UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ERICK GIANCARLO SUCLUPE FARRO

Caracterização estrutural e bioquímica das arabinanases de Bacillus licheniformis

> São Carlos 2016

ERICK GIANCARLO SUCLUPE FARRO

Caracterização estrutural e bioquímica das arabinanases de Bacillus licheniformis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física aplicada Opção: Biomolecular. Orientador: Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento Co-Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

Versão Corregida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos 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.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

> Suclupe Farro, Erick Giancarlo Caracterização estrutural e bioquímica das arabinanases de Bacillus licheniformis / Erick Giancarlo Suclupe Farro; orientador Alessandro Silva Nascimento; co-orientador Richard Charles Garratt - versão corrigida -- São Carlos, 2016. 109 p. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Computacional) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016. 1. Bacillus licheniformis. 2. Hidrolases de glicosídeos familia 43. 3. Arabinanases. 4. Endo-arabinanases.. I. Silva Nascimento, Alessandro, orient. II. Garratt, Richard Charles, co-orient. III. Título.

Dedico este trabalho a meus pais Willy e Delia pelo apoio constante; a meu irmão por ver em mim um exemplo a seguir, a minha esposa Marcia pela compreensão e amor, e a meus filhos Thiago, Missael e Erick por ser a base de minha força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e bondades que me oferece dia a dia.

A meus pais Willy e Delia, obrigado pelo amor e cultivar em mim a humildade, a perseverança e sempre ter o desejo de êxito na vida. Obrigado pelos conselhos e ânimos que apesar da distância nunca ficamos longe.

Ao meu irmão Gabriel (Labi), obrigado por tua paciência e admiração. Obrigado por todas essas chamadas de atenção que, apesar da curta idade, possui a maturidade de um homem.

À minha esposa Marcia, obrigado por suportar todos esses dias que pareciam intermináveis, por cuidar de nossos filhos, e manter a ordem em casa durante esta longa ausência; obrigado pelo amor e carinho incondicional e por ficar sempre ao meu lado.

Aos meus filhos Thiago, Missael e Erick, obrigado por fazer com que meus dias sejam felizes. Obrigado por ser minha razão de viver e obrigado por me dar a oportunidade de conhecer a pureza do seu amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento, obrigado por ter a coragem de aceitar-me como seu aluno sem conhecer-me, obrigado pela confiança depositada e compartilhar momentos gratos não só como professor também como um valioso amigo. Obrigado pela amizade

Ao Prof. Dr. Richard Garratt, obrigado pela confiança e amizade. Não poderia ter melhor aliado que você para iniciar esta carreira.

Ao Prof. Igor Polikarpov, obrigado pela disponibilidade da infraestrutura, onde foi possível realizar o trabalho.

À Dra. Livia Manzine, obrigado pela ajuda no laboratório e auxiliar-me a cada momento no laboratório.

Ao Prof Dr. Milton Sonoda, obrigado por me lembrar que a constância é parte da ciência e pelo dito que sempre me lembrarei: "sangue nos olhos"

À Dra. Amanda Bernarbes, pelas medidas no thermofluor.

Ao Dr. Marco Kadowaki, pela ajuda com as medidas no espectrômetro de massas.

À Dra. Renata Florindo pelas discussões no projeto.

Ao Prof, Dr. Pedro Chimoy Effio, por ser parte de minha formação e ensinar-me o começo da vida científica, pelos conselhos e estar no momento em que precise de um amigo.

Ao meu amigo Diego Leonardo, por virar em mais que um amigo em um irmão com quem posso confiar.

A minhas amigas Paola, Fernanda, Mery, Taty e a toda essa galera peruana que formou nestes dois anos: Juan, Daniel, Roger, Wolfrang, Johan e Jhonson, que fizerem que me sinta como em casa.

Ao meu amigo João Victor, essa pessoa que me escuto e apoio em momentos que achava que não dava mais, que me deu palavras de alento para continuar, pelas conversas científica produtivas. E por ajudar-me a que meus tempos livres virem mais improdutivo e divertido.

Aos amigos da sala 09, Heloisa, Karina, Èrika, Lilian e Mariana, por aqueles momentos em que os dias de trabalho viravam em conversas sem sentido. E por formar por que fizerem que meus dias aqui sejam como em casa.

Aos amigos da sala 08, Atílio, Caio, Danilo, Aline, Graziele, Evandro, Bruno, com quem compartilhamos o trabalho a diário.

Ao pessoal do serviço de pós-graduação, Sílvio e Ricardo, pela atenção e dedicação.

Ao IFSC pela infraestrutura.

À FAPESP pelo apoio financeiro, bolsa de mestrado concedida no qual permitiu o desenvolvimento do projeto.

"Quien vive de prisa no vive de veras"

(José Santos Chocano) Escritor peruano

RESUMO

SUCLUPE FARRO, E. G. Caracterização estrutural e bioquímica das arabinanases de *Bacillus licheniformis.* 2016. 108 p. Dissertação (Mestrado em ciencias) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

As mudanças climáticas estão causando prejuízos em vários setores da economia mundial. Na reunião da COP21, que teve como foco estas mudanças climáticas, participantes do mundo todo decidiram tomar atitudes urgentes para tentar conter aumento da temperatura média global. Dentro deste cenário, a produção e o consumo de energia têm uma importância central, onde fontes de energia renováveis vêm sendo preferidas às fontes de energias fósseis. O Brasil tem uma participação importante na geração de energia renovável mundial aportando um 40% do total de sua matriz energética. A degradação dos componentes da parede celular vegetal tem um vasto potencial na geração de biocombustíveis e outros compostos "verdes" a partir da celulose, hemicelulose e lignina. Para isto estudos das enzimas capazes de degradas estes componentes vem sendo realizados, com ênfase nas enzimas hidrolases de glicosídeos. Dentre as hidrolases, encontram-se as arabinanases, enzimas capazes de hidrolisar o arabinano, componente polissacídeo da hemicelulose, em L-arabinose. Neste trabalho, estudos envolvendo duas arabinanases de Bacillus licheniformis foram realizados, iniciando na etapa de clonagem dos genes. Os produtos foram transformados em Escherichia coli e expressos e purificados. A avaliação da estabilidade térmica indicou uma afinidade das enzimas por metais divalentes. Tentativas de cristalização resultaram na formação de um cristal, que possibilitou a determinação da estrutura uma das arabinanases. Através de ensaios bioquímicos, foi determinada a especificidade por substrato, temperatura e pH ótimos e a atividade frente a metais. Foi observado que as enzimas são seletivas para arabinano não ramificado, tem temperatura ótima em 45 e 40 graus, para BIAbn-1 e BIAbn-2, respectivamente, e pH ótimo em 8 e 7. Por último, foram realizados ensaios complementares de sinergismo e atividade oxidativa. Embora os ensaios de atividade oxidativa tenham sido inconclusivos, os ensaios de sinergismo mostraram que a enzima BIAbn-1 é capaz de aumentar em 30% a atividade do coquetel enzimático Accellerase 1500 sobre biomassa pré-tratada e sobre celulose pura. Este efeito é ainda maior na presença de sulfato de níquel.

Palavras chave: *Bacillus licheniformis.* Hidrolases de glicosídeos familia 43. Arabinanases. Endo-arabinanases.

ABSTRACT

SUCLUPE FARRO., E. G. Structural and biochemical characterization of arabinanases from *Bacillus licheniformis.* 2016. 108p. Dissertação (Mestrado em ciencias) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Climate change is causing losses in different sectors of the world economy. At the meeting of COP21, focused on climate changes, participants from around the world decided to take urgent actions to try to halt the increase in global average temperature. Within this scenario, the production and consumption of energy are of central importance, where renewable energy sources have been preferred to fossil fuels. Brazil has an important role in the global renewable energy generation by contributing 40% of its total energy mix. The degradation of the components of plant cell wall has a vast potential in the generation of biofuels and other 'green' chemical from cellulose, hemicellulose and lignin. Thus, studies of enzymes that degrade these components have been carried out, with emphasis on glycoside hydrolases. Among the hydrolases are the arabinanases, enzymes capable of hydrolyzing arabinan, a polysaccharide component of hemicellulose, in L-arabinose. In this work, studies involving two arabinanases from Bacillus licheniformis were carried out, starting in gene cloning step. The products were transformed into *Escherichia coli*, expressed and purified. The evaluation of the thermal stability of the enzymes showed an affinity for divalent metals. Crystallization attempts resulted in the formation of a single crystal, which made it possible to determine the crystal structure of one arabinanase. Through biochemical assays, it was determined the substrate specificity, optimum temperature and pH and activity against metals. It was observed that the enzymes are selective for nonbranched arabinan, have optimum temperature at 45 and 40 degrees, to BIAbn-1 and BIAbn-2, respectively, and optimum pH of 8 and 7. Finally, additional tests were performed to evaluate the possible synergism and oxidative activity. Although the oxidative activity assays were inconclusive, the synergism tests showed that BIAbn-1 is able to increase by 30% the activity of the enzymatic cocktail Accellerase 1500 on pre-treated biomass and on pure cellulose. This effect is even greater in the presence of nickel sulfate.

Keywords: *Bacillus licheniformis*. Glycoside Hydrolase family 43. Arabinanases. Endoarabinanases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Evolução do uso dos combustíveis em 42 anos de 1971 a	
	2013	28
Figura 2 -	Uso de combustíveis no ano 1973 e no 2013	29
Figura 3 -	Repartição do consumo da energia	31
Figura 4 -	Composição da parede celular vegetal	32
Figura 5 -	Organização estrutural na parede celular da cana de açúcar.	
	A celulose é protegida da degradação pela hemicelulose e	
	lignina	33
Figura 6 -	Ação geral das Hidrolases de Glicosídeo (GHs).	34
Figura 7 -	Ação das enzimas GHs. As enzimas com modo de ação exo	
	clivam a ligação glicosídica a partir de suas extremidades. Já	
	as enzimas com modo de ação endo clivam ligações	
	glicosídicas internas	35
Figura 8 -	GH43 compreende 37 subfamílias; dentro das quais somente	
	tem atividade endo-arabinanses, as subfamílias GH43_4,	
	GH43_5 e GH43_6	36
Figura 9 -	Tipos de ligação em polissacarídeo de L-arabinose. A cadeia	
	principal esta formada por ligações α -1,5 e as ramificações por	
	ligações de tipo α-1,2 e α-1,3	37
Figura 10 -	As endo-α-1,5-Larabinanses da familia GH43, subfamilia 5,	
	atuam sobre as ligações de tipo 1,5 formando produtos	
	principais arabinose, arabinobiose e arabinotriose.	38
Figura 11 -	Mecanismo de ação das Endo-α-L-arabinanases. Possuem	
	um mecanismo de inversão igual às α-glicosidases. A reação	
	ocorre pela protonoção do oxigênio glicosídico seguido por um	
	ataque nucleofílico da água assistido pela base geral; sendo o	
	aceptor de prótons o ácido geral. Normalmente os	
	aminoácidos glutâmico e aspártico são a base e o ácido geral	
	repescitvamente 30,31	39
Figura 12 -	Ingresso do arabinano na via das pentosas fosfato e glicólises.	
	A L-araninose é convertido para o intermediário L-ribulose e	

	logo para L-xiluose até chegar ao xilitol, que a partir daqui já	
	pode ser incluído para a produção de etanol	40
Figura 13 -	Esquema representativo do plasmídeo	44
Figura 14 -	Esquema representativo da técnica DSF; mostra o princ io da	
	técnica, como a sonda que fica na região hidrofóbica da	
	proteína é exposta depois de um aumento de temperatura. No	
	momento que começa o desenovelamento é calculado a T° de	
	Melting. ³⁹	49
Figura 15 -	Analises de sequência das duas arabinanases, pode se	
	observar qeu as duas possuem um alto porcetagem de	
	identidade 78%	56
Figura 16 -	Expressão das Arabinanases. Electroforese em gel SDS-Page	
	12% representa a expressão e purificação por cromatografia	
	de afinidade das enzimas pertencentes a B. licheniformis.	
	Acima) BIAbn-1 e Abaixo) BIAbn-2. As duas proteínas têm um	
	peso molecular teórico de 46,5kDa	57
Figura 17 -	Proteínas clivadas por ação da TEV. Na franja vermelha fração	
	não clivada e na franja azul fração clivada. M= Padrão de peso	
	(kDa); 1) BIAbn-1; 2) BIAbn-2	58
Figura 18 -	Cromatografia de Troca Iónica: de BIAbn-1, pode-se observar	
	um pico maior que corresponde a proteína em questão e em	
	verde aumento de gradiente de NaCI	59
Figura 19 -	Cromatografia de Exclusão Molecular: Em preto eluição de	
	BIAbn-1; em azul eluição de BIAbn-2, a diferença nos	
	tamanhos dos picos é pela diferente concentração	60
Figura 20 -	Gel Nativo: na franja preta representa as arabinanases em	
	estado monomérico (~32kDa). M= padrão de peso molecular	
	kDa; 1) BIAbn-1 após de troca iónica, 2) BIAbn-2 após de troca	
	iónica, 3) BIAbn-1 após da exclusão molecular, 4), 5) BIAbn-2	
	após da exclusão molecular	60
Figura 21 -	Estabilidade Térmica: Em azul claro as temperaturas de	
	BIAbn-1 e em laranja as temperaturas de BIAbn-2. As cores	
	azuis e laranja mais escuras são dos tampões que deram	

	maior estabilidade térmica as enzimas. A maior temperatura	
	para BIAbn-1 foi de 56°C 52°C para BIAbn-2	62
Figura 22 -	Estabilidade em presencia de metais. O metal que ligou com a	
	enzima BIAbn-1 e deu mais estabilidade foi o cobalto seguida	
	de estrôncio, com o cobre foi a que teve a mais baixa	
	estabilidade. O controle tinha BIAbn-1 e agua e os ensaios	
	tinham BlAbn-1 e metal	63
Figura 23 -	Estabilidade em presencia de metais. Para BIAbn-2 o metal	
	que deu mais estabilidade foi o níquel (Ni2+) seguido do	
	cobalto (Co2+), com o cobre foi a que teve a mais baixa	
	estabilidade. O controle tinha BIAbn-2 e agua e os ensaios	
	tinham BIAbn-2 e metal	64
Figura 24 -	Formação de cristal em CLASSIC-L: condição do poço 0.1mM	
	HEPES pH 7.5; 10% (w/v) PEG 4000, 5% (v/v) 2-propanol.	
	Esquerda: foto do cristal com luz normal; Direita: foto do cristal	
	com luz UV	65
Figura 25 -	ClassicL: condição do poço 0.1mM Cacodilato de Sódio pH	
	6.5; 0.2mM Acetato de Magnesio, 15% (v/v) 2-Methyl-2, 4-	
	pentanediol (MPD). Esquerda: foto do cristal com luz normal;	
	Direita: foto do cristal com luz UV	66
Figura 26 -	Salt RX: condição do poço 0.1mM TRIS pH 8.5; 0.8mM LiSO4.	
	Esquerda: foto do cristal com luz normal; Direita: foto do cristal	
	com luz UV	66
Figura 27 -	Padrão de difração da proteína BIAbn-1, processado no	
	software XDS	67
Figura 28 -	Estrutura cristalográfica da enzima BIAbn-1. À esquerda,	
	tetrâmero observado na unidade assimétrica. À direita,	
	disposição do sitio catalítico da BIAbn-1. O sitio catalítico esta	
	formado por três aminoácidos ácidos dois ácidos aspárticos e	
	um ácido glutâmico (Asp-13, Asp-130 e Glu-182)	70
Figura 29 -	Alinhamento estrutural. Superposição das estruturas, em	
	vermelho BIAbn-1 em roxo 1UV4	71

Figura 30 -	Superposição das estruturas cristalográficas das enzimas	
	BIAbn1 (em verde), BsAbn (amarelo), GsAbn (rosa), 3D5Y	
	(GsAbn, branco), GtAbn (azul), 3D61 (GsAbn, laranja), 3D5Z	
	(GsAbn, verde claro), 3D60 (GsAbn, ciano). Os aminoácidos	
	catalíticos de BIAbn-1 estão destacados	72
Figura 31 -	Visao lateral da superposição das estruturas de endo-	
	arabinanases bacterianas	73
Figura 32 -	Superposição das estruturas das enzimas BIAnb-1 (em verde),	
	endo-xilosidase de B. licheniformis (ciano) e endo-xilanase de	
	B. thetaiotaomicron (magenta). A enzima xilosidase possui um	
	domínio de adesão (módulo de ligação a carboidratos)	
	mostrado na parte inferior da figura. Para o domínio catalítico,	
	o enovelamento do tipo β -propeller é conservado entre as	
	enzimas, embora as atividades catalíticas sejam diversas e	
	sobre ligações glicosídicas diversas	74
Figura 33 -	Potenciais interações entre o sítio ativo da enzima BIAbn-1	
	(em branco) e o substrato arabinotriose (mostrado em	
	amarelo). A posição do substrato foi deduzida com base na	
	superposição da estrutura da enzima BIAbn-1 com a estrutura	
	de GsAbn (PDB 3D5Z)	75
Figura 34 -	Sítio de ligação ao cálcio em endo-arabinanases	77
Figura 35 -	Concentração ideal BIAbn-1	78
Figura 36 -	Concentração ideal BIAbn-2	79
Figura 37 -	Especificidade de substrato para BIAbn-1	80
Figura 38 -	Especificidade de substrato para BIAbn-2	80
Figura 39 -	Validação da atividade da BIAbn-1 em diferentes pH; e a	
	atividade ótima é dada em pH 8.0	81
Figura 40 -	Atividade da BIAbn-1 em variação de temperatura; se observa	
	a melhor atividade a uma temperatura de 45°C	82
Figura 41 -	Validação da atividade da BIAbn-2 em diferentes pH; e a	
	atividade ótima é dada em pH 7.0	82
Figura 42 -	Atividade da BIAbn-2 em variação de temperatura; se observa	
	a melhor atividade a uma temperatura de 40°C	83

Figura 43 - Curva padrão de arabinano para anular a sinal de fundo 84

Figura 44 - Linearidade da reação em diferentes tempos para BIAbn-1 84

- Figura 45 Linearidade da reação em diferentes tempos para BIAbn-2 85

- Figura 49 -A esquerda, superposição da estrutura da LPMO de *T. reesei* (PDB 2VTC. em verde) е а arabinanase de G. thermodenitrificans (magenta). A figura demonstra a ausência de similaridade estrutural para este alinhamento, além de enovelamentos completamente diversos. À direita. а similaridade entre os motivos (His-His-Tyr) é evidenciada 89
- Figura 51 Atividade de sinergismo. Accellerase 1500, BIAbn-1 e Accellerase com BIAbn-1 em papel de filtro. Todas as reações foram feitas em tampão fosfato de sódio pH8,0

92

- Figura 54 Possíveis formação de produtos por atividade oxidativa da BIAbn-1. Em azul a reação com enzima BIAbn-1 e em cinza o branco (sem enzima). A reação tinha como substrato papel de

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Repartição da produção de energia	.30
Tabela 2 - Primers utilizados para a clonagem dos genes BlAbn-1 e BlAbn-2	.44
Tabela 3 – Meio reacional para inserção de vetores em <i>E.coli</i>	.45
Tabela 4- Estatística do processamento e refinamento da estrutura da enzima	
BIAbn-1	.69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividades Auxiliares
ATCC	American Type Culture Collection Basic
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool Carbohydrate-Active
CAZy	Carbohydrate-Active Enzymes
CEs	Esterases de Carboidratos
cDNA	Ácido desoxrribonucleico complementar
COP 21	Conference of Parties 21
DNS	Dinitrosalisylic Acid Degree
DSF	Differential Scanning Fluorimetry
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GHs	Hidrolases de glicosídeos
GTs	Glicosiltranferase
IEA	International Energy Agency
LB	Luria Bertani
LIC	Clonagem Independente de Ligação
LPMOs	Lytic Polysaccharide Mono-oxygenases

Mtoe	Milhões de toneladas equivalentes de petróleo
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
pl	Ponto isoelétrico
PLs	Polissacarídeo Liase
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
<i>p-</i> PNA	<i>p</i> -nitrofenil-α-L-arabinofuranosideo
SDS- PAGE	Gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio
TEV	Tobacco Etch Virus
Tm	Melting Temperature
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
Trx	Proteína de fusão tiorredoxina
UV	Ultra-violeta
VC	Volume de coluna

SUMARIO

CAPITU	LO 1	27
1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Panorama Geral do Uso de Energia no Mundo	27
1.2	Cana-de-Açúcar como Fonte de Energia Sustentável	31
1.3	CAZYmes: Hidrolases de Glicosídeos e sua Importância em Biotecnolog	ia 33
1.3.1	Família GH43 e suas subfamílias	35
1.3.2	Endo-Arabinanases	37
CAPITU	LO 2	41
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivos Gerais	41
2.2	Objetivos Específicos	41
CAPÍTU	LO 3	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	Clonagem e Expressão e Purificação: BIAbn-1 e BIAbn-2	43
3.1.1	Clonagem BIAbn-1 e BIAbn-2	43
3.1.2	Preparo de células competentes e transformação bacteriana.	44
3.1.3	Expressão BIAbn-1 e BIAbn-2	46
3.1.4	Purificação por Cromatografia	47
3.1.4.1	Cromatografia por afinidade	47
3.1.4.2	Cromatografia por troca iônica para <i>BIAbn-1</i> e precipitação da protease <i>BIAbn-2.</i>	para 48
3.1.4.3	Cromatografia por exclusão de massa molecular	48
3.2	Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)	49
3.2.1	Determinação da termoestabilidade em tampão e metais bivalentes	50
3.3	Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raio-X	51
3.4	Caracterização Bioquímica	52
3.4.1	Identificação da concentração ótima das enzimas BIAbn-1 e BIAbn-2	52
3.4.2	Especificidade de substrato para <i>BIAbn-1</i> e <i>BIAbn-2</i>	52
3.4.3	Determinação de pH e temperatura ótima	53
3.4.4	Ativação de BIAbn-1 e BIAbn-2 por metais bivalentes	53
3.5	Ensaios complementares	53
3.5.1	Ensaio de sinergismo: <i>Accellerase</i> 1500 e <i>BlAbn-1</i>	53
3.5.2	Ensaios de atividade oxidativa com BIAbn-1	54
CAPÍTU	LO 4	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55

4.1	Clonagem, expressão e purificação	55
4.2	DSF: Tampão ótimo e termoestabilidade em metais bivalentes	61
4.3	Ensaios de Cristalização	65
4.3.1	Formação de cristais	65
4.3.2	Difração de raios X, coleta e processamento de dados	67
4.3.3	Análise da Estrutura Cristalográfica	
4.4	Caraterização enzimática	
4.4.1	Análise da concentração ótima das arabinanases	78
4.4.2	Analise de especificidade de substrato de BIAbn-1 e BIAbn-2	
4.4.3	Analise de pH e temperatura ótima para BIAbn-1 e BIAbn-2	
4.4.4	Analise da atividade especifica para BIAbn-1 e BIAbn-2	
4.4.5	Analise da ativação de BIAbn-1 e BIAbn-2 por metais divalentes	
4.5	Ensaios complementares	
4.5.1	Ensaios de possível atividade oxidativa	
4.5.1.1	Analise de sinergismo: Accellerase 1500 com BIAbn-1 e BIAbn-2	
4.5.2	Análise de uma possível atividade oxidativa em BIAbn-1	94
CAPITUL	.0 5	97
5	CONCLUSÕES	97
5.1	Conclusões	97
REFERÊI	NCIAS	
ANEXOS		107

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama Geral do Uso de Energia no Mundo

As mudanças climáticas globais já causam prejuízos em diversos setores da economia mundial e, no intuito de conter o avanço do impacto destas mudanças, a COP21 (*Conference of Parties 21*), realizada em dezembro do ano 2015 em Paris, com a participação de pouco mais de 40.000 assistentes entre advogados, cientistas e investidores, foi realizada para discutir e propor atitudes que possam ser tomadas em todo o planeta para conter o aumento médio da temperatura dentro do limite de 2°C até o final deste século, considerando um aumento em 1,5°C como o mais aceitável. ^{1,2} A COP21 considerou de suma urgência buscar a mudança de uma política de consumo de energia baseada em material fóssil para uma matriz energética de caráter sustentável. A fim de alcançar esta meta, muitas adaptações nos setores produtivos e na forma de vida do cidadão comum necessitarão ser implementadas.

A matriz energética mais comum no cenário global envolve o uso de fontes não renováveis que, em sua grande maioria, são oriundas do petróleo, gás natural e energia nuclear. A energia hidráulica, e de biocombustíveis figuram como fonte primariamente renovável. De acordo com a agência internacional de energia (IEA), o consumo de energia nos últimos 42 anos aumentou de modo considerável como mostra a Figura 1 e Figura 2. ³ O consumo aumentou pouco mais de 110%, e o perfil do consumo por fonte de energia também mudou, evidenciando uma tendência crescente das fontes renováveis na matriz energética, embora esta participação ainda seja modesta.



Figura 1- Evolução do uso dos combustíveis em 42 anos de 1971 a 2013.

Fonte: Adaptada de IEA 3



Figura 2- Uso de combustíveis no ano 1973 e no 2013.

Fonte: Adaptada de IEA 3

No Brasil, o cenário da matriz energética é bastante peculiar, quando comparado ao restante do mundo. As fontes não renováveis constituem 60,6% da matriz energética enquanto as fontes renováveis respondem por 39,4%, como mostrado na Tabela 1, construída a partir de dados do Ministério de Minas e Energia. ⁴ A participação do Brasil na produção de energias renovável no mundo foi de 40 e 39% nos anos 2013 e 2014 respetivamente, com uma ligeira queda causada pela menor oferta de energia hidráulica em consequência da recente crise hídrica.

Em termos de consumo de energia no Brasil, a maior parte do uso de energia no Brasil é feito como fruto da atividade industrial (32,9%) e de transporte (32,5%). Em seguida, vêm o uso residencial, o setor energético, a agropecuária e o setor de serviços que em conjunto sumam 28,5% do consumo no país. ⁵

Fontes	2014
Não renováveis	60.6%
Petróleo e derivados	39,4%
Gás Natural	13,5%
Carvão mineral	5,7%
Uranio	1,3%
Outros	0,6%
Renováveis	39,4
Biomassa de cana	15,7%
Hidráulica	11,5%
Lenha e carvão vegetal	8,1%
Lixivia e outras renováveis	4,1%

Tabela 1 - Repartição da produção de energia.

Fonte: Adaptada de Ministério de Energia e Minas⁴

Sendo o setor de transportes um grande consumidor de energia no país, é interessante observar como se distribui o uso de energia por fonte para este setor. Os dados do Ministério de Minas e Energia indicam que o óleo diesel responde por 45,2% da energia consumida no setor de transporte, a gasolina responde por 29,8% e o etanol contabilizando 15,1%, como é indicado na Figura 3.



Consumo de Energia nos Transportes

Figura 3- Repartição do consumo da energia. Fonte: Adaptada de Ministério de Minas e Energia ⁵

1.2 Cana-de-Açúcar como Fonte de Energia Sustentável

Nos últimos anos, estão sendo feitos esforços consideráveis no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de etanol a partir de fontes vegetais renováveis e visando, com isto, reduzir o consumo de petróleo e as emissões de gases causadores do efeito estufa. ⁶ Dentre as fontes renováveis, os compostos de carbono presentes nas paredes das plantas superiores, constituídas por carboidratos complexos (Figura 4), incluindo a celulose, a hemicelulose, polissacarídeos pécticos, glicoproteínas estruturais e ligninas tem atraído a atenção de pesquisadores na academia e no setor produtivo.⁷



Figura 4- Composição da parede celular vegetal. Fonte: Adaptada de NHUCHHEN et al ⁸.

A cana-de-açúcar oferece uma oportunidade muito interessante para o Brasil como uma fonte de energia renovável. O Brasil é um dos principais produtores de cana-de-açúcar e é responsável por mais da metade do consumo no mundo, como indica o ministério da agricultura. ⁸⁷ A moenda da cana-de-açúcar é empregada para a produção de etanol (1^a geração, 1G) através da fermentação do caldo da cana, gerando o bagaço da cana de açúcar como um dos principais resíduos nas indústrias de açúcar e álcool. Esta atividade industrial gera pouco mais de 280 kg de bagaço de cana por tonelada de cana de açúcar processada. ⁹

O bagaço da cana de açúcar apresenta uma quantidade alta de fibras que podem ser utilizadas para a produção de etanol (2ª geração, 2G) através da degradação de seus componentes. Em termos de composição, o bagaço da cana-de-açúcar contém 40-50% de celulose, um polissacarídeo linear e homogêneo constituído de glicose e que se encontra tipicamente em uma forma cristalina. Ademais, possui 25-35% de hemicelulose, um polissacarídeo amorfo e de composição heterogênea, mas rico em xilose, arabinose e glicose. Finalmente, o bagaço contém ainda cerca de 15-25% de lignina, minerais e ceras. ^{9–11} A Figura 5 mostra um

esquema de composição da parede celular vegetal para gramíneas, como a cana-deaçúcar.





Fonte: Adaptada de QUIROZ-CASTAÑEDA. 12

1.3 CAZYmes: Hidrolases de Glicosídeos e sua Importância em Biotecnologia

Dada a constituição da biomassa gerada após a moenda da cana-de-açúcar, rica em sacarídeos, fica clara a importância de métodos que visem a degradação destes açúcares complexos, visando sua decomposição em açúcares simples e que possam ser fermentados para a produção de álcool ou mesmo de outros compostos de interesse. Esta degradação pode ser alcançada através da via química (degradação ácida) ou via enzimática, através do uso de enzimas denominadas hidrolases de glicosídeos (GHs).

A base de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*) reúne diversas enzimas capazes de degradar, modificar ou criar ligações glicosídicas. No CAZy, estas proteínas são agrupadas em famílias, refletindo sua similaridade em sequência e estrutura. O CAZy também utiliza a sequência de aminoácidos para correlacionar os mecanismos de ação e enovelamentos proteicos em famílias distintas. ¹³

Na atualidade, o CAZy abrange uma gama de enzimas dividas em cinco grandes grupos: 1) hidrolases de glicosídeo (GHs, que tem função de hidrolisar ou rearranjar ligações glicosídicas (Figura 6); 2) glicosiltranferases (GTs), formam ligações glicosídicas; 3) polissacarídeo liases (PLs), este grupo faz a clivagem não hidrolítica de ligações glicosídicas; 4) esterases de carboidratos (CEs), hidrolisam ésteres de carboidratos; e 5) atividades auxiliares (AA), que não possuem as atividades listadas acima, mas que atuam em conjunto com CAZymes ¹³. Dentre estes grupos, destacaremos as hidrolases de glicosídeos, ou GHs.



Figura 6- Ação geral das Hidrolases de Glicosídeo (GHs). Fonte: Adaptada de CAZy. ⁸⁸

O grupo das GHs (EC 3.2.1. *) é o grupo com maior número de famílias no CAZy, com um total de 135 até o momento. A primeira classificação foi publicada no ano de 1991 e foi baseada na similaridade da sequência de aminoácidos de 301 sequências de hidrolases de glicosídeo e enzimas relacionadas. (14-15) O potencial de aplicação para estas enzimas é extremadamente grande, tomando em conta com maior ênfase a ação catalítica na degradação da celulose e da hemicelulose, ou ainda, de forma mais geral, na degradação da biomassa.
O modelo clássico de degradação da celulose foi criado com base nas enzimas do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* e baseia-se na ação cooperativa entre pelo menos três diferentes enzimas: endo-glucanase, exo-glucanase (celobiohidrolase) e β -glicosidase. ¹⁶ As exo e endo-glucanases são capazes de introduzir cortes nas ligações β -1,4 de celulose a partir das extremidades e em regiões internas (amorfas), respectivamente (Figura 7). Já as β -glicosidases são capazes de clivar a celobiose (dissacarídeos de glicose unido por ligação β -1,4 e liberado como produto de hidrólise de exo e endo-glucanases) em moléculas de glicose. ^{17–19}



Figura 7- Ação das enzimas GHs. As enzimas com modo de ação exo clivam a ligação glicosídica a partir de suas extremidades. Já as enzimas com modo de ação endo clivam ligações glicosídicas internas.

Fonte: Adaptada de CAZy.88

1.3.1 Família GH43 e suas subfamílias

A biomassa da parede celular vegetal, composta primariamente por celulose, hemicelulose e lignina, constitui a maior fonte de carbono na biomassa terrestre. Destes componentes, a hemicelulose representa uma fração importante do peso seco da biomassa. Constituída de açúcares complexos e amorfos, a hemicelulose usualmente apresenta em sua composição xilose, arabinose, galactose, glicose e manose ⁹, sendo a xilose e arabinose as pentoses mais abundantes presentes na natureza. ²⁰ A compreensão dos mecanismos de hidrólise da hemicelulose poderiam certamente aumentar a eficiência da degradação da biomassa vegetal e sua conversão em uma fonte de energia renovável ainda mais interessante.

Subfamily	Size	Taxonomic distribution	EC number	Total	Ligand	3-D Structure
GH43	122		2 x 3.2.1.55	2		
GH43_1	254		11 x 3.2.1.37 + 2 x (3.2.1.37 + 3.2.1.55)	13	BWX, pNP-aLAraf PNP-bXyl	4MLG
GH43_2	31	Neocallimastigomycota		0		
GH43_3	87			0		
GH43_4	264	Neocallimastigomycota	12 x 3.2.1.99	12	SBAR, LAR	2X8F,3KMV,3LV4, 4KC7,4KCA
GH43_5	211		9 x 3.2.1.99	9	SBAR, LAR	1GYD,1UV4,1WL7 3CU9,4KCB
GH43_6	38	Fungi	9 x 3.2.1.99	9	SBAR, LAR	
GH43_7	13	Bacteria		0		
GH43_8	26	Bacteria		0		
GH43_9	137	Chytridiomycota		0		
GH43_10	376		1 x 3.2.1.37 + 1 x (3.2.1.37 + 3.2.1.55) + 7 x 3.2.1.55	9	AAX , WAX, SBAR, MU-Xylose, pNP-aLAraf, pNP-bXyl	
GH43_11	583	Ascomycota	14 x 3.2.1.37 + 4 x (3.2.1.37 + 3.2.1.55)	18	OSX, Xylobiose, Linear 1,4-b-xylan, PNP-aLAraf, pNP-bXyl	1YI7,1YIF,1YRZ, 2EXH,3C2U
GH43_12	395	Mollusca	1 x 3.2.1.37 + 3 x (3.2.1.37 + 3.2.1.55) + 5 x 3.2.1.55	9	WAX, MU-Xylose PNP-aLAraf	
GH43_13	15	Fungi		0		
GH43_14	34	Fungi	1 x 3.2.1.37	1	WAX, pNP-bXyl	
GH43_15	9	Bacteria		0		
GH43_16	184	Neocallimastigomycota	1 x (3.2.1.37 + 3.2.1.55) + 6 x 3.2.1.55	7	WAX, linear arabinoxylan, OSX, RAX, MU-aLAraf	1W0N,3C7E
GH43_17	53			0		5C0P
GH43_18	61			0		
GH43_19	53	Neocallimastigomycota	1 x 3.2.1.55	1		
GH43_20	19	Basidiomycota		0		
GH43_21	19	Fungi	1 x 3.2.1.55	1	SBAR, pNP-aLAraf	
GH43_22	118		1 x 3.2.1.37	1	Xylan oligosaccharide (unspecified source)	
GH43_23	36			0		
GH43_24	228		8 x 3.2.1.145	8	LWG, 1,3-b-galactan	3NQH,3VSF
GH43_25	9	Fungi		0		
GH43_26	851		3 x 3.2.1.55	3	pNP-aLAraf	3AKF,3CPN
GH43_27	32	Bacteria	1 x 3.2.1.37 + 1 x 3.2.1.55	2	OSX, pNP-bXyl, pNP-aLAraf	
GH43_28	75			0		
GH43_29	218		2 x (3.2.1.37 + 3.2.1.55) + 1 x 3.2.1.55 + 2 x 3.2.1.8	5	pNP-bXyl, pNP-aLAraf	3QED,4NOV
GH43_30	111			0		
GH43_31	54	Bacteroidetes		0		3KST
GH43_32	32	Rotifera		0		
GH43_33	25		1 x 3.2.1.55	1	pNP-aLAraf	4QQS
GH43_34	185			0		3QZ4
GH43_35	63	Neocallimastigomycota	3 x (3.2.1.37 + 3.2.1.55)	3	pNP-bXyl, pNP-aLAraf	
GH43_36	47		2 x 3.2.1.55	2	No substrates specified	3ZXJ
GH43_37	13			0		

Figura 8- GH43 compreende 37 subfamílias; dentro das quais somente tem atividade endoarabinanses, as subfamílias GH43_4, GH43_5 e GH43_6.

Fonte: Adaptada de MEWIS et al. 21

Dentro do grupo das GHs existem algumas famílias especializadas na degradação de hemicelulose. Uma destas famílias é a família GH43, que pode ser encontrada em archaea, bactérias e fungos. Esta família inclui enzimas com função β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, arabinanase, xilanase, galactano 1,3- β -galactosidase, α -1,2-L-arabinofuranosidase, exo- α -1,5-L-arabinofuranosidase, exo- α

A divisão em subfamílias das GHs é conhecida. Aconteceu com a família GH5 ²⁷, GH13 ²⁸ e, mais recentemente foi reportada a subdivisão da família GH43 ²¹ em 37 subfamílias como é mostrada na Figura 8, esta subdivisão foi baseada por suas sequências, ensaios bioquímicos e estudos estruturais. No entanto, as análises de concorrência nestas subfamílias com outros módulos funcionais revelaram fortes associações entre algumas subfamílias GH43 com domínios CBM6 e CBM13.

1.3.2 Endo-Arabinanases

O arabinano como já é sabido, forma o segundo maior componente da hemicelulase sendo um polissacarídeo altamente ramificados formados por uma cadeia principal constituída por L-arabinose com ligações α -1,5; as quais podem conter ramificações laterais com um ou dois tipos de ligação dependendo do carbono ao qual fazem ligação, que podem ser α -1,2 e α -1,3; como é mostrada na Figura 9.



Figura 9- Tipos de ligação em polissacarídeo de L-arabinose. A cadeia principal esta formada por ligações α-1,5 e as ramificações por ligações de tipo α-1,2 e α-1,3.

Fonte: Adaptada de BIOCYC 89

As enzimas arabinanases são objeto do nosso estudo, com especial interesse nas endo- α -1,5-L-arabinanase, capazes de clivar o arabinano em L-arabinose (Figura 10). Na família GH43, esta atividade enzimática é observada nas subfamílias GH43-4, GH43-5 e GH43-6. Estas subfamílias são as únicas que apresentam atividade α -Larabinanase e, embora distintas, são relacionadas devido à atividade e à similaridade estrutural que possuem. ²¹ No escopo das hemicelulases, as arabinanases são enzimas bastante interessantes,



Figura 10- As endo-α-1,5-Larabinanses da familia GH43, subfamilia 5, atuam sobre as ligações de tipo 1,5 formando produtos principais arabinose, arabinobiose e arabinotriose.

Fonte: Adaptada de BIOCYC 89

As endo-arabinanases, utilizam o mecanismo de catálise com inversão. Neste mecanismo, a configuração do carbono anomérico é alterada ao final da reação, como mostrado na Figura 11 abaixo. O mesmo mecanismo já havia sido observado para uma enzima β-xilosidase da mesma família. ³⁰

Mecanismo de Inversão para α-glicosidases



Figura 11 - Mecanismo de ação das Endo-α-L-arabinanases. Possuem um mecanismo de inversão igual às α-glicosidases. A reação ocorre pela protonoção do oxigênio glicosídico seguido por um ataque nucleofílico da água assistido pela base geral; sendo o aceptor de prótons o ácido geral. Normalmente os aminoácidos glutâmico e aspártico são a base e o ácido geral repescitvamente ^{31,32}.

Fonte: Adaptada de CAZy. 88

Os estudos com endo-arabinanases têm grande importância dada sua relevância na degradação do arabinano. Várias de estas enzimas foram caracterizadas bioquimicamente em diferentes organismos, como o fungo *Rhizomucor miehei*²⁰ e o *Geobacillus stearotehermophillus,* por exemplo. ³³

Para que o arabinano possa ser integrado na formação de etanol, tem que passar por vários processos de conversão até chegar a xilitol. Para isto o arabinano após de ser hidrolisado pelas endo-arabinanases formando L-arabinose e logo de processos de isomerização forma um intermediario D-ribulose para depois formar L-xilulose e por fim xilitol, que como é mostrado na Figura 12



Figura 12- Ingresso do arabinano na via das pentosas fosfato e glicólises. A L-araninose é convertido para o intermediário L-ribulose e logo para L-xiluose até chegar ao xilitol, que a partir daqui já pode ser incluído para a produção de etanol.

Fonte: Adaptada de CHANDRAKAN et al ³⁴

Além de sua importância na degradação da biomassa oriunda da parede celular vegetal, estudos mais recentes têm demonstrado um potencial de aplicação bastante vasto para as arabinanases para a produção de alimentos funcionais. Em estudos *in vitro*, realizados com mucosa intestinal porcina, foi observado um efeito inibidor de L-arabinose na atividade intestinal da sacarase ^{35,36}. Compostos de arabinose como o arabinoxilano estão sendo considerados como açúcares nãodigeríveis que ajudam a manter a regularidade das funções do cólon e contribuir para a saúde humana, reduzindo o risco das doenças crônicas. ³⁷

CAPITULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este projeto esta orientado à avaliação de enzimas arabinanases como parte do estudo da degradação dos componentes da biomassa vegetal.

2.2 Objetivos Específicos

Para o desenvolvimento do projeto foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- 1. Clonagem dos genes das duas arabinanases de *B. licheniformis*.
- 2. Expressão e purificação das proteínas usando diferentes técnicas de cromatografia líquida.

- 3. Avaliação de estabilidade térmica utilizando a fluorimetria diferencial de varredura (*DSF*).
- 4. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X e elucidação estrutural.
- 5. Ensaios de caracterização funcional das proteínas por meio da análise da atividade enzimática.
- 6. Ensaios para a avaliação da possível atividade oxidativa.
- 7. Ensaios de sinergismo com um coquetel enzimático comercial.

CAPÍTULO 3

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem e Expressão e Purificação: BIAbn-1 e BIAbn-2

3.1.1 Clonagem *BIAbn-1* e *BIAbn-2*

Os genes que codificam para as duas arabinanases de *B. licheniformis* ATCC 14580, foram clonados a partir da biblioteca de cDNA deste organismo disponível no grupo de Biotecnologia Molecular. Para a amplificação dos genes que codificam as enzimas *BIAbn-*1 e *BIAbn-*2 foram utilizados os *primers forward* e *reverse*, descritos na Tabela 2. Os produtos da amplificação por PCR foram inseridos no vetor pET-Trx empregando o método LIC, conforme implementado no grupo. ³⁸ Na Figura 13 esta representado os plasmídeos para as duas genes de arabinanases.



Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 2 - Primers utilizados para a clonagem dos genes BIAbn-1 e BIAbn-2.

Gene	Forward	Reverse
BIAbn-1	5'-CAGGGCGCCATGGCG	5'- GACCCGACGCGGTTAA
	TTTTGGGACACAAAAG-3'	TAAGTCGGCCACCCTTG-3'
BIAbn-2	5'-CAGGGCGCCATGGCTTTT	5'-GACCCGACGCGGTTACTAA
	TGGGATACAAAAGGAGAC-3'	TACTTCGGCCAGCCTTTAG-3'

Fonte: Elaborada pelo autor

3.1.2 Preparo de células competentes e transformação bacteriana.

Preparou-se um estoque de bactérias competentes aptas para acolher o vetor de expressão. Para esta finalidade, utilizou-se a cepa bacteriana de *E. coli*. Partindo do estoque glicerinado, plaqueou-se em meio LB sólido (Luria-Bertani – 10 g/L de Triptona; 5 g/L de Extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, ágar 20 g/L) sem antibiótico incubando por 12hrs a 37°C. Em seguida, foi selecionada uma colônia isolada e incubou-se em 10 mL de meio LB líquido (sem ágar) sem antibiótico à 37 °C por 12 horas a 250 rpm. O inóculo foi vertido em um Erlenmeyer contendo 400 mL de meio LB líquido sem antibiótico e incubado a 37 °C e 180 rpm até que a DO (densidade ótica) 600 nm atingisse a faixa entre 0,5 e 0,7. O meio com as células foi centrifugado a 5000 rpm, 4°C por 10 min e a massa celular foi ressuspendida em 20 mL de solução de 60 mM de CaCl₂, 15% de glicerol, 10mM PIPES pH 7,0. A amostra foi centrifugada

utilizando-se as mesmas condições anteriores e ressuspendida em 50 mL de CaCl₂. A solução foi incubada no gelo por 60 minutos e posteriormente centrifugada a 5000 rpm a 4°C por 5 min. As células foram ressuspensas em 10 mL de tampão 100 mM de CaCl2 e 5% glicerol, aliquotadas e estocadas à -80 °C.

Para a transformação bacteriana, os vetores de interesse foram inseridos nas células competentes em meio contendo cloreto de cálcio e o plasmídeo de interesse nas proporções descritas na Tabela 3:

Reação de inserção	Volume µL
CaCl2 (60mM)	100
Células competentes	100
0.1 µg de plasmídeos	1 - 2

Tabela 3 – Meio reacional para inserção de vetores em E.coli.

Fonte: Elaborada pelo autor

A mistura foi incubada por 30 min em gelo e, em seguida levada à temperatura ambiente por 5 min, o choque térmico foi realizado com a mudança brusca de temperatura para 42°C, deixando por 1 min. Em seguida as células foram incubadas em gelo por 5 minutos. Finalmente, foi adicionado 800 µL de meio LB sem antibiótico e incubada por 1-2 horas a 100rpm, a 37°C. Passado este tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 segundos. 800 µL do sobrenadante foram descartados e o volume restante foi empregado para ressuspender a massa celular. Finalmente, preparou-se uma placa de Petri com meio LB sólido contendo 25 mL com os antibióticos cloranfenicol (35 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL). 200 µL da amostra foram espalhados com ajuda de uma alça de *Drigalski* e o meio foi incubado a 37°C *overnight*.

3.1.3 Expressão BIAbn-1 e BIAbn-2

Para a expressão das arabinanases, *BlAbn-1* e *BlAbn-2*, a cepa *E. coli* - Rosetta foi transformada por choque térmico com os plasmídeos de cada uma das arabinanases. As colônias contendo as plasmídeos foram levadas para tubos com 5 mL de meio LB liquido, aos quais foram adicionados cloranfenicol, a uma concentração de 35μ g/mL, e canamicina a uma concentração de 50μ g/mL. O meio foi incubado por 16 horas a 37° C e 200 rpm. Após a incubação, as culturas foram vertidas em um Erlenmeyer de 2L preenchido com 1L de meio auto-indutor ZYP-5052 (10 g Triptona, 5 g Extrato de Levedura, 2.8 g (NH₄)₂SO₄, 6.8 g KH₂PO₄, 7.1 g Na₂PO₄, 5 g glicerol, 0.5 g glicose e 2.9 g α-lactose por litro de meio) além dos antibióticos cloranfenicol e canamicina e incubadas por 5 horas a 37° C e 180 rpm. Após este período, a temperatura foi reduzida para 18° C e a cultura foi incubada por 16 horas a 180 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 6000rpm a 4°C por 20 min, descartando o sobrenadante e ressuspendendo a massa celular com 20 – 40 mL de tampão de lise: 50 mM de TRIS-HCl pH 7,05, 150 mM NaCl, 5 mM imidazol, 10% v/v glicerol, usado tanto para *BlAbn-1* e *BlAbn-2*.

A lise bacteriana foi feita com a adição de 10 mM de lisozima e 0,1 mM PMSF, deixando atuar por 2 horas. Em seguida a amostra foi levada para sonicação por oito ciclos com pulsos de 30 segundos e intervalos de 30 segundos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 30min a 18000 rpm, para a separação das frações solúvel e insolúvel.

3.1.4 Purificação por Cromatografia

3.1.4.1 Cromatografia por afinidade

Na primeira etapa da purificação foi feita por cromatografia de afinidade, usando 3 mL de resina de níquel, Ni Sepharose (GE *Healthcare*, USA), previamente preparada fazendo uma lavagem com 20 volumes de coluna (VC) de água deionizada e 10 VC de tampão de equilíbrio (50 mM Tris 7,5, 150 mM de NaCl, 10 mM de

imidazol). Em seguida, a fração solúvel obtida da lise celular foi passada duas vezes pela coluna. A primeira lavagem foi com 5 VC de tampão de lise sem glicerol (descrito na seção 1.2), a segunda, terceira e quarta lavagens foram realizadas com 5 VC de tampão lise com tampão de lise adicionado diferentes concentrações de imidazol: 5mM, 20mM e 40mM respectivamente.

A eluição das enzimas *BIAbn-1* e *BIAbn-2* foi realizada com o tampão de lise respetivo e três concentrações diferentes de imidazol 100 mM, 200 mM e 250 mM e um último passo de tampão de lise com 500 mM imidazol. As alíquotas da purificação foram analisadas utilizando-se gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE e corados com *Comassie Blue*.

As frações eluídas com 100, 200 e 250 mM de imidazol foram reunidas em uma única solução e concentradas por centrifugação usando um concentrador de 30 kDa de corte (GE *Healthcare*, USA), onde o tampão foi trocado (lavagem) para eliminar o imidazol, atingindo um volume final 5-10mL. Em seguida, foi adicionada a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*) em proporção de 1 mg de protease para cada 50 mg de proteína e incubada por 20 horas a 10°C ³⁹ para a clivagem da proteína de fusão (Histag+Trx).

3.1.4.2 Cromatografia por troca iônica para *BIAbn-1* e precipitação da protease para *BIAbn-2.*

Na segunda etapa de purificação usou-se cromatografia por troca iônica com o objetivo de separar a enzima *BlAbn-1* que foi clivada com a que não podo ser clivada pela protease TEV. Para isto, foi utilizado um sistema AKTÄ e uma coluna 16/20 CM (carboximetil) Sepharose catiônica previamente equilibrada com tampão A (50 mM de fosfato de sódio pH 6.5 e 150 mM NaCl) e empregando um gradiente do tampão B (50 mM de fosfato de sódio pH 6.5 e 1 M NaCl). A eluição da enzima foi monitorada através da leitura de absorbância em UV (280 nm), as frações de eluição foram coletadas cada 2 mL; estas frações foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE corado com *Comassie Blue* e concentradas no concentrador de 30 kDa de corte (GE *Healthcare*, USA).

Para a purificação da *BlAbn-2* decidiu-se precipitar a TEV trocando o tampão da solução. O tampão inicial Tris-HCl pH 7,05, onde a TEV tem atividade e cliva na região da His-tag-Trx, foi substituído pelo tampão citrato de sódio 50 mM pH 4.0, 150 mM NaCl, e em seguida, a solução foi incubada por 30min em gelo e centrifugada por 10 min a 10000 rpm a 4°C. Nestas condições, a protease TEV é inativada e precipitada.

3.1.4.3 Cromatografia por exclusão de massa molecular

Na última etapa da purificação a cromatografia de exclusão molecular foi utilizada uma coluna Superdex 75 16/60 (GE *Healthcare*) acoplada ao cromatógrafo Äkta Purifier (Pharmacia Biotec/GE, EUA), a qual foi equilibrada com o tampão fosfato de sódio 50 mM de sódio pH 6.5, 150 mM NaCl, para *BlAbn-1* e citrato de sódio 50 mM pH 4.0, 150 mM NaCl para *BlAbn-2*.

Realizou-se uma eluição isocrática utilizando um volume de coluna total, fluxo de 1 mL/min de tampão monitorada mediante a leitura a 280 nm de absorbância. As frações de proteína eluídas da coluna foram coletadas e analisadas em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE, corado com *Comassie Blue*.

3.2 Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)

O DSF (do inglês, *Differential Scanning Fluorimetry*), também conhecida como Thermofluor®. É uma técnica quer faz uma análise da desnaturação da proteína com o aumento gradual da temperatura a partir da interação com a sonda hidrofóbica *Sypro-Orange*. Esta sonda possui afinidade com regiões hidrofóbicas da proteína, estas regiões são expostas à medida que vai sendo desenovelada. O monitoramento da intensidade de emissão da sonda permite a avaliação da temperatura de transição da curva de desnaturação (Temperatura de *melting* – Tm), como é exemplificado na Figura 14.



Figura 14- Esquema representativo da técnica DSF; mostra o princípio da técnica, como a sonda que fica na região hidrofóbica da proteína é exposta depois de um aumento de temperatura. No momento que começa o desenovelamento é calculado a T° de Melting. ⁴⁰

Fonte: Adaptada de Argonne National Laboratory ⁹⁰

3.2.1 Determinação da termoestabilidade em tampão e metais bivalentes.

Após da obtenção das proteínas com o grau de pureza adequado, era preciso determinar quais era os melhores tampões que lhes confeririam as condições de estabilidade, além disso, também era necessário determinar a estabilidade térmica frente a metais divalentes, o que pode auxiliar no processo de cristalização. Para este ensaio foi usado o DSF.

Para os ensaios de termoestabilidade, foi utilizada uma adaptação do protocolo descrito por Ericsson et al. ⁴¹, com os kits de tampões e aditivos comerciais da empresa *Hampton Research*. A concentração mínima de proteína usada foi de 1 mg/mL e 10 mM dos aditivos. O kit dispunha de uma variedade de soluções que variam a concentração de tampões, NaCl e pH; no caso dos aditivos foram usados os seguintes sais: cloreto de cálcio dihidratado, cloreto de cobalto (II) hexahidratado, cloreto de cobre (II) dihidratado, cloreto de magnésio hexahidrateado, cloreto de

manganês (II) tetrahidratado, cloreto de estrôncio hexahidratado, cloreto de zinco, cloreto de níquel (II) hexahidratado.

Neste ensaio, a temperatura foi elevada de 25 a 90 °C a uma taxa de 1 grau por minuto. O desenovelamento foi monitorado pela intensidade de fluorescência da sonda *Sypro-Orange* (Invitrogen) a uma concentração de 50x (concentração inicial 5000x). A leitura para foi realizada no equipamento CFX96 Real-Time (Bio-Rad) usando os comprimentos de onda para a absorção e emissão de 470 e 569 nm, respetivamente. ⁴²

As medidas foram realizadas em triplicata para cada proteína testada. A análise de desnaturação da proteína e obtenção do valor de *Tm* foi realizada no programa Origin (OriginLab) e a planilha Excel DSF *analysis tool*.

3.3 Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raio-X

Os ensaios iniciais de cristalização para as arabinanases *BIAbn-1 e BIAbn-2* foram feitos com diferentes concentrações de proteína: 12, 15, 17 e 21 mg/mL, usando kits comerciais de cristalização baseados no método da matriz esparsa ⁴³. Os kits CLASSICL, CRISTAL-SCREEN, INDEX, PACT SUITE, PEG I, PEG II e SALT-RX (*Hampton Research*) foram empregados. Cada kit explora 96 condições diferentes de cristalização e, para cada condição, foram testadas três razões de concentração proteína-solução de cristalização: 0,5:1, 1:1 e 2:1. As condições foram montadas na configuração de gota sentada (*sitting drop*) com um robô de cristalização *HoneyBee*. Após montadas, as condições de cristalização foram incubadas a 18°C.

Uma vez conhecida a/as condições onde apresentarem a formação dos cristais, passo seguido, as condições de cristalização foram otimizadas mudando concentrações dos reagentes e o pH das soluções em questão.

Duzentas e vinte imagens de difração foram coletadas na fonte doméstica Rigaku MicroMax 007-HF equipada com detector R-AXIS IV++, operando com radiação CuK α (λ =1,54 Å). A coleta de dados foi realizada no grupo de cristalografia de proteínas do IFSC, com o auxílio do Dr. Humberto Pereira. As imagens foram processadas com o programa XDS. ⁴⁴ A estrutura foi resolvida por substituição molecular utilizando, para esta finalidade, o programa PHASER-MR ⁴⁵, disponível no pacote PHENIX. ⁴⁶ A estrutura cristalográfica da arabinanase de *Bacillus subtilis* ⁴⁷, que tem 73% de identidade com a *BlAbn-1*, foi empregada como modelo de busca e a solução obtida foi subsequentemente refinada em ciclos iterativos de refinamento no espaço real e no espaço recíproco utilizando os programas COOT e PHENIX. ^{48,49}

Uma vez conhecida a/as condições onde apresentarem a formação dos cristais, passo seguido, as condições de cristalização foram otimizadas mudando contrações dos reagentes e o pH das soluções em questão.

3.4 Caracterização Bioquímica

3.4.1 Identificação da concentração ótima das enzimas BIAbn-1 e BIAbn-2

A identificação das concentrações ótima das enzimas de *B. licheniformis* foi realizada variando a concentração das enzimas de 10 - 150 nM, usando como substrato o arabinano desramificado ^{50,51} em tampão Tris-HCl pH 8,0. A reação foi feita em microplaca de reação em triplicata usando o termociclador (BioRad®). A reação continha 40 µL de tampão Tris-HCl 125 mM, 50 µL de substrato 0.8% (w/v) e 10 µL de enzima *BIAbn-1* ou *BIAbn-2*. O procedimento experimental envolveu a incubação da enzima com o substrato a 35°C por 20 min, e a determinação da atividade hidrolítica por análise da liberação de açúcares redutores com a adição de 100 µL de DNS (ácido dinitro-salicílico) no método de Miller. ⁵² A reação foi aquecida por 15 min a 95°C, e a quantidade total de açúcares redutores foi determinada por absorção em 540 nm, no espectrofotômetro (*Multiskan spectrum, Thermo Scientific, EUA*). A absorbância foi convertida em concentração de açúcares através da comparação com uma curva padrão de L-arabinose (Sigma) determinada previamente.

3.4.2 Especificidade de substrato para BIAbn-1 e BIAbn-2

A atividade enzimática foi avaliada em uma variedade de substratos incluindo arabinano desramificado, arabinano linear, arabinano de lariço, arabinoxilano de centeio, arabinano de açúcar de beterraba, além do substrato sintético (*p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo – *p*-PNA) ^{32,51,53–55}, e, como controle negativo, celulose. Os procedimentos experimentais seguiram o mesmo protocolo do item anterior. No caso do substrato sintético a reação foi finalizada pela adição de 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1 M, usando o método de Somogyi. ⁵⁶

3.4.3 Determinação de pH e temperatura ótima

A determinação do pH e temperatura ótima para a reação de hidrólises foi realizada usando o arabinano desramificado como substrato. Para a determinação do pH foi utilizado o tampão universal (citrato de sódio, fosfato dibásico de sódio, glicina) 125 mM com uma variação de pH de 2 – 10, incubando a 35°C por 20min. Para a determinação da temperatura foi utilizado o pH ótimo e uma variação de temperatura de 20 – 70 °C, por 20 min. O método do DNS foi empregado para a determinação da quantidade de açucares redutores formado.

3.4.4 Ativação de BIAbn-1 e BIAbn-2 por metais bivalentes

O efeito da presença de íons divalente sobre a atividade hidrolítica foi avaliado. Para esta finalidade, foram usados cloretos de cálcio, cobre, cobalto, magnésio, manganês, estrôncio, níquel e zinco e EDTA em uma concentração de 50 mM (solução estoque) e arabinano desramificado como substrato. A reação continha 10 μ L de tampão 500 mM de fosfato de sódio pH 8,0 para *BlAbn-1* e pH 7,00 para *BlAbn-*2, 10 μ L de enzimas a 200 e 750 nM respetivamente, 2 μ L de metais a 50 mM, 50 μ L de substrato a 0.8% w/v e completando o volume com água deionizada até 100 μ L, em temperatura de 35°C por 20 min. Novamente, a leitura do produto formado foi realizada pelo método de DNS.

3.5 Ensaios complementares

3.5.1 Ensaio de sinergismo: Accellerase 1500 e BlAbn-1

O efeito da adição da enzima *BlAbn*-1 a um coquetel enzimático comercial foi avaliado. Neste experimento, o protocolo previamente publicado ⁵⁷ foi empregado com alterações. Nestes experimentos, 20 mg de substrato (papel de filtro) foram incubados em 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 8,0 e 3 µg/mL de *BlAbn-1* em 1 mL de reação; também foi testado a atividade junto a 1 mM de sulfato de níquel (NiSO₄) e ácido ascórbico. A mistura foi incubada a 40°C por 18 horas em agitação de 1200 rpm. Após a incubação, as amostras foram fervidas por 3 min e centrifugadas por 17000*g* por 15 min a 4°C para a separação da parte solúvel. A quantidade de açucares redutores formada foi determinada com DNS.

3.5.2 Ensaios de atividade oxidativa com BIAbn-1

Testes preliminares de uma possível atividade oxidativa da enzima *BlAbn*-1 foram realizados usando como substratos: 0.25% (w/v) PASC ⁵⁸, 100 mg de Avicel ⁵⁹, 100 mg celulose, 100 mg liquenano, 100 mg de β -glucano ⁶⁰ e papel filtro. A reação foi feita em 20 mM de tampão acetato de amônio pH 6.5, 5 mM NaCl, 2 mM MnCl₂, além de 30.7 µM de *BlAbn*-1 e 1 mM ácido ascórbico, em um volume de reação final de 1 mL. A reação ficou incubada a 35°C e 1200 rpm em tempos que variaram entre 2, 4 e 6 horas. Em todos os casos, a reação foi parada baixando a temperatura até 4°C e centrifugando por 15 min a 17000g. A determinação dos possíveis produtos foi realizada por espectrometria de massas com MALDI-TOF (Microflex, Bruker Daltonics). A preparação da amostra foi feita com 2 µL de matriz (ácido 2,5dihidroxibenzoico - DHB) a 1 mM e 1 µL do sobrenadante da reação HARVEY. ⁶¹

CAPÍTULO 4

4 **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

4.1 Clonagem, expressão e purificação

A analise de sequência de aminoácidos para as duas proteínas indicarem que possuem uma identidade do 78% como se indica na

Figura 15. Para estes genes que codificam as endo-1,5-α-L-arabinanases (*BIAbn-1 e BIAbn-2*), foram clonadas removendo do produto gênico os primeiros 29 aminoácidos de *BIAbn-1* e os primeiros 37 aminoácidos de *BIAbn-2*, que fazem parte do peptídeo sinal destas enzimas, de acordo com a predição do servidor *SignalP*⁶². O produto clonado corresponde, portanto, aos 291 aminoácidos, adicionado de um His-*tag* e da proteína de fusão tiorredoxina (Trx). ³⁸ O peso molecular teórico após da inserção do His-*tag* e Tioredoxina é de 46769.2 Da para *BIAbn-1* e, para *BIAbn-2*, 46562.3 Da.



Figura 15- Analises de *sequência* das duas arabinanases, pode se observar qeu as duas possuem um alto porcetagem de identidade 78%.



A expressão das arabinanases foi feita em *E. coli* Rosetta em meio ZYP (autoindutor) em duas temperaturas diferentes, 37°C e 17°C. Na Figura 16 podem ser observadas as bandas correspondentes ao peso teórico das arabinanases. As duas proteínas foram incubadas com a TEV protease e a Figura 17 mostra o produto da clivagem. Os pesos moleculares teóricos das enzimas são de 32445.9 Da (32.5kDa) e 32239.0Da (32.2kDa), para *BlAbn-1 e BlAbn-2*, respectivamente (plasmídeos representados na Figura 13).



Figura 16 - Expressão das Arabinanases. Electroforese em gel SDS-Page 12% representa a expressão e purificação por cromatografia de afinidade das enzimas pertencentes a *B. licheniformis*.
Acima) BlAbn-1 e Abaixo) BlAbn-2. As duas proteínas têm um peso molecular teórico de 46,5kDa



Figura 17- Proteínas clivadas por ação da TEV. Na franja vermelha fração não clivada e na franja azul fração clivada. M= Padrão de peso (kDa); **1**) *BIAbn*-1; **2**) *BIAbn*-2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dada a conhecida afinidade das arabinanases por metais divalentes, não foi possível a eliminação do *His-tag* e proteína de fusão (Trx) por cromatografia de afinidade. ^{51,63–65} Por esta razão, optou-se pela cromatografia de troca iônica para a separação da enzima *BlAbn-1* da protease TEV. Isto foi possível pela diferença entre os pontos isoelétricos (pl) que apresentam. De acordo com os valores calculados pelo servidor *PROTPARAM* ⁶⁶, *BlAbn-1* sem o *His-tag-Trx apresenta* um valor de pl de 6,22, enquanto a protease TEV tem um valor de pl de 8,99. O volume de eluição para *BlAbn-1* esta mostrado na Figura 18, onde é possível observar uma boa separação da enzima dos seus contaminantes.

Para a enzima *BIAbn-2*, este tipo de cromatografia não pode ser usada com sucesso, uma vez que os valores de pl para a enzima era de 8,90, comparado com o valor de 8,99 para a TEV. Para isso foi feita a análise do comportamento da TEV em um pH ácido. A protease tem atividade de clivagem em pHs entre 6,5 e 8 e é inativada e precipitada em pH ácido ³⁹. A purificação da TEV é feita num tampão Tris-HCl pH 8,0. Optou-se então por realizar a troca para o tampão citrato de sódio pH 4.0 (tampão que maior estabilidade a *BIAbn-2*), o que permitiu a precipitação da protease TEV e a separação da *BIAbn-2*.

A última etapa da purificação foi realizada através de filtração em gel em uma coluna *HiLoad* 16/600 Superdex 75 PG. Nesta etapa foi possível finalizar o processo de purificação, obtendo as amostras finais em elevado grau de pureza e também analisar o estado oligomérico delas. A eluição das duas arabinanases ocorreu perto de 65-70 mL, como mostra a Figura 19. A Figura 20 mostra um gel nativo que confirma o estado monomérico das duas proteínas.



Figura 18- Cromatografia de Troca Iónica: de *BIAbn*-1, pode-se observar um pico maior que corresponde a proteína em questão e em verde aumento de gradiente de NaCI.



Figura 19- Cromatografia de Exclusão Molecular: Em preto eluição de *BlAbn-*1; em azul eluição de *BlAbn-*2, a diferença nos tamanhos dos picos é pela diferente concentração.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 20 - Gel Nativo: na franja preta representa as arabinanases em estado monomérico (~32kDa).
M= padrão de peso molecular kDa; 1) BlAbn-1 após de troca iónica, 2) BlAbn-2 após de troca iónica, 3) BlAbn-1 após da exclusão molecular, 4), 5) BlAbn-2 após da exclusão molecular.

Ao final do processo de purificação em três etapas, cromatografia por afinidade, troca iônica e filtração em gel, o rendimento obtido para as enzimas *BIAbn-1* e *BIAbn-2* foi de 20 e 15 mg/mL de cultura, respectivamente.

4.2 DSF: Tampão ótimo e termoestabilidade em metais bivalentes

Feitos os ensaios de clonagem, expressão e o primeiro teste purificação, foi preciso obter e manter as proteínas o mais estaveis possível. É conhecido que a estabilidade térmica é fundamental para o estudo de estrutura de proteínas, visando o sucesso na cristalização e mesmo em estudos biofísicos. ⁴² Neste sentido, estudos de fluorimetria diferencial de varredura (DSF) foram realizados buscando encontrar o tampão adequado para cada uma das proteínas em estudo e assim obter a maior estabilidade durante a purificação e cristalização.

Na Figura 21, as condições onde enzimas demonstraram maior estabilidade térmica são listados. A figura também apresenta a concentração do tampão, o pH e a concentração de NaCl que possui cada solução testada.

Para *BlAbn-1*, o tampão fosfato de sódio (50 mM) pH 6.5 e uma concentração de NaCl de 100 mM renderam uma maior estabilidade considerando como indicador a temperatura de *Melting* (Tm) que foi de 51°C para 56°C. No caso de *BlAbn-2*, a melhor estabilidade térmica foi observada na condição onde havia citrato de sódio (50 mM), pH 4.0 e 150 mM de NaCl. Neste caso, o Tm foi de 44°C para 52°C.

É interessante observar que, embora as duas proteínas sejam definidas como enzimas de atividade endo-arabinanase de uma mesma família (GH43) e com razoável identidade entre elas (78.1%), as condições ótimas de estabilidade entre as enzimas são bastante diferentes e o mesmo valor para a temperatura de transição.



Figura 21- Estabilidade Térmica: Em azul claro as temperaturas de BlAbn-1 e em laranja as temperaturas de BlAbn-2. As cores azuis e laranja mais escuras são dos tampões que deram maior estabilidade térmica as enzimas. A maior temperatura para BlAbn-1 foi de 56°C 52°C para BlAbn-2.

Também foi realizada a valiação de termoestablidade frente a presença de aditivos, visando avaliar a eventual capacidade de ligação a metais. Oito metais divalentes foram testados e avaliados para a *BlAbn-1 e BlAbn-2*. Como mostrado na Figura 22, para a enzima *BlAbn-1* foi observado um aumento na estabilidade térmica para a maioria dos metais testados. O cloreto de cobalto (II) hexahidratado resultou em um aumento bastante significativo para a proteína, 61°C, tendo um ganho de quase 10°C em comparação com o controle, 51,3°C. Na sequência, o cloreto de estrôncio hexahidratado com 58°C. A menor temperatura de transição se deu com cloreto de cobre (II) dihidratado com 48,3°C. Shi, Hao et al. ⁶⁷ reportaram que o cobalto pode estimular no aumento da atividade catalítica de uma endo-arabinase em *Thermotoga thermarum*, o que corrobora os resultados observados em nossos experimentos.



Figura 22- Estabilidade em presencia de metais. O metal que ligou com a enzima *BIAbn*-1 e deu mais estabilidade foi o cobalto seguida de estrôncio, com o cobre foi a que teve a mais baixa estabilidade. O controle tinha *BIAbn-1* e agua e os ensaios tinham *BIAbn-1* e metal.

Para a *BlAbn-2* (Figura 23) o ganho de estabilidade térmica foi mais modesto do que aquele observado para *BlAbn-1*. Aqui foi observado que a maior estabilidade térmica ocorre frente à adição de cloreto de níquel (II) hexahidratado, com uma T_M de 46,3°C. Em seguida, o cloreto de cobalto (II) hexahidratado. Diferente do que foi observado para *BlAbn-1*, o cloreto de cobre (II) dihidratado deu uma estabilidade significativa e uma perda de estabilidade foi observada com o cloreto de estrôncio hexahidatado.



Figura 23- Estabilidade em presencia de metais. Para *BIAbn-2* o metal que deu mais estabilidade foi o níquel (Ni²⁺) seguido do cobalto (Co²⁺), com o cobre foi a que teve a mais baixa estabilidade. O controle tinha *BIAbn-2* e agua e os ensaios tinham *BIAbn-2* e metal.

4.3 Ensaios de Cristalização

4.3.1 Formação de cristais

Partindo dos resultados mencionados anteriormente e feitos os primeiros testes de cristalização para as arabinanases *BIAbn-1 e BIAbn-2*, a partir da triagem *das* condições dos kits, foi possível a formação e obtenção de cristais.

Dos kits de cristalização testados para *BlAbn-1*: CLASSICL, CRISTAL-SCREAM, INDEX, PACT SUITE, PEGs I, PEGs II e SALT RX, a formação e crescimento de cristais foi observada no kit ClassicL, com uma concentração de 17mg/mL. Os cristais se foram formados em 10 dias a 19°C. Na Figura 24, é possível observar alguns dos cristais formados no kit ClassicL em uma solução contendo 0.1mM HEPES pH 7,05, 10% (w/v) PEG 4000, 5% (v/v) 2-propanol.



Figura 24- Formação de cristal em CLASSIC-L: condição do poço 0.1mM HEPES pH 7,05; 10% (w/v) PEG 4000, 5% (v/v) 2-propanol. Esquerda: foto do cristal com luz normal; Direita: foto do cristal com luz UV.

Já para *BIAbn-2*: indícios de cristalização foram observados com os kits ClassicL e Salt RX (Figura 25 e Figura 26), usando uma concentração de proteína mais elevada, de 21 mg/mL, tendo crescido após 15 dias a 19ºC.



Figura 25 - ClassicL: condição do poço 0.1mM Cacodilato de Sódio pH 6.5; 0.2mM Acetato de Magnesio, 15% (v/v) 2-Methyl-2, 4-pentanediol (MPD). Esquerda: foto do cristal com luz normal; Direita: foto do cristal com luz UV.

Fonte: Elaborada pelo autor

Salt RX



Figura 26- Salt RX: condição do poço 0.1mM TRIS pH 8.5; 0.8mM LiSO4. Esquerda: foto do cristal com luz normal; Direita: foto do cristal com luz UV.

Estudos anteriores demonstraram a formação de cristais em outras arabinanases usando uma concentração relativamente alta de proteína 12 – 25 mg/mL) e uma faixa de pH entre 6.0 – 8.0 na maioria dos casos foi tampão Tris. 33,47,51,68–70

4.3.2 Difração de raios X, coleta e processamento de dados

O monocristal mostrado na Figura 27 foi utilizado para a coleta de dados de difração em uma fonte doméstica (anodo rotatório) operando na radiação do cobre Kα. Duzentas imagens de difração foram coletadas e, apesar do forte anel de gelo formado durante o processo de congelamento do cristal para a coleta de dados, um conjunto de dados completo pôde ser coletado. O processamento dos dados realizado com o programa XDS⁷¹ indicou um grupo espacial P2₁.



Figura 27- Padrão de difração da proteína *BlAbn*-1, processado no software XDS. Fonte: Elaborada pelo autor

O coeficiente de Matthews calculado com o pacote CCP4 ^{72,73}, sugeriu um conteúdo de quatro moléculas na unidade assimétrica com uma fração de solvente estimada em 42%. Essas informações foram confirmadas com a substituição molecular realizada com o programa *Phaser-MR* da ferramenta cristalográfica PHENIX ⁷⁴, que empregou como molde a estrutura cristalográfica da arabinanase de *Bacillus subtilis* ⁴⁷, que tem 73% de identidade com a *BlAbn-1*. Uma solução foi encontrada com quatro moléculas na unidade assimétrica. Para esta solução, um escore Z para a função de rotação (RFZ) de 8,3 foi observado e, após localizar todos os monômeros, o escore Z para a função de translação (TFZ) foi de 22,1.

O programa *AutoBuild*⁷⁵ foi empregado para a reconstrução do modelo a partir do modelo obtido após a substituição molecular. Nesta etapa, 283 aminoácidos dos 291 aminoácidos foram construídos e ajustados na densidade eletrônica a partir do emprego de simetria não-cristalográfica (NCS). Finalmente, o programa *COOT*⁴⁸ foi usado para o refinamento manual da estrutura no espaço real. O modelo final apresenta valores de R_{work} e R_{free} de 24,2% e 29,8%, respectivamente, para o modelo final refinado com um conjunto de dados de resolução máxima de 2,70 Å. As estatísticas de processamento e refinamento dos dados estão resumidas na Tabela 4 abaixo.

Parâmetro	BIAbn-1
Comprimento de onda (Å)	1.54
Resolução (Ă)	44.53 - 2.703 (2.8 - 2.703)
Grupo espacial	P2 ₁
Cela unitária (Ă / °)	64.58 124.24 69.24 90 91.16 90
Reflexões totais	51094 (5620)
Reflexões únicas	25295 (2798)
Multiplicidade	2.0 (2.0)
Completeza (%)	84.51 (93.45)
<i o(i)=""></i>	8.93 (2.09)
B-fator de Wilson (Å ²)	37.90
R _{merge} *	0.08686 (0.406)
R _{meas}	0.1176
CC _{1/2}	0.978 (0.775)
CC*	0.995 (0.934)
R _{factor} / R _{free}	0.243 (0.311) / 0.299 (0.354)
Número de átomos não hidrogênio	9132
Macromoléculas	9008
Água	116
Aminoácidos	1136
RMSD _{ligação} (Å)	0.014
RMSD _{ângulo} (°)	1.38
Ramachandran (%)	
Região favorável	98
Região não permitida	0
Clashscore	17.81
B _{fator} médio (Å ²)	40.20
Macromoléculas (Å ²)	40.40
Solvente (Å ²)	30.50

Tabela 4- Estatística do processamento e refinamento da estrutura da enzima BIAbn-1.

*Rmerge = $\sum hkl \sum i |Ii(hkl)-<I(hkl)>|/ \sum hkl \sum i < I(hkl)>, onde Ii(hkl) é a intensidade observada para I(hkl) e < I(hkl)> é a média das intensidades.$

4.3.3 Análise da Estrutura Cristalográfica

Como já havia sido observada na estrutura da enzima endo-L-arabinanase de *B. subtilis* (PDB ID 1UV4) ⁴⁷ a enzima *BIAbn*-1 apresenta um enovelamento do tipo β*propeller* ou hélice beta, contendo cinco pás. A enzima tem um formato cilíndrico com diâmetro e altura de aproximadamente 40 Å. Cada uma das cinco pás é composta por um motivo repetido com formato em "W", composto por quatro fitas β antiparalelas ⁴⁷. A estrutura cristalográfica de *BIAbn*-1 apresenta quatro moléculas na unidade assimétrica e o arranjo entre estas moléculas esta mostrado na Figura 28 abaixo.



Figura 28- Estrutura cristalográfica da enzima *BlAbn*-1. À esquerda, tetrâmero observado na unidade assimétrica. À direita, disposição do sitio catalítico da *BlAbn*-1. O sitio catalítico esta formado por três aminoácidos ácidos dois ácidos aspárticos e um ácido glutâmico (*Asp-13, Asp-130* e *Glu-182*)

Fonte: Elaborada pelo autor

O sitio ativo da enzima encontra-se numa abertura em "V" e é localizado na região central da estrutura. Nesta região, são encontrados dois ácidos aspárticos e um ácido glutâmico (Asp-13, Asp-130 e Glu-182), que formam a tríade catalítica característica das proteínas da família GH43, como foi previamente observado. ⁷⁶ A Figura 29 mostra a superposição das estruturas de *B. licheniformis - BlAbn*-1 (em roxo
e sitio ativo em laranja) e *B. subtilis* – 1UV4 (em verde e sitio ativo em rosa) onde é possível observar a similaridade no enovelamento, além da conservação estrutural dos aminoácidos catalíticos.



Figura 29- Alinhamento estrutural. Superposição das estruturas, em vermelho *BlAbn-1* em roxo 1UV4. Fonte: Elaborada pelo autor

Uma busca por proteínas com similaridade estrutural com a enzima *BlAbn*-1 realizada através do servidor DALI ⁷⁷ demonstrou que o arranjo estrutural observado para esta enzima é bastante típico para as enzimas da família GH43. Trinta e quatro estruturas foram encontradas com um Z-Score maior que 30, sendo a maioria destas relativas a enzimas da família GH43. As primeiras vinte e cinco soluções correspondem a diferentes estruturas de arabinanases (Z maior ou igual a 31.4), seguido por xilanases e β -xilosidases também da família GH43. Como esperado, no topo da lista figura a estrutura da enzima de *B. subtilis*, com 74% de identidade e um escore Z de 47,8.

A comparação da estrutura da enzima *BlAbn-1* com as estruturas das enzimas de *B. subtilis* (BsAbn, PDB ID 1UV4) ⁴⁷, de *Geobacillus stearothermophilus* (GsAbn, PDB 3CU9) ³³ e *Geobacillus thermodenitrificans* (GtAbn, PDB 1WL7) ⁷⁰, além de estruturas de complexos destas mesmas enzimas, revelou uma grande similaridade estrutural, como mostra a Figura 30 abaixo.



Figura 30- Superposição das estruturas cristalográficas das enzimas BIAbn1 (em verde), BsAbn (amarelo), GsAbn (rosa), 3D5Y (GsAbn, branco), GtAbn (azul), 3D61 (GsAbn, laranja), 3D5Z (GsAbn, verde claro), 3D60 (GsAbn, ciano). Os aminoácidos catalíticos de *BIAbn*-1 *estão destacados.*

Fonte: Elaborada pelo auto.

Apenas uma região de alça (*loop*), mostrada na parte superior da figura anterior apresenta uma pequena diversidade estrutural. No restante, o enovelamento é bastante conservado para os membros deste grupo.

A visão lateral (rotacionada 90 graus em torno do eixo horizontal) mostra que as pás que constituem a hélice (*propeller*) formam uma abertura superior em formato que lembra a letra "V" e que define a região do sítio ativo. O sítio, portanto, é exposto ao solvente e tem fácil acessibilidade, como seria esperado para enzimas que possuem modo *endo* de ação. A Figura 31 também mostra que a acessibilidade do substrato ao sítio ativo pode ser parcialmente modulada pelo movimento dos loops que recobrem a porção superior (mostrada à direita e à esquerda da figura). A presença de um loop mais longo nesta região foi apontada como determinante para a seletividade de modo *endo* ou *exo* para arabinanases ⁶⁹, sendo o loop longo relacionado à atividade exo-arabinanase e os loops curtos relacionados à atividade endo-arabinanase, onde a acessibilidade ao substrato precisa ser maior. No entanto, estudo realizado a partir de enzimas mutantes demonstrou que este modelo não estava correto ⁴⁷.



Figura 31- Visão lateral da superposição das estruturas de endo-arabinanases bacterianas. Fonte: Elaborada pelo autor.

Dentre os membros da família GH43, duas enzimas com atividade não arabinanase, figuram no topo da lista do servidor DALI duas enzimas: uma enzima β -xilosidase de *Bacillus licheniformis* (PDB 3LV4, 32% de identidade e escore Z de 31,4) e a enzima endo-1,4-beta-xilanase de *Bacteroides thetaiotaomicron* (PDB 3QZ4, 25% de identidade e escore Z de 29,1). A superposição da estrutura da enzima *BlAbn-1* com estas duas enzimas esta mostrada na Figura 32. É interessante observar que, embora a enzima de *B. thetaiotaomicron* tenha atividade em ligações do tipo 1,4 e com configuração β , diferente das endo- α -arabinanases, o enovelamento é conservado, demonstrando versatilidade da Natureza com relação a este enovelamento.



Figura 32- Superposição das estruturas das enzimas BIAnb-1 (em verde), endo-xilosidase de B. licheniformis (ciano) e endo-xilanase de B. thetaiotaomicron (magenta). A enzima xilosidase possui um domínio de adesão (módulo de ligação a carboidratos) mostrado na parte inferior da figura. Para o domínio catalítico, o enovelamento do tipo β-propeller é conservado entre as enzimas, embora as atividades catalíticas sejam diversas e sobre ligações glicosídicas diversas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A região do sítio ativo da enzima *BlAbn-1* pôde ser deduzida a partir da comparação da estrutura desta enzima com a estrutura da enzima GsAbn complexada com arabinotriose (PDB 3D5Z). De acordo com a superposição das estruturas, a arabinotriose ocupa os sítios -1, +1 e +2 no sítio ativo da enzima (mostrados da direita para a esquerda na Figura 33). Aqui, o açúcar (arabinano) no sítio -1 faz interações com o Asp13, através da hidroxila OH5 do sacarídeo (2,8 Å). Já as hidroxilas OH2 e OH3 interagem com o Asp130 (2,3 Å e 2,4 Å, respectivamente). É interessante observar que o Asp13 é polarizado pelos aminoácidos na vizinhança (Thr28, His12 e His252), criando uma rede de interações que regula o pKa deste aminoácido. ⁷⁸



Figura 33- Potenciais interações entre o sítio ativo da enzima *BlAbn*-1 (em branco) e o substrato arabinotriose (mostrado em amarelo). A posição do substrato foi deduzida com base na superposição da estrutura da enzima *BlAbn*-1 com a estrutura de GsAbn (PDB 3D5Z).

Fonte: Elaborada pelo autor

O oxigênio da ligação glicosídica formada entre arabinano -1 e +1 interage com o Glu282 (2.5 Å). Já no sítio +1, as hidroxilas OH3 e OH2 interagem com a Asn127. Estas interações poderiam explicar a razão da falta de atividade da enzima sobre o substrato sintético pNP- α -L-arabinofuranosídeo. Como neste substrato, o sítio +1 seria preenchido com o grupo *p*-nitrofenolato, as interações com a Asn127 seriam perdidas, o que poderia justificar a baixa eficiência da enzima em manter este substrato. ³³

Finalmente, no sítio +2, a hidroxila OH3 interage com a carbonila da cadeia principal da Gly92. Vale destacar também a interação da Ser147 com o Glu182, novamente polarizando o aminoácido catalítico que atua como ácido geral.

Em termos de mecanismo, de acordo com a proposta típica para enzimas com mecanismo de inversão da configuração anomérica, a reação teria início com o ataque da base geral (Asp13) a uma molécula de água, desprotonando esta molécula. O radical hidroxil gerado então atacaria o carbono C1 do açúcar no sítio -1 (distante 6.3 Å da base geral). A ligação glicosídica seria então quebrada formando um intermediário OR ligado ao ácido geral (Glu182), que se encontra próximo ao oxigênio da ligação glicosídica (2.5 Å). Desta forma, acredita-se que o papel do aminoácido Asp13 seja acessório, modulando o pKa do ácido geral, Glu182, que é encontrado a 4.0 Å de distância na estrutura de *BlAbn-*1.

Em diversas endo-arabinanases, é observado um sítio de ligação a um átomo de cálcio nas proximidades do sítio ativo. ^{51,64,68,79} Neste sítio, o átomo de cálcio aparece ligado a uma histidina e a moléculas de água (Figura 34). Na estrutura cristalográfica da enzima BIAbn-1 não há densidade eletrônica clara para a modelagem do átomo de cálcio. No entanto, a comparação com as estruturas das de Β. subtilis. Geobacillus stearothermophilus е enzimas Geobacillus thermodenitrificans sugere a interação com cálcio através da His252 (numeração em BlAbn-1). O papel desta interação não é claro. No entanto, a análise estrutural demonstra que esta histidina, além de coordenar o átomo de cálcio, também interage com o a base geral Asp13. Desta forma, a interação com o cálcio poderia alterar a polarização do ácido geral, responsável pelo início da catálise. Esta observação é corroborada com a observação experimental de que a atividade da enzima BIAbn-1 é reduzida na presença do agente quelante EDTA, como demonstrado nesta

dissertação. É interessante destacar que o papel do cálcio parece ser enzima dependente. Para algumas enzimas, a introdução de EDTA não parece afetar a atividade enzimática. Uma análise metagenômica de rúmen revelou duas endoarabinanases da família GH43 com mecanismo independente de cálcio ⁵¹, embora possua a histidina relativa a His252 e tenha sido observada a interação com o cálcio na estrutura cristalográfica. Por outro lado, a enzima arabinofuranosidase (GH43) de *Halothermotrix orenii*, que também possui um sítio de ligação ao cálcio, demonstrou um aumento na atividade específica de 6,7 para 17,4 U/mg quando pré-tratada com EDTA e na presença de cálcio, respectivamente. De forma geral, compreende-se que a interação com o cálcio, embora não seja essencial, culmina em muitos casos com um aumento na atividade enzimática por motivos que ainda precisam ser melhor explorados.



Figura 34- Sítio de ligação ao cálcio em endo-arabinanases. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Caraterização enzimática

4.4.1 Análise da concentração ótima das arabinanases

A concentração ótima das enzimas arabinanases foi o ponto de partida para a caracterização bioquímica das enzimas. Após um teste onde se variou a concentração das enzimas entre 10 e 150 nM, com uma concentração saturante de arabinano desramificado, buscamos leituras onde a absorbância fosse maior que o branco e menor que uma unidade de absorbância em um tempo de reação de 20 min e a uma temperatura inicial de 35°C.

Como se apresentam na Figura 35 e Figura 36, para *BlAbn-1* e *BlAbn-2* respetivamente, as concentrações para o início dos estudos de caracterização bioquímica de 20 nM para *BlAbn-1* e 75 nM para *BlAbn-2*, mostraram-se adequadas, considerando que foi a concentração mais baixa que resultava em uma leitura acima de 0,4 de absorbância em 20 min de reação.



Figura 35- Concentração ideal BIAbn-1 Fonte: Elaborada pelo autor.



Figura 36- Concentração ideal BIAbn-2.

4.4.2 Analise de especificidade de substrato de BIAbn-1 e BIAbn-2

Nos primeiros ensaios da medida da atividade catalítica foram realizados experimentos da degradação de substratos comumente empregados para enzimas da família das GH43, os que foram usados em trabalhos recentes na literatura. ^{50,51,67} No ensaio, foi observada a atividade catalítica em arabinano desramificado e arabinano linear, mas não se detectou atividade nos substratos *arabinano de lariço*, arabinoxilano de centeio, arabinano de açúcar de beterraba, no subtrato sintético *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosideo (*p*-PNA), e em celulose, que como esperado, não houve atividade. Estes resultados foram observados para as duas enzimas (Figura 37 e Figura 38) e estão em consonância com dados recentes reportados na literatura científica ^{50,51,67} para endo-arabinanases (GH43). Curiosamente, as enzimas β -D-xilosidase e α -L-arabinofuranosidase que também pertencem à família GH43, têm atividade catalítica frente aos substratos sintéticos p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosidase, respectivamente como reportaram Zhou et al. e Shinozaki et al. ^{55,80}



Figura 37- Especificidade de substrato para BIAbn-1.





Figura 38- Especificidade de substrato para BIAbn-2.

4.4.3 Analise de pH e temperatura ótima para BIAbn-1 e BIAbn-2

A partir destes ensaios para a optimização da hidrólise do arabinano, foi possível a determinação da temperatura e o pH ótimo, como é mostrado nas figuras abaixo.

A condição ótima para *BlAbn*-1 de foi observada em pH 8,0 e a uma temperatura de 45°C (Figura 39 e Figura 40). De maneira similar, as condições ótimas de *BlAbn-2* ocorrem em pH 7,00 e uma temperatura de 40°C (Figura 41 e Figura 42). Para fins de comparação, as temperaturas ótimas das endo-arabinanases de *Halothermothrix orenii* ⁶⁵, *Bacillus subtilis* ⁸¹, *Thermotoga thermarum* ⁶⁷ foram reportadas em 76, 50 e 80°C, respetivamente.



CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA BIAbn-1

Figura 39- Validação da atividade da *BIAbn-1* em diferentes pH; e a atividade ótima é dada em pH 8,0. Fonte: Elaborada pelo autor.



Figura 40- Atividade da *BIAbn-1* em variação de temperatura; se observa a melhor atividade a uma temperatura de 45°C.

CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA BIAbn-2







Figura 42- Atividade da BIAbn-2 em variação de temperatura; se observa a melhor atividade a uma temperatura de 40°C

4.4.4 Analise da atividade especifica para BIAbn-1 e BIAbn-2

A atividade especifica, definida como a quantidade de produto gerado por minuto por miligrama de enzima (1U = 1 μ mol/(min.mg)), foi determinada a uma temperatura de 35°C e uma concentração de enzima de 20 nM para *BlAbn-1* e de 75nM para *BlAbn-2* em um tempo de 25 e 20 minutos, respectivamente. Neste experimento a inclinação da curva de formação de produto (absorbância em 540 nm) no tempo foi comparada à curva padrão (Figura 43), para obter a velocidade de formação de produto (μ mol/min) e, subsequentemente, esta velocidade foi dividida pela concentração de enzima, resultando em uma atividade específica de 127 e 74 U/mg para *BlAbn-*1 e *BlAbn-*2 respetivamente (Figura 44 e Figura 45).



Figura 43- Curva padrão de arabinano para anular a sinal de fundo.



Figura 44- Linearidade da reação em diferentes tempos para BlAbn-1.

Fonte: Elaborada pelo autor.



Figura 45- Linearidade da reação em diferentes tempos para BIAbn-2.

4.4.5 Analise da ativação de BIAbn-1 e BIAbn-2 por metais divalentes

É conhecida a afinidade de proteínas da família GH43 por metais. Além dos resultados de fluorimetria diferencial de varredura (DSF), ensaios de atividade para avaliar o rendimento com metais foram realizados; para tais medidas os experimentos foram avaliados a 35°C por 20 min com a concentração ótima das enzimas, arabinano desramificado e em tampão fosfato de sódio pH 8,0 e 7,0 para *BlAbn-1* e *BlAbn-2* respetivamente e a adição de metais bivalentes baixa a forma de cloretos.

A atividade de *BlAbn-1* teve um aumento significativo com CaCl₂, CoCl₂ e MgCl₂; dos quais o Co⁺² foi o metal que apresentou o maior ganho de atividade, com quase 20%. Com o MnCl₂ e SrCl₂ pode-se considerar que não tem há diferença. Finalmente, com CuCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ e EDTA, a atividade caiu entre 24-30% (Figura 46).





Já para *BIAbn-2*, o Co⁺² foi o metal que apresentou o maior ganho, diferente da *BIAbn-1*, e o CuCl₂ obtive um ganho mínimo de 10%. Com o CaCl_{2'} houve uma perda de 10% e, no caso de ZnCl₂ e NiCl₂, a atividade melhorou em 12%. O teste com EDTA indicou uma diminuição na atividade em mais de um 50% (Figura 47).



Figura 47- Variação do rendimento de BIAbn-2 frente a metais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Ensaios complementares

4.5.1 Ensaios de possível atividade oxidativa

A análise minuciosa da estrutura da enzima *BlAbn*-1 demonstrou a presença de um centro formado por duas histidinas e uma tirosina. Na enzima de *B. subtilis*, este motivo aparece coordenando um átomo de cálcio. O mesmo foi observado em outras estruturas cristalográficas de outras endo-L-arabinanases. ^{33,47} Curiosamente, este sítio é bastante similar ao sítio de interação com metais observados nas enzimas líticas de polissacarídeos ou LPMOs.

As LPMOs são enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas em polissacarídeos que são inacessíveis à clivagem por hidrólise enzimática. Ao aumentar a acessibilidade dos substratos, as LPMOs aumentam a eficiência total da degradação enzimática de polissacarídeos. Este efeito já é explorado pela atual geração de coquetéis enzimáticos comerciais ⁵⁸. Estas enzimas, classificadas no CAZy como enzimas de atividade auxiliar, têm em comum um sítio ativo exposto ao solvente com duas histidinas e uma tirosina coordenando um íons de cobre. ⁸² O papel do cobre na reação é o de reduzir o dioxigênio, o que requer elétrons de um doador externo. O dioxigênio reduzido possivelmente abstrai um hidrogênio do substrato, levando a clivagem de uma ligação β-1,4, tipicamente. ⁵⁸ O mecanismo exato ainda não esta claramente estabelecido, embora cálculos empregando DFT tenham sugerido que um radical cobre-oxil abstraia um hidrogênio e, subsequentemente, resulte na hidroxilação do substrato através de um mecanismo de recuperação de oxigênio (*oxygen-rebound*). ⁸³

O sítio catalítico da enzima LPMO (AA9) de *Trichoderma reesei* (PDB 2VTC) ⁸⁴ esta mostrado na Figura 48 abaixo. A coordenação do átomo do metal empregado para a reação oxidativa é bastante conservada entre as LPMOs, sendo invariante a 'braçadeira de histidinas. Tipicamente o primeiro aminoácido da sequência é uma histidina que coordena o átomo metálico. A coordenação é completada com uma segunda histidina e um terceiro aminoácido. No caso das LPMOs da família AA9 (enzimas fúngicas), o terceiro aminoácido é, tipicamente, uma tirosina.



Figura 48 - Visão geral da estrutura cristalográfica da enzima LPMO de *T. reesei*. O átomo de níquel cristalizado no sítio ativo esta mostrado como esfera e os aminoácidos próximos a ele, como *sticks*. À direita, o sítio ativo é mostrado em maiores detalhes. H1, H89 e Y176 coordenam o átomo de níquel, enquanto H165 e Q174 completam a vizinhança polar.

Uma busca por este motivo espacial (H1-H89-Y176) presente na enzima LPMO (anteriormente classificada como GH61) de *T. reesei* (PDB 2VTC) ⁸⁴ realizada através do programa *SPASM* ⁸⁵, relacionou duas enzimas arabinanases de *Cellvibrio japonicus* e *Geobacillus thermodenitrificans* como proteínas que contém um motivo similar ao motivo de ligação ao Cu²⁺ observado naquela LPMO. Esta similaridade estrutural observada através da comparação dos motivos espaciais levou à construção da seguinte hipótese: a presença deste motivo espacial é suficiente para a interação com o metal, tal como observado em LPMO? E mais ainda: a interação com metal neste sítio específico é suficiente para introduzir uma atividade oxidativa, tal como observado em LPMOs?

As sequências de aminoácidos das enzimas de *C. japonicus* e *G. thermodenitrificans* (1GYD e 1WL7) foram usadas para a busca de proteínas homólogas a estas e que conservassem o motivo estrutural (H1-H89-Y176) observado na enzima LPMO. Após comparação empregando o programa BLAST com o genoma de *B. licheniformis* ATCC 14580, as duas arabinanases foram identificadas, com código GenBank: AAU41895.1 e AAU40201.1. A análise das sequências e os alinhamentos das proteínas 1GYD e 1WL7 com as sequências dadas pelo BLAST assim como o alinhamento entre elas, estão mostradas com maiores detalhes nos

anexos. A Figura 49 abaixo mostra as diferenças estruturais em termos de enovelamento, ao mesmo lado que evidencia a similaridade para este motivo estrutural especificamente.



Figura 49- À esquerda, superposição da estrutura da LPMO de *T. reesei* (PDB 2VTC, em verde) e a arabinanase de *G. thermodenitrificans* (magenta). A figura demonstra a ausência de similaridade estrutural para este alinhamento, além de enovelamentos completamente diversos. À direita, a similaridade entre os motivos (His-His-Tyr) é evidenciada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A comparação das sequências das enzimas endo-arabinanase de *G. thermodenitrificans* e de *B. licheniformis* demonstrou que, das duas endoarabinanases presentes em *B. licheniformis*, a enzima *BlAbn-1* apenas tinha o motivo conservado, correspondendo aos aminoácidos His252, His264 e Tyr266. Uma vez que a enzima *BlAbn-1* possui o motivo observado em LPMO (inferindo a partir da similaridade com a enzima de *G. thermodenitrificans*), e sabendo que esta enzima já possui a capacidade de ligação de um metal próximo à histidina His252, passamos a avaliar se haveria uma possível atividade oxidativa em condições ideais para a enzima *BlAbn-*1.

4.5.1.1 Analise de sinergismo: Accellerase 1500 com BIAbn-1 e BIAbn-2

O real efeito da atividade das enzimas *BlAbn-1* e *BlAbn-2* pode ser avaliado pela sua capacidade de aumentar a quantidade de açúcares redutores formados após a hidrólise da biomassa da parede celular, quando comparada a atividade de um coquetel enzimático comercial. Como padrão, o coquetel enzimático comercial *Accellerase 1500* (DuPont) é apresenta um conjunto de enzimas de atividade exo e endo-glucanase, além de beta-glicosidases. Este coquetel tem atividade ótima em temperaturas entre 50 e 65 °C e em pH 4,0 – 5,0, sendo facilmente inativado em temperaturas maiores que 70°C e a pH maiores de 7,0. ⁸⁶

O efeito sinérgico avaliado entre o coquetel *Accellerase* 1500 e expansinas (proteínas responsáveis pelo afrouxamento das paredes celulares de celulose permitindo o crescimento das plantas) foi testado e foi observado que há uma melhora na atividade hidrolítica sobre o papel de filtro em 36%, segundo Tomazini et al. ⁸⁷ Ensaios recentes demostraram que existe certa atividade sinérgica do coquetel *Accellerase* 1500 com arabinanases, onde um aumento da atividade sobre o bagaço da cana-de-açúcar pré-tratada foi observado, resultando em um modesto aumento de 5%. ⁵⁷ Até o momento, este é o único dado na literatura de avaliação do efeito de sinergismo entre arabinanases e um coquetel comercial.

Para nossos estudos foram empregados bagaço de cana pré-tratado, denominado *hidrosolve* (tratamento com 80% de agua e 20% de solvente orgânico), composto por celulose, hemicelulose e lignina. Adicionalmente o papel de filtro, que é 100% celulose, também foi empregado. Estes ensaios foram realizados com uma concentração mais baixa que a reportada por Botelho (3 ug/ml de *BlAbn-1*) e com enzima livre (não-imobilizada).

No primeiro teste, realizado em hidrosolve (Figura 50), foi possível observar um aumento de atividade da *Accellerase 1500* com *BlAbn-1* de 45%, em comparação com *Accellerase 1500*. Curiosamente, a atividade de *BlAbn-1* sobre o substrato (biomassa pré-tratada) é extremamente baixa. O pH em que foi realizado o experimento (pH 8,0) é o pH ótimo da *BlAbn-1* e esta fora da faixa ótima para o coquetel, mas não foi um

obstáculo para a atividade da *Accellerase 1500.* Infelizmente não foi possível testar *BIAbn-2*, sendo limitante o substrato.



Figura 50 - Atividade de sinergismo. *Accellerase 1500* e *BlAbn-1*, em Hidrosolve (bagaço de cana tratado com 80% de agua e 20% de solvente orgânico), testado em tampão fosfato de sódio pH 8,0.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Também foi testada também a atividade em papel de filtro. Na a atividade sinérgica do coquetel *Accellerase 1500* adicionado de *BlAbn-1,* apresenta um aumento de 35% em comparação com a atividade do coquetel. Para o teste com *Accellerase 1500* e *BlAbn-2* (), o complexo não apresenta diferença na atividade hidrolítica. Este ensaio foi feito em pH 7,0, pH ótimo da *BlAbn-2*. Nos dois casos a atividade das arabinanases foi nula.



Figura 51- Atividade de sinergismo. *Accellerase* 1500, *BIAbn-1* e *Accellerase* com *BIAbn-1* em papel de filtro. Todas as reações foram feitas em tampão fosfato de sódio pH8,0.



Figura 52- Atividade de *Accellerase, BlAbn-2 e Accellerase com BlAbn-1.* Todas as reações foram feitas em tampão fosfato de sódio pH8,0.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por último, a adição de sulfato de níquel (NiSO₄) nos testes de sinergismo, como é mostrado na Figura 53, resultou em queda da atividade da *Accellerasse 1500* de 29% em relação à *Accellerase 1500*. Novamente pode se observar o aumento na atividade de *Accellerase 1500* com *BlAbn-1*, e o ganho ainda maior no complexo *Accellerase 1500* - *BlAbn-1* - NiSO₄, onde se obteve um aumento de 97% em relação com *Accellerase 1500* - NiSO₄, e um ganho do 12% em comparação com *Accellerase 1500* - *BlAbn-1*.

O ganho de atividade quando da adição da enzima *BlAbn-1* ao coquetel em biomassa pré-tratada pode ser facilmente explicado pela hidrólise dos componentes da hemicelulose (arabinano), resultando em maior quantidade de açúcares redutores total formada. Contudo, se esta fosse a hipótese, o efeito da adição da enzima *BlAbn-1* deveria ser aditivo e não sinérgico, isto é, a enzima sozinha deveria ter uma leitura que, uma vez somada à atividade do próprio coquetel, resultasse na leitura observada para o coquetel adicionado de *BlAbn-1*. Esta diferença pode evidenciar fatores envolvidos na acessibilidade ao substrato ou um mecanismo diferente de sinergismo.

Para avaliar um possível mecanismo diferenciado, o mesmo teste foi repetido em papel filtro, que é composto por celulose. Neste substrato, a enzima endo-L- α arabinanase não têm atividade. Curiosamente, o mesmo ganho de atividade foi observado para o coquetel suplementado com *BlAbn-1*, embora a enzima sozinha não tenha apresentado atividade sobre celulose, conforme se esperava. O teste foi repetido diversas vezes resultando sempre em ganhos da ordem de 30% ao menos quando da adição de *BlAbn-*1 ao coquetel.

É curioso o fato que *BIAbn-1* apresenta este efeito sinérgico, enquanto *BIAbn-2* não apresenta. Vale ressaltar que a enzima *BIAbn-1* possui o motivo estrutural formado por duas histidinas e uma tirosina observado também para enzimas com capacidade de clivar a celulose por um mecanismo oxidativo (LPMOs). Já a enzima *BIAbn-2* não possui este motivo. Na tentativa de avaliar se uma possível atividade oxidativa poderia ser a responsável pelo sinergismo observado sobre o papel filtro, o experimento foi repetido na presença de um metal divalente, o níquel. Neste cenário, o efeito sinérgico foi ainda maior, apresentando um ganho de 168% de atividade

quando comparada com a atividade do coquetel, sugerindo que o ganho de atividade é *BIAbn-1* dependente, mas é também dependente da presença de um metal.



Figura 53- Atividade de *Accellerase*, *BlAbn-*1 e *Accellerase* com *BlAbn-*1.em presença de NiSO₄. Todas as reações foram feitas em tampão fosfato de sódio pH8.0.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5.2 Análise de uma possível atividade oxidativa em BIAbn-1

Nos primeiros ensaios da medida de uma possível atividade oxidativa, foram realizados experimentos de degradação de substratos que são típicos para enzimas que oxidam celulose, no grupo das AA9, AA10 e AA11. Nestes testes, foi usado o Mn²⁺ como metal, uma vez que dados da literatura (79) indicam que o manganês é o segundo melhor metal para a oxidação de celulose. Adicionalmente, o manganês mostrou ser capaz de aumentar atividade enzimática nos ensaios da função hidrolítica.

Medidas feitas com diferentes tipos e concentrações de substrato (PASC, papel filtro, amido, liquenano, β-glucano), em diferentes temperaturas, proporções de metal e iniciador (ácido ascórbico) e tempos de reação foram avaliados quanto à formação de produtos oxidativos por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Em nenhum dos casos, no entanto, foi possível a identificação inequívoca de produtos de oxidação, embora em alguns espectros, a formação de novos picos tenha sido observada em relação ao espectro do controle de reação (sem enzima).

Desta forma, nossos experimentos não puderam ser conclusivos quanto a uma possível atividade oxidativa da enzima *BIAbn-*1 através de um mecanismo similar ao mecanismo empregado pelas enzimas LPMO da família AA9.



Figura 54 - Possíveis formação de produtos por atividade oxidativa da BlAbn-1. Em azul a reação com enzima BlAbn-1 e em cinza o branco (sem enzima). A reação tinha como substrato papel de filtro, como metal oxidante cloreto de manganês (Mn²⁺) 2 mM; iniciador, ácido ascórbico 1 mM e BlAbn-1, 30.7 μM; preparado em tampão acetato de amônio 50 mM pH 6,5. A formação de picos pode indicar a formação de adutos produto da possível oxidação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

CAPITULO 5

5 CONCLUSÕES

5.1 Conclusões

No presente trabalho são apresentados resultados da clonagem, expressão, purificação, estrutura, caracterização bioquímica e ensaios complementares de enzimas endo-arabinanases oriundas de *Bacillus licheniformis*.

Partindo da biblioteca de cDNA disponível no grupo, decidimos pela clonagem de duas proteínas da família GH43 que têm importância na degradação dos componentes da biomassa da parede celular vegetal, em especial da hemicelulose.

O ensaio de DSF permitiu a melhora da estabilidade das proteínas, estabelecendo um protocolo mais preciso de purificação, além de indicar a afinidade que as enzimas possuem a metais divalentes.

Foi possível a resolução da estrutura da proteína *BlAbn-1* a uma resolução 2,7 Å. O enovelamento é similar àquele observado para as arabinanases, do tipo β -*propeller*, sendo possível também identificar de forma clara o sitio catalítico formado pela triade ácida.

Os estudos de caracterização bioquímica permitiram identificar a especificidade do substrato, assim como encontrar as melhores condições de temperatura e pH, onde as proteínas possuem maior atividade. Além disso, a influência dos metais e do EDTA durante a atividade também foram estabelecidos.

Os estudos complementares permitiram estabelecer um claro efeito sinérgico quando da adição da enzima *BlAbn*-1 ao coquetel enzimático *Accellerase 1500*. Este efeito representa um ganho de 35% sobre celulose e é específico para *BlAbn*-1, não sendo observado em *BlAbn-2*. Curiosamente, a enzima *BlAbn*-1 apresenta um motivo espacial também observado no sitio ativo das enzimas LPMOs, que poderia, em princípio, coordenar um metal e, possivelmente, iniciar uma reação oxidativa de sacarídeos. A adição de um metal (níquel) efetivamente tornou ainda maior o efeito sinérgico. Contudo, estudos adicionais serão necessários para estabelecer uma relação mecanística.

REFERÊNCIAS

1 Lane, J. The COP21 agreement : Greenhouse Gases and the GDP. International Journal of Research in Humanities and Social Studies, v3, n.1, p. 1-17, 2016

2 Robbins, A. How to understand the results of the climate change summit: Conference of Parties21 (COP21) Paris 2015. **Journal Public Health Policy**, v 21, 1–4, 2016.

3 International Energy Agency. **Key world energy statistics**, Paris: IEA, 2015. Disponivel em: http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/key-world-energy-statistics-2015.html>. Acceso em: 10 fev. 2016.

4 Empresa de Pesquisa Energética. **Balanço energético nacional** - Brasil: EPE. 2015 Disponivel em : <https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioSintese.aspx?anoColeta=2015&anoFimColeta= 2014> Acceso em : 03 fev. 2016

5 Ministerio de Minas e Energia. **Balanço energético nacional** - BEN 2015. Brasil: EPE. 2015 Disponivel em: <https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioSintese.aspx?anoColeta=2015&anoFimColeta= 2014>. Acceso em : 03 feb 2016 .

6 ULAGANATHAN, K.; GOUD, B.; REDDY, M,; KUMAR, V.; BALSINGH, J.; RADHAKRISHNA, S. Proteins for breaking barriers in lignocellulosic bioethanol production. **Current Protein and Peptide Science**. v.16, n. 2, p.100-134, 2015

7 Pauly, M. et al. Hemicellulose biosynthesis. Planta. v. 238, n. 4, p.627-642, 2013.

8 Nhuchhen, D., Basu, P. & Acharya, B. A Comprehensive Review on Biomass Torrefaction. **International Journal of Renewable Energy & Biofuels**. v.2014, p.1-56.

9 SUN, J.; SUN, X.; SUN, R.; SU, Y. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**. v. 56, n. 2, p.195–204, 2004.

10 PANDEY, A.; SOCCOL, C., NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology.** doi: 10.1016/S0960-8524(99)00142-X.

11 LINDER, A.; BERGMAN, R.; BODIN, A.; GATENHOLM, P. Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces. **Langmuir**, v.19, n.12. p,5072-5077, 2003

12 QUIROZ-CASTAÑEDA, R.; FOLCH-MALLOL, J. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass -** techniques, applications and commercialization. doi: 10.5772/53719

13 LOMBARD, V.; GOLACONDA, RAMULU, H.; DRULA, E., COUTINHO, P.;, HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy). **Nucleic Acids**

Research, v. 42, n. 1, p. 490-495, 2013.

14 HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. **Biochemical Journal**, v.280, n. 2, p. 309-316, 1991

15 HENRISSAT, B.; BAIROCH. A New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. 3, p.781–788, 1993

16 TIWARI, P.; MISRA, B. N.; SANGWAN, N. β-glucosidases from the fungus Trichoderma: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-10, 2013.

17 MEDIE, F. M.; DAVIES, G.; DRANCOURT, M.; HENRISSAT, B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n. 3, p. 227-234, 2012

18 SERPA, V. I.: POLIKARPOV, I. Enzymes in bioenergy. In: BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H.(Ed.) **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer; 2011. p. 97–113.

19 HIMMEL, M. E.et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v.315, n. 5813, p.804–807, 2014.

20 CHEN, Z.; LIU, Y.; YAN, Q.; YANG, S.; JIANG, Z. Biochemical characterization of a novel endo-1,5- α -L-arabinanase from *Rhizomucor miehei*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 63, n. 4, p. 1226–1233, 2015.

21 MEWIS, K., LENFANT, N., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 1682-1692, 2016. doi:10.1128/AEM.03453-15

22 VAN DEN BROEK L. et al. Cloning and characterization of arabinoxylan arabinofuranohydrolase-D3 (AXHd3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p.641-647, 2005.

23 KIE, V. et al. Arabinanase A from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa exhibits both an endo- and an exo- mode of action. **Biochemical Journal**, v. 555, n. 1 p. 547–555, 1997.

24 SHALLOM, D. et al. Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43 β -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. **Biochemistry**, v.44, p.1, p.387–397, 2005.

25 Ichinose, H. et al. An Exo- α -1,3-galactanase having a novel α -1,3-galactan-binding module from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 27, p. 25820–25829, 2005

26 BOURGOIS, T. et al. Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. subtilis ATCC 6051: A GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, n. 6, p.1309-

1317, 2007.

27 ASPEBORG, H.; COUTINHO, P.; WANG, Y.; BRUMER, H.; HENRISSAT, B. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). **BioMed Central Evolutionary Biology**, v.12, n. 1, p.186, 2012..

28 STAM, M.; DANCHIN, E.; RANCUREL. C.; COUTINHO, P.; HENRISSAT, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. **Protein Engineering, Design and Selection**. v.19, n.12, p.555-562, 2006.

29 KERSTERS-HILDERSON, H.; CLAEYSSENS, M.; VAN DOORSLAER, E.; DE BRUYNE, C. Determination of the anomeric configuration of D-xylose with D-xylose isomerases. **Carbohydrate Research**, v.47, n.2, p.269-273. 1976.

30 MCCARTER, J.D.; WITHERS, S,G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 4, n. 6,p.885-892, 1994.

31 WONG, D., CHAN, V., MCCORMACK, A. Functional cloning and expression of a novel Endo-alpha-1,5-L-arabinanase from a metagenomic library. **Protein Peptide** Letters. v. 16, n. 12, p. 1435–1441, 2009.

32 ALHASSID, A. et al. Crystal structure of an inverting GH 43 1,5-alpha-Larabinanase from *Geobacillus stearothermophilus* complexed with its substrate. **Biochemistry Journal**, v.422, n.1, p.73-82, 2009

33 CHANDRAKANT, P. and BISARIA, V. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Review Biotechnology**. v. 18, n. 4, **p.** 295–331, 1998.

34 SERI K, SANAI K, MATSUO N, KAWAKUBO K, XUE C, INOUE S. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 45, n. 11, p. 1368–74, 1996

35 KROG-MIKKELSEN, I.; HELS, O., TETENS, I.; HOLST, J, ANDERSEN, J.; BUKHAVE, K. The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: Dose-response studies in vitro and in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.94, n.2, p.472–8, 2011.

36 GROOTAERT, C.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE. T. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, n.2, p. 64–71, 2007

37 CAMILO, C. and POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). **Protein Expression and Purification**. v. 99, n. 1, p. 35–42, 2014

38 PUHL, A.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; BATISTA-VIERA, F.; VILLARINO A, TERENZI, H. Covalent immobilization of tobacco-etch-virus NIa protease: a useful tool for cleavage of the histidine tag of recombinant proteins. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.53, n.3, p.165–174, 2009

39 NIESEN, F.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v.2, n.9, p-2212–222, 2007

40 ERICSSON, U.; HALLBERG, B.; DETITTA, G.; DEKKER, N.; NORDLUND, P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v.357, n.2, p.289–298, 2006.

41 BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. **Protein Expression and Purification**, v.91, n.2, p.192–206, 2013

42 CUDNEY, R.; PATEL, S.; WEISGRABER, K.; NEWHOUSE, Y.; MCPHERSON, A. Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. **Acta Crystallographica Section D,**v.50, n.4, p.414–423, 1994

43 Kabsch, W. Xds. Acta Crystallographica Section D. v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010.

44 MCCOY, A.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.; ADAMS, P.; WINN, M.; STORONI, L.; READ, R. Phaser crystallographic software. **Journal Applied Crystallography**, v.40, p.658-674,2007. doi: 10.1107/S0021889807021206.

45 ADAMS, P. et al. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v.55,n.1,p.94–106,2011.

46 PROCTOR, M. et al. Tailored catalysts for plant cell-wall degradation: redesigning the exo/endo preference of Cellvibrio japonicus arabinanase 43A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.102, n.8, p.2697–26702, 2005.

47 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallographica D, v.60, n.12, p.2126–2132, 2004.

48 AFONINE, P. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica D,** v.68, n.1, p.352–367, 2012.

49 SEO, E.; LIM, Y.; KIM, Y.; PARK, C.; OH, D. Characterization of a recombinant endo-1,5-α-L-arabinanase from the isolated bacterium *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.15, n.4, p.590–594, 2010.

50 SANTOS,C. et al. Mechanistic strategies for catalysis adopted by evolutionary distinct family 43 arabinanases. **Journal Biology Chemistry,** v. 289, n.11, p.7362–7362, 2014.

51 MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-28,1959. doi: 10.1021/ac60147a030.

52 AHMED, S. et al. A novel α -L-Arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (Ct43Araf) from *Clostridium thermocellum*. **PLoS One,**v.8, n.9, p.1–10, 2013.

53 LIM, Y.; YEOM, S.; KIM, Y.; OH. D. Synergistic production of I-arabinose from

arabinan by the combined use of thermostable endo- and exo-arabinanases from Caldicellulosiruptor saccharolyticus. **Bioresource Technology,** v.102, n.5, p.4277-4280, 2011.

54 ZHOU,J.; BAO, L.; CHANG, L.; ZHOU, Y.; LU, H. Biochemical and kinetic characterization of GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase and GH30 α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from rumen metagenome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 39, n.1, p.143–152, 2012

55 SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal Biological Chemistry**,v.195, n.1, p.19–23, 1952..

56 BOTELHO, C. et al. Increased biomass saccharification by supplementation of a commercial enzyme cocktail with endo-arabinanase from Bacillus licheniformis. **Biotechnology Letters,** doi: 10.1007/s10529-015-1818-0.

57 FORSBERG, Z. et al. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 111, n. 23, p. 8446–8451, 2014.

58 HARRIS, P.; WELNER, D.; MCFARLAND, KC.; RE, E,; NAVARRO, C,; BROWN, K. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. **Journal Biochemistry**, v.49, n.15, p.3305–3316, 2010.

59 WESTERENG, B. et al. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by longrange electron transfer. **Scientific Reports,** v.5, n.18561. 2015 doi: 10.1038/srep18561

60 HARVEY,D. Matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry of carbohydrates. **Mass Spectrometry Reviews**. v.18, n.2, p.87-154. 1999. doi: 10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18.

61 PETERSEN, T.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G., NIELSEN, H.;. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v.8, n.10, p.785–786, Oct.2011

62 LEE, C. et al. Divalent metal activation of a GH43 β-xylosidase. **Enzyme Microbiology Technology**; v. 52,n. 2,p. 84-90, 2013.

63 MCVEY, C. et al. The importance of the Abn2 calcium cluster in the endo-1,5arabinanase activity from Bacillus subtilis. **Journal Biological Inorganic Chemistry**. v. 19, n.4, p.505-513. 2014

64 HASSAN, N.; KORI, L.; GANDINI, R, PATEL BKC, DIVNE C, TAN TC. Highresolution crystal structure of a polyextreme GH43 glycosidase from *Halothermothrix orenii* with α -L-arabinofuranosidase activity. **Acta Crystallographica**. v. 71,n.3, p. 338-345, 2015.

65 GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server.In: WALKER, J.M.(Ed.) **The Proteomics Protocols Handbook.** New York:

Humana Press, 2005. p.571-607. doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571

66 SHI, H. et al. Expression and characterization of a GH43 endo-arabinanase from Thermotoga thermarum. **BioMed Central Biotechnology,** v.14, n.1, p.35,2014

67 DE SANCTIS, D.; INÁCIO. J.; LINDLEY, P.; DE SÁ-NOGUEIRA, I.; BENTO, I. New evidence for the role of calcium in the glycosidase reaction of GH43 arabinanases. **FEBS Journal**, v. 277, n. 21, p. 4561-4574, 2010.

68 NURIZZO, D. et al. Cellvibrio japonicus alpha-L-arabinanase 43A has a novel fiveblade beta-propeller fold. **Nature Structural Biology**. v. 9, n. 9, p. 665-668, 2002.

69 YAMAGUCHI, A.et al. Structural basis for thermostability of endo-1,5-α-Larabinanase from *Bacillus thermodenitrificans* TS-3. **Journal Biochemistry**, v. 137, n. 5, p. 587–592, 2005.

70 KABSCH, W. XDS. Acta Crystallographica D. v. 66, n. 2, p.125-132, 2010 doi:10.1107/S0907444909047337.

71 BAILEY, S. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallographica D, v. 50, n. 5, p. 760–763, Sept. 1994.

72 WINN, M. ET AL. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallographica D, v. 67, n. 4, p.235-242, 2011.

73 ADAMS, P. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica D,** v. 66, n. 2, p. 213-221, 2010.

74 TERWILLIGER, T. et al. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. **Acta Crystallographica D**, v. 64, n.1, p. 61-69, 2008.

75 PONS, T.; NAUMOFF, D.; MARTÍNEZ-FLEITES, C.; HERNÁNDEZ, L. Three acidic residues are at the active site of a beta-propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. **PROTEINS:** structure, function, and bioinformatics, v. 54, n. 3, p. 424-432, 2004.

76 HOLM, L.: ROSENSTRÖM, P. Dali server: conservation mapping in 3D. Nucleic Acids Research, v. 38, n. 2, p. 545-549, 2010.

77 GUTTERIDGE, A.; THORNTON, J. M. Understanding nature's catalytic toolkit. **TRENDS in Biochemical Sciences,** v. 30, n. 11, p.622-629, 2005.

78 Mckee, L. S. (2011) Diversity in structure and substrate specificity of family 43 glycoside hydrolase enzymes. Doctoral Thesis, Newcastle University, Newcastle. 291p.

79 SHINOZAKI, A.; KAWAKAMI, T.; HOSOKAWA, S.; SAKAMOTO, T. A novel GH43 α -l-arabinofuranosidase of Penicillium chrysogenum that preferentially degrades single-substituted arabinosyl side chains in arabinan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58-59, p. 80–86. 2014

80 INÁCIO, J.; DE SÁ-NOGUEIRA, I. Characterization of abn2 (yxiA), encoding a Bacillus subtilis GH43 arabinanase, Abn2, and its role in arabino-polysaccharide degradation. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.12, p.4272-4280,2008.

81 AACHMANN, F.; SORLIE, M.; SKJAK-BRAEK, G.; EIJSINK, V, VAAJE-KOLSTAD, G. NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 109, n. 46, p. 18779–18784 doi: 10.1073/pnas.1208822109

82 KIM, S.; STÅHLBERG, J.; SANDGREN, M.; PATON, R.; BECKHAM, G. Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxyl, oxygen-rebound mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, n.1, p.149-154. 2014.

83 KARKEHABADI, S., HANSSON, H.; KIM, S.; PIENS, K.; MITCHINSON, C.; SANDGREN, M. The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from Hypocrea jecorina, at 1.6 A resolution. **Journal Molecular Biology**, v.383, n.1, p.144–54, 2008.

84 KLEYWEGT, G. Recognition of spatial motifs in protein structures. **Journal Molecular Biology,** v.285, n.4, p.1887-1897, 1999.

85 DuPont. Accellerase® 1500. DuPont Genencor Sci. Disponivel em http://accellerase.dupont.com/fileadmin/user_upload/live/accellerase/documents/DU P-00413_ProdSheet_1500_web.pdf>. Acceso em: 02 jan 2016.

86 JUNIOR, A.; DOLCE, L.; DE OLIVEIRA NETO, M.; POLIKARPOV, I.. Xanthomonas campestris expansin-like X domain is a structurally disordered beta-sheet macromolecule capable of synergistically enhancing enzymatic efficiency of cellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 37, p.2419–2426. 2015. doi: 10.1007/s10529-015-1927-9.

87 BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA. **"Cana de acucar" em vegetales.** Disponivel em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>.Acesso em: 15 mar 2016

88 WITHERS, S.; WILLIAMS, S. **"Glycoside hydrolases" in** *CAZypedia*. Disponivel em: http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases. Acesso em: Acesso em: 15 mar 2016

89 BIOCYC Database Collection. "**Bacillus subtilis subtilis 168 Pathway: L-arabinan degradation**". Disponivel em: http://biocyc.org/BSUB/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-6790> Access em: 02 abr 2016.

90 ARGONNE NATIONAL LABORATORY. "Ligand screening" in molecular and
systemssystemsbiology.<http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html>.Acesso em: 15 mar 2016
ANEXOS

Proteína	Gene	Familia	Organismo	GenBank	UniProt			
BIAbn-1	BLi03029 ou BL00353	GH43	Bacillus licheniformis DSM 13 = ATCC 14580	AAU41895.1	Q65GB9			
BIAbn-2	BLi01295 ou BL02653	GH43	Bacillus licheniformis DSM 13 = ATCC 14580	AAU40201.1	Q65L63			
Fonte: Elaborada pelo autor.								

Anexo A – Tabela de código dos genes das arabinanases no GenBank e UniProt.

Anexo B – Tabela de proteínas com sítios similares à proteína de *Hypocrea jecorina* encontradas por SPASM.

Fonte: Elaborada pelo autor.									
Cód PDB	Nome	Sitio ativo	RMSD	Função					
2GF3	Monomeric sacarolichesine oxidase	His A 324 His A 345 Tyr A 61	0.91	Oxidoreductase					
1NKG	Rhamnogalacturonase B	His A 85 His A 92 Phe A 242	0.92	Lyase					
1L9C	Monomeric sacarosine oxidase	His A 324 His A 345 Tyr A 61	0.93	Oxidoreductase					
ЗВНК	Monomeric sacarosine oxidase	His A 324 His A 345 Tyr A 61	0.93	Oxidoreductase					
1ZOV	Monomeric sacarosine oxidase	His A 324 His A 345 Tyr A 61	0.94	Oxidoreductase					
1GYD	Arabinan endo-1,5-α- L-arabinanase A	His B 291 His B 306 Tyr B 249	0.96	Arabinanase					
1WL7	Arabiniase-TS	His A 271 His A 286 Tyr A 229	0.97	Hidrolase					

Anexo C - ALINHAMENTOS DE SEQUENCIAS

Anexo C.1 - Alinhamento com a sequência AAU40201.1 com a proteína 1GYD.

	Coincidência com: AAU40201.1												
Organismo: <i>B. licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 14580													
	# de aa: 320 score: 233				C	% de identidade: 42.57							
l GYD BlAbn-1 onsensu]] s	MKNVLR	KMS LA.	ALIFGI	LLSFS	MPES	GKAAF	QV WDTKG	D VE DNFIE	id p v m t id p s i i DP	regdty kegnty EG T	wylfst wytfgt WYFGT	21 GL 59
lGYD BlAbn-1 onsensu	22 60 s	$ \frac{GPGITI}{GTGLRV} $ $ \frac{\int_{U}^{U} \int_{U}^{U} \int_{U}^{U}$	YSSKD IKSTD SD	RVNWRY GRNWSA	SDRAF APSIF	ATEP PTPL	TWAKR SWWKN	vspsp vvpne P	D H - V	VAPDIY VAPDIY VAPDIS APDIS VAPDI-	$\frac{1}{2} + \frac{1}{2} + \frac{1}$	WY-F-T FYLYYS YWLYYS LYYS	vs 80 vs 118
l GYD BlAbn-1 onsensu	81 119 s	AFGKNT SFGSNT FG NT - FG - NT	SAIGV SAIGL SAIG SAIG-	TVNKT L A STDR I	NPASP SSG	DYRW QW	EDKGI RDDGI DG G	viesv virst VIRST VI-S-	PQRDI S-GDQ	WNAID FNAID NAID	PAIIAI PDLVII P	DDHGQV DKDGNP U	WM 139 WL 172
l GYD BlAbn-1 onsensu	140 173 s	sfgsfw sfgsfw SFGSFW SFGSFW	GGLKL SGIKL GKL	FKLNDD FRLDKN	LTRPA TMKPT P	EPQE GS	WHSIA LYSIA SIA	KLERS SRPN-		SQAGS NG	AQIEA GAVEA EA	PFILRK PNITYK PIK	GD 198 DG 220
lGYD BlAbn-1 ¦onsensu	199 221 s	vyylfa vyylfv <mark>vyylf</mark>	SWGLC SFDSC	CRKGDS CKGVDS	TYHLV TYKIA	V GR S Y GR S GRS	KQVTG TSITG T	PYLDK PYYDK PY DK	TGRDM SGKNM			gnkrwv gndrwk JN RW	GL 257 GP 279 U G-
l GYD BlAbn-1 Consensu	258 280 s	GHNSAY GHQDVL	TWDGK NN	DYLVLH SILVRH	IAYEAA IAYDAL	DNYL DNGV DNGV	oklki sklli KL		VDGEGV VDSQGV	vpovde: vpty		YISQRL	K 315 - 320

Anexo C.2 - Alinhamento com a sequência AAU402201.1 com a proteína 1wl7

Coincidência com: AAU402201.1

Organismo: B. licheniformis DSM 13 = ATCC 14580

de aa: 328 score: 315 % de identidade: 51.59

