fragmento correspondente ao vetor pETSUMO foi puncionado do gel e purificado pelo Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega – Madison, EUA) e a digestão do fragmento FaeAxe foi purificada pelo Kit *DNA Clean e Concentrator™ -5* (Zymo Research – Irvine, EUA). A clonagem foi feita da mesma maneira que a clonagem de FaeAxe em pET28a. *E.coli* DH5α eletrocompetentes foram transformadas com o produto da ligação FaeAxe/pETSUMO e foram realizadas PCRs de colônia para identificar os clones positivos, que tiveram seu

DNA extraído para posterior sequenciamento. As amostras foram preparadas e sequenciadas da mesma maneira como descrito no item 3.1.1.9.

3.5.3. Expressão da quimera FaeAxe em pETSUMO

Um clone de FaeAxe foi expresso em *E. coli* Rosetta DE3 a 37°C em de meio de cultura LB na presença do indutor isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). O IPTG foi adicionado a uma concentração final de 0,2 mM após as culturas atingirem densidade óptica (600nm) de 0,6. Alíquotas após 1, 2, 3 e 4 horas de indução foram retiradas e assim como descrito no item 3.2, as células foram coletadas e sonicadas para avaliação da solubilidade da quimera por SDS-PAGE.

3.5.4. Purificação da enzima quimérica

A purificação da quimera FaeAxe foi feita por cromatografia de afinidade utilizando a resina HisLink™ Protein Purification (Promega – Madison, EUA). A cultura para expressão foi preparada da mesma maneira conforme descrito no item 3.1.4. Da mesma maneira como descrito no item 3.3 a purificação procedeu por lavagens com concentrações crescentes de imidazol (até 40mM), nesse ponto, 2mg da enzima ULP1 foram adicionados e a resina ligada com a quimera FaeAxe e a enzima ULP1 foram incubadas por 1h a 4°C.

Nesse procedimento, a enzima ULP1 cliva o sítio de proteólise altamente específico entre a quimera e a ubiquitina SUMO. Desse modo, a *His.tag* da FaeAxe (que ficou ancorada à coluna junto com a SUMO) é removida e a quimera fica livre no meio, podendo ser eluída sem a presença de imidazol. A enzima ULP1 também possui *His.tag* e fica ligada à resina. Assim, é possível eluir a enzima de interesse, no caso a quimera FaeAxe sem contaminação por SUMO ou ULP1.

3.5.5. Expressão e purificação da protease ULP1 (*Ubiquitin-like-specific protease 1*) de *Saccharomyces cerevisiae*

A protease ULP1 foi necessária no processo de purificação da quimera FaeAxe clonada em pETSUMO, uma vez que a quimera está fusionada com a ubiquitina SUMO. O clone da protease ULP1 já estava disponível em nosso laboratório e foi utilizado para expressão da proteína. A expressão se deu em bactérias *E. coli* Rosetta DE3 a 18°C por 18h, na presença de 0,1 mM de IPTG. O IPTG foi adicionado após a cultura atingir densidade óptica (600nm) de 0,8.

A purificação também foi feita por cromatografia de afinidade utilizando a resina HisLink™ Protein Purification (Promega – Madison, EUA). A cultura para expressão foi preparada da mesma maneira conforme descrito no item 3.1.4 e purificada como descrito em 3.3. A proteína eluída foi armazenada em alíquotas de 2mg em tampão 25 Mm Tris-HCl pH 8; 250 mM NaCl; 300 mM imidazol contendo glicerol (10%) a -20°C até o momento de uso.

3.6. Quantificação das enzimas parentais e da enzima quimérica

Os parâmetros fundamentais das enzimas parentais acetil-xilano esterase e feruloil esterase, bem como da quimera FaeAxe, como massa molecular, coeficiente de absortividade molar e ponto isoelétrico, foram estimados através do programa online *ProtParam* (GASTEIGER et al., 2005). Tendo conhecimento da massa molecular e coeficiente de absortividade molar teórico das proteínas de interesse, suas concentrações foram determinadas em um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific – Waltham, EUA). Este método foi empregado em todas as quantificações proteicas no decorrer dos experimentos.

3.7. Análise de substratos naturais comerciais por espectrometria de massas

A fim de encontrar substratos adequados às enzimas acetil-xilano esterase e feruloil esterase, realizou-se uma busca a partir de alguns substratos naturais comerciais disponíveis. Nessa etapa, foram analisados seguintes substratos: Xilano de *birch wood* (Sigma – St. Louis, EUA), xilano de *beechwood* (Sigma – St. Louis, EUA), xilano de *oat spelts* (Sigma – St. Louis, EUA) e Arabinoxilano de trigo (*low viscosity*) (Megazyme – Bray, Irlanda).

Todos os substratos foram submetidos à digestão pela endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis* para a obtenção de um padrão de oligossacarídeos no qual se pudesse analisar se os mesmos possuíam substituições ácido acético ou ácido ferúlico. As reações foram conduzidas em tampão acetato de amônio 50 mM pH 5,6 e 1% de substrato (concentração final). Foram adicionados 653 pmol de endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*. As reações foram conduzidas a 50 °C por 4 horas e em seguida foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos.

Os sobrenadantes foram submetidos a análise por espectrometria de massas realizadas por LC-MS. As amostras foram submetidas a cromatografia líquida por interação hidrofóbica em uma coluna HILIC, a 40°C acoplada a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S (Waters Corporation – Milford, EUA). A fase móvel foi composta pelo solvente A (água) e solvente B (Metanol + 10 mM de acetato de amônio) em modo de eluição isocrático, sendo 90% de A. O tempo de desenvolvimento cromatográfico foi de 7 minutos com fluxo de 0,45 mL/min.

O espectrometro de massas Xevo TQ-S MS (Waters Corporation, Milford, EUA) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massas do tipo quadrupolo operou no modo de aquisição positivo. Argônio foi utilizado como gás de colisão. Os parâmetros analíticos foram os seguintes: voltagem do capilar: 3,2kV; temperatura da fonte: 150°C; gás de dessolvatação: N₂ a 300°C. Nos experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) a energia de colisão foi de 40 eV. Os dados foram coletados e analisados pelo software MassLynx 4.0 (Waters Corporation – Milford, EUA).

3.8. Extração de arabinoxilano acetilado a partir de bagaço de cana-de-açúcar

3.8.1. Pré-extração da biomassa

Esse procedimento foi realizado segundo Naran e colaboradores (2009). Aproximadamente 10g de bagaço de cana-de-açúcar moído foram submetidos à extração utilizando um extrator Soxhlet. A primeira extração foi realizada com água deionizada (DI) a fim de remover os compostos acessíveis solúveis em água. Uma segunda extração foi realizada utilizando etanol 80% para remover os lípidios e outros materiais solúveis em álcool. Todas as extrações foram realizadas à temperatura de refluxo do solvente utilizado e à pressão ambiente. Os sólidos foram secos em estufa a 60°C por 24h.

3.8.2. Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar

A deslignificação foi realizada segundo protocolo de Saarnio (1954) em uma garrafa de vidro tampada por adição de água a cerca de 10g de biomassa seca para uma consistência de 10%. Quatro gramas de clorito de sódio (NaClO_2) foram adicionadas à mistura, seguido pela adição de 500 μL de ácido acético glacial. A garrafa foi fechada e mantida a 60°C em banho-maria por 3h. A abertura regular da garrafa foi necessária para aliviar a pressão interior e evitar uma concentração elevada de ClO_2 . Uma vez a cada hora, 4g de NaClO_2 foram adicionadas (no total), até que a quantidade total foi de, aproximadamente, 0,80 g de NaClO_2/g de biomassa. O líquido resultante foi filtrado em um filtro a vácuo e o sólido foi lavado com água deionizada e seco a 50°C por 24h.

3.8.3. Extração dos polissacarídeos acetilados com DMSO

A extração dos polissacarídeos acetilados com DMSO foi feita de acordo com o protocolo de Rowley e colaboradores (2013). Aproximadamente 4g de bagaço de

cana-de-açúcar deslignificado foram submetidas à extração com DMSO utilizando uma razão de 14 mL/g de biomassa à temperatura ambiente em um frasco com agitação a 20 rpm a 70°C por 2h. O sólido foi separado por filtração e submetido à extração pela segunda vez à mesma temperatura e tempo. O sólido foi filtrado e lavado com etanol, o líquido filtrado foi reservado para a etapa de precipitação. Os líquidos filtrados foram misturados e adicionou-se etanol a uma razão de 3,8L de etanol/L de DMSO. Adicionou-se ácido clorídrico concentrado (HCl) a uma proporção de 0,66 mL de HCl/L de solução etanol/DMSO para a etapa de precipitação do arabinoxilano. A solução foi deixada a 4°C por 18h para completar a precipitação. Posteriormente, a solução foi filtrada em filtro de papel (Qualy – poro 14 µM) utilizando um filtro a vácuo.

A fração sólida foi lavada com etanol e colocada em um recipiente com etanol sob agitação a 4°C por 18h. A solução foi filtrada e novamente colocada em etanol sob agitação a 4°C por mais 5h para remover todo o DMSO. A solução foi novamente filtrada e lavada com dietil éter e colocado com dietil éter sob agitação a 4°C por 18h. O arabinoxilano foi filtrado, lavado com água e então liofilizado.

3.8.4. Análise de arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e de arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) por espectrometria de massas

O substrato acetilado extraído de bagaço de cana-de-açúcar, juntamente com o substrato comercial arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) foram submetidos à hidrólise pela endoxilanse GH11 e analisados por espectrometria de massas da mesma maneira como descrito no item 3.7.

3.9. Análise do padrão de clivagem da acetil-xilano esterase, feruloil esterase e quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) após clivagem pela endoxilanase GH11

A quimera FaeAxe foi ensaiada contra o substrato arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda). Para a reação com o arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar, o domínio monomérico acetil-xilano esterase e a quimera FaeAxe foram analisados individualmente em condições de equimolaridade. As reações ocorreram por 16h. Decorrido esse tempo, endoxilanase GH11 foi adicionada a reação por mais 4h. As reações foram conduzidas em tampão acetato de amônio 50 mM pH 5,6 e 1% de arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar (concentração final). Foram adicionados 25µL de FaeAxe (0,24mg/mL), 7,58µL de Axe (0,36mg/mL) e 653 pmol de endoxilanase GH11. As reações foram conduzidas a 50 °C e analisadas por LC-MS como descrito em 3.7. Para a reação com arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) o domínio monomérico feruloil esterase e a quimera FaeAxe foram analisados individualmente em condições de equimolaridade. As reações ocorreram da mesma maneira que para o outro substrato, exceto que foram adicionados 3,06 µL de Fae (1,2mg/mL).

3.10. Análise do padrão de clivagem da acetil-xilano esterase, feruloil esterase e quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano solúvel e arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar após clivagem pela endoxilanase GH11

A quimera FaeAxe foi ensaiada contra os substratos arabinoxilano solúvel e arabinoxilano insolúvel de cana-de-açúcar. Esses substratos foram gentilmente cedidos por Marco Aurélio Silva Tiné (Instituto de Botânica de São Paulo) para realização destes ensaios. As reações foram preparadas e analisadas da mesma maneira como descrito no item 3.9.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Subclonagem da acetil-xilano esterase em pET28a

A sequência codificadora Axe foi sintetizada pela empresa Gen Script com otimização de códons raros para *E. coli* e com inserção das sequências de restrição para *NdeI* e *NotI* e fornecido clonado em pUC57 usando sítio de restrição *EcoRV*. Para proceder com a subclonagem da sequência em vetor de expressão bacteriano pET28a, primeiramente foi realizada a digestão da construção pUC57/Axe com as enzimas de restrição *NdeI* e *NotI*, para liberação do fragmento Axe. O vetor pET28a foi linearizado com as mesmas enzimas, como descrito no item 3.1.1.4. As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 10) pelo aparecimento de bandas correspondentes ao tamanho do fragmento (638 pb) e do vetor pET28a (5.3 kb).

Figura 10. Digestão da construção pUC57/Axe e do vetor pET28a. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador molecular de DNA de 1Kb. 1 – digestão da construção pUC57/Axe mostrando um fragmento correspondente ao vetor pUC57 com cerca de 2.7kb (acima) e um fragmento correspondente à sequência codificadora Axe com cerca de 638pb (abaixo). 2 – controle da digestão do vetor pET28a mostrando banda em aproximadamente 5.3kb. 3 - controle, construção pUC57/Axe não digerida. 4 - controle, vetor pET28a não digerido.

Após a digestão e purificação do DNA, foi realizada a ligação da sequência codificadora Axe no vetor pET28a que posteriormente foi transformada em *E. coli* DH5 α . O tamanho do fragmento amplificado na PCR de colônia está de acordo com o anelamento dos *primers* T7 *promoter* e T7 *terminator* (Tabela 1) que se anelam em

sequências específicas do vetor pET28a, gerando um fragmento de 878 pb quando a sequência codificadora Axe estiver inserido e 318 pb quando a sequência não estiver inserida. Após PCR de colônia, foi possível observar os clones positivos (aqueles que apresentam a sequência codificadora Axe inserida no plasmídeo pET28a) por eletroforese em gel de agarose (Figura 11), na qual observou-se que os clones 9 e clone 11 foram positivos.

Figura 11. PCR de colônia da ligação pET28a/Axe. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio M: marcador molecular de DNA de 1Kb; 1-11: PCR das colônias; C: controles positivos com pET28a vazio.

4.2. Expressão e purificação das proteínas parentais

4.2.1. Expressão e purificação da acetil-xilano esterase

A expressão de Axe procedeu como descrito no item 3.2. A partir de cinco horas após a indução com 0,5 mM de IPTG, já foi possível observar a expressão de Axe com um peso molecular de aproximadamente 25 kDa (Figura 12), em acordo com o peso molecular predito a partir da sequência de nucleotídeos sintetizada.

Figura 12. Gel SDS-PAGE da expressão de Axe em *E. coli* Rosetta DE3. M: marcador de peso molecular. Controles: pET28a vazio não induzido por IPTG e pET28a após indução por IPTG por 15h. t0 - controle da expressão, sem indução por IPTG. t0 – t15: tempo em horas após a indução por IPTG. P – precipitado após sonicação e centrifugação. S – fração solúvel após sonicação e centrifugação.

Após a expressão e verificação da presença da proteína na fração solúvel, a purificação por IMAC procedeu como descrito no item 3.3, com lavagens sucessivas com tampões com 40 mM e 80 mM de imidazol, para posterior eluição, com tampão com 300 mM de imidazol (Figura 13).

Figura 13. Purificação da acetil-xilano esterase. Gel SDS-PAGE 12,5%. M: marcador de peso molecular de proteínas; 1 – fração solúvel após sonicação e centrifugação; 2 – lavagem com 40 mM de imidazol; 3 – lavagem com 80 mM de imidazol, canaletas 4 a 7 – eluição da proteína pura.

4.2.2. Expressão e purificação da feruloil esterase

No caso da enzima feruloil esterase, após uma hora a partir da indução com 0,5 mM de IPTG, já é possível observar a expressão da enzima com um peso molecular de aproximadamente 33 kDa (Figura 14). A proteína apresentou-se em sua maioria na fração solúvel.

Figura 14. Expressão da feruloil esterase. Gel SDS-PAGE 12,5%. M: marcador de peso molecular. Controles: pET28a vazio não induzido por IPTG e pET28a após indução por IPTG por 4h. t0 - controle da expressão, sem indução por IPTG. t0 – t4: tempo em horas após a indução por IPTG. P – precipitado após sonicação e centrifugação. S – fração solúvel após sonicação e centrifugação.

Dessa forma, o sobrenadante foi submetido a purificação por IMAC e o procedimento consistiu de lavagens sucessivas com tampões com 20 mM e 40 mM de imidazol, para posterior eluição, com tampão com 300 mM de imidazol (Figura 15).

Figura 15. Purificação da feruloil esterase. Gel SDS-PAGE 12,5%. M: marcador de peso molecular de proteínas; 1 – fração solúvel após sonicação e centrifugação; 2 – lavagem com 20 mM de imidazol; 3 – lavagem com 40 mM de imidazol, canaletas 4 a 6 – eluição da proteína pura.

4.2.3. Purificação da enzima endoxilanase GH11

A expressão procedeu como descrito no item 3.2. Após a expressão, a purificação procedeu como descrito no item 3.3, com lavagens sucessivas com tampões com 20 mM e 40 mM de imidazol, para posterior eluição, com tampão com 300 mM de imidazol. A endoxilanase GH11 apresentou-se na fração solúvel com um peso molecular de aproximadamente 22 kDa (Figura 16).

Figura 16. Purificação da endoxilanase GH11. Gel SDS-PAGE 12,5%. M: marcador de peso molecular de proteínas; 1 – fração solúvel após sonicação e centrifugação; 2 – lavagem com 20 mM de imidazol; 3 – lavagem com 40 mM de imidazol, canaletas 4 a 7 – eluição da proteína pura.

4.3. Desenho racional da quimera FaeAxe

O modelo estrutural da quimera foi gerado por desenho racional, com o auxílio do software *Modeller* (SALI; BLUNDELL, 1993) levando em consideração a localização dos sítios catalíticos e sítios de ligação a cofatores, conforme descrito no item 3.4.2. A enzima acetil-xilano esterase foi inserida em uma alça da enzima feruloil esterase, entre os aminoácidos Pro853 e Asn854 (Figura 17). No modelo final da quimera FaeAxe não foram inseridos *linkers* peptídicos entre as estruturas das enzimas parentais nos locais de fusão.

Figura 17. Ponto de união das enzimas feruloil esterase e acetil-xilano esterase. Visualização da estrutura da quimera FaeAxe gerada pelo software *Pymol*. Em vermelho, a enzima feruloil esterase e em verde, acetil-xilano esterase. As setas indicam os aminoácidos na posição de rompimento da alça de feruloil esterase para inserção da acetil-xilano esterase.

4.3.1. Validação dos modelos por *Ramachandran Plot*

O gráfico de Ramachandran mostra os ângulos de torção ϕ (*phi*) e ψ (*psi*) para todos os resíduos na estrutura (exceto aqueles nos terminais de cadeia). As conformações possíveis são as que envolvem pouca ou nenhuma interferência estérica, com base em cálculos dos raios de van der Waals e ângulos diedros. No gráfico de Ramachandran (Figura 18), as áreas mais escuras (mostradas em vermelho) correspondem às regiões que representam as combinações mais

favoráveis de valores *phi-psi*. Idealmente, espera-se que mais de 90% dos resíduos estejam nessas regiões. A percentagem de resíduos nessas regiões é um dos melhores guias para a avaliação da qualidade estereoquímica da molécula. As demais regiões, marrom, amarelo médio e amarelo claro, expressam a probabilidade decrescente de conformações de ângulos permitidas (MORRIS et al., 1992). Resíduos de glicina são separadamente identificados por triângulos, já que os ângulos dihedrais permitidos desses resíduos não são restritos às regiões do gráfico observadas para os outros tipos de cadeia lateral. Isso se deve ao fato de que a glicina possui apenas um átomo de hidrogênio em sua cadeia lateral, o que permite uma ampla faixa de ângulos dihedrais. Dentre os valores de ϕ e ψ gerados para a quimera FaeAxe, 91,4% estão em regiões permitidas (*most favoured region*), 7,4% encontram-se em zonas menos permitidas (*additional allowed region*), 0,5% encontram-se em zonas restritas (*generously allowed residues*), 0,7% encontram-se em áreas proibidas (*disallowed region*).

Figura 18. Gráfico de Ramachandran para a quimera FaeAxe. As áreas em vermelho representam as conformações que apresentam pouco ou nenhum impedimento estérico, portanto são totalmente permitidas. Em marrom, as áreas que tem raios de van der Waals aproximados, portanto são conformações menos permitidas. Em amarelo escuro, são conformações restritas, e o amarelo claro representa conformações proibidas.

Dentre os aminoácidos que aparecem em áreas do gráfico referentes a conformações proibidas, a Serina 112 é um aminoácido da enzima acetil-xilano esterase distante da alça de união das duas enzimas e também está presente em áreas de conformações proibidas no gráfico de Ramachandran para a enzima monomérica parental. Já o aminoácido Asparagina 257 na quimera FaeAxe, se refere à Asn854 da enzima feruloil esterase, já descrito anteriormente, como sendo um aminoácido que está na posição de rompimento de uma alça de feruloil esterase para inserção da acetil-xilano esterase.

4.4. Construção do gene da quimera FaeAxe

4.4.1. Amplificação dos fragmentos

Para a construção da enzima híbrida feruloil esterase/acetil xilano esterase, 3 fragmentos de DNA foram amplificados utilizando os iniciadores mostrados na Tabela 5. O fragmento 1, de 203 pares de bases, que corresponde à região N-terminal da enzima feruloil esterase, o fragmento 2, de 648 pares de bases, que corresponde à enzima acetil-xilano esterase e o fragmento 3, de 714 pares de bases, referente à região C-terminal de feruloil esterase, de acordo com o item 3.3.1. Os fragmentos advindos das reações de PCR foram submetidos à análise eletroforética em gel de agarose 1% para confirmação das amplificações, conforme a Figura 19.

Figura 19. Amplificação dos fragmentos constituintes da quimera FaeAxe. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador molecular de DNA de 1Kb. 1- fragmento 1 amplificado; 2- fragmento 2 amplificado; 3- fragmento 3 amplificado.

4.4.2. *Overlap PCR*

A *overlap PCR* foi feita com os três fragmentos gerados por amplificação em proporção equimolar, como descrito no item 3.4.4.2. O produto da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo (Figura 20), e apresentou um fragmento resultante de aproximadamente 1.5 Kb e corresponde ao tamanho esperado (1499 pb) pela fusão das duas enzimas parentais, gerando a quimera FaeAxe.

Figura 20. Fusão dos fragmentos de DNA via *overlap PCR*. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador molecular de DNA de 1Kb. 1- fragmento resultante da *overlap PCR*.

4.5. Digestão e clonagem de FaeAxe no vetor pET28a

O vetor pET28a foi linearizado por digestão com as enzimas de restrição *NcoI* (Biolabs – Ipswich, EUA) e *XhoI* (Biolabs – Ipswich, EUA) (Figura 21A), assim como o fragmento correspondente a FaeAxe gerado por *overlap PCR*, como descrito no item 3.4.5. Foi realizada uma reação de ligação, e posteriormente *E. coli* DH5 α foi transformada com o produto. Após PCR de colônia, foi possível observar os clones positivos que apresentam o fragmento FaeAxe inserido no plasmídeo pET28a por eletroforese em gel de agarose (Figura 21B). Os fragmentos amplificados na PCR de colônia são vistos no gel de agarose e apresentaram um tamanho esperado para o fragmento da quimera FaeAxe (cerca de 1.5 Kb), verificando-se que os clones 5, 8 e 10 mostraram-se positivos.

Figura 21. Digestão do vetor pET28a e PCR de colônia da clonagem de FaeAxe em pET28a. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio M: marcador molecular de DNA de 1Kb. **A**, digestão do vetor pET28a. 1- vetor linearizado com enzimas *NcoI* e *XhoI*, banda correspondente ao tamanho do vetor (5.3kb); 2- controle negativo da digestão (vetor não-linearizado). **B**, PCR de colônia da clonagem. 5, 8 e 10 foram clones positivos para FaeAxe, em tamanho aproximado de 1.5kb.

4.6. Sequenciamento do gene da quimera FaeAxe

O sequenciamento do fragmento da quimera FaeAxe gerado por *overlap PCR* e clonado em pET28a revelou duas trocas de bases, uma timina por uma citosina na posição 1.119 pb e uma adenina por uma guanina na posição 1.201 pb. No entanto, essas trocas de bases não trocaram o aminoácido que deve ser traduzido, validando o clone.

4.7. Testes de expressão da quimera FaeAxe em pET28a

Como descrito no item 3.4.8, o domínio catalítico quimérico FaeAxe foi submetido a diversos testes de expressão da proteína recombinante em células *E. coli Rosetta* DE3, onde foram variadas as condições de indução, com testes de expressão na presença de 0.1mM, 0.5mM e 1mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo), com expressão a 37°C por 4h; e também variadas as condições de crescimento, com teste de expressão a 18°C por 16h com indução na

presença de 0.1 mM de IPTG. A quimera FaeAxe tem um tamanho aproximado de 55 kDa, e como observado na Figura 22, todas as condições de expressão testadas foram bem-sucedidas, no entanto, a quimera apresentou-se na fração insolúvel em todas as condições.

Tendo em vista a dificuldade de se purificar proteínas expressas em corpos de inclusão, optou-se por subclonar o fragmento gerado no vetor de expressão pETSUMO.

Figura 22. Testes de expressão da quimera FaeAxe em pET28a. Géis de poliacrilamida 12,5% com dodecil sulfato de sódio corados com azul de comassie. M: Marcador de peso molecular de proteínas. **A**, teste de expressão com indução por 1mM de IPTG por 4h a 37°C. **B**, teste de expressão com indução por 0,1 mM de IPTG por 18h a 18°C. **C**, teste de expressão com indução por 0,5 mM de IPTG por 4h a 37°C. **D**, teste de expressão com indução por 0,1 mM de IPTG por 4h a 37°C. t0 – controle da expressão sem indução por IPTG, t1, t2, t3, t4, t18 – tempos em horas após a indução da cultura por IPTG.

4.8. Clonagem de FaeAxe no vetor pETSUMO

4.8.1. Amplificação dos fragmentos da quimera FaeAxe e digestão do vetor pETSUMO

Como descrito no item 3.5.1 o fragmento da quimera FaeAxe foi amplificando com os *primers* descritos na Tabela 6 para inserção dos sítios de restrição para as enzimas *SacI* e *XhoI*, 5' e 3' da sequência codificadora, respectivamente. O fragmento amplificado na PCR apresentou um tamanho de aproximadamente 1.5 Kb após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 23A). O fragmento foi digerido com as enzimas *SacI* e *XhoI* da mesma forma que o vetor pETSUMO, como descrito no item 3.5.2. A digestão foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, pelo aparecimento de uma banda em torno de 5.6 Kb (Figura 23B).

Figura 23. Amplificação do fragmento de FaeAxe e digestão do vetor pETSUMO. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio M: marcador molecular de DNA de 1Kb. **A**, amplificação do fragmento de FaeAxe. 1- fragmento amplificado, correspondente ao tamanho do gene da quimera gerado (1.5 Kb). **B**, digestão do vetor pETSUMO. 1 – vetor linearizado com enzimas *SacI* e *XhoI*, mostrando banda correspondente ao tamanho do vetor (5.6kb), 2 – controle negativo da digestão: vetor não linearizado.

4.8.2. Clonagem do fragmento de FaeAxe em pETSUMO

Após a reação de ligação do vetor pETSUMO linearizado e do fragmento de FaeAxe digerido, bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram transformadas com o produto da ligação. O *screening* dos transformantes foi realizado por PCR de colônia e as reações de amplificação foram analisadas por gel de agarose 1% corado com brometo de etídio pelo aparecimento de bandas de aproximadamente 1.5 Kb (Figura 24). O *screening* permitiu observar duas colônias positivas (aquelas que apresentam o fragmento correspondente a FaeAxe inserido no plasmídio pETSUMO).

Figura 24. PCR de colônia de FaeAxe em pETSUMO. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio M: marcador molecular de DNA de 1Kb. As canaletas 1 e 2 mostram os clones positivos para FaeAxe/pETSUMO, com tamanho aproximado de 1.5 Kb.

4.9. Expressão e purificação da quimera FaeAxe fusionada com SUMO

A partir de uma hora após a indução com 0,2 mM de IPTG, como descrito no item 3.5.4, já é possível observar a expressão de FaeAxe fusionada com SUMO, em um peso molecular de aproximadamente 68 KDa (somando 55 kDa da FaeAxe aos 13 kDa da proteína de fusão SUMO). Após o processo de sonicação e centrifugação, foi possível observar que cerca de 50% da quimera FaeAxe se encontrava solúvel quando fusionada a SUMO (Figura 25). O controle dessa expressão (pETSUMO vazio) mostra a expressão da ubiquitina SUMO pelo aparecimento de uma banda de aproximadamente 13 kDa.

Figura 25. Expressão da quimera FaeAxe em vetor pETSUMO. Gel de poliacrilamida 12,5% com dodecil sulfato de sódio corado com azul de comassie. M: Marcador de peso molecular de proteínas. t0 – controle da expressão, sem indução por IPTG. t1, t2, t3, t4 – tempo em horas após a indução por IPTG. P – precipitado após sonicação e centrifugação. S – fração solúvel após sonicação e centrifugação.

Após a expressão e verificação da presença da quimera FaeAxe na fração solúvel, a purificação procedeu como descrito no item 3.5.5. Como pode ser visto na Figura 26, a quimera FaeAxe fusionada com SUMO pode ser eluída na ausência de imidazol após clivagem da ubiquitina SUMO pela protease ULP1, uma vez que as proteínas fusionadas a SUMO no vetor pETSUMO são removidas da resina de afinidade após a ação da protease. A quimera aparece com um peso molecular de aproximadamente 53 kDa, sem a cauda de histidina. A subclonagem da quimera FaeAxe no vetor de expressão bacteriano pETSUMO foi uma opção bem sucedida para a expressão da enzima solúvel. Cerca de 50% da quantidade de enzima expressa mostrou-se na fração solúvel quando expressa no vetor pETSUMO. De posse da enzima solúvel e purificada foi possível prosseguir com os experimentos de caracterização da quimera.

Figura 26. Purificação da quimera FaeAxe fusionada com SUMO. Gel de poliacrilamida 12,5% com dodecil sulfato de sódio corados com azul de comassie. M: Marcador de peso molecular de proteínas. As canaletas 1 a 5 mostram a eluição da quimera com tampão sem imidazol após reação de clivagem pela protease ULP1.

4.10. Análise dos oligossacarídeos gerados pela endoxilanase GH11 a partir dos substratos comerciais através de espectrometria de massas (LC-MS)

Com o objetivo de analisar as atividades dos domínios acetil-xilano esterásico e feruloil esterásico, primeiramente buscou-se substratos que, após hidrólise enzimática, liberassem produtos que pudessem ser detectados colorimetricamente, por espectrofotometria. A enzima acetil-xilano esterase de *Clostridium thermocellum* mostra atividades não detectáveis em substratos gerais para esterases, incluindo *p*-nitrofenil acetato (TAYLOR et al., 2006). Em buscas na literatura, encontrou-se um ensaio acoplado de enzimas com atividade acetil-xilano esterásica com uma enzima β -xylosidase (*xlnD*) de *A. niger* (BIELY et al., 2004). A base do ensaio é a hidrólise de monoacetatos de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeos por acetil-xilano esterase que gera um substrato cromogênico específico para a β -xilosidase (Figura 27). No entanto, a síntese desses monoacetatos de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeos não foi possível em nosso laboratório.

Figura 27. Princípio do ensaio acoplado. Representação esquemática dos substratos cromogênicos na parte superior da figura. Os substratos tornam-se passíveis da ação da β -xilosidase somente após a desacetilação e a liberação de 4-nitrofenol é controlada indiretamente pela taxa de desacetilação (BIELY et al., 2004).

A enzima feruloil esterase de *C. thermocellum* utilizada nesse trabalho teve sua atividade catalítica pouco descrita na literatura. A apresenta 30% de identidade com a sequência de aminoácidos da FaeA de *Orpinomyces* strain PC-2. Além disso, apresenta atividade sobre o substrato FAXX, hidrolisando-o e liberando ácido ferúlico (BLUM et al., 2000). Outras moléculas são utilizadas como substrato para enzimas com atividade feruloil esterásica, bem como *p*-nitrofenil acetato (substrato geral para esterases) etil ferulato, metil ferulato, FAX₃, PAX₃ e etil-*p*-cumarato (liberando *p*-cumárico) (BLUM et al., 2000; GONG et al., 2013; WANG et al., 2014). Em experimentos anteriores utilizando o substrato etil ferulato, não foi possível detectar a liberação de ácido ferúlico a partir desse substrato pela feruloil esterase de *C. thermocelum* (ARRUDA, 2015). Os substratos FAXX, FAX₃ e PAX₃ não foram passíveis de síntese em nosso laboratório.

Optou-se por usar substratos naturais a fim de verificar a atividade das enzimas acetil-xilano esterase e feruloil esterase e da quimera FaeAxe utilizando espectrometria de massas para detecção. A espectrometria de massas tem sido amplamente utilizada para detecção de oligossacarídeos produzidos por digestão enzimática a partir de substratos naturais (BIELY et al., 2013b, 2014; CHONG et al., 2011a; SØRENSEN; PEDERSEN; MEYER, 2007b; VINUEZA et al., 2013).

Os substratos comerciais Xilano de *birch wood* (Sigma – St. Louis, EUA), xilano de *beechwood* (Sigma – St. Louis, EUA), xilano de *oat spelts* (Sigma – St. Louis, EUA) e Arabinoxilano de trigo de baixa viscosidade (*Wheat low viscosity*) (Megazyme – Bray, Irlanda) foram submetidos à digestão pela endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis* e os oligossacarídeos gerados foram analisados por LC-MS. Os oligômeros de interesse são eluídos na cromatografia líquida (nas condições descritas no item 3.7) em torno de 3 minutos (mostrados nos cromatogramas na Figura 28).

Figura 28. Cromatograma das amostras dos substratos comerciais após digestão com a endoxilanase GH11. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **A**, cromatograma da amostra de arabinoxilano de trigo de baixa viscosidade (*Wheat low viscosity*); **B**, cromatograma da amostra de xilano de *oat spelts*; **C**, cromatograma da amostra de xilano de *birchwood*; **D**, cromatograma da amostra de xilano de *beechwood*.

A Figura 29 mostra os espectros de massas do referido pico da cromatografia para cada amostra analisada. Os espectros de massa mostram a relação de m/z dos íons moleculares obtidos nas amostras após a digestão com a endoxilanase GH11 *versus* a abundância relativa desses íons na amostra.

A

Xilano de *birch wood* (Sigma – St. Louis, EUA)
LCMS – Pico 2 (~2.8 min)

B

Xilano de *oat spelts* (Sigma – St. Louis, EUA)
LCMS – Pico 2 (~2.8 min)

C

Arabinoxilano de trigo (*low viscosity*) (Megazyme – Bray, Irlanda)
LCMS – Pico 2 (~2.8 min)

D

Xilano de *beechwood* (Sigma – St. Louis, EUA)
LCMS – Pico 2 (~2.8 min)

Figura 29. Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos das amostras comerciais após a digestão com a endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico eluído com um tempo de retenção de cerca de 3 min (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente. **A, espectro de massas da amostra de xilano de *birchwood*; **B**, espectro de massas da amostra de xilano de *oat spelts*; **C**, espectro de massas da amostra de arabinoxilano de trigo de baixa viscosidade (*Wheat low viscosity*); **D**, espectro de massas da amostra de xilano de *beechwood*.**

A Tabela 7 resume os adutos de sódio $[M+Na^+]$ e/ou adutos de amônio $[M+NH_4^+]$ dos íons moleculares dos oligossacarídeos gerados. A tabela foi construída com base nos espectros de m/z obtidos pelo *software* MassLynx 4.0 (Waters Corporation – Milford, EUA). Quando observada a presença do íon, a m/z é indicada na tabela. Na ausência do íon o campo correspondente está em branco.

Tabela 7. Adutos de Na^+/NH_4^+ dos oligossacarídeos gerados após o tratamento dos substratos comerciais xilano de *birchwood*, xilano de *oat spelts*, arabinoxilano de trigo de baixa viscosidade (*Wheat low viscosity*) e xilano de *beechwood* com a endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*

Oligossacarídeos	Adutos de Na^+/NH_4^+ dos íons moleculares			
	<i>Wheat low viscosity</i>	<i>Birchwood</i>	<i>Beechwood</i>	<i>Oat Spelts</i>
Pent2	300	300/305	300/305	300/305
Pent3	432	432/437	432/437	432/437
Pent4	564	564	564	564
Pent5	696	696	696	696
Pent6	828			828
Pent7	960			
Pent8	1092			1092
Pent9	1224			1224
Pent10				1356
Pent2MeGlcA			490	
Pent3MeGlcA		622	622	
Pent4MeGlcA		754	754/759	754
Pent5MeGlcA		886	886	886
Pent6MeGlcA		1018	1018	1018
Pent7MeGlcA				1150
Pent8MeGlcA	1282	1282		1282
Pent9MeGlcA	1414			
Pent10MeGlcA	1546			
Pent2MeGlcAAc3	621			
Pent3MeGlcAAc3	753			
Pent4MeGlcAAc3	885			
Pent5MeGlcAAc3	1017			
Pent2AcFA		518		
Pent5Ac6FA2		1300	1300	
Pent6Ac4FA2	1348			
Pent6Ac6FA2		1432	1432	
Pent6FA				1004

Abreviações: Pent= pentose (exemplo: xilose, arabinose); MeGlcA= ácido 4-O-metil-glucurônico; Ac= ácido acético; FA= ácido ferúlico

Como observado na Tabela 7, todos os substratos analisados apresentaram basicamente pento-oligossacarídeos não substituídos, que variaram de 2 a 10 pentoses, pento-oligossacarídeos substituídos por MeGlcA (ácido metil-glucurônico), pento-oligossacarídeos substituídos por MeGlcA e grupos acetil e pento-oligômeros substituídos por grupamentos feruloil e acetil. Os xilanos advindos de *birchwood*, *beechwood* e *oat spelts*, bem como o arabinoxilano de trigo contêm grande quantidade de resíduos de ácido metil-glucurônico, no entanto, o arabinoxilano advindo de trigo possui substituintes acetil em maior quantidade. As substituições dos oligômeros tanto por grupamentos acetil quanto grupamentos feruloil, apareceram raramente, o que tornou esses substratos comerciais desinteressantes para o estudo das enzimas e da quimera em questão.

As hemiceluloses são os polissacarídeos mais heterogêneos e, depois da celulose, são a segunda estrutura orgânica mais abundante na parede celular. O principal polímero hemicelulósico dos cereais e da madeira *hardwood* é o xilano. O xilano é constituído por uma cadeia principal de unidades D-xilose unidas entre si por ligações β -1,4 e pode ser substituída por diferentes grupos laterais, como L-arabinose, D-galactose, acetil, feruloil, *p*-cumaril, e resíduos de ácido glucurônico (VRIES; VISSER, 2001).

Estudos mostraram que o principal componente da hemicelulose de *hardwoods* é o glucuronoxilano. Esse componente hemicelulósico da maioria das *hardwoods* consiste de um esqueleto principal de D-xiloses com substituições ácido $\alpha(1\rightarrow2)$ -4-O-metil-D-glucurônico ou ácido $\alpha(1\rightarrow2)$ -D-glucurônico em cerca de 10% dos resíduos de xilose (DE VRIES et al., 2001; JEFFRIES et al., 1994). Já nos xilanos de *softwood* e da maioria das gramíneas, a presença de resíduos de L-arabinose os diferem dos xilanos de *hardwood*. O componente hemicelulósico predominante em gramíneas é o glucoronoarabinoxilano (GAX), que pode compreender aproximadamente 40-50% dos polissacarídeos da parede celular por peso (KULKARNI et al., 2012). O esqueleto xilano de GAX é substituído com resíduos de arabinose e, em um grau bem menor, por ácido 4-O-metil-glucorônico (SLAVOV; ALLISON; BOSCH, 2013).

O esqueleto principal de xilano em trigo (e em outros cereais) pode também ser substituído com grupos acetil (RHODES; SADEK; STONE, 2002) esterificados nas posições 2 ou 3 dos resíduos de xilose, bem como por ácido ferúlico esterificado

no C5 dos resíduos de arabinosil (SØRENSEN; PEDERSEN; MEYER, 2007b). Pontes de ácido ferúlico podem ocorrer entre arabinoxilanos e lignina (TUYET LAM; IIYAMA; STONE, 1992).

Além da composição natural da parede celular dessas madeiras e do trigo, outro fator influencia na quantidade de acetilações e feruloilações presentes nesses substratos comerciais: o tipo de pré-tratamento desses materiais antes da comercialização. Celulose e hemicelulose são polissacarídeos em cadeia, enquanto a lignina é heterogênea e forma uma rede de ligações cruzadas tridimensionais, associando-se com a celulose e hemiceluloses (MUSSATTO et al., 2008). Estes componentes estão fortemente interligados através de ligações covalentes e não-covalentes formando a matriz lignocelulósica. Essas características estruturais dos materiais lignocelulósicos fazem deles substratos muito recalcitrantes para enzimas e resultam em uma baixa digestibilidade desses materiais. Para contornar esse problema, muitos processos de pré-tratamento têm o objetivo de reduzir a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos pela remoção da lignina e/ou hemiceluloses (SUN et al., 2016).

Os pré-tratamentos alcalinos são o método mais comumente usado para remover lignina e hemiceluloses dos materiais lignocelulósicos. Durante esse processo, as ligações éster na lignina e na hemicelulose são quebradas. A quebra dessas ligações promove significativamente a solubilização das hemiceluloses e da lignina, resultando na exposição da celulose às enzimas (SUN et al., 2016). Dessa maneira, para tornar os substratos comerciais solúveis, muitas vezes pré-tratamentos alcalinos são utilizados; e causam rompimento das ligações éster, nesse caso, a desacetilação e deferuloilação dos xilo-oligossacarídeos (CHATURVEDI; VERMA, 2013; CHONG et al., 2011a; NARAN et al., 2009; PAPA et al., 2015; SELIG et al., 2009; SUN; CHENG, 2002).

4.11. Análise dos oligossacarídeos gerados pela endoxilanase GH11 a partir do substrato arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e do arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) através de espectrometria de massas (LC-MS)

O arabinoxilano acetilado extraído de bagaço cana-de-açúcar, após hidrólise com a endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis* foi submetido a LC-MS como já descrito. Os oligossacarídeos de interesse foram eluídos em torno de 3 minutos na cromatografia líquida e o espectro de massas dessa fração mostrou que o procedimento de extração da fração acetilada de arabinoxilano de bagaço de cana-de-açúcar apresentou uma variedade de oligossacarídeos acetilados no material resultante, bem como pento-oligossacarídeos não substituídos, como observado na Figura 30. O cromatograma e o espectro de massas completo encontram-se no Apêndice A.

Figura 30. Espectro da relação m/z dos íons moleculares obtidos a partir da amostra de arabinoxilano acetilado de cana-de-açúcar após digestão com a endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição em torno de 3 min após cromatografia líquida. Em vermelho, destacados os oligossacarídeos acetilados obtidos na fração; em azul os oligossacarídeos não substituídos.

No caso do arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) observou-se uma variedade de oligossacarídeos acetilados, bem como com substituintes feruloil, como já descrito por Sorensen e colaboradores (2007). A Tabela 8 mostra os adutos de sódio $[M+Na^+]$ e/ou adutos de amônio $[M+NH_4^+]$ dos íons moleculares dos oligossacarídeos gerados após hidrólise do arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar e arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) pela endoxilanase GH11. Quando observada a presença do íon, a m/z é indicada na tabela. Na ausência do íon o campo correspondente está em branco. Os cromatogramas e espectros de massa estão no Apêndice B.

Tabela 8. Adutos de Na⁺/NH₄⁺ dos oligossacarídeos gerados após o tratamento dos substratos arabinoxilano acetilado de cana-de-açúcar e arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) com a endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*

Oligossacarídeos	Adutos de Na ⁺ /NH ₄ ⁺ dos íons moleculares	
	Arabinoxilano acetilado de cana-de-açúcar	<i>Insoluble wheat arabinoxylan</i>
Pent2	300	300/305
Pent3	432/437	432/437
Pent4	564/569	564/569
Pent5	696	696/701
Pent6		828/833
Pent7		960/965
Pent8		1092
Pent9		1224
Pent10		1356
Pent11		1488
Pent3Ac1	474/479	
Pent3Ac2	516	
Pent4Ac	606/611	
Pent4Ac2	648/653	
Pent5Ac	738	
Pent5Ac2	780	
Pent5Ac3	822	
Pent6Ac	870	
Pent6Ac2	912	
Pent6Ac3	954	
Pent6Ac4	996	
Pent7Ac2	1044	
Pent7Ac3	1086	
Pent7Ac4	1128	
Pent7Ac5	1170	
Pent8Ac3	1218	
Pent8Ac4	1260	
Pent8Ac5	1302	
Pent9Ac3	1350	
Pent9Ac4	1392	
Pent6MeGlcA		1018
Pent9MeGlcA		1414
Pent10MeGlcA		1546
Pent2MeGlcAAc3		621
Pent2MeGlcAAc4	663	663
Pent2MeGlcAAc5	700/705	700/705
Pent3MeGlcAAc3		753
Pent4MeGlcAAc3		885
Pent6MeGlcAAc3		1149
Pent4FA		740
Pent10Ac2FA		1621

Abreviações: Pent= pentose (exemplo: xilose, arabinose); MeGlcA= ácido 4-O-metil-glucurônico; Ac= ácido acético; FA= ácido ferúlico

Como já descrito pela literatura, todos os procedimentos de biorefinaria de materiais hemicelulósicos que não envolvem pré-tratamentos alcalinos irão gerar frações parcialmente acetiladas de hemicelulose (SUN et al., 2016). Desse modo, extrações de frações hemicelulósicas com DMSO têm resultado em xilanos solúveis em água, e que retêm os grupos acetil nativos presentes nessa fração (HÄGGLUND et al., 1956; NARAN et al., 2009; ROWLEY et al., 2013).

No caso do arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*), o fabricante não informa o método de extração e purificação da fração comercializada, mas descreve o material como sendo extraído para manter as pontes de ácido ferúlico, o que já foi observado na literatura (SØRENSEN; PEDERSEN; MEYER, 2007a; WONG et al., 2013).

A análise desses substratos permitiu concluir que se tratam de substratos adequados às enzimas feruloil esterase e acetil-xilano esterases. Dessa maneira, esses substratos foram utilizados nos ensaios enzimáticos da acetil-xilano esterase e feruloil esterase de *Clostridium thermocellum*, bem como da quimera FaeAxe.

4.12. Análise do padrão de clivagem da acetil-xilano esterase e da quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise com a endoxilanase GH11

O modo de ação da enzima Axe, bem como da quimera FaeAxe foi examinado pela análise de uma mistura de oligossacarídeos gerados a partir da fração acetilada de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise com a endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*. Os produtos liberados pela endoxilanase correspondem a oligossacarídeos acetilados de tamanhos variados (Tabela 9 e Apêndice C). Esses resultados estão de acordo com dados previamente publicados que mostraram uma alta frequência de acetilação para glucuronoxilano extraído de faia (*aspen*), madeira (*birch*) e eucalipto na ausência de condições alcalinas (CHONG et al., 2011b; EVTUGUIN et al., 2003; KABEL; SCHOLS; VORAGEN, 2002; TELEMAN et al., 2000).

Após a hidrólise com a endoxilanase GH11, os únicos oligossacarídeos não-acetilados detectados foram pentotriose, pentotetrose e pentopentose. Os demais oligossacarídeos foram acetilados, começando por derivados mono- ou di-O-acetil até derivados com número de grupos acetil superior ao número de pentoses. Somente um oligossacarídeo foi detectado com substituição de MeGlcA.

A eliminação dos grupos acetil da fração acetilada de bagaço de cana-de-açúcar com a enzima acetil-xilano esterase, bem como com a quimera FaeAxe, evidenciou a ação da enzima parental e da quimera sobre as acetilações presentes pelo desaparecimento da maioria dos oligossacarídeos após o tratamento com essas enzimas, em comparação com os oligossacarídeos presentes quando o substrato foi hidrolisado somente com a endoxilanase GH11. Os oligossacarídeos produzidos após o tratamento com Axe e FaeAxe limitaram-se a pento-oligômeros livres (Pent2, Pent3, Pent4, Pent5, Pent6), oligômeros monoacetilados (Pent4Ac, Pent5Ac, Pent6Ac, Pent7Ac, Pent9Ac) e no caso dos oligômeros com substituições de ácido metil-glucurônico, oligômeros mono-, di- e triacetilados (Tabela 9 e Apêndices D e E).

Tabela 9. Adutos de Na⁺/NH₄⁺ dos oligossacarídeos gerados pelas enzimas Axe e quimera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir do substrato arabinoxilano acetilado de cana-de-açúcar

Oligossacarídeos	Adutos de Na ⁺ /NH ₄ ⁺ dos íons moleculares		
	Xil	Xil+Axe	Xil+FaeAxe
Pent2		300	300
Pent3	432	432/437	432/437
Pent4	569	564/569	564/569
Pent5	701	696	696
Pent6		828	828
Pent3Ac	474	479	479
Pent4Ac	606		
Pent4Ac2	648		
Pent5Ac	738	738	738
Pent5Ac2	780		
Pent5Ac3	822		
Pent5Ac6			953
Pent6Ac		870	
Pent6Ac2	912		
Pent6Ac3	954		
Pent6Ac4	996		
Pent7Ac		1002	1002
Pent7Ac2	1044		
Pent7Ac3	1086		
Pent7Ac4	1128		
Pent7Ac5	1170		
Pent8Ac3	1218		
Pent8Ac4	1260		
Pent8Ac5	1302		
Pent9Ac			1271
Pent9Ac3	1350		
Pent9Ac4	1392		
Pent9Ac5	1434		
Pent3MeGlcAAc			664
Pent4MeGlcAAc		796	
Pent5MeGlcAAc2	975		
Pent6MeGlcAAc		1060	1060
Pent7MeGlcAAc	1192	1192	1192
Pent7MeGlcAAc2		1234	1234
Pent6FA2Ac3		1311	1311

Abreviações: Pent= pentose (exemplo: xilose, arabinose); MeGlcA= ácido 4-O-metil-glucurônico; Ac= ácido acético; FA= ácido ferúlico

A possível localização dos grupos acetil resistentes ao tratamento com a acetil-xilano esterase e com a quimera FaeAxe pode ser proposta com base no conhecimento da atividade desse domínio em substratos acetilados artificiais (BIELY; MASTIHUBOVÁ; PUCHART, 2007; BIELY, 2012), conhecimento sobre a necessidade do grupo hidroxil adjacente ao sítio de desacetilação (BIELY; MASTIHUBOVÁ; PUCHART, 2007; BIELY et al., 2003; TAYLOR et al., 2006), e possibilidade de migração espontânea de grupos acetil no anel de xilose (MASTIHUBOVÁ; BIELY, 2004).

A acetil-xilano esterase de *Clostridium thermocellum*, junto com as outras enzimas da família CE4, são aspartato-metaloenzimas e diferem das outras famílias CE no seu modo de ação. Estudos realizados com derivados monoacetilados de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo mostraram que a desacetilação ocorre preferencialmente em grupos acetato presentes na posição 2 da xilose, seguida das posições 3 e 4, para as quais as atividades específicas foram 5 e 15 vezes menor, respectivamente (BIELY; MASTIHUBOVÁ; PUCHART, 2007). Essa enzima necessita de um grupo hidroxil adjacente livre para ser eficiente na hidrólise de grupos acetil., entretanto, essa enzima é significativamente ativada por Co^{2+} e a desacetilação de ambas as posições 2-O-acetil e 3-O-acetil é acelerada pela adição do íon. Essa ativação pelo íon só ocorre em substratos que possuem um grupo hidroxil adjacente livre, dessa forma, a não ativação pela adição do íon também ocorre com substratos nos quais ambas as posições 2 e 3 estão acetiladas. A presença de um grupo hidroxil nas posições 2 ou 3 é um pré-requisito não só para uma eficiente desacetilação de posições vizinhas mas também para a ativação da enzima com o íon cobalato (BIELY; MASTIHUBOVÁ; PUCHART, 2007; BIELY et al., 2003; TAYLOR et al., 2006).

A migração de grupos acetil é uma reação espontânea observada em carboidratos parcialmente acetilados em meio aquoso, e a taxa de migração pode variar com o pH (MASTIHUBOVÁ; BIELY, 2004). Essa reação não é acompanhada pela liberação do ácido acético na solução aquosa; ela envolve provavelmente a formação de um intermediário ortoéster entre os dois grupos hidroxil vizinhos (Figura 31) (BIELY, 2012).

Figura 31. Interconversão espontânea de grupos acetil. Interconversão espontânea dos derivados monoacetilados de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo devido à migração de grupos acetil através de intermediários ortoéster.

A dissolução de qualquer um dos três derivados monoacetilados de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo leva a um equilíbrio no qual o 4-acetato predomina, no entanto, a migração de grupos acetil entre as posições 2 e 3 pode ocorrer em resíduos xilopiranosil da cadeia principal de xilano em substratos naturais. Esse pressuposto é suportado pela distribuição semelhante dos grupos acetil entre as posições 2 e 3 no xilano e (POUVREAU et al., 2011). No caso de clivagem da ligação glicosídica entre um resíduo xilopiranosil acetilado pode ocorrer a migração do grupo acetil para a posição 4 do grupo hidroxil livre recém formado, o qual estava originalmente envolvido na ligação glicosídica. Dessa forma, os monoacetatos resistentes correspondem mais provavelmente a oligossacarídeos com resíduos de xilose da extremidade não-redutora acetilados na posição 4-O, que são resultado da migração espontânea de grupos acetil da posição 3-O (BIELY et al., 2013a; UHLIARIKOVÁ et al., 2013).

Esses resultados evidenciam a ação de hidrólise de ambas as enzimas acetil-xilano esterase e quimera FaeAxe na desacetilação desse substrato, no entanto, parecem não existir diferenças no padrão de hidrólise entre a enzima parental acetil-xilano esterase e a quimera (Tabela 9).

4.13. Análise do padrão de clivagem da feruloil esterase e da quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) após hidrólise com a endoxilanase GH11

O modo de ação da enzima Fae e da quimera FaeAxe foi examinado a partir de uma mistura de oligossacarídeos gerados pela endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis* a partir do substrato comercial arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda). As análises dos espectros de massa indicam que o material liberado pela endoxilanase consistem principalmente de pento-oligossacarídeos, oligossacarídeos com substituições de ácido metil-glucurônico (MeGlcA), oligossacarídeos acetilados e com substituições por grupos feruloil (Tabela 10 e Apêndice F). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Sorensen e colaboradores (2007) após a hidrólise do mesmo substrato pela enzima β -xilosidase de *Trichoderma reesei* e a preparação fúngica hemicelulolítica de *Humicola insolens* (Ultraflo L). O tamanho dos pento-oligossacarídeos variou de 2 até 9 resíduos de xilose, e esses foram mais abundantes quando comparados com os pento-oligômeros substituídos.

O tratamento do substrato arabinoxilano insolúvel de trigo com a enzima feruloil esterase e com a quimera FaeAxe mostraram que tanto a enzima feruloil esterase (Fae) quanto a quimera FaeAxe não foram capazes de remover os grupos feruloil dos oligossacarídeos gerados pela endoxilanase, visto que todos os oligossacarídeos substituídos por grupos feruloil continuam presentes mesmo depois do tratamento com as enzimas. (Tabela 10 e Apêndices G e H).

Tabela 10. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados pela enzima Fae e quimera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir do substrato arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*)

Oligossacarídeos	Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos íons moleculares		
	Xil	Xil+Fae	Xil+FaeAxe
Pent2	305	300/305	300/305
Pent3	437	432/437	432/437
Pent4	569	564	564
Pent5	701	696/701	696/701
Pent6	833	828/833	828/833
Pent7	965	960/965	960/965
Pent8	1097	1092	1092
Pent9	1229	1224	1224
Pent10		1356	1356
Pent11		1488	1488
Pent9Ac2	1308		
Pent5MeGlcA	891		
Pent7MeGlcA		1150	1150
Pent8MeGlcA		1282	1282
Pent9MeGlcA		1414	1414
Pent2MeGlcAAc			532
Pent2MeGlcAAc3		621	621
Pent3MeGlcAAc			664
Pent3MeGlcAAc3		753	753
Pent4MeGlcAAc			796
Pent4MeGlcAAc3		885	885
Pent5MeGlcAAc3		1017	1017
Pent3Ac6FA2		1036	1036
Pent3Ac7FA2		1083	1083
Pent4FAAc	782		
Pent5Ac4FA2		1216	1216
Pent6Ac4FA2		1348	1348
Pent7Ac4FA2		1480	1480
Pent4FA	745	740	740
Pent5FA	877	872	872
Pent6FA	1009	1004	1004
Pent7FA		1136	1136

Abreviações: Pent= pentose (exemplo: xilose, arabinose); MeGlcA= ácido 4-O-metil-glucurônico; Ac= ácido acético; FA= ácido ferúlico

4.14. Análise do padrão de clivagem da feruloil esterase, acetil-xilano esterase e da quimera FaeAxe sobre o arabinoxilano solúvel e arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar após hidrólise com a endoxilanase GH11

O modo de ação das enzimas parentais acetil-xilano esterase e feruloil esterase e da quimera FaeAxe foi examinado a partir da mistura de oligossacarídeos gerados a partir dos substratos solúvel e insolúvel de parede de cana-de-açúcar pela endoxilanase GH11 de *Bacillus subtilis*.

Os produtos liberados pela endoxilanase nos dois substratos correspondem a pento-oligossacarídeos, oligossacarídeos acetilados, oligossacarídeos com substituições por grupos acetil e ácido metil glucurônico e oligossacarídeos substituídos por ácido ferúlico. No substrato arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar (Tabela 11 e Apêndice I), os produtos limitaram-se a pento-oligômeros livres, variando de 2 a 4 pentoses, oligômeros acetilados que variaram de mono- a tetraacetilados, oligômeros substituídos com MeGlcA foram mono- e tetraacetilados. Os oligômeros substituídos por ácido ferúlico apresentaram 5, 6, 7 e 9 pentoses e foram substituídos por um grupamento feruloil e 1 ou 2 grupamentos acetil. No substrato arabinoxilano solúvel de parede de cana-de-açúcar (Tabela 12 e Apêndice M) os oligossacarídeos resultantes da hidrólise pela endoxilanase foram bastante parecidos, pento-oligômeros livres, variando de 2 a 4 pentoses, oligômeros acetilados que variaram de monoacetilados até tetra-acetilados, oligômeros substituídos com MeGlcA foram monoacetilados. Os oligômeros substituídos por ácido ferúlico variaram de 5 a 9 pentoses e foram substituídos por um ou dois grupos feruloil e um ou dois grupos acetil.

Tabela 11. Adutos de Na⁺/NH₄⁺ dos oligossacarídeos gerados pelas enzimas Fae, Axe e químera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir de arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar gerados

Oligossacarídeos	Adutos de Na ⁺ /NH ₄ ⁺ dos íons moleculares			
	Xil	Xil+Axe	Xil+Fae	Xil+FaeAxe
Pent2	300	300/305	300/305	300/305
Pent3	432	432	432	432
Pent4	564	564	564	564
Pent5		696		696
Pent3Ac	474/479		474/479	
Pent3Ac2	516		516	
Pent4Ac	606/611		606/611	
Pent4Ac2	648		648	
Pent5Ac	738		738	
Pent5Ac2	780		780	
Pent5Ac3	822		822	
Pent6Ac3	954		954	
Pent6Ac4	996		996	
Pent7Ac4	1128		1128	
Pent2MeGlcAAc	532	532	532	532
Pent2MeGlcAAc4	663	663	663	663
Pent4MeGlcAAc	796/801	796/801	796/801	796/801
Pent5MeGlcAAc		928		928
Pent6MeGlcAAc		1060		1060
Pent5FAAc	914		914	
Pent6FA Ac	1046		1046	
Pent6FA Ac2	1088		1088	
Pent7FAAc2	1220		1220	
Pent9FA2Ac	1623	1623	1623	1623
Pent8MeGlcAFA		1463	1463	1463
Pent5FA		872	1463	872
Pent6FA		1004	1463	1004

Abreviações: Pent= pentose (exemplo: xilose, arabinose); MeGlcA= ácido 4-O-metil-glucurônico; Ac= ácido acético; FA= ácido ferúlico

O tratamento de ambos os substratos com a enzima parental acetil-xilano esterase (Tabelas 11 e 12, Apêndices J e O) evidenciou a ação dessa enzima sobre as acetilações presentes pelo desaparecimento de picos referentes a oligossacarídeos acetilados, em comparação com os picos presentes quando o substrato foi hidrolisado somente pela endoxilanase GH11. Isso também foi observado para a químera FaeAxe (Tabelas 11 e 12, Apêndices L e P). No entanto, a desacetilação, tanto pela enzima parental quanto pela químera acontece raramente quando o oligossacarídeo também é substituído por MeGlcA. Nesse caso,

um mecanismo adicional de resistência é óbvio: a presença de um substituinte MeGlcA em ligação α -1,2 com o resíduo xinopiranosil impede a desacetilação de grupamentos acetil na posição 3, devido à necessidade de um grupamento hidroxil adjacente para a desacetilação, como já descrito anteriormente (BIELY et al., 2013a).

Tabela 12. Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos oligossacarídeos gerados pela pelas enzimas Fae, Axe e quimera FaeAxe após hidrólise pela endoxilanase GH11 a partir de arabinoxilano solúvel de parede de cana-de-açúcar

Oligossacarídeos	Adutos de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ dos íons moleculares			
	Xil	Xil+Axe	Xil+Fae	Xil+FaeAxe
Pent2	300/305	300/305	300/305	300/305
Pent3	432/437	432/437	432/437	432/437
Pent4	564	564	564	564
Pent5		696		696
Pent3Ac	474/479		474/479	
Pent4Ac	606/611		606/611	
Pent4Ac2	648		648	
Pent4Ac3	690		690	
Pent5Ac	738		738	
Pent5Ac2	780		780	
Pent5Ac3	822		822	
Pent5Ac4	864			
Pent6Ac3	954		954	
Pent6Ac4	996		996	
Pent7Ac4	1128		1128	
Pent2MeGlcAAc	532	532	532	532
Pent3-MeGlcAAc				664
Pent4MeGlcAAc		796		796
Pent5MeGlcAAc		928		928
Pent6MeGlcAAc		1060		
Pent5AcFA	914		914	
Pent6AcFA	1046		1046	
Pent6Ac2FA	1088		1088	
Pent7Ac2FA	1220			
Pent9AcFA2	1623	1623	1623	1623
Pent4FA		740	740	740
Pent5FA		872	872	872
Pent6FA		1004	1004	1004
Pent8MeGlcAFA		1463	1463	1463

Abreviações: Pent= pentose (exemplo: xilose, arabinose); MeGlcA= ácido 4-O-metil-glucurônico; Ac= ácido acético; FA= ácido ferúlico

O tratamento dos substratos arabinoxilano solúvel e insolúvel de parede de cana-de-açúcar com a enzima feruloil esterase (Tabelas 11 e 12, Apêndices K e N) mostrou que oligômeros substituídos por ácido ferúlico não desaparecem depois do tratamento com Fae. Para a quimera FaeAxe (Tabelas 11 e 12, Apêndices L e P), a maioria dos oligômeros substituídos com grupos feruloil e grupos acetil desaparecem após o tratamento com FaeAxe. Esse fato se deve à ação do domínio acetil-xilano esterásico da quimera, que removeu os grupos acetil dos oligossacarídeos.

A estrutura tridimensional da enzima feruloil esterase contém a tríade catalítica Ser-His-Asp. Esses resíduos são também encontrados como resíduos catalíticos em estruturas de feruloil esterases homólogas a Fae (Xyn10B) de *C. thermocellum* e presume-se que essa enzima realiza a hidrólise do substrato através da formação e posterior quebra de um intermediário covalente acil-enzima (SCHUBOT et al., 2001) (Figura 32).

Figura 32. Mecanismo catalítico da feruloil esterase. Mostrado para FAX₃. Após a ligação do substrato, a serina é ativada pela histidina, que permite que o ataque nucleofílico do carbono carbonil do substrato. O intermediário tetraédrico resultante é estabilizado por meio de interações com dois grupos NH da cadeia principal de dois aminoácido do bolsão catalítico. A histidina doa um próton para a formação do componente álcool do substrato, o que leva à formação de um segundo intermediário covalente: o "acil-enzima". Uma molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina, resultando em um ataque nucleofílico ao carbono carbonil e liberação do componente ácido do substrato. Adaptado de PRATES et al., 2001a.

Estudos de cristalografia mostraram que na estrutura de Fae, a serina do sítio catalítico está presente em uma forma modificada, que parece ser um grupamento fosfato ou sulfato. Dados de MALDI-MS revelaram que aproximadamente 95% da amostra de Fae apresenta essa modificação pós-traducional, com uma massa de 80,3 kDa (PRATES et al., 2001a). Esses dados explicam a ausência de atividade dessa enzima nos ensaios apresentados.

4.15. Caracterização dos oligossacarídeos substituídos por grupos acetil através de MS/MS

Os pento-oligossacarídeos Pent₄Ac, com razão m/z 606 (M + NH⁴⁺) ou 611 (M + Na⁺) e Pent₄Ac₂, com razão m/z 648 (M + NH⁴⁺) ou 653 (M + Na⁺) foram analisados por MS/MS como descrito no item 3.7. Os espectros de MS/MS obtidos para os referidos pento-oligossacarídeos citados são mostrados na Figura 33.

Levando em consideração o íon 611 (Figura 33A), supondo se tratar de um oligossacarídeo com uma cadeia linear composta por quatro resíduos de xilose, o grupo acetil pode estar localizado em oito possíveis locais, o que significa que oito possíveis isômeros de massa contribuíram para a abundância relativa total do íon [Xil₄Ac+Na⁺]. Da mesma maneira, o íon 653 [Xil₄Ac₂+Na⁺] (Figura 33B), possui isômeros de massa que contribuíram para sua abundância relativa total.

A liberação de um resíduo de xilose não substituído a partir da extremidade redutora ocorre pela perda de 150 Da (Xil_{red}), enquanto a liberação de um resíduo de xilose a parte da extremidade não-redutora ocorre pela perda de 132 Da. Se o resíduo de xilose da extremidade redutora for substituído, ocorre a perda de 192 Da; e se o resíduo substituído estiver na extremidade não-redutora, ocorre a perda de 174 Da. A identificação de um grupamento acetil ocorre pela perda de 42 Da. Não é possível diferenciar a posição do grupo acetil em C-2 ou C-3, exceto quando esse grupo está ligado à xilose da extremidade redutora. Nesse caso, a perda de 102 Da indica que o grupo acetil está na posição C-2 da xilose da extremidade redutora. Os espectros de MS/MS da Figura 33 mostraram a presença de um íon formado pela perda de 60 Da a partir do íon precursor. Esse fragmento CH₃CO₂H ocorre devido a presença de grupo acetil (REIS et al., 2005).

Figura 33. Espectros de MS/MS dos xilooligossacarídeos com um e dois grupos O-acetil (Xil_4Ac_n). (A) íon m/z 611 (Xil_4Ac). (B) íon m/z 653 (Xil_4Ac_2).

Nos espectro de MS/MS para Xil₄Ac foi possível observar íons formados pela perda de um resíduo de xilose da extremidade redutora (150 Da) e extremidade não-redutora (132 Da) que confirmam a presença de isômeros com o resíduo de xilose terminal livre de grupos acetil. Íons com m/z 197 mostram a presença de isômeros com o grupo acetil na extremidade não-redutora.

Embora todos os isômeros não possam ser diferenciados por MS/MS, algumas possíveis localizações dos grupos acetil podem ser propostas. No espectro de MS/MS para Xil₄Ac₂, íons formados devido à perda de Xil_{red}Ac (formando m/z 461 a partir de m/z 653) e íons formados devido à perda de XilAc (formando m/z 479 a partir de m/z 653) sugerem a presença de isômeros com um grupamento acetil na extremidade redutora e isômeros com um grupamento acetil na extremidade não-redutora, respectivamente. A presença de íons formados devido à perda de Xil_{red}Ac₂ (formando m/z 419 a partir de 653) sugere a presença de isômeros contendo os dois grupamentos acetil no mesmo resíduo de xilose da extremidade redutora. A ausência de íon formado devido perda de XilAc₂ (que formaria m/z 437 a partir de 653) sugere que não há isômeros com os dois grupamentos acetil no mesmo resíduo de xilose da extremidade não-redutora.

5. CONCLUSÕES

A enzima quimérica com os domínios com atividade feruloil esterase e acetil-xilano esterase foi construída com sucesso através da técnica de *overlap PCR*, fato que pode ser evidenciado pela expressão da proteína heteróloga. No entanto, a quimera não pôde ser expressa na forma solúvel em bactérias *E. coli* Rosetta DE3 quando clonada em pET28a, mas quando clonada em PETSUMO, cerca de 50% da proteína apresentou-se na forma solúvel.

A análise dos substratos comerciais Xilano de *birch wood* (Sigma – St. Louis, EUA), xilano de *beechwood* (Sigma – St. Louis, EUA), xilano de *oat spelts* (Sigma – St. Louis, EUA) e Arabinoxilano de trigo de baixa viscosidade (*Wheat low viscosity*) (Megazyme – Bray, Irlanda) parecem apresentar poucas substituições com acetil, bem como com grupamentos feruloil, o que tornou-os pouco interessantes às enzimas em questão neste trabalho, quando comparados com o arabinoxilano acetilado extraído de bagaço de cana-de-açúcar.

A extração do arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar mostrou-se bem-sucedida, uma vez que íons moleculares com massas-carga referentes a oligossacarídeos acetilados foram abundantes nos espectros de massa. O substrato comercial arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan* - Megazyme – Bray, Irlanda) mostrou substituições com grupos acetil, bem como com grupos feruloil, mostrando que ambos os substratos poderiam ser passíveis à degradação pelas enzimas Axe, Fae e FaeAxe.

A enzima parental acetil-xilano esterase de *C. thermocellum* e a quimera FAeAxe mostraram-se ativas na desacetilação dos substratos testados, embora tenham sido inativas na desacetilação de oligossacarídeos substituídos por MeGlcA. A enzima feruloil esterase e a quimera FaeAxe mostraram pouca ou quase nenhuma atividade de hidrólise de ácido ferúlico sobre os substratos testados.

Parece que nenhuma diferença no padrão de hidrólise dos substratos ocorreu quando comparados os domínios parentais com a quimera.

Através dos experimentos de MS/MS é possível propor algumas possíveis localizações de grupos acetil nos oligossacarídeos em questão (no caso, analisados m/z 611 e m/z 653), no entanto, não é possível diferenciar todos os isômeros presentes na amostra.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLAKHA, N. et al. Synthesis and characterization of chimeric proteins based on cellulase and xylanase from an insect gut bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4859–4866, 2011.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–61, jul. 2010.

ARRUDA, L. M. **Construção e caracterização de enzimas quiméricas multifuncionais para despolimerização de materiais hemicelulósicos**. [s.l: s.n.].

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273–2282, nov. 2009.

BENTSEN, N. S.; FELBY, C. Biomass for energy in the European Union - a review of bioenergy resource assessments. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 25, 2012.

BERNDES, G.; HOOGWIJK, M.; VAN DEN BROEK, R. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 1, p. 1–28, jul. 2003.

BIELY, P. et al. Cooperativity of Esterases and Xylanases in the Enzymatic Degradation of Acetyl Xylan. **Bio/Technology**, v. 4, n. 8, p. 731–733, ago. 1986.

BIELY, P. et al. Mode of action of acetylxyylan esterase from *Streptomyces lividans*: A study with deoxy and deoxy-fluoro analogues of acetylated methyl β -D-xylopyranoside. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1622, n. 2, p. 82–88, 2003.

BIELY, P. et al. Enzyme-coupled assay of acetylxyylan esterases on monoacetylated 4-nitrophenyl β -D-xylopyranosides. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 1, p. 109–115, 2004.

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1575–1588, 2012.

BIELY, P. et al. Mode of action of acetylxytan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 11, p. 5075–5086, 2013a.

BIELY, P. et al. Mode of action of acetylxytan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 11, p. 5075–86, nov. 2013b.

BIELY, P. et al. Trichoderma reesei CE16 acetyl esterase and its role in enzymatic degradation of acetylated hemicellulose. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 1, p. 516–25, jan. 2014.

BIELY, P.; MASTIHUBOVÁ, M.; PUCHART, V. The vicinal hydroxyl group is prerequisite for metal activation of Clostridium thermocellum acetylxytan esterase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1770, n. 4, p. 565–70, abr. 2007.

BLAIR, D. E. et al. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15429–34, 25 out. 2005.

BLAIR, D. E.; VAN AALTEN, D. M. F. Structures of Bacillus subtilis PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetyl-glucosamine. **FEBS letters**, v. 570, n. 1-3, p. 13–9, 16 jul. 2004.

BLUM, D. L. et al. Feruloyl Esterase Activity of the Clostridium thermocellum Cellulosome Can Be Attributed to Previously Unknown Domains of XynY and XynZ. v. 182, n. 5, p. 1346–1351, 2000.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 519–46, 28 jan. 2003.

BOHN, P. J.; FALES, S. L. Effect of two pre-treatments on phenolic acid yield in three forage species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, n. 3, p.

347–354, 1991.

BRYKSIN, A. V; MATSUMURA, I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. **BioTechniques**, v. 48, n. 6, p. 463–5, jun. 2010.

BUSSE-WICHER, M. et al. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. p. 492–506, 2014.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D233–8, jan. 2009.

CARROLL, A.; SOMERVILLE, C. Cellulosic Biofuels. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 165–182, jun. 2009.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 415–431, 5 set. 2013.

CHONG, S.-L. et al. Feasibility of using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization with ion trap mass spectrometry in the analysis of acetylated xylooligosaccharides derived from hardwoods and *Arabidopsis thaliana*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 9, p. 2995–3009, 2011a.

CHONG, S.-L. et al. Feasibility of using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization with ion trap mass spectrometry in the analysis of acetylated xylooligosaccharides derived from hardwoods and *Arabidopsis thaliana*. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 401, n. 9, p. 2995–3009, nov. 2011b.

DE VRIES, R. P. et al. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

DOI, R. H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 541–51, 1 jul. 2004.

EVTUGUIN, D. et al. Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 597–604, mar. 2003.

FAN, Z. et al. Multimeric hemicellulases facilitate biomass conversion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1754–1757, 2009.

FAN, Z.; YUAN, L. Production of multifunctional chimaeric enzymes in plants: a promising approach for degrading plant cell wall from within. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 3, p. 308–15, abr. 2010.

FERNANDES, A. C. et al. and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. v. 110, p. 105–110, 1999.

FONSECA-MALDONADO, R. et al. Synergistic action of co-expressed xylanase/laccase mixtures against milled sugar cane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 1152–1161, jul. 2014.

FURTADO, G. P. et al. A designed bifunctional laccase/ β -1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. **Protein engineering, design & selection : PEDS**, v. 26, n. 1, p. 15–23, 2013a.

FURTADO, G. P. et al. A designed bifunctional laccase/ β -1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. **Protein engineering, design & selection : PEDS**, v. 26, n. 1, p. 15–23, jan. 2013b.

FURTADO, G. P. et al. Enhanced xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase efficiency in an engineered CBM44-XegA chimera. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 5095–5107, 2015.

FURTADO, G. P.; RIBEIRO, L. F.; LOURENZONI, M. R. enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. v. 26, n. 1, p. 15–23, 2013.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005.

GHOSH, D. et al. Multiple conformations of catalytic serine and histidine in acetylxyylan esterase at 0.90 Å. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11159–66, 6 abr. 2001.

GLASS, N. L. et al. Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi. 2013.

GONÇALVES, V. M. F.; EVTUGUIN, D. V; DOMINGUES, M. R. M. Structural characterization of the acetylated heteroxylan from the natural hybrid *Paulownia elongata*/*Paulownia fortunei*. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 2, p. 256–66, 4 fev. 2008.

GONG, Y. Y. et al. Cloning, expression of a feruloyl esterase from *Aspergillus usamii* E001 and its applicability in generating ferulic acid from wheat bran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 12, p. 1433–1441, 2013.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714–23, dez. 1997.

HECKMAN, K. L.; PEASE, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 924–32, jan. 2007.

HUA, Y.-W. et al. Fusion of *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II with the raw-starch-binding domain of *Bacillus* sp. strain TS-23 alpha-amylase generates a chimeric enzyme with enhanced thermostability and catalytic activity. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 273–7, jul. 2004.

KABEL, M. .; SCHOLS, H. .; VORAGEN, A. G. . Complex xylo-oligosaccharides identified from hydrothermally treated *Eucalyptus* wood and brewery's spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 2, p. 191–200, nov. 2002.

KIM, G. J.; LEE, D. E.; KIM, H. S. Construction and evaluation of a novel bifunctional N-carbamylase-D-hydantoinase fusion enzyme. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2133–8, maio 2000.

KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, fev. 1993.

KOUTANIEMI, S. et al. Substituent-specific antibody against glucuronoxylan reveals

close association of glucuronic acid and acetyl substituents and distinct labeling patterns in tree species. p. 739–751, 2012.

KULKARNI, A. R. et al. Comparison of Arabinoxylan Structure in Bioenergy and Model Grasses. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 222–229, 2012.

MASTIHUBOVÁ, M.; BIELY, P. Lipase-catalysed preparation of acetates of 4-nitrophenyl beta-D-xylopyranoside and their use in kinetic studies of acetyl migration. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 7, p. 1353–60, 17 maio 2004.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 37–46, maio 2002.

MORRIS, A. L. et al. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, v. 12, n. 4, p. 345–64, abr. 1992.

MUSSATTO, S. I. et al. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124–129, ago. 2008.

NARAN, R. et al. Extraction and characterization of native heteroxylans from delignified corn stover and aspen. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 661–675, 9 jun. 2009.

PAN, X. et al. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 851–61, 5 ago. 2006.

PAPA, G. et al. Comparison of different pretreatments for the production of bioethanol and biomethane from corn stover and switchgrass. **Bioresource technology**, v. 183, p. 101–10, 2015.

PE, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin : an overview. p. 53–63, 2002.

POUVREAU, L. et al. Characterization and mode of action of two acetyl xylan esterases from *Chrysosporium lucknowense* C1 active towards acetylated xylans. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 3, p. 312–320, 2011.

PRATES, A. M. et al. The Structure of the Feruloyl Esterase Module of Xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* Provides Insights into Substrate Recognition. v. 9, n. 01, p. 1183–1190, 2001a.

PRATES, J. A M. et al. The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. **Structure**, v. 9, n. 12, p. 1183–1190, 2001b.

PROZIL, S. O. et al. Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L. **Carbohydrate research**, v. 356, p. 252–9, 15 jul. 2012.

RALPH, J. et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1-2, p. 29–60, 2004.

REIS, A. et al. Electrospray tandem mass spectrometry of underivatized acetylated xylo-oligosaccharides. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 23, p. 3589–3599, 2005.

RHODES, D. I.; SADEK, M.; STONE, B. A. Hydroxycinnamic Acids in Walls of Wheat Aleurone Cells. **Journal of Cereal Science**, v. 36, n. 1, p. 67–81, jul. 2002.

RIBEIRO, L. F. et al. Engineering Bifunctional Laccase-Xylanase Chimeras for Improved Catalytic Performance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43026–43038, 2011a.

RIBEIRO, L. F. et al. Engineering bifunctional laccase-xylanase chimeras for improved catalytic performance. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43026–38, 16 dez. 2011b.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of molecular biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, 5 dez. 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263–89, jan. 2010.

SCHUBOT, F. D. et al. Structural Basis for the Substrate Specificity of the Feruloyl Esterase Domain of the Cellulosomal Xylanase Z from *Clostridium thermocellum* †. p. 12524–12532, 2001.

SELIG, M. J. et al. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 711–722, 2009.

SHEVCHUK, N. A et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 2, p. e19, jan. 2004.

SLAVOV, G.; ALLISON, G.; BOSCH, M. Advances in the genetic dissection of plant cell walls: tools and resources available in *Miscanthus*. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. July, p. 217, jan. 2013.

SØRENSEN, H. R.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 908–918, mar. 2007a.

SØRENSEN, H. R.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Characterization of solubilized arabinoxyl-oligosaccharides by MALDI-TOF MS analysis to unravel and direct enzyme catalyzed hydrolysis of insoluble wheat arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1-2, p. 103–110, jul. 2007b.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, maio 2002.

TAYLOR, E. J. et al. Structure and activity of two metal ion-dependent acetylxylan esterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to peptidoglycan deacetylases. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 16, p. 10968–75, 21 abr. 2006.

TELEMAN, A. et al. Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan

isolated from aspen employing ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 329, n. 4, p. 807–815, dez. 2000.

TUYET LAM, T. B.; IIYAMA, K.; STONE, B. A. Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1179–1183, abr. 1992.

UHLIARIKOVÁ, I. et al. Positional specificity of acetylxylen esterases on natural polysaccharide: An NMR study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3365–3372, 2013.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477–92, set. 2011.

VINUEZA, N. R. et al. Analysis of xyloglucans by ambient chloride attachment ionization tandem mass spectrometry. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 1203–13, 15 out. 2013.

VRIES, R. P. DE; VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

WANG, L. et al. A feruloyl esterase (FAE) characterized by relatively high thermostability from the edible mushroom *russula virescens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 993–1003, 2014.

WILLIAMSON, G.; FAULDS, C. B.; KROON, P. A. Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. **Biochemical Society transactions**, v. 26, n. 2, p. 205–9, maio 1998.

WONG, D. W. S. et al. Cloning of a novel feruloyl esterase gene from rumen microbial metagenome and enzyme characterization in synergism with endoxylanases. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 3-4, p. 287–95, abr. 2013.

XIONG, G.; CHENG, K.; PAULY, M. Xylan O-acetylation impacts xylem development

and enzymatic recalcitrance as indicated by the Arabidopsis mutant tbl29. **Molecular plant**, v. 6, n. 4, p. 1373–5, jul. 2013.

XUE, Y. et al. Construction of the trifunctional enzyme associating the Thermoanaerobacter ethanolicus xylosidase-arabinosidase with the Thermomyces lanuginosus xylanase for degradation of arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 1, p. 22–27, 2009.

ZHANG, K. et al. Lignocellulosic biomass gasification technology in China. **Renewable Energy**, v. 49, p. 175–184, jan. 2013.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise pela endoxilanase GH11. **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

APÊNDICE B – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) após hidrólise pela endoxilanase GH11. **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 min (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um zoom da região com m/z correspondente.

APÊNDICE C – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise pela endoxilanase GH11. **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

APÊNDICE D – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise pela endoxilanase GH11 e acetil-xilano esterase de *C. thermocellum* (Axe). **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e Axe. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e Axe. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

APÊNDICE E – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano acetilado de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise pela endoxilanase GH11 e quimera FaeAxe. **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um zoom da região com m/z correspondente.

APÊNDICE F – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) após hidrólise pela endoxilanase GH11. **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um zoom da região com m/z correspondente.

APÊNDICE G – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e FaeAxe. **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

APÊNDICE H – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de trigo (*Insoluble wheat arabinoxylan*) (Megazyme – Bray, Irlanda) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e Fae. **A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e Fae. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e Fae. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.**

APÊNDICE I – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano solúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11. A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). B, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

B

APÊNDICE J – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano solúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e Axe. **A**, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e Axe. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). **B**, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e Axe. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

APÊNDICE K – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano solúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e Fae. A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e Fae. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). B, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e Fae. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

APÊNDICE L – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano solúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e FaeAxe. A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). B, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um zoom da região com m/z correspondente

APÊNDICE M – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11. A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). B, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um *zoom* da região com m/z correspondente.

APÊNDICE N – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e Fae. A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e Fae. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). B, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e Fae. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um zoom da região com m/z correspondente.

APÊNDICE O – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e Axe. A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e Axe. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). B, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e Axe. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um zoom da região com m/z correspondente.

APÊNDICE P – Cromatograma e espectro de massas do arabinoxilano insolúvel de parede de cana-de-açúcar (Cedido por Marco Aurélio Silva Tiné - Instituto de Botânica de São Paulo) após hidrólise pela endoxilanase GH11 e FaeAxe. A, Cromatograma da amostra após digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. Os oligômeros de interesse são eluídos com um tempo de retenção de cerca de 3 minutos (*). B, Espectros da relação m/z dos íons moleculares obtidos da amostra após a digestão com a endoxilanase GH11 e FaeAxe. O espectro mostra a relação m/z dos íons moleculares *versus* a abundância relativa dos íons na amostra referentes ao pico de eluição com um tempo de retenção em torno de 3 minutos (*) após cromatografia líquida. Na parte superior, um zoom da região com m/z correspondente.