UNIVERSIDADE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANA ELISA TOGNOLI LEITE

**Bioprospecção, estudos bioquímicos de enzimas oxidativas e seu sinergismo
com celulasas na hidrólise de biopolímeros**

São Carlos

2017

ANA ELISA TOGNOLI LEITE

**Bioprospecção, estudos bioquímicos de enzimas oxidativas e seu sinergismo
com celulasas na hidrólise de biopolímeros**

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

Área de Concentração: Física aplicada
Opção: Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2017

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)

Leite, Ana Elisa Tognoli

Bioprospecção, estudos bioquímicos de enzimas oxidativas e seu sinergismo com celulasas na hidrólise de biopolímeros / Ana Elisa Tognoli Leite; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2017.

101 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Biocombustíveis. 2. Enzimas acessórias. 3. Sinergismo. 4. Prospeção. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

Agradecimentos

À minha família, principalmente minha mãe por estar sempre disposta a me ajudar independentemente do problema e a minha cachorrinha Catarina por ter escutado todas as minhas apresentações de seminário, trabalhos e discussão de matéria de prova além da companhia perfeita e momentos de distração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Polikarpov por ter me recebido em seu laboratório e por todo ensinamento e oportunidades.

Ao Dr. Marco Antonio Kadowaki, pelos ensinamentos e paciência para explicar quantas vezes necessárias qualquer coisa além da amizade e parceria durante esses dois anos.

A Paula e Mariana pela amizade, ensinamentos e pelos momentos de distração e diversão no laboratório e também fora dele.

Ao Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento e ao Prof. Dr. Eduardo de Azevedo pela ajuda em diversas ocasiões.

A todos do laboratório, Atílio, Vanessa, Danilo, Aline, Evandro, Bruno, Karina, Érika pela amizade e por sempre me ajudarem quando precisei.

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

A minhas sempre amigas Malu, Noeli, Luana e Marília que mesmo longe continuam sempre lá para quando eu precisar.

Ao IFSC pela infraestrutura.

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

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida e a CAPES e a FAPESP pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

RESUMO

LEITE, A. E. T. **Bioprospecção, estudos bioquímicos de enzimas oxidativas e seu sinergismo com celulases na hidrólise de biopolímeros.** 2017. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A demanda por fontes renováveis de energia juntamente com o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e do aquecimento global tem despertado grande interesse. A degradação da biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis tem se revelado uma alternativa viável, contudo tem enfrentado desafios em função de sua recalcitrância. Novos preparados enzimáticos envolvendo não só celulases com mecanismo hidrolítico, mas também proteínas com atividade auxiliares têm sido desenvolvidas e comercializadas. Contudo a adição de enzimas oxidativas nestes coquetéis ainda é passível de desenvolvimento e otimização. Nesse âmbito, o objetivo desse trabalho foi analisar três possíveis abordagens para a resolução desse problema. A primeira através do isolamento de fungos filamentosos de compostagem com o intuito de obter novas enzimas com função oxidativa. A segunda, constituiu o estudo de sinergismo de uma enzima acessória da família GH43 com o coquetel enzimático industrial Accellerase e a terceira no estudo da enzima oxidativa monooxigenases lítica de polissacarídeo (Lpmo) assim como sua interação sinérgica com uma endoglucanase de *Trichoderma harzianum*. A atividade celulolítica dos fungos foi determinada por análise do halo hidrolítico, assim como por reações enzimáticas utilizando substratos específicos. Os potenciais fungos produtores de enzimas oxidativas foram identificados por amplificação e sequenciamento da região ITS3. Dezesesseis fungos foram isolados e testados, destes três apresentaram atividade positiva para a enzima lacase. O sequenciamento revelou que todos os fungos pertencem à mesma espécie patogênica *Scedosporium prolificans*, A enzima BlAbn1 (GH43) foi expressa em células de *E. coli* (BL21) e purificada para análise do sinergismo com o coquetel enzimático Accellerase em diferentes condições como sinergismo sequencial ou simultâneo, diferentes pH's, tempo de reação e concentração enzimática. No sinergismo simultâneo e análises em pH 5 e pH 8 a taxa de sinergismo encontrada foi muito baixa apenas 4 %. Contudo no sinergismo sequencial com diferentes

tempos e concentrações enzimáticas foi encontrado um aumento de 30 % na liberação de açúcares redutores na reação de 20 horas, mostrando que há ação sinérgica. O estudo da enzima oxidativa Lpmo foi realizado utilizando a enzima purificada após expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans*. Análises com diferentes substratos e doadores de elétrons assim como sinergismo com uma endoglucanase foram realizados. Ácido ascórbico e pirogallol apresentaram-se como doadores de elétrons utilizando celulose amorfa (PASC), xilano e arabinoxilano como substratos. Ação sinérgica entre a endoglucanase e Lpmo foi observada, apresentando um aumento na liberação de açúcares redutores na ordem de 15 %. Em habitats naturais os microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas e auxiliares apresentam ação sinérgica como demonstrado para enzimas da família GH43 com coquetéis enzimáticos e de enzimas oxidativas com endoglucanases. Este efeito pode ser explorado e utilizado na melhora da composição dos coquetéis enzimáticos dedicados à produção de biocombustíveis lignocelulósicos.

Palavras-Chaves: Biocombustíveis. Enzimas acessórias. Sinergismo. Prospecção.

ABSTRACT

LEITE, A. E. T. **Bioprospecting, biochemical studies of oxidative enzymes and their synergism with cellulases in the hydrolysis of biopolymers.** 2017. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The demand for renewable energy sources coupled with the depletion of fossil fuel reserves and global warming has aroused great interest. The degradation of lignocellulosic biomass for the production of biofuels has proved to be a viable alternative, however it has faced challenges due to its recalcitrance. New enzymatic preparations involving not only cellulases with a hydrolytic mechanism, but also proteins with an auxiliary activity have been developed and commercialized. However the addition of oxidative enzymes in these cocktails is still amenable to development and optimization. In this context, the objective of this work was to analyze three possible approaches to solve this problem. The first one through the isolation of filamentous fungi from composting in order to obtain new enzymes with oxidative function. The second was the synergism study of an accessory enzyme of the GH43 family with the industrial enzymatic cocktail Accellerase and the third in the study of lytic polysaccharide monooxygenases (Lpmo) oxidative enzyme as well as its synergistic interaction with a *Trichoderma harzianum* endoglucanase. The cellulolytic activity of the fungi was determined by analysis of the hydrolytic halo, as well as by enzymatic reactions using specific substrates. Potential fungi producing oxidative enzymes were identified by amplification and sequencing of the ITS3 region. Sixteen fungi were isolated and tested, of these three showed positive activity for the lacase enzyme. Sequencing revealed that all fungi belong to the same pathogenic species *Scedosporium prolificans*. The enzyme BlAbn1 (GH43) was expressed in *E. coli* cells (BL21) and purified for synergism analysis with the enzymatic cocktail Accellerase under different conditions such as sequential synergism or Different pH, reaction time and enzymatic concentration. In simultaneous synergism and analyzes at pH 5 and pH 8 the synergism rate found was very low, only 4%. However in the sequential synergism with different times and enzymatic concentrations a 30% increase in the release of reducing sugars in the

reaction of 20 hours was found, showing that there is synergistic action. The study of the oxidative enzyme Lpmo was performed using the enzyme purified after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. Analyzes with different substrates and electron donors as well as synergism with an endoglucanase were performed. Ascorbic acid and pyrogallol were presented as electron donors using amorphous cellulose (PASC), xylan and arabino-xylan as substrates. Synergistic action between endoglucanase and Lpmo was observed, with an increase in the release of reducing sugars approximately 15%. In natural habitats, the microorganisms producing hydrolytic and auxiliary enzymes present synergistic action as demonstrated for enzymes of the GH43 family with enzymatic cocktails and oxidative enzymes with endoglucanases. This effect can be exploited and used in improving the composition of the enzymatic cocktails dedicated to the production of lignocellulosic biofuels.

Keywords: Biofuels. Auxiliary activities enzymes. Synergism. Prospecting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consumo energético mundial por combustível do ano 1990 com perspectiva ate 2038	21
Figura 2 - Esquema Produção biocombustíveis	22
Figura 3 - Gráfico em porcentagem da composição da biomassa.....	23
Figura 4 - Esquema da estrutura da celulose, hemicelulose e lignina da biomassa.	24
Figura 5 - Esquema mostrando oxidações referente à Lpmo do tipo1 (oxidação C1) e LPMO do tipo 2 (oxidação C4).....	28
Figura 6 - Esquema da degradação das cadeias de celulose por diferentes enzimas.	29
Figura 7 - Teste halo identificação enzimas celulolítica incubado a 37 °C.....	43
Figura 8 - Teste Halo identificação enzimas oxidativas incubado a 37 °C.....	44
Figura 9 - Gel de Agarose (1,5%) da extração do DNA dos principais fungos.	46
Figura 10 - Gel de Agarose dos DNA extraídos e amplificados e peso molecular utilizado.	47
Figura 11 - Gel SDS-PAGE 15% da primeira etapa de purificação da enzima BIAbn1. Corado com Coomassie-bleu. Na esquerda encontra-se o marcador indicando o peso molecular.	58
Figura 12 - Gel SDS-Page para confirmação da clivagem da proteína BIAbn1 pela protease TEV.....	59
Figura 13 - Gel SDS-Page para verificar a pureza da enzima BIAbn1 de interesse utilizada nos estudos de sinergismo. Na esquerda encontra-se o marcador indicando o peso molecular.	60
Figura 14 - Gel SDS-Page para verificar a pureza da enzima BIAbn1 de interesse após concentração utilizada nos estudos de sinergismo.	60
Figura 15 - Gráfico da análise açúcares redutores liberados (g/L) em reação sequencial com reação de 16 horas.	62
Figura 16 - Quantidade de açúcar redutor liberado pelas reações de sinergismo sequencial em diferentes tempos.	62
Figura 17 - Quantidade de açúcar redutor (g/L) liberado nas reações de sinergismo sequencial com diferentes concentrações enzimáticas.....	64
Figura 18 - Foto indicando a diferença existente na morfologia do papel filtro após a realização do pré-tratamento com BIAbn1.....	65
Figura 19 - 13C espectro Multi-CP de amostras de papel filtro com diferentes tratamentos	66
Figura 20 - a) Esquema estrutural e poros da celulose. b) Distribuição T2 para cada tratamento.	68
Figura 21 - A linha I indica uma ampliação de 100X, linha II uma ampliação de 500X e linha III uma ampliação de 1000X. Coluna a) indicam apenas amostras de papel de filtro, b) papel de filtro em ANB1, c) papel de filtro em Accellerase e d) papel de filtro pré-tratado com BIAbn1 e posterior reação com Accellerase.....	70

Figura 22 - Fungo <i>A. nidulans</i> após crescimento em placa petri.	76
Figura 23 - Expressão em bandeja de 4 litros para produção da proteína LpmoF.....	76
Figura 24 - Concentração inicial do meio de cultura contendo a proteína em Hollow Fiber.	77
Figura 25 - Tabela utilizada na purificação utilizando precipitação com sulfato de amônio.....	77
Figura 26 - Gel SDS-Page das frações da precipitação com sulfato de amônio para purificação da proteína. Na esquerda os respectivos pesos moleculares, em KDa.	81
Figura 27 - Cromatograma referente à purificação da LpmoF	82
Figura 28 - Gel SDS-Page com as eluições da purificação da proteína LpmoF	82
Figura 29 - Análise do Cromatograma HPAEC referente à atividade da Lpmo sobre PASC.....	83
Figura 30 - Cromatograma HPAEC referente à análise de Xilano como substrato.....	84
Figura 31 - Cromatograma HPAEC referente à análise de arabinoxilano como substrato.....	85
Figura 32 - Cromatograma HPAEC da análise de doadores de elétron utilizando pirogalol utilizando PASC como substrato.	86
Figura 33 - Cromatograma HPAEC da análise de doadores de elétron utilizando CDH.	86
Figura 34 - Espectro de massas referente à análise do Arabinoxilano como substrato.....	88
Figura 35 - Espectro de massas referente à análise do Xilano como substrato.	88
Figura 36 - Análise da quantidade de açúcar redutor formado em g/L nas reações para análise do sinergismo entre LpmoF e Endoglucanase. B1 como controle sem enzima oxidativa e sem doador de elétron, B2 como controle de endoglucanase e doador de elétrons, B3 controle sem endoglucanase, B4 como controle sem doador e B5 como controle sem ambas as enzimas e sem doador.....	89
Figura 37 - Cromatograma HPAEC referente à análise de sinergismo entre a LpmoF e Endoglucanase.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção dos principais produtos das lavouras- Brasil – 2000	25
Tabela 2- Teste de atividade realizado para cada proteína fúngica.	45
Tabela 3 - Quantificação proteica dos principais fungos.	45
Tabela 4 - Quantidade de açúcar redutor formado em cada uma das reações. nas Chamadas Accellerase contém apenas o coquetel enzimático, nas chamadas Reação contém o coquetel enzimático e a enzima BIAbn1, nas chamadas BIAbn1 contém apenas a enzima e no branco encontra-se tampão e substrato.....	61
Tabela 5 - Taxa de sinergismo observado nas reações com diferentes concentrações enzimáticas.	64
Tabela 6 - Medida de absorbância reação DNS para verificar a formação de açúcar redutor pela ABN1 em diferentes tempos.....	65
Tabela 7 - Tabela referente ao índice de cristalinidade das amostras e papel filtro com diferentes tratamentos.	67
Tabela 8 - Valores espaços Inter-fibras e Inter-micro-fibras para cada um dos tratamentos pela distribuição T_2	68
Tabela 9 - Reações realizadas na análise de substrato com a enzima LpmoF.....	79
Tabela 10 - Reações realizadas na análise de diferentes doadores de elétrons com enzima LpmoF.....	80
Tabela 11 - Reações realizadas para análise do sinergismo	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Atividades acessórias

ABTS - 2, 2-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato

BIAbn1 - Arabinanase de *Bacillus licheniformis*

CAZy - *Carbohydrate-Active Enzymes*

CDH - Celobiose Desidrogenase

CE - Esterases de carboidrato

CMC – Carboximetilcelulose

DCPIP – Dichlorophenolindophenol

DHB – Ácido 2,5-dihidroxibenzoico

DMAc - N, N-dimetilacetamida

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNS – Ácido dinitrosalisílico

EGI - Endoglucanases I

FT – Flow through

GH - Glicosil Hidrolases

GT - Glicosil transferase

HRP - *Horseradish peroxidase*

LB - Meio Luria-Bertani

Lpmo - Monooxigenases líticas de polissacarídeos

M.t. - *Myceliophthora thermophila*

PASC - *Phosphoric acid-swollen cellulose* (celulose micro-cristalina)

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PDA – *Potato dextrose Agar*

PEG - Polietileno glicol

PL - Polissacarídeo liase

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SEM – microscopia eletrônica de varredura (MEV)

TEV - Tobacco Etch Virus

Sumário

CAPÍTULO 1	21
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E PROBLEMÁTICA	21
1.2 HIDROLASES E ENZIMAS ACESSÓRIAS	25
1.2.1 Glicosil Hidrolase – GH43	27
1.2.2 Monooxigenases líticas de polissacarídeos (Lpmo)	27
1.3 SINERGISMO	29
1.4 BIOPROSPECÇÃO	31
CAPÍTULO 2	35
OBJETIVOS	35
OBJETIVO GERAL:	35
OBJETIVO ESPECÍFICO:	35
CAPÍTULO 3	39
ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO	39
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1.1 Meios de cultura	39
3.1.1.2 Meio mínimo <i>Aspergillus</i>	39
3.1.1.2 Meio PDA	40
3.1.1.3 Determinação da temperatura ideal de crescimento dos fungos isolados	40
3.1.1.4 Meios seletivos para celulases	40
3.1.1.5 Meios seletivos para enzimas oxidativas	40
3.1.2 Teste atividade das proteínas secretadas	41
3.1.3 Extração DNA genômico	41
3.1.4 Reação PCR	42
3.1.5 Purificação DNA gel de Agarose	42
3.1.6 Preparação amostra sequenciamento	42
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.2.1 Meios seletivos e testes de atividade	43
3.2.2 Extração e purificação do DNA genômico	46
3.2.3 Sequenciamento	48
3.3 CONCLUSÃO	49
CAPÍTULO 4	53
ESTUDO DE SINERGISMO GH43	53
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1.1 Expressão e purificação da enzima BIAbn1	53
4.1.2 Análise de sinergismo	55
4.1.3 Quantificação dos açúcares redutores liberados no ensaio de sinergismo	56
4.1.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)	56
4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.2.1 Expressão e purificação ABN1	58
4.2.2 Análise sinergismo	60
4.2.3 RMN:	66

4.2.4	MEV:	69
4.3	CONCLUSÃO:	70
CAPÍTULO 5:		75
ESTUDO ENZIMA OXIDATIVA LPMOF		75
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
5.1.2	<i>Expressão e purificação da enzima LpmoF de M. thermophila</i>	75
5.1.3	<i>Análises por HPAEC – ICS 5000 DIONEX</i>	78
5.1.4	<i>Testes de substratos</i>	78
5.1.5	<i>Teste com diferentes doadores de elétrons</i>	79
5.1.7	<i>Análise por Espectroscopia de Massas (MALDI-TOF)</i>	80
5.1.8	<i>Testes de sinergismo</i>	80
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.2.1	<i>Expressão e purificação</i>	81
5.2.2	<i>Testes com diferentes substratos</i>	83
5.2.3	<i>Teste de doadores de elétrons</i>	85
5.2.5	<i>Análise por espectrometria de Massas (Maldi-TOF)</i>	87
5.2.6	<i>Testes de sinergismo</i>	89
CONCLUSÃO:		91
CAPÍTULO 6:		95
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS:		95
REFERÊNCIAS.....		97

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Ana Elisa Tognoli Leite
IFSC - USP

Capítulo 1

1 Introdução

1.1 Contextualizações e problemática

Atualmente o consumo de energia mundial encontra-se elevado e continua crescendo devido ao aumento das tecnologias e da população mundial. Além do problema da alta demanda energética são os tipos de combustíveis que vem sendo usados. Na Figura1, podemos observar que a partir do ano de 1990, com perspectiva até 2038, a maioria dos combustíveis que estão sendo e serão utilizados são de origens fósseis ou altamente poluentes.¹ Isso causa diversos problemas ambientais e econômicos devido ao aquecimento global e ao esgotamento das reservas de combustíveis fósseis.

Figura 1 – Consumo energético mundial por combustível do ano 1990 com perspectiva ate 2038

Fonte: ENERGY...¹

Devido a esse fato, tem se despertado o interesse por novas fontes de energia renováveis,² como por exemplo os biocombustíveis de segunda geração, como o etanol. Na produção do açúcar e do etanol através da cana de açúcar, há o aproveitamento apenas do caldo, o bagaço é queimado para gerar energia para a própria usina, como observado na Figura 2 onde temos a porcentagem em massa. Esse fato é um dos principais motivos pelo qual a utilização desse bagaço para produção do etanol de segunda geração não é muito interessante para a usina, pois a locais que se mantêm, em questão energética, somente com essa queima.

Figura 2 - Esquema Produção biocombustíveis

Fonte: Elaborada pela autora

Para a produção desses biocombustíveis, a fonte mais promissora é através da degradação de biomassa vegetal.³ Essa biomassa apresenta como principal componente a celulose, homopolímero de glicose com ligações $\beta 1-4$; seguido da hemicelulose, polímero heterogêneo de pentoses como o xilano (xilose, arabinose e ácido glucurônico), hexoses como a manose, e alguns ácidos; e lignina⁴ como pode ser observado na Figura 3, em suas devidas proporções.

Figura 3 - Gráfico em porcentagem da composição da biomassa

Fonte: Adaptada de SUN et al ⁵

Essa degradação é feita em dois processos, o primeiro consiste na formação de açúcares fermentáveis, geralmente realizado por enzimas e um segundo realizado por bactérias ou leveduras que transformam esses açúcares em álcool ³. O grande problema da produção desses biocombustíveis são os elevados preços para a sua produção assim como a recalcitrância que esse material pode apresentar, devido ao seu grau de cristalinidade. Necessita-se, portanto, do emprego de pré-tratamentos antes de ser realizada a hidrólise enzimática, tornando seu custo benefício desfavorável. Na Figura 4, pode-se observar um esquema da estrutura da celulose, hemicelulose e lignina mostrando sua alta compactação e cristalinidade. Para procurar baratear essa produção podem-se diminuir os gastos em uma das etapas de produção ou em ambas através de uma otimização no processo. Essa otimização nas etapas da produção dos biocombustíveis pode ser feita de diferentes maneiras como por exemplo através da hidrólise enzimática dessa biomassa com

uma melhora na ação de coquetéis enzimáticos já existentes pela adição de enzimas acessórias.

A produção desses biocombustíveis a partir da cana de açúcar é ainda mais interessante no Brasil, onde desde o descobrimento do país as indústrias de açúcar e álcool estiveram sempre operantes e sendo a maior produção da agricultura brasileira, tendo produzido no ano 2000 mais de 320.000.000 toneladas, como mostra a Tabela 1.⁶

Figura 4 - Esquema da estrutura da celulose, hemicelulose e lignina da biomassa.

Fonte: Adaptada de SANTOS et al ⁷

Tabela 1 - Produção dos principais produtos das lavouras- Brasil – 2000

Produtos	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (t)	Rendimento médio (kg/ha)	Valor (1000 R\$)
Abacaxi (1) (2)	62 976	60 406	1 335 792	22 113	463 892
Algodão herbáceo (em caroço)	811 848	801 618	2 007 102	2 503	1 274 249
Alho	13 269	13 269	84 141	6 341	174 976
Amendoim (em casca)	104 972	104 948	187 890	1 790	120 417
Arroz (em casca)	3 704 863	3 664 804	11 134 588	3 038	2 586 649
Aveia (em grão)	230 513	182 010	214 276	1 177	39 362
Batata-doce	44 007	43 900	484 443	11 035	131 875
Batata-inglesa	152 242	151 731	2 606 932	17 181	810 243
Cana de açúcar (2)	4 879 841	4 804 511	326 121 011	67 878	6 652 318
Cebola	66 515	66 505	1 156 332	17 387	364 062
Centeio (em grão)	7 156	6 755	6 948	1 028	1 081
Cevada (em grão)	149 677	145 507	282 826	1 943	53 544
Ervilha (em grão)	1 470	1 467	3 699	2 521	3 685
Fava (em grão)	41 751	41 179	15 751	382	15 076
Feijão (em grão)	4 441 431	4 332 545	3 056 289	705	1 658 867
Fumo (em folha)	310 633	310 462	579 727	1 867	1 022 024
Juta (fibra)	1 355	1 114	1 333	1 196	581
Linho (semente)	5 321	5 321	3 850	723	1 139
Malva (fibra)	4 901	3 759	5 947	1 582	2 835
Mamona (baga)	214 485	208 538	116 017	556	44 674
Mandioca (2)	1 736 240	1 708 875	23 040 670	13 482	2 585 041
Melancia (1)	81 022	80 509	226 788	2 816	181 194
Melão (1)	11 409	11 399	174 710	15 326	63 796
Milho (em grão)	12 648 005	11 890 376	32 321 000	2 718	6 037 136
Rami (fibra)	465	465	1 006	2 163	654
Soja (em grão)	13 693 677	13 656 771	32 820 826	2 403	8 658 735
Sorgo granífero (em grão)	561 121	528 061	792 759	1 501	99 268
Tomate	56 866	56 720	3 004 797	52 975	1 181 372
Trigo (em grão)	1 535 723	1 138 687	1 725 792	1 515	349 762

Fonte: Adaptada de BRASIL ...⁶

1.2 Hidrolases e enzimas acessórias

Devido à composição da biomassa, devem-se buscar processos que visem à degradação de seus açúcares complexos para a sua utilização na produção de biocombustíveis. Essa degradação pode ser realizada através de processos químicos ou enzimáticos.⁵¹ Algumas das enzimas responsáveis por essa

degradação podem ser encontradas no banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*) onde são divididas em 4 grupos de acordo com suas respectivas funções:

- Glicosil Hidrolases (GHs): realizam hidrólise ou rearranjo das ligações glicosídicas;
- Polissacarídeo liases (PLs): realizam clivagem não hidrolíticas das ligações glicosídicas;
- Esterases de carboidrato (CEs): responsáveis pela hidrólise de ésteres de carboidrato;
- Atividades acessórias (AAs): enzimas que agem em conjunto com CAZymes, como por exemplo as redox.

Dentre esses grupos as GHs e AAs despertam interesse para este trabalho devido as suas diversas aplicações. Podemos citar como glicosil hidrolases as enzimas da família GH5. Essa família incluem enzimas com diferentes atividades como Endo- β -1,4-glucanase, Endo- β -1,4-xylanase, β -glucosidase, celulase, entre outras.⁹ Elas são encontradas em fungos, bactérias, vírus como por exemplo em *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus licheniformis*, *Erwinia phage*, entre outros.⁹

Já com relação às enzimas que auxiliam a atividade das celulasas, há a presença de celobiose desidrogenase (CDH), monooxigenases líticas de polissacarídeos (Lpmo's),¹⁰ desidrogenase oxido redutase,¹¹ entre outras. A oxidação da biomassa por reações enzimáticas é de extrema importância e valor industrial. Para isso há uma classe de enzimas especializadas em ações oxidantes, as Lpmo.¹² Elas pertencem aos subgrupos AA9, AA10, AA11 e AA13, oxidando celulose, quitina e ligações β 1-4 da celulose com a formação de gluco-oligosacarídeos oxidados.¹³ Essas enzimas são encontradas em fungos, vírus e bactérias e necessitam de uma molécula de oxigênio para realizar o processo oxidativo onde um átomo de oxigênio é inserido com o rompimento das ligações glicosídicas e o segundo átomo é liberado da reação na forma de H₂O.¹² A oxidação de composto de uma reação depende também de doadores de elétrons,¹⁴ para que ocorra a liberação desse oxigênio necessário para o processo.

1.2.1 Glicosil Hidrolase – GH43

As glicosil hidrolases da família GH43 podem ser encontradas em diversos organismos como fungos e bactérias apresentando diversas funções como β -xilosidase, arabinanase, xilanase, α -1,2-L arabinofuranosidase, β -1,3-xilosidase e α -L-arabinofuranosidase.¹⁵⁻¹⁹

A família GH43 é uma das maiores famílias de glicosil hidrolases, com 4555 (2016) membros reportados na base de dados CAZy, uma base de dados que descreve enzimas que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas, além da descrição de seus módulos estruturais.⁹ Esta família tem atraído muita atenção uma vez que microrganismos produtores dessas enzimas são ótimos degradadores da parede celular de plantas.²⁰ Uma enzima previamente estudada pelo grupo de Biotecnologia Molecular (IFSC-USP) é a arabinanase de *Bacillus licheniformis* (BIAbn1), bactérias gram-negativa geralmente encontrada no solo.

Estudos já mostram a interação sinérgica entre enzimas arabinanases da família GH43 com o coquetel enzimático Accellerase,³³ além disso a enzima BIAbn1 tem um motivo estrutural formado por duas histidinas e uma tirosina, bastante similar, estruturalmente, ao sítio observado nas enzimas oxidativas (Lpmos), que também apresentam atividade sinérgica com enzimas.³⁷

1.2.2 Monooxigenases líticas de polissacarídeos (Lpmo)

As Lpmos vêm sendo alvo de diversos estudos nos últimos anos, devido ao seu elevado potencial oxidativo e na elaboração de coquetéis enzimáticos devido a atividade sinérgica. Como já mencionado, elas são classificadas como Atividades Auxiliares (AA) pelo CAZy e são organizadas em AA9, AA10, AA11 e AA13,¹⁴ sendo as AA9s exclusivamente encontradas em fungos cujo mecanismo de ação envolve a ativação do oxigênio em um sítio ativo contendo cobre na superfície da enzima.⁴⁴ Elas podem ser classificadas em três tipos dependendo de seu mecanismo de ação. Tipo 1 oxidam apenas o carbono 1, tipo 2 oxidam o carbono 4 e tipo 3 oxidam ambos, C1 e C4,²¹ como mostra a Figura 5. A clivagem

oxidativa da celulose leva à formação de terminais oxidados em diferentes posições resultando na formação de um ácido aldólico na posição C1 e/ou 4-ketoaldoses na posição C4.⁴⁵ Segundo CAZy, 9 Lpmo de 6 fungos diferentes já apresentam suas estruturas resolvidas, como *Thielavia terrestris* e *Neurospora crassa*.¹⁴

Figura 5 - Esquema mostrando oxidações referente à Lpmo do tipo 1 (oxidação C1) e LPMO do tipo 2 (oxidação C4).

Fonte: Adaptada de HEMSWORTH et al.²²

Como mencionado anteriormente, as Lpmos necessitam de doadores de elétrons para reduzi-los, e esses doadores de elétrons podem ser ácido gálico, ácido ascórbico, fenóis derivados de lignina ou CDH.²³

Um dos organismos onde essas enzimas são expressas é o fungo filamentoso *Myceliophthora thermophila*, que é um fungo termofílico isolado do solo e classificado como ascomiceto. Ele apresenta crescimento em temperaturas entre 25 e 55 °C. Além da Lpmo, esse fungo apresenta genes para diversas outras classes de enzima, como endoglucanases, xilanases, β -glucosidases, entre outras.²⁵ A Lpmo de *M.thermophila* cliva β ,1-4 xilosil e β , 1-4 glicosil apresentando um alto efeito sinérgico com a endoglucanase I (EGI), resultando em 16x mais oligossacarídeos liberados.¹⁹

1.3 Sinergismo

Diferentes enzimas tais como celulases, hemicelulases e enzimas oxidativas estão presentes em coquetéis enzimáticos atuando de forma cooperativa. Estas enzimas atuam sinergicamente causando uma ruptura completa da biomassa lignocelulósica.²⁶ Um desses coquetéis enzimáticos é a Accellerase® 1500 produzido pela DuPont. Trata-se de um complexo de enzimas como exoglucanases, endoglucanases, hemicelulases, β -glucosidases e outras, como pode ser observado na Figura 6. Esta composição melhora a digestão dos carboidratos não-amiláceos da biomassa.²⁷

Figura 6 - Esquema da degradação das cadeias de celulose por diferentes enzimas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A melhor atividade deste coquetel ocorre nas temperaturas entre 50 e 65 ° C e pH 4,5 para 5,0.²⁷ Uma opção para a utilização desses coquetéis enzimáticos é descobrir uma maneira de aperfeiçoar ainda mais a atividade dos mesmos, por exemplo, através de sinergismo com outras enzimas. Esse sinergismo pode ser

estudado com adição de enzimas expressas por microrganismos conhecidos por expressarem enzimas acessórias como *M. thermophila* ou *B. licheniformis*, ou através da busca por microrganismos presentes em certos ambientes que expressem essas enzimas.

O sinergismo ocorre quando a mistura de duas ou mais enzimas apresentam maior atividade enzimática do que a soma das atividades dessas enzimas separadamente ²⁸ como mostrado na Equação 1.

Equação 1- cálculo da taxa de sinergismo

$$\text{sinergismo} = \frac{[\text{tx. de glicose produzida pela mistura de enzimas}]}{[\text{tx. de glicose produzida enzima 1}] + [\text{tx. glicose produzida enzima 2}]} \quad (1)$$

A quantificação do sinergismo é o nível de interação de duas ou mais enzimas ²⁹ e dependem de muitos fatores como a concentração molar das enzimas utilizadas, ³⁰ do mecanismo de ação, das propriedades do substrato ²⁹ e do tempo de reação. Alguns estudos mostram que o maior sinergismo ocorre no início da reação, ³¹, porém outro estudo aponta o oposto, indicando maior sinergismo em um maior tempo de reação. ³² O efeito de sinergia também pode depender da forma como as enzimas são adicionadas ao substrato, se sequencial ou simultaneamente. ³³

Um caso de sinergismo já analisado com uma enzima endoarabinanase da família GH43 de *Bacillus licheniformis* com o coquetel enzimático Accellerase indica um aumento de 15 % na concentração de açúcar liberado. ³⁴ Outros estudos mostram a presença de sinergismo entre uma endoarabinanase de *Phanerochaete chrysosporium* e uma endoxilanase onde também ocorre um aumento na taxa de açúcar redutor liberado. ³⁵ Com respeito às enzimas da classe das Lpmos estudos mostram que ocorre um aumento de até 16 vezes na degradação de substrato quando associada a uma endoglucanase I. ¹⁸ Outros estudos com Lpmos mostram também que quando em ação conjunta com as

celulases há um aumento nessa atividade e que o percentual desse aumento é substrato específico.³⁶ Pode-se também dar como exemplo um sinergismo já estudado entre uma Lpmo da família AA9 e uma xilanase na hidrólise do xilano de da lignocelulose onde ocorre uma liberação de açúcar redutor 1.3 vezes maior.³⁷

1.4 Bioprospecção

Enzimas com propriedades biotecnológicas podem ser encontradas e expressas em diversos microrganismos já conhecidos ou podem ser isoladas através da realização de estudos de bioprospecção em diferentes meios como solo, lagos ou compostagem, por exemplo. A bioprospecção é definida como a busca por um determinado gene ou organismo inteiro na vida selvagem, com intuito de desenvolvimento de produtos por observação biológica e diversos métodos bioquímicos e genéticos.³⁸

Há estudo que mostra que cerca de 95 a 99,9% dos microrganismos existentes ainda não foram cultivados por técnicas laboratoriais convencionais,³⁹ aumentando ainda mais o potencial referente a esse tipo de pesquisa.

Análise da bioprospecção de microrganismos tem crescido muito atualmente, devido ao aumento pelo interesse biotecnológico e a descoberta da utilização desses organismos em diversas áreas.⁴⁰ Com esses microrganismos podem ser realizados diversos estudos enzimáticos gerais ou mais específicos, como por exemplo, a bioprospecção de enzimas oxidativas. Com o estudo enzimático é possível atingir diversos campos de atuação, como compreender o papel das bactérias que estão presentes em certo habitat até a descoberta de novas fontes de enzimas para auxiliar, por exemplo, a produção de combustíveis alternativos. O isolamento de microrganismos presentes em ambientes que exercem pressão seletiva para uma determinada função, constitui uma estratégia na identificação destes alvos.⁵²

A busca por produtores de enzimas oxidativas em terrenos de fácil acesso como, por exemplo, em compostagem, facilitaria o estudo de sinergismo entre

enzimas oxidativas e coquetéis enzimáticos para a produção desses combustíveis alternativos.

Capítulo 2

Ana Elisa Tognoli Leite
IFSC - USP

Capítulo 2

Objetivos

Objetivo Geral

Com a utilização de microrganismos já isolados e por meio de bioprospecção de microrganismos de compostagem, realizar a otimização da degradação de biopolímeros através da ação sinérgica entre enzimas acessórias e coquetéis enzimáticos industrializados ou outras enzimas com intuito de melhorar a produção de bioetanol produzido através da biomassa vegetal.

Objetivo específico

1. Bioprospecção de 240 fungos previamente isolados de um sistema de compostagem.
2. Expressão e teste de atividade enzimática para os fungos isolados do sistema de compostagem.
3. Purificação de DNA e sequenciamento dos fungos isolados dos sistemas de compostagem.
4. Expressão e purificação enzimática heteróloga para enzima BIAbn1 e LpmoF.
5. Estudos de condições ótimas de sinergismo para enzima BIAbn1.
6. Análises das mudanças ocasionadas nos biopolímeros devido à ação enzimática da BIAbn1.
7. Ensaios enzimáticos para LpmoF para diferentes substratos e com diferentes doadores de elétrons.
8. Análise de sinergismo para LpmoF com endoglucanase.

Capítulo 3

Ana Elisa Tognoli Leite
IFSC - USP

Capítulo 3

Estudo de Bioprospecção

Com intuito de encontrarmos organismos que expressem enzimas oxidativas para futura aplicação na degradação de biopolímeros, foram realizados diversos estudos enzimáticos com fungos previamente isolados de sistemas de compostagem pelo aluno de doutorado do grupo Bruno Luan Mello. Dentre eles o teste do Halo para enzimas celulolítica e oxidativas, teste de atividade para as enzimas lacase, celobiose desidrogenase e lignina peroxidase. Foi realizado também a extração e purificação do DNA para identificação dos fungos. Foram analisados inicialmente 240 fungos que se encontravam congelados em glicerol, desses 240 apenas 16 retomaram o crescimento sendo então estudados.

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Meios de cultura

3.1.1.2 Meio mínimo *Aspergillus*

O meio mínimo para o cultivo dos clones de *Aspergillus nidulans* é composto por: 20 mg/L de piridoxina, 50 mL/L de sais de nitrato (composto por NaNO_3 (120g/L), KCl (10,4g/L), MgSO_4 (10,4g/L), KH_2PO_4 (30,4g/L)), 1 mL de elemento traço (composto por ZnSO_4 (22g /L), H_3BO_3 (11g /L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (5g /L), $\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.6g /L), $\text{NaMoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.1g /L) e Na-EDTA (50g/L) a pH 5.0) e glicose 10g/L, ajustando-se o pH para 6.5.

3.1.1.2 Meio PDA

Para o cultivo dos fungos isolados da compostagem, foi utilizado meio PDA a uma concentração de 39 g/L seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.1.1.3 Determinação da temperatura ideal de crescimento dos fungos isolados

Os fungos previamente isolados de um sistema de compostagem, assim como todos os microrganismos selecionados da biblioteca genômica, foram armazenados e congelados em freezer - 80°C. Os fungos foram armazenados em glicerol 80% e distribuídos em placas de 96 poços. Em placas petri contendo meio PDA sólido, realizou-se a divisão em 20 quadrantes onde foram inoculados diferentes fungos. Os inóculos foram feitos em duplicata e incubados entre 48 h e 72 h para crescimento em estufas com temperaturas de 37 e 50 °C. Após o crescimento, os fungos foram isolados em placas mestras contendo diferentes meios para análise da expressão proteica.

3.1.1.4 Meios seletivos para celulases

Este meio seletivo é composto por: 15 g/L ágar e 0.2% (m/v) CMC em Meio Mínimo para *Aspergillus*. Após crescimento do fungo, revela-se a atividade celulolítica com vermelho congo, deixando agir por 30 minutos. Após esse período descarta-se o corante e com uma solução de NaCl 0,5 M retira-se o excesso do vermelho congo, deixando agir por 5 minutos e descartando depois.

3.1.1.5 Meios seletivos para enzimas oxidativas

Este meio é composto por: 15 g/L ágar, 2 g/L glicose, 160 µM CuSO₄ e 0.035% ABTS em meio mínimo para *Aspergillus*. Após o inóculo do fungo isolado, cobriu-se as placas com papel alumínio durante todo o período de crescimento, pois o ABTS é fotossensível.

3.1.2 Teste atividade das proteínas secretadas

Após o crescimento em meio mínimo *Aspergillus* líquido á 37 °C durante 96 horas, as proteínas secretadas foram analisadas para três possíveis atividades enzimáticas: identificação das enzimas Lacase, celobiose Desidrogenase e lignina Peroxidase. Foram realizados testes preliminares para descobrir a melhor quantidade de enzima a ser utilizada em cada um dos testes.

3.1.2.1 Teste atividade Lacase

Foi utilizado para esse teste 10 µL de enzimas (0,838 mg/mL), 10 µL ABTS (10 mM), 10 µL Tampão Acetato de sódio pH 5.0 (100 mM) para um volume final de 100 µL. O tempo de reação foi para 30 minutos a temperatura de 37 °C.

3.1.2.2 Teste atividade Celobiose Desidrogenase

Para um volume final de 100 µL de reação foram utilizados: 10µL DCPIP (5 mM, 10 µL de Celobiose (250 mM), tampão citrato de sódio pH 5.0 (50 mM), 25 µL de enzima (0,838 mg/mL).

3.1.2.3 Teste atividade Lignina Peroxidase

Para um volume de reação de 100 µL foram utilizados: 375 µL de tartarato de sódio (0,3 M), 125 µL de Veratril álcool (4 mM), 50 µL de peróxido de hidrogênio (10 mM), 25 µL de enzimas (0,838 mg/mL) .

3.1.3 Extração DNA genômico

Para a extração do DNA genômico dos fungos isolados foi utilizado uma solução de extração contendo: 60% (m/v) de PEG (polietileno glicol alcalino) em 20

mM de KCl, pH 13.5. Em tubos Eppendorf de 2 mL colocou-se uma amostra de micélio (~10 mg) e 10 a 20 volumes da solução de extração por amostra. As amostras foram misturadas por agitação em vortex por aproximadamente 30 segundos e incubadas a 70°C, 1000 rpm, por 10 minutos em *Thermomixer*. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a na potência máxima por 10 minutos. A fração sobrenadante foi transferida e 1 µL desta solução foi utilizada para 50 µL de reação de PCR.

3.1.4 Reação PCR

Para uma reação de 50 µL utilizou-se: 1 µL do DNA genômico extraído, 2,5 µL de cada um dos primers (ITS4 R; ITS86 F) (10pM/µL), 10 µL de tampão CG (5 X), 4 µL de dNTP (10 mM), 2 µL DMSO, 0,5 µL MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL da enzima Phusion (2 U/mL). Os ciclos da PCR foram 98°C por 30 segundos para uma primeira desnaturação, 98°C por 10 segundos para uma segunda desnaturação, 55°C por 30 segundo para anelamento, 72°C por 30 segundo para a Ampliação, em ciclos com repetição de 30 vezes e 72 °C por 10 minutos.

3.1.5 Purificação DNA gel de Agarose

Os fragmentos de DNA amplificados na reação de PCR foram extraídos do gel de agarose e purificados utilizando o Kit de extração SV Gel and PCR Clean-Up System Promega.

3.1.6 Preparação amostra sequenciamento

A reação de sequenciamento foi composta por: 1 µL do Primer R ou F (3,2 pmol/µL), DNA a uma concentração de 10 a 20 ng em volume final de 7 µL. O sequenciamento foi realizado em 3130 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems) capaz de gerar sequências de 800pb.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Meios seletivos e testes de atividade

Os fungos isolados de compostagem foram plaqueados em meios seletivos para análise das possíveis atividades das enzimas secretadas. As análises realizadas nesses testes do halo foram feitas de maneira visual.

Para o teste das enzimas celulolíticas foi observado que dos 16 fungos analisados apenas 7 apresentavam uma boa atividade, como pode ser observado na Figura 7. A atividade celulolítica por ser evidenciada pela presença de um halo ao redor das colônias fúngicas. O raio dos halos é proporcional a atividade e quantidade de enzimas secretadas pelos fungos em estudo.

Figura 7 - Teste halo identificação enzimas celulolítica incubado a 37 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se a presença de halo em quase todas as colônias fúngicas com uma maior atividade observada para os fungos P1E7, P2C11, P3F10, P3H10, P4C1, P5D8 e P2E3.

A placa com testes de identificação de enzimas oxidativas pode ser observada na Figura 8, nela também se observa que dos 16 fungos analisados 9

apresentam atividade oxidativa sendo que desses 9, 7 apresentavam-se mais forte que em outros, como se pode observar pelo halo formado.

Figura 8 - Teste Halo identificação enzimas oxidativas incubado a 37 °C

Fonte: Elaborada pela autora.

Nesta placa observa-se que os fungos com maior expressão de enzimas oxidativas são P2C1, P2C11, P3F10, P3H10, P4C1, P5B10 e P2E3.

Para ampliar os testes de atividade para enzimas oxidativas expressas por esses fungos, foram feitos testes de atividade para distinguir três possíveis enzimas: lacase, celobiose desidrogenase e lignina peroxidase. A partir dos resultados desses experimentos foi elaborada a Tabela 2 mostrando a presença ou ausência de uma determinada atividade enzimática para cada colônia fúngica.

Tabela 2- Teste de atividade realizado para cada proteína fúngica.

	Halo ABTS	Atividade ABTS (Lacase)	Atividade celobiose Desidrogenase	Atividade lignina Peroxidase
P1C5	-	-	+	+
P1E7	-	+	-	-
P1G5	-	-	-	-
P2C11	++	++	+	++
P2E3	++	+	+	+
P3F10	++	-	-	-
P3F12	+	-	-	-
P3H10	++	-	-	-
P4C1	++	+	+	+
P4E1	-	++	-	++
P5A1	-	-	-	-
P5B10	+	-	-	-
P5D8	-	-	-	-
P5F6	-	-	-	-
P5F12	+	-	-	-

(-) corresponde a sem atividade, (+) a baixa atividade e (++) a alta atividade. Em azul estão destacados os fungos que apresentaram as melhores atividades.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após seleção dos fungos com maior atividade, analisando todos os parâmetros mostrados na tabela acima, foi realizada a quantificação proteica de cada um deles por Bradford, sendo os resultados encontrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantificação proteica dos principais fungos.

Concentração proteica (g/L)	
P2C11	0,1950
P2E3	0,1955
P4C1	0,2050

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a quantidade de proteínas expressa pelos fungos é semelhante. A partir destes resultados foi realizada a extração do DNA genômico dos três melhores isolados para posterior amplificação da região ITS 5 e sequenciamento.

3.2.2 Extração e purificação do DNA genômico

Para a identificação de fungos podem ser utilizadas técnicas como PCR onde essa identificação ocorre através da utilização de primers contendo regiões bem conservadas do DNA genômico chamadas ITS (Internal Transcribed Spacer) capazes de estabelecerem relações filogenéticas.⁴⁹

Na Figura 9 podemos observar o gel de Agarose 1,5 % resultante da análise da primeira amplificação após a extração do DNA genômico, podemos observar que somente aparecem bandas de DNA nos poços 1 e 3, indicando que a extração do DNA do fungo P4C1 não foi realizada com sucesso.

Figura 9 – Gel de Agarose (1,5%) da extração do DNA dos principais fungos.

Fonte: Elaborada pela autora.

A primeira reação de PCR gerou bandas inespecíficas e a banda de 400 pb foi recortada do gel de agarose e utilizada como molde para uma nova reação de

PCR. O resultado dessa nova PCR pode ser observado na Figura 10 onde foi possível obter uma única banda específica correspondendo ao tamanho aproximado de 400 pb.

Figura 10 - Gel de Agarose dos DNA extraídos e amplificados e peso molecular utilizado.

Fonte: Elaborada pela autora.

O DNA amplificado foi preparado conforme indicado no Item 2.10. e submetido à reação de sequenciamento.

3.2.3 Sequenciamento

A sequência obtida para o ITS dos fungos P2C11 e P2E3 foram:

>P2C11

```
AGCGGTGCACTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAGCCT
AGGTTTTTTACAAGCCCAAGGATCGGTGTTGGGGCGCTACGGTTGTCATCTGACC
GCCGTAGGCTCTGAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCGGGCGCCTTCTGCGTAGT
AGATTTACAACCTCGCATTGGGTCCCGGCCGAAGGCCAGCCGTCAAACCCTCTATT
CTTATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACTTAAGCTATCAA
TAAGCGGAGGAA
```

>P2E3

```
TCCGGGCGGTATCTGGCCGAGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGA
GCCTAGGTTTTTTACAAGCCCAAGGATCGGTGTTGGGGCGCTACGGTTGTCATCT
GACCGCCGTAGGCTCTGAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCGGGCGCCTTCTGC
GTAGTAGATTTACAACCTCGCATTGGGTCCCGGCCGAAGGCCAGCCGTCAAACCC
TCTATTCTTATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACTTAAGCT
ATCAATAAGCGGAGGAAATACATTTGTGTCTGATGCTATCAATAAGCGGAGGCA
TCTTTTTTTTTTTTATTTTTTCCTTCGTAGGAGAGAAAAT
```

Estas sequência foram submetidas a análise por Blastn. Ambos os fungos foram identificadas com 98% de identidade com o fungo *Scedosporium prolificans*. Este fungo pertence à família Microascaceae, caracterizado como patogênico e não apresenta genoma sequenciado. Esse microrganismo está envolvido na colonização das vias aéreas podendo causar infecções sino e extrapulmonares além de infecções associadas ao sistema nervoso central principalmente em pacientes imunocomprometidos.⁴¹

3.3 Conclusão

Através do isolamento de organismos do ambiente de compostagem foi possível isolar e identificar o fungo *Scedosporium prolificans*, responsável pela expressão da enzima oxidativa Lacase. O sequenciamento do genoma desse organismo assim como estudos de sinergismo com essa enzima para a otimização da degradação da biomassa não foi realizado devido ao risco de patogenicidade associado a este fungo.

Capítulo 4

Ana Elisa Tognoli Leite
IFSC - USP

Capítulo 4

Estudo de sinergismo GH43

Com intuito de buscar a atividade sinérgica entre a enzima BIAbn1 de *Bacillus licheniformis* com o coquetel enzimático Accellerase (composto por diversas enzimas como endoglucanases e β - glicosidase), foram realizadas a partir de células de *Escherichia coli* já transformadas e cedidas pelo ex-aluno Erick Suclupe, estudos para obtenção da condição ótima de sinergismo e análises de ressonância magnética nuclear em estado sólido e relaxometria para análise de cristalinidade e calculo do tamanho dos poros da amostra e microscopia eletrônica de varredura para a análise em alta resolução da superfície da amostra. Todas as análises aqui realizadas foram iniciadas a partir de um estudo prévio onde se analisou as melhores condições para se trabalhar com essa enzima.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Expressão e purificação da enzima BIAbn1

Células de *Escherichia coli* cepa BL21(Rosetta) transformadas com o plasmídeo PETTrxA-1a/LIC construído e cedido pelo antigo aluno de mestrado do grupo Erick Giancarlo Suclupe Farro baseado na literatura⁵³ e contendo o gene de interesse para arabinanase, foram pré-inoculadas meio LB líquido a partir de estoque glicerinado. A esse pré-inóculo foram adicionados os antibióticos clorofenicol (35 μ g/mL) e canamicina (50 μ g/mL) e incubado por 16 horas a 37°C e 180 rpm. Esta cultura foi inoculada em 1L de meio auto indutor ZYP-5052 composto por: 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 meio⁵⁰ contendo os antibióticos clorofenicol e canamicina nas mesmas concentrações anteriores. Esse

meio foi inicialmente incubado por 5 horas a 37°C e 180 rpm e em seguida resfriada por 16 horas a 20 °C e 180 rpm. Após a expressão, as células foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 6000 rpm a 4°C por 35 minutos. A fração sobrenadante foi descartada e as células ressuspensas em 30 mL de tampão de lise contendo: 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM imidazol e 10% v/v glicerol. A esta solução foi adicionada 0,1 mM PMSF e em seguida submetida a lise por sonicação (ciclos de 30 segundos ligados e 30 segundos desligados) por 8 minutos para uma melhor lise. As amostras foram centrifugadas por 30min a 18000 rpm onde as proteínas solúveis foram separadas.

A purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade utilizando resina GE Talon superflow contendo cobalto. Essa resina foi inicialmente lavada com 10 volumes (VC) de água MilliQ e em seguida 10 volumes de tampão de equilíbrio contendo 50 mM Tris 7,5; 150 mM de NaCl e 10 mM de imidazol. Após a etapa de equilíbrio, as proteínas solúveis foram carregadas na resina. A seguir foram realizadas 4 lavagens, todas elas com 5 volumes. A primeira lavagem foi feita com tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl. A segunda, terceira e quarta lavagens foram realizadas com 5 VC desse mesmo tampão com a adição de diferentes concentrações de imidazol: 5mM, 20mM e 40mM respectivamente. Em seguida foram realizadas 4 eluições, todas com esse mesmo tampão e com variadas concentrações de imidazol (100 mM, 200 mM, 250 mM e 500 mM). Foram coletadas alíquotas de todas as frações e as proteínas analisadas em gel SDS-PAGE 15 % corados com Coomassie-blue.

Após a análise das amostras eluídas, as frações mais puras foram reunidas e concentradas por centrifugação em concentrador de centrifuga GE Healthcare Life Vivaspin™ 20 com corte de 30 KDa até aproximadamente 5 mL. Em seguida foi diluída para 25 mL com tampão 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl. As amostras foram incubadas por aproximadamente 16 horas na presença da protease TEV (Tobacco Etch Virus) na proporção de 1 mg de protease para cada 50 mg de para a clivagem da proteína de fusão (Histag+Trx) confirmada em gel SDS-PAGE 15%.

A amostra clivada foi novamente submetida a cromatografia de afinidade para a remoção da cauda de histidina que foi retirada após a clivagem no sítio da TEV. A

coluna foi equilibrada e lavada da mesma maneira da primeira purificação e as eluições foram feitas com variadas concentrações de imidazol (10mM, 100 mM, 200mM e 500 mM), todas em tampão 50 mM Tris-HCl e 150 mM NaCl.

Dessa segunda purificação foi coletada a fração não ligada (F.T) e a eluição de 10 mM de imidazol.

4.1.2 Análise de sinergismo

Para verificar a presença de uma possível reação sinérgica entre a arabinanase e o coquetel enzimático Accellerase foram realizados diferentes experimentos.

Inicialmente foi analisado o efeito do pH sobre a atividade das enzimas envolvidas. As reações foram realizadas em tampão citrato de sódio pH 5.0, ótimo para Accellerase, e em tampão fosfato de sódio pH 8.0, ótimo para BIAbn1, ambos a uma concentração de 100 mM. Cada reação enzimática foi composta por 30 ng/ μ L¹⁴ de BIAbn1, 2 μ L/mL de Accellerase 1500³⁴ e aproximadamente 20 mg/mL de papel filtro WhatmanTM para um volume final de 1 mL. As reações foram incubadas em Thermomixer Eppendorf por 16 horas, 1500 RPM e 40 °C. Para todas as reações foram feitos 3 controles, um contendo somente substrato e tampão, um contendo somente a enzima BIAbn1 e outro somente a Accellerase.

Após a verificação do baixo nível de sinergismo encontrado em reações simultâneas, foi realizado outros testes foram feitos com um tratamento prévio do papel filtro com a enzima BIAbn1, para a verificação de um sinergismo sequencial. Para esse estudo foram analisadas 4 reações, (a) somente com papel filtro e tampão; (b) papel filtro, BIAbn1 e tampão; (c) papel filtro, Accellerase e tampão; (d) papel filtro, BIAbn1, Accellerase e tampão. Todas essas com um pré-tratamento do papel por 5 horas e uma reação 3 horas, 16 horas e 20 horas. Foram analisados também os resultados apenas do pré-tratamento para as amostras de papel filtro e tampão e papel filtro, tampão e BIAbn1.

Esse pré-tratamento foi feito também em Thermomixer Eppendorf, por 5 horas, 1500 rpm, a 40 °C e com um volume total de 1 mL. Foi utilizado tampão fosfato de sódio pH 8.0 a uma concentração de 50 mM, 30 ng/μL da arabinanase, 20 mg/mL de papel filtro e água MilliQ para completar o volume da reação.

Logo após as amostras foram fervidas por 10 min para desnaturar a enzima e lavadas em centrifuga com água MilliQ por 10 minutos a rotação de 13.3 rpm e 4 °C. Esse procedimento de lavagem foi repetido três vezes.

As reações para a análise do sinergismo foram feitas com um volume final também de 1 mL, 1500 rpm, 40 °C e por 17 horas. Foi utilizado tampão citrato pH 5.0 em uma concentração de 50 mM, os papeis filtro previamente tratados, Accellerase em 2 μl/mL somente nas reações (c) e (d) e água MilliQ para completar o volume da reação.

4.1.3 Quantificação dos açúcares redutores liberados no ensaio de sinergismo

Todos os testes com relação à taxa de sinergismo foram analisados por meio da técnica do açúcar redutor DNS (dinitrosalisilic acid), incubados por 15 minutos a 98 °C. Esses resultados foram analisados pela leitura de absorbância a 540 nm no espectrofotômetro Multiskan Spectrum. As taxas de açúcares redutores produzidos foram calculadas por meio de uma curva de glicose previamente efetuada.

4.1.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas no Grupo de Ressonância Magnética, Espectroscopia e Magnetismo pelo grupo do professor Dr. Eduardo Ribeiro de Azevêdo no Instituto de Física de São Carlos (IFSC – USP).

Os experimentos de RMN de estado sólido foram realizados utilizando um espectrômetro Bruker Avance 400, equipado com uma sonda de dupla ressonância, MAS de Bruker de 4 mm, às frequências de ^{13}C e ^1H de 100,5 e 400,0 MHz, respectivamente. O Índice de Cristalinidade (CI) foi obtido usando RMN de estado

sólido pela descongelação de linhas a 84 e 88 ppm, que são atribuídas ao carbono C4 de celulose amorfa (superfície) e cristalina (interna), respectivamente conforme indicado na literatura.⁴⁶

Os resultados de RMN de relaxometria foram realizados através de um espectrômetro Bruker Minispec MQ-20 que opera com um campo magnético de 0,5 T (frequência ¹H Larmor de 20 MHz). 50,000 ecos foram adquiridos com tempos de eco de 70 s e recicla os atrasos de 15 s. As amostras foram secas em um forno a vácuo a 510 mmHg, 80°C durante 24h. Então, eles foram saturados com DMAc e bombeados a 600 mmHg durante 20 minutos para preencher os poros da amostra. O excesso de DMAc foi removido com uma micropipeta. Para acessar a estrutura dos poros dos materiais, utilizou-se N, N-dimetilacetamida (DMAc) como uma sonda molecular ao invés de água uma vez que esta altera a distribuição dos poros.

4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de papel de filtro das diferentes reações do sinergismo sequencial foram analisadas em *High Resolution Scanning Microscope Field emission gun feg* (SEM) FEI INSPEC F. Todas as amostras foram revestidas com ouro para evitar a acumulação de elétrons, uma vez que o papel de filtro não apresenta uma Superfície condutora. As imagens foram feitas sob vácuo, utilizando uma tensão de aceleração de 5 kV e utilizando um detector externo vCD. As ampliações utilizadas foram de 100X, 500X e 1000X. Para resultados mais precisos, foram feitas pelo menos 10 imagens de cada amostra. Tanto a preparação das amostras quanto a microscopia foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos, SP no grupo de pesquisa do professor Dr. Edson Roberto Leite

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Expressão e purificação ABN1

Após a primeira purificação da proteína BIAbn1 em coluna de cobalto, onde foram realizadas diversas lavagens e eluições, as frações foram analisadas em SDS-PAGE 15% para verificar em quais frações a proteína encontra-se mais pura. Na Figura 11 pode-se verificar que a maior concentração da enzima está presente nas lavagens 3 e 4 com concentrações de 20 e 40 mM de imidazol respectivamente e na eluição 1 com 100 mM de imidazol. Indicando que a ligação da enzima, pela cauda de histidina não ocorre tão fortemente, se desligando com baixas concentrações de imidazol.

Figura 11 - Gel SDS-PAGE 15% da primeira etapa de purificação da enzima BIAbn1. Corado com Coomassie-bleu. Na esquerda encontra-se o marcador indicando o peso molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a concentração dessas frações elas foram incubadas overnight com a protease TEV, a remoção da proteína de fusão foi verificada em gel SDS-PAGE (Figura 12). Pode-se observar 3 bandas, a primeira indicando a proteína que não foi clivada (45KDa), a segunda indicando a proteína clivada (30 KDa) e a terceira a proteína de fusão (14KDa).

Figura 12 - Gel SDS-Page para confirmação da clivagem da proteína BIAbn1 pela protease TEV.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim foi realizada novamente uma purificação de afinidade em coluna de cobalto no intuito de separar a proteína de fusão e a enzima não proteolisada. Devido à ausência agora da cauda de histidina a proteína não deve se ligar a coluna ou se ligar muito fracamente. Devido a esse motivo foram realizadas eluições de 10, 40, 100, 200 e 500 mM de imidazol seguido da verificação da pureza em gel SDS-PAGE (Figura 13). É possível observar que a proteína de interesse está presente em maior quantidade na fração que passou direto, Flow through (F.T) e nas eluições de 10 e 40 mM de imidazol. Nota-se a presença de pequenas bandas ainda presente nesse gel contaminando a proteína de interesse. Porém, como a concentração dessa enzima será realizada em concentradores de 30 kDa, essas frações serão separadas da BIAbn1 e então descartadas, como mostra a Figura 14. Essas frações encontram-se praticamente pura e foram então concentradas a 1,098 µg/µL e então utilizadas nos testes de sinergismo.

Figura 13 - Gel SDS-Page para verificar a pureza da enzima BIAbn1 de interesse utilizada nos estudos de sinergismo. Na esquerda encontra-se o marcador indicando o peso molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 - Gel SDS-Page para verificar a pureza da enzima BIAbn1 de interesse após concentração utilizada nos estudos de sinergismo.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.2 Análise sinergismo

Com relação às primeiras análises de sinergismo, para as duas primeiras reações foi utilizada a mesma concentração enzimática, de substrato, o tempo de reação e a agitação, foram analisadas as atividades com diferentes tampões e diferentes pH's.

A análise em diferentes tampões foi realizada calculando-se a quantidade de açúcar redutor liberados utilizando método do DNS. Esses resultados podem ser encontrados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 – Quantidade de açúcar redutor formado em cada uma das reações. Nas Chamadas Accellerase contém apenas o coquetel enzimático, nas chamadas Reação contém o coquetel enzimático e a enzima BIAbn1, nas chamadas BIAbn1 contém apenas a enzima e no branco encontra-se tampão e substrato.

	Açúcar redutor formado	Erro
Accellerase pH 5.0	0,878	±0,009
Reação pH 5.0	0,916	±0,003
Accellerase pH 8.0	0,770	±0,008
Reação pH 8.0	0,870	±0,002
BIAbn1 pH 5.0	0,096	±0,007
BIAbn1 pH 8.0	0,087	±0,005
Branco pH 5.0	0,092	±0,009
Branco pH 8.0	0,087	±0,008

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir desses valores foi calculada a taxa de sinergismo em todos os pH, a taxa de sinergismo encontrada para o pH 8.0 foi de 1,017, indicando que ocorre um aumento de 1,7 % na produção de açúcar redutor do que quando somente com a Accellerase. Este valor não é significativo, pois nesse pH o coquetel não atua de maneira ótima. Com relação ao pH 5.0, o valor de sinergismo encontrado para essas condições foi de 1,04, indicando que também há relação de sinergismo entre a BIAbn1 e o coquetel enzimático nessas condições de reação com uma melhora na faixa de 4 % na quantidade de açúcar redutor formado. Esse valor ainda é muito baixo, pois há estudos que mostram que o sinergismo entre o coquetel enzimático e enzimas da família GH43 podem atingir valores de 15 %.³⁴ Desta forma, pode-se concluir que, apesar da condição ótima de sinergismo entre a enzima e o coquetel não ter sido encontrada, comparativamente foi melhor em pH 5.0, que corresponde ao pH ótimo da Accellerase.

Como não foi encontrada nenhuma condição ótima de sinergismo simultâneo, foi realizado um pré-tratamento do papel filtro com a enzima BIAbn1, em tampão fosfato pH 8.0, para verificar se há presença de sinergismo sequencial. Após esse tratamento o papel filtro pré-tratado foi submetido à ação da Accellerase em tampão

citrato pH 5.0 por 16 horas. Os valores de açúcares redutores formados nessa reação podem ser observados na figura 15 abaixo:

Figura 15 - Gráfico da análise açúcares redutores liberados (g/L) em reação sequencial com reação de 16 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nesse aumento na liberação de açúcar redutor em relação ao controle, reação contendo apenas o coquetel enzimático Accellerase, novas reações com diferentes tempos foram realizadas. Nessas reações foram utilizadas reações com tempos de 3 e 20 horas, para observar como essas reações se comportavam com um tempo menor e um maior do que o anteriormente testado. A quantidade de açúcar redutor formado nesses tempos pode ser encontrada na Figura 16.

Figura 16 - Quantidade de açúcar redutor liberado pelas reações de sinergismo sequencial em diferentes tempos.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos valores de açúcares redutores encontrados pelo experimento acima nota-se que com os tempos de 3 e 20 horas há uma interação sinérgica entre

os componentes estudados. Para o tempo inicial de 3 horas é possível observar um aumento na liberação de açúcar redutor na faixa de 8 %, ainda baixo quando comparado com a literatura. Já com relação ao tempo de 20 horas, apesar de haver uma maior liberação de açúcares na reação, ocorre uma sobreposição nas barras de erro indicando, possivelmente, que a intensidade deles é aproximadamente a mesma, indicando a presença ainda mais baixa dessa condição sinérgica. Com isso é possível deduzir que um tempo maior que de 16 horas pode ser prejudicial para esse sinergismo. É possível concluir que o melhor tempo para uma interação sinérgica entre essa enzima e o coquetel enzimático é de 16 horas onde o aumento na liberação de açúcar redutor foi em torno de 16,3%. Esses valores foram calculados com base na equação 1 a partir da medida, por DNS, de açúcares redutores formados em cada reação. Os valores para a reação controle e apenas com BIAbn1 são bastante semelhantes, variando apenas na terceira casa decimal, fazendo com que essa medida relacionada à enzima GH43 não interfira praticamente nada no cálculo do sinergismo.

Foram também analisadas interações sinérgicas com diferentes concentrações de enzimas para o sinergismo sequencial. Essas concentrações são de; 0,1; 0,5; 1; 2 e 3 μM da enzima BIAbn1 em reações de 16 horas, melhor tempo encontrado por experimentos anteriores.

Na Figura 17 podemos observar o gráfico contendo a taxa de equivalência em glicose para cada uma das reações (Accellerase + BIAbn1) assim como a reação somente da Accellerase. Nele observamos que a quantidade de enzima utilizada interfere na reação sinérgica entre ela e o coquetel enzimático Accellerase. Nota-se que para todas as concentrações há interação sinérgica e observa-se um aumento na taxa de açúcar redutor formado à medida que se aumentam as concentrações de enzima utilizada, porém quando essa concentração passa a ser de 2 μM a atividade sinérgica cai indicando que o sinergismo é dependente da concentração de enzima utilizada.

Figura 17 - Quantidade de açúcar redutor (g/L) liberado nas reações de sinergismo sequencial com diferentes concentrações enzimáticas

Fonte: Elaborada pela autora.

A taxa de sinergismo observada nas diferentes concentrações pode ser analisada na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Taxa de sinergismo observado nas reações com diferentes concentrações enzimáticas.

Sinergismo:	
Reação 0.1 μM	1.213
Reação 0.5 μM	1.219
Reação 1.0 μM	1.337
Reação 2.0 μM	1.132
Reação 3.0 μM	1.138
Reação 4.0 μM	1.112

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando que o sinergismo só ocorre com um tratamento prévio do substrato com a enzima procurou-se saber o porquê isso ocorre. Inicialmente foram feitas análises para verificar se a enzima já começava a degradar o papel filtro durante o pré-tratamento, já que se nota uma deformação no substrato, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Foto indicando a diferença existente na morfologia do papel filtro após a realização do pré-tratamento com BIAbn1.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar se já havia açúcares redutores sendo formados nessa etapa e, por isso que a produção final de açúcar era maior nas reações do que nos controles, foi feito um teste de DNS logo após esse período de pré-tratamento. No teste foram analisadas amostras em triplicata contendo somente tampão e substrato, e outra contendo tampão, substrato e enzima BIAbn1 30 ng/ μ L. Após a reação com DNS as absorbâncias medidas em comprimento de onda de 540 nm se apresentaram praticamente as mesmas, sendo seus valores observados na Tabela 6. Essas medidas foram realizadas depois da reação de pré-tratamento de 5 horas e da reação total de 16 horas.

Tabela 6 – Medida de absorbância reação DNS para verificar a formação de açúcar redutor pela ABN1 em diferentes tempos.

	Absorbância
ABN1 5 horas	0,056
CTRL 5 horas	0,055
ABN1 16 horas	0,056
CTRL 16 horas	0,057

Fonte: Elaborada pela autora.

Como a razão desse sinergismo entre a Accellerase e a enzima estudada BIAbn1 não era a formação de açúcares durante o pré-tratamento, supõe-se que alguma mudança estrutural ou composicional tenha ocorrido no papel filtro o que auxiliou na ação do coquetel enzimático Accellerase. Para verificar isso, as amostras

foram analisadas por dois modos diferentes. Foram feitas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.2.3 RMN

Com relação à espectrometria RMN de estado sólido observa-se na Figura 19, de baixo para cima, os espectros de RMN de amostras de papel pré-tratadas com: a) nenhum tratamento, b) Accellerase, c) BIAbn1, d) Accellerase + BIAbn1. Apesar da ausência de diferenças significativas nas mudanças químicas, existem algumas mudanças sutis nas formas da linha, que estão relacionadas a modificações no estado conformacional das amostras.

Figura 19 - ^{13}C espectro Multi-CP de amostras de papel filtro com diferentes tratamentos

Fonte: Cedida por Jefferson G. Filgueiras - Grupo de RMEM - IFSC.

O índice de cristalinidade foi calculado a partir da razão entre $C_4^{\text{Cristalino}}$ pela soma do $C_4^{\text{Cristalino}}$ com C_4^{Amorfo} , extraído do gráfico da figura anterior pela intensidade dos picos. Esses índices podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 - Tabela referente ao índice de cristalinidade das amostras e papel filtro com diferentes tratamentos.

AMOSTRA	PAPEL	ACCEL.	BIAbn1	ACCEL+BIAbn1
CI	0.69 ± 0.02	0.75 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.78 ± 0.02

Fonte: Cedida por Jefferson G. Filgueiras - Grupo de RMEM - IFSC.

Observa-se que o índice de cristalinidade aumenta dependendo do tipo de tratamento realizado no papel filtro, indicando que a parte amorfa do papel esta diminuindo, fazendo com que essa razão seja maior.

Com relação aos resultados RMN de relaxometria temos para fluidos confinados em nano e micro poros temos uma estreita relação entre o tempo de relaxamento transversal, T_2 e a relação superfície-volume dos poros,⁴⁷ ou seja, o tamanho do poro presente no papel filtro é proporcional a distribuição T_2 que pode ser calculado pela equação 2, onde ρ é a constante de relaxividade, S é a superfície do poro e V o volume.

Altos valores de T_2 indicam poros maiores já que há uma maior superfície e, portanto, uma maior interação do DMAc. Na Figura 20 observa-se um esquema estrutural e dos poros da celulose e o gráfico da distribuição de T_2 para cada um dos tratamentos realizados no papel filtro. De cima para baixo temos Accel. + BIAbn1 (preto), BIAbn1 (vermelho), Accellerase (verde), papel filtro (azul). A largura dos picos corresponde à variação no tamanho dos poros e o valor mais alto encontrado se refere ao tamanho médio encontrado para os poros. Observa-se que com os tratamentos, em especial o tratamento do papel filtro com BIAbn1 e posterior reação com a Accellerase faz com que o pico se desloque para a esquerda indicando que houve aumento dos espaços Inter-fibras e Inter-micro-fibras. Esses valores podem também serem observados na Tabela 8, aonde temos os valores médios da distribuição T_2 referente a cada um dos tratamentos. Isso indica, de maneira complementar aos resultados do Índice de cristalinidade que a remoção da parte amorfa está realmente ocorrendo fazendo com que haja um aumento também nos poros da celulose.

Equação 2- Equação para cálculo de T_2

$$1/T_2 = \rho (S/V) \quad (2)$$

Figura 20 - a) Esquema estrutural e poros da celulose. b) Distribuição T_2 para cada tratamento.

Fonte: a) Adaptado de ZHANG et al.⁴⁸ b) Cedida por Jefferson G. Filgueiras Grupo de RMEM - IFSC.

Tabela 8- Valores espaços Inter-fibras e Inter-micro-fibras para cada um dos tratamentos pela distribuição T_2 .

	Espaço Inter-micro-fibras	Espaço Inter-fibras
PAPEL FILTRO	$(5.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ s	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^{-1}$ s
Accel.	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^{-2}$ s	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-1}$ s
BIAbn1	$(8.4 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ s	$(8.8 \pm 0.3) \times 10^{-2}$ s
Accel. + BIAbn1	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^{-2}$ s	$(2.3 \pm 0.3) \times 10^{-1}$ s

Fonte: Cedida por Jefferson G. Filgueiras Grupo de RMEM – IFSC.

4.2.4 MEV

As imagens de microscopia foram feitas das amostras de sinergismo sequencial, ou seja, do que recebe um pré-tratamento com a enzima. Foram feitas análises do controle (papel filtro e tampão), somente da enzima BIAbn1 da reação total de 16 horas, somente da Accellerase e da Mistura entre a enzima e a Accellerase. Para evitar o acúmulo de elétrons na superfície do papel foi feita uma deposição de uma fina camada de ouro. Todas as imagens foram realizadas com o mesmo detector (vCD), mesma voltagem (5.00 KV) e mesmo spot (4.00). Houve mudança apenas na magnificação. As imagens de micrografia podem ser observadas na Figura 21. Na coluna a temos a presença do primeiro controle, apenas papel filtro. Nela observa-se que as fibras do papel estão mais fechadas, mais grossas e regulares. Na coluna b temos apenas papel filtro tratado com a BIAbn1 onde é possível notar uma mudança na morfologia do papel mostrando as fibras mais abertas e finas. O mesmo ocorre na coluna c onde o papel tratado apenas com Accellerase apresenta praticamente as mesmas mudanças, porém liberando açúcar redutor durante essa reação, como mencionado anteriormente. Já na coluna d temos imagens do papel filtro tratado com BIAbn1 e depois com Accellerase, nessas imagens nota-se que a abertura nas fibras do papel é muito maior do que nos outros tratamentos e que se nota que elas estão, além de bem finas, quebrada, indicando que o tratamento com a enzima GH43 ajuda na ação do coquetel enzimático.

Figura 21 - A linha I indica uma ampliação de 100X, linha II uma ampliação de 500X e linha III uma ampliação de 1000X. Coluna a) indicam apenas amostras de papel de filtro, b) papel de filtro em ANB1, c) papel de filtro em Accellerase e d) papel de filtro pré-tratado com BIAbn1 e posterior reação com Accellerase.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Conclusão

Com relação a análise de possível sinergismo entre a arabinanase da família GH43 BIAbn1 e o coquetel enzimático Accellerase foram observados que, com relação ao sinergismo simultâneo, não ocorre aumento na liberação de açúcar redutor quando a enzima é adicionada à reação contendo Accellerase. O sinergismo existe e está presente apenas quando realizado de maneira sequencial. Além disso, esse sinergismo é dependente do tempo e também da quantidade de enzima utilizada, sendo que quanto maior a quantidade de enzima utilizada, maior o sinergismo encontrado, tendo um máximo em $1\mu\text{M}$ de enzima diminuindo a partir dessa concentração. Observa-se também que esses pré-tratamentos realizados também realizam alterações na morfologia dos substratos como pode ser observado nas imagens de micrografia onde se observa que cada tratamento modifica a

estrutura do papel filtro com uma mudança mais visível para o tratamento com a enzima Bianb1 e uma posterior reação com o coquetel Accellerase. De maneira complementar nota-se isso também nos resultados de RMN onde ocorre um aumento no tamanho dos poros da membrana e redução na parte amorfa da celulose, deixando as fibras cristalinas da celulose mais em evidencia.

Capítulo 5

Ana Elisa Tognoli Leite
IFSC - USP

Capítulo 5

Estudo enzima oxidativa LpmoF

Com intuito de estudar a atividade da enzima oxidativa LpmoF em diferentes substratos além de análise de sinergismo com uma endoglucanase na hidrólise de biopolímeros foi realizado, a partir de um clone de *Aspergillus nidulans* constituído e cedido pelo Dr. Marco Kadowaki, aluno de pós doutorado do grupo, diferentes análises com técnicas de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e HPAEC.

5.1 Materiais e métodos

5.1.2 Expressão e purificação da enzima LpmoF de *M. thermophila*

O clone de *A. nidulans* constituído e cedido pelo Dr. Marco Kadowaki, aluno de pós-doutorado do grupo, expressando a enzima oxidativa LpmoF de *M. thermophila* foi inicialmente ativado em meio mínimo sólido contendo: 20mg/L de piridoxina, 50 mL/L de sais de nitrato (composto por NaNO₃ (120g/L), KCl (10,4g/L), MgSO₄ (10,4g/L), KH₂PO₄ (30,4g/L)), 1 mL/L de elemento traço (composto por ZnSO₄ (22g /L), H₃BO₃ (11g /L), MnCl₂.4H₂O (5g /L), CaCl₂.5H₂O, CuSO₄.5H₂O (1.6g /L), NaMoO₄.4H₂O (1.1g /L) e Na-EDTA (50g/L) a pH 5.0), 10 g/L glicose e 19g/L ágar com pH ajustado para 6,5 (Figura 22).

Figura 22 - Fungo A. nidulans após crescimento em placa petri.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após o crescimento do fungo a 37°C por 48h, os esporos foram transferido para meio de indução composto pelo meio mínimo líquido descrito acima acrescido de 5 % (m/v) de xarope de milho maltose/glicose). Este inóculo foi incubado em bandejas de 4L a 37°C por 36horas (Figura 23).

Figura 23 - Expressão em bandeja de 4 litros para produção da proteína LpmoF.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após esse período o tapete micelial foi retirado e o meio de cultura coletado. O meio foi centrifugado por 15 min a 9000 xg para eliminar resíduos de micélio que tenham permanecido no meio e em seguida filtrado em membranas Miracloth e concentrado em Hollow Fiber (corte de 5 kDa) até aproximadamente 350 mL (Figura 24).

Figura 24 - Concentração inicial do meio de cultura contendo a proteína em Hollow Fiber.
Fonte: Elaborada pela autora.

A primeira etapa de purificação constituiu em uma cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex. Nesta etapa a enzima Lpmo é recuperada na fração não retida. Esta cromatografia permitiu separar proteínas contaminantes de massa molecular acima de 40 kDa assim como reter pigmentos produzidos pelo fungo. Em seguida a amostra foi submetida a precipitação de polissacarídeos com sulfato de amônio a 20% (m/v) de saturação de acordo com a Figura 25 abaixo.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																			
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100			
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																			
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0		
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5		
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10		
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15		
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20		
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25		
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30		
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35		
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40		
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45		
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50		
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55		
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60		
									0	31	63	97	132	168	205	244	65		
										0	32	65	99	134	171	209	70		
											0	32	66	101	137	174	75		
												0	33	67	103	139	80		
													0	34	68	105	85		
														0	34	70	90		
															0	35	95		
																0	100		

Figura 25 - Tabela utilizada na purificação utilizando precipitação com sulfato de amônio.

Fonte: BIOCHIMIE ...⁵⁴

Esta solução foi incubada a 10°C por duas horas e depois centrifugada por 40 min a 6000 rpm. O pellet foi descartado e a concentração de sulfato de amônio elevada para 70 % com o intuito de precipitar a proteína. Esta solução foi incubada por 16 h sob leve agitação e refrigeração. Posteriormente, centrifugou-se por 40 min a 16000 rpm e o pellet de proteínas ressuspenso em 20 mL de água. A solução foi concentrada para 2 mL e submetida a cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 75 HiLoad 16/60 (GE) em cromatógrafo do tipo AKTA. Esta cromatografia foi realizada a um fluxo de 1 mL/min em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8.0 e 150 mM de NaCl.

5.1.3 Análises por HPAEC – ICS 5000 DIONEX

Uma das maneiras de verificar a atividade oxidativa dessas enzimas é através da utilização do horseradish Peroxidase (HRP) que processa o peróxido de hidrogênio liberado pela reação de oxidação e o Amplex Red é reduzido a resorufina, na presença do doador de elétron.²⁴ Além dessa maneira, a atividade também pode ser verificada através dos produtos gerados pelas reações de oxidação da enzima Lpmo através de análises por cromatografia de interação iônica no equipamento DIONEX ICS-5000. Todas as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.3 RPM e filtradas em CROMAFIL®Xtra PTFE-20/25 da Macherey-Nagel antes de serem aplicadas no equipamento. Foi utilizada a coluna CarboPac PA1 analytical 4x250 mm com fluxo de 1 mL/min e temperatura de 30°C. Os carboidratos foram separados utilizando-se dois tampões: tampão A contendo 0,1 M de hidróxido de sódio e Tampão B contendo 0,1 M de hidróxido de sódio e 1 M de Acetato de sódio.

5.1.4 Testes de substratos

A atividade da Lpmo pode ser testada com três tipos de xilano: arabinoxilano, glucoronxilano de bétula (birchwood) e xilano de aveia. A atividade em celulose PASC com a presença de ácido ascórbico apresenta compostos oxidados como

produto. Porém, essa mesma reação sem o ácido ascórbico não apresenta compostos oxidados como produto.¹⁹

Foram realizadas análises de atividade oxidativa com diferentes substratos, dentre eles: PASC, Xilano de faia, Sigma-Cell (Sigma), Xilohexaose, Celohexaose, arabinoxilano de centeio (Megazyme). Para cada uma das reações foram realizados dois controles, um deles sem a enzima e o outro sem o ácido ascórbico ou pirogalol como agente redutor. As reações foram montadas conforme indica a Tabela 9

Tabela 9 - Reações realizadas na análise de substrato com a enzima LpmoF

	PASC 0,5 %	Xilano 0,8 %	Xilohexaose	Sigma-Cell	Celohexaose	Arabino xilano 0,8%
1 mM Ác. Asc.	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL	2,5 µL
Substrato	342 µL	240 µL	240 µL	480 µL	240 µL	200 µL
Enzima	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Tampão	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	25 µL
H₂O	215,75µL	317,75 µL	314 µL	74 µL	314 µL	262,5 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

As reações foram incubadas por 16 horas a 50 °C e 1500 rpm.

5.1.5 Teste com diferentes doadores de elétrons

Foram realizadas análises de diferentes doadores de elétrons como o ácido ascórbico, o ácido pirogalico (Química Nova) e a enzima CDH como mostra a Tabela 10. Para cada uma das reações foram realizados dois controles, um apenas com o doador de elétrons em tampão e outro apenas com a enzima LpmoF em tampão. Foram realizadas reações de 16 horas a 50 °C e 1500 RPM.

Tabela 10 - Reações realizadas na análise de diferentes doadores de elétrons com enzima LpmoF.

	Pirogallol	CDH
1 mM Doador elétrons	2,5 µL	56 µL
0,8 % PASC	71 µL	71
Enzima	10 µL	10
Tampão	25 µL	25
H₂O	Completar 500 µL	Completar 500 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.7 Análise por Espectroscopia de Massas (MALDI-TOF)

A reação utilizada para a análise dos produtos oxidados gerados foi também analisada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. As amostras foram diluídas em solução de cloreto de lítio 50 mM, na proporção 10:1 (v:v). Após agitação manual, 1 µL dessa solução foi misturada com 2 µL da matriz 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) ⁴² e aplicadas em placa microScout Target de 96 spots (Bruker). As análises foram realizadas no equipamento Maldi-TOF MicroFlex LT (Bruker) com feixe de laser na intensidade entre 80-90% e o range de 800 a 2200 m/z.

5.1.8 Testes de sinergismo

Foram realizadas reações em tampão 50 mM acetato de amônia pH 5.0, PASC 0.2% como substrato, Endoglucanase *Trichoderma harzianum* na concentração de 100 µg/g de substrato, 1 mg/g de substrato de LpmoF. As reações foram realizadas em triplicata a 52°C, 18 h e 1500 RPM, de acordo com a Tabela 11. A taxa de sinergismo encontrada foi calculada com base na Equação 1. Nas reações temos B1 como controle sem enzima oxidativa e sem doador de elétron, B2 como controle de endoglucanase e doador de elétrons, B3 controle sem endoglucanase, B4 como controle sem doador e B5 como controle sem ambas as enzimas e sem doador.

Tabela 11 - Reações realizadas para análise do sinergismo

	Reação	B1	B2	B3	B4	B5
Endo	2,5 µL	2,5 µL	-	-	2,5 µL	-
Lpmof	10 µL	-	10 µL	10 µL	10 µL	-
PASC	71 µL	71 µL	71 µL	71 µL	71 µL	71 µL
Tampão	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Ác. Asc.	2,5 µL	-	-	2,5 µL	-	-
H₂O	390,25 µL	402,75 µL	394 µL	391,5 µL	392,75 µL	404 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Expressão e purificação

Após todos os passos com precipitação com sulfato de amônio, a pureza das amostras foi verificada por gel SDS-PAGE 15% antes de prosseguir com os passos para a sua total purificação. O gel pode ser observado na Figura 26. Observa-se maior presença da proteína no poço 6, onde encontra-se a fração precipitada com 70 % de sulfato de amônio e concentrada antes de ser aplicada no AKTA, com o qual foi utilizado para dar continuidade ao processo de purificação.

Figura 26 - Gel SDS-Page das frações da precipitação com sulfato de amônio para purificação da proteína LpmoF. Na esquerda os respectivos pesos moleculares, em kDa.

Fonte: Elaborada pela autora.

O refinamento da purificação foi realizado por exclusão molecular em coluna Superdex 75. O cromatograma obtido dessa purificação pode ser observado na Figura 27.

Figura 27 - Cromatograma referente à purificação da LpmoF

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir do cromatograma obtido pela purificação no AKTA foi realizado outro Gel SDS-PAGE para verificar qual era o volume de eluição pertencente à proteína de interesse. Esse gel pode ser observado na Figura 28.

Figura 28 - Gel SDS-Page com as eluições da purificação da proteína LpmoF

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a proteína está presente no poço 3 referente a eluição de 76 a 90 mL. Enquanto nos outros poços (1,2 e 4) referente aos outros picos e eluições do cromatograma não referem-se a proteína de interesse.

5.2.2 Testes com diferentes substratos

Com relação ao PASC, pode-se notar que somente ocorre atividade oxidativa na presença do doador ácido ascórbico onde os picos oxidados (depois 12 minutos) aparecem (Figura 29). Na análise do xilano como substrato observa-se que a enzima estudada também apresenta atividade com a presença do doador de elétron, ácido ascórbico, como mostra a Figura 30

Figura 29 - Análise do Cromatograma HPAEC referente à atividade da Lpmo sobre PASC.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 30 - Cromatograma HPAEC referente à análise de Xilano como substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com relação aos demais substratos (Sigma-Cell, Xilohexaose e Celohexaose) a enzima LpmpF não apresentou atividade oxidativa detectada. Já com relação ao arabinoxilano observa-se que houve atividade oxidativa e algumas mudanças no cromatograma entre as amostras, como a formação dos picos oxidados entre os tempos de 16 e 20 minutos pode ser observado na Figura 31.

Figura 31 - Cromatograma HPAEC referente à análise de arabinoxilano como substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3 Teste de doadores de elétrons

Além do ácido ascórbico utilizado como doador de elétrons nos testes iniciais, foram realizadas análises com diferentes doadores de elétrons como pirogallol, devido a sua semelhança com o ácido ascórbico e com a enzima CDH. Com relação ao pirogallol foi encontrada atividade oxidativa indicando que ele funciona bem como doador de elétron, como mostra a Figura 32. Com relação ao teste com CDH também houve a presença de atividade oxidativa porém baixa, indicando que ele não atua como um bom doador de elétrons, como mostra a Figura 33. Logo, para análises futuras o doador de elétrons a ser utilizado é o pirogallol.

Figura 32 - Cromatograma HPAEC da análise de doadores de elétron utilizando pirogalol utilizando PASC como substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 - Cromatograma HPAEC da análise de doadores de elétron utilizando CDH.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5 Análise por espectrometria de Massas (Maldi-TOF)

Para alguns dos substratos nos quais a enzima oxidativa LpmoF apresentou atividade (Arabinoxilano, Xilano) foram realizadas análise de espectrometria de massas para comprovação do resultado, através da detecção e identificação da molécula de interesse pela medição das massas encontradas e das características da estrutura nos produtos de cada uma das reações realizadas.

Na Figura 34 são apresentados os resultados referentes ao Arabinoxilano onde temos a atividade referente à uma reação contendo a enzima LpmoF, o doador de elétrons e o substrato. Nota-se que quando há a presença do doador de elétrons juntamente com a enzima há a formação de um pico duplo com uma diferença entre eles de massa de 15 ± 2 indicando a ocorrência da oxidação. Observa-se também que a distância entre os picos é de 131 ± 2 indicando a diferença de massa de uma xilose/arabinose, mostrando que está ocorrendo à hidrólise do arabinoxilano.

Na Figura 35 temos os resultados referentes à análise de massas do substrato Xilano, na presença do doador de elétron e da enzima. Observa-se que a oxidação do xilano ocorre na presença do doador de elétron juntamente com a LpmoF como indica a diferença de massas de 15 ± 2 entre os picos duplo formados. Há também a comprovação da hidrólise do xilano devido a diferença entre os picos de 131 ± 2 referente à massa de uma xilose. Observa-se também que há um pico intermediário entre o resultante da hidrólise e o oxidado com uma diferença de massa de 5 ± 2 referente ao lítio que foi utilizado na preparação da amostra.

Através desses resultados de espectrometria de massas comprova-se a atividade oxidativa da enzima de *M. thermophila* LpmoF sob os substratos, Xilano e Arabinoxilano. Nota-se também que ela ocorre na presença do doador de elétron para realizar a oxidação.

Figura 34 - Espectro de massas referente à análise do Arabinoxilano como substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 35 - Espectro de massas referente à análise do Xilano como substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.6 Testes de sinergismo

Para análise de sinergismo entre a LpmoF e a endoglucanase foram realizadas análises por liberação de açúcar redutor medido por DNS e por análise de produto formado por HPAEC. A interação sinérgica entre essas duas enzimas seria interessante, pois nela a endoglucanase seria responsável pela degradação da região amorfa e as Lpmo pela ação nas regiões cristalina. As reações para análise de sinergismo foram feitas em tampão 50 mM acetato de amônia pH 5.0, PASC 0.2%, Endoglucanase 100 µg/g de substrato, 1 mg/g de LpmoF foram realizadas em triplicata a 52°C, 17 h e 1500 RPM, e reveladas por DNS. A taxa de açúcar redutor liberado em cada uma das amostras pode ser observado na Figura 36.

Figura 36 - Análise da quantidade de açúcar redutor formado em g/L nas reações para análise do sinergismo entre LpmoF e Endoglucanase. B1 como controle sem enzima oxidativa e sem doador de elétron, B2 como controle de endoglucanase e doador de elétrons, B3 controle sem endoglucanase, B4 como controle sem doador e B5 como controle sem ambas as enzimas e sem doador.

Fonte: Elaborada pela autora.

O cálculo do sinergismo foi realizado através dos valores obtidos pelas reações com DNS e da equação 1, onde o resultado obtido foi de 1,1576 para a reação com LpmoF e a endoglucanase indicando um sinergismo com

aproximadamente 15,76 % de aumento no açúcar redutor liberado, bem próximo ao encontrado na literatura o qual foi em torno de 16 %.¹³

A partir desse resultado foi realizada uma análise dos produtos formados a partir de técnica de HPAEC. Nesse resultado foi possível observar que há aumento do produto hidrolítico, como já observado por experimentos anteriores, e também que ocorre a oxidação do substrato PASC comprovado pela liberação de produtos oxidados, como pode ser observado na Figura 37, comprovando a ação sinérgica entre as enzimas.

Figura 37 - Cromatograma HPAEC referente à análise de sinergismo entre a *LpmoF* e Endoglucanase.

Fonte: Elaborada pela autora.

Conclusão

A enzima oxidativa LpmoF de *Myceliophthora thermophila* apresenta atividade oxidativa sobre 3 dos substratos testados, PASC, Xilano e Arabinoxilano. Como doadores de elétrons foram identificados dois que apresentam uma ótima função que é o caso do ácido ascórbico e do ácido pirogálico como já citado na literatura²⁰. Quando adicionada juntamente com uma endoglucanase utilizando PASC como substrato ocorre uma interação sinérgica entre essas duas enzimas aumentando não só o produto oxidado da reação, mas também o hidrolítico liberando uma taxa de açúcar redutor quase 16 % a mais do que da reação da endoglucanase sozinha.

Capítulo 6

Ana Elisa Tognoli Leite
IFSC - USP

Capítulo 6

Conclusões Gerais e perspectivas futuras

A partir do isolamento de microrganismos encontrados em um sistema de compostagem é possível identificar um responsável pela expressão de enzimas oxidativas. O fato do fungo isolado e identificado ser patogênico impediu de se tentar realizar a otimização da degradação de biopolímeros. Através da expressão heteróloga de uma enzima auxiliar da família GH43, BIAbn1, foi encontrado em diferentes condições ação sinérgica dessa arabinanase e do coquetel enzimático Accellerase, atingindo em sua melhor condição um aumento na taxa de açúcar redutor liberado de 30%. Sendo assim possível de melhorar a ação desses coquetéis já existentes no mercado, tornando assim mais favorável a produção de bioetanol através da biomassa vegetal. Observa-se também a existência de sinergismo entre enzimas oxidativas Lpmos e endoglucanases, onde a adição dessas enzimas melhora em 15 % a liberação de açúcar pela endoglucanase. A LpmoF apresenta atividade em diferentes substratos como PASC, Arabinoxilano e Xilano e que para essa atividade são necessários de doadores de elétrons para realizarem a oxidação do substrato, esses doadores podem ser ácido ascórbico, pirogalol ou CDH.

Pretende-se agora realizar estudos mais profundos com essas enzimas oxidativas assim como sua interação com o substrato, analisando sua composição físico-química e morfologia, a fim de identificar como essa enzima atua a nível molecular em diferentes substratos, principalmente biomassa lignocelulósica. Essas análises serão realizadas por meio de diferentes técnicas físicas como microscopias. Além de novas tentativas de cristalização.

Com relação a BIAbn1 da família GH43, já há um manuscrito sendo escrito para uma futura publicação e estamos a realizar uma nova caracterização dessa enzima como uma celulase, devido a sua atividade sobre papel filtro, analisando a

sua atividade específica, perfil de liberação de produtos, entre outros. Para obtermos resultados melhores e mais precisos para uma melhor publicação.

Referências

- 1 ANDREWS, R. **Emissions reductions and world energy demand growth.** Disponível em: <<http://euanmearns.com/emissions-reductions-and-world-energy-demand-growth/>> Acesso em: 11 Jan. 2017.
- 2 PANWAR, N. L.; KAUSHIK, S. C.; KOTHARI, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 3, p.1513-1524, Apr. 2011. doi.org/10.1016/j.rser.2010.11.037.
- 3 DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p.1-8, Sept. 2012. doi.org/10.5936/csbj.201209015.
- 4 SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 2003. doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x.
- 5 SUN, N. et al. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? **Chemical Communications**, v. 47, n. 5, p.1405-1421, Feb. 2011. doi.org/10.1039/c0cc03990j.
- 6 BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal 2000.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam.shtm>>. Acesso em: 05 maio 2017.
- 7 SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 5, n. 35, p.1004-1010, jan. 2012.
- 8 LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 490-495, Nov. 2013. doi.org/10.1093/nar/gkt1178.
- 9 CAZy. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 05 ago. 2016.
- 10 MEWIS, K. et al. Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1686-1692, Jan. 2016. doi.org/10.1128/aem.03453-15.
- 11 DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1-8, Sept. 2012. doi.org/10.5936/csbj.201209015.
- 12 MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-556, May 2002.

13 FROMMHAGEN, M. et al. Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-12, July 2015. doi.org/10.1186/s13068-015-0284-1.

14 CANNELLA, D. et al. Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-8, Apr. 2016. doi.org/10.1038/ncomms11134.

15 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.

16 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.

17 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, n. 1, p. 387-397, 2005.

18 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

19 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, 2007.

20 WESTERENG, B. et al. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-9, Dec. 2015. doi.org/10.1038/srep18561.

21 VU, van V. et al. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 2, p. 562-565, Jan. 2014. doi.org/10.1021/ja409384b.

22 HEMSWORTH, G. R. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 747-761, Dec. 2015. doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.006.

23 MONCLARO, A. V.; FERREIRA FILHO, E. X. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: recent developments and application in lignocellulose breakdown. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 771-778, Sept. 2017. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.077.

- 24 KITTL, R. et al. Production of four neurospora crassa lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 79-92, 2012. doi.org/10.1186/1754-6834-5-79.
- 25 KARNAOURI, A. et al. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-22, June 2014. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00281.
- 26 SALVADOR, V. H. et al. Suplementação de coquetéis enzimáticos aplicados na sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 7., 2013, Maringá. **Anais** Maringá: Cesumar, 2103. p. 1-5.
- 27 DUPONT. ACCELLERASE® 1500. Disponível em: <http://accelerasedupont.com/fileadmin/user_upload/live/accelerasedupont.com/documents/DUP-00413_ProdSheet_1500_web.pdf>. Acesso em: 08 maio 2016.
- 28 WOOD, T. M.; MCCRAE, S. T. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. **Advances in Chemistry Series** v. 181, n. 10, p. 181-209, 1979.
- 29 VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p.1458-1480, Nov. 2012. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002.
- 30 JEOH, T.; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 270-277, Fev. 2006. doi.org/10.1021/bp050266f.
- 31 ANDERSEN, N. et al. Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on avicel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 4, p. 362-370, March 2008. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.018.
- 32 JUNG, H. et al. Effect of sodium hydroxide treatment of bacterial cellulose on cellulase activity. **Cellulose**, v. 15, n. 3, p. 465-471, 26 Oct. 2007. doi.org/10.1007/s10570-007-9190-4.
- 33 DOI, R. H. Cellulases of Mesophilic Microorganisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 267-279, Mar. 2008. doi.org/10.1196/annals.1419.002.
- 34 MACHADO, C. B. et al. Increased biomass saccharification by supplementation of a commercial enzyme cocktail with endo-arabinanase from *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 7, p.1455-1462, Mar. 2015. doi.org/10.1007/s10529-015-1818-0.

- 35 HUY, N. D. et al. Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from *Phanerochaete chrysosporium* and its synergistic action with endo-xylanase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 6, p. 677-685, Jan. 2013. doi.org/10.1007/s00449-013-0891-9.
- 36 HU, J. et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 7, p. 2308-2315, 2014. doi.org/10.1039/c4ee00891j.
- 37 KIM, I. J.; YOUN, H. J.; KIM, K. H. Synergism of an auxiliary activity 9 (AA9) from *Chaetomium globosum* with xylanase on the hydrolysis of xylan and lignocellulose. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1445-1451, Oct. 2016. doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.017.
- 38 MATEO, N.; NADER, W.; TAMAYO, G. **Encyclopedia of biodiversity: bioprospecting**. Costa Rica: Academic Press, 2001.
- 39 AMANN, R. I. et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1919-1925, June 1990.
- 40 OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **Revista MultiCiencia: construindo a história dos recursos naturais**, n. 7, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_08_7.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- 41 CORTEZ, K. J. et al. Infections caused by *scedosporium* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p.157-197, Jan. 2008. doi.org/10.1128/cmr.00039-07.
- 42 WESTERENG, B. et al. Analyzing activities of lytic polysaccharide monooxygenases by liquid chromatography and mass spectrometry. **Methods in Molecular Biology**, p. 71-92, 2017. doi.org/10.1007/978-1-4939-6899-2_7.
- 43 FROMMHAGEN, M. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1-17, Aug. 2016. doi.org/10.1186/s13068-016-0594-y.
- 44 FRANDSEN, K. H. et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 298-303, Feb. 2016. doi.org/10.1038/nchembio.2029.
- 45 VILLARES, A. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40262-40271, Jan. 2017. doi:10.1038/srep40262.

- 46 PARK, Sunkyu et al. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state ^{13}C nuclear magnetic resonance. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p.641-647, 17 June 2009. doi.org/10.1007/s10570-009-9321-1
- 47 BROWNSTEIN, K. R.; TARR, C. E. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. **Physical Review A**, v. 19, n. 6, p.2446-2453, June 1979. doi.org/10.1103/physreva.19.2446
- 48 ZHANG, C. et al. Hierarchical porous structures in cellulose: NMR relaxometry approach. **Polymer**, v. 98, p. 237-243, Aug. 2016. doi.org/10.1016/j.polymer.2016.06.036.
- 49 CHEN, C. A. et al. Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribossomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. **Zoological Studies**. v. 43, p. 759-771, 2004.
- 50 FARRO, E. G. S. **Caracterização estrutural e bioquímica das 101Arabinanase de Bacillus licheniformis**. 2016. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016
- 51 OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010. doi.org/10.1590/s0100-40422010000700023
- 52 ISOLAMENTO de microrganismos. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAXDUAH/isolamentomicrorganismos>>. Acesso em 11 jun. 2017.
- 53 CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). **Protein Expression and Purification**, v. 99, p.35-42, July 2014. doi.org/10.1016/j.pep.2014.03.008.
- 54 BIOCHIMIE des protéines. Disponível em <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html>. Acesso em 20 fev. 2017.