UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DANILO ELTON EVANGELISTA

Estudos funcionais e estruturais de pectinases e xilanases com
potencial para aplicações biotecnológicas.

São Carlos
2017

DANILO ELTON EVANGELISTA

Estudos funcionais e estruturais de pectinases e xilanases com
potencial para aplicações biotecnológicas.

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física 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)

Evangelista, Danilo Elton

Estudos funcionais e estruturais de pectinases e xilanases com potencial para aplicações biotecnológicas / Danilo Elton Evangelista; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2017.
155 p.

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

1. Despolimerização da biomassa vegetal. 2. Pectinases e Xilanases. 3. Caracterização enzimática. 4. . SAXS. 5. Cristalografia de proteínas. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

Dedico essa Tese aos meus Pais Almerindo e Maria, os quais sempre me apoiaram, me aconselharam e me orientaram, tornando possível toda minha travessia pessoal e profissional até aqui.

ANTI-DEDICATÓRIA

Anti-dedico essa Tese à parcela majoritária dos políticos brasileiros, aos atuais e aos seus predecessores. Anti-dedico a todo esse exército que aparenta lutar com tanto empenho, dedicação e eficiência em prol do completo assolamento da educação, ciência e dos avanços tecnológicos da nossa tão distante “Pátria Educadora”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pela trajetória que me designou, preenchida com uma família maravilhosa e verdadeiros amigos.

À minha família pela ótima criação e educação que me deram, além do constante apoio em minhas decisões, sendo, portanto, meus primeiros orientadores e os grandes responsáveis pelo meu desenvolvimento pessoal e profissional alcançados até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Igor Polikarpov, o qual me concedeu uma das maiores oportunidades da minha vida profissional ao me receber em seu grupo de pesquisa. Agradeço também, pelos valiosos ensinamentos, pela orientação e amizade em mim depositados durante esses quatro anos.

À toda equipe técnica que compõe nosso grupo de pesquisa, os quais atuam com extrema competência e disposição, permitindo que os projetos de pesquisa fluam com qualidade e rapidez. Agradeço, portanto, aos integrantes da equipe técnica: Livia Manzine, Josimar Sartori, João Possato e Maria dos Santos.

Aos Professores e funcionários do IFSC, responsáveis pela manutenção da alta qualidade do programa de pós-graduação em Física Aplicada.

À CAPES pelo suporte financeiro através da bolsa de doutorado que me foi concedida ao longo de quatro anos.

Ao Dr. Andre Schutzer de Godoy, pelo trabalho em colaboração com os dados cristalográficos da proteína SI-PME.

Ao colega de equipe, Dr. Marco Antonio Seiki Kadowaki, pelo trabalho em colaboração com os dados de cristalografia e SAXS das proteínas SI-PME, MT-Xyn10 e MT-Xyn11a. Também pelas inúmeras vezes em que me auxiliou na análise e interpretação de dados.

Ao Prof. Dr. Mario Oliveira Neto e ao Dr. Robert Rambo, pela coleta de dados de SAXS realizadas para a proteína BI-ExoPG, na linha B21 do Instituto de Pesquisa Diamond Light Source Synchrotron (Diot, Reino Unido).

Ao colega de equipe, aluno de Doutorado Evandro Ares de Araújo pelo trabalho em colaboração com os dados de SAXS da proteína BI-ExoPG.

Ao Dr. Paul Dupree do Dep. Bioquímica na Universidade de Cambridge, pela ajuda na interpretação dos dados de HPAEC da enzima MT-Xyn10.

Aos atuais e ex integrantes do Grupo Biotecnologia Molecular, com os quais tive o privilégio de conviver por algum tempo: Aline, Amanda, Ana, André, Atílio, Bruno, Caio,

César, Evandro, Gabi, Grazi, Hévila, Lorenzo, Marco, Marina, Melissa, Paula, Paulo, Renata, Segato, Simara, Vanessa e Vassily. Agradeço por todos os momentos que passamos dentro e fora do laboratório, pelo apoio, sugestões, bate-papos acadêmicos e não-acadêmicos. Agradeço em especial aos amigos Aline, Evandro e Lorenzo pelas frequentes conversas “tontas”, gerando muitas risadas e, assim, contribuindo para um ambiente de trabalho mais descontraído e agradável.

Aos amigos de São Carlos, que tornaram minha longa estadia nessa cidade muito mais agradável. Dentre eles, agradeço aos integrantes da Rep. Auto Posto pelas inúmeras boas lembranças e aos “Carpineiros de Terreno”, o provável grupo de futebol menos promissor possível. Em especial, agradeço aos grandes amigos Darlan, Marcelinho, Mega, Cleston, Juan, Gabriel, Brunão, Belém, Zunto, Pedezzi, Dressa, Priscila e Nhalijá.

Por fim, porém mais importante, agradeço à minha companheira Letícia, pelo apoio, amor e carinho ao longo desses anos todos. Agradeço pela paciência e compreensão que manteve durante os inúmeros finais de semana de experimentos intermináveis no laboratório; agradeço também, pelas viagens maravilhosas que fizemos juntos.

"O essencial é invisível aos olhos."
Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

EVANGELISTA, D. E. **Estudos funcionais e estruturais de pectinases e xilanases com potencial para aplicações biotecnológicas.** 2017. 155p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

O uso desenfreado dos recursos naturais durante as últimas décadas têm impactado drasticamente o meio ambiente, direcionando a humanidade a investir no desenvolvimento de tecnologias para produção sustentável e ecológica de novas fontes de energia renovável e de produtos verdes. Nesse âmbito, o uso de resíduos derivados da biomassa vegetal tem sido apresentado como uma promissora alternativa à substituição de combustíveis, componentes químicos e polímeros de origem fóssil. Esse material é barato, abundante e não compete direta ou indiretamente com a segurança alimentar. Hoje, mais de 200 compostos químicos e biopolímeros de valor agregado podem ser obtidos a partir do processamento de material lignocelulósico. Todavia, essa tecnologia ainda não é plenamente desenvolvida, afetando sua competitividade econômica, sendo que o maior custo atribui-se à despolimerização enzimática dos polissacarídeos que formam a parede celular vegetal (PCV). Essa etapa requer preparados enzimáticos compostos por diversas enzimas, que agem sinergicamente sobre a complexa estrutura da PCV. Dentre essas enzimas, as pectinases e xilanases desempenham um importante papel na desconstrução dos polímeros pécicos e da hemicelulose. O presente trabalho objetivou o estudo funcional e estrutural de diferentes classes de pectinases e xilanases com potencial biotecnológico, no intuito de contribuir para o desenvolvimento pleno da despolimerização enzimática da PCV. Dentro dessa perspectiva, foram estudadas: uma pectina metilesterase (SI-PME) e uma endo-poligalacturonase (SI-EndoPG) do inseto *Sphenophorus levis*; uma exo-poligalacturonase (BI-ExoPG) de *Bacillus licheniformis*; uma xilanase GH10 (MT-Xyn10) e duas GH11 (MT-Xyn11a e MT-Xyn11b) identificadas no metatranscriptoma de um consórcio microbiótico derivado de compostagem de bagaço de cana-de-açúcar. A estrutura cristalográfica da SI-PME evidenciou alta semelhança com outra PME de inseto. Também foi concluído que as PMEs de inseto são mais similares às bacterianas, quando comparadas às fúngicas e vegetais, principalmente em relação ao sulco catalítico. Além disso, PMEs de inseto, exclusivamente, apresentam uma permutação circular, possivelmente realcionada a um evento de transferência horizontal. A BI-ExoPG apresentou-se monomérica em solução, com atividade ótima em pH neutro a 60 °C, sendo estável em uma ampla faixa de pH (5-10) e com considerável termoestabilidade em elevadas temperaturas. Essa enzima, também, apresentou especificidade por pectina não-metilada, liberando

unicamente monômeros de ácido galacturônico. As três xilanases estudadas apresentaram-se monoméricas em solução, com maior atividade entre 30 e 45 °C e pHs de 6 a 9, restando atividade acima de 50% nos pHs 5 e 10. Além disso, todas elas apresentam especificidade por xilano, sendo que a MT-Xyn10 apresentou, também, alta atividade sobre arabinoxilano. A MT-Xyn10 apresentou um conjunto de propriedades enzimáticas bastante atrativas às aplicações industriais, uma vez que é altamente estável em uma ampla faixa de pH (4-10), termoestável em temperaturas de até 50 °C e sua ação catalítica produz diversos xilo-oligossacarídeos de alto valor agregado. A análise da estrutura cristalográfica da MT-Xyn11a revela três particularidades estruturais, compartilhadas com a MT-Xyn11b, mas não descritas para outras GH11. Dentre essas particularidades, um *loop* parece limitar o acesso do substrato ao sítio catalítico, contribuindo diretamente para a baixa afinidade ao substrato apresentada por essas duas enzimas.

Palavras-chave: Despolimerização da biomassa vegetal. Pectinases e Xilanases. Caracterização enzimática. SAXS. Cristalografia de proteínas.

ABSTRACT

EVANGELISTA, D. E. **Functional and structural studies of pectinases and xylanases with potential for biotechnological applications.** 2017. 155p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Decades of unbridled use of natural resources have drastically affected the global environment, driving humanity to invest in the development of novel technologies for production of sustainable and ecofriendly renewable energy sources and green products. In this context, plant biomass residues have been presented as a promising alternative to fuels, chemicals and polymers derived from fossil reserves. This feedstock is abundant, cheap and does not compete directly or indirectly with food security. Today, more than 200 value-added chemicals and biopolymers can be generated by processing lignocellulosic material. However, this technology is not fully developed yet; its major costs stem from the enzymatic depolymerization of the polysaccharides that constitute the plant cell wall (PCW). This step requires enzymatic cocktails composed of several enzymes that synergistically deconstruct the complex PCW. Among these enzymes, pectinases and xylanases play an important role in the depolymerization of pectic polymers and hemicellulose. The present work is a functional and structural study of different classes of pectinase and xylanases with biotechnological potential. It intends to contribute to the full development of PCW enzymatic depolymerization. With this perspective, we studied a pectin methylesterase (Sl-PME) and an endo-polygalacturonase (Sl-EndoPG) from the insect *Sphenophorus levis*; an exo-polygalacturonase (Bl-ExoPG) from *Bacillus licheniformis*; a GH10 xylanase (MT-Xyn10); and two GH11 xylanases (MT-Xyn11a and MT-Xyn11b) from the metatranscriptome of sugarcane bagasse compost-derived microbial consortia. The Sl-PME crystallographic structure showed high similarity with other insect PME. It was also concluded that insect PMEs are more similar to bacterial PMEs than fungi or plant PMEs, especially in relation to the catalytic groove. Moreover, insect PMEs exclusively presented a circular permutation that is possibly related to an event of horizontal gene transfer. Bl-ExoPG is monomeric in solution, with optimal activity on neutral pH and 60 °C, being stable in a wide pH range (5-10) and with considerable thermostability at high temperatures. This enzyme, also presented specificity for non-methylated pectin substrates, releasing only monomers of galacturonic acid as catalytic product. All three xylanases studied here are monomeric in solution, with optimal activity between 30 °C and 45 °C and between pHs 6 and

9, retaining more than 50% of original activity in the pHs 5 and 10. Besides, they all showed specificity for xylan, and MT-Xyn10 also showed high activity on arabinoxylan. MT-Xyn10 revealed a set of enzymatic properties attractive for industrial applications, such as high stability in a wide pH range (4-10), thermostability up to 50 °C and released products that are high value-added xilo-oligosaccharides. The MT-Xyn11a crystallographic structure revealed three structural particularities shared with MT-Xyn11b, but not previously described in other GH11. Among these particularities, a loop seems to limit the substrate access to the catalytic site, contributing to the low enzyme affinity presented by both MT-Xyn11a and MT-Xyn11b.

Keywords: Plant biomass depolymerization. Pectinases and Xylanases. Enzymatic characterization. SAXS. Protein X-ray crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parede celular vegetal. A figura destaca as estruturas que compõe a PCV, classificadas de acordo com o posicionamento dessas em relação a membrana plasmática e a composição dessas estruturas.	34
Figura 2 - Parede celular vegetal e seus principais componentes. A figura mostra a distribuição e arranjo dos principais constituintes da parede celular: celulose, hemicelulose, lignina e pectina.	34
Figura 3 - Cadeia principal do polímero pectico. O esqueleto da cadeia é constituído de inúmeros monômeros de α -ácido galacturônico parcialmente esterificadas por grupos metil.	35
Figura 4 - Pectina. A Figura esquematiza a estrutura e composição da pectina destacando as diferentes regiões ao longo da cadeia principal de ácido galacturônico.....	35
Figura 5 - Estrutura da celulose. Um conjunto de longas cadeias de celulose agrupam-se por ligações de hidrógeno formando microfibras, as quais se agrupam, também por ligações de hidrógeno, formando fibras maiores que constituem a PCV (A). Ao longo das microfibras de celulose existem regiões organizadas (cristalinas), que são mais resistentes à hidrólise enzimática; e existem regiões “desorganizadas” (amorfas) mais susceptíveis a hidrólise (B).	37
Figura 6 - Estrutura dos diferentes tipos de heteroxilanos. (A) O-Acetil-4-O-metilglucuronoxilano de vegetais de “madeira dura”. (B) Arabino-4-O-metilglucuronoxilano de vegetais de “madeira mole”. (C) Arabinoxilano de cereais.	39
Figura 7 - Monolignóis. As três unidades que predominantemente formam a lignina são derivadas do fenilpropano.....	40
Figura 8 - Módulos estruturais da lignina presente nos vegetais de “madeira mole”. A figura mostra os diferentes tipos de ligações possíveis entre as unidades de monolignóis.	40
Figura 9 - Ação de diferentes pectinases sobre as substâncias pecticas. As PPases-A e B agem sobre a protopectina dissociando-a dos demais componentes da parede celular convertendo-a em pectina solúvel. A PME remove os grupamentos metil, aumentando a afinidade das despolimerases pela cadeia. PG e PL rompem as ligações glicosídicas gerando monômeros de açúcar saturados e insaturados, respectivamente.	43
Figura 10 - Purificação SI-Pectinases. As enzimas foram purificadas a partir do sobrenadante através de cromatografia de afinidade por Ni^{+2} e por exclusão molecular. Os SDS-PAGEs mostram a pureza das amostras	57
Figura 11 - Sequencias de aminoácidos preditas para SI-PME e SI-EndoPG. A SI-PME tem uma cadeia polipeptídica de 386 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 16 resíduos e dois sítios de glicosilação, correspondente a uma proteína de 40 kDa. A SI-EndoPG tem uma cadeia polipeptídica de 364 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 19 resíduos e quatro sítios de glicosilação, correspondente a uma proteína de 36 kDa. As sequencias em negrito correspondem aos peptídeos sinais e as sublinhadas correspondem aos sítios de glicosilação.	58
Figura 12 - Massa molecular da SI-PME. Durante purificação por gel filtração, foi calculado a massa molecular da proteína SI-PME (51 kDa), através de uma curva padrão contendo as proteínas de massas conhecidas: Ferritina, Aldolase, Conalbumina e Ovalbumina.	58
Figura 13 - pH-estabilidade da SI-PME. A termoestabilidade da estrutura terciária da SI-PME foi avaliada entre os pH de 2 a 10 em tampão ABF, pelo método de ThermoFluor. A estrutura molecular apresentou considerável estabilidade entre os pH 3-10 com ápice entre os pH 5 e 6.	61

- Figura 14 - Cristais de proteína das SI-Pectinases. Os cristais de SI-PME mostrados na figura cresceram em 10 dias na condição 25% (p/v) de PEG 3.350, 0,1 M de ácido cítrico, pH 3,5; os cristais de SI-EndoPG cresceram em 140 dias na condição 2,8 M de acetato de sódio trihidratado pH 7,0. 61
- Figura 15 - Estrutura cristalográfica da SI-PME. (A) A estrutura é visualizada em quatro posições diferentes ao longo de um eixo vertical; as estruturas secundárias foram diferenciadas em azul para α -hélices, vermelho para folhas- β e roxo para *loops*; as extremidades N e C-terminais são indicadas por setas. (B) e (C) mostram diferentes ângulos de visualização do sulco catalítico, onde a estrutura da SI-PME (em dourado) foi alinhada à molécula de hexasacarídeo V (em vermelho), a qual foi cristalizada juntamente com a PME de *D. dadantii* (pdb 2NTQ). 64
- Figura 16 - Alinhamento estrutural das PMEs de diferentes reinos. A estrutura tridimensional da SI-PME (dourado) foi alinhada às PMEs reportadas para os reinos animal (azul), vegetal (verde), monera (violeta) e fungi (vermelho). Foram usadas as estruturas: (A) *S. oryzae* (pdb 4PMH), (B) *E. coli* (pdb 3GRH), (C) *Erwinia chrysanthemi* (pdb 1QJV), (D) *Yersinia enterocolitica* (pdb 3UW0), (E) *Aspergillus niger* (pdb 5C1C), (F) *Daucus carota* (pdb 1GQ8) e (G) *Solanum lycopersicum* (pdb 1XG2). A SI-PME mostra uma sobreposição estrutural quase perfeita com a estrutura de *S. oryzae*. 66
- Figura 17 - Diferença entre os sulcos-catalítico das PMEs dos diferentes reinos. A figura mostra a semelhança do sulco catalítico das PMEs de inseto com as de bactéria, quando comparado com os sulcos-catalítico de fungos e plantas. Estruturas cristalográficas representativas das PMEs descritas para insetos, bactérias, fungos e plantas foram alinhadas à molécula de hexasacarídeo V (em amarelo), a qual foi cristalizada juntamente com a PME de *D. dadantii* (pdb 2NTQ). (A) SI-PME; (B) *E. chrysanthemi* (pdb 1QJV); (C) *A. niger* (pdb 5C1C); (D) *D. carota* (pdb 1GQ8). 67
- Figura 18 - Permutação circular entre as PMEs de inseto e as PMEs dos demais reinos. A figura A, elaborada por Teller e colaboradores⁷⁵, ilustra a permutação circular entre as PMEs de inseto (esquerda) e as demais PMEs (direita). A figura B elaborada por Bliven e colaboradores⁷⁹ ilustra de forma didática um evento de permutação entre um par de proteínas. 68
- Figura 19. Dados de SAXS da SI-PME. Perfil experimental de espalhamento foi comparado com o perfil calculado do envelope molecular da SI-PME e de modelos homólogos (A). A análise de Guinier na região linear mostra que os dados satisfazem a condição $q < 1.3/R_g$. (A, imagem inserida). A função $P(r)$ (B). 69
- Figura 20 - Modelo à baixa resolução da SI-PME. O envelope molecular da SI-PME (em cinza-transparente) obtido através dos experimentos de SAXS foi sobreposto com o modelo estrutural cristalográfico da SI-PME (em dourado). 69
- Figura 21 - Estrutura molecular obtida para os cristais da SI-EndoPG. A estrutura cristalográfica construída a partir dos cristais da SI-EndoPG (azul), quando comparada à PG de *C. lupini* (pdb: 2IQ7), revela que apenas parte da molécula da SI-EndoPG foi de fato cristalizada. 72
- Figura 22 - Degradação da SI-EndoPG. A proteína SI-EndoPG foi avaliada quanto a degradação por peptidases. O SDS-PAGE mostra a diferença entre amostra tratada com 10 mM de coquetel inibidor de proteases (+) e da amostra não tratada (-), após 5 dias à 18 °C. 73
- Figura 23 - Sequência de aminoácidos predita para BI-ExoPG. A sequência polipeptídica de 436 aminoácidos corresponde a uma proteína com ponto isoelétrico de 6,1 e massa molecular de 48 kDa. 85
- Figura 24 - Expressão, purificação e determinação da massa molecular da BI-ExoPG. A) O SDS-PAGE mostra os passos de purificação da BI-ExoPG; 1: total de proteínas solúveis; 2: BI-ExoPG fusionada com a cauda 6xHist-Trx (~ 65 kDa) após purificação por cromatografia por afinidade por Ni^{+2} ; 3: BI-ExoPG após remoção da cauda 6xHist-Trx por TEV protease; 4: BI-ExoPG (~50 kDa) após segunda purificação por cromatografia por afinidade por Ni^{+2} e por exclusão molecular. B) Perfil da cromatografia de exclusão molecular contendo os marcadores moleculares Ferritina (440 kDa), Aldolase (150 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Ovalbumina

- (44 kDa) sobrepondo o pico de eluição da BI-ExoPG. C) Curva de calibração experimental indicando massa molecular de aproximadamente 54 kDa para BI-ExoPG..... 86
- Figura 25 - Atividade enzimática da BI-ExoPG. A enzima tem maior atividade em pH 6,5 (A) e 60 °C (B), além disso a enzima mostrou boa estabilidade entre os pH 5 e 10 (C). Em ensaios de termoestabilidade sob temperatura ótima, BI-ExoPG mostrou meia vida de aproximadamente 6 h e completa inativação após 18 h; sob 50 °C, BI-ExoPG manteve 80% de sua atividade original após 15 h e mesmo após 24 h, a enzima mantinha atividade acima de 60%. 90
- Figura 26 - Parâmetros cinéticos da BI-ExoPG. Os parâmetros cinéticos V_{max} 4,18 $\mu\text{M/s}$, K_M 3,25 mg/mL e k_{cat} 2,58 s^{-1} da BI-ExoPG foram calculados ($R^2 = 0,94$) para o substrato Poli-AGal sob condições ótimas de atividade. 94
- Figura 27 - Padrão de clivagem da BI-ExoPG. A)TLC. M: marcador molecular contendo mono e tri-AGal; B: Branco (produto da reação de 3 h sem enzima); 0,5, 1,5 e 3,0: produto das reações de 0,5, 1,5 e 3,0 h contendo 2,2 μM de BI-ExoPG. As reações foram realizadas em ótimas condições de atividade enzimática. O produto de reação de 3 h (com e sem enzima) também foi avaliado por HPAEC-PAD (B). Os resultados consistentemente mostraram que enzima libera mono-AGal como único produto de reação..... 95
- Figura 28 - Cristais de proteína da BI-ExoPG. A proteína purificada foi submetida à triagem de condições para cristalização, através do método de difusão a vapor “sitting-drop”, utilizando o sistema automático robótico Honey Bee 961 Dispensing System e kits comerciais (Quiagen e Hampton) de cristalização de proteínas. A figura mostra as imagens em luz branca e UV dos cristais obtidos em três condições distintas do kit Pact Suite. 96
- Figura 29 - Dados de SAXS da BI-ExoPG. A) curvas de espalhamento experimental e teórica para BI-ExoPG. As intensidades experimentais (esferas) têm alta correspondência com a curva de espalhamento teórico (linha vermelha) calculada para o modelo à baixa resolução gerado. A figura inserida, à direita superior, mostra a forte correspondência entre a curva experimental e teórica na região de Guinier, usada no cálculo do Rg. B) Função P(r) determinada para espalhamento experimental (linha contínua) e para o modelo BI-ExoPG gerado (linha tracejada). C) Análise de Kratky indica perfil previsto para partículas globulares compactas. D) Análise de Porod-Debye dos dados de SAXS. 97
- Figura 30 - Modelo molecular à baixa resolução da BI-ExoPG. O envelope molecular da BI-ExoPG (em cinza-transparente) obtido através dos experimentos de SAXS foi sobreposto com o melhor modelo atômico obtido por homologia (N-terminal em azul e C-Terminal em vermelho). 99
- Figura 31 - Sequencia de aminoácidos predita para a MT-Xyn10. A proteína tem uma cadeia polipeptídica de 374 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 26 resíduos (em negrito), com ponto isoelétrico de 6,77 e massa molecular de 42 kDa. 111
- Figura 32 - Expressão e purificação da MT-Xyn10. A análise em SDS-PAGE avaliou o rendimento da produção e a integridade da proteína MT-Xyn10 após 12 h (0) e 24 h (1) de expressão. O experimento também mostra a pureza da amostra após segunda cromatografia de afinidade por Ni^{+2} (2) e por gel filtração (3). A seta indica a posição da proteína MT-Xyn10 em aproximadamente 40 kDa. 112
- Figura 33 - Atividade ótima e cinética enzimática da MT-Xyn10. MT-Xyn10 mostra maior atividade por volta de 40 °C e pH 7,0. Sob ótimas condições de atividade, a enzima mostrou os parâmetros cinéticos $V_{max} = 19,82 \mu\text{M/s}$, $K_M = 5,14 \text{ mg/mL}$ e $k_{cat} = 792,8 \text{ s}^{-1}$ para xilano ($R^2 = 0,98$); e $V_{max} = 9,16 \mu\text{M/s}$, $K_M = 1,96 \text{ mg/mL}$ e $k_{cat} = 366,4 \text{ s}^{-1}$ para arabinoxilano ($R^2 = 0,98$). 116
- Figura 34 - Estabilidade da MT-Xyn10. A estabilidade da MT-Xyn10 foi avaliada por Thermofluor (A) e por DNS medindo-se sua atividade residual (B). Ambos resultados demonstram que a enzima tem considerável estabilidade dos pHs 4 ao 10. Em pH 2 e 3, a enzima sofre desnaturação irreversível resultando na sua completa inativação. A termoestabilidade a 40 °C e 50 °C foi avaliada por DNS medindo-se sua atividade residual ao longo de 120 h (C). A enzima

apresenta alta estabilidade em su pH ótimo de atividade (40 °C), pois a atividade original permanece constante mesmo após 120 h. A 50 °C, a enzima tem meia vida de 24 h. 119

Figura 35 - Padrão de clivagem da MT-Xyn10. As reações foram conduzidas sob as condições ótimas de atividade e os produtos solúveis gerados foram analisados por HPAEC-PAD. Controle: de xilose até xilohexaose; A (arabinofuranose); M (ácido metilglucurônico). Para xilano, X_A: xilose; X_B: xilobiose; X_C: xiloteriose com um resíduo de 1,2- α -D-ácido metilglucurônico no terminal não-redutor. Para arabinoxilano, AX_A: xilose; AX_B: xilobiose; AX_C: xilobiose com um resíduo de 1,3- α -L-arabinofuranose no terminal não-redutor; AX_D: xilotriose com um resíduo de 1,3- α -L-arabinofuranose na unidade central de xilose. 122

Figura 36 - Cristais de proteína da MT-Xyn10. A proteína purificada foi submetida à triagem de condições para cristalização, através do método de difusão a vapor “sitting-drop”, utilizando o sistema automático robótico Honey Bee 961 Dispensing System e kits comerciais (Quiagen e Hampton) de cristalização de proteínas. A figura mostra os cristais obtidos na condição 0,1 M MES pH 6,5, contendo 20% (p/v) de PEG 10K, após 14 dias. 123

Figura 37 - Dados de SAXS da MT-Xyn10. Perfil experimental de espalhamento foi comparado com o perfil calculado do envelope molecular da MT-Xyn10 e de modelos homologos (A). A análise de Guinier na região linear mostra que os dados satisfazem a condição $q < 1.3/R_g$. (A, imagem inserida). A função P(r) (B). Análise de Kratky (C). 124

Figura 38 - Modelo à baixa resolução da MT-Xyn10. O envelope molecular da MT-Xyn10 (em cinza-transparente) obtido através dos experimentos de SAXS foi sobreposto com o modelo atômico gerado por homologia (em azul). 124

Figura 39 - Sequências de aminoácidos preditas para MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. A MT-Xyn11a tem uma cadeia polipeptídica de 268 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 21 resíduos (em negrito), com ponto isoelétrico de 5,96 e massa molecular de 27 kDa. A MT-Xyn11b tem uma cadeia polipeptídica de 254 aminoácidos com ponto isoelétrico de 5,96 e massa molecular de 28 kDa. 126

Figura 40 - Expressão e purificação das proteínas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. A esquerda, o SDS-PAGE mostra a expressão da proteína MT-Xyn11a (0), seguida dos passos de cromatografia de afinidade por Ni⁺² antes (1) e depois (2) da clivagem com TEV protease; e a proteína pura após terceiro passo de purificação por exclusão molecular (3). A direita, o SDS-PAGE mostra a proteína MT-Xyn11b ao final de todo processo de expressão e purificação (4). 127

Figura 41 - Atividade ótima das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. MT-Xyn11a mostra maior atividade por volta de 35 °C e pH 7,0, enquanto a MT-Xyn11b tem maior atividade por volta de 45 °C entre os pHs de 5,0 a 9,0. 130

Figura 42 - Cinética enzimática das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. Os experimentos de cinética enzimática para MT-Xyn11a e MT-Xyn11b foram realizados com xilano, sob as respectivas condições ótimas atividade pré-determinadas. Entretanto, não foi possível definir os parâmetros cinéticos de ambas as enzimas, pois, mesmo em altas concentrações de substrato não foi atingida a V_{max}. 131

Figura 43 - Cristal da proteína MT-Xyn11a. A proteína purificada foi submetida à triagem de condições para cristalização, através do método de difusão a vapor “sitting-drop”, utilizando o sistema automático robótico Honey Bee 961 Dispensing System e kits comerciais (Quiagen e Hampton) de cristalização de proteínas. A figura mostra os cristais obtidos na condição 0,1M Mes pH 6,5, contendo 30% de PEG 4K, após 21 dias. 132

Figura 44 - Estrutura molecular geral das GH11. A estrutura geral das xilanases GH11 é aqui representada pelo modelo cristalográfico da GH11 de *B. subtilis* complexado com uma xilotriose (pdb 2QZ3). 134

Figura 45 - Estrutura molecular da proteína MT-Xyn11. A estrutura cristalográfica da MT-Xyn11a apresenta a conformação estrutural tradicional descrita para dezenas de outras GH11,

provenientes de diferentes organismos. A estrutura conhecida como “rolo de gelatina” assemelha-se à uma mão direita parcialmente fechada. O modelo foi colorido por “B-factor spectrum”, onde os tons mais escuros de azul indicam as estruturas mais rígidas e menos flexíveis, enquanto os tons mais vermelhos indicam grande flexibilidade. (A) e (B) mostram diferentes ângulos de visualização da molécula. (C) e (D) mostram diferentes ângulos de visualização da cavidade catalítica, contendo uma xilotriose..... 135

Figura 46 - Alinhamento das sequências de amino ácidos de diferentes GH11. As sequências de amino ácidos de cinco diferentes xilanases GH11 representativas foram alinhadas com as sequências das MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. Essas xilanases estão dentre aquelas com maior identidade de sequência para MT-Xyn11a e MT-Xyn11b, além de terem suas estruturas cristalográficas depositadas no PDB. Dentre elas, duas são fúngicas (*C. thermophilum*: 1H1A; e *T. reesei*: 4XQD) e três bacterianas (*B. subtilis*: 1XXN; *T. fusca*: 3ZSE; e *T. Cellulolyticus*: 3WP3). Os quadros 1 e 2 indicam dois loops pertencentes somente à MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. 137

Figura 47 - Alinhamento estrutural de diferentes xilanases GH11. As estruturas cristalográficas de cinco diferentes xilanases GH11 foram alinhadas com o modelo cristalográfico da MT-Xyn11a. Essas xilanases estão dentre aquelas com maior identidade de sequência para a MT-Xyn11a e MT-Xyn11b, sendo duas fúngicas e três bacterianas, nessa ordem: Azul: *C. thermophilum*, 1H1A; Cinza: *T. reesei*, 4XQD; Verde: *B. subtilis*, 1XXN; Rosa: *T. fusca*, 3ZSE; e Amarelo: *T. Cellulolyticus*, 3WP3. A estrutura de MT-Xyn11a, em vermelho, notavelmente apresenta dois loops extras exclusivos dessa enzima (1) e (2). 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Termoestabilidade das SI-Pectinases avaliada em diversas condições por Thermofluor. (-) = erro na medida; (N/A) = Condição não avaliada. Condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados para cada enzima.	60
Tabela 2 -	Coleta e processamento dos dados cristalográficos da proteína SI-PME.	63
Tabela 3 -	Dados de coleta e processamento de SAXS da SI-PME.	70
Tabela 4 -	Coleta e processamento dos dados cristalográficos da proteína SI-EndoPG.	71
Tabela 5 -	Termoestabilidade da BI-ExoPG em diversos tampões. A termoestabilidade da estrutura terciária da BI-ExoPG foi avaliada sob efeito de diversos tampões e pHs por Thermofluor. (-) = erro na medida. Condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados.	87
Tabela 6 -	Substrato específico e influência de aditivos na atividade da BI-ExoPG.	88
Tabela 7 -	Propriedades bioquímicas de diferentes exo-PGs (EC 3.2.1.67) neutras. A BI-ExoPG foi comparada às demais ExoPGs (EC 3.2.1.67) neutras disponíveis no banco de dados BRENDA. Foram comparados: temperatura ótima, pH ótimo, pH-estabilidade e termoestabilidade. (N/A) = Condição não avaliada.	92
Tabela 8 -	Propriedades bioquímicas das pectinases comerciais atuais. N/A: Não avaliado.	93
Tabela 9 -	Parâmetros cinéticos de diferentes exo-PGs (EC 3.2.1.67). Os parâmetros cinéticos da BI-ExoPG foram comparados aos parâmetros das ExoPGs (EC 3.2.1.67) disponíveis no banco de dados BRENDA. (N/A) = Condição não avaliada.	94
Tabela 10 -	Dados de coleta e processamento de SAXS da enzima BI-ExoPG.	98
Tabela 11 -	Termoestabilidade da MT-Xyn10 em diversos tampões. A termoestabilidade da estrutura terciária da MT-Xyn10 foi avaliada sob efeito de diversos tampões e pHs por Thermofluor. Condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados.	113
Tabela 12 -	Influência de aditivos na atividade da MT-Xyn10.	115
Tabela 13 -	Propriedades bioquímicas de diferentes MT-Xyn10.	118
Tabela 14 -	Dados de coleta e processamento de SAXS da MT-Xyn10.	125
Tabela 15 -	Termoestabilidade das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b em diversas condições. A termoestabilidade da estrutura terciária das enzimas MT-	

Xyn11a e MT-Xyn11b foram avaliadas sob efeito de diversos tampões e pHs por Thermofluor. (-) = erro na medida; condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados. 128

Tabela 16 -	Coleta e processamento dos dados cristalográficos da proteína MT-Xyn11a.	133
-------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	<i>Auxilar activity proteins</i> (Proteínas de atividade auxiliar)
ABF	Tampão acetato/borato/fosfato de sódio
AGal	Ácido galacturônico
β -ME	β -Mercaptaetanol
Ca	Cálcio
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i> (enzimas ativas contra carboidratos)
CBM	<i>Carbohydrate binding modules</i> (Módulos de ligação a carboidratos)
CE	Carboidrato esterases
CMC	Carboximetilcelulose
Co	Cobalto
CPDB	<i>Circular Permutation Data Bank</i> (Banco de dados de permutação circular)
Cu	Cobre
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido dioxiribonucleico)
cDNA	DNA complementar
DNAg	DNA genômico
DNS	<i>Dinitrosalicylic acid</i> (Ácido dinitrosalicílico)
DTT	Ditiotreitol
E1G	Etanol de primeira geração
E2G	Etanol de segunda geração
EDPCV	Enzimas de degradação da parede celular vegetal
Fe	Ferro
GH	<i>Glycoside hydrolases</i> (Hidrolases de glicosídeos)
GT	Glicosiltransferases
HPAEC	<i>High performance anion exchange chromatography</i> (Cromatografia de troca aniônica de alta performance)
HPAEC-PAD	<i>HPAEC-Pulsed amperimetric detection</i> (HPAEC-Detector de pulso amperiométrico)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta performance)
id.	Identidade
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> (Isopropil- β -D-galactosídeo)

K	Potássio
Li	Lítio
LIC	<i>Ligation independent cloning</i> (Ligação independente de clonagem)
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Mg	Magnésio
Ni	Níquel
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PAE	Pectina acetilesterases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação da polimerase em cadeia)
PCV	Parede celular vegetal
PDB	<i>Protein data bank</i> (Banco de dados de proteína)
PEG	Poli etileno glicol
PG	Poligalacturonases
PL	Pectato liases
PME	Pectina metilesterases
PPase	Protopectinases
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i> (Espalhamento de raios-X à baixo ângulo)
SEC-SAXS	<i>Size exclusion chromatography-SAXS</i> (Cromatografia de exclusão por tamanho –SAXS).
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> (Cromatografia de camada delgada)

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
Bl-	de <i>Bacillus licheniformis</i>
°C	graus Celsius
D _{max}	Diâmetro máximo
kDa	quilo Daltons
k _{cat}	Constante catalítica
k _{cat} / K _M	Eficiência catalítica
K _M	Constante de Michaelis-Menten
mg	miligramas
mL	mililitros
µL	microlitro
mm	milímetros
mM	milimolar
nM	nanomolar
Mn	Mangânes
MT-	do Meta transcriptoma
p/v	peso/volume
Rg	Raio de giro
Sl-	de <i>Sphenophorus levis</i>
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
U	Unidade de enzima
V _{max}	Velocidade máxima
xg	vezes a gravidade
X ₁	xilose
X ₂	xilobiose
X ₃	xilotriose
X ₄	xilotetraose
X ₅	xilopentaose
X ₆	xilohexaose
6xHist-Trx	Cauda de histidina fusionada com uma tireodeoxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	Biomassa vegetal e sua importância na atual conjuntura global.....	31
1.2	Parede celular vegetal.....	33
1.2.1	Pectina.....	34
1.2.2	Celulose	36
1.2.3	Hemicelulose	37
1.2.4	Lignina	39
1.3	Despolimerização enzimática da PCV	40
1.3.1	Pectinases.....	41
1.3.2	Xilanases.....	43
1.4	Enzimas-alvo e suas origens	46
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
3	Introdução.....	49
4	Materiais & Métodos	51
4.1	Expressão heteróloga e purificação das SI-Pectinases.....	51
4.2	Determinação da massa molecular	51
4.3	Thermofluor – Triagem de melhor condição para estabilidade da proteína	51
4.4	Cristalização das SI-Pectinases	52
4.5	Construção do modelo estrutural das SI-Pectinases por cristalografia de raios-X	53
4.6	Experimentos de SAXS da SI-PME	54
5	Resultados & Discussão.....	57
5.1	Produção e purificação das SI-Pectinases	57
5.2	Estabilidade das SI-Pectinases por Thermofluor	59
5.3	Cristalização das SI-Pectinases	61
5.4	Estrutura cristalográfica da SI-PME	62
5.5	Modelo de envelope molecular	68
	Fonte: Elaborada pelo autor.	70
5.6	Estrutura cristalográfica da SI-EndoPG.....	70
6	Conclusão	75

7	Introdução	77
8	Materiais & Métodos.....	79
8.1	Expressão heteróloga e purificação de proteínas	79
8.2	Determinação da massa molecular	79
8.3	Thermofluor – Triagem de melhor condição para estabilidade da proteína	79
8.4	Ensaio de atividade	80
8.5	Determinação do padrão de clivagem	81
8.6	Cristalização.....	81
8.7	Coleta e processamento de dados cristalográficos por difração de raios-X	81
8.8	SEC-SAXS.....	82
9	Resultados & Discussão	85
9.1	Produção e purificação da BI-ExoPG	85
9.2	Estabilidade da BI-ExoPG por Thermofluor	86
9.3	Caracterização enzimática da BI-ExoPG	88
9.3.1	Especificidade de substrato.....	88
9.3.2	Influência de aditivos na atividade da BI-ExoPG	88
9.3.3	Atividade ótima da BI-ExoPG.....	89
9.3.4	Estabilidade enzimática da BI-ExoPG.....	91
9.3.5	Cinética enzimática da BI-ExoPG	93
9.3.6	Padrão de clivagem da BI-ExoPG	94
9.4	Cristalização, coleta e processamento de dados cristalográficos da BI-ExoPG.....	95
9.5	Modelo de envelope molecular da BI-ExoPG	96
10	Conclusões.....	101
11	Introdução	103
12	Materiais & Métodos.....	105
12.1	Análises in silico.....	105
12.2	Clonagem.....	105
12.3	Expressão heteróloga e purificação das MT-Xylanases.....	106
12.4	Determinação da massa molecular das MT-Xylanases	106
12.5	Thermofluor – Triagem de melhor condição para estabilidade das MT-Xylanases	106
12.6	Ensaio de atividade da MT-Xylanases.....	107
12.6.1	Determinação do padrão de clivagem da MT-Xyn10	108
12.7	Cristalização das MT-Xylanases	108
12.8	Coleta e processamento de dados cristalográficos por difração de raios-X	108

12.9 Experimentos de SAXS da MT-Xyn10	109
13 Resultados & Discussão.....	111
13.1 Resultados e discussão da enzima MT-Xyn10.....	111
13.1.1 Produção e purificação da MT-Xyn10	111
13.1.2 Estabilidade da MT-Xyn10 por Thermofluor	112
13.1.3 Especificidade de substrato da MT-Xyn10	113
13.1.4 Influência de aditivos na atividade da MT-Xyn10	114
13.1.5 Atividade ótima e cinética enzimática da MT-Xyn10.....	115
13.1.6 Estabilidade enzimática da MT-Xyn10	119
13.1.7 Padrão de clivagem da MT-Xyn10.....	120
13.1.8 Cristalização, coleta e processamento de dados cristalográficos da MT-Xyn10	122
13.1.9 Modelo de envelope molecular da MT-Xyn10.....	123
13.2 Resultados e discussão das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b	125
13.2.1 Produção e purificação.....	125
13.2.2 Estabilidade por Thermofluor	127
13.2.3 Especificidade de substrato	129
13.2.4 Atividade ótima e cinética enzimática	129
13.2.5 Cristalização, coleta e processamento de dados cristalográficos.....	132
13.2.6 Construção do modelo estrutural da MT-Xyn11a por cristalografia de raios-X	132
13.2.7 Análise do modelo estrutural da MT-Xyn11a	134
14 Conclusões.....	139
15 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
REFERÊNCIAS	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa vegetal e sua importância na atual conjuntura global

O uso desenfreado dos recursos naturais durante as últimas décadas têm impactado drasticamente o meio ambiente. O exemplo mais conhecido, sendo reportado ao longo dos anos, é o crescente aumento no aquecimento global. O acréscimo na temperatura do planeta tem afetado intensamente a biodiversidade, sendo a causa da extinção de várias espécies.¹ A atual conscientização sobre os danos causados em nosso ecossistema global e suas consequências têm direcionado a humanidade a investir no desenvolvimento de novas tecnologias, almejando a produção sustentável e ecológica de novas fontes renováveis de energia e de produtos verdes.

Nesse âmbito, o uso de resíduos derivados da biomassa vegetal tem se apresentado como uma alternativa promissora à substituição de combustíveis, componentes químicos e polímeros de origem fóssil.²⁻⁶ Hoje, mais de 200 compostos químicos e biopolímeros de valor agregado podem ser obtidos a partir dos diversos métodos de tratamentos de material lignocelulósico.³ Os resíduos vegetais são gerados em abundância nos setores agrícolas, florestais, industriais e até mesmo nos lixos municipais, portanto, são baratos e não competem direta ou indiretamente com a segurança alimentar.^{2,5-6}

Os primeiros “produtos verdes” de valor agregado gerados pelo refinamento da biomassa vegetal são os açúcares simples, como glicose, xilose, arabinose, manose, ramnose e ácido galacturônico. A partir desses açúcares, um grande número de outros valiosos componentes químicos ou biomateriais são subsequentemente produzidos, como: ácidos 1,4-succínico, 1,4-fumárico e 1,4-málico; ácidos 2,5-furanodicarboxílico; ácidos 3-hidroxipropiônico, aspártico, glucônico, glutâmico, itacônico, levulínico; 3-hidróxibutirolactona; glicerol, sorbitol, xilitol, etanol e ácido láctico, para citar alguns.³

Dentre os produtos secundários, o bioetanol de segunda geração (E2G) e o ácido láctico são tidos como os exemplos mais bem sucedidos no uso sustentável da biomassa vegetal, pois têm alcançado maiores escalas de produção e já estão amadurecendo seu posicionamento no mercado mundial.³ Por tal motivo, o E2G será usado aqui, como exemplo para ilustrar o atual cenário do uso sustentável e ecológico da biomassa vegetal.

O bioetanol tem se apresentado com uma alternativa factível para substituição de combustíveis fósseis como a gasolina, pois, é considerado ecológico e sustentável, com alto poder de octanagem, baixa pressão de vapor e grande poder calorífero.² De fato, em alguns países como o Brasil, o bioetanol já é adicionado (27%) à gasolina para melhores benefícios econômicos e ecológicos. O bioetanol de primeira geração (E1G), o qual utiliza açúcares solúveis e fermentáveis provenientes das culturas de cana-de-açúcar e cereais, já é uma tecnologia bem desenvolvida com altos rendimentos em sua produção.² Porém, apesar dessa eficiente produção, essa tecnologia não é capaz de suprir totalmente a demanda atual, sem que haja expansão nas suas áreas de plantio. Além disso, essa tecnologia já ocupa extensas áreas de plantações, afetando direta ou indiretamente a segurança alimentar.²

Em contraste ao E1G, o E2G utiliza, como matéria prima, a biomassa vegetal residual, gerando açúcares fermentáveis a partir das longas cadeias de polissacarídeos que constituem a parede celular vegetal (PCV). O E2G, portanto, em teoria, se apresenta como a alternativa ideal à suplementação na produção de biocombustível nas atuais usinas de E1G. A implementação da tecnologia de E2G nas atuais usinas de bioetanol conciliaria várias vantagens como: uso sustentável e ecológico dos resíduos vegetais gerados pelo E1G; redução nos custos do transporte de matéria prima para a produção do E2G e o aproveitamento de uma infraestrutura já existente para fermentação dos açúcares em etanol. No entanto, apesar da somatória de benefícios que essa estratégia apresenta, ela ainda não é implementada, uma vez que ainda não se apresenta economicamente viável. Essa problemática pode ser claramente observada no atual setor sucroalcooleiro do Brasil.

O Brasil é considerado exemplo mundial no setor de “energia limpa”, pois, mais de 42% de sua matriz energética total provém de fontes renováveis e sustentáveis⁷. Contribuindo para esse cenário, está o E1G proveniente do caldo da cana-de-açúcar. A produção do E1G brasileiro gera toneladas de bagaço de cana-de-açúcar como resíduo agrícola, o qual é constituído de cerca de 15-25% de lignina, 28-32% de hemicelulose e 25-45% de celulose³. São os açúcares presentes na pectina, celulose e hemicelulose que podem ser aproveitados para obter os já mencionados “produtos verdes”, incluindo o E2G. No entanto, devido ao elevado atual custo no refinamento da biomassa vegetal, a queima do bagaço para gerar energia elétrica é tida como alternativa mais economicamente viável pelas usinas sucroalcooleiras.

Existe, portanto, um problema de alto custo na produção de “produtos verdes” a partir da biomassa vegetal, que reduz a competitividade econômica desse setor. Mesmo utilizando matéria prima barata e abundante, o processo de refinamento da biomassa vegetal não está plenamente desenvolvido,^{8; 9} elevando o preço de seus produtos. O maior custo desse processo está na conversão das longas e complexas cadeias de polissacarídeos em oligos e monossacarídeos.^{8; 9} Essa etapa requer preparados enzimáticos compostos por diversas enzimas que degradam a parede celular vegetal (EDPCV), as quais atacam sinergicamente a complexa estrutura da PCV. Portanto, grandes esforços têm surgido por parte de Universidades, institutos de pesquisa e empresas biotecnológicas, como a Novozymes, Dupont e outras, no intuito de melhor compreender, otimizar e viabilizar o processo de despolimerização enzimática da PCV. Acredita-se que, os frutos desses esforços irão contribuir para reduzir os custos e elevar a competitividade econômica dos “produtos verdes” derivados da biomassa vegetal.

1.2 Parede celular vegetal

A PCV é a estrutura responsável pela forma e tamanho das células e tecidos vegetais, protegendo o vegetal contra desidratação, acúmulo excessivo de água, choques mecânicos e invasores.¹⁰⁻¹² Além disso, sua interface entre as células vizinhas desempenha um importante papel na comunicação intercelular do organismo vegetal.¹⁰⁻¹¹ A PCV é altamente complexa, formada por diversos polissacarídeos, proteínas e substâncias aromáticas.¹⁰⁻¹² Essa estrutura é comumente classificada em parede celular primária e secundária de acordo com sua composição química e localização em relação à membrana plasmática (Figura 1).^{10; 11} A parede celular primária é mais externa à membrana plasmática e envolve as células em crescimento e multiplicação ou células com capacidade para tal. Por outro lado, a parede celular secundária, é mais próxima da membrana plasmática, é mais espessa e rígida e envolve células já especializadas como células do xilema e floema.⁴ De fato, as células vegetais já diferenciadas apresentam proporções distintas entre parede primária e secundária, de acordo com a especialidade da célula.

Figura 1 - Parede celular vegetal. A figura destaca as estruturas que compõe a PCV, classificadas de acordo com o posicionamento dessas em relação a membrana plasmática e a composição dessas estruturas.

Fonte: Adaptada de BIOENERGY...¹³

Os componentes mais abundantes da PCV são os polímeros celulose, hemicelulose, lignina e pectina, os quais são distribuídos em proporções heterôgeneas ao longo das camadas dessa estrutura (Figura 1 e Figura 2).¹⁰⁻¹² A pectina, por exemplo, é o integrante majoritário da camada mais externa da célula, conhecida como lamela média; enquanto a lignina é mais encontrada na parede celular secundária.

Figura 2 - Parede celular vegetal e seus principais componentes. A figura mostra a distribuição e arranjo dos principais constituintes da parede celular: celulose, hemicelulose, lignina e pectina.

Fonte: Adaptada de MARTINS¹⁴; U.S DEPARTMENT OF ENERGY.¹⁵

1.2.1 Pectina

A pectina é um polissacarídeo heteromolecular, constituído de uma longa cadeia principal (Figura 3), a qual é associada a açúcares secundários como arabinose, ramnose, xilose, apiose e fucose.¹⁶ Essa cadeia principal é formada por inúmeros resíduos de ácido galacturônico ligados em série via ligações α -1,4. Além das ramificações, a cadeia principal também é parcialmente metil-esterificada e/ou acetilada em alguns resíduos de ácido galacturônico.¹⁶⁻¹⁸

Figura 3 - Cadeia principal do polímero péctico. O esqueleto da cadeia é constituído de inúmeros monômeros de α -ácido galacturônico parcialmente esterificadas por grupos metil.

Fonte: ALKORTA et. al.¹⁸

Os açúcares secundários, quando associados à cadeia principal, geram cadeias laterais. As regiões da pectina que apresentam essas ramificações são denominadas de peludas (“*hairly*”) e classificadas em ramnogalacturonana I e II (Figura 4). Entretanto a cadeia principal é predominantemente composta pelas regiões lisas (“*smooth*”) ou homogalacturonanas, as quais são lineares ou com poucas ramificações de tamanho reduzido.¹⁶ Xilogalacturonana pertence à região lisa e contem xiloses ligadas à cadeia principal. Ramnogalacturonana I apresenta em sua cadeia principal, alternância de ácido galacturônico e ramnose, além disso, suas ramificações são mais homogêneas, sendo compostas geralmente por apenas um tipo de açúcar por ramo. Ramnogalacturonana II, apesar do nome, tem apenas ácido galacturônico em sua cadeia principal; entretanto, suas ramificações são longas e bastante heterogêneas (Figura 4).¹⁶

Figura 4 - Pectina. A Figura esquematiza a estrutura e composição da pectina destacando as diferentes regiões ao longo da cadeia principal de ácido galacturônico.

Fonte: Adaptada de WILLATS et. al.¹⁶

Pectina é um termo geral para designar a mistura de substâncias pécticas de composições variadas citadas acima. Sendo assim, as substâncias pécticas ainda podem ser

classificadas em: protopectina, pectina, ácido pectínico e ácido péctico. A protopectina é a forma mais nativa da pectina, encontrada principalmente em frutos não maduros, é altamente insolúvel em água, está associada aos demais polímeros estruturais da PCV e a íons Ca^{+2} . A pectina é representada pela cadeia principal altamente metilada (acima de 75%), enquanto o ácido pectínico define a cadeia parcialmente metilada abaixo de 75%; e o ácido péctico, cuja cadeia é isenta de metilação.¹⁶

A mistura de substâncias pécticas é o principal constituinte da lamela média (camada mais externa da célula) que, portanto, está estritamente relacionada com a adesão entre as células vegetais, sendo comumente descrita na literatura como “cimento intercelular”.^{19; 20} Apesar do seu já bem conhecido papel biológico, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos de interação molecular entre a mistura de substâncias pécticas e os demais polímeros da PCV.

1.2.2 Celulose

A celulose não é somente o constituinte majoritário da PCV, mas também o polímero natural mais abundante do planeta. Esse polissacarídeo é formado por uma longa cadeia linear de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 5A).^{3-4,11-12} As inúmeras cadeias de celulose agrupam-se paralelamente entre si, por ligações de hidrogênio, formando microfibras.^{3-4,11-12} As microfibras de celulose possuem áreas ordenadas (cristalinas) e áreas desordenadas (amorfas), sendo a primeira mais resistente à hidrólise enzimática (Figura 5B).¹¹ Os conjuntos de microfibras paralelas também interagem com os conjuntos perpendiculares a elas; e assim forma-se uma matriz.^{3-4,11-12,20} Essa matriz é preenchida por hemicelulose, lignina e pectina, os quais interagem com a celulose através de pontes de hidrôgeno e Forças de Waals.^{3-4,11-12,20}

Figura 5 - Estrutura da celulose. Um conjunto de longas cadeias de celulose agrupam-se por ligações de hidrôgeno formando microfibras, as quais se agrupam, também por ligações de hidrôgeno, formando fibras maiores que constituem a PCV (A). Ao longo das microfibras de celulose existem regiões organizadas (cristalinas), que são mais resistentes à hidrólise enzimática; e existem regiões “desorganizadas” (amorfas) mais susceptíveis a hidrólise (B).

Fonte: Adaptada de BORJESSON et. ²¹

1.2.3 Hemicelulose

Hemicelulose é o segundo constituinte em maior quantidade na PCV. Diferentemente da celulose, a hemicelulose tem estrutura amorfa e “desorganizada”, além disso, tem composição variável, incluindo os polímeros xilano, arabinoxilano, xiloglucano, glucoronoxilano, galactoglucomanano.^{3,11-12} Os heteropolímeros que constituem a hemicelulose são principalmente compostos por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácido urônicos (glucurônico, 4-O-metilgalacturônico e galacturônico).^{3,22} Alguns outros açúcares como fucose e ramnose também estão presentes, mas em menor quantidade; e alguns monômeros de açúcares podem estar acetilados.^{3,22} A proporção desses polímeros varia de acordo com as espécies vegetais, sendo a hemicelulose

de “madeira dura” mais rica em xilano e a de “madeira mole” mais rica em galactoglucomanano.^{3,22}

O xilano é composto por uma cadeia linear de xiloses associadas por ligações β -1,4.²² A cadeia principal de xilano pode conter cadeias laterais formadas principalmente por arabinose; ácido glucurônico ou seu derivado 4-O-metil; e galactose (Figura 6).²² O glucuronoxilano é o principal componente da hemicelulose dos vegetais de “madeira dura” (30% da massa seca).²² Nesse polímero, as unidades de xilose são comumente acetiladas (C2 e C3) (8-17%) e, a cada dez unidades, uma contem um ácido 4-O-metilglucurônico anexado (ligação α -1,2).²² Arabinoxilano é o principal componente da hemicelulose dos grãos de cereais. Esse polímero é similar ao glucuronoxilano, porém a quantidade de arabinoses ligadas a cadeia principal é muito maior. Sendo assim, além dos ácidos 4-O-metilglucurônicos ligados a cadeia principal, uma grande quantidade de resíduos de arabinose são ligadas às unidades de xilose (ligações α -1,2 e/ou α -1,3).²² Ao contrário do glucuronoxilano e do arabinoxilano, o xiloglucano tem sua cadeia principal formada por glicoses (ligação β -1,4), das quais, 75% são anexadas a resíduos de xilose (ligação α -1,6). Além disso, os resíduos de xilose podem estar associados a unidades de outros açúcares como arabinose e galactose, criando ramificações na cadeia principal.²² Por fim, o polímero galactoglucomanano é o componente principal da hemicelulose dos vegetais de “madeira mole”. Esse polímero tem sua cadeia principal formada por resíduos de glicose e manose (ligação β -1,4), podendo esses estarem acetilados (C2 e C3) e anexados à uma galactose (ligação α -1,6).²²

Figura 6 - Estrutura dos diferentes tipos de heteroxilanos. (A) O-Acetil-4-O-metilglucuronoxilano de vegetais de “madeira dura”. (B) Arabino-4-O-metilglucuronoxilano de vegetais de “madeira mole”. (C) Arabinoxilano de cereais.

Fonte: POLLET et al.²³

1.2.4 Lignina

A lignina é um polímero aromático formado principalmente pelo acoplamento oxidativo entre as unidades derivadas do fenilpropano. Essas unidades são conhecidas como monolignóis e consistem de uma molécula de fenilpropano contendo um (álcool hidroxifenílico), dois (álcool coniferílico) ou três (álcool sinapílico) grupos metóxi anexados ao anel aromático (Figura 7).²⁴ Essas unidades podem formar diferentes ligações entre elas, proporcionando moléculas com alto grau de heterogenicidade (Figura 8).²⁴ A ligação mais abundante (cerca de 50% nos vegetais de “madeira mole”) ocorre entre o carbono β de uma unidade com o grupo hidroxifenil de outra unidade (ligação β -O-4).²⁴

Figura 7 - Monolignóis. As três unidades que predominantemente formam a lignina são derivadas do fenilpropano.

Fonte: Adaptada de DUVAL et al.²⁴

Figura 8 - Módulos estruturais da lignina presente nos vegetais de “madeira mole”. A figura mostra os diferentes tipos de ligações possíveis entre as unidades de monolignóis.

Fonte: DUVAL et al.²⁴

1.3 Despolimerização enzimática da PCV

A desconstrução enzimática da PCV é considerada o gargalo para as tecnologias de aproveitamento de biomassa vegetal, devido o elevado custo de produção das EDPCV.¹⁴ A PCV evoluiu para resistir à degradação, sua robustez e recalcitrância provém da cristalinidade da celulose, hidrofobicidade da lignina e revestimento da celulose pela matrix pécino-ligno-hemicelulósica. Essa resistência é, portanto, fruto da complexa rede de interações entre a ampla diversidade de monossacarídeos, compostos aromáticos, minerais, acetilações e metilações, proteínas e lipídeos que compõem a PCV.⁴⁻⁷ Dada essa complexidade, é

necessário um completo e diversificado arsenal enzimático para uma eficiente despolimerização da PCV. Dentre as diferentes classes de EDPCV, destacam-se: glicosiltransferases (GT); carboidrato esterases (CE); proteínas de atividade auxiliar (AA); polissacarídeo-liases (PL); módulos de ligação a carboidratos (CBM); e hidrolases de glicosídeos (GH). A seguir, serão melhor descritas as classes enzimáticas pectinases (CE08 e GH28) e xilanases (GH10 e GH11), as quais foram alvos dos estudos realizados nesta Tese de Doutorado.

1.3.1 Pectinases

A pectina é usada na indústria de alimentos principalmente como agentes geleificantes, porém, a presença desse polissacarídeo é indesejada para muitos processos industriais, sendo necessária sua remoção. Neste contexto, as enzimas pectinolíticas têm sido vastamente aplicadas como uma estratégia eficiente na desconstrução da pectina, além de preservar os demais componentes e propriedades desejadas do produto de interesse.

O uso das pectinases na indústria iniciou-se por volta de 1930 nas preparações de vinhos e sucos de frutas.²⁵ A partir da década de 60, após maior conhecimento sobre a natureza química dos tecidos vegetais, essas enzimas foram utilizadas com maior eficiência.²⁵ Hoje, as pectinases têm vasta aplicação industrial em diversos setores, tais como clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, amadurecimento artificial de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, fermentação de chá e chocolate, extração de polpa de tomate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras vegetais na indústria têxtil e de papel, nutrição animal e extração de óleos vegetais.²⁶ Devido sua vasta aplicação industrial, preparados comerciais de pectinases correspondem cerca de 25% do mercado global de enzimas.²⁷

As pectinases são enzimas que atuam sobre a pectina alterando sua estrutura e composição (Figura 9). Essas enzimas são geralmente sintetizadas por bactérias, leveduras, fungos, plantas e por alguns insetos herbívoros como verificado em estudos recentes.²⁸⁻³⁰ As pectinases vegetais estão relacionadas com mudanças ocorrentes ao longo da expansão celular e fundamentalmente no crescimento e amadurecimento dos frutos.³¹ As pectinases de micro-organismos estão relacionadas com processos de infecção, definindo seu potencial de patogenicidade,³² e as de insetos estão provavelmente vinculadas com seu potencial de herbivoria.³³

As pectinases mais extensamente estudadas são as que agem sobre a região homogalacturonana; essas enzimas são subclassificadas de acordo com seu mecanismo de ataque a esse substrato. As protopectinases (PPase) convertem a protopectina em pectina solúvel, agindo diretamente (PPase-A) sobre a cadeia de ácido poligalacturônico (Poli-AGal) ou quebrando (PPase-B) as ligações da protopectina com os demais polímeros da PCV. A pectina metilesterase (PME) (E.C 3.1.1.11), integrante da família CE08, remove as metilações da cadeia principal aumentando a afinidade deste pelas despolimerases. A pectina acetilesterase (PAE) (E.C 3.1.1.-) remove as acetilações da cadeia principal. As depolimerases promovem a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 entre os monômeros de ácido galacturônico, como as pectato liases (PL) (EC 4.2.2.2) e/ou pectina liases (EC 4.2.2.10) que clivam a cadeia através de uma reação de trans-eliminação liberando açúcares insaturados; e as poligalacturonases (PG) (família GH28) que hidrolisam a cadeia liberando açúcares saturados.^{26,34} As PGs ainda podem ser classificadas quanto ao modo de ataque à cadeia: as endo-PGs (EC 3.2.1.15) agem aleatoriamente sobre os sítios internos da cadeia enquanto as exo-PGs clivam sequencialmente a cadeia a partir de uma extremidade não redutora liberando monômeros (EC 3.2.1.67) ou dímeros (EC 3.2.1.82) de ácido galacturônico.³⁴

Figura 9 - Ação de diferentes pectinases sobre as substâncias pécicas. As PPases-A e B agem sobre a protopectina dissociando-a dos demais componentes da parede celular convertendo-a em pectina solúvel. A PME remove os grupamentos metil, aumentando a afinidade das despolimerases pela cadeia. PG e PL rompem as ligações glicosídicas gerando monômeros de açúcar saturados e insaturados, respectivamente.

Fonte: Adaptada de EVANGELISTA.³⁵

1.3.2 Xilanases

Como descrito acima, o xilano é um longo polissacarídeo heterogêneo parcialmente acetilado, formado por vários açúcares e componentes ácidos. A desconstrução completa e eficiente dessa complexa estrutura requer um conjunto de diferentes enzimas xilanolíticas com distintas especificidades e modos de ataque ao substrato. A ação conjunta dessas enzimas reduz a longa e complexa cadeia de xilano em seus componentes elementares como xilose, arabinose, ácido glucurônico e outros.

Dentre as xilanases mais estudadas e mais industrialmente utilizadas, estão as endo- β -1,4-xilanases (E.C 3.2.1.8) que hidrolisam aleatoriamente as ligações glicosídicas ao longo da cadeia principal de xilano. Essas enzimas, portanto, tem mecanismo endo-catalítico, liberando diferentes xilo-oligosacarídeos e xilose como produtos de reação.^{23,36-37} As exo-xilooligossacarídeos (E.C 3.2.1.156) têm mecanismo exo-catalítico atuando processivamente

no terminal redutor da cadeia principal, liberando xilo-oligossacarídeos.^{23,38} As β -1,4-xilosidades (E.C 3.2.1.37) também tem ação exo-catalítica, atuando nas extremidades da cadeia principal ou dos xilo-oligossacarídeos, inclusive xilobiose, em todos os casos libera xilose como único produto de reação.³⁷ Os grupos laterais, arabinose, ácido glucurônico e acetilações, são removidos pela ação das enzimas arabinofuranase (E.C 3.2.1.55), glucoronosidade (E.C 3.2.1.139) e xilano acetilesterase (E.C 3.1.1.72), respectivamente.³⁷ Esse complexo xilanolítico é comumente produzido por fungos, leveduras e bactérias.^{23,36-37}

A maioria das xilanases descritas na literatura são das famílias GH10 e GH11; enquanto uma pequena parte é classificada entre as famílias GH5 e GH8.²³ Dentre as 145 famílias de GH, a GH5 é uma das maiores, contendo mais de 8.500 enzimas reportadas no banco de dados do CAZy. Essa família engloba enzimas com diferentes especificidades e atividades, sendo a maioria celulasas (E.C 3.2.1.4), β -1,4-manosidase (E.C 3.2.1.78) e β -1,3-glucosidases (E.C 3.2.1.58).²³ Porém, algumas poucas enzimas dessa família apresentam especificidade para heteroxilano, como por exemplo as glucuronoxilanases XynA de *Erwinia chrysanthemi*³⁹ e a XynC de *Bacillus subtilis*,⁴⁰ ou a exo-xilanase de *Hypocrea jecorina*.²³ Da mesma maneira, a família GH8 consiste majoritariamente de celulasas, mas também são compostas por chitasanases (E.C 3.2.1.132), lichenases (E.C 3.2.1.73) e xilanases.³⁸ De fato, já foram descritas para família GH8 tanto endo-xilanases⁴¹⁻⁴⁴ quanto exo-xilanases.⁴⁵⁻⁴⁶

Até presente data, a maior parte das xilanases estudadas são endo- β -1,4-xilanases pertencentes à família GH10. As endo- β -1,3-xilanases, que clivam as ligações β -1,3 entre os resíduos de xilano, também integram a família GH10, embora em menor número. Por ser a classe de xilanases mais estudadas, a família GH10 tem seu mecanismo de reconhecimento e de catálise do substrato melhor compreendido que as demais. A especificidade enzimática dessa família é bastante ampla, uma vez que a cavidade catalítica acomoda não apenas a cadeia principal linear de xilano mas também heteroxilanos mesmo com alto grau de decorações (grupos laterais, descritos acima).²³ Sabe-se que as endo- β -1,4-xilanases GH10 são capazes de clivar a ligação glicosídica ao lado (em direção ao terminal redutor) de uma xilose decorada até por dois grupos laterais; e necessita de apenas duas xiloses isentas de decoração entre duas xiloses decoradas.²³ Além disso essas enzimas hidrolisam as ligações β -1,4 precedentes às ligações β -1,3 (no caso de xilanos com ligações mistas), mas não a ligação β -1,4 que imediatamente sucede uma ligação β -1,3 em direção ao terminal redutor.²³ Em relação as endo- β -1,3-xilanases, sabe-se que quebram as ligações β -1,3 mesmo estando

flanqueadas, em ambas as direções, por ligações β -1,4.²³ Apesar de não atuarem sobre a cadeia de celulose, as xilanases da família GH10 conseguem tolerar até duas unidades de celulose inseridas consecutivamente na cadeia de xilano.²³

Sendo a segunda classe de xilanases mais estudadas até hoje, a família GH11 também apresenta mecanismos de reconhecimento e hidrólise do substrato melhor compreendidos. Diferentemente das outras famílias de GH que contém diferentes tipos de xilanases como representantes, a GH11 é formada exclusivamente por endo- β -1,4-xilanases.²³ Uma típica GH11 tem especificidade por heteroxilanos e preferencialmente clivam regiões isentas de decorações. Isso porque, diferentemente das xilanases GH10, as GH11 não são capazes de clivar a ligação glicosídica ao lado (em direção ao terminal redutor) de uma xilose anexada a um grupo lateral; e requer três xiloses isentas de decoração para efetivar a hidrólise.²³ Desse modo, quando comparadas as xilanases GH10, as GH11 têm baixa atividade sobre heteroxilanos com alto grau de decorações e também sobre xilo-oligossacarídeos menores que xilopentoses.²³ Além disso, em relação as cadeias de xilano com ligações mistas (β -1,4 e β -1,3), o maior produto liberado pela ação de uma xilanase GH11 é uma xilotetraose com uma ligação β -1,3 no centro.²³

Devido sua fundamental contribuição da desconstrução da biomassa vegetal, as xilanases têm sido amplamente utilizadas na produção de E2G e outros processos biotecnológicos industriais, tais como: produção de xilitol; germinação de sementes e amadurecimento de frutas; preparo de sucos de frutas e cerveja; tratamento de polpas vegetais; fabricação de pães; tratamento de dejetos industriais; degumagem de papel e tecidos vegetais.³⁶⁻³⁷ Além disso, os xilo-oligossacarídeos têm sido muito empregados na formulação de alimentos, pois suas propriedades tecnológicas e benefícios para saúde são mais vantajosas que de outros oligossacarídeos.⁴⁷⁻⁴⁸ Por exemplo, xilo-oligossacarídeos são estáveis a temperaturas de até 100 °C e uma ampla variação de pH (2,5-8,0), diferentemente de outros oligossacarídeos não-digeríveis como os fruto-oligossacarídeos, os quais são instáveis em pH gástrico humano.⁴⁷⁻⁴⁸ Xilose e xilobiose têm maior atividade anticongelante que glicose, sacarose e maltose; e também, xilobiose tem atividade de água similar à da glicose.⁴⁸ Além disso, xilo-oligossacarídeos não são cancerígenos, têm odor aceitável e baixas calorias, favorecendo seu uso na formulação de produtos dietéticos.⁴⁷⁻⁴⁸

1.4 Enzimas-alvo e suas origens

Como mencionado acima, as classes de enzimas estudadas neste trabalho são pectinases (CE08 e GH28) e xilanases (GH10 e GH11). Mais especificamente, as pectinases são: uma PME e uma endo-PG identificadas no transcriptoma e genôma do inseto praga *Sphenophorus levis*; e uma exo-PG identificada no genôma de *Bacillus licheniformis*. As três β -1,4-endo-xilanases (uma GH10 e duas GH11) foram identificadas em nosso banco de sequências-alvo, o qual foi gerado a partir do metatranscriptoma de um consórcio microbiótico derivado da compostagem de bagaço de cana-de-açúcar. Uma descrição detalhada sobre essas enzimas-alvo e suas respectivas fontes de bioprospecção será apresentada a seguir nos Capítulos I, II e III, juntamente com os estudos realizados para cada uma delas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A despolimerização enzimática da PCV requer maiores estudos científicos no âmbito da: identificação, caracterização bioquímica e biofísica e determinação dos mecanismos de ação de novas EDPCV, que melhor adequem-se as exigências industriais. Dentre as EDPCV mais utilizadas na indústria, estão as pectinases e xilanases. Em consideração a tais fatos, o presente trabalho objetivou o estudo funcional e estrutural de diferentes classes de pectinases e xilanases, no intuito de contribuir para o desenvolvimento pleno das tecnologias baseadas na despolimerização enzimática da PCV.

2.2 Objetivos específicos

- Expressar, purificar e cristalizar as pectinases de *S. levis* e *B. licheniformis* a partir dos clones recombinantes (gerados em estudos anteriores) de levedura *Pichia pastoris* e bactéria *E. coli*, respectivamente.
- Clonar, expressar, purificar e cristalizar as três xilanases identificadas e selecionadas no banco de genes do metatranscriptoma.
- Gerar e analisar, para as enzimas-alvo, o modelo da estrutura molecular em alta resolução a partir da cristalografia de raios-X.
- Gerar e analisar, para as enzimas-alvo, o modelo do envelope através de experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).
- Realizar, para a pectinase de *B. licheniformis* e para as três xilanases selecionadas, uma detalhada caracterização bioquímica, incluindo: especificidade de substrato; pH e temperatura ótimos; influência de íons e agentes químicos diversos; estabilidade frente a temperaturas elevadas e a variações de pH; determinação do padrão de clivagem por TLC e/ou HPAEC; e determinação dos parâmetros cinéticos V_{max} , K_M , k_{cat} e eficiência catalítica (k_{cat}/K_M).

Capítulo I

SI-Pectinases: as pectinases do “Bicudo da cana-de-açúcar”, *Sphenophorus levis*

3 Introdução

O coleóptero *S. levis*, pertencente à família *Curculionidae*, é o besouro popularmente conhecido como “Bicudo da cana-de-açúcar.”^{35,49-51} As larvas desse inseto atacam o interior do rizoma da cana-de-açúcar, abrindo galerias na base da brotação, causando graves danos à planta ou até mesmo sua morte.^{35,49-51} Deste modo, a ação desse inseto praga tem reduzido significativamente a produtividade e longevidade dos canaviais, afetando economicamente o setor sucroalcooleiro brasileiro.^{35,49-52}

Com o intuito de gerar maior conhecimento sobre esta praga e promover subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de controle, o Laboratório de Biologia Molecular (UFSCar, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos-SP) chefiado pelo Prof. Dr. Flavio Henrique Silva, construiu uma biblioteca de cDNA a partir das larvas de *S. levis*. Durante análise da biblioteca de cDNA foram identificadas sequências codificantes para uma PME e uma endo-PG, nomeadas de SI-PME e SI-EndoPG, respectivamente, ou em conjunto como SI-Pectinases.³⁵

As SI-Pectinases foram objetos de estudo durante curso de Mestrado deste aluno, sob orientação do Prof. Dr. Flavio Henrique Silva. Nesse estudo, as ORFs SI-PME (GenBank: KF697077) e SI-EndoPG (GenBank: KF697078), excluindo a sequência codificante para peptídeo sinal, foram previamente amplificadas e clonadas para expressão heteróloga em levedura *P. pastoris*.^{28,33,35} Os plasmídios resultantes foram construídos para expressar a proteína-alvo fusionada, em seu C-terminal, a um c-myc epitope, usado em ensaios de imunodeteção, mais uma cauda de histidina (6xHis-tag), usada na purificação da proteína.^{28,33,35}

Os clones da levedura *P. pastoris* expressores das enzimas recombinantes SI-PME e SI-EndoPG foram gentilmente cedidos ao nosso grupo pelo Prof. Dr. Flavio Henrique Silva para realização dos estudos estruturais das SI-Pectinases que serão descritos neste capítulo.

4 Materiais & Métodos

4.1 Expressão heteróloga e purificação das SI-Pectinases

A expressão das SI-Pectinases foi conduzida em nosso laboratório de Biotecnologia Molecular, segundo método descrito na Dissertação de Mestrado ³⁵ e publicações deste aluno. ^{28; 33} As leveduras foram crescidas em 500 mL de meio BMGY por 24 h a 250 rpm e 28 °C até atingir $D.O_{600} = 6.0$. As células foram precipitadas e o meio trocado por 100 mL de meio BMMY, onde incubou-se por 144 h a 250 rpm e 28 °C, adicionando-se diariamente metanol (concentração final de 0,75%). Ao término das 114 h, o meio foi deslevedurado por 40 min a 17.000 $\times g$, filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 μm (Millipore) e as proteínas purificadas.

As SI-Pectinases foram purificadas a partir do sobrenadante através de dois passos de cromatografia: afinidade por Ni^{+2} e exclusão molecular. No primeiro passo de purificação, as proteínas-alvo foram eluídas em tampão 100 mM de Tris, pH 8,0, 150 mM de NaCl e 100 mM de imidazol. O imidazol foi removido posteriormente por diálise em mesmo tampão e as proteínas-alvo concentradas até o volume final de 2 mL. Para garantir a pureza da amostra, realizou-se um segundo passo de purificação por gel filtração na coluna Superdex™ 200 prep grade 16/60 (GE) com 100 mM de citrato de sódio pH 5,0 e 150 mM de NaCl. A pureza das amostras foi avaliada em SDS-PAGE 15% coradas com Comassie blue.

4.2 Determinação da massa molecular

Durante procedimento de purificação em gel filtração, foi também gerada uma curva de calibração cromatográfica a partir de proteínas com massa molecular conhecida (Ferritina (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Ovalbumina (44 kDa)) para cálculo estimativo da massa molecular da SI-PME. A construção da curva e cálculos foram realizados segundo manual da coluna de gel filtração Superdex™ 200 prep grade 16/60 (GE).

4.3 Thermofluor – Triagem de melhor condição para estabilidade da proteína

Após purificação, as SI-Pectinases foram encaminhadas para ensaios de Thermofluor para triagem de condições (tampões) que promovem maior estabilidade à estrutura terciária dessas enzimas. Além disso, a estabilidade da SI-PME também foi avaliada sob a variação de

pH de 2 a 10, usando tampão acetato/borato/fosfato de sódio (ABF). Avaliar as condições que melhor ou pior estabilizam a proteína-alvo é de grande importância para armazenamento dessa, assim como para experimentos de atividade enzimática e cristalização. O método Thermofluor baseia-se na ligação de uma sonda fluorescente ao centro hidrofóbico das proteínas, desse modo, quando a proteína inicia o desenovelamento como resultado do acréscimo de temperatura, um sinal de fluorescência é imediatamente detectado.⁵³ Portanto, as melhores condições para a estabilidade da enzima são aquelas que apresentam maiores valores de T_m .

O experimento de Thermofluor constituiu-se de 13 μ M de enzima em 50 mM de tampão adicionado de 5 μ L de SYPRO Orange dye 10X (Invitrogen, Carlsbad, USA) em volume final de 20 μ L, os quais foram depositados em uma placa de PCR 96-well thin-wall (Bio-Rad). Todas as reações foram conduzidas em triplicata adicionadas de um branco (amostra sem enzima). Após selamento das placas, essas foram incubadas e analisadas quanto a emissão de fluorescência no equipamento iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA). Variou-se a temperatura de 25 a 90 °C crescendo de 1 °C por min e uma pausa de 30 s para cada ponto. A temperatura de melting (T_m) foi determinada pela leitura da fluorescência nos comprimentos de onda de 490/530 nm para excitação/emissão.

4.4 Cristalização das SI-Pectinases

A cristalização de macromoléculas é um fenômeno indispensável para a realização de estudos estruturais de proteínas a partir da cristalografia de raios-X. Esse fenômeno ocorre quando há condições apropriadas à supersaturação da solução proteica, reduzindo a solubilidade e promovendo a aglutinação das proteínas. Entretanto, a supersaturação deve ocorrer de forma cineticamente lenta para favorecer a aglutinação organizada das proteínas e assim resultar na formação de cristais; caso contrário, a aglutinação desordenada resultará em precipitados amorfos da proteína. A formação de cristais é a resultante de três eventos: nucleação, crescimento e cessação do crescimento. Esse fenômeno é fortemente influenciado por temperatura, pH, sais, agentes precipitantes, detergentes, solventes orgânicos, aditivos diversos e alguns outros parâmetros. Atualmente, o método mais usado na cristalização de proteínas é o de difusão a vapor por “gota sentada” (*sitting drop*) ou “gota pendurada” (*hanging drop*), que consistem em depositar uma gota de solução da proteína pura, misturada com solução precipitante, dentro de uma câmara selada, onde existe um reservatório da mesma solução precipitante. Como o reservatório tem maior concentração de precipitante, a gota

perde água por evaporação para o reservatório na tendência de se atingir o equilíbrio do sistema. Essa evaporação promove a lenta supersaturação da proteína e do precipitante na gota, favorecendo a algutinação organizada da proteína na forma de cristais.

As SI-Pectinases purificadas foram concentradas e submetidas à triagem de condição de cristalização. SI-PME foi concentrada até 15,8 mg/mL em tampão HEPES 20 mM pH 8,0 e 20 mM de NaCl; SI-EndoPG foi concentrada até 11,2 mg/mL em citrato de sódio 20 mM pH 5,0 e 20 mM de NaCl. O método de difusão a vapor “sitting-drop” foi utilizado, no qual 1 µL da solução contendo a enzima foi misturada com 1 µL da solução de cristalização à 18 °C. A triagem de cristalização foi realizada através do sistema automático robótico Honey Bee 961 Dispensing System (DIGLABTM) e de kits comerciais de cristalização (Index e SaltRx – Hampton research, Pact Suite, PEGs I e II Suite – Quiagen).

4.5 Construção do modelo estrutural das SI-Pectinases por cristalografia de raios-X

Os cristais de proteína das SI-Pectinases foram coletados com loops (Hampton), adicionados à solução 10-20% (v/v) de etileno glicol e resfriados à -173 °C sob fluxo de nitrogênio líquido. Os dados cristalográficos da SI-PME foram coletados em nosso instituto utilizando o sistema de difração Bruker APEX DUO equipado com um goniômetro KAPPA e detector APEX II CCD. A coleta de dados, tratamento destes e a construção do modelo cristalográfico da proteína foram realizados em colaboração pelo Dr. Andre Schutzer de Godoy como descrito em Evangelista e colaboradores, 2014.²⁸ Durante a coleta de dados, o tempo de exposição por *frame* foi de 20 s com ângulo de deslocamento de -20°. A determinação do grupo pontual e a estratégia de coleta de dados foram realizados via software PROTEUM2. Os dados de difração foram integrados a 2.1 Å de resolução pelo programa SAINT, escalonados pelo software SADBS (Bruker AXS), a estatística e grupo espacial foram determinados pelo programa XPRED (Bruker AXS). O conteúdo de solvente foi calculado pelo coeficiente de Matthews usando-se o software phenix.xtriage.⁵⁴ A estrutura da proteína foi resolvida pelo Phaser⁵⁵ por substituição homóloga, através de um “super modelo” gerado via phenix.ensemble e phenix.sculptor,⁵⁴ a partir de estruturas cristalográficas homólogas depositadas no banco de dados do PDB. Quatro estruturas homólogas de maior semelhança (maior identidade de sequência) com a SI-PME foram selecionadas para a construção do “super modelo”: 3GRH (id. 35%), 1XG2 (id. 25%), 1GQ8 (id. 24%) e 3UW0 (id. 31%).⁵⁶⁻⁵⁹ O refinamento da estrutura foi realizado através do programa Phenix,⁵⁴ sendo que durante todo o processo foram realizados ciclos alternados de refinamento com inspeção

visual do mapa de densidade eletrônica, remodelando manualmente quando necessário, a posição dos resíduos através do programa Coot.⁶⁰

Os dados cristalográficos da SI-EndoPG foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, utilizando a linha MX2 com comprimento de onda de 1.458 Å e o detector PILATUS2M (Dectris). A indexação das imagens, determinação do grupo pontual, integração do conjunto de imagens, a estatística e grupo espacial foram todos realizados pelo software iMOSFLM.⁶¹⁻⁶³ O escalonamento das intensidades foi realizado pelo software SCALA, presente no pacote de programas do CCP4.⁶⁴ O conteúdo de solvente e moléculas na unidade assimétrica foram calculados pelo coeficiente de Matthews.⁶⁵ O faseamento e resolução da estrutura molecular foram realizados pelo programa Phaser⁵⁵ via técnica de substituição molecular. Para tal, utilizou-se a estrutura da PG de *Colletotrichum lupini* (pdb: 2IQ7) com identidade de sequência igual a 49%. O refinamento da estrutura foi realizado pelos softwares Phenix⁵⁴ e Coot⁶⁰ como citado acima para SI-PME.

4.6 Experimentos de SAXS da SI-PME

A técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) é amplamente utilizada nas análises de estrutura molecular à baixa resolução de macromoléculas em solução. No caso de proteínas, essa análise permite determinar, entre outros parâmetros, o estado oligomérico, massa molecular, volume molecular, raio de giro (Rg) e o envelope molecular.

Experimentos de SAXS foram conduzidos para a proteína SI-PME, onde o envelope molecular foi determinado. Os dados experimentais foram coletados na linha D02A-SAXS1, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP. O conjunto de dados foi coletado usando um feixe monocromático de raios-X ($\lambda = 1.488$ Å) e um detector Pilatus 300. A distância entre a amostra e o detector foi ajustada para aproximadamente 1,0 mm cobrindo um vetor de espalhamento ($q = 4\pi/\lambda \sin(\theta)$, sendo 2θ o ângulo de espalhamento) de variação entre 0.0129 a 0.3500 Å⁻¹. Amostras de 1,5, 3,0 e 6,0 mg/mL da proteína pura em tampão 100 mM de citrato de sódio pH 5,5, 150 mM de NaCl e 5% (p/v) de glicerol foram previamente preparadas. Para garantir a qualidade das medidas e remover qualquer artefato de agregamento, a amostra foi previamente centrifugada a 23.500 xg e 4 °C por 5 min. A amostra foi carregada em uma célula de mica de 1.0 mm de comprimento e exposta ao feixe de raios-X em intervalos de 30 s. A análise comparativa de cada conjunto coletado foi usada para

avaliar danos por radiação. A medida coletada para o tampão foi usada na subtração da medida das amostras.

A análise de Guinier foi utilizada para checar a monodispersidade e o raio de giro (R_g), o qual também foi determinado pelo método de Transformada de Fourier indireta, usando o software GNOM.⁶⁶ A função de distribuição de distâncias $P(r)$ foi analisada pelo software GNOM, onde o diâmetro máximo (D_{max}) foi atribuído. A massa molecular experimental baseada nos dados de SAXS foi calculada através do programa SAXSMoW.⁶⁷ Dez modelos de envelope molecular foram gerados via *ab initio* pelo programa GASBOR,⁶⁸ sendo alinhados e calculado a média pelo programa DAMAVER.⁶⁸ Os perfis de espalhamento teórico dos modelos de envelope e de modelos homólogos foram comparados aos perfis de espalhamento experimental via software FoXS.⁶⁹ O modelo de envelope gerado por SAXS e o modelo de estrutura cristalográfica foram sobrepostos usando o programa SUPCOMB.⁷⁰

5 Resultados & Discussão

5.1 Produção e purificação das SI-Pectinases

Ambas as SI-Pectinases foram produzidas e purificadas com sucesso (Figura 10) e ambas com cerca de 50 kDa. Em estudos anteriores, as análises de sequências de aminoácidos (Figura 11) predisseram massas moleculares de 43 kDa para SI-PME e 39 kDa para SI-EndoPG recombinantes, entretanto, também foram identificados um sítio de N-glicosilação para SI-PME e quatro para SI-EndoPG; e um sítio de O-glicosilação para SI-PME. Também, em estudos anteriores foi mostrado, através de tratamento com deglicosidades do tipo N e O, que as SI-Pectinases são de fato expressas com glicosilações, justificando o aumento em suas massas moleculares preditas ³⁵. Além disso, neste estudo, a massa molecular da SI-PME em solução foi calculada por gel filtração, onde a proteína foi eluída em um único pico cromatográfico referente a 51 kDa (Figura 12).

Figura 10 - Purificação das SI-Pectinases. As enzimas foram purificadas a partir do sobrenadante através de cromatografia de afinidade por Ni^{+2} e por exclusão molecular. Os SDS-PAGEs mostram a pureza das amostras

Fonte:Elaborada pelo autor.

SI-PME	1	MKIIVLLPVLVALACAN QNPPGTSSRPILTASEANYYTKEKYLQGWSPPS	50
	51	ISTNHTD Y TVGGGGYSTIQAAVNDAINAGGSNRKYIKINTGTYQQVVYIP	100
	101	NTNVPLTIYAGSRPDNTVITLNMPAQTTTPSAYKNLVNPNDAFFKPGDPA	150
	201	YSIYNGCASSSGTIGTSCSTVFVWLAPNVQIVNLQIQNSAKNKGDDQAVA	200
	251	LQTNSDRIQVHNVNLLGHQDTLCAGSGGTD TQ IAHYTNTYIEGDIDYVFG	250
	301	GGTAIFESC T FYSKADRKNDES V IFAPDTPHQMYGYLVIKSTITGDSA W	300
	351	SSSKKVYLGRSWDAGVKSANAYVPGTSPNGQLVIRE T TINGIVPNSAPWT	350
	401	TATSGRAYAGNAANSRDLNNQN F NRFWEYANTGSGA #	386
SI-EndoPG	1	MNLLVASLLLVLVARAAY ATPAVGASCTVSSYNDVAGAVSSCTSITLKGF	50
	51	TVPAGKALIMKLKSGTTVKVAGTIKFAVSEWKGPLVEISGSKITFSGAGG	100
	101	YFDGQGASYWDGQGDKGKTKPKFFRIKTTGGSHFNNIKLLNCPHQCVSIN	150
	201	PASDTTLTDWTVDV S AGDSKGGKNTDGF DL SNSSGITIKHAVVKNQDDCV	200
	251	AVNQGSHYVFQ N LTC SG GHGLSLSVGQSSQNGNPNTVKN V TFSDCTVTNS	250
	301	RNGIHVKTHNDAGTGAISDV T YKNIKLSGITNYGINIQEDYENGSSGNP	300
	351	KANIPISKLN L QSVTGSMSSGGSSMPVYILCGSNGC NN WN WS GV S IGNGK	350
	401	KKNSCNYKPSGFSC #	364

Figura 11 - Sequências de aminoácidos preditas para SI-PME e SI-EndoPG. A SI-PME tem uma cadeia polipeptídica de 386 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 16 resíduos e dois sítios de glicosilação, correspondentes a uma proteína de 40 kDa. A SI-EndoPG tem uma cadeia polipeptídica de 364 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 19 resíduos e quatro sítios de glicosilação, correspondente a uma proteína de 36 kDa. As sequências em negrito correspondem aos peptídeos sinais e as sublinhadas correspondem aos sítios de glicosilação.

Fonte: EVANGELISTA.³⁵

Figura 12 - Massa molecular da SI-PME. Durante purificação por gel filtração, foi calculada a massa molecular da proteína SI-PME (51 kDa), através de uma curva padrão contendo as proteínas de massas conhecidas: Ferritina, Aldolase, Conalbumina e Ovalbumina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O rendimento da produção da SI-PME e SI-EndoPG foi, respectivamente, de 80 mg e 30 mg por litro de meio de indução. Em relação a integridade das proteínas purificadas, é

possível verificar indícios de degradação para a SI-EndoPG, pois há diversas bandas de tamanhos reduzidos. O fator degradação da SI-EndoPG será melhor discutido no item 5.6.

5.2 Estabilidade das SI-Pectinases por Thermofluor

No intuito de avaliar a estabilidade térmica da estrutura terciária das SI-Pectinases sob efeito de diferentes tampões, foram realizados experimentos de Thermofluor (Tabela 1). As condições que apresentaram menores valores de T_m para SI-PME foram: carbonato de sódio pH 9,5 ($T_m = 36\text{ }^{\circ}\text{C}$), HCl ($T_m = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ácido cítrico pH 3,0 ($T_m = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$). Valores moderados ($T_m = 44\text{-}49\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram observados para os tampões de pH básicos; e os maiores valores foram atingidos pelos tampões de pH ácidos acima de 4,0 ($T_m = 50\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$), com destaque para fosfato de potássio pH 5,0 e Mes pH 6,2, ambos com $T_m = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Também foi avaliado para SI-PME o efeito da adição de 300 mM de NaCl nas mesmas condições testadas anteriormente (dados não apresentados), onde nenhuma variação nos valores de T_m foi verificada.

Para SI-EndoPG apenas as condições de pH ácido e neutro foram avaliadas. Os maiores valores de T_m foram encontrados para os tampões acetato de sódio pH 5,0 ($T_m = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), citrato de sódio pHs 4,0 e 4,7 ($T_m = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$), e fosfato de potássio pH 5,0 ($T_m = 52\text{ }^{\circ}\text{C}$). As demais condições variaram os T_m entre 44 (Bistris pH 7,0) e 49 $^{\circ}\text{C}$ (fosfato de potássio pH 6,0, fosfato de sódio pH 5,5 e citrato de sódio pH 5,5). Apesar de não ter sido avaliada a estabilidade dessa proteína nas condições de pHs básicos, é possível verificar uma tendência decrescente nos valores de T_m à medida que o pH se eleva, sugerindo que em meios básicos a estabilidade da SI-EndoPG seja baixa. Em estudos anteriores a atividade ótima da SI-EndoPG foi definida para pH 5,0 em tampão acetato de sódio,³⁵ que está dentro da faixa de maior estabilidade estrutural dessa enzima. Esses dados corroboram para a, já bem conhecida, relação entre estabilidade estrutural e função das proteínas.

Tabela 1 -Termoestabilidade das SI-Pectinases avaliada em diversas condições por Thermofluor. (-) = erro na medida; (N/A) = Condição não avaliada. Condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados para cada enzima.

pH	Tampão (50 mM)	SI-PME (T_m °C)	SI-EndoPG (T_m °C)
7,0	Controle (água)	54	40
2,0	HCl	37	-
3,0	Ácido Cítrico	38	-
4,0	Citrato de Sódio	50	51
4,5	Acetato de Sódio	51	48
4,7	Citrato de Sódio	54	51
5,0	Acetato de Sódio	54	50
5,0	Fosfato de Potássio	55	52
5,5	Citrato de Sódio	54	49
5,5	Fosfato de Sódio	54	49
5,8	Mes	55	48
6,0	Fosfato de Potássio	54	49
6,0	Bis-Tris	54	48
6,2	Mes	55	47
6,5	Fosfato de Sódio	51	48
6,5	Cacodilato de Sódio	54	47
6,5	Bis-Tris	55	45
6,5	Mes	54	47
6,7	Bis-Tris	53	47
7,0	Fosfato de Potássio	51	-
7,0	Hepes	53	47
7,0	Bis-Tris	53	44
7,3	Acetato de Amônio	-	46
7,5	Fosfato de Sódio	48	45
7,5	Tris	51	45
8,0	Imidazol	48	N/A
8,0	Hepes	49	N/A
8,0	Tris	49	N/A
8,0	Bicina	48	N/A
8,5	Tris	47	N/A
9,0	Bicina	44	N/A
9,5	Carbonato de Sódio	36	N/A
10,0	Carbonato de Sódio	-	N/A

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda em análise de Thermofluor, foi avaliada a estabilidade estrutural da SI-PME em tampão ABF entre os pH de 2 a 10 (Figura 13). Em pH 2, um sinal significativo de

fluorescência foi detectado já no início do experimento, indicando a completa desnaturação da proteína mesmo em temperatura ambiente. Em pH 3, a estrutura da SI-PME apresenta considerável estabilidade ($T_m = 43\text{ }^{\circ}\text{C}$) que segue aumentado até pH 5 e 6, ambos com $T_m = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$. Porém a partir do pH 7 ($T_m = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$) a proteína apresenta perdas contínuas e moderadas na sua estabilidade estrutural à medida em que se eleva o pH do meio, até atingir $T_m = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ em pH 10.

Figura 13 - pH-estabilidade da SI-PME. A termoestabilidade da estrutura terciária da SI-PME foi avaliada entre os pH de 2 a 10 em tampão ABF, pelo método de Thermofluor. A estrutura molecular apresentou considerável estabilidade entre os pH 3-10 com ápice entre os pH 5 e 6.

Fonte:Elaborada pelo autor.

5.3 Cristalização das SI-Pectinases

No intuito de se gerar as estruturas cristalográficas das SI-Pectinases, essas proteínas foram cristalizadas (Figura 14). A SI-PME cristalizou com cerca de 10 dias na condição 0,1 M de ácido cítrico, pH 3,5, 25% (p/v) de PEG 3.350, do kit Index. A SI-EndoPG gerou cristais pequenos e de mesmo formato, com média de 140 dias em várias condições do kit Index; aquela que apresentou maior cristal foi a condição 2,8 M de acetato de sódio trihidratado, pH 7,0 (Figura 14).

Figura 14 - Cristais de proteína das SI-Pectinases. Os cristais de SI-PME mostrados na figura cresceram em 10 dias na condição 25% (p/v) de PEG 3.350, 0,1 M de ácido cítrico, pH 3,5; os cristais de SI-EndoPG cresceram em 140 dias na condição 2,8 M de acetato de sódio trihidratado pH 7,0.

Fonte:Elaborada pelo autor.

5.4 Estrutura cristalográfica da SI-PME

A coleta, processamento e construção do modelo estrutural a partir dos dados cristalográficos da enzima SI-PME foram publicados em um artigo de 2014.²⁸ Os dados foram indexados assumindo uma estrutura monoclinica C-centrada e, após integração, as reflexões foram escalonadas e mergeadas dentro de um total de 22.383 reflexões, com um R_{merge} total de 15,8% e completeza de 96,6%. Baseados no escalonamento, o grupo espacial foi identificado como C2, com os parâmetros de célula unitária $a=122.181 \text{ \AA}$, $b=82.213 \text{ \AA}$, $c=41.176 \text{ \AA}$, $\alpha=\gamma=90^\circ$ e $\beta=97.48^\circ$ (Tabela 2). Assumindo uma única molécula com 51 kDa na unidade assimétrica, o coeficiente de Matthews foi calculado como $2.71 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, correspondendo a um conteúdo de solvente de 54,7% para o cristal.⁶⁵ A estrutura foi resolvida por substituição molecular através do programa Phaser,⁷¹ usando um “super modelo” construído a partir dos pdb's 3GRH, 1XG2, 1GQ8 e 3UW0.^{56-59,72} O método empregado gerou uma única solução no grupo espacial identificado (Função de Rotação Z-score = 9,4, Função de Translação Z-score = 180). O refinamento da estrutura foi realizado através do programa Phenix, sendo que durante todo o processo foram realizados ciclos alternados de refinamento com inspeção visual do mapa de densidade eletrônica, remodelando manualmente, quando necessário, a posição dos resíduos através do programa Coot.⁶⁰

Tabela 2 - Coleta e processamento dos dados cristalográficos da proteína SI-PME.

Dados de coleta	
Detector	APEX IICCD
Comprimento de onda (Å)	1,54166
Faixa de rotação por frame (°)	0,5
Dist. entre cristal e detector (mm)	50
Temperatura de coleta (K)	100
Faixa de resolução (Å)	36,1-2,1 (2,19-2,10)
Grupo espacial	C121
Parâmetros da célula unitária	
a, b, c (Å)	122,181 82,213 41,176
α , β , γ (°)	90 97,48 90
Reflexões únicas	22.383 (1.958)
Multiplicidade	8,27 (4,78)
Completeza (%)	96,62 (85,43)
I/ σ (I)	8,93 (1,77)
R _{merge}	0,1578 (0,5264)
Refinamento do modelo	
Nº de reflexões usadas	22.354 (2.017)
Conteúdo de solvente (%)	54,7
R _{work} /R _{free} (%)	19,50/22,31
Nº de átomos na proteína	2.794
Nº de moléculas de águas	361
R.m.s.d. ^b , comprimento das ligações (Å)	0,006
R.m.s.d. ^b , ângulo das ligações (°)	0,89
Ramachandran (%)	
Favoráveis	97
Permitidos	2,7
Não permitidos	0,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

As pectinases são raramente presentes no reino animal e esse é um dos motivos dessas enzimas serem quase que exclusivamente estudadas em plantas, bactérias, archeas e fungos. De fato, das 2.763 PMEs reportadas no banco de dados do CAZy, 841 delas são de origem eucariótica, das quais apenas quatro são de origem animal, incluindo a SI-PME. Assim como a SI-PME, as demais PMEs animais provem de insetos fitófagos. A análise da sequência de amino ácidos da SI-PME revelou maior semelhança (baseado em identidade de sequência) com as PMEs dos coleópteros *Rhynchophorus ferrugineus* (id. 80%), *Sitophilus oryzae* (76%) e *Dendroctonus ponderosae* (66%); seguida das PMEs bacterianas do gênero *Dickeya* (id. $\leq$ 40%). Estudos filogenéticos, entre 36 PMEs de origens distintas, evidenciaram que as PMEs de inseto são mais filogeneticamente próximas às PMEs bacterinas.^{33,35} Além disso, demais

evidências indicam que as PME de inseto originaram da transferência horizontal entre uma bactéria e o ancestral primitivo dos atuais coleópteros.^{33,35,73-74}

Apesar de um grande número de genes identificados e da ampla aplicação industrial das PMEs, existem apenas oito diferentes estruturas depositadas no PBD, sendo que apenas uma é de origem animal, a PME de *S. oryzae*.⁷⁵ Portanto, o estudo da estrutura cristalográfica de uma nova PME animal pode contribuir significativamente, não apenas na área de aplicações biotecnológicas, mas também na área de evolução desses artrópodes.

Apesar de haver diferentes classes de pectinases com distintos mecanismos de ação sobre as substâncias pécicas, todas as classes apresentam a mesma estrutura geral. Esse padrão estrutural foi primeiramente observado para uma pectato liase⁷⁶ e posteriormente para PGs⁷⁷ e PMEs.⁷⁸ A estrutura molecular da SI-PME revela a mesma estrutura geral das demais pectinases descritas, ou seja, um extenso núcleo hidrofóbico formado por um conjunto de β -hélices paralelas no sentido “mão-direita”, o qual é decorado externamente por *loops* e α -hélices (Figura 15).^{56-59,72,75}

Figura 15 - Estrutura cristalográfica da SI-PME. (A) A estrutura é visualizada em quatro posições diferentes ao longo de um eixo vertical; as estruturas secundárias foram diferenciadas em azul para α -hélices, vermelho para folhas- β e roxo para *loops*; as extremidades N e C-terminais são indicadas por setas. (B) e (C) mostram diferentes ângulos de visualização do sulco catalítico, onde a estrutura da SI-PME (em dourado) foi alinhada à molécula de hexasacarídeo V (em vermelho), a qual foi cristalizada juntamente com a PME de *D. dadantii* (pdb 2NTQ).

Fonte:Elaborada pelo autor.

Em análise de similaridades estruturais, a estrutura molecular da SI-PME foi alinhada individualmente com cada uma das PMEs disponíveis no banco de dados do PDB (Figura 16). Assim como esperado, o alinhamento tridimensional mostrou melhor sobreposição da SI-PME com as PMEs que apresentaram maiores semelhanças de sequência nos estudos filogenéticos anteriores.^{33,35} Em exemplo, o alinhamento da SI-PME com a estrutura de *S. levis* (id. 76%) mostrou sobreposição quase perfeita, sem qualquer diferença estrutural drástica. Além disso, observa-se que as PMEs de inseto tem maior similaridade com as PMEs bacterianas em relação às PMEs fúngicas ou vegetais. Uma das características estruturais que melhor representa esse perfil é o comprimento das voltas que sobressaem das β -hélices nas proximidades do sulco catalítico. Essas voltas são muito maiores nas PMEs bacterianas e de inseto, quando comparadas às PMEs fúngicas ou vegetais (Figura 16 e 17). Devido essa particularidade estrutural, as PMEs bacterianas e de insetos apresentam um sulco catalítico mais profundo e estreito (Figura 16 e 17).

(continua)

(continuação)

Figura 16 - Alinhamento estrutural das PMEs de diferentes reinos. A estrutura tridimensional da SI-PME (dourado) foi alinhada às PMEs reportadas para os reinos animal (azul), vegetal (verde), monera (violeta) e fungi (vermelho). Foram usadas as estruturas: (A) *S. oryzae* (pdb 4PMH), (B) *E. coli* (pdb 3GRH), (C) *Erwinia chrysanthemi* (pdb 1QJV), (D) *Yersinia enterocolitica* (pdb 3UW0), (E) *Aspergillus niger* (pdb 5C1C), (F) *Daucus carota* (pdb 1GQ8) e (G) *Solanum lycopersicum* (pdb 1XG2). A SI-PME mostra uma sobreposição estrutural quase perfeita com a estrutura de *S. oryzae*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 - Diferença entre os sulcos-catalítico das PMEs dos diferentes reinos. A figura mostra a similaridade do sulco catalítico das PMEs de inseto com as de bactéria, quando comparado com os sulcos-catalítico de fungos e plantas. Estruturas cristalográficas representativas das PMEs descritas para insetos, bactérias, fungos e plantas foram alinhadas à molécula de hexasacarídeo V (em amarelo), a qual foi cristalizada juntamente com a PME de *D. dadantii* (pdb 2NTQ). (A) SI-PME; (B) *E. chrysanthemi* (pdb 1QJV); (C) *A. niger* (pdb 5C1C); (D) *D. carota* (pdb 1GQ8).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Mesmo revelando maior similaridade com as PMEs bacterianas, as PMEs de inseto, no entanto, apresentam uma característica exclusiva de seu grupo, diferenciando-as de qualquer outro, inclusive do grupo das bactérias. Interessantemente, o N-terminal das PMEs de inseto se alinham com o C-terminal de todas as outras PMEs (Figura 18A). Essa particularidade já havia sido notada por Teller e colaboradores,⁷⁵ que a identificaram como um caso de permutação circular. Permutações circulares são caracterizadas por uma mudança na ordem dos amino ácidos em sua sequência peptídica, resultando em uma proteína com porções estruturais conectadas de forma diferente, porém mantendo a estrutura tridimensional geral da proteína original⁷⁹ (Figura 18B). As permutações circulares são consideradas incomuns e podem ocorrer através de dois mecanismos distintos: eventos evolucionários (genéticos) ou pós-traducionais.⁷⁹ O primeiro caso foi descrito em 1979 para o par de proteínas concavanalina A e lectina, permutada pós-traducionalmente por uma clivagem seguida de uma ligação peptídica incomum.⁸⁰ Hoje mais de 2.000 casos de permutação circular são descritos no CPDB (*Circular Permutation Data Bank*).

Figura 18 - Permutação circular entre as PMEs de inseto e as PMEs dos demais reinos. A figura A, elaborada por Teller e colaboradores ⁷⁵, ilustra a permutação circular entre as PMEs de inseto (esquerda) e as demais PMEs (direita). A figura B elaborada por Bliven e colaboradores ⁷⁹ ilustra de forma didática um evento de permutação entre um par de proteínas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como mencionado anteriormente, evidências sugerem que a origem das PMEs na família *Curculionidae* deva-se a um evento evolucionário conhecido como transferência horizontal, onde um fragmento de DNA de um organismo integra-se ao genoma de um outro organismo. Mais precisamente neste caso, acredita-se que esse evento ocorreu entre uma bactéria e o inseto ancestral comum aos coleópteros. O alinhamento realizado entre as sequências de amino ácidos das PMEs de inseto indica que a permutação circular ocorre em todas as sequências, portanto é uma particularidade desse grupo, além disso, o alinhamento aponta que a causa da permutação é genética e não pós-traducional. ⁷⁵ Considerando ambas inferências, aqui especula-se que durante a transferência horizontal fragmentos do gene PME sofreram fissões e fusões rearranjando a informação genética de modo a codificar uma proteína com a permutação circular aqui descrita.

5.5 Modelo de envelope molecular

Para melhor compreender o mecanismo de ação e comportamento molecular da enzima SI-PME em solução, foram realizados experimentos de SAXS (Figura 19). A proteína apresentou R_g de 26,08 Å, calculado pela análise de Guinier (Figura 19) e massa molecular de 42,7 kDa estimada pelo SAXS_MoW. Os dados de SAXS revelam que SI-PME é um monômero em solução, em acordo com o observado em de gel filtração (Figura 12). A função $P(r)$ é consistente para uma partícula com D_{max} de 90 Å e R_g de 27,06 Å, em acordância com o valor obtido na análise de Guinier (Figura 19). Dez modelos independentes de envelope foram gerados usando dados experimentais e mesclados.

Figura 19 - Dados de SAXS da SI-PME. Perfil experimental de espalhamento foi comparado com o perfil calculado do envelope molecular da SI-PME e de modelos homologos (A). A análise de Guinier na região linear mostra que os dados satisfazem a condição $q < 1.3/R_g$. (A, imagem inserida). A função $P(r)$ (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modelo final do envelope molecular tem forma semelhante a uma garrafa, devido a sua cauda c-myc epitope + 6xHist-tag (Figura 20). Como mencionado na introdução deste capítulo, o vetor de expressão heteróloga em *P. pastoris* adiciona, ao C-terminal da proteína-alvo, um c-myc epitope, usado em ensaios de imunodetecção, mais a 6xHis-tag, usada na purificação da proteína. O modelo final também destaca o sitio catalítico caracterizado por um extenso sulco. A maior parte do envelope molecular se sobrepõe perfeitamente à estrutura cristalográfica da SI-PME (Figura 20), porém não totalmente, uma vez que a cauda c-myc epitope + 6xHist-tag não gerou, durante os experimentos de espalhamento de raios-X, densidade eletrônica favorável à sua detecção. Os dados experimentais de SAXS estão sumarizados na Tabela 3.

Figura 20 - Modelo à baixa resolução da SI-PME. O envelope molecular da SI-PME (em cinza-transparente) obtido através dos experimentos de SAXS foi sobreposto com o modelo estrutural cristalográfico da SI-PME (em dourado).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Dados de coleta e processamento de SAXS da SI-PME.

Dados de coleta	
Feixe de luz	LNLS-SAXS1
Comprimento de onda (Å)	1,488
Variação de q (Å ⁻¹)	0,0129 – 0,3500
Tempo de exposição por <i>frame</i> (s)	30
Concentrações de proteína (mg/mL)	1-6
Temperatura (°C)	20
Análise dos dados	
R _g (Å) (Guinier) (± Desv. padrão)	26,08 +- 0,41
R _g (Å) (GNOM) (± Desv. padrão)	27,06 +- 0,165
D _{max} (Å)	90
Resolução (Å)	16
Massa molecular experimental (kDa)	42,747
Massa molecular teórica (kDa)	44,038
Estado oligomérico	Monômero
Modelamento <i>Ab initio</i>	
Número de modelos	10
Discrepância espacial normalizada	0,673 +- 0,036
χ	1,676
Software usado	
Primeira redução de dados	Fit2D
Processamento de dados	PRIMUS
Modelamento	GASBOR

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Estrutura cristalográfica da SI-EndoPG

O conjunto de dados cristalográficos da SI-EndoPG foram indexados assumindo uma estrutura trigonal e, após integração, as reflexões foram escalonadas e mergeadas dentro de um total de 21.182 reflexões, com um R_{merge} total de 3,17% e completeza de 100%. Baseados no escalonamento, o grupo espacial foi identificado como P 3₂21, com os parâmetros de célula unitária a=45,499 Å, b=45,499 Å, c=114,522 Å, α=β=90° e γ=120 ° (Tabela 4). Assumindo uma única molécula com 14,6 kDa na unidade assimétrica, o coeficiente de Matthews foi calculado como 2.32 Å³ Da⁻¹, correspondendo um conteúdo de solvente de 47% para o cristal. O método de substituição molecular empregado gerou uma única solução no grupo espacial identificado (Função de Rotação Z-score = 87, Função de Translação Z-score = 13,5).

Tabela 4 - Coleta e processamento dos dados cristalográficos da proteína SI-EndoPG.

Dados de coleta	
Detector	PILATUS 2M
Comprimento de onda (Å)	1,458
Faixa de rotação por frame (°)	0,5
Dist. entre cristal e detector (mm)	150
Temperatura de coleta (K)	100
Faixa de resolução (Å)	27.42 - 1.95 (2.019 - 1.95)
Grupo espacial	P 3 ₂ 2 1
Parâmetros da célula unitária	
a, b, c (Å)	45,499 45,499 114,522
α , β , γ (°)	90 90 120
Reflexões únicas	10.591(1.045)
Multiplicidade	2,0 (2,0)
Completeza (%)	100 (100)
I/ σ (I)	11,08 (2,27)
R _{merge}	0,03166 (0,1172)
Refinamento do modelo	
Nº de reflexões usadas	21.182 (2.090)
Conteúdo de solvente (%)	47,00
R _{work} /R _{free} (%)	21,46/26,92
Nº de átomos na proteína	988
Nº de moléculas de águas	115
R.m.s.d. ^b , comprimento das ligações (Å)	0,008
R.m.s.d. ^b , ângulo das ligações (°)	1,16
Ramachandran (%)	
Favoráveis	90
Permitidos	
Não permitidos	1,5

Fonte:Elaborada pelo autor.

Como já mencionado acima, as pectinases são quase que exclusivamente estudadas para plantas, bactérias e fungos, sendo raramente identificadas no reino animal. Assim como as PMEs, algumas poucas PGs foram reportadas para insetos fitófagos da família *Curculionidae* 29; 30; 33; 35; 74; 81; 82. De fato, das 4.706 GH28 reportadas no banco de dados do CAZy, 2.601 delas são de origem eucariótica, das quais apenas nove PGs são de origem animal, incluindo a SI-EndoPG. Além disso, dentre as sete estruturas de PGs depositadas no PDB, cinco são de fungos, uma de bactéria e uma de planta, inexistindo qualquer estrutura de origem animal, justificando a importância do estudo da estrutura molecular da SI-EndoPG.

A análise da sequência de amino ácidos da SI-EndoPG revelou maior semelhança (baseado em identidade de sequência) com as PGs dos coleópteros *S. oryzae* (id. 74%), *D. ponderosae* (68%), *Diabrotica virgifera* (id. 57%), *Chrysomela tremula* (id. 57%), *Gastrophysa viridula* (id. 56%), *Phaedon cochleariae* (id. 56%), *Leptinotarsa decemlineata* (id. 56%), *R. ferrugineus* (id. 76%); seguida das PGs fúngicas do gênero *Talaromyces* (id. $\leq$ 52%). Estudos filogenéticos, entre 33 PGs de origens distintas, evidenciaram que as PGs de inseto são mais filogeneticamente próximas às PGs fúngicas.^{33,35} Além disso, demais evidências indicam que as PGs de inseto originaram da transferência horizontal entre um fungo e o ancestral primitivo dos atuais coleópteros.^{33,35,74,82} Portanto, o estudo da estrutura molecular da SI-EndoPG seria de grande valia não apenas no âmbito das aplicações biotecnológicas, mas principalmente na área de evolução desses insetos praga. Porém, a análise da estrutura da SI-EndoPG mostrou que apenas parte da molécula foi cristalizada de fato, sugerindo que a proteína fora clivada (Figura 21). Esse padrão foi observado para todos os cristais coletados nas diversas condições em que foram obtidos.

Figura 21 - Estrutura molecular obtida para os cristais da SI-EndoPG. A estrutura cristalográfica construída a partir dos cristais da SI-EndoPG (azul), quando comparada à PG de *C.lupini* (pdb: 2IQ7), revela que apenas parte da molécula da SI-EndoPG foi de fato cristalizada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O fato de apenas parte da molécula da proteína SI-EndoPG ter sido cristalizada, levou ao questionamento sobre os motivos que levaram a proteína a ser clivada durante processo de cristalização. Nesse âmbito, testamos a teoria de que a clivagem era resultante de ação de

proteases que teriam persistido até mesmo após etapas de purificação. A proteína SI-EndoPG foi novamente produzida e purificada como descrito anteriormente e em seguida analisou-se o tratamento da amostra com 10 mM de inibidor de proteases (SigmaFastTM, Sigma) incubada à 18 °C durante 5 dias (Figura 22). A teoria foi confirmada uma vez que a amostra não tratada apresentou sinais de degradação muito mais elevados que a amostra tratada. De fato, o experimento revelou que a SI-EndoPG praticamente já não existe na sua forma íntegra, decorridos 5 dias sem o tratamento anti-proteases. Além disso, é possível observar que mesmo a amostra tratada também foi drasticamente afetada, ainda que em intensidade reduzida.

A proteína SI-EndoPG foi mais uma vez produzida, mas dessa vez tratada com 100 mM de inibidor SigmaFastTM durante todo processo de purificação até encaminhamento para ensaios de cristalização. Entretanto, mesmo após a nova estratégia, cristais de SI-EndoPG surgiram somente nas condições anteriormente observadas e em tempo médio similar (~140 dias). Além disso, o modelo cristalográfico gerado a partir desses cristais revelaram o mesmo resultado antes observado, ou seja, novamente o mesmo fragmento da molécula foi cristalizado.

Figura 22 - Degradação da SI-EndoPG. A proteína SI-EndoPG foi avaliada quanto a degradação por peptidases. O SDS-PAGE mostra a diferença entre amostra tratada com 10 mM de coquetel inibidor de proteases (+) e da amostra não tratada (-), após 5 dias à 18 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 Conclusão

- As análises bioquímicas mostram que as SI-Pectinases são monoméricas em solução. Também foi concluído que a melhor estabilidade estrutural das proteínas SI-PME e SI-EndoPG estão entre os pHs 5-6 e 4-5, respectivamente.
- A análise da estrutura cristalográfica da SI-PME evidencia alta similaridade com a PME do inseto *S. oryzae*. Também foi concluído que as estruturas das PMEs de inseto são mais similares às bacterianas, quando comparadas com as fúngicas e vegetais, principalmente em relação ao sulco catalítico. Ainda em análise estrutural, as PMEs de inseto apresentam uma particularidade exclusiva de seu grupo, a qual é conhecida como permutação circular. Aqui sugere-se, que essa particularidade pode ser resultado direto do evento de transferência horizontal, que conferiu o gene PME aos insetos da família *Curculionidae*.
- O modelo de envelope molecular da SI-PME acomoda perfeitamente a estrutura cristalográfica dessa proteína e ainda revela a presença da cauda (c-myc epitope + 6xHist-tag) no C-terminal da proteína, a qual não foi detectada nos experimentos de cristalografia de raios-X.
- A molécula da SI-EndoPG mostrou susceptibilidade à degradação por provável ação de proteases, a qual resultou na cristalização de apenas uma parte da proteína SI-EndoPG. Essa circunstância impossibilitou o avanço dos estudos estruturais que buscavam revelar as similaridades e diferenças entre as estruturas das PGs de origem animal, vegetal, fúngica e bacteriana.

Capítulo II

Bl-ExoPG: uma nova exo-poligalacturonase de *Bacillus licheniformis*

7 Introdução

B. licheniformis tem sido de grande importância na produção de muitas biomoléculas de interesse industrial, entre elas, principalmente as enzimas. *B. licheniformis* é uma bactéria gram positiva, comumente encontrada no solo.⁸³ Esse micro-organismo tem taxa ótima de crescimento a 65 °C, mas apesar disso é considerado mesofílico, pois sua capacidade de crescimento abrange as temperaturas entre 15 e 68 °C.⁸³ A alta performance em secretar uma serina peptidase alcalina, tornou *B. licheniformis* um importante micro-organismo no setor industrial de enzimas.⁸⁴ Posteriormente, essa bactéria também ganhou importância como um produtor de biodetergentes.⁸⁵⁻⁸⁶ Desde então, *B. licheniformis* tem sido usado como uma importante fonte de bioprospecção de diversas enzimas de interesse industrial como celulases, xilanases⁸⁷⁻⁸⁹ e pectinases.⁹⁰⁻⁹²

Dada a importância desse organismo, nosso laboratório adquiriu a cepa de *B. licheniformis* ATCC14580, cujo genoma sequenciado está publicamente disponível (GenBank: GCA_000011645.1).⁹³ A análise do genoma permitiu a identificação de uma sequência codificante para uma exo-PG ainda não estudada, que nomeamos de Bl-ExoPG. A ORF Bl-ExoPG (GenBank: AAU42338.1) foi amplificada a partir do DNA genômico de *B. licheniformis* e clonada em vetor de expressão pETTRXA-1a/LIC, anteriormente pelo nosso grupo.⁹⁴ O plasmídeo resultante foi construído para expressar a proteína alvo fusionada, em seu N-terminal, à 6xHis-tag + proteína tireodoxina (Trx) + sítio de clivagem para a protease de *Tobacco etch virus* (TEV). Esse DNA então foi utilizado para gerar células de *E. coli* Rosetta expressoras da proteína recombinante Bl-ExoPG,⁹⁴ a qual foi objeto dos estudos funcionais e estruturais descritos a seguir.

8 Materiais & Métodos

8.1 Expressão heteróloga e purificação de proteínas

Células de *E. Coli* Rosetta foram usadas na expressão da proteína BI-ExoPG a 37 °C durante 5 h, seguida de 24 h a 18 °C em meio auto indutor ZYM-5052⁹⁵ contendo lactose como agente indutor. Subsequentemente, as células foram centrifugadas a 2.000 $\times g$ por 45 min sob 4 °C, suspendidas em tampão de lise (50 mM de Tris pH 8,0, 300 mM de NaCl, 5 mM de imidazole, 5% de glicerol, 1 mM de PMSF, 1 mM de DTT e 25 $\mu g/mL$ de lisozima) adicionado de 1X de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFastTM, Sigma) e incubados por 40 min sob temperatura ambiente. As células foram rompidas por sonicação em gelo pelo equipamento 550 Sonic Dismembrator Sonifier (Fisher Scientific). Após centrifugação (6.000 $\times g$, por 30 min a 4 °C) a proteína alvo foi purificada do sobrenadante através de três etapas de cromatografia: duas etapas de afinidade por Ni⁺² (uma anterior e uma posterior ao tratamento com TEV protease) e uma de exclusão molecular. No primeiro passo de purificação, a proteína recombinante foi eluída em tampão 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM de NaCl e 100 mM de imidazol. O imidazol foi removido posteriormente por diálise em mesmo tampão. A proteína purificada foi incubada com 3 mg/mL de TEV protease durante 48 h a 4 °C. No segundo passo de purificação, a proteína recombinante sem a cauda 6xHist-Trx foi eluída em 100 mM de fosfato de potássio pH 8,0, 150 mM de NaCl. Para garantir a pureza da amostra, foi adicionado um terceiro passo de purificação por gel filtração na coluna SuperdexTM 200 prep grade 16/60 (GE) com 100 mM de fosfato de potássio pH 7,5 e 150 mM de NaCl. A pureza das amostras foi avaliada em SDS-PAGE 15% coradas com Comassie blue.

8.2 Determinação da massa molecular

A massa molecular da proteína BI-ExoPG foi determinada durante purificação em coluna de gel filtração SuperdexTM 200 prep grade 16/60 (GE), seguindo o método descrito no item 4.2.

8.3 Thermofluor – Triagem de melhor condição para estabilidade da proteína

Foram realizados experimentos de Thermofluor, no intuito de avaliar a estabilidade térmica da estrutura terciária da BI-ExoPG sob efeito de diferentes tampões. Os experimentos foram realizados seguindo o método descrito no item 4.3.

8.4 Ensaios de atividade

A atividade enzimática foi quantitativamente determinada pelo método DNS que mensura a quantidade de extremidades redutoras dos açúcares.⁹⁶ Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata adicionados de um branco. A reação constitui-se de 2,2 μ M de enzima, 1% (p/v) de substrato e 100 mM de tampão em volume final de 50 μ L, incubados por 20 min. A reação foi parada com 100 μ L de solução DNS, aquecida a 95 °C por 5 min e imediatamente resfriada em gelo por 1 min. A absorbância foi mensurada a 540 nm usando o equipamento MultiSkan Spectrum (Thermo Scientific); e o valor obtido pelo branco foi descontado do valor de cada uma das reações de sua respectiva triplicata.

O substrato específico da enzima foi determinado testando-se cinco diferentes substratos (Sigma): Poli-AGal; pectina de citrus 20-34% esterificada; pectina de maçã 75% esterificada; carboximetilcelulose (CMC) e xilano. Os valores de absorbância foram convertidos em valores de atividade relativa. Tendo a BI-ExoPG mostrado maior atividade pelo substrato não metilado, todos os demais experimentos foram conduzidos com Poli-AGal.

A temperatura ótima da enzima foi determinada em fosfato de potássio pH 7,0 variando a temperatura entre 40-80 °C. O pH ótimo da enzima foi determinado a 60 °C em tampão citrato de sódio/glicina/fosfato de sódio variando o pH entre 2-10. Para avaliar a termoestabilidade, a enzima foi pré-incubada a 50, 60 e 70 °C durante longos períodos no pH ótimo pré-determinado. Para avaliar a estabilidade frente à variação de pH, a enzima foi pré-incubada durante 30 min em tampão acetato de sódio/borato de sódio/fosfato de sódio nos pH de 2 a 10 sob a temperatura ótima pré-determinada. Após tratamentos, a atividade residual relativa foi avaliada nas condições ótimas de tampão, pH e temperatura pré-determinadas. Além disso, o desempenho da enzima foi analisado na presença de 15 diferentes aditivos. Os parâmetros cinéticos atividade específica, V_{max} , K_M and k_{cat} foram definidos utilizando-se D-(+)-ácido-galacturônico monohidratado (Sigma) na construção de uma curva padrão de concentração de produto gerado. As reações foram realizadas nas condições ótimas pré-determinadas aumentando-se a concentração do substrato de 0,1 à 9 mg/mL.

Todos os dados de atividade foram analisados usando o software GraphPad Prism (versão 5.0). Para definição dos valores ótimos de pH e temperatura, usou-se a análise estatística “Sum of two Gaussians” e para os parâmetros cinéticos, usou-se a análise “Michaelis-Menten” e “ k_{cat} ”.

8.5 Determinação do padrão de clivagem

O método de cromatografia de camada delgada, ou TLC (“Thin layer chromatography”) ⁹⁷ foi usado para analisar os produtos solúveis gerados pela clivagem enzimática da BI-ExoPG. A reação foi conduzida com 0,1% de Poli-AGal nas condições otimizadas de tampão, pH e temperatura. As amostras foram coletadas após 0,5, 1,5 e 3 h de reação, centrifugadas a 13.000 xg por 5 min e o sobrenadante aplicado nas folhas de sílica 60 F₂₅₄ para TLC (Merck). A cromatografia deu-se através de dez corridas alternando-se entre duas soluções/matriz de corrida (solução A: 1-butanol: 2-propanol: ácido acético: água (7:5:2:4); e solução B: 1-butanol: ácido acético: água (4:5:1)). Após secar a folha de TLC, essa foi borrifada com solução de ácido sulfúrico 5% em etanol absoluto e aquecida por 10 min a 105 °C.

Para confirmar o resultado do experimento de TLC, também foi realizada uma cromatografia de troca aniônica de alto desempenho através do sistema HPAEC-PAD (ICS-5000, Dionex) equipado com a coluna analítica CarboPAC1 (250 mm x 2 mm i.d., Dionex). O fluxo foi de 0,5 mL/min (30 °C); a injeção de volume de 1 µL e a eluição realizada em duas etapas: gradiente linear de 0,05 a 0,7 M de acetato de sódio em 0,1 M de NaOH por 65 min, seguido de outro gradiente linear até 1 M de acetato de sódio por 10 min. Monômero de ácido galacturônico (Mono-AGal) e trímero de ácido galacturônico (Tri-AGal) foram usados como padrão em ambos os experimentos.

8.6 Cristalização

A proteína purificada foi concentrada até 16 mg/mL em tampão 25 mM Tris pH 8,0, 100 mM de NaCl e submetida à triagem de condição de cristalização, segundo método descrito no item 4.4.

8.7 Coleta e processamento de dados cristalográficos por difração de raios-X

Os dados cristalográficos dos cristais de BI-ExoPG foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, utilizando a linha MX2 com comprimento de onda de 1,48 Å e o detector MAR Mosaic 225 CCD (MAR USA) ⁹⁸. Os cristais foram coletados com loops (Hampton), adicionados à solução 10-20% (v/v) de etileno glicol e resfriados a -173 °C sob fluxo de nitrogênio líquido. Os dados cristalográficos obtidos foram processados pelo programa iMosflm, ^{61; 62; 63} onde foram considerados insatisfatórios

(resolução abaixo de 4 Å) para determinação dos parâmetros de dimensão e orientação (a, b, c, α , β e γ) da célula unitária.

8.8 SEC-SAXS

A técnica de SAXS, como já descrito no item 4.6, tem grande importância nos estudos estruturais à baixa resolução das proteínas. Uma variação dessa técnica é o SEC-SAXS (“Size Exclusion Chromatography-SAXS”) que acopla um passo automatizado de cromatografia de exclusão molecular à coleta de dados experimentais de SAXS. Essa variação: garante melhor precisão na subtração dos dados de espalhamentos derivados do tampão da amostra; requer menor concentração de proteína; reduz a interação intermolecular entre os componentes da amostra sendo, portanto, ideal para casos de proteínas que se agregam após reconcentração da amostra, além disso permite a medida dos constituintes individuais presente em uma mistura.

Experimentos de SEC-SAXS foram conduzidos para a proteína Bl-ExoPG, onde o envelope molecular foi determinado. Os dados experimentais foram coletados pelo Prof. Dr. Mario Oliveira Neto, na linha B21 do instituto de pesquisa Diamond Light Source Synchrotron (Diot, Reino Unido) com apoio do Dr. Robert Rambo. As amostras de proteína purificada foram centrifugadas a 17.000 xg por 2 horas a 4 °C e, então, carregadas em coluna KW-403 (Shodex) de volume 4,8 mL, acoplada ao sistema HPLC (Agilent, Série-1200). A coluna havia sido previamente equilibrada com tampão 50 mM de Tris pH 8,0, 150 mM de NaCl e 5% (p/v) de glicerol. Durante as medidas de SAXS, 40 µl da amostra migrou em vácuo, através de um capilar de quartzo com 1,6 mm de espessura, em fluxo de 0,16 mL/min a 25 °C. O intervalo de aquisição para cada imagem coletada foi de 3 segundos. Os dados do tampão (a serem usados na subtração da amostra) foram coletados após 1,5 volumes de coluna. A coleta foi realizada utilizando o detector Pilatus2M (Dectris) configurado para cobrir a transferência de momento dentro da faixa $4.014\text{E-}03 \text{ Å}^{-1} < q < 4.07\text{E-}01 \text{ Å}^{-1}$ ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$, onde 2θ representa o ângulo de espalhamento).

Os dados coletados de SAXS foram processados pelo aluno de doutorado Evandro Ares de Araujo. A média, escalonamento e mergeamento dos dados de SAXS foram processados usando o software próprio do equipamento e o programa ScÅtter (Diamond Light Source, Didcot, Reino Unido, www.bioisis.net/tutorial/9). O R_g foi estimado através da análise de Guinier e também pelo programa ScÅtter, o mesmo foi usado para determinar o $P(r)$ e o D_{max} . A massa molecular experimental baseada nos dados de SAXS foi calculada

através do programa SAXSMoW.^{67,99} 21 *ab initio* modelos DAMs (“Dummy Atom Models”) foram gerados no DAMMIF,¹⁰⁰ onde o modelo DAMSTART foi melhorado com o software DAMMIN,¹⁰¹ ambos incluídos no ATSAS.¹⁰² O melhor modelo foi sobreposto ao modelo gerado por homologia através do programa SUPCOMB.¹⁰³ Baseado nas estruturas cristalográficas depositadas do banco de dados do PDB e também no modelo gerado por homologia, os perfis de espalhamento teórico dos modelos de envelope e de modelos homólogos foram comparados aos perfis de espalhamento experimental via software FoXS.⁶⁹

9 Resultados & Discussão

9.1 Produção e purificação da Bl-ExoPG

A análise de bioinformática para a sequência de aminoácidos (Figura 23) predizeram para a Bl-ExoPG uma cadeia polipeptídica de 436 aminoácidos com ponto isoelétrico de 6,1, massa molecular de 48 kDa. A enzima foi expressa como uma proteína fusionada à uma cauda 6xHist-Trx e massa total aproximada de 65 kDa (Figura 23).

Bl-ExoPG	1	MSLQKIKEEIVKKLKVPVFPNRSFDVTSFGADENGKNDSTEAIQKAIDQA	50
	51	HQAGGGRVTVPEGVFLSGALRLKSNVDLHIAKGAVIKFSQNPEDYLPVVL	100
	101	TRFEGVELYNYSPLIYAYEADNIAITGKGTLDGQGDDEHWWPWKRGTNGQ	150
	201	PSQEKDRNALFEMAERGIPVTERQFGKGHYLRPNFIQPYRCKHILIQGV	200
	251	VLNSPMWQVHPVLCENVTVDGIKVIGHGPNTDGVNPESCKNVVIGCHF	250
	301	NGDDCIAVKSGRNADGRRINIPSENIVIEHNEMKDGHHGGVTIGSEISGGV	300
	351	KNVIAEGNLMDSPNLDRALRIKTNVSRGGVLENIYFHKNTVKSLEKRE	350
	401	IDMEYEEGDAGDFKPVVRTVDVKQLKSMGGQYGIRVLAYDHSPVTGLKVA	400
	451	DSEIDGVDVPMELKHVKDPVFSNLYINGKRYDSHKA#	436

Figura 23 - Sequência de aminoácidos predita para Bl-ExoPG. A sequência polipeptídica de 436 aminoácidos corresponde a uma proteína com ponto isoelétrico de 6,1 e massa molecular de 48 kDa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em primeiro passo de purificação por cromatografia de afinidade por Ni^{+2} , a proteína fusionada foi eluída em tampão contendo 100 mM de Imidazol. Em segundo passo, a cauda foi removida por tratamento com TEV protease e a proteína não-fusionada foi, então, purificada em cromatografia de afinidade por Ni^{+2} , onde dessa vez foi eluída em 65 mM de Imidazol, indicando uma forte interação pela coluna mesmo após remoção da cauda. O peso molecular é similar ao teórico estimado (48 kDa) pela análise prévia da sequência de aminoácidos. Em seguida, para assegurar a pureza da amostra, essa foi purificada em gel filtração, onde a proteína Bl-ExoPG foi eluída em um único pico cromatográfico (Figura 24). Durante purificação por gel filtração também foi realizado o cálculo experimental da massa molecular da Bl-ExoPG, que resultou em uma proteína de 54 kDa (Figura 24), indicando, portanto, que essa enzima assume forma monomérica em solução. O cálculo experimental de massa molecular por gel filtração é baseado em proteínas globulares, portanto, a singela diferença de 6 kDa entre a massa experimental e a teórica deve-se, provavelmente, ao formato

ligeiramente alongado da BI-ExoPG, que aumenta seu tempo de retenção na coluna, assemelhando-a a uma proteína globular de 54 kDa.

Figura 24 - Expressão, purificação e determinação da massa molecular da BI-ExoPG. A) O SDS-PAGE mostra os passos de purificação da BI-ExoPG; 1: total de proteínas solúveis; 2: BI-ExoPG fusionada com a cauda 6xHis-Trx (~ 65 kDa) após purificação por cromatografia por afinidade por Ni^{+2} ; 3: BI-ExoPG após remoção da cauda 6xHis-Trx por TEV protease; 4: BI-ExoPG (~50 kDa) após segunda purificação por cromatografia por afinidade por Ni^{+2} e por exclusão molecular. B) Perfil da cromatografia de exclusão molecular contendo os marcadores moleculares Ferritina (440 kDa), Aldolase (150 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Ovalbumina (44 kDa) sobrepondo o pico de eluição da BI-ExoPG. C) Curva de calibração experimental indicando massa molecular de aproximadamente 54 kDa para BI-ExoPG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

9.2 Estabilidade da BI-ExoPG por Thermofluor

No intuito de avaliar a estabilidade térmica da estrutura terciária da BI-ExoPG sob efeito de diferentes tampões, foram realizados experimentos de Thermofluor (Tabela 5). As condições que apresentaram menores valores de T_m para enzima foram: ácido cítrico pH 3,0 ($T_m = 41^\circ\text{C}$), acetato de sódio pH 4,5 ($T_m = 56^\circ\text{C}$) e citrato de sódio pH 4,0 ($T_m = 57^\circ\text{C}$). A partir do pH 4,7, em citrato de sódio, foi verificado um salto positivo na estabilidade da proteína para todos os demais tampões e pHs ($T_m = 61\text{--}72^\circ\text{C}$), sendo o maior valor de 72°C determinado para Hepes e Tris, ambos com pH 8,0. Esses dados indicam que a estrutura terciária da BI-ExoPG tem considerável estabilidade entre os pHs 5 e 10. De fato, se

camparada às outras pectinases estudadas no capítulo anterior (SI-Pectinases), a BI-ExoPG apresenta estabilidade muito superior a elas até mesmo no tampão fosfato de potássio pH 5,0, onde a SI-PME e a SI-EndoPG apresentaram seus maiores valores de T_m (67 °C para BI-ExoPG, 55 °C para SI-PME e 52 °C para SI-EndoPG) (Tabela 1 e Tabela 5).

Tabela 5 - Termoestabilidade da BI-ExoPG em diversos tampões. A termoestabilidade da estrutura terciária da BI-ExoPG foi avaliada sob efeito de diversos tampões e pHs por Thermofluor. (-) = erro na medida. Condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados.

pH	Tampão (50 mM)	BI-ExoPG (T_m °C)
7	Controle (água)	67
3	Ácido Cítrico	41
4	Citrato de Sódio	57
4,5	Acetato de Sódio	56
4,7	Citrato de Sódio	62
5	Acetato de Sódio	61
5	Fosfato de Potássio	67
5,5	Citrato de Sódio	66
5,5	Fosfato de Sódio	70
5,8	Mes	64
6	Fosfato de Potássio	70
6	Bis-Tris	63
6,2	Mes	64
6,5	Fosfato de Sódio	70
6,5	Cacodilato de Sódio	68
6,5	Bis-Tris	67
6,5	Mes	65
6,7	Bis-Tris	65
7	Fosfato de Potássio	71
7	Hepes	71
7	Bis-Tris	70
7,3	Acetato de Amônio	-
7,5	Fosfato de Sódio	71
7,5	Tris	71
8	Imidazol	68
8	Hepes	72
8	Tris	72
8	Bicina	-
8,5	Tris	71
9	Bicina	69
9,5	Carbonato de Sódio	68
10	Carbonato de Sódio	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

9.3 Caracterização enzimática da Bl-ExoPG

9.3.1 Especificidade de substrato

Em análise de substrato específico, a enzima Bl-ExoPG apresentou atividade enzimática unicamente para os substratos pécnicos, ou seja, nenhuma atividade significativa foi verificada para CMC ou xilano (Tabela 6). A maior atividade relativa (100%) foi verificada para Poli-AGal, seguido de 20 % para pectina de citros e apenas 2% para pectina de maçã. A especificidade enzimática por pectina não-metilada é uma característica comum para todas as GH28 descritas. Além disso, já é bem conhecido que a remoção de grupos metilester das pectinas metiladas, por ação enzimática prévia de uma PME, aumenta a afinidade das PGs pelo substrato.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Tabela 6 - Substrato específico e influência de aditivos na atividade da Bl-ExoPG.

Substratos (1%)	Atividade Rel. (%)	Aditivos (4 mM)	Atividade Rel. (%)
Poli-AGal	100	Control	100
Pectina de citros	20	K ⁺¹	96,2
Pectina de maçã	2	Mg ⁺²	91,9
CMC	0	β-ME	89,7
Xilano	0	Li ⁺²	88,0
		DTT	83,3
		Ca ⁺²	74,7
		Ni ⁺²	73,5
		Mn ⁺²	68,5
		Fe ⁺³	64,6
		Cu ⁺²	30,4
		Co ⁺²	36,0
		Fe ⁺²	11,8
		Aditivos (0,1%)	
		Triton x100	96,6
		Tween 20	87,4
		SDS	24,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

9.3.2 Influência de aditivos na atividade da Bl-ExoPG

Em avaliação da influência de íons metálicos, detergentes e agentes redutores na performance enzimática da Bl-ExoPG (Tabela 6), nenhum efeito positivo foi observado para

qualquer dos aditivos testados, ao invés disso, todos eles causaram algum decréscimo na atividade enzimática. O maior detrimento foi verificado para tratamento com SDS (perda de 76% na atividade original) e para íons bivalentes, principalmente para Fe^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2} com perdas de 88%, 70% e 64%, respectivamente. Esses resultados estão em acordo com o comportamento de outras PGs descritas. Por exemplo, a PG de *Pleurotus ostreatus* perdeu 29,4%, 33%, 48,2%, 56,3% e 95,8% na sua atividade original após tratada com Ni^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} e Fe^{+3} , respectivamente ¹⁰⁷. A exo-PG de *Bacillus* KSM-P576 mostrou estabilidade em 5 mM de β -Mercaptaetanol, mas perdeu, respectivamente 69%, 28% e 10% de atividade após tratada com Cu^{+2} , Ni^{+2} e SDS ¹⁰⁸. Notavelmente, essa enzima teve ganho em atividade de 60%, 36%, 18% e 16% quando tratada com Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} e Fe^{+3} ¹⁰⁸.

9.3.3 Atividade ótima da BI-ExoPG

Em determinação das condições ótimas de atividade, a BI-ExoPG apresentou melhor performance em pH 6,5, retendo 60% da sua atividade máxima em pH 5,0 e 50% em pH 8,0 (Figura 25). Em geral, pectinases fúngicas têm atividade ótima em pHs ácidos, enquanto as bacterinas em pHs básicos,^{17; 108; 109} mas a BI-ExoPG, apesar da sua origem bacteriana, tem maior atividade em pHs próximos à neutralidade. Um comportamento similar foi reportado para duas exo-PGs de *Thermotoga maritima*, cujos pHs ótimos são de 6,4¹¹⁰ e 6,0,¹¹¹ e para a PG de *Sporotrichum thermophile* com ótimo pH em 7,0.¹¹²

Como já descrito no item 1.3.1, as pectinases têm ampla aplicação industrial em diversos setores, como extração e clarificação de sucos de frutas, preparo de vinhos, fermentação de chocolate, extração de óleos vegetais, tratamento de resíduos contendo pectina e processamento de papel e tecidos vegetais. Em alguns desses setores, como na indústria de sucos de frutas e vinhos, pectina é processada em pHs baixos e, portanto, requerem pectinases ácidas. Por outro lado, alguns setores, como a degumagem de tecidos vegetais, processam a pectina em pHs básicos e, portanto, requisitam pectinases alcalinas. Todavia, processos industriais que usam pHs muito baixos ou muito altos precisam neutralizar seus dejetos antes de descartá-los no meio ambiente, o que aumenta o consumo de água e o volume desses resíduos. Por tal motivo, o uso de pectinases neutras poderia trazer vantagens ecológicas e econômicas, pois isenta de uma etapa de neutralização. Um exemplo perfeito dentro desse contexto foi apresentado por Pusic e colaboradores,¹¹³ cuja pesquisa revela nenhuma diferença significativa entre o processo de esfregamento de fibras de algodão por pectinases neutras, ácidas ou alcalinas. Nesse trabalho, portanto, foi concluído que o uso de pectinases

neutras é a melhor opção, já que proporciona as vantagens econômicas e ecológicas citadas acima.

Figura 25 - Atividade enzimática da BI-ExoPG. A enzima tem maior atividade em pH 6,5 (A) e 60 °C (B), além disso a enzima mostrou boa estabilidade entre os pH 5 e 10 (C). Em ensaios de termoestabilidade sob temperatura ótima, BI-ExoPG mostrou meia vida de aproximadamente 6 h e completa inativação após 18 h; sob 50 °C, BI-ExoPG manteve 80% de sua atividade original após 15 h e mesmo após 24 h, a enzima mantinha atividade acima de 60%.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda em determinação das condições ótimas de atividade, a BI-ExoPG apresentou melhor performance em temperatura próxima a 60 °C (Figura 25), retendo 65% da atividade máxima a 50 °C e cerca de 30% a 70 °C. Atividade ótima em temperaturas elevadas é uma propriedade enzimática importante para as pectinases industriais, pois temperaturas próximas ou acima de 50 °C são comumente requeridas no processamento de pectina, devido à alta viscosidade desse substrato e, também, para melhor prevenir o crescimento indesejado de organismos mesofílicos contaminantes.¹¹⁴

9.3.4 Estabilidade enzimática da BI-ExoPG

Estabilidade frente à uma ampla faixa de pH e frente a elevadas temperaturas por longos períodos são importantes características enzimáticas para aplicações industriais. Por tal motivo, esses parâmetros foram avaliados para a enzima BI-ExoPG medindo-se sua atividade residual após tratada com variações de pH e elevadas temperaturas. Em primeira análise, a enzima foi incubada em temperatura ótima por 30 min nos pHs de 2 a 10 (Figura 25). Foi observado atividade residual abaixo de 20% entre os pHs 2 e 4 e 84,6% no pH 5. Do pH 6 ao 10, a enzima mantém a atividade original sem qualquer perda significativa, revelando, portanto, alta estabilidade entre os pHs 5 e 10. Esse resultado é consistente com aqueles obtidos por Thermofluor, o qual revelou que estrutura terciária da BI-ExoPG é bastante estável entre os mesmos pHs (Tabela 5), evidenciando a estreita relação entre a estabilidade da estrutura molecular da proteína e manutenção de sua atividade catalítica. Em segunda análise, a enzima foi incubada em pH ótimo durante longos períodos à elevadas temperaturas (Figura 25). A 70 °C, a enzima teve perda total em sua atividade após incubada por 20 min. Em ótima temperatura (60 °C), a atividade enzimática original decaiu para aproximadamente metade (52,8%) após 6 h; decaiu para 21,3% após 9 h e sua completa inativação foi observada após 18 h. A 50 °C, a enzima manteve alta atividade residual (83,2%) após 15 h e mesmo após 24 h, 64,9% ainda foi mantido, demonstrando que a BI-ExoPG tolera essa condição térmica por mais tempo antes da sua completa inativação.

Como discutido acima, as pectinases neutras têm ganhado grande importância em alguns setores industriais, sendo uma alternativa mais ecológica e econômica quando comparada às pectinases ácidas e alcalinas. Um outro ponto a ser retomado é a necessidade de elevadas temperaturas no processamento de pectina. Nesse contexto, a BI-ExoPG pode ser considerada um candidato em potencial para aplicações industriais, pois, essa enzima não somente tem atividade ótima em pH 6,5, como também tem grande estabilidade em pHs próximos a neutralidade. Além disso, essa enzima exibe melhor desempenho e considerável termoestabilidade a 60 °C. Portanto, a BI-ExoPG exibe considerável estabilidade e atividade ótima nas condições relevantes para a indústria de processamento de pectinas.

As propriedades bioquímicas da BI-ExoPG foram sistematicamente comparadas com as propriedades de todas as outras exo-PGs (EC 3.2.1.67) neutras (pH ótimo de atividade entre 6,0 e 8,0) disponíveis no banco de dados do BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>) (Tabela 7). Apesar do pH ótimo de atividade dessas enzimas ser bastante

similar, a estabilidade enzimática frente à variação de pH difere muito entre elas. A maior pH-estabilidade é observada para a exo-PG de *Klebsiella sp.*, a qual cobre os pHs de 3 a 11; seguida por aquela de *Aspergillus niveus* (pH 3-9) e pela BI-ExoPG (pH 5-10). A ótima temperatura de atividade dessas enzimas varia de 30 a 60 °C e elas são termoestáveis (durante períodos considerados longos) até 40-50 °C, exceto para as duas exo-PGs de *T. maritima*, as quais apresentam temperatura ótima acima de 80 °C e termoestabilidade de até 90 °C. Considerando esses dados, é plausível afirmar que a BI-ExoPG está melhor posicionada que as demais exo-PGs derivadas de organismos mesofílicos, aqui avaliadas.

Tabela 7 - Propriedades bioquímicas de diferentes exo-PGs (EC 3.2.1.67) neutras. A BI-ExoPG foi comparada às demais ExoPGs (EC 3.2.1.67) neutras disponíveis no banco de dados BRENDA. Foram comparados: temperatura ótima, pH ótimo, pH-estabilidade e termoestabilidade. (N/A) = Condição não avaliada.

Organismo	Temp. (°C)	pH	pH-estab.	Termoestab. (°C)	Referência
<i>Aspergillus niveus</i>	50	4,0 - 6,5	3,0 - 9,0	N/A	115
<i>Aspergillus giganteus</i>	55 – 60	6,0	6,5 - 10,0	40	116
<i>Klebsiella sp.</i>	40 – 50	6,0	3,0 - 11,0	50	117
<i>Paecilomyces variotii</i>	30	6,0	N/A	40	118
<i>Penicillium viridicatum</i>	60	6,0	7,0 - 10,0	45	119
<i>Thermotoga maritima</i>	80	6,4	N/A	90	110
<i>Thermotoga maritima</i>	95	6,0	N/A	90	111
<i>Bacillus sp.</i>	60	7,0	8,0 - 12,0	N/A	120
<i>Bacillus subtilis</i>	50	7,0	N/A	N/A	121
<i>Acrophialophora nainiana</i>	60	8,0	8,0 - 9,0	50	122
<i>Bacillus licheniformis</i>	60	6,5	5,0 - 10,0	60	Presente estudo

Fonte: Elaborada pelo autor.

As propriedades bioquímicas da BI-ExoPG também foram comparadas com os atuais coquetéis enzimáticos usados no processamento de pectina (Tabela 8). A termoestabilidade desses preparados enzimáticos está entre 45-60 °C, com exceção para o Beisol PRO (CHT, Alemanha), que é termoestável até 98 °C. Em relação a faixa de pH atuante desses coquetéis, observa-se uma grande diferença entre alguns deles, o que é bastante compreensível, uma vez que alguns desses coquetéis são desenvolvidos especificamente para atuar em pHs ácidos e outros em pHs básicos. Ao comparar as propriedades enzimáticas da BI-ExoPG com as dos

coquetéis, é plausível sugerir que a suplementação de preparados enzimáticos como a Pectinex® Ultra Mash (Novozymes, Dinamarca), Pectinase (Biocon, Índia) e Beisol PRO (CHT, Alemanha) com a BI-ExoPG, poderia gerar melhor rendimento nos processamentos de pectina em até 60 °C. Isso porque, a completa despolimerização da pectina requer a ação sinérgica dos diferentes mecanismos de ataque, provenientes das diferentes classes de pectinases, tais como a PME, PL, endo-PG e exo-PG. Portanto, a adição da BI-ExoPG em preparados enzimáticos como Pectinex® Ultra Mash (Novozymes, Dinamarca) e Pectinase (Biocon, Índia), os quais ainda carecem de uma exo-PG em sua composição, poderia melhorar significativamente seu desempenho.

Tabela 8 - Propriedades bioquímicas das pectinases comerciais atuais. N/A: Não avaliado.

Produto	Componentes	Termoestab (°C)	pH	Organismo	Fabricante
Beisol HP	N/A	50	1.5-5.0	N/A	CHT
Klerzyme 150	N/A	60	2.0-6.0	<i>Aspergillus niger</i>	DSM Food Specialties
Mega BC	PG	60	3.3-4.0	N/A	Peli Bio-Chem Tech.
Novozym® 33095	N/A	60	3.0-5.0	N/A	Novozymes
Pectinase PE-500	PG + PME + PL	45	3.0-6.0	<i>Aspergillus niger</i>	Boli Bioproducts
Pectinase	Endo-PG	N/A	3.5-6.5	<i>Aspergillus niger</i>	Parchem
Macerozyme R-10	PG + celulase + hemicelulase	N/A	3.5-7.0	<i>Rhizopus sp.</i>	Duchefa Biochemie B.V.
Pectinex® Ultra Mash	PG + PL	N/A	4.0-9.0	<i>A. aculeatus</i> e <i>A. niger</i>	Novozymes
Pectinase	Endo-PG + PME + PL + Lichenase	55	4.5-9.0	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Biocon
Beisol PRO	N/A	98	6.0-9.0	N/A	CHT
BI-ExoPG	Exo-PG	60	5.0-10.0	<i>B.licheniformis</i>	Presente estudo

Fonte: Elaborada pelo autor.

9.3.5 Cinética enzimática da BI-ExoPG

Os parâmetros cinéticos $V_{max} = 4,18 \mu\text{M/s}$, $K_M = 3,25 \text{ mg/mL}$ e $k_{cat} = 2.58 \text{ s}^{-1}$ foram determinados nas condições ótimas de atividade enzimática utilizando Poli-AGal como substrato (Figura 26). Os parâmetros cinéticos da BI-ExoPG foram comparados com os parâmetros das outras exo-PGs (EC 3.2.1.67) disponíveis no banco de dados do BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>) (Tabela 9). Dentre as enzimas aqui analisadas, a BI-ExoPG apresenta menor k_{cat} e maior K_M , consequentemente, a menor eficiência catalítica ($k_{cat}/K_M = 0,79$). A maior eficiência catalítica foi observada para a exo-PG de *A. giganteus* ($k_{cat}/K_M = 594,83$), que embora não possua o maior k_{cat} (690 s^{-1}) nem o menor K_M ($1,66 \text{ mg/mL}$), possui a melhor relação entre esses parâmetros.

Figura 26 - Parâmetros cinéticos da BI-ExoPG. Os parâmetros cinéticos V_{max} 4,18 $\mu\text{M/s}$, K_M 3,25 mg/mL e k_{cat} 2,58 s^{-1} da BI-ExoPG foram calculados ($R^2 = 0,94$) para o substrato Poli-AGal sob condições ótimas de atividade.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos de diferentes exo-PGs (EC 3.2.1.67). Os parâmetros cinéticos da BI-ExoPG foram comparados aos parâmetros das ExoPGs (EC 3.2.1.67) disponíveis no banco de dados BRENDA. (N/A) = Condição não avaliada.

Organismo	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mg/mL)	k_{cat}/K_M	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Referências
<i>Penicillium janthinellum</i>	301,3	1,74	173,18	45	5,0	123
<i>Thermotoga thermophilus</i>	10,6	0,33	32,12	N/A	N/A	124
<i>Thermotoga maritima</i>	936,0	1,98	472,73	80	6,4	110
<i>Aspergillus giganteus</i>	690,0	1,16	594,83	55-60	6,0	116
<i>Neosartorya fischeri</i>	720,0	2,90	248,28	65	3,5	125
<i>Aspergillus niger</i>	194,0	2,30	84,34	50	4,0	115
<i>Aspergillus niveus</i>	393,3	6,70	58,7	50	4,0-6,5	115
<i>Bacillus sp.</i>	33,8	1,30	26,0	60	7,0	120
<i>Bacillus licheniformis</i>	2,6	3,25	0,79	60	6,5	Presente estudo

Fonte: Elaborada pelo autor.

9.3.6 Padrão de clivagem da BI-ExoPG

Para avaliar os produtos liberados pela ação catalítica da BI-ExoPG, esses foram submetidos às análises de TLC e HPAEC-PAD (Figura 27). O TLC mostrou uma única banda correspondente ao monômero de ácido galacturônico em todas as três reações (1 h, 2 h e 3 h). Os produtos solúveis derivados da reação de 3 h foram também analisados em HPAEC-PAD, onde resultaram em um único pico cromatográfico correspondente a Mono-AGal. Portanto, ambas as análises confirmaram consistentemente que a enzima BI-ExoPG classifica-se como uma exo-PG EC 3.2.1.67, a qual libera Mono-AGal como único produto de sua ação enzimática.

Figura 27 - Padrão de clivagem da BI-ExoPG. A)TLC. M: marcador molecular contendo mono e tri-AGal; B: Branco (produto da reação de 3 h sem enzima); 0,5, 1,5 e 3,0: produto das reações de 0,5, 1,5 e 3,0 h contendo 2,2 μ M de BI-ExoPG. As reações foram realizadas em ótimas condições de atividade enzimática. O produto de reação de 3 h (com e sem enzima) também foi avaliado por HPAEC-PAD (B). Os resultados consistentemente mostraram que enzima libera mono-AGal como único produto de reação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

9.4 Cristalização, coleta e processamento de dados cristalográficos da BI-ExoPG

Com objetivo se obter a estrutura cristalográfica da proteína BI-ExoPG, essa foi submetida a triagem de cristalização. A proteína cristalizou em média de 15 dias, em três condições do kit Pact Suite (Figura 28): 20% (p/v) de PEG 3.350, 200 mM de NaF, 100 mM de Bis Tris propano, pH 6,5; 20% (p/v) de PEG 3.350, 200 mM de NaI, 100 mM de Bis Tris propano, pH 8,5; e ; 20% (p/v) de PEG 6.000, 200 mM de NaCl, 100 mM de Mes, pH 6,0. Os cristais foram submetidos aos experimentos de difração de raios-X na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP, como descrito no item 4.5. Entretanto, o conjunto de dados de difração de raios-X coletados para os cristais da BI-ExoPG foram insatisfatórios (resolução abaixo de 4 Å) na determinação dos parâmetros de dimensão e orientação (a , b , c , α , β e γ) da célula unitária. Para futuros experimentos, considera-se, portanto, necessária a obtenção de novos cristais crescidos em condição de cristalização otimizada.

Figura 28 - Cristais de proteína da BI-ExoPG. A proteína purificada foi submetida à triagem de condições para cristalização, através do método de difusão a vapor “sitting-drop”, utilizando o sistema automático robótico Honey Bee 961 Dispensing System e kits comerciais (Quiagen e Hampton) de cristalização de proteínas. A figura mostra as imagens em luz branca e UV dos cristais obtidos em três condições distintas do kit Pact Suite.

Fonte: Elaborada pelo autor.

9.5 Modelo de envelope molecular da BI-ExoPG

Visando gerar maiores conhecimentos sobre o mecanismo de ação e comportamento molecular da enzima BI-ExoPG em solução, foram realizados experimentos de SEC-SAXS (Figura 29). A amostra apresentou monodispersidade como indicado pela linearidade da intensidade na região de Guinier (Figura 29A). A região inicial (q -região) das curvas de espalhamento, analisadas pela aproximação de Guinier ($\log(I(q))$ versus q^2), exibiu uma correlação linear, indicando um formato globular para a proteína BI-ExoPG. O R_g , calculado a partir da análise de Guinier (Figura 29, Tabela 10), resultou no valor de 22.4 Å e manteve-se constante dentre os conjuntos de dados coletados para cada concentração de amostra, indicando ausência de agregação interpartículas nas concentrações testadas. O valor do R_g foi posteriormente confirmado baseado na curva de $P(r)$. A $P(r)$ também indicou formato globular para a proteína com $D_{\max}$ igual a 69.7 Å (Figura 29B). A análise de Kratky mostrou um pico bem definido, sugerindo que a BI-ExoPG é uma partícula compacta (Figura 29C). Além disso, a análise de Porod-Debye ($I(q)q^4$ versus q^4)¹²⁶ apresentou um claro platô (Figura 29D), indicando que as partículas em solução carecem de regiões desordenadas.

Figura 29 - Dados de SAXS da B1-ExoPG. A) curvas de espalhamento experimental e teórica para B1-ExoPG. As intensidades experimentais (esferas) têm alta correspondência com a curva de espalhamento teórico (linha vermelha) calculada para o modelo à baixa resolução gerado. A figura inserida, à direita superior, mostra a forte correspondência entre a curva experimental e teórica na região de Guinier, usada no cálculo do R_g . B) Função $P(r)$ determinada para espalhamento experimental (linha contínua) e para o modelo B1-ExoPG gerado (linha tracejada). C) Análise de Kratky indica perfil previsto para partículas globulares compactas. D) Análise de Porod-Debye dos dados de SAXS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 10 - Dados de coleta e processamento de SAXS da enzima BI-ExoPG.

Dados de coleta		
Feixe de lux	DLSS B21	
Comprimento de onda (Å)	1,55	
Variação de q (Å ⁻¹)	0,0095-0,3619	
Tempo de exposição por <i>frame</i> (s)	3	
Concentrações de proteína (mg/mL)	1, 2 e 4	
Temperatura (°C)	25	
Análise dos dados		
	BI-ExoPG	Modelo
R _g (Å) (Guinier)	22,4	21,7
R _g (Å) (GNOM)	22,4	-
D _{max} (Å)	69,7	74,6
Resolução (Å)	16	
Massa molecular experimental (kDa)	44,0	-
Massa molecular teórica (kDa)	48,2	-
Estado oligomérico	Monômero	Monômero
Modelamento <i>ab initio</i>		
Número de modelos	100	
	BI-ExoPG	Modelo
X Exp/DAMMIF	0,88	-
X EXP/PDB	-	0,91
Software usado		
Primeira redução e processamento de dados	ScÅtter pipelines e ATSAS	
Análise <i>ab initio</i>	DAMMIF/DAMMIN	
Alinhamento dos modelos	DAMAVER	
Sobreposição dos modelos 3D	SUPCOMB	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram construídos cem modelos da estrutura atômica da proteína BI-ExoPG através do programa Modeller,¹²⁷⁻¹²⁸ combinando as estruturas cristalográficas da PG de *Erwinia carotovora ssp. carotovora* (EccPG; PDB id: 1BHE)⁷⁷ e da exo-PG de *T. maritima* (TmPG; PDB id: 3JUR).¹²⁹ Os cem modelos foram todos comparados com a curva experimental de SAXS, derivada da BI-ExoPG, através do χ -parameter, que mede a qualidade do encaixe entre cada modelo e a curva. A curva de espalhamento calculada bom base no melhor modelo gerado representou os dados experimentais de SAXS com $\chi = 0,91$. O valor de $P(r)$ calculado

a partir do melhor modelo reproduziu ao valor de $P(r)$ correspondente aos dados de SAXS obtidos para a proteína BI-ExoPG (Figura 29).

O modelo de envelope molecular à baixa resolução, construído a partir dos dados de SAXS via *ab initio* ($\chi = 0.88$), foi satisfatoriamente sobreposto com o melhor modelo por homologia criado para a BI-ExoPG (Figura 30). O perfil teórico de espalhamento calculado para o melhor modelo estrutural de BI-ExoPG reproduziu satisfatoriamente os dados experimentais obtidos ($\chi = 0.91$, Tabela 10).

Coletivamente, as análises dos dados de SAXS evidenciam que a proteína BI-ExoPG, em solução, tem forma bem definida de uma proteína monomérica globular rígida.

Figura 30 - Modelo molecular à baixa resolução da BI-ExoPG. O envelope molecular da BI-ExoPG (em cinza-transparente) obtido através dos experimentos de SAXS foi sobreposto com o melhor modelo atômico obtido por homologia (N-terminal em azul e C-Terminal em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

10 Conclusões

- Os dados bioquímicos e biofísicos revelam que a Bl-ExoPG é um monômero em solução. Além disso a caracterização enzimática mostra que a Bl-ExoPG tem atividade ótima em pH neutro a 60 °C, sendo estável em uma ampla faixa de pH (5-10) e com considerável termoestabilidade em temperaturas até 50 °C. A enzima apresenta especificidade por pectina não metilada, liberando mono-AGal como único produto de reação. A cinética enzimática revela que a Bl-ExoPG tem baixa eficiência catalítica quando comparada a outras exo-PGs (EC 3.2.1.67).
- Os cristais de proteína gerados para Bl-ExoPG foram insatisfatórios para os experimentos de difração de raios-X, sendo necessário a otimização das condições de cristalização.
- O modelo de envelope molecular, gerado por SAXS, acomoda adequadamente a estrutura atômica da proteína, gerada por homologia, destacando seu extenso sulco catalítico. Além disso, os dados mostram que a Bl-ExoPG é uma proteína monomérica globular rígida.

Capítulo III

MT-Xilanases: três xilanases identificadas em Metatranscriptoma de consórcio microbiótico derivado de compostagem de bagaço de cana-de-açúcar.

11 Introdução

EDPCV têm sido extensamente estudadas a partir de uma vasta diversidade de vegetais, fungos, leveduras, bactérias e até mesmo animais, como estudos mais recentes demonstram.^{29,81,130} Dentre esses organismos, os micro-organismos representam a maior fonte de bioprospecção das EDPCV, isso porque eles possuem maior quantidade e diversidade de representantes. Entretanto, apenas 0,1-1% dos micro-organismos são atualmente cultiváveis em laboratório, o que representou por muitos anos a impossibilidade de estudar as enzimas produzidas pela fração majoritária e não-cultivável desses organismos. Nesse âmbito, o uso da tecnologia de metatranscriptoma, a qual baseia-se nas plataformas de sequenciamento de nova geração, tem possibilitado a bioprospecção de novos genes de interesse que, até então, permaneciam escondidos e inexploráveis dentro dos micro-organismos não-cultiváveis.¹³¹⁻¹³⁴

Com o intuito de acessar um grande número de novas EDPCV, nosso grupo realizou, recentemente, estudos de metatranscriptoma a partir de um consórcio microbiótico derivado da compostagem de bagaço de cana-de-açúcar.¹³⁵ Utilizando-se de meio de cultura com limitação nutricional e enriquecido com bagaço de cana-de-açúcar, o consórcio microbiótico foi seletivamente pressionado em favor daqueles micro-organismos com maior potencial de degradação da biomassa vegetal¹³⁵. Após duas semanas de cultivo, cerca de 1% dos genes expressos pelo consórcio microbiótico tinham homologia com sequências do CAZymes (dados não publicados). A análise dessas sequências revelou que as GHs e CBMs representam as classes mais expressas (maior que 60%). Além disso, cerca de 10% de todas as GH expressas são GH10 e GH11, demonstrando a importância das xilanases no crescimento do consórcio microbótico. Dentre as sequências de xilanases, foi identificada uma nova β -1,4-xilanase da família GH10 (GenBank: MF463011), aqui nomeada de MT-Xyn10, a qual corresponde a 7,5% do total de transcritos para as GH10. Também foram identificadas duas β -1,4-xilanases da família GH11, aqui nomeadas de MT-Xyn11a (GenBank: MF537593) e MT-Xyn11b (GenBank: MF537594).

Neste capítulo será descrito a clonagem, expressão, purificação, estudos bioquímicos e biofísicos realizados para essas três xilanases (MT-Xilanases) mencionadas.

12 Materiais & Métodos

12.1 Análises in silico

As sequências-alvo das MT-Xilanases foram primeiramente analisadas pelas ferramentas de bioinformática: Blastx,¹³⁶ Blastp,¹³⁷ Xtalprep,¹³⁸ SignalP4.0,¹³⁹ T-COFFEE Multi Alignment Server,¹⁴⁰ Compute pI/Mw (ExPASy).¹⁴¹ Também foram construídos e analisados os modelos de predição para as estruturas tridimensionais das proteínas-alvo, através dos softwares Phyre2,¹⁴² Swiss-Model¹⁴³ e Pymol.¹⁴⁴ Tais análises permitiram o conhecimento prévio sobre algumas propriedades bioquímicas e estruturais das proteínas-alvo, proporcionando melhor planejamento dos experimentos.

12.2 Clonagem

As ORFs MT-Xilanases foram clonadas, excluindo sequência codificante para peptídeo sinal, em vetor de expressão pETM11/LIC, o qual fornece extremidades LIC (“Ligation Independent Cloning”) para clonagem. As sequências-alvo de DNA foram amplificadas a partir do DNA genômico, extraído do consórcio microbiótico mencionado acima. A amplificação foi conduzida pelos seguintes *primers* contendo extremidades LIC (destacado em negrito) complementares às do vetor pETM11/LIC:

Xyn10_Fw 5'-**CAGGGCGCCATGGCAGCGCAAAAACC**-3'

Xyn10_Rv 5'-**GACCCGACGCGGTTACAATTTTAATAGTCTGTAGTAAGCATC**-3'

Xyn11a_Fw 5'-**CAGGGCGCCATGGAACCCAAAATGCCACCTG**-3'

Xyn11a_Rv 5'-**GACCCGACGCGGTTAACGGGGTGTTCATCCC**-3'

Xyn11b_Fw 5'-**CAGGGCGCCATGGTCCCGACCCAGAAGTCC**-3'

Xyn11b_Rv 5'-**GACCCGACGCGGTTATTAAGGGGGGGTCGC**-3'

As PCR constituíram de 150 ng de DNAg, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 1U de DNA polimerase Phusion HF (Thermo Fisher Scientific), 2X tampão Phusion HF Red, 0,4 mM de cada *primer* e água estéril Milli-Q para volume final de 25 µl. As reações foram submetidas à ciclagem de temperatura de: 98 °C por 30 s, seguidos de 35 ciclos de 10 s a 98 °C, 30 s a 57 °C, 40 s a 72 °C, e um passo final de 5 min a 72 °C. Os fragmentos foram

analisados em eletroforese com gel de agarose 1%, onde os *amplicons* de tamanho esperado foram coletados e purificados por kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Posteriormente, para criar as extremidades LIC nos insertos, 200 ng de *amplicon* purificado foi tratado com 3 U de T4 DNA polimerase (Fermentas) em presença 1X tampão T4 Polimerase adicionado de 2,5 mM de dATP e 4 mM de DTT em volume final de 20 µl, incubados a 22 °C por 30 min e, subsequentemente, inativados a 75 °C por 20 min. O mesmo tratamento, mas substituindo dATP por dTTP, foi realizado para gerar as extremidades LIC no vetor. A ligação inserto/vetor foi realizada misturando-se 3 µl de inserto com 1 µl de vetor tratados; a mistura foi diluída para 10 µl e incubada a 25 °C durante 30 min. O plasmídeo resultante foi construído para expressar a proteína alvo fusionada, em seu N-terminal, à 6xHis-tag + sítio de clivagem para TEV protease.

A multiplicação dos plasmídeos resultantes e obtenção de células de *E. coli* Rosetta expressoras das proteínas-alvo foi realizado segundo método descrito em Camilo et. al, 2014⁹⁴.

12.3 Expressão heteróloga e purificação das MT-Xylanases

A expressão das MT-Xilanases foi conduzida a 37 °C durante 5 h, seguida de 24 h a 18 °C em meio LB contendo 1 mM IPTG como agente indutor. A purificação das MT-Xilanases foi realizada seguindo método descrito no item 8.1.

12.4 Determinação da massa molecular das MT-Xylanases

A massa molecular da proteína MT-Xyn10 foi determinada durante purificação em coluna de gel filtração Superdex[™] 200 prep grade 16/60 (GE), seguindo o método descrito no item 4.2.

12.5 Thermofluor – Triagem de melhor condição para estabilidade das MT-Xylanases

Foram realizados experimentos de Thermofluor, no intuito de avaliar a estabilidade térmica da estrutura terciária das MT-Xilanases sob efeito de diferentes. Além disso, a estabilidade da MT-Xyn10 também foi avaliada sob a variação de pH de 2 a 10, usando tampão ABF. Os experimentos foram realizados seguindo o método descrito no item 4.3.

12.6 Ensaios de atividade da MT-Xilanases

A atividade enzimática das MT-Xilanases foi quantitativamente determinada pelo método DNS,⁹⁶ seguindo método descrito no item 8.4. As reações de 50 µL constituíram de substrato a 1% (p/v), 50 mM de tampão e 5 µL de enzima (MT-Xyn10: 25 nM, MT-Xyn11a: 34 nM e MT-Xyn11b: 14 nM), incubados por 7 min.

O substrato específico da enzima foi determinado testando-se 15 diferentes substratos vegetais: xilano de *beechwood*, CMC, sigmacell, hidroximetilcelulose e avicel (todos da Sigma) arabinoxilano de *rye flour*, xiloglucano, β -glucano, manano, arabinano, arabinano não ramificado, lichenano, arabinogalactano de larch e dextrina (todos da Megazymes). Tendo as MT-Xilanases mostrado maior atividade para xilano, todos os demais experimentos foram conduzidos com esse substrato.

A temperatura ótima das MT-Xilanases foi determinada em fosfato de potássio pH 7,0 variando a temperatura entre 20-60 °C. O pH ótimo das enzimas foi determinado em tampão ABF variando o pH de 2 a 10, a 35, 40 e 45 °C para MT-Xyn11a, MT-Xyn10 e MT-Xyn11b, respectivamente. Os parâmetros cinéticos V_{max} , K_M and k_{cat} foram definidos para xilano e arabinoxilano utilizando-se D-(+)-xilose (Sigma) na construção de uma curva padrão de concentração de produto gerado. As reações foram realizadas nas condições ótimas pré-determinadas aumentando-se a concentração do substrato de 0,1 a 20 mg/mL. Os dados foram analisados pelos programas “Michaelis-Menten” e “ k_{cat} ” usando o software GraphPad Prism (versão 5.0).

A caracterização enzimática da MT-Xyn10 foi estendida, contendo análises adicionais não realizadas para as demais MT-Xilanases. O desempenho enzimático da MT-Xyn10 foi avaliado na presença de 15 diferentes aditivos. Também, avaliou-se a termoestabilidade, pré-incubando a enzima a 40 e 50 °C por 120 h em pH ótimo pré-determinado. Além disso, analisou-se a estabilidade frente à variação de pH, pré-incubando a enzima durante 30 h em tampão ABF nos pH de 2 a 10 sob a temperatura ótima pré-determinada. Após tratamentos, a atividade residual relativa foi mensurada nas condições ótimas de tampão, pH e temperatura pré-determinadas.

12.6.1 Determinação do padrão de clivagem da MT-Xyn10

A reação foi conduzida com 0,5% de xilano ou arabinoxilano nas condições otimizadas de tampão, pH e temperatura. As amostras foram coletadas após 1 h de reação, centrifugadas a 13.000 *xg* por 5 min e o sobrenadante analisado em HPAEC-PAD segundo método descrito no item 8.5. Uma solução padrão contendo xilose (X₁), xilobiose (X₂), xilotriose (X₃), xilotetraose (X₄), xilopentose (X₅) e xilohexaose (X₆) foi usada como padrão.

12.7 Cristalização das MT-Xilanases

As proteínas purificadas foram submetidas à triagem de condição de cristalização, segundo método descrito no item 4.4. Para tal, a MT-Xyn10 foi concentrada até 53 mg/mL em tampão 20 mM Bis-Tris pH 6,5; MT-Xyn11a foi concentrada até 10 mg/mL em tampão 20 mM citrato de sódio pH 5,5; e MT-Xyn11b foi concentrada até 12 mg/mL em tampão 20 mM Bis-Tris pH 6,5.

12.8 Coleta e processamento de dados cristalográficos por difração de raios-X

Cristais de proteína foram obtidos para as enzimas MT-Xyn10 e MT-Xyn11a. Os dados cristalográficos desses cristais foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, utilizando a linha MX2 com comprimento de onda de 1.48 Å e o mais recente detector PILATUS2M (Dectris). Os cristais foram coletados com loops (Hampton), adicionados à solução 10-20% (v/v) de etileno glicol e resfriados à -173 °C sob fluxo de nitrogênio líquido. A coleta e processamento de dados cristalográficos, assim como a construção dos modelos estruturais foram realizados, em colaboração, pelo Dr. Marco Antonio Seiki Kadowaki. Os conjuntos de imagens do padrão de difração de raios-X foram inicialmente processados pelo programa iMosflm.⁶¹⁻⁶³ O conjunto obtido para MT-Xyn10 foi insatisfatório na determinação dos parâmetros de dimensão e orientação da célula unitária (resolução abaixo de 4 Å) e, portanto, não foi possível prosseguir com os estudos estruturais dessa proteína. Por outro lado, o conjunto de imagens obtidos para a MT-Xyn11a possibilitou a indexação e integração dos dados cristalográficos com sucesso, permitindo determinar o grupo espacial e a estatística dos dados de coleta e processamento. O escalonamento das intensidades foi realizado pelo software SCALA, presente no pacote de programas do CCP4.⁶⁴ A quantidade de moléculas da proteína dentro da célula unitária e o conteúdo de solvente foram calculados pelo coeficiente de Matthews.⁶⁵ O faseamento e resolução da

estrutura molecular foram realizados pelo programa Phaser ⁵⁵ via método de substituição molecular.

12.9 Experimentos de SAXS da MT-Xyn10

O envelope molecular à baixa resolução foi determinado para a proteína MT-Xyn10 em solução, através de dados experimentais de SAXS coletados na linha D02A-SAXS2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas–SP, segundo método descrito no item 4.6. Os experimentos foram realizados com amostras da proteína MT-Xyn10 purificada em 100 mM de tampão Tris pH 8,0, 150 mM de NaCl nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/mL. O processamento dos dados e construção do modelo de envelope molecular foram realizados, em colaboração, pelo Dr. Marco Antonio Seiki Kadowaki, segundo método descrito no item 4.6.

13 Resultados & Discussão

13.1 Resultados e discussão da enzima MT-Xyn10

13.1.1 Produção e purificação da MT-Xyn10

As análises de bioinformática predizeram para a MT-Xyn10 uma cadeia polipeptídica de 374 aminoácidos (Figura 31) com ponto isoelétrico de 6,77, massa molecular de 42 kDa (incluindo um peptídeo sinal de 26 resíduos). Essa enzima apresentou maior semelhança (baseado em identidade de sequência) com β -1,4-xilanases (GH10) de origem bacteriana, principalmente com as do gênero *Cellvibrio*, como *C. mixtus* (id. 68%), *C. japonicus* (id. 67%), *C. sp. PSBB023* (id. 66%) e *C. sp. pealriver* (id. 63%), sugerindo que a MT-Xyn10 tem provável origem bacteriana.

MT-Xyn10	1	MISRRKFMLASGAGLMSQLKLSAMAA QKTGLKDVYKDRFLVGAAINTS	50
	51	IASGQHPDITEIIKRDFSSVTPENSMKWESVRTEEGGWKEEADHFINFA	100
	101	TQHKLHAVGHTLAWHSQIPDSVFKN TKGEYISAAELSKKMEEHITTIVGR	150
	201	YKGKLAAWDVVNEAVGDDNQMRKSHYYN ILGEFIDKAFHLAHEVDPN AH	200
	251	LMYNDYNNEKDGKREATVEMLKR LIKRGVPIHGLGIQGHIAVDGPSIADI	250
	301	EKSILAYADLGLRVHFTELDIDV LPLVWDL PVAEISTRFEYRPERDPFKN	300
	351	GLSKEMNDKLSARYEDLFKLF IKHKDKIDRVTLWGVSDDATWLNDFPIKG	350
	401	RTSYPLLFDRKHQPKDAYYRL LKL#	374

Figura 31 - Sequencia de aminoácidos predita para a MT-Xyn10. A proteína tem uma cadeia polipeptídica de 374 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 26 resíduos (em negrito), com ponto isoelétrico de 6,77 e massa molecular de 42 kDa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A ORF (1.047 pb) da MT-Xyn10 foi amplificada com sucesso a partir do DNA genômico total do consórcio microbiótico. A ORF foi purificada e clonada no vetor de expressão pETM11/LIC para, então, ser utilizada na transformação de células *E. coli* Rosetta. A cepa recombinante foi induzida à expressão da proteína MT-Xyn10, a qual foi analisada

após 12 e 24 h (Figura 32) de indução. MT-Xyn10 foi superexpressa como uma proteína de cerca de 40 kDa, fusionada à cauda 6xHist; um aumento significativo na produção da proteína-alvo foi verificado entre 12 e 24 h; e aparentemente, a integridade da MT-Xyn10 não foi afetada ao longo do período total de expressão.

Figura 32 - Expressão e purificação da MT-Xyn10. A análise em SDS-PAGE avaliou o rendimento da produção e a integridade da proteína MT-Xyn10 após 12 h (0) e 24 h (1) de expressão. O experimento também mostra a pureza da amostra após segunda cromatografia de afinidade por Ni^{+2} (2) e por gel filtração (3). A seta indica a posição da proteína MT-Xyn10 em aproximadamente 40 kDa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A proteína fusionada foi purificada em cromatografia de afinidade por Ni^{+2} , eluída em tampão contendo 100 mM de imidazol e sua cauda 6xHist removida por conseguinte ação da TEV protease. A proteína desprovida da cauda (~40 kDa) foi, então, coletada no “flowthrough” da segunda cromatografia de afinidade por Ni^{+2} . Para assegurar a pureza da amostra, essa foi submetida à um terceiro passo de purificação por exclusão molecular, onde a MT-Xyn10 foi eluída em um único pico cromatográfico correspondente a 40 kDa (cálculo estimativo através da curva de calibração), indicando que a enzima assume estado monomérico em solução. A pureza e integridade da proteína foram confirmadas por SDS-PAGE (Figura 32).

13.1.2 Estabilidade da MT-Xyn10 por Thermofluor

No intuito de encontrar as melhores condições para as análises e armazenamento da enzima, a estabilidade da estrutura terciária da MT-Xyn10 foi avaliada em função de diferentes soluções tampão, utilizando a técnica de Thermofluor (Tabela 11). As condições que apresetaram menores valores de T_m foram: acetato de sódio pH 4,5 ($T_m = 30^\circ\text{C}$) e 5,5 ($T_m = 47^\circ\text{C}$), seguidos de carbonato de sódio pH 9,5 ($T_m = 31^\circ\text{C}$) e 10 ($T_m = 30^\circ\text{C}$); e citrato de sódio pH 4,5 ($T_m = 44^\circ\text{C}$). Valores moderados de T_m foram observados para bicina pH 9 (T_m

= 54 °C), Bis-tris pH 6 (T_m = 55 °C) e citrato de sódio pH 5,5 (T_m = 56 °C). O maior valor de 59 °C foi obtido para as condições: Bis-tris pH 6,5, Hepes pH 7,0 e Tris pHs 7,5 e 8,0. Também foi avaliado o efeito da adição de 300 mM de NaCl nas mesmas condições testadas (dados não apresentados), onde nenhuma variação nos valores de T_m foi verificada. Portanto, as condições testadas que proporcionam maior estabilidade a proteína MT-Xyn10 são: Tris, Bis-tris, cacodilato e Hepes, todos com pHs próximos ao neutro.

Tabela 11 - Termoestabilidade da MT-Xyn10 em diversos tampões. A termoestabilidade da estrutura terciária da MT-Xyn10 foi avaliada sob efeito de diversos tampões e pHs por Thermofluor. Condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados.

pH	Tampão	T_m (°C)
4.5	Citrato de sódio	44
4.5	Acetato de sódio	30
5.5	Citrato de sódio	56
5.5	Acetato de sódio	47
6.0	Fosfato de sódio	57
6.0	Bis-tris	55
6.0	Mes	57
6.5	Fosfato de sódio	58
6.5	Bis-tris	59
6.5	Cacodilato	59
7.0	Fosfato de sódio	58
7.0	Bis-tris	59
7.0	Hepes	59
7.5	Fosfato de sódio	58
7.5	Tris	59
8.0	Tris	59
8.0	Hepes	58
8.0	Imidazol	57
8.0	Bicine	57
8.5	Tris	58
9.0	Bicina	54
9.5	Carbonato de sódio	31
10.0	Carbonato de sódio	30

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.1.3 Especificidade de substrato da MT-Xyn10

A atividade enzimática da MT-Xyn10 foi testada contra 15 diferentes substratos de origem vegetal, dentre os quais a enzima apresentou atividade somente para xilano e arabinoxilano. Sendo o maior valor de atividade observado para xilano, esse foi considerado 100% em uma escala relativa e, conseqüentemente, para arabinoxilano foi verificado 75% de atividade enzimática. As GH10 são normalmente inativas em celulose,²³ porém, para substratos derivados de hemicelulose, o sítio ativo das GH10 pode acomodar não só a cadeia linear de xilano, mas também a cadeia decorada de heteroxilano, como glucuroxilano e arabinoxilano,²³ o que explica, portanto, os resultados aqui obtidos. A diferença entre a atividade enzimática em xilano e arabinoxilano aqui verificadas, deve-se a diferença na quantidade de decorações contidas na cadeia principal de xilano. Como já descrito na Introdução (item 1.3.2), quanto maior o grau de decorações na cadeia principal de xilano, menor a quantidade de sítios disponíveis para a clivagem hidrolítica das GH10. É justificável, portanto, que a MT-Xyn10 demonstre maior atividade para xilano de *beechwood* (~13% de ácido glucurônico) em relação ao arabinoxilano de *rye flour* (~40% de arabinose) usados aqui.

13.1.4 Influência de aditivos na atividade da MT-Xyn10

Durante processos laboratoriais ou industriais, existem agentes químicos que podem influenciar, positivamente, ou negativamente, na performance das enzimas. Por tal motivo, avaliou-se os efeitos de 15 diferentes aditivos na atividade da MT-Xyn10 (Tabela 12). Todos os componentes testados causaram algum decréscimo na atividade enzimática, sendo que os maiores danos foram causados pelo SDS (total inativação da enzima) e pelos cátions bivalentes: Cu^{+2} , Mn^{+2} e Ca^{+2} , com perdas de 94%, 58% e 43%, respectivamente. Os demais íons testados também reduziram a atividade enzimática, porém, mais discretamente, como verificado para K^+ (6%), Li^{+2} (10%), Mg^{+2} (11%), Fe^{+3} (17%), Co^{+2} (20%), Ni^{+2} (21%) e Fe^{+2} (24%). Esses resultados são comparáveis com obtidos para outras GH10 descritas. Por exemplo, Xyn10 de *Penicillium oxalicum*, também sofreu drástica perda (96,4%) em sua atividade original após adição de Cu^{+2} e moderadas perdas por Co^{+2} (26%), Ni^{+2} (23%), Mg^{+2} (6%), Li^+ (15%) and Fe^{+2} (14%)¹⁴⁵. Em contraste, outra xilanase de *P. oxalicum* (Xyn11A), quando testada com apenas 1 mM desses mesmos íons, apresentou acréscimos na atividade enzimática original de 31, 20, 26, 31, 30, 9 e 51%, respectivamente para Ca^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} e Fe^{+2} . Essa mesma enzima não sofreu influência por Li^+ , embora grandes perdas (92,2%) foram causadas por Fe^{+3} ¹⁴⁶

Tabela 12 - Influência de aditivos na atividade da MT-Xyn10.

Aditivos (2 mM)	Atividade residual (%)
Control	100 ± 0.42
Ca ⁺²	57 ± 4.2
Co ⁺²	80 ± 1.6
Cu ⁺²	6 ± 0.7
Ni ⁺²	79 ± 6.7
Mg ⁺²	89 ± 0.3
Mn ⁺²	42 ± 3.7
Li ⁺²	90 ± 2.2
K ⁺	94 ± 0.6
Fe ⁺²	76 ± 4.5
Fe ⁺³	83 ± 2.2
Aditivos	Atividade residual (%)
DTT (2 mM)	89 ± 6.9
β-Mercaptoetanol (2 mM)	83 ± 3.9
Triton-100X (0.1 %)	100 ± 4.2
Tween 20 (0.1 %)	88 ± 2.2
SDS (0.1 %)	0 ± 0.0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Entre os detergentes, Tween-20 decresceu 12% na performance da MT-Xyn10, enquanto nenhum efeito significativo foi observado para Triton-100X. Agentes redutores como DTT e β-Mercaptoetanol causaram danos similares de 11 e 17%, respectivamente. Similarmente, nenhum efeito significativo foi verificado para a Xyn10 de *P. Oxalicum* quando tratados por 0,1% dos mesmos detergentes e por 1 mM dos mesmos agentes redutores.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶ Por outro lado, a Xyn11 de *P. Oxalicum* revelou perdas similares quando tratadas com 1% de Triton-100X (12%) e Tween-20 (6%); ou por 10 mM de DTT (4%) e β-Mercaptoetanol (14%).¹⁴⁶

13.1.5 Atividade ótima e cinética enzimática da MT-Xyn10

O perfil da atividade enzimática da MT-Xyn10 em função da variação de temperatura mostrou melhor performance em 40 °C (Figura 33A), mantendo aproximadamente 70% da máxima atividade a 30 °C e cerca de 38% a 50 °C. O perfil de atividade enzimática também foi determinado em função da variação de pH (Figura 33B), onde a MT-Xyn10 apresentou máximo desempenho em pH 7, retendo quase 90% da máxima atividade à pH 6,0 e 70% à pH 5,0. Em pHs abaixo de 5,0, nenhuma atividade significativa foi detectada. Em pHs básicos,

aproximadamente 86%, 82%, e 55% da atividade máxima foi observada para os pHs 8, 9 e 10, respectivamente. Portanto, MT-Xyn10 tem melhor desempenho em pH neutro, mas também mantém alta atividade em pH ligeiramente ácidos ou básicos. De fato, até mesmo em pH 10, a enzima apresentou atividade superior a 50%. O perfil de atividade da MT-Xyn10 é consistente com outras GH10 de bactérias, fungos e leveduras, como reportado na revisão de Beg e colaboradores.¹⁴⁷ A temperatura ótima de atividade, de mais de 40 xilanases descritas, está entre 40 e 60 °C, exceto para àquelas de micro-organismos termofílicos e de *Streptomyces viridosporu*. Além disso, o pH ótimo de atividade dessas enzimas está entre 5 e 9 para a grande maioria delas.

Figura 33 - Atividade ótima e cinética enzimática da MT-Xyn10. MT-Xyn10 mostra maior atividade por volta de 40 °C e pH 7,0. Sob ótimas condições de atividade, a enzima mostrou os parâmetros cinéticos $V_{max} = 19,82 \mu\text{M/s}$, $K_M = 5,14 \text{ mg/mL}$ e $k_{cat} = 792,8 \text{ s}^{-1}$ para xilano ($R^2 = 0,98$); e $V_{max} = 9,16 \mu\text{M/s}$, $K_M = 1,96 \text{ mg/mL}$ e $k_{cat} = 366,4 \text{ s}^{-1}$ para arabinoxilano ($R^2 = 0,98$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros cinéticos foram definidos sob as condições ótimas de atividade usando xilano e arabinoxilano como substratos (Figura 33C e 33D). Para xilano, MT-Xyn10 tem $V_{max} = 19,82 \mu\text{M/s}$, $K_M = 5,14 \text{ mg/mL}$, $k_{cat} = 792,8 \text{ s}^{-1}$ e eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) igual 154,24.

Para arabinoxilano, a enzima apresenta $V_{max} = 9,16 \mu\text{M/s}$, $K_M = 1,96 \text{ mg/mL}$, $k_{cat} = 366,4 \text{ s}^{-1}$ e eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) igual 186,90. Interessantemente, MT-Xyn10 revelou eficiência catalítica bastante similar para ambos substratos. Isso porque, apesar do valor de k_{cat} da enzima ser 2,2 vezes maior para xilano, a afinidade da enzima para esse substrato é 2,6 vezes menor quando comparados aos mesmos parâmetros obtidos para arabinoxilano, compensando um parâmetro ao outro e dessa forma aproximando os valores de eficiência catalítica.

O menor valor de k_{cat} observado para arabinoxilano deve-se, provavelmente, ao maior grau de decoração na cadeia linear de xilano quando comparado ao glucuronoxilano, pois é sabido que as GH10 necessitam de, ao menos, dois resíduos consecutivos de xilose não-decorados ao longo da cadeia de heteroxilano para clivá-la.²³ Entretanto, o alto grau de decoração de arabinosil na cadeia principal aumenta a solubilidade dessa,¹⁴⁸ o que deve facilitar o acesso da enzima a esse substrato. Essa propriedade pode explicar a maior afinidade da enzima ao arabinoxilano. Os parâmetros cinéticos da MT-Xyn10 estão na mesma faixa determinada para outras xilanases microbióticas (Tabela 13). Embora algumas dessas xilanases foram testadas contra diferentes tipos de heteroxilanos (de *birchwood* e de *oat spelt*), não há diferenças drásticas entre suas eficiências catalíticas (entre 104,6 e 298), exceto para a xilanase de *Glaciecola mesophila* que tem o menor k_{cat}/K_M (60) e para a xilanase de *Streptomyces lividans* que tem o maior k_{cat}/K_M (1.327).

Tabela 13 - Propriedades bioquímicas de diferentes MT-Xyn10.

Organismo	Substrato	V_{max} ($\mu\text{M/s}$)	K_M (mg/mL)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M	Referência
<i>Streptomyces</i>	Xilano de <i>Birchwood</i>	N/A	0,1	134,0	1.327,0	¹⁴⁹
<i>lividans</i>						
<i>Aspergillus</i>	Xilano de <i>Oat spelt</i>	118,2	9,0	1.340,0	148,9	¹⁵⁰
<i>niger</i>						
<i>Geobacillus</i>	Xilano de <i>Beechwood</i>	N/A	1,7	493,0	298,0	¹⁵¹
<i>stearothermophilus</i>						
<i>Glaciecola</i>	Xilano de <i>Beechwood</i>	6,3	5,8	609,0	104,6	¹⁵²
<i>mesophila</i>						
<i>Glaciecola</i>	Xilano de <i>Oat spelt</i>	7,3	11,9	712,0	60,0	¹⁵²
<i>mesophila</i>						
<i>Thermus</i>	Xilano de <i>Oat spelt</i>	22.1	3,0	868,1	284,9	¹⁵³
<i>brockianus</i>						
<i>Malbranchea</i>	Xilano de <i>Birchwood</i>	1,4	4,6	748,0	162,6	¹⁵⁴
<i>pulchella</i>						
<i>Volvariella</i>	Xilano de <i>Beechwood</i>	N/A	0,5	69,3	126,4	¹⁵⁵
<i>volvacea</i>						
<i>Penicillium</i>	Xilano de <i>Birchwood</i>	1,6	7,5	925,9	123,5	¹⁵⁶
<i>janczewskii</i>						
<i>Penicillium</i>	Xilano de <i>Oat spelt</i>	1,2	4,2	675,8	160,9	¹⁵⁶
<i>Janczewskii</i>						
Desconhecido	Xilano de <i>Beechwood</i>	19,8	5,1	792,8	154,2	Presente estudo
Desconhecido	Arabinoxilano de rye flour	9,2	1,9	366,4	186,9	Presente estudo

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.1.6 Estabilidade enzimática da MT-Xyn10

Dentre as propriedades enzimáticas comumente exigidas nos processos industriais, a estabilidade por longos períodos em ampla faixa de pH e por longos períodos sob temperaturas elevadas são geralmente as propriedades mais almejadas. Por isso, foi avaliado a termoestabilidade da estrutura terciária da MT-Xyn10 em função da variação de pH por Thermofluor (Figura 34). Em pH 2, um sinal significativo foi detectado já no início do experimento, indicando a desnaturação da enzima já à temperatura ambiente. Em pH 3, a estrutura da proteína mantém alguma estabilidade, pois um baixo valor de T_m (27 °C) foi observado. Em seguida, um ganho na estabilidade estrutural foi verificado para todos os demais pHs analisados. A enzima mostrou-se estável do pH 4 ($T_m = 51$ °C) ao pH 10 ($T_m = 52$ °C), com um pico de estabilidade em pH 6 ($T_m = 58$ °C).

Figura 34 - Estabilidade da MT-Xyn10. A estabilidade da MT-Xyn10 foi avaliada por Thermofluor (A) e por DNS medindo-se sua atividade residual (B). Ambos resultados demonstram que a enzima tem considerável estabilidade dos pHs 4 ao 10. Em pH 2 e 3, a enzima sofre desnaturação irreversível resultando na sua completa inativação. A termoestabilidade a 40 °C e 50 °C foi avaliada por DNS medindo-se sua atividade residual ao longo de 120 h (C). A enzima apresenta alta estabilidade em su pH ótimo de atividade (40 °C), pois a atividade original permanece constante mesmo após 120 h. A 50 °C, a enzima tem meia vida de de 24 h.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estabilidade da MT-Xyn10 em função da variação de pH também foi avaliada pelo método DNS, medindo-se a atividade residual da enzima após incubada 30 h em ótima temperatura nos pHs 2-10 (Figura 34). Nenhuma atividade residual foi observada para os pH 2 e 3, indicando que a alta protonação do meio causou dano irreversível na estrutura enzimática. Esse resultado é consistente com os resultados obtidos na análise de Thermofluor, a qual mostrou a completa desnaturação da proteína em pH 2 e 3 sob temperaturas abaixo de 40 °C. Em pH 4, MT-Xyn10 manteve 80% de sua atividade original e entre os pH 5 e 10, a enzima reteve atividade residual acima de 90%. Novamente, esses resultados mostram o mesmo perfil observado em análise de Thermofluor, corroborando com a já bem conhecida relação direta entre a estabilidade estrutural e função da proteína. Como discutido acima, apesar do pH ótimo de atividade da MT-Xyn10 ser neutro, a enzima mantém considerável atividade entre os pHs 5-10 e alta estabilidade entre os pH 4-10, portanto, MT-Xyn10 pode ser aplicada em uma larga faixa de pH.

Para estender as análises de estabilidade, também foi avaliada a atividade residual da enzima após 120 h a 40 e 50 °C sob pH ótimo (Figura 34). A 40 °C, nenhuma perda significativa na atividade original da MT-Xyn10 foi observada mesmo após 120 h de incubação. A 50 °C, MT-Xyn10 apresentou meia-vida de 24 h, pois sua atividade residual foi de aproximadamente 50%, 25% e 12,5% depois de 24, 48 e 72 h, respectivamente. Após 96 h, a enzima reteve cerca de 3,5% da atividade original e sua completa inativação foi observada após 120 h. Portanto, os dados revelam que MT-Xyn10 é altamente estável sob suas condições ótimas de atividade.

13.1.7 Padrão de clivagem da MT-Xyn10

Para avaliar os produtos liberados pela ação catalítica da MT-Xyn10 em xilano e arabinoxilano, esses foram submetidos às análises de HPAEC-PAD (Figura 35). A enzima apresentou padrão de clivagem endo-catalítico liberando diferentes produtos para ambos substratos. A hidrólise de xilano promoveu três diferentes produtos, correspondentes a xilose (X_A), xilobiose (X_B) e um outro oligossacarídeo (X_C), o qual apresentou maior tempo de retenção que os açúcares-padrão aqui usados (X_1 - X_6). A hidrólise de xilano promoveu quatro diferentes produtos correspondentes a xilose (AX_A), xilobiose (AX_B) e dois outros produtos (AX_C e AX_D) que também tem maior tempo de retenção que os açúcares-padrão. Portanto, os produtos X_C , AX_C e AX_D não podem ser determinados através da simples comparação com os açúcares-padrão. Entretanto, todos esses oligossacarídeos puderam ser precisamente definidos

baseados no mecanismo catalítico das GH10 descrito na revisão de Pollet e colaboradores²³ e baseado no padrão de clivagem da GH10 de *Thermoascus aurantiacus*, a qual também foi determinado para xilano e arabinoxilano por HPAEC-PAD.¹⁵⁷ Desse modo, o produto X_C corresponde ao maior oligossacarídeo decorado liberado pela ação da GH10 sobre glucuronoxilano, ou seja, uma xilotriose com um resíduo de 1,2- α -ácido metilglucurônico anexado à extremidade não redutora. Os produtos AX_C e AX_D são, respectivamente, xilobiose com um resíduo de 1,3- α -L-arabinofuranosil ligado à extremidade não redutora e uma xilotriose com um resíduo de 1,3- α -L-arabinofuranosil ligado a unidade central de xilose.

Como descrito na Introdução, xilose e xilo-oligossacarídeos têm sido amplamente utilizados em diversos setores industriais, o que significa que MT-Xyn10 é apropriada para muitos processos biotecnológicos, devido os diferentes produtos de valor agregado gerados a partir de sua ação catalítica.

Figura 35 - Padrão de clivagem da MT-Xyn10. As reações foram conduzidas sob as condições ótimas de atividade e os produtos solúveis gerados foram analisados por HPAEC-PAD. Controle: de xilose até xilohexaose; A (arabinofuranose); M (ácido metilglucurônico). Para xilano, X_A : xilose; X_B : xilobiose; X_C : xilotriose com um resíduo de 1,2- α -D-ácido metilglucurônico no terminal não-redutor. Para arabinoxilano, AX_A : xilose; AX_B : xilobiose; AX_C : xilobiose com um resíduo de 1,3- α -L-arabinofuranose no terminal não-redutor; AX_D : xilotriose com um resíduo de 1,3- α -L-arabinofuranose na unidade central de xilose.

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.1.8 Cristalização, coleta e processamento de dados cristalográficos da MT-Xyn10

Com objetivo se obter a estrutura cristalográfica da proteína MT-Xyn10, essa foi submetida a triagem de cristalização. A proteína cristalizou após 14 dias em uma única condição: 0,1 M MES pH 6,5, contendo 20% (p/v) de PEG 10K (Figura 36). Os cristais foram utilizados em experimentos de difração de raios-X na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP, como descrito no item 4.5. Entretanto, o conjunto de dados de difração de raios-X coletados para os cristais da MT-Xyn10 foram insatisfatórios na determinação dos parâmetros de célula unitária (resolução abaixo de 4 Å). Para futuros

experimentos, considera-se, portanto, necessária a obtenção de novos cristais crescidos em condição de cristalização aperfeiçoada.

Figura 36 - Cristais de proteína da MT-Xyn10. A proteína purificada foi submetida à triagem de condições para cristalização, através do método de difusão a vapor “sitting-drop”, utilizando o sistema automático robótico Honey Bee 961 Dispensing System e kits comerciais (Quiagen e Hampton) de cristalização de proteínas. A figura mostra os cristais obtidos na condição 0,1 M MES pH 6,5, contendo 20% (p/v) de PEG 10K, após 14 dias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.1.9 Modelo de envelope molecular da MT-Xyn10

Para melhor compreender o mecanismo de ação e comportamento molecular da enzima MT-Xyn10 em solução, foram realizados experimentos de SAXS (Figura 37). A proteína apresentou R_g de 20,85 Å, calculado pela análise de Guinier, e massa molecular de 42,9 kDa estimada pelo SAXS_MoW. Os dados de SAXS revelam que MT-Xyn10 é um monômero em solução, em acordo com o observado em de gel filtração. A função $P(r)$ é consistente para uma partícula de forma globular, com D_{max} de 60 Å e R_g de 20,21 Å, em acordância com o valor obtido na análise de Guinier (Figura 37A e B). Dez modelos independentes de envelope foram gerados usando dados experimentais e mesclados. O modelo final do envelope molecular tem forma semelhante a uma tigela, destacando o sítio catalítico caracterizado por um extenso sulco. O envelope molecular se sobrepôs perfeitamente ao modelo 3D atômico da MT-Xyn10 gerado por homologia (Figura 38). A enzima tem considerável flexibilidade em solução como revelado pela análise de Kratky (Figura 37C). Essa propriedade pode ser diretamente relacionada a capacidade de reconhecer e clivar substratos decorados (heteroxilano). Os dados experimentais de SAXS estão sumarizados na Tabela 14.

Figura 37 - Dados de SAXS da MT-Xyn10. Perfil experimental de espalhamento foi comparado com o perfil calculado do envelope molecular da MT-Xyn10 e de modelos homólogos (A). A análise de Guinier na região linear mostra que os dados satisfazem a condição $q < 1.3/R_g$. (A, imagem inserida). A função $P(r)$ (B). Análise de Kratky (C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 38 - Modelo à baixa resolução da MT-Xyn10. O envelope molecular da MT-Xyn10 (em cinza-transparente) obtido através dos experimentos de SAXS foi sobreposto com o modelo atômico gerado por homologia (em azul).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 14 - Dados de coleta e processamento de SAXS da MT-Xyn10.

Dados de coleta	
Feixe de luz	LNLS-SAXS1
Comprimento de onda (Å)	1,55
Varição de q (Å ⁻¹)	0,012 – 0,400
Tempo de exposição por <i>frame</i> (s)	30
Concentrações de proteína (mg/mL)	1, 2 e 4
Temperatura (°C)	20
Análise dos dados	
R_g (Å) (Guinier) ($\pm$ Desv. padrão)	20,85 +- 0,04
R_g (Å) (GNOM) ($\pm$ Desv. padrão)	20,21 +- 0,08
D_{max} (Å)	60
Resolução (Å)	16
Massa molecular experimental (kDa)	42,9
Massa molecular teórica (kDa)	40
Estado oligomérico	Monômero
Modelamento <i>Ab initio</i>	
Número de modelos	10
Número de desv. padrão	0,848 +- 0,022
χ	3,19
Software usado	
Primeira redução de dados	Fit2D
Processamento de dados	PRIMUS
Modelamento	GASBOR

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.2 Resultados e discussão das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b

13.2.1 Produção e purificação

As análises de bioinformática predizeram para a MT-Xyn11a uma cadeia polipeptídica de 268 aminoácidos com ponto isoelétrico de 6,2, massa molecular de 30 kDa (incluindo um peptídeo sinal de 21 resíduos) (Figura 39). As mesmas análises revelaram para MT-Xyn11b um polipeptídeo de 254 aminoácidos com ponto isoelétrico de 5,9, massa molecular de 28 kDa isento de peptídeo sinal (Figura 39). Essas enzimas apresentam id. de 83% entre si, e ambas apresentaram maior semelhança (baseado em identidade de sequência) com β -1,4-xilanases (GH11) de origem bacteriana, principalmente com as do gênero *Cellvibrio* (id. 75-80%) e da espécie *Marinimicrobium agarilyticum* (id. 71% para MT-Xyn11a e 78% para MT-Xyn11b), indicando uma provável origem bacteriana para essas enzimas.

MT-Xyn11a	1	MMLKHFLGSLVILGGLLGCAQ EPKMPPAVADAKASGIARFNAYTQYFPEA	50
	51	TLITQPHATGHVGNFFFTHWKDGGSAAALDLDAKGNFSVSWQGGGYNVVG	100
	101	PGWHFGDKNRVIGYRFNQDSGASYITLYGWGYDKSMPATDPAHLVEYYIL	150
	201	QRWTYDPSQDGIYGKTFVSNGLIEYSTYRSIRKVKPSINGPTTFYQYWSKP	200
	251	SAQQELGKDHKIIFADHVKAWADTGWILPDMNNFDASDDPTYQVLAVEVF	250
	301	NPQKNGTASGQVWDET PR#	268
MT-Xyn11b	1	MVPTQKSVDAKEAVEPDASAVGIEKFKAYTQRFPEKALITQNHATGHVGN	50
	51	FFFTHWKDAGAASLSLDATGSFSVSWQGGGYNVVGPGWHFGDVNRVIGY	100
	101	RFDKDSGASYITLYGWGYNKDMPASDPAHLVEYYILQRWTYDPSKDGIIYG	150
	201	KTFVSDGVEYSTYRSVREQPSINGPTTFYQYWSKPAQQRPLGQKHRIIF	200
	251	ADHVKAWAETGWILPDMNNFNASDDPTYQVMAVEVFNPPKDGTSAGQVWD	250
	301	ATPP #	254

Figura 39 - Sequências de aminoácidos preditas para MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. A MT-Xyn11a tem uma cadeia polipeptídica de 268 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 21 resíduos (em negrito), com ponto isoelétrico de 5,96 e massa molecular de 27 kDa. A MT-Xyn11b tem uma cadeia polipeptídica de 254 aminoácidos com ponto isoelétrico de 5,96 e massa molecular de 28 kDa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As ORFs (744 bp para MT-Xyn11a e 789 pb para MT-Xyn11b) foram amplificadas com sucesso a partir do DNA genômico total do consórcio microbiótico. Em seguida, as ORFs foram purificadas e clonadas no vetor de expressão pETM11/LIC, o qual foi usado na transformação de células *E. coli* Rosetta. As cepas recombinantes foram induzidas durante 24 h à expressão das proteínas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b (Figura 40). Ambas proteínas foram superexpressas com cerca de 32 kDa, purificadas em cromatografia de afinidade por Ni^{+2} , eluída em tampão contendo 100 mM de imidazol e sua cauda 6xHist removida por conseguinte ação da TEV protease. As proteínas desprovidas da cauda (~28 kDa) foram, então, coletadas no “flowthrough” da segunda cromatografia de afinidade por Ni^{+2} . Para garantir a pureza das amostras, essas foram submetidas à um terceiro passo de purificação por exclusão molecular, onde ambas enzimas foram eluídas em um único pico cromatográfico correspondente a ~30 kDa (cálculo estimativo através da curva de calibração), indicando que ambas enzimas assumem estado monomérico em solução. A pureza e integridade da MT-Xyn11a e MT-Xyn11b foram confirmadas por SDS-PAGE (Figura 40).

Figura 40 - Expressão e purificação das proteínas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. A esquerda, o SDS-PAGE mostra a expressão da proteína MT-Xyn11a (0), seguida dos passos de cromatografia de afinidade por Ni^{+2} antes (1) e depois (2) da clivagem com TEV protease; e a proteína pura após terceiro passo de purificação por exclusão molecular (3). A direita, o SDS-PAGE mostra a proteína MT-Xyn11b ao final de todo processo de expressão e purificação (4).

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.2.2 Estabilidade por Thermofluor

Experimentos de Thermofluor foram realizados para avaliar a estabilidade da estrutura terciária das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b frente às distintas condições tamponantes (Tabela 15). Para a MT-Xyn11a, a menor estabilidade foi observada para HCl pH 2,0 ($T_m = 26^\circ\text{C}$) e ácido cítrico pH 3,0 ($T_m = 33^\circ\text{C}$). Valores intermediários de T_m foram verificados tanto para as condições ácidas, citrato de sódio pH 4,0 ($T_m = 45^\circ\text{C}$) e acetato de sódio pH 4,5 ($T_m = 46^\circ\text{C}$), quanto para as mais básicas, Bicina pH 9,0 ($T_m = 48^\circ\text{C}$) e carbonato de sódio pHs 9,5 e 10,0 ($T_m = 46^\circ\text{C}$). Valores de T_m acima de 50°C foram apresentados por todas as demais condições, com destaque para citrato de sódio pH 5,5 e fosfato de potássio pH 6,0, os quais conferiram maior estabilidade à MT-Xyn11a ($T_m = 54^\circ\text{C}$). Portanto, a MT-Xyn11a mantém considerável estabilidade entre os pHs de 4 a 10, principalmente entre os pHs 5 e 8,5.

No caso da MT-Xyn11b, erros na medida impossibilitaram o cálculo dos T_m para as condições de pHs mais ácidos. A menor estabilidade da enzima foi conferida pelos tampões acetato de sódio pH 4,5 ($T_m = 34^\circ\text{C}$) e carbonato de sódio pHs 9,5 e 10,0 ($T_m = 36^\circ\text{C}$ e 38°C). Valores moderados de T_m foram observados para citrato de sódio pH 4,7 ($T_m = 44^\circ\text{C}$) e citrato de sódio pH 5,0 ($T_m = 47^\circ\text{C}$). Para a maioria das condições restantes a enzima mostrou estabilidade com T_m acima de 55°C , atingindo o maior valor de 59°C para várias condições distintas entre os pHs 6,5 e 8,0. Portanto, a MT-Xyn11b mantém considerável estabilidade entre os pHs de 5,0 a 9,0, principalmente entre os pHs 6,5 e 8,0.

Tabela 15 - Termoestabilidade das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b em diversas condições. A termoestabilidade da estrutura terciária das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b foram avaliadas sob efeito de diversos tampões e pHs por Thermofluor. (-) = erro na medida; condições em destaque correspondem aos maiores valores de T_m encontrados.

pH	Tampão (50 mM)	MT-Xyn11a (T_m °C)	MT-Xyn11b (T_m °C)
7,0	Controle (água)	52	59
1,2	HCl	-	-
2,0	HCl	26	-
3,0	Ácido Cítrico	33	-
4,0	Citrato de Sódio	45	-
4,5	Acetato de Sódio	46	34
4,7	Citrato de Sódio	50	44
5,0	Acetato de Sódio	49	47
5,0	Fosfato de Potássio	53	54
5,5	Citrato de Sódio	54	56
5,5	Fosfato de Sódio	53	58
5,8	Mes	52	53
6,0	Fosfato de Potássio	54	57
6,0	Bis-Tris	53	55
6,2	Mes	53	57
6,5	Fosfato de Sódio	53	58
6,5	Cacodilato de Sódio	53	59
6,5	Bis-Tris	51	59
6,5	Mes	53	58
6,7	Bis-Tris	53	58
7,0	Fosfato de Potássio	52	58
7,0	Hepes	52	59
7,0	Bis-Tris	53	59
7,3	Acetato de Amônio	53	56
7,5	Fosfato de Sódio	51	58
7,5	Tris	51	59
8,0	Imidazol	50	57
8,0	Hepes	52	58
8,0	Tris	51	59
8,0	Bicina	50	57
8,5	Tris	50	58
9,0	Bicina	48	54
9,5	Carbonato de Sódio	46	38
10,0	Carbonato de Sódio	46	36

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.2.3 Especificidade de substrato

A atividade enzimática da MT-Xyn11a e MT-Xyn11b foi testada contra 15 diferentes substratos de origem vegetal, dentre os quais ambas enzimas apresentaram atividade somente para xilano de *beechwood*. Como já descrito na Introdução (item 1.3.2), uma típica endo- β -1,4-xilanase da família GH11 são específicas para heteroxilanos, sendo incapazes de hidrolisar qualquer outro tipo de substrato, como celulose ou derivados. Sabe-se também, que essa enzimas tem baixa atividade contra substratos com alto grau de decorações, o que pode explicar o porque das MT-Xyn11a e MT-Xyn11b serem ativas em xilano de *beechwood* (~13% ácido glucurônico) mas não em arabinoxilano de *ryefluor* (~40% arabinose).

Como já discutido no item 13.1.3, a MT-Xyn10 apresentou menor atividade em arabinoxilano devido o elevado grau de decorações nesse substrato. O motivo pelo qual a atividade das MT-Xyn11a e MT-Xyn11b terem sido mais afetadas em relação a MT-Xyn10, deve-se a diferença entre a cavidade catalítica dessas diferentes classes de xilanases. Como detalhado na Introdução (item 1.3.2), endo- β -1,4-xilanases GH10 clivam a ligação glicosídica ao lado (em direção ao terminal redutor) de uma xilose decorada até por dois grupos laterais; e necessita de apenas duas xiloses isentas de decoração entre duas xiloses decoradas. Enquanto que as endo- β -1,4-xilanases GH11 não são capazes de clivar a ligação glicosídica ao lado (em direção ao terminal redutor) de uma xilose que esteja anexada a um grupo lateral; e requer três xiloses isentas de decoração para hidrolisar a ligação β -1,4.

13.2.4 Atividade ótima e cinética enzimática

O perfil da atividade enzimática da MT-Xyn11a em função da variação de temperatura mostrou melhor performance em 35 °C, mantendo aproximadamente 60% da máxima atividade a 25 °C, cerca de 50% a 45 °C e apenas 25% a 50 °C (Figura 41A). Enquanto, a MT-Xyn11b mostrou maior atividade em 45 °C, mantendo aproximadamente 50% dessa atividade nas temperaturas 34 °C e 55 °C; e apenas 16% da atividade máxima a 60 °C (Figura 41C).

Figura 41 - Atividade ótima das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. MT-Xyn11a mostra maior atividade por volta de 35 °C e pH 7,0, enquanto a MT-Xyn11b tem maior atividade por volta de 45 °C entre os pHs de 5,0 a 9,0.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em função da variação de pH, o perfil de atividade enzimática da MT-Xyn11a apresenta atividade pouco significativa entre os pHs 2 e 4; máximo desempenho em pH 7, retendo cerca de 60% da atividade máxima nos pHs 5,0 e 10,0 (Figura 41B). No caso da MT-Xyn11b, atividades relativas menores que 5% são observadas para os pHs 2 e 3 e apenas 20% no pH 4. Além disso, a melhor performance dessa enzima se estende entre os pHs 5 e 9 de forma quase que constante. Em pH 10, a enzima tem uma queda de aproximadamente 50% em sua atividade máxima (Figura 41D).

A revisão de Paes e colaboradores¹⁵⁸ reúne dados de 164 xylanases GH11 reportadas no banco de dados CAZy. Dentre todas essas xilanases há uma grande variação em suas temperaturas (35-85 °C) e pH (2,0-9,0) ótimos de atividade. Apesar da grande variedade, a maioria dessas enzimas apresentam condições ótimas de atividade a 40-65 °C e pH 4,0-7,0.

De modo, que a atividade ótima das MT-Xyn11a e MTXyn11b são condizentes com a maior parte das GH11 já estudadas.

Interessantemente, os resultados indicam que todas as três MT-Xilanases tem maior atividade entre 30 e 45 °C e entre os pHs 6,0 e 9,0, restando atividade acima de 50% nos pH 5,0 e 10,0, sugerindo que podem ser usadas em combinação para uma mesma gama de aplicações biotecnológicas.

No intuito de se determinar os parâmetros cinéticos V_{max} , K_M e k_{cat} das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b, foram realizadas reações com concentrações crescentes de xilano de *beechwood*. As reações foram realizadas sob as condições ótimas de temperatura e pH anteriormente definidas para cada uma delas. Estranhamente, não foi possível determinar os parâmetros cinéticos de nenhuma das enzimas, uma vez que a V_{max} não foi alcançada nem mesmo nas altas concentrações de substrato e, portanto, também não foi possível calcular o K_M e k_{cat} . De fato, a análise das curvas obtidas pelos experimentos revelam que as velocidades iniciais de ambas enzimas ainda estão em fase linear mesmo com elevadas concentrações de xilano (avaliado até 18 mg/mL para MT-Xyn11a e até 9 mg/mL para MT-Xyn11b) (Figura 42). Os dados sugerem, portanto, que ambas as enzimas apresentam baixíssima afinidade ao substrato, sendo necessário concentrações de substrato superiores a 20 mg/mL para que essas enzimas atinjam suas V_{max} .

Figura 42 - Cinética enzimática das enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. Os experimentos de cinética enzimática para MT-Xyn11a e MT-Xyn11b foram realizados com xilano, sob as respectivas condições ótimas atividade pré-determinadas. Entretanto, não foi possível definir os parâmetros cinéticos de ambas as enzimas, pois, mesmo em altas concentrações de substrato não foi atingida a V_{max} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Xilanases GH11 de diversos outros organismos foram reportadas com valores de K_m bastante variável para xilano de *beechwood*. Por exemplo, as duas GH11 de *P. oxalicum* apresentaram K_M de 3,0 e 4,7 mg/mL,¹⁴⁵ enquanto as GH11 de *Humicola insolens* e *C. mixtus* têm K_M iguais a 2,2 e 6,0 mg/mL, respectivamente.^{159; 160} Valores de afinidade muito superiores foram reportados para duas GH11 de *Achaetomium sp.* ($K_M = 0,31$ e $0,37$ mg/mL). Por fim, após extensa busca na literatura, as xilanases GH11 encontradas com menor afinidade para xilano de *beechwood* são de *Hypocrea orientalis* ($K_M = 10,43$ mg/mL)¹⁶¹ e de *Clostridium beijerinckii* ($K_M = 19,1$ mg/mL).¹⁶² Considerando os dados cinéticos aqui gerados, as enzimas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b apresentam afinidade ao substrato muito inferior que as demais GH11, até mesmo quando comparadas as de *H.orientalis* e *C. beijerinckii*.

13.2.5 Cristalização, coleta e processamento de dados cristalográficos

Com objetivo de se obter a estrutura cristalográfica das proteínas MT-Xyn11a e MT-Xyn11b, essas foram submetidas a triagem de cristalização. Porém, foram obtidos cristais de proteína apenas para MT-Xyn11a, a qual cristalizou em uma única condição após 21 dias: 0,1M Mes pH 6,5, contendo 30% de PEG 4K (Figura 43).

Figura 43 - Cristal da proteína MT-Xyn11a. A proteína purificada foi submetida à triagem de condições para cristalização, através do método de difusão a vapor “sitting-drop”, utilizando o sistema automático robótico Honey Bee 961 Dispensing System e kits comerciais (Quiagen e Hampton) de cristalização de proteínas. A figura mostra os cristais obtidos na condição 0,1M Mes pH 6,5, contendo 30% de PEG 4K, após 21 dias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.2.6 Construção do modelo estrutural da MT-Xyn11a por cristalografia de raios-X

O conjunto de dados cristalográficos da MT-Xyn11a foram indexados no grupo espacial $P6_3$ e, após integração, as reflexões foram escalonadas e mergeadas dentro de um total de 33.189 reflexões únicas, com um R_{merge} total de 9,6% e completeza de 100%. Um resumo dos parâmetros de processamento das imagens de difração e refinamento da estrutura cristalográfica encontra-se na Tabela 16. Assumindo uma única molécula com 28 kDa na

unidade assimétrica, o coeficiente de Matthews foi calculado como $2 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, correspondendo um conteúdo de solvente de 38,5% para o cristal. A estrutura foi resolvida por substituição molecular através do programa Phaser, via método de substituição molecular. Para tal, utilizou-se como molde as coordenadas da xilanase de *Chaetomium thermophilum* (pdb: 1H1A) com identidade sequencial de 37%. O método empregado gerou uma única solução no grupo espacial identificado (Função de Rotação Z-score = 16,5, Função de Translação Z-score = 179). O refinamento da estrutura foi realizado através do programa Phenix-Refine, sendo que durante todo o processo foram realizados ciclos alternados de refinamento com inspeção visual do mapa de densidade eletrônica, remodelando manualmente quando necessário, a posição dos resíduos através do programa Coot.⁶⁰

Tabela 16 - Coleta e processamento dos dados cristalográficos da proteína MT-Xyn11a.

Dados de coleta	
Detector	PILATUS 2M
Comprimento de onda (Å)	1,458
Faixa de rotação por frame (°)	0,5
Dist. entre cristal e detector (mm)	150
Temperatura de coleta (K)	100
Faixa de resolução (Å)	48,49 – 1,91 (1,96 – 1,91)
Grupo espacial	P6 ₃
Parâmetros da célula unitária	
a, b, c (Å)	96,97 96,97 40,91
α , β , γ (°)	90, 90, 120
Reflexões únicas	33189 (5397)
Multiplicidade	19,4 (17,6)
Completeza (%)	100,0 (99,6)
$I/\sigma(I)$	25,1 (5,7)
R_{merge}	9,6 (61,2)
Refinamento do modelo	
Nº de reflexões usadas	17.171
Conteúdo de solvente (%)	38,5
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	0,14/0,18
Nº de átomos na proteína	1.997
Nº de moléculas de águas	233
R.m.s.d. ^b , comprimento das ligações (Å)	0,007
R.m.s.d. ^b , ângulo das ligações (°)	0,869
Ramachandran (%)	
Favoráveis	95,97
Permitidos	3,63
Não permitidos	0,40

Fonte: Elaborada pelo autor.

13.2.7 Análise do modelo estrutural da MT-Xyn11a

A estrutura tradicional descrita para mais de 50 xilanases GH11 depositadas no PDB têm domínio catalítico conhecido como “ β -rolo de geléia”, o qual lembra a forma de uma mão direita parcialmente fechada (Figura 44). A estrutura é consituída de duas folhas- β antiparalelas e torcidas, mais uma única α -hélice. As duas folhas- β formam os “dedos”, enquanto a parte torcida da folhas- β somada à α -hélice formam a “palma da mão.”²³ É na “palma da mão” que os dois resíduos catalíticos (glutamato) conservados se encontram. O polegar é formado pelo *loop* que conecta as fitas- β 7 e 8, enquanto o “cordão” é formado por um *loop* maior e irregular entre as fitas- β 6 e 9, conectando os dedos à base do polegar e parcialmente fechando a cavidade catalítica na sua região mais próxima ao C-terminal.²³ Os resíduos que constituem o “polegar” são altamente conservados, sendo sua sequência PSIXG, onde X pode ser praticamente qualquer resíduo.²³ No caso da MT-Xyn11a, esse resíduo “X” foi identificado como uma asparagina (N).

Figura 44 - Estrutura molecular geral das GH11. A estrutura geral das xilanases GH11 é aqui representada pelo modelo cristalográfico da GH11 de *B. subtilis* complexado com uma xilotriose (pdb 2QZ3).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modelo cristalográfico da MT-Xyn11a apresenta a mesma estrutura geral descrita pelas demais GH11 já reportadas, porém algumas notáveis diferenças estruturais foram encontradas (Figura 45A-45D). O N-terminal da enzima apresenta uma α -hélice com alta flexibilidade, segundo análise de B-fator. Além disso, dois *loops* extras (1) e (2) com pouca flexibilidade, segundo análise de B-fator, também foram notados (Figura 45A-45D). Após extensa busca na literatura, as funções da α -hélice extra e dos dois *loops* permanecem desconhecidos, pois não foram descritos por nenhuma outra GH11 presente no PDB. Para melhor compreender a função dessas diferenças estruturais, a molécula de xilotriose,

cristalizada juntamente com a GH11 de *B. subtilis* (pdb 2QZ3), foi alinhada à estrutura da MT-Xyn11a (Figura 45C e 45D). Em relação à α -hélice extra, apesar de sua função desconhecida, seu posicionamento espacial, distante da cavidade catalítica, sugere que não interage diretamente com o substrato (Figura 45D). O mesmo pode-se dizer sobre o *loop* (2), o qual se encontra acima da cavidade catalítica (Figura 45C). Por outro lado, o posicionamento espacial do *loop* (1) sugere uma interação direta com a cadeia de xilano, gerando uma espécie de barreira que impede ou dificulta a acomodação do substrato na cavidade catalítica na sua região mais próxima ao N-terminal (Figura 45D).

Figura 45 - Estrutura molecular da proteína MT-Xyn11. A estrutura cristalográfica da MT-Xyn11a apresenta a conformação estrutural tradicional descrita para dezenas de outras GH11, provenientes de diferentes organismos. A estrutura conhecida como “rolo de gelatina” assemelha-se à uma mão direita parcialmente fechada. O modelo foi colorido por “B-factor spectrum”, onde os tons mais escuros de azul indicam as estruturas mais rígidas e menos flexíveis, enquanto os tons mais vermelhos indicam grande flexibilidade. (A) e (B) mostram diferentes ângulos de visualização da molécula. (C) e (D) mostram diferentes ângulos de visualização da cavidade catalítica, contendo uma xilotriose.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As sequências de amino ácidos da MT-Xyn11a e MT-Xyn11b foram alinhadas com mais de 50 xilanases GH11 depositadas no PDB (Figura 46). Com exceção das MT-Xyn11a e MT-Xyn11b nenhuma outra sequência apresenta qualquer um dos dois *loops* mencionados. Além disso, a estrutura terciária de cinco xilanases representativas foram selecionadas para um alinhamento 3D com a estrutura cristalográfica da MT-Xyn11a (Figura 47). Essas xilanases estão entre as quais apresentaram maior identidade de sequência para a MT-Xyn11a e MT-Xyn11b, sendo duas fúngicas (*C. thermophilum*: 1H1A; e *T. reesei*: 4XQD) e três bacterianas (*B. subtilis*: 1XXN; *T. fusca*: 3ZSE; e *T. Cellulolyticus*: 3WP3). O resultado do alinhamento 3D realça o observado no alinhamento das sequências de amino ácidos, ou seja, evidencia que as estruturas nomeadas aqui de *loop* (1) e (2) estão presentes apenas na estrutura molecular da MT-Xyn11a.

Figura 46 - Alinhamento das sequências de amino ácidos de diferentes GH11. As sequências de amino ácidos de cinco diferente xilanases GH11 representativas foram alinhadas com as sequências das MT-Xyn11a MT-Xyn11b. Essas xilanases estão dentre àquelas com maior identidade de sequência para MT-Xyn11a e MT-Xyn11b, além de terem suas estruturas cristalográficas depositadas no PDB. Dentre elas, duas são fúngicas (*C. thermophilum*: 1H1A; e *T. reesei*: 4XQD) e três bacterianas (*B. subtilis*: 1XXN; *T. fusca*: 3ZSE; e *T. Cellulolyticus*: 3WP3). Os quadros 1 e 2 indicam dois loops pertencentes somente à MT-Xyn11a e MT-Xyn11b.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 47 - Alinhamento estrutural de diferentes xilanases GH11. As estruturas cristalográficas de cinco diferente xilanases GH11 foram alinhadas com o modelo cristalográfico da MT-Xyn11a. Essas xilanases estão dentre àquelas com maior identidade de sequência para a MT-Xyn11a e MT-Xyn11b, sendo duas fúngicas e três bacterianas, nessa ordem: Azul: *C. thermophilum*, 1H1A; Cinza: *T. reesei*, 4XQD; Verde: *B. subtilis*, 1XXN; Rosa: *T. fusca*, 3ZSE; e Amarelo: *T. Cellulolyticus*, 3WP3. A estrutura de MT-Xyn11a, em vermelho, notavelmente apresenta dois *loops* extras exclusivos dessa enzima (1) e (2).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda não é claro o papel de cada uma dessas três estruturas distintas (α -hélice extra, *loop* (1) e (2)) contidas nas estruturas da MT-Xyn11a e MT-Xyn11b. Estudos mais aprofundados, envolvendo mutações sítio-dirigidas devem ser realizadas, no intuito de melhor compreender a contribuição de cada um desses componentes estruturais na atividade enzimática. No entanto, a análise prévia aqui realizada permite sugerir que o *loop* (1), bloqueia parcialmente parte da cavidade catalítica, sendo o provável motivo da baixa afinidade ao substrato, apresentada por ambas as enzimas aqui estudadas.

14 Conclusões

- A partir dos estudos prévios do metatranscriptoma gerado por nosso grupo, três xilanases foram clonadas, expressas e purificadas com sucesso, permitindo relevantes estudos bioquímicos e biofísicos dessas enzimas.
- Os dados bioquímicos mostram que as três MT-Xilanases são monoméricas em solução, apresentam maior atividade entre 30 e 45 °C e pHs de 6,0 a 9,0, retendo atividade acima de 50% nos pHs 5,0 e 10,0. Além disso, todas apresentam especificidade por xilano, sendo que a MT-Xyn10 apresenta, também, alta atividade contra arabinoxilano. De fato, as eficiências-catalítica da MT-Xyn10 contra xilano e arabinoxilano são bastante similares.
- A MT-Xyn10 apresenta um conjunto de propriedades enzimáticas bastante atrativas às aplicações industriais, uma vez que é altamente estável em uma ampla faixa de pH (4-10), termoestável em temperaturas até 50 °C sua ação catalítica produz diversos xilo-oligossacarídeos de alto valor agregado.
- Os cristais gerados para as proteínas MT-Xyn10 e MT-Xyn11b foram insatisfatórios para os experimentos de difração de raios-X, sendo necessário a otimização de suas condições de cristalização.
- O modelo de envelope molecular gerado para a MT-Xyn10 acomoda adequadamente a estrutura atômica da proteína, gerada por homologia. Além disso, os dados de SAXS mostram que a MT-Xyn10 é uma proteína globular, assemelhando-se à uma tigela, onde o extenso sulco catalítico é destacado.
- Ao contrário da MT-Xyn10, a MT-Xyn11a e MT-Xyn11b mostram baixa afinidade pelo substrato. A análise de sequência de amino ácidos e a análise da estrutura cristalográfica da MT-Xyn11a revela que tanto a MT-Xyn11a quanto a MT-Xyn11b apresentam três particularidades estruturais ainda não descritas para outras GH11. Dentre essas particularidades o *loop* (1) parece limitar o acesso do substrato ao sítio catalítico, sugerindo ter contribuição direta na baixa afinidade dessas enzimas pelo substrato.

15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Considerando os objetivos específicos aqui propostos, pode-se afirmar que a grande maioria deles foram alcançados.
- A análise da estrutura cristalográfica da SI-PME, aqui construída, revelou grande importância nos estudos evolucionários relacionados à origem das PMEs de inseto. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovação da teoria de transferência horizontal, aqui mencionada.
- Maiores esforços são necessários para que a proteína SI-EndoPG seja cristalizada na sua forma íntegra, uma vez que essa apresentou alta susceptibilidade à degradação por peptidases.
- A BI-ExoPG apresenta algumas propriedades enzimáticas atrativas às aplicações industriais, tais como: temperatura ótima e termoestabilidade acima de 50 °C; pH ótimo neutro e alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (5-10). Além disso, libera monômeros de ácido galacturônico como único produto de reação. Entretanto, a enzima também apresenta eficiência catalítica muito inferior à maioria das Exo-PGs (EC 3.2.1.67) já reportadas, tornando-a inviável para os atuais processamentos de pectina do setor industrial.
- Os estudos de metatranscriptoma mais uma vez apresentam-se como uma ferramenta poderosa na bioprospecção de enzimas que, até então, permaneciam “escondidas” nos micro-organismos atualmente não-cultiváveis em laboratório. Afirma-se isso, pois, neste trabalho três novas xilanases, nunca antes descritas, foram clonadas, expressas, purificadas e estudadas com sucesso, a partir dos estudos de metatranscriptoma realizados anteriormente por nosso grupo.
- A MT-Xyn10 apresenta-se como um forte candidato à aplicação industrial, uma vez que é termoestável em até 50 °C, tem pH ótimo neutro e alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (4-10). Além disso, sua ação catalítica em xilano e arabinoxilano produz vários xilo-oligossacarídeos de alto valor agregado, além de xilose. Mais ainda, a eficiência catalítica dessa enzima é comparável à maioria das GH10 já reportadas.
- O estudo estrutural do modelo cristalográfico da MT-Xyn11a, construído aqui, permitiu identificar particularidades estruturais não antes descritas para as GH11 já reportadas. Além disso, permitiu correlacionar uma dessas particulares estruturais

(*loop* (1)) com a baixa afinidade dessa enzima pelo seu substrato. Embora, maiores estudos sejam necessários para confirmação da hipótese aqui gerada.

REFERÊNCIAS

- 1 MALCOLM, J. R. et al. Global warming and extinctions of endemic species from biodiversity hotspots. **Conservation Biology**, v. 20, n. 2, p. 538-48, Apr. 2006.
- 2 SIMS, R. E. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570-80, Mar. 2010.
- 3 ISIKGOR, F.; BECER, C. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.
- 4 THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 834-847, Jan. 2015. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.044.
- 5 THANGAVELU, S.; AHMED, A.; ANI, F. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 820-835, Apr. 2016.
- 6 SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, Jan. 2012.
- 7 BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Energia renovável representa mais de 42% da matriz energética brasileira. 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2015/11/energia-renovavel-representa-mais-de-42-da-matriz-energetica-brasileira>>. Acesso em: 31 jul. 2017.
- 8 DAVIS, R. et al. **Process design and economics for the conversion of lignocellulosic biomass to hydrocarbons**: dilute-acid and enzymatic deconstruction of biomass to sugars and catalytic conversion of sugars to hydrocarbons. 2015. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/docs/fy15osti/62498.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 9 JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 10, n. 2, p. 164-174, Mar-Apr. 2016.
- 10 YORK, W. S. et al. Isolation and characterization of plant-cell walls and cell-wall components. **Methods in Enzymology**, v. 118, p. 3-40, 1986. doi.org/10.1016/0076-6879(86)18062-1.
- 11 KEEGSTRA, K. Plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 483-486, Oct. 2010.
- 12 CARPITA, N.; TIERNEY, M.; CAMPBELL, M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1-2, p. 1-5, 2001.
- 13 BIOENERGY SCIENCE CENTER. Walls and Biofuels: lignocelluloisc biomass and bioenergy. Disponível em: <<http://bioenergy.crc.uga.edu/Background/background.htm>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

- 14 MARTINS, E. D. S. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, Rio Claro, 2006.
- 15 U.S. A. Department of Energy. Office of Science. Genomics: GTL Roadmap. Disponível em: <<http://genomicsgtl.energy.gov/roadmap/>>. Acesso em: 31 jul. 2017.
- 16 WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.
- 17 KASHYAP, D. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, May 2001.
- 18 ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, Jan. 1998.
- 19 TAJNER-CZOPEK, A. Changes of pectic substances concentration in potatoes and French fries and the effect of these substances on the texture of the final product. **Nahrung**, v. 47, n. 4, p. 228-231, Aug. 2003.
- 20 ZAITLIN, M.; COLTRIN, D. Use of Pectic Enzymes in a Study of the Nature of Intercellular Cement of Tobacco Leaf Cells. **Plant Physiology**, v. 39, n. 1, p. 91-95, Jan. 1964.
- 21 BÖRJESSON, M.; WESTMAN, G. Crystalline nanocellulose: preparation, modification, and properties. In: POLETTI, M.; ORNAGHI JUNIOR, H. L. (Ed.). **Cellulose** - fundamental aspects and current trends. Rijeka: InTech, 2015. cap. 7.
- 22 GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, July 2010.
- 23 POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 176-91, Sept. 2010.
- 24 DUVAL, A.; LAWOKO, M. A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials. **Reactive & Functional Polymers**, v. 85, p. 78-96, Dec. 2014.
- 25 KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 277-282, Apr. 2000.
- 26 KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.
- 27 KOHLI, P. et al et al. Pectin methylesterase: a review. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n.5, 2015. doi.org/10.4172/2155-9821.1000227.

- 28 EVANGELISTA, D. E. et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the pectin methylesterase from the sugar cane weevil *Sphenophorus levis*. **Acta Crystallographica F**, v. 70, n. 3, p. 331-334, 2014.
- 29 PAUCHET, Y. et al. Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15635, Dec. 2010.
- 30 PAUCHET, Y. et al. Identification and characterization of plant cell wall degrading enzymes from three glycoside hydrolase families in the cerambycid beetle *Apriona japonica*. Insect. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, p. 1-13, June 2014. doi: 10.1016/j.ibmb.2014.03.004
- 31 GAINVORS, A. et al. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, p. 1311-9, Oct. 1994.
- 32 ROGERS, L. M. et al. Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 17, p. 9813-9818, Aug. 2000.
- 33 EVANGELISTA, D. E. et al. Pectinases from *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): putative accessory digestive enzymes. **Journal of Insect Science**, v. 15, Feb. 2015. doi: 10.1093/jisesa/ieu168.
- 34 MARKOVIČ, O.; JANEČEK, Š. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. **Protein Engineering**, v. 14, n. 9, p. 615-631, Sept. 2001.
- 35 EVANGELISTA, D. E. **Produção recombinante, caracterização enzimática e estudos sobre a ocorrência de pectinases no bicudo da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*, Curculionidae)**. 2012. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012..
- 36 KALIM, B. et al. Xylanases—from microbial origin to industrial application. **British Biotechnology Journal**, v. 7, n. 1, p. 20, 2015
- 37 WALIA, A. et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 11, May 2017.
- 38 LAGAERT, S. et al. Recombinant expression and characterization of a reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase from *Bifidobacterium adolescentis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5374-5377, Aug. 2007.
- 39 KEEN, N.; BOYD, C.; HENRISSAT, B. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. **Molecular Plant-microbe interactions**, v. 9, n. 7, p. 651-657, Sept. 1996. ISSN 0894-0282.
- 40 NISHITANI, K.; NEVINS, D. Glucuronoxylan xylanohydrolase - a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6539-6543, Apr. 1991.

- 41 YOON, K. H.; YUN, H. N.; JUNG, K. H. Molecular cloning of a *Bacillus* sp. KK-1 xylanase gene and characterization of the gene product. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 45, n. 2, p. 337-47, June 1998.
- 42 COLLINS, T. et al. A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35133-35139, Sept. 2002.
- 43 BRENNAN, Y. et al. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3609-3617, June 2004.
- 44 LEE, C. C. et al. Cloning and characterization of a cold-active xylanase enzyme from an environmental DNA library. **Extremophiles**, v. 10, n. 4, p. 295-300, Aug. 2006..
- 45 TAKAMI, H. et al. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 21, p. 4317-31, Nov. 2000.
- 46 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, June 2005.
- 47 KUMAR, G. P.; PUSHPA, A.; PRABHA, H. A review on xylooligosaccharides. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 8, p. 4, 2012.
- 48 VAZQUEZ, M. et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387-393, Nov. 2000.
- 49 FONSECA, F. P. D. P. **Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis***. 2013. 180 p. Tese (Doutorado). Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- 50 PAVLU, F.; MOLIN, J. A sampling plan and spatial distribution for site-specific control of *Sphenophorus levis* in sugarcane. **Acta Scientiarum-agronomy**, v. 38, n. 3, p. 279-287, July-Sept. 2016.
- 51 GIRON-PEREZ, K. et al. Attraction of *Sphenophorus levis* Vaurie Adults (Coleoptera: Curculionidae) to vegetal tissues at different conservation levels. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 842-846, Nov-Dec. 2009.
- 52 PEDEZZI, R. et al. A novel beta-fructofuranosidase in Coleoptera: characterization of a beta-fructofuranosidase from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, p. 31-38, Dec. 2014.
- 53 ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289-98, Oct. 2006.

- 54 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-221, Feb. 2010.
- 55 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- 56 EKLOF, J. M. et al. The crystal structure of the outer membrane lipoprotein YbhC from *Escherichia coli* sheds new light on the phylogeny of carbohydrate esterase family 8. **Proteins**, v. 76, n. 4, p. 1029-36, Sept. 2009.
- 57 DI MATTEO, A. et al. Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. **Plant Cell**, v. 17, n. 3, p. 849-58, Mar. 2005.
- 58 JOHANSSON, K. et al. Crystal structure of plant pectin methylesterase. **FEBS Letters**, v. 514, n. 2-3, p. 243-9, Mar. 2002.
- 59 BORASTON, A. B.; ABBOTT, D. W. Structure of a pectin methylesterase from *Yersinia enterocolitica*. **Acta Crystallographica F**, v. 68, n. Pt 2, p. 129-133, Feb. 2012.
- 60 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-2132, Dec. 2004.
- 61 BATTYE, T. G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica D**, v. 67, n. Pt 4, p. 271-81, Apr. 2011..
- 62 POWELL, H. R.; JOHNSON, O.; LESLIE, A. G. Autoindexing diffraction images with iMosflm. **Acta Crystallographica D**, v. 69, n. Pt 7, p. 1195-1203, 2013.
- 63 POWELL, H. R. et al. Integrating macromolecular X-ray diffraction data with the graphical user interface iMosflm. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1310-1325, July 2017.
- 64 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica D**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-763, Sept. 1994.
- 65 MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491-7, Apr. 28 1968. I
- 66 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, n. 4, p. 495-503, 1992.
- 67 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101-109, 2009.
- 68 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 3, p. 860-864, 2003.

- 69 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; HAMMEL, M.; SALI, A. FoXS: a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. W540-544, July 2010. doi: 10.1093/nar/gkq461.
- 70 KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, n. 1, p. 33-41, Feb. 2001.
- 71 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- 72 JOHANSSON, K. et al. Crystal structure of plant pectin methylesterase. **FEBS Letters**, v. 514, n. 2-3, p. 243-9, Mar. 2002.
- 73 SHEN, Z. et al. Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. **Journal of Insect Science**, v. 5, p. 21, Aug. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1307582/pdf/i1536-2442-005-21-0001.pdf>>. Acesso em; 23 jan. 2017..
- 74 WYBOUW, N. et al. Horizontal gene transfer contributes to the evolution of arthropod herbivory. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 1785-1801, June 2016.
- 75 TELLER, D. C. et al. The structure of rice weevil pectin methylesterase. **Acta Crystallographica F**, v. 70, n. 11, p. 1480-1484, 2014.
- 76 YODER, M. D.; KEEN, N. T.; JURNAK, F. New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. **Science**, v. 260, n. 5113, p. 1503-1507, June 1993.
- 77 PICKERSGILL, R. et al. Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24660-24664, Sept. 1998.
- 78 JENKINS, J. et al. Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 4, p. 951-960, Jan. 2001.
- 79 BLIVEN, S.; PRLIĆ, A. Circular permutation in proteins. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 3, p. e1002445, 2012.
- 80 CUNNINGHAM, B. A. et al. Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 7, p. 3218-3222, July 1979.
- 81 PAUCHET, Y. et al. Studying the organization of genes encoding plant cell wall degrading enzymes in *Chrysomela tremula* provides insights into a leaf beetle genome. **Insect Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 286-300, June 2014.
- 82 SHEN, Z. et al. Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. **Journal of Insect Science**, v. 3, p. 24, Aug. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524663/pdf/i1536-2442-003-24-0001.pdf>>. Acesso em 23 jan. 2017..

- 83 LLARCH, A. et al. Isolation and characterization of thermophilic bacillus spp. from geothermal environments on deception island, south shetland archipelago. **Microbial Ecology**, v. 34, n. 1, p. 58-65, July 1997.
- 84 JACOBS, M. et al. Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 24, p. 8913-8926, Dec. 1985.
- 85 JENNY, K.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 5-13, Oct. 1991.
- 86 YAKIMOV, M. M. et al. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1706-13, May 1995.
- 87 SEO, J. K. et al. Characterization of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 Isolated from the Rumen of a Native Korean Goat. **Asian-Australas Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 50-58, Jan. 2013.
- 88 DAMIANO, V. et al. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n. 1-3, p. 289-302, Mar. 2006.
- 89 ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* mvs1 and *Bacillus* sp mvs3 isolated from indian hot spring. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 497-503, July-Aug. 2012.
- 90 REHMAN, H. U. et al. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 622-626, Feb. 2014.
- 91 REHMAN, H. et al. Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 819-824, Jan. 2015.
- 92 REHMAN, H. U. et al. Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 5, 2015.
- 93 REY, M. W. et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R77, 2004.
- 94 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.
- 95 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, May 2005.

- 96 MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959 Mar. 1959.
- 97 OVODOV, Y. et al. Thin-layer chromatography of carbohydrates. **Journal of Chromatography**, v. 26, n. 1, p. 111, 1967.
- 98 GUIMARAES, B. G. et al. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 16, n. 1, p. 69-75, 2009.
- 99 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, p. 101-109, Feb. 2010.
- 100 FRANKE, D.; SVERGUN, D. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, p. 342-346, Apr. 2009.
- 101 SVERGUN, D. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2879-2886, June 1999.
- 102 PETOUKHOV, M. et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, p. 342-350, Apr. 2012.
- 103 KOZIN, M.; SVERGUN, D. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 33-41, Feb. 2001.
- 104 JANSEN, E.; MACDONNELL, L. Influence of methoxyl content of pectic substances on the action of polygalacturonase. **Archives of Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 97-112, 1945.
- 105 MOHAMED, S.; CHRISTENSEN, T.; MIKKELSEN, J. New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 6, p. 515-524, Mar. 2003.
- 106 CRELIER, S. et al. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat- and pressure-induced inactivation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5566-5575, Nov. 2001.
- 107 RASHAD, M. M. et al. Purification and characterization of extracellular polygalacturonase from *pleurotusostreatus* using citrus limonium waste. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 6, n. 1, p. 9, 2010.
- 108 KOBAYASHI, T. et al. Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 1, p. 70-75, July 2001.

- 109 TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 7, 2014.
- 110 KLUSKENS, L. et al. Characterization and mode of action of an exopolygalacturonase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. **FEBS Journal**, v. 272, n. 21, p. 5464-5473, Nov. 2005.
- 111 PARISOT, J. et al. Cloning expression and characterization of a thermostable exopolygalacturonase from *Thermotoga maritima*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 12, p. 1333-1337, June 2003.
- 112 KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 239-243, Sept. 2004.
- 113 PUSIC, T.; TARBUK, A.; DEKANIC, T. Bio-innovation in cotton fabric scouring. acid and neutral pectinases. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 23, n. 1, p. 98-103, Jan.-Feb. 2015.
- 114 MARTINS, E. et al. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949-954, Apr. 2002.
- 115 MALLER, A. et al. Functional properties of a manganese-activated exopolygalacturonase produced by a thermotolerant fungus *Aspergillus niveus*. **Folia Microbiologica (Praha)**, v. 58, n. 6, p. 615-21, Nov. 2013.
- 116 PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 567-73, June 2010.
- 117 YUAN, P. et al. A protease-resistant exo-polygalacturonase from *Klebsiella* sp. Y1 with good activity and stability over a wide pH range in the digestive tract. **Bioresources Technology**, v. 123, p. 171-6, Nov. 2012.
- 118 PATIL, N. P. et al. Production, Purification of Exo-Polygalacturonase from Soil Isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and Its Application. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 240-246, June 2012.
- 119 SILVA, D. et al. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1237-1243, Aug. 2007.
- 120 KOBAYASHI, T. et al. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 842-7, Apr. 2001.
- 121 SWAIN, M.; RAY, R. Production, Characterization and Application of a Thermostable Exo-polygalacturonase by *Bacillus subtilis* CM5. **Food Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 37-50, 2010.

- 122 CELESTINO, S. M. et al. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 33-42, May 2006.
- 123 MA, Y. et al. Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 88 Suppl. 1, p. 479-487, 2016.
- 124 WAGSCHAL, K. et al. Expression and characterization of hyperthermostable exo-polygalacturonase TtGH28 from *Thermotoga thermophilus*. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 7, p. 509-519, July 2016.
- 125 LI, K. et al. Two thermophilic fungal pectinases from *Neosartorya fischeri* P1: gene cloning, expression, and biochemical characterization. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 118, p. 70-78, Aug. 2015. doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.005.
- 126 RAMBO, R.; TAINER, J. Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the porod-debye law. **Biopolymers**, v. 95, n. 8, p. 559-571, Aug. 2011.
- 127 WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 47, p. 5.6.1-32, Sept. 2014.
- 128 ESWAR, N. et al. Protein structure modeling with MODELLER. **Methods in Molecular Biology**, v. 426, p. 145, 2008. doi: 10.1007/978-1-60327-058-8_8.
- 129 PIJNING, T. et al. The crystal structure of a hyperthermoactive exopolygalacturonase from *Thermotoga maritima* reveals a unique tetramer. **FEBS Letters**, v. 583, n. 22, p. 3665-3670, Nov. 2009.
- 130 EVANGELISTA, D. et al. Pectinases from *sphenophorus levis vaurie*, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): putative accessory digestive enzymes. **Journal of Insect Science**, v. 15, Feb. 2015. doi: 10.1093/jisesa/ieu168
- 131 CURTIS, T. P.; HEAD, I. M.; GRAHAM, D. W. Theoretical ecology for engineering biology. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 64A-70A, Feb. 2003.
- 132 RITTMANN, B. E. et al. A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 1096-103, Feb. 2006.
- 133 DUAN, C. J.; FENG, J. X. Mining metagenomes for novel cellulase genes. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 12, p. 1765-75, Dec. 2010.
- 134 CASTILLO, J. M.; ROMERO, E.; NOGALES, R. Dynamics of microbial communities related to biochemical parameters during vermicomposting and maturation of agroindustrial lignocellulose wastes. **Bioresources Technology**, v. 146, p. 345-54, Oct. 2013.
- 135 MELLO, B. L. et al. Nutrient availability shapes the microbial community structure in sugarcane bagasse compost-derived consortia. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38781, Dec. 2016.

- 136 PIROOZNIA, M.; PERKINS, E.; DENG, Y. Batch Blast extractor: an automated blastx parser application. **BMC Genomics**, v. 9, Supplement 2, p. S10, Sept. 2008. doi: 10.1186/1471-2164-9-S2-S10.
- 137 DELANEY, S. et al. Three improvements to the BLASTP search of genome databases. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SCIENTIFIC AND STATISTICAL DATABASE MANAGEMENT, 12.,2000, Berlin. **Proceedings...** Berlin: IEEE, 2000. p. 14-24.
- 138 SLABINSKI, L. et al. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. **Bioinformatics**, v. 23, n. 24, p. 3403-3405, Dec. 2007.
- 139 PETERSEN, T. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-786, Oct. 2011.
- 140 NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.; HERINGA, J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205-217, Sept. 2000.
- 141 WILKINS, M. R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods in Molecular Biology**, v. 112, p. 531-552, 1999.
- 142 KELLEY, L. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, June 2015.
- 143 SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381-3385, July 2003.
- 144 DELANO, W.; LAM, J. PyMOL: a communications tool for computational models. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 230, p. U1371-U1372, Aug. 2005.
- 145 LIAO, H. et al. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12631, July 2015..
- 146 LIAO, H et al. A new acidophilic endo-beta-1,4-xylanase from *Penicillium oxalicum*: cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1071-1083, July 2014.
- 147 BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-38, Aug. 2001.
- 148 NARAN, R.; CHEN, G.; CARPITA, N. C. Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 132-141, Sept. 2008.
- 149 ROBERGE, M. et al. Characterization of active-site aromatic residues in xylanase A from *Streptomyces lividans*. **Protein Engineering**, v. 12, n. 3, p. 251-7, Mar. 1999.

150 PAL, A.; KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on the surface of alginateglutaraldehyde beads decreases the 'catalytic efficiency' but provides 'low temperature stabilization' effect. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 4, p. 5, 2012.

151 WANG, Y. et al. Improving catalytic efficiency of endo-beta-1, 4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* by directed evolution and H179 saturation mutagenesis. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 341-7, Dec. 2013.

152 GUO, B. et al. Gene cloning, expression and characterization of a novel xylanase from the marine bacterium, *Glaciecola mesophila* KMM241. **Marine Drugs**, v. 11, n. 4, p. 1173-1187, Apr. 2013.

153 SASKIA, B. et al. Biochemical characterization of a recombinant Xylanase from *Thermus brockianus*, Suitable for Biofuel Production. **JSM Biotechnology & Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 10, 2014.

154 RIBEIRO, L. F. et al. A xylose-stimulated xylanase-xylose binding protein chimera created by random nonhomologous recombination. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 119, 2016.

155 ZHENG, F. et al. N- and C-terminal truncations of a GH10 xylanase significantly increase its activity and thermostability but decrease its SDS resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 8, p. 3555-65, Apr. 2016.

156 TERRASAN, C. R. F.; GUISAN, J. M.; CARMONA, E. C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 54-62, Sept. 2016. doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.08.001.

157 ZHANG, J. et al. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 12, May 2011. doi: 10.1186/1754-6834-4-12.

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

159 SHI, P. et al. Molecular characterization of a new alkaline-tolerant xylanase from *Humicola insolens* Y1. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 149504, 2015. doi: 10.1155/2015/149504.

160 WU, Y. R.; HE, J. Characterization of a xylanase-producing *Cellvibrio mixtus* strain J3-8 and its genome analysis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10521, May 2015.

161 LI, H. et al. Heterologous expression and characterization of an Acidic GH11 family Xylanase from *hypocrea orientalis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, July 2017. doi: 10.1007/s12010-017-2532-2.

162 NG, C. H.; HE, J.; YANG, K. L. Purification and characterization of a GH11 xylanase from biobutanol-producing *Clostridium beijerinckii* G117. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 2832-44, Mar. 2015..