UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

AWANA DA SILVA LIMA

**Expressão heteróloga e caracterização bioquímica de uma xilo-
oligossacarídeo oxidase de *Thielavia terrestris* pertencente à família AA7**

Lorena

2018

AWANA DA SILVA LIMA

**Expressão heteróloga e caracterização bioquímica de uma xilo-
oligossacarídeo oxidase de *Thielavia terrestris* pertencente à família AA7**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Corrigida

Lorena

2018

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 elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lima, Awana da Silva

Expressão heteróloga e caracterização bioquímica de uma xilo-oligossacarídeo oxidase de *Thielavia terrestris* pertencente à família AA7 / Awana da Silva Lima; orientador Fernando Segato - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
90 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Xilo-oligossacarídeo oxidase. 2. Flavoproteínas. 3. Enzimas oxidativas. 4. Xilo-oligômeros. 5. *Thielavia terrestris*. I. Título. II. Segato, Fernando, orient.

Dedico esta dissertação à minha família, aos meus amigos de longa data e aos amigos conquistados durante esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus por todas as bênçãos alcançadas durante a minha vida que me permitiram chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Fernando Segato, por ter me aceito no seu grupo de pesquisa e por toda orientação e paciência que me foi destinada, principalmente nos momentos mais desesperadores.

A toda minha família, em especial, aos meus pais, Regino e Zenilda, e ao meu irmão, Anderson, por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que eu mesma não o fazia. Vocês são tudo na minha vida e se eu cheguei até aqui hoje, eu devo isso totalmente à vocês. Muito obrigada pelas conversas, conselhos e risadas pelas chamadas em vídeo no WhatsApp durante este período. Eu amo vocês.

Aos professores, Arnaldo Márcio, Adriane Milagres, Elisson Romanel e André Ferraz, que tive a oportunidade de conviver e que sempre estiveram dispostos a me ajudar. Eu aprendi muito com vocês.

A todos meus amigos de laboratório (Bruno, Gi, Bianca, Josman, Aline, Mulinari e os ICs André, Caio, Ana Laura e Fernando Satoshi) pelo convívio, pelas inúmeras risadas, pelas discussões e troca de conhecimento. E também as “agregadas” Patrícia e Verônica pela ajuda nos momentos de “sufoco” e pela amizade formada durante este período.

Aos demais estudantes do departamento pela ajuda que me foi dada em algum momento durante a minha pesquisa.

Ao técnico de laboratório Zé Moreira pelo apoio quando necessário e, em especial, ao Zé “Cobrinha” pelo carinho de sempre, pelas risadas e pelos inúmeros “menina” que ele sempre dizia quando me encontrava.

À minha amiga de longa data, laquine, pelo apoio e incentivo nas horas que mais precisei, agradeço à Deus por sua amizade e irmandade de sempre.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo incentivo financeiro dado a mim e a todo o grupo de pesquisa.

À USP pela oportunidade dada de desenvolver este trabalho.

Sou imensamente grata a todos vocês!

RESUMO

LIMA, A. S. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica de uma xilo-oligossacarídeo oxidase de *Thielavia terrestris* pertencente à família AA7.** 2018. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

A biomassa vegetal pode ser uma importante fonte de obtenção de diversos produtos a partir da desestruturação de suas frações por um vasto grupo de enzimas. No entanto, a geração de compostos de alto valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica requer o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos. Pensando nisso, a prospecção e a caracterização de novas enzimas que estão presentes no secretoma de fungos degradadores da biomassa lignocelulósica tem sido fonte de pesquisa por pesquisadores do mundo todo. O objetivo deste trabalho foi prospectar, clonar e expressar de maneira heteróloga o gene codificante de uma enzima putativa do fungo termofílico *T. terrestris* em cepas do fungo filamentoso *A. nidulans* A773 e promover sua caracterização bioquímica e biofísica. O gene da enzima foi amplificado, clonado e inserido no vetor pEXPYR antes de ser inserido no sistema de expressão do *A. nidulans*. Os transformantes obtidos foram induzidos em meio mínimo de cultivo contendo 3% (m/v) de maltose e 1% (m/v) de glicose em meio estacionário para a produção, seguido da purificação da enzima. Estudos bioquímicos foram realizados para determinar o pH e a temperatura ótima de reação, bem como, a especificidade aos substratos e a determinação dos parâmetros cinéticos. A termoestabilidade da enzima também foi avaliada por estudo de dicroísmo circular (DC). Além disso, foi avaliado o efeito colaborativo entre uma xilanase GH10 e a enzima em estudo na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. A enzima obtida por expressão heteróloga foi caracterizada como uma xilo-oligossacarídeo oxidase (XyIO). Por meio da análise filogenética das sequências de aminoácidos entre a enzima expressa e outras enzimas oxidativas, a XyIO foi classificada como pertencente a família das flavoproteínas e subfamília das BBE. A enzima TtXyIO demonstrou ter especificidade em oligossacarídeos de C5 apresentando boa atividade enzimática em substratos complexos de xilana. A enzima possui pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 25 °C. As análises de DC indicaram temperatura de desnaturação de 62,7 °C, caracterizando esta enzima como termofílica. Contudo, novos estudos ainda são necessários para avaliar os produtos gerados a partir da oxidação dos diferentes xilo-oligossacarídeos pela XyIO e seu potencial uso na indústria.

Palavras-chave: Xilo-oligossacarídeo oxidase. Flavoproteínas. Enzimas oxidativas. Xilo-oligômeros. *Thielavia terrestris*. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

LIMA, A. S. **Heterologous expression and biochemical characterization of a xylooligosaccharide oxidase from *Thielavia terrestris* belonging to AA7 family**. 2018. 90 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

Plant biomass is an important source for generation of several products obtained from enzymatic cleavage of its fractions by a large group of enzymes. However, the generation of high value compounds from lignocellulosic biomass requires the development of new enzymatic systems. Considering that, prospection and characterization of enzymes present in the biomass-degrading fungi secretome has been a source of study by researchers around the world. The aim of this work was to prospect, clone and heterologously express a putative enzyme encoding gene from the thermophilic fungus *T. terrestris* in *A. nidulans* A773 strains and to promote its biochemical and biophysical characterization. The gene was amplified, cloned and inserted into the pEXPYR vector before being inserted into *A. nidulans* expression system. The transformants were induced by culture in minimal medium containing 3% (w/v) maltose and 1% (w/v) glucose by stationary culture for the production, followed by enzyme purification. Biochemical analyses were performed to determine optimum pH and temperature as well as the substrate specificities and kinetic parameters. The enzyme thermostability was also evaluated by circular dichroism (CD). In addition, the collaborative effect between the enzyme and a GH10 on hydrolysis of pre-treated sugarcane bagasse was evaluated. The enzyme obtained by heterologous expression was characterized as a xylooligosaccharide oxidase (XyIO). Phylogenetic analysis between amino acid sequences of expressed enzyme and other oxidative enzymes classified XyIO as belonging to flavoproteins family and subfamily of BBE. TtXyIO has been shown to have specificity on C5 oligosaccharides exhibiting good enzymatic activity on complex xylan substrates. The enzyme has an optimum pH of 5.5 and optimum temperature of 25 °C. DC analyses showed melting temperature of 62.7 °C, characterizing this enzyme as thermophilic. In general, further studies are still needed to evaluate the products generated from oxidation of xylooligosaccharides by XyIO and their potential use in the industry.

Keywords: Xylooligosaccharide oxidase. Flavoproteins. Oxidative enzymes. Xylooligomers. *Thielavia terrestris*. Heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da organização da parede celular vegetal.	17
Figura 2 - Esquema geral da degradação da fração hemicelulósica pelas enzimas hemicelulolíticas.	20
Figura 3 - Esquema mostrando os diversos produtos obtidos a partir da hidrólise da hemicelulose.	22
Figura 4 - Estrutura do cristal de XylO de <i>M. thermophila</i> mostrando o domínio F (em verde), domínio S (em vermelho) e o cofactor FAD (em amarelo).	24
Figura 5 - FAD ligado covalentemente a dois sítios de ligação diferentes: 6-S-cisteinil e 8 α -N1-histidil.	25
Figura 6 - Demonstração da reação global catalisada pela enzima XylO.	27
Figura 7 - Vetor pEXPYR utilizado para super expressão e secreção de proteínas recombinantes em cepas do gênero <i>Aspergillus</i>	34
Figura 8 - Análise filogenética entre a XylO e outras enzimas com atividade oxidativa em oligossacarídeos.	50
Figura 9 - Alinhamento parcial de TtXylO, MtXylO e GOOX mostrando as regiões conservadas de histidina (H) e cisteína (C), sublinhado e negrito.	50
Figura 10 - Esquema mostrando a disposição gênica do gene codificante de TtXylO.	51
Figura 11 - Gel de agarose 1% com os fragmentos amplificados do gene codificante de TtXylO de <i>T. terrestris</i> em diferentes temperaturas de anelamento.	52
Figura 12 - Resultado da PCR de colônia feitas a partir das colônias selecionadas no meio de seleção.	53
Figura 13 - <i>Screening</i> em SDS-PAGE dos transformantes de <i>A. nidulans</i> A773 para expressar e secretar a enzima TtXylO.	54
Figura 14 - Quantificação de proteínas totais produzidas a partir de diferentes condições de cultivo.	56
Figura 15 - SDS-PAGE das diferentes condições cultivo para expressão da enzima TtXylO.	58
Figura 16 - SDS-PAGE das frações na cromatografia de troca iônica.	59

Figura 17 - SDS-PAGE das frações que apresentaram pico na cromatografia de exclusão por tamanho.....	60
Figura 18 - SDS-PAGE dos transformantes tratado com 5% de ácido acético para detectar a presença do cofator FAD na estrutura da proteína.	61
Figura 19 - Espectro do scanning UV-vísivel para TtXylO mostrando os picos presentes no cofator FAD em seu estado oxidado.	62
Figura 20 - Aminoácidos detectados (em vermelho) presentes nos peptídeos gerados após digestão por tripsina da enzima XylO.....	63
Figura 21 - Espectro de dicroísmo circular mostrando a curva de desnaturação térmica da enzima TtXylO.....	64
Figura 22 - Espectros de CD de TtXylO a 222 nm ao longo de aumento de temperatura.	64
Figura 23 - Temperatura ótima de reação para a enzima TtXylO.	66
Figura 24 - pH ótimo de reação para a enzima TtXylO.....	66
Figura 25 - Painel de atividade em diferentes substratos para TtXylO.	68
Figura 26 - Efeito de diferentes íons sobre a atividade da TtXylO.	71
Figura 27 - Análise da atividade colaborativa entre uma xilanase GH10 e a TtXylO em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente por 10 minutos....	73
Figura 28 - Análise da atividade colaborativa entre uma xilanase GH10 e a TtXylO em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente por 20 minutos....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) desenhados a partir da sequência gênica para XylO de <i>T. terrestris</i>	37
Tabela 2 - Condições de cultivo empregado para determinar qual a melhor condição para expressão e secreção da enzima XylO.	42
Tabela 3 - Condições de cultivo utilizadas para cada um dos substratos (bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por 10 minutos e por 20 minutos).	47
Tabela 4 - Alguns dos peptídeos obtidos e detectados com suas respectivas massas carga obtidos pela análise de espectrometria de massas.	62
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos da TtXylO, MtXylO e SsGOOX determinados em xilo-oligossacarídeos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	Aminoantipirina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BBE	<i>Berberine Bridge Enzyme</i>
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzymes</i>
ChitO	Quito-oligossacarídeo oxidase
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNS	<i>Dinitrosalicylic Acid</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleotide</i>
DSPS	<i>Double Strength Protoplasting Solution</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FAD -	<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
GOOX	Gluko-oligossacarídeo oxidase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IDT	<i>Integrated DNA Technology</i>
LB	Luria-Bertani (meio de cultura)
Mg²⁺Cl⁻	Cloreto de magnésio
pb	pares de base
PCR -	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietileno glicol
RNM	Ressonância nuclear magnética
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
TAE	Tris, Ácido acético e EDTA
tRNA	Ácido ribonucleico de transferência
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
XyIO	Xilo-oligossacarídeo Oxidase
XOS	Xilo-oligossacarídeos
VAO	Vanilil álcool oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Biomassa vegetal lignocelulósica	16
2.2 Hemicelulose	18
2.3 Xilo-oligossacarídeo oxidase	23
2.3.1 Aplicações para enzima XyLO	27
2.4 <i>Thielavia terrestris</i>	28
2.5 Expressão heteróloga de proteínas	29
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Linhagens	36
4.2 Árvore filogenética	36
4.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	36
4.4 Amplificação gênica	37
4.5 Clonagem do gene codificante da XyLO em <i>Escherichia coli</i>	38
4.6 PCR de colônia	38
4.7 Transformação em <i>A. nidulans</i> A773	39
4.8 <i>Screening</i> dos transformantes	40
4.9 Purificação das proteínas	40
4.10 Determinação da melhor condição de expressão	41
4.11 Quantificação de proteínas	42
4.12 Espectrometria de massas	43
4.13 Dicroísmo circular	43
4.14 Determinação da presença do cofator FAD	44
4.15 Ensaio de atividade enzimática e painel de substratos	45
4.16 Determinação de pH ótimo	45
4.17 Determinação de temperatura ótima	46
4.18 Determinação dos parâmetros cinéticos	46
4.19 Painel de íons	46

4.20	Análise de efeito colaborativo entre uma xilanase GH10 e XylO	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Análise filogenética	48
5.2	Amplificação gênica	51
5.3	Clonagem e expressão do gene que codifica TtXylO	52
5.4	Melhor condição de expressão e secreção de TtXylO	54
5.5	Purificação e quantificação	59
5.6	Presença do cofator FAD	61
5.7	Espectrometria de massas	62
5.8	Dicroísmo circular e termoestabilidade	63
5.9	Temperatura e pH ótimo de reação	65
5.10	Atividade enzimática e parâmetros cinéticos	67
5.11	Painel de íons	71
5.12	Avaliação de atividade colaborativa entre uma xilanase GH10 e TtXylO	71
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE A - SOLUÇÕES	82
	APÊNDICE B – CÁLCULOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	84
	APÊNDICE C – PUBLICAÇÕES	85
	ANEXO A – CURVA PADRÃO DE BSA	86
	ANEXO B – CURVA PADRÃO DE GLICOSE	87
	ANEXO C – ORGANIZAÇÃO GÊNICA	88
	ANEXO D – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA ENZIMA	89
	ANEXO E – COMPOSIÇÃO DOS BAGAÇOS	90

1 INTRODUÇÃO

A biomassa vegetal é um recurso renovável que se encontra disponível em grande quantidade no planeta Terra. Parte deste recurso é destinado a fins alimentícios, tanto humano quanto animal, enquanto que outra parte é voltada, principalmente, para o setor energético, através da produção de biocombustíveis. No entanto, a necessidade da substituição de diversos produtos que são gerados das refinarias de petróleo por questões sociais, políticas e ambientais impulsionam as pesquisas na produção e no desenvolvimento de novos produtos com base biológica.

A geração de compostos de alto valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica requer o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos. Uma das estratégias utilizada por pesquisadores é a prospecção de novas enzimas encontradas no secretoma dos fungos decompositores da biomassa de resíduos agrícolas.

O custo das enzimas em sistemas de conversão de biomassa representa um importante fator para a economia do processo. Com isso a otimização do processo por meio do uso de enzimas que possuam maior estabilidade térmica, suportando tempos de hidrólise prolongados em temperaturas mais elevadas, como as enzimas produzidas pelos microrganismos termofílicos comumente encontrados na matéria orgânica em decomposição pode ser uma alternativa.

O estudo de novas enzimas engloba o uso de várias técnicas a fim de se obter altos rendimentos do processo. Dentre as técnicas utilizadas, as ferramentas moleculares são as que receberam maiores avanços nas últimas décadas, desde o advento da tecnologia do DNA recombinante. O uso de microrganismos modelos como sistemas de expressão heteróloga é um dos métodos mais aplicados para atingir a superprodução de proteínas de interesse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica será contextualizada brevemente a composição química da biomassa lignocelulósica, com ênfase na fração hemicelulósica do composto. Além disso, será apresentada uma visão geral das enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose, destacando a ação da enzima xilo-oligossacarídeo oxidase (XylO) e a importância dos produtos obtidos por meio de seu mecanismo de ação. Por fim, será discutida a produção heteróloga de enzimas oxidativas com atuação em oligossacarídeos e uma breve apresentação do fungo *Thielavia terrestris*, o qual foi utilizado como fonte para prospecção da enzima XylO.

2.1 Biomassa vegetal lignocelulósica

A biomassa vegetal é composta principalmente de materiais amiláceos e lignocelulósicos (CHEAH et al., 2016). Os açúcares representam o componente mais importante da planta, sendo estes, divididos em duas classes principais, de acordo seu papel fisiológico: a) açúcares considerados como reservas metabólicas, que são facilmente extraídos e utilizados amplamente em processos industriais, como o amido e a sacarose; b) açúcares que constituem as partes estruturais da planta, contendo açúcares mais complexos e de difícil acesso, devido ao arranjo de suas estruturas, que ocasiona a recalcitrância do composto, como a lignocelulose (OCTAVE; THOMAS, 2009).

A biomassa lignocelulósica é composta em sua maior parte por celulose, seguida de hemicelulose e lignina, e em menores quantidades de proteínas estruturais, lipídeos e cinzas (OCTAVE; THOMAS, 2009). Durante o processo evolutivo da planta, a biomassa lignocelulósica tornou-se crucial para sustentar fisicamente a planta e proporcionar a ela resistência aos estresses externos bióticos e abióticos. No entanto, essa característica representa atualmente, um dos maiores desafios no processamento industrial da biomassa, que necessita de novos sistemas enzimáticos ou cepas microbianas e tecnologias mais avançadas de fermentação capazes de degradar este polímero (VIKARI et al., 2007; SHARMA et al., 2017).

Os componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), estão fisicamente e quimicamente ligados, sendo que a celulose, na sua forma cristalina está associada à hemicelulose e cercada por lignina, que também se liga covalentemente a hemicelulose (Figura 1). A hemicelulose está situada entre a lignina e o conjunto de fibras de celulose (ZHANG, 2008; OCTAVE; THOMAS, 2009; CAICEDO et al., 2016). O papel principal da lignina é proteger a celulose e a hemicelulose contra o ataque hidrolítico dos microrganismos saprofíticos e patogênicos. A recalcitrância da lignina contra a biodegradação é devido à natureza volumosa e aromática do composto que impede o acesso das enzimas microbianas diminuindo a biodegradabilidade da biomassa (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012).

Figura 1 - Representação da organização da parede celular vegetal.

Fonte: Adaptado de Hyeon, Shin e Han (2016).

A celulose é o polímero natural mais abundante no planeta Terra, sendo composta por microfibrilas formadas por subunidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β -1,4. As microfibrilas são cadeias lineares não ramificadas conectadas entre si de maneira paralela por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals, gerando uma estrutura cristalina rígida ou regiões amorfas (ZHANG, 2008; SHARMA et al., 2017). A hidrólise da celulose requer a cooperação entre três classes diferentes de celulases denominadas exoglucanases (celobiohidrolases), endoglucanases e β -glicosidases (VIAKARI et al., 2007). As

endoglucanases rompem as ligações glicosídicas internas da celulose, aleatoriamente, liberando oligossacarídeos e/ou celobiose, enquanto que as exoglucanases atacam as extremidades redutoras e não redutoras do polímero liberando celobiose. Por sua vez, as β -glicosidases clivam a celobiose, obtida por meio da ação das endo- e principalmente das exo-glucanases, liberando duas moléculas de glicose (HORN et al., 2012). Oposto ao mecanismo hidrolítico, as LPMOs (do inglês, *Lytic Polysaccharide MonoOxygenases*), atuam clivando oxidativamente as ligações glicosídicas β -1,4, principalmente nas regiões cristalina do polímero de celulose e, em diferentes graus, oligossacarídeos a partir da captação de elétrons obtidas por meio de diferentes doadores de elétrons (FROMMHAGEN et al., 2018).

A lignina, o segundo maior polímero terrestre (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012), apresenta uma estrutura complexa, amorfa e insolúvel em água, formada por unidades de fenil-propano conectado por ligações carbono-carbono (C-C) e aril-éter (C-O-C) (SHARMA et al., 2017). A lignina é gerada a partir do acoplamento de compostos denominados monolignóis, que são os precursores primários do polímero como o álcool cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico. Quando introduzidas na lignina, os monolignóis são chamados de hidróxifenila (H), guaiacil (G) e siringila (S) (WANG et al., 2013; SHARMA et al., 2017). A composição da lignina varia entre as espécies e entre os tecidos das plantas (WANG et al., 2013). Alguns microrganismos, como os fungos de podridão branca, são capazes de gerar compostos e de secretar enzimas que atuam na degradação direta da lignina, sendo as principais, as lacases (Lac) e várias peroxidases, como as lignina peroxidases (LiPs), as manganês peroxidases (MnPs) e as peroxidases versátil (VP) (WAN; LI, 2012; SHARMA et al., 2017).

2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polímero complexo e ramificado, formado por diversos açúcares (pentoses, hexoses e ácidos de açúcares). Os monômeros presentes na hemicelulose podem ser: xilose, arabinose, manose, glicose, galactose, ácido 4-O-metil-glucurônico, ácido galacturônico e ácido glucurônico

(SHARMA et al., 2017). A hemicelulose não é um composto quimicamente bem definido, uma vez que sua composição é bastante variável entre as espécies de plantas (POLIZELI et al., 2005; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009). As classes de hemicelulose são definidas de acordo com a unidade principal de açúcar do polímero e os principais componentes encontrados no composto são a xilana e a manana (POLIZELI et al., 2005; MOREIRA; FILHO, 2008; SAINI et al., 2015). A xilana é um polímero linear formado por unidades de β -D-xilopiranosil covalentemente unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (POLIZELI et al., 2005). Já a manana é um homopolissacarídeo linear composto por resíduos de β -D-manopiranosil unidos por ligação β -1,4 (MOREIRA; FILHO, 2008).

Baseado nos principais substituintes encontrados ligados as cadeias principais de xilana ou de manana, esse polímero pode ser categorizado como homoxilana linear, arabinoxilana, glucoronoxilana e glucuronoarabinoxilana para grupos ligados a cadeia de xilana; e manana linear, glucomanana, galactomanana e galactoglucomanana para grupos ligados a cadeia principal de manana (POLIZELI et al., 2005; MOREIRA; FILHO, 2008; SAINI et al., 2015). A partir deste ponto será dada ênfase a hemicelulose de xilana por ser mais relevante aos propósitos deste estudo.

As cadeias laterais na molécula de xilana são fundamentais ao composto, pois influenciam na solubilidade, conformação física e na reatividade da xilana aos outros componentes hemicelulósicos, afetando, portanto, o modo e a extensão da clivagem enzimática no polímero (KULKARNI ; SHENDYE; RAO, 1999).

Devido a heterogenidade da hemicelulose, diferentes tipos de enzimas são necessárias para sua hidrólise. A degradação enzimática da hemicelulose ocorre por meio de uma ação coletiva de catalisadores biológicos conhecidos como “CaZymes” ou enzimas ativas em carboidratos. Essas enzimas estão inseridas no banco de dados do CAZy (*Carbohydrate Active enZymes* – www.cazy.org) onde são classificadas de acordo com a similaridade entre as sequências de aminoácidos, suas estruturas tridimensionais e mecanismos de ação (LEVASSEUR et al., 2013; CRAGG et al., 2015). A maioria das hemicelulases são classificadas dentro das glicosil hidrolases (GHs), no entanto, existem também, enzimas pertencentes ao grupo das carboidrato esterases (CEs) que removem grupos metil, acetil e éster-fenólico das cadeias laterais da hemicelulose e por

este motivo, tem sido denominadas como enzimas acessórias (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; CRAGG et al., 2015).

A hidrólise completa da xilana ocorre por meio do sinergismo de um sistema enzimático que envolve a ação de endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), xilana acetil esterases (EC 3.1.1.72) e ácido ferúlico/cumárico esterases (EC 3.1.1.73) (SAINI et al., 2015). As endo-1,4- β -xilanases clivam a cadeia de xilana gerando xilo-oligossacarídeos os quais são hidrolisados pela ação das β -D-xilosidases em suas unidades monoméricas (SANCHEZ, 2009). Além disso, as enzimas acessórias auxiliam na remoção dos grupos laterais ligados a cadeia principal de xilana, como as α -L-arabinofuranosidases que removem as arabinofuranoses, as α -glucuronidases que removem os ácidos glucurônicos, as acetil esterases que removem os grupos acéticos e as ácido ferúlico/cumárico esterases que removem os grupos éster-cumárico e/ou éster ferúlico ligados a cadeia lateral de arabinofuranose, permitindo deste modo, uma maior acessibilidade da cadeia principal (Figura 2) (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; SANCHEZ, 2009; SAINI et al., 2015).

Figura 2 - Esquema geral da degradação da fração hemicelulósica pelas enzimas hemicelulolíticas.

Fonte: Adaptado de Hyeon, Shin e Han (2016).

A biodegradabilidade e a não toxicidade das hemiceluloses permitem que este composto seja utilizada para diferentes aplicações (Figura 3). Além de ser

uma fonte rica de açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados na produção de bioetanol (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018), tem sido demonstrada a formação de hidrogel de xilana em combinação com quitosana que podem ter aplicações biomédicas como no auxílio a liberação dirigida de medicamentos no organismo. Os hidrogéis são uma rede de polímeros que possuem a capacidade de reter uma grande quantidade de água de maneira similar aos tecidos vivos. Devido a não toxicidade e a resistência à digestão no estômago, os hidrogéis de xilana tornam-se adequados para a liberação controlada de medicamentos encapsulados. Além disso, estudos tem sido conduzidos para a aplicação da hemicelulose na produção de compostos de interesse industrial como filmes (produzidos a partir de precursores provenientes da hemicelulose como sorbitol, glicerol e xilitol), embalagens e revestimentos alimentares a partir da hemicelulose (HANSEN; PLACKETT, 2008; NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018).

Figura 3 - Esquema mostrando os diversos produtos obtidos a partir da hidrólise da hemicelulose.

Fonte: Adaptado de Naidu, Hlangothi e John (2018)

2.3 Xilo-oligossacarídeo oxidase

Recentemente, foi prospectada, clonada e caracterizada bioquimicamente, uma enzima que apresentou atividade oxidativa em xilo-oligossacarídeos (XOS), sendo denominada como xilo-oligossacarídeo oxidase (XyIO) (FERRARI et al., 2016). Até momento, apenas a XyIO de *Myceliophthora thermophila* C1 (atualmente conhecido como *Thermothelomyces thermophila*) foi relatada na literatura. A enzima XyIO é classificada como pertencente à família AA7 do CAZy, na qual engloba as gluco-oligossacarídeo oxidases (GOOXs) e as quitto-oligossacarídeo oxidases (ChitOs). As enzimas que são classificadas como pertencentes a classe “AA” (*Auxiliary Activities*) do CAZy representam famílias de LPMOs e de outras enzimas que possuem atividade oxidativa (LEVASSEUR et al., 2013).

Dentro da família AA7 do CAZy, apenas quatro enzimas foram caracterizadas até o momento, sendo elas, a XyIO de *M. thermophila* (FERRARI et al., 2016), uma GOOX de *Sarocladium strictum* (LIN et al., 1991), uma ChitO de *Fusarium graminearum* (HEUTS, JANSSEN e FRAAIJE, 2007) e uma carboidrato oxidase (MnCO) de *Microdochium nivale* (XU et al., 2001). Estas enzimas compartilham estruturas semelhantes, sendo todas estas classificadas como pertencentes à família de flavoproteínas vanilil álcool oxidase (VAO) (LEFERINK et al., 2008; FERRARI et al., 2016). Além disso, todas as enzimas oligossacarídeo oxidases apresentam a característica de oxidar seletivamente seus substratos na posição C1 da extremidade redutora (LIN et al., 1991; HEUTS; JANSSEN; FRAAIJE, 2007; FERRARI et al., 2016).

A família de flavoproteínas VAO engloba enzimas que conservam um domínio de ligação ao FAD (*Flavin Adenine Dinucleotide*) e que estão envolvidas em uma ampla variedade de processos metabólicos ao longo dos domínios filogenéticos (Bacteria, Archaea e Eukaria) (LEFERINK et al., 2008). Uma característica importante desta família de enzimas é que o módulo de ligação ao FAD favorece a ligação covalente do cofator a estrutura da proteína. Diversos tipos de ligação covalente com a flavina já foram observados entre os membros da família das flavoproteínas VAO, sendo que a ligação do grupo 8 α -metil do anel isoaloxazina do FAD a um resíduo de histidina tem sido frequentemente

observado (LEFERINK et al., 2008). No entanto, Huang et al. (2005) produziram um cristal da GOOX de *S. strictum* e a análise estrutural demonstrou que a enzima é composta por dois domínios distintos classificados como domínios F e S. A análise estrutural do cristal de XylO de *M. thermophila* (FERRARI et al., 2016) também apresentou os dois domínios distintos (Figura 4). O domínio F é composto por dois subdomínios (α e β) no qual o cofator FAD está acoplado, enquanto que o domínio S está posicionado sobre o anel isoaloxazina do FAD, o qual compõe a maior parte do sulco de ligação aos carboidratos.

Figura 4 - Estrutura do cristal de XylO de *M. thermophila* mostrando o domínio F (em verde), domínio S (em vermelho) e o cofator FAD (em amarelo).

Fonte: Ferrari et al.(2016).

Huang et al. (2005) também observaram que a GOOX apresenta uma flavinilação diferenciada das descritas na literatura, até aquele momento. Esta enzima foi a primeira relatada que possui o cofator FAD covalentemente ligada a dois resíduos de aminoácidos distintos, histidina 70 e cisteína 130 (Figura 5), sendo denominado FAD-6-S-cisteinil,8 α -N1-histidil (HUANG et al., 2005; HUANG et al., 2008).

Figura 5 - FAD ligado covalentemente a dois sítios de ligação diferentes: 6-S-cisteinil e 8 α -N1-histidil.

Fonte: van Hellemond (2006).

A análise estrutural da XylO de *M. thermophila* demonstrou que a enzima possui o mesmo tipo de flavinilação (FAD-6-S-cisteinil,8 α -N1-histidil) que a GOOX de *S. strictum*, sendo bicovalentemente ligada ao FAD na histidina 94 e na cisteína 155, bem similar a ChitO de *F. graminearum* (histidina 94 e cisteína 154) com uma identidade de sequência de 44% entre a XylO e a GOOX, enquanto que a similaridade entre XylO e MnCO foi de 48% de identidade entre as sequências (FERRARI; LEE; FRAAIJE, 2015; FERRARI et al., 2016).

Apesar dos sítios ativos das enzimas XylO, GOOX e MnCO serem estruturalmente bem similares, a XylO de *M. thermophila* possui em seu sulco de ligação ao substrato, três aminoácidos que são únicos a sua estrutura: uma tirosina na posição 376, uma leucina na posição 274 e uma isoleucina na posição 378; sugerindo que esses resíduos desempenham um papel importante na prevenção de ligação de aldohexoses no compartimento de ligação aos substratos (FERRARI et al., 2016)., A fim de aumentar a gama de substratos utilizados pela GOOX, Foumani et al. (2011) fizeram uma mutação sítio dirigida na enzima, onde, 15 aminoácidos da GOOX nativa de *A. strictum* T1, foram substituídos por aminoácidos identificados por participar da ligação ao substrato na ChitO de *F. graminearum* e MnCO. Os autores observaram que as mutações promoveram uma melhora na atividade catalítica da enzima recombinante (GOOX-VN), na qual apresentou atividade em xilo-oligossacarídeos, galactose e N-acetil-glucosamina, além dos substratos comumente utilizados pela enzima nativa como glicose, maltose e celo-oligossacarídeos (FOUMANI et al., 2011). Seguindo a mesma linha, Ferrari, Lee e Fraaije (2015) promoveram a substituição

de resíduos selecionados em ChitO por resíduos envolvidos na formação do sítio de ligação ao substrato de GOOX ou MnCO e geraram variantes com eficiência catalítica melhorada para o substrato da enzima, N-acetil-glucosamina, além de lactose, celobiose e maltose. Esses trabalhos demonstram que a natureza dos aminoácidos que revestem o sulco de ligação aos carboidratos nestas oligossacarídeo oxidases determinam a especificidade da enzima ao substrato (FERRARI et al., 2016).

A XyLO de *M. thermophila* demonstrou alta atividade catalítica nos XOS testados (xilobiose, xilotriose e xilotetraose) apresentando baixa atividade em celobiose, lactose e xilose, não sendo detectada atividade em oligossacarídeos de maltose. Dos XOS testados, a enzima apresentou maior atividade catalítica em xilotetraose (FERRARI et al., 2016). Já a atividade da GOOX em celo-oligossacarídeos foi observada em compostos que continham até 6 resíduos de glicose em sua estrutura (LEE et al., 2005), em malto-oligossacarídeos a enzima reagiu com compostos de até 7 unidade em sua cadeia (LIN et al., 1991), enquanto que em XOS, a GOOX demonstrou eficiência catalítica maior em xilopentose e xilohexose quando comparada com os celo-oligossacarídeos correspondentes (VUONG et al., 2013). Também foi demonstrado atividade da GOOX nativa em glucomanana de konjac, β -glucana de cevada, carboximetilcelulose, celulose amorfa regenerada, xiloglucana de semente de tamarindo e Avicel (FOUMANI et al., 2015). De acordo com os dados cinéticos obtidos por Ferrari et al. (2016), a XyLO demonstra ter preferência por oligossacarídeos de pentose ao invés dos oligossacarídeos de hexoses.

Como a maioria das flavoenzimas, a reação catalisada pela XyLO consiste em duas etapas principais (Figura 6): na primeira ocorre a oxidação da extremidade redutora de um resíduo de açúcar gerando um composto intermediário através da transferência de um íon hidreto para o FAD, o qual é reduzido. Esse intermediário é espontaneamente hidrolisado a um ácido correspondente ao substrato oxidado. A segunda etapa da reação consiste na regeneração do FAD para seu estado oxidado através da redução de oxigênio molecular (O_2) gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LEE et al., 2005; HUANG et al., 2005). Ferrari et al. (2016) por meio de análises de ressonância nuclear magnética (NMR) definiu os produtos gerados a partir da oxidação de xilobiose pela XyLO. Esses autores observaram que o intermediário da reação consiste em

um molécula de xilobionato, produto da oxidação da XylO corresponde a um ácido xilobiônico.

Figura 6 - Demonstração da reação global catalisada pela enzima XylO.

Fonte: Arquivo próprio.

2.3.1 Aplicações para enzima XylO

Os XOS podem apresentar diferente grau de polimerização em sua composição, sendo os substratos preferenciais para a enzima XylO, e tem sido explorados como compostos que possuem diferentes aplicações industriais. Os XOS de cadeia curta com grau de polimerização entre 2 e 5 tem sido utilizados como pré-bióticos por aumentar seletivamente o crescimento de bactérias que vivem no intestino humano, gerando efeitos benéficos a saúde. Além disso, possuem atividade antioxidante, antialérgica, antimicrobiana, imunomodulatória e atividade citotóxica seletiva (MOURE et al., 2006; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012; SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). No entanto, foi demonstrado que os XOS possuem forte ação inibitória em celulasas durante a hidrólise da celulose (QING; YANG; WYMAN, 2010), bem como na das xilanases, devido ao excesso de formação de produto, sugerindo que a enzima XylO pode ter um importante papel no mecanismo de degradação biológica utilizada pelos fungos decompositores de biomassa vegetal, prevenindo os efeitos inibitórios causados pelo excesso de XOS no meio (FERRARI et al., 2016).

Como produto da reação da XylO, há a formação de diferentes ácidos aldônicos a depender dos diferentes XOS oxidados, como por exemplo, a xilose gera o ácido xilônico como produto da ação da XylO. Segundo o Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE), o ácido xilônico foi considerado em 2004, como um dos 30 compostos químicos de maior valor agregado (LIU et al., 2012). Esse composto tem sido utilizado como precursor para a produção de outros químicos, como o 1,2,4-butanotriol, que também é considerado um químico de alto valor utilizado na síntese de plastificantes, polímeros e precursores médicos;

além disso o ácido xilônico também tem sido utilizado como aditivo de concreto auxiliando na dispersão do produto (LIU et al., 2012; LEE et al., 2017). Aplicações para os diferentes ácidos que podem ser formados pela oxidação dos XOS com diferentes graus de polimerização, como ácido xilobiônico, ácido xilotriônico, ácido xilotetraônico, entre outros, ainda são desconhecido na literatura, sugerindo que novas pesquisas são necessárias para identificar, purificar e caracterizar esses compostos.

O peróxido de hidrogênio produzido durante a atividade catalítica da XyLO consiste em um subproduto da reação, pode ser utilizado como substrato para peroxidases necessárias na degradação da lignina. As peroxidases ligninolíticas dependem da ação das enzimas carboidrato oxidases para gerarem o H_2O_2 necessário à sua atividade (HELLEMOND et al., 2006). Uma possível aplicação sugerida por Ferrari et al. (2016) para a enzima XyLO, considerando sua alta especificidade por XOS e baixa atividade em celobiose seria seu uso em ensaios de atividade de xilanases.

2.4 *Thielavia terrestris*

Thielavia terrestris é um fungo filamentosso termofílico pertencente ao filo Ascomycota geralmente encontrado no solo. Este fungo possui ampla distribuição geográfica e apresenta alta atividade degradadora de compostos lignocelulósicos, além de ser bem caracterizado pela sua capacidade de produzir enzimas termoestáveis (REY et al., 2003; BERKA et al., 2011).

Morgenstern et al. (2012) analisaram o crescimento de diversos fungos termofílicos, dentre eles, *T. terrestris* durante 4 dias em 4 diferentes temperaturas de incubação (22, 34, 45 e 55 °C), observando que a temperatura ótima de crescimento para este microrganismo foi de 45 °C, no entanto, *T. terrestris* também apresentou uma boa taxa de crescimento a 55 °C.

O genoma de *T. terrestris* foi completamente sequenciado apresentando em sua composição 36.912.256 pares de bases (pb) organizados em 6 cromossomos, com um total de 9.813 genes identificados (BERKA et al., 2011). No secretoma do *T. terrestris*, obtido através do cultivo do microrganismo em celulose e xilose por 96 horas, foram preditas em torno de 789 proteínas sendo

que das proteínas extracelulares preditas do secretoma, cerca de 180 foram classificadas como CAZymes, 40 como peptidases, acima de 65 como oxidoredutases e mais de 230 como proteínas de função desconhecida (BERKA et al., 2011).

de Vries et al. (2011) cultivaram o fungo *T. terrestris* em quatro fontes complexas de carbono (serragem de amieiro, serragem de pinho, farelo de trigo e casca de soja) a 40 °C durante 4 dias e os resultados das análises proteômicas mostraram que o fungo foi capaz de secretar uma variedade de glicosil hidrolases e algumas proteases nas condições testadas (134 em serragem de amieiro, 12 em serragem de pinho, 137 em farelo de trigo e 182 casca de soja). O resultado é contundente com a diversidade de CAZymes preditas no genoma do microrganismo, além de demonstrar a variação de proteínas que são secretadas pelo microrganismo quando está exposto a diferentes substratos no meio ambiente (de VRIES et al., 2011).

Baseado na análise do transcriptoma de *T. terrestris*, Berka et al. (2011) notaram que o gene, identificado como Thite_2106069 e predito para codificar uma oxidoredutase hipotética, foi detectada no exoproteoma deste organismo quando cultivado em resíduos agroindustriais, sendo que o mesmo não ocorre quando o fungo é cultivado em meio contendo apenas glicose como fonte de carbono. O produto da expressão do gene Thite_2106069 é o foco de estudo deste trabalho, uma vez que, este gene foi identificado no secretoma do *T. terrestris* quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado (MULINARI, dados não publicados) e a sequência da proteína codificada a partir do gene Thite_2106069 contém 69% de identidade com a XylO do *M.thermophila*.

2.5 Expressão heteróloga de proteínas

O advento da tecnologia do DNA recombinante vem possibilitando a produção de compostos de interesse com um maior rendimento através da utilização de diferentes organismos como bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas unicelulares, células de insetos, plantas e células de mamíferos como plataforma de produção (WEINACKER et al., 2013; AHMAD et al., 2018). Cada hospedeiro possui vantagens e desvantagens e a sua escolha

dependerá da proteína de interesse (AHMAD et al., 2018). Nesta seção será comentado brevemente sobre os sistemas de expressão de proteínas recombinantes em bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo que este último terá um foco maior.

A bactéria *Escherichia coli* é um dos sistemas mais utilizados na expressão de proteínas recombinantes, devido à sua biologia celular ser bem compreendida, por apresentar fácil manuseio, além de processos simples de fermentação com a produção de grandes quantidades de proteínas (GUPTA; SHUKLA, 2016). Atualmente, há diversos protocolos moleculares disponíveis, assim como, um grande número de vetores comerciais de expressão, tudo isso atrelado ao rápido crescimento bacteriano que possibilita altos rendimentos (PARACHIN et al., 2012; GUPTA; SHUKLA, 2016). No entanto, este organismo não possui a maquinaria celular responsável por executar as modificações pós-transcricionais e pós-traducionais requeridas a algumas proteínas de origem eucariótica, o que pode gerar produtos recombinantes em um estado fisiológico não funcional (WEINACKER et al., 2013; GUPTA; SHUKLA, 2016). Além disso, pode haver a formação de corpos de inclusão, que são agregados proteicos formados devido a uma super expressão da proteína recombinante no citoplasma da célula, gerando proteínas insolúveis e desoveladas que podem causar toxicidade à célula (GUPTA; SHUKLA, 2016; GAO et al., 2018). Uma forma de superar essa barreira é a utilização de ferramentas de bioinformática para projetar sequências de peptídeos sinais apropriadas para dirigirem as proteínas recombinantes para o espaço periplasmático ou extracelular da *E. coli* minimizando o acúmulo e/ou a degradação proteolítica destas proteínas (GUPTA; SHUKLA, 2016).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são também amplamente utilizadas como sistemas de expressão, sendo que o uso de *P. pastoris* apresentou um aumento exponencial em diversos estudos nos últimos anos (PARACHIN et al., 2012). Comparado com hospedeiros procarióticos, as leveduras apresentam a vantagem de processar modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, como glicosilação, além de evitar contaminações por endotoxinas e bacteriófagos. Quando comparado a células de mamíferos, as leveduras apresentam crescimento rápido, gerando um maior acúmulo da proteína de interesse por meio da sua secreção para o meio extracelular, resultando também em uma diminuição nas etapas de obtenção e purificação

(PARACHIN et al., 2012; WEINACKER et al., 2013). Outras vantagens da produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* incluem: altos níveis de produtividade em meios quase isentos de proteínas; ausência de patogenicidade humana; facilidade de fermentação com alta densidade celular; fácil manipulação genética devido à existência de vetores de expressão bem caracterizados (WEINACKER et al., 2013).

A ampla gama de informações disponíveis em relação aos promotores, marcadores de seleção, métodos para minimizar a atividade de proteases e a compreensão dos diferentes padrões de glicosilação auxiliam os pesquisadores a obterem melhores rendimentos de suas proteínas de interesse (WEINACKER et al., 2013). A maioria dos promotores atualmente disponíveis no sistema de expressão de *P. pastoris* é induzido por metanol. No entanto, o uso industrial de metanol é indesejado devido à alta inflamabilidade e riscos à saúde ocasionada por este composto, além de requerer altas demandas de oxigênio e alta produção de calor pela via metabólica de utilização do metanol, exigindo precauções quanto à segurança e gerando limitações dos processos fermentativos (GASSER et al., 2013; AHMAD et al., 2014).

Assim como as leveduras, os fungos filamentosos também possuem maquinaria capaz de processar modificações pós-transcricionais e pós-traducionais como glicosilação das proteínas, clivagem proteolítica e formação de pontes dissulfeto (NEVALAINEN et al., 2005). De modo geral, os fungos filamentosos apresentam algumas vantagens como a capacidade produzir enzimas em grandes quantidades, secretar as proteínas diretamente para o meio extracelular, evitando etapas de rompimento celular durante processos de purificação, utilizar meios de cultura simples e baratos e a disponibilidade de ferramentas biológicas modernas e clássicas para manipulação molecular (SU et al., 2012). A alta produtividade dos fungos filamentosos está relacionada à sua alta taxa de crescimento e elevada formação de biomassa utilizando substratos de baixo custo em fermentadores simples (WARD, 2012).

Os fungos filamentosos são microrganismos multicelulares que possuem uma parede celular espessa. Uma eficiente inserção do DNA exógeno neste organismo é um pré-requisito para seu uso como uma “fábrica celular” (*cell factory*) de proteínas recombinantes (SU et al., 2012; GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016). Existem quatro metodologias bem caracterizadas para a

transformação de fungos filamentosos: 1) transformação de protoplastos mediada por PEG; 2) eletroporação; 3) transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; e 4) biobalística (SU et al., 2012).

Algumas desvantagens observadas no uso de fungos filamentosos como hospedeiros de proteínas heterólogas refere-se a frequências relativamente baixas de transformação, defeitos morfológicos e modificações de proteínas devido à atividade de proteases (WARD, 2012). Durante a transformação, o número de cópias do gene de interesse, ao se integrar no genoma do hospedeiro pode variar, e os transformantes que receberem altas cópias do gene geralmente produzem altos níveis de proteínas recombinantes (SU et al., 2012).

Dentre as diversas espécies de fungos filamentosos estudadas, as espécies do gênero *Aspergillus* estão entre as utilizadas como sistema de expressão heteróloga de proteínas (ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017). Dentro deste gênero, a espécie *Aspergillus nidulans* é muito bem descrita e estudada na literatura, tornando-a um grande candidato como organismo modelo para expressão heteróloga de proteínas (YAEGASHI et al., 2014; ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017).

A expressão heteróloga eficiente depende de vários fatores, dentre eles: um promotor forte e induzível capaz de estimular uma alta taxa de transcrição; marcadores selecionáveis; modificação dos padrões de glicosilação; adaptação ao uso de códons; e cepas mutantes deficientes em proteases (GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016). Vários promotores estão disponíveis para expressão de enzimas recombinantes em cepas de *Aspergillus* e o uso de promotores induzíveis permite uma expressão proteica mais regulada, no entanto, é importante que os indutores sejam baratos permitindo que os processos de fermentação sejam economicamente viáveis (GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016). O promotor do gene que codifica a enzima glucoamilase, *glaA*, tem sido um dos mais utilizados na expressão heteróloga entre as espécies de *Aspergillus*, incluindo o *Aspergillus nidulans* (SU et al., 2012). O promotor *glaA* é induzido por amido e maltose e reprimido por xilose. Este promotor é bem conservado entre as espécies de *Aspergillus* o que permite o uso do mesmo vetor em diferentes espécies deste gênero, e seu uso é associado aos altos rendimentos obtidos com a secreção de glucoamilase (SU et al., 2012; GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016).

As marcas auxotróficas são comumente utilizadas na transformação de fungos filamentosos havendo a necessidade de um marcador de seleção que restaure a prototrofia (SU et al., 2012). Os marcadores auxotróficos em *Aspergillus* mais utilizados incluem os genes *pyrG*, *argG* e *amdS*, que codificam as enzimas orotidina-5'-monofosfato descaboxilase, ornitina carbamoiltransferase e acetamidase, respectivamente (GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016). Além disso, existem os marcadores de resistência a antibióticos como os genes *hph* e *ble* que conferem resistência a higromicina e bleomicina, respectivamente (GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016).

Outro fator importante a ser levado em consideração é o padrão de glicosilação gerado pelo microrganismo hospedeiro, uma vez que a glicosilação está associada à via de secreção da proteína afetando o seu enovelamento, a sua translocação, a estabilidade e função proteica (SU et al., 2012). Dois tipos principais de glicosilação são conhecidos: a N-glicosilação, na qual ocorre a adição de uma glicana a um resíduo de asparagina da proteína nascente; e a O-glicosilação, que adiciona glicana nos resíduos de hidroxilisina, hidroxiprolina, serina ou treonina. (SU et al., 2012). Nas cepas de *Aspergillus*, ambos os tipos de glicosilação são gerados, no entanto, o tipo de glicana entre os diferentes organismos, como mamíferos e fungos, por exemplo, pode diferir, afetando assim a via biossintética da proteína (GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016). Fatores como a composição do meio de cultura e condições de crescimento tais quais pH e indutores, são conhecidos por afetarem a glicosilação provavelmente devido a influência que esses fatores exercem sobre a expressão de enzimas específicas envolvidas nas vias de glicosilação (SU et al., 2012; GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016).

Nos fungos filamentosos existe o viés dos códons está correlacionado ao recrutamento dos RNAs de transferência (tRNA) para o ribossomo (SU et al., 2012). Na expressão de genes heterólogos, uma estratégia utilizada é a otimização de códons dos genes heterólogos de acordo com o uso de códons pelo organismo hospedeiro. Esta prática visa aumentar os níveis de expressão baseado na premissa de que não haverá a falta de tRNA carregados com os códons frequentemente usados pelos hospedeiros (GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016).

O controle da atividade de protease também é uma estratégia que possibilita o aumento da produção de proteínas recombinantes. Dentre os métodos utilizados neste controle incluem a seleção de cepas deficientes em proteases obtidas por meio da manipulação molecular de genes e reguladores de proteases, e por meio da manipulação das condições de cultivo como pH e controle de metabolitos tais quais carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo (WARD, 2012).

Segato et al. (2012) a fim de aumentar a expressão e secreção de proteínas recombinantes em cepas de *Aspergillus* (*nidulans* e *awamori*), desenvolveram o vetor pEXPYR (Figura 7). O pEXPYR é um vetor que foi construído baseado no vetor pUC19 de *E. coli* e possui o promotor da glucoamilase (*glaA*) induzido por maltose. Além disso, o pEXPYR é um vetor de clonagem e expressão que contém como marcadores de seleção a resistência à ampicilina e zeocina, e como marca auxotrófica possui o gene *pyrG* que corrige a síntese de pirimidina (SEGATO et al., 2012).

Figura 7 - Vetor pEXPYR utilizado para super expressão e secreção de proteínas recombinantes em cepas do gênero *Aspergillus*.

Fonte: Segato et al. (2012).

Diante do que foi exposto, neste trabalho foi realizada a prospecção de um gene que codifica uma enzima considerada hipotética encontrada nas análises do transcriptoma e secretoma do fungo termofílico *T. terrestris* seguida da expressão e secreção desta enzima utilizando o vetor pEXPYR na maquinaria do fungo filamentoso *A. nidulans* linhagem A773.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi prospectar, clonar e expressar de maneira heteróloga a enzima xilo-oligossacarídeo oxidase (XyIO) no fungo filamentoso *A. nidulans* linhagem A773 e promover sua caracterização bioquímica e biofísica.

3.2 Objetivos específicos

- Clonagem e expressão da enzima xilo-oligossacarídeo oxidase do fungo termofílico *T. terrestris* em sistema de expressão de fungo filamentoso (*A. nidulans* A773);
- Transformação de *A. nidulans* A773 a fim de se obter uma *cell factory* para a expressão heteróloga de uma enzima oxidativa obtida a partir do fungo filamentoso *T. terrestris*;
- Produção da enzima XyIO de *T. terrestris*;
- Caracterização bioquímica e biofísica da enzima XyIO;
- Avaliação do efeito colaborativo entre uma xilanase GH10 e XyIO em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente por 10 e 20 minutos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as soluções e meios de cultura utilizadas neste trabalho estão descritas no Apêndice A deste trabalho.

4.1 Linhagens

Foram utilizadas nesse trabalho a cepa de *A. nidulans* A773 (*pyrG89*; *wA3*; *pyroA4*), obtida no *Fungal Genetic Stock Center* (Kansas, Estados Unidos), utilizada como sistema de expressão heteróloga, e a cepa de *T. terrestris* UAMH 3264, obtida da coleção de microfungos da Universidade de Alberta (Edmonton, Canadá). O vetor pEXPYR (Figura 7) foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (SEGATO et al., 2012).

4.2 Árvore filogenética

A sequência da enzima XyIO (número de acesso no NCBI: XP_003648522.1) foi utilizada como modelo para a busca de proteínas que apresentassem sequências de aminoácidos similares utilizando o BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990) e o UNIPROT (www.uniprot.org). As proteínas alinhadas, que apresentaram *e-value* igual a 0 foram selecionadas e algumas sequências foram obtidas da literatura e do CAZy (LOMBARD et al., 2014). A árvore filogenética foi construída usando o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) e a análise evolutiva foi realizada pelo método *Neighbor-Joining* e *bootstrap* com 1000 repetições.

4.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Um par de primers para amplificar o gene que codifica a XyIO de *T. terrestris* foi desenhado a partir da sequência do gene obtida nos bancos de

dados do CAZy (LOMBARD et al., 2014), do BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) e do *JGI MycoCosm* (GRIGORIEV et al., 2014). A partir dos códons de início (ATG) e de término (TAA, TAG ou TGA) selecionaram-se 30 nucleotídeos posteriores ao códon iniciador (extremidade 5') para formar o *primer forward* e 30 nucleotídeos anteriores ao códon de parada (extremidade 3') para formar o *primer reverse*. A temperatura de anelamento foi calculada através do programa *Oligo Analyzer* da IDT. Às sequências dos *primers* (*forward* e *reverse*) foram adicionadas caudas de nucleotídeos (em negrito na Tabela 1) que permitiram a subsequente inserção do fragmento amplificado no vetor de expressão pEXPYR através de ligação por recombinação homóloga por meio da técnica de *Gibson Assembly* (GIBSON, 2009).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados a partir da sequência gênica para XylO de *T. terrestris*.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Organismo</i>
Forward	CATTACACCTCAGCAATGTTGGTTCCCTTCGCCTTCGCCGTGGCG	<i>T. terrestris</i>
Reverse	GTCCCGTGCCGGTTATCATGCCGTGGTCGGATCAATGGCCTGCGG	<i>T. terrestris</i>

Fonte: Arquivo próprio.

4.4 Amplificação gênica

Primeiro foi feita a extração do DNA genômico do microrganismo *T. terrestris* utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). As reações de PCR foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo: 0,5 µL do DNA genômico de *T. terrestris* (34,85 µg/µL), 2 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (20 pmol), 10 µL de tampão (GG Buffer 5X), 2 µL de dNTPs 10X (2,5 mM), 2 µL de DMSO, 0,5 µL de Mg₂Cl (50 mM), 0,5 µL de *Phusion* polimerase e 31 µL de água para completar o volume final de reação de 50 µL.

As condições aplicadas para realizar o PCR foram: 98 °C por 30 segundos seguidos de 30 ciclos de 98 °C por 10 segundos, anelamento dos *primers* em 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C, 68 °C e 70 °C (uma reação para cada temperatura) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos.

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Das amostras do PCR foram coletadas 5 µL e misturadas à 5 µL de DNA *loading* e aplicadas ao gel. As amostras que apresentaram bandas no tamanho esperado

foram purificadas com o kit *Wizard® SV Gel and PCR System* (PROMEGA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Clonagem do gene codificante da XyIO em *Escherichia coli*

O gene amplificado e purificado foi inserido no vetor de clonagem e expressão pEXPYR (*pyrG*-) por meio da reação de Gibson (GIBSON, 2009). Para inserção no plasmídeo, 1 µL do vetor e 4 µL do gene amplificado e purificado acrescidos de 5 µL do reagente de Gibson (*New England Biolabs*) foram incubados a 50 °C durante 60 minutos. A inserção do gene exógeno no vetor ocorre por sobreposição (complementaridade das caudas no gene amplificado e do vetor) das partes constituintes por recombinação homóloga. O reagente de Gibson, contém as enzimas T5-exonuclease, Phusion® DNA polimerase e Taq DNA ligase. A enzima T5-exonuclease remove as sequências da cadeia de DNA, a partir da extremidade 5', gerando cadeias simples, permitindo que os fragmentos complementares se unam. A polimerase promove o anelamento e o "preenchimento" dos espaços deixados pela exonuclease e a enzima ligase une os nucleotídeos covalentemente.

A inserção do gene de interesse nas colônias bacterianas foi feita através da adição dos plasmídeos obtidos na reação de Gibson em uma alíquota de células competentes de *E. coli* TURBO. Os plasmídeos juntamente com as células competentes foram incubados em gelo por 30 minutos com subsequente choque térmico a 42 °C por 40 segundos, e seguido de nova incubação em gelo por 2 minutos. Após, 1 mL de meio SOC foi adicionado às células transformadas e foram mantidas a 37 °C por 1 hora. Em seguida, alíquotas das células transformadas foram inoculadas em meio ágar LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram mantidas a 37 °C por 18 horas.

4.6 PCR de colônia

A fim de confirmar a presença do gene de interesse no plasmídeo inserido nas células bacterianas foi realizada uma PCR a partir das colônias selecionadas em meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina após a transformação. As

colônias foram coletadas com a ponta de uma ponteira e ressuspensas em 10 µL de água destilada estéril. Essa solução foi utilizada como *template* para a PCR. As condições utilizadas na PCR e na eletroforese foram as mesmas descritas no tópico 4.4.

4.7 Transformação em *A. nidulans* A773

As colônias bacterianas positivas no PCR de colônia foram cultivadas em meio líquido LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C por 18 horas. Após esse período, foi feita a extração do DNA plasmidial por meio do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, seguindo as instruções do fabricante. O plasmídeo de interesse foi inserido no sistema de expressão do *A. nidulans* A773 por meio de transformação de protoplastos mediada por PEG. Para obtenção dos protoplastos, esporos frescos de *A. nidulans* A773 foram cultivados em meio mínimo ágar contendo piridoxina (1 mg/L), uracila e uridina (2,5 mg/L cada) em pH 6,5 a 37 °C por 2 dias. Após este período, os esporos obtidos foram inoculados em meio mínimo líquido contendo piridoxina (1mg/L), uracila e uridina (2,5 mg/L cada) e mantidos a 37 °C sob rotação de 200 rpm por 18 horas. O micélio resultante foi filtrado com papel de filtro (*Whatman* nº 1) estéril e lavado com solução de lavagem de micélio e com solução DSPS. Após a lavagem, os micélios foram transferidos para um tubo Falcon (50 mL) contendo 5 mL de DSPS acrescido de 250 mg de *Lysozyme From Chicken Egg White* (Sigma) e 500 mg de *Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum* (Sigma) e incubados a 37 °C sob rotação de 200 rpm por 2 a 3 horas.

A solução obtida após o tratamento enzimático foi filtrada com membrana *Miracloth* (Calbiochem) estéril para separação dos protoplastos, os quais atravessam a membrana enquanto que os restos celulares ficam retidos. Em seguida, foi feita uma lavagem dos protoplastos com solução de STC 50. Durante a lavagem, os protoplastos foram centrifugados sob rotação de 4000 rpm por 10 minutos, após isso descarta-se o sobrenadante, e o *pellet* formado foi ressuspendido em STC 50 e avolumado até 45 mL para nova centrifugação. Esses passos foram repetidos por 3 vezes consecutivas. Ao fim deste processo, o

pellet foi ressuspensionado no volume final necessário para o número desejado de transformações.

A transformação do *A. nidulans* A773 com o gene que codifica a proteína XylO de *T. terrestris* foi feita através da adição de 10 µg de DNA plasmidial (*miniprep*) em 250 µL da solução de protoplastos que foram gentilmente misturados e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada à reação uma solução de PEG 60%, até completar o volume de 2 mL, misturou-se gentilmente e incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionada uma solução de STC 50 até o volume de 12 mL, misturou-se gentilmente e verteu-se em placas de Petri contendo meio de regeneração e seleção. As placas foram incubadas com as tampas viradas para cima a 37 °C por 24 horas e após esse período, foram invertidas e mantidas por mais 2 dias na estufa.

4.8 Screening dos transformantes

Todas as colônias que apresentaram crescimento no meio de regeneração e seleção foram testadas quanto a sua capacidade de produção heteróloga da enzima XylO. Os esporos de cada colônia foram coletados e inoculados em placas de Petri 49x13mm contendo meio mínimo líquido acrescido de maltose 5% e piridoxina (1 mg/L). As placas foram mantidas em modo estacionário de cultivo a 37 °C por 48 horas. Após este período, o extrato foi coletado em tubos Falcon e 2 mL foram concentrados em membrana de ultra-filtração *Vivaspin*® 500 com corte de 10 kDa (*GE Healthcare Life Sciences*).

A presença da proteína no extrato foi verificada por gel de poliacrilamida 15%. Alíquotas de 20 µL das amostras foram misturadas com 5 µL de tampão de carregamento de proteínas (*protein loading*) e aplicadas no gel juntamente com o marcador de peso molecular de proteínas e o controle (*A. nidulans* A773 transformado com o vetor pEXPYR vazio). O gel de poliacrilamida foi corado com *Comassie Brilliant Blue* (MEYER; LAMBERTS, 1965).

4.9 Purificação das proteínas

As colônias positivas selecionadas para a produção de XylO foram cultivadas em 15 placas de Petri 90x15mm contendo meio mínimo líquido acrescido de maltose 3% e 1mg/L de piridoxina, como descrito anteriormente. Cerca de 350 mL do extrato obtido foi filtrado em papel de filtro com o auxílio de uma bomba de vácuo, concentrado com concentrador *Amicon Stirred Cell* (Millipore) com membrana com corte de 10 kDa e equilibrado em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0. O extrato concentrado (volume cerca de 35 mL) foi novamente filtrado, como relatado anteriormente, e foi aplicado a uma coluna de troca iônica *DEAE-sepharose CL6B* (*GE Healthcare Life Science*) equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0. A fração eluída após a aplicação do extrato foi coletada (fração *flow-through*), em seguida foi feita uma lavagem com 10 mL do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna e a fração foi coletada (fração de lavagem). A eluição da proteína foi realizada com 10 mL de solução contendo um gradiente de concentração do mesmo tampão adicionado de solução salina (50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mM de NaCl), com a coleta de suas respectivas frações. Cada fração foi aplicada em gel de poliacrilamida 15% como descrito anteriormente, para verificar em qual fração a proteína de interesse foi eluída.

As frações, que apresentaram a proteína de interesse no gel, foram concentradas utilizando membranas de ultra-filtração *Vivaspin® 6* (*GE Healthcare Life Science*), com corte de 5 kDa em uma rotação de 2.000 rpm até atingir o volume final desejado (cerca de 5 mL). Esse concentrado foi injetado em uma coluna de cromatografia de exclusão de tamanho *Superdex 200 10/300 GL* acoplada ao sistema *ÄKTA Pure 25 M* (*GE Healthcare Life Science*) e frações de 1,5 mL onde apresentavam um pico de absorbância no equipamento foram coletadas. Essas frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15%, e aquelas que apresentaram bandas de acordo com a proteína de interesse foram unidas e concentradas (SEGATO et al., 2017).

4.10 Determinação da melhor condição de expressão

A melhor condição de expressão da enzima XylO foi determinada utilizando diferentes meios de cultivo. Foram analisadas meio mínimo com e sem 1% (m/v) de glicose acrescido de 2%, 3% e 5% (m/v) de maltose ou *high* maltose

incubados em meio agitado (200 rpm) ou estacionário. Um total de 12 condições diferentes foram analisadas para expressão e secreção de proteínas totais ao final de 48 horas de incubação a 37 °C (Tabela 2). Os ensaios consistiram de 30 mL dos diferentes meios de cultura inoculados com $1,15 \times 10^8$ esporos/mL de uma cepa transformante para XylO. Alíquotas do extrato bruto ao final do período de incubação foram coletadas para quantificação de proteínas totais através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Os dados obtidos foram confrontados a uma curva de calibração de BSA (ANEXO A). Todas as análises foram feitas em triplicata.

Cerca de 2 mL do extrato bruto ao final das 48 horas foram concentradas até atingir o mesmo volume final em todas as amostras e a presença das proteínas foram verificadas por gel de acrílica 15%, empregando a mesma metodologia descrita no tópico 4.8.

Tabela 2 - Condições de cultivo empregado para determinar qual a melhor condição para expressão e secreção da enzima XylO.

Açúcares		Meio de cultivo	
Glicose (1% m/v)	Maltose ou high maltose (m/v)	Agitado	Estacionário
-	2%	+	+
	3%		
	5%		
+	2%	+	+
	3%		
	5%		

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: Os meios mínimo utilizados consistiam da presença (+) ou ausência (-) de 1% (m/v) glicose acrescido de dois indutores diferentes (maltose ou *high maltose*) em 3 concentrações diferentes (2%, 3% e 5% m/v).

Todas as condições foram cultivadas em meio agitado e estacionário.

4.11 Quantificação de proteínas

A enzima XylO, obtida após o processo de purificação, foi quantificada utilizando a metodologia de acordo com a lei de *Lambert-Beer*, na qual 200 µL da amostra foi aplicada em placa de leitura UV (Corning), sendo utilizado como branco o mesmo tampão da proteína (Tris-HCL 50 mM pH 7,0). A leitura foi feita em um comprimento de onda de 280 nm em leitor de microplaca Infinite 200 PRO

(Tecan). Os experimentos foram feitos em triplicata e a média dos valores foi calculada. A concentração molar foi obtida a partir da equação:

$$\text{Abs} = \varepsilon * L * C \quad (1)$$

Onde: Abs é a absorbância (Abs proteína = Abs amostra – Abs branco);

ε é o coeficiente de extinção molar;

L é o caminho ótico em cm;

C é a concentração molar.

Os dados da concentração molar são multiplicados pelo peso molecular da proteína para se obter o valor de concentração molar em g/L ou mg/mL.

4.12 Espectrometria de massas

A banda da proteína XyIO purificada foi excisada do SDS-PAGE, reduzida, alquilada e submetida à digestão *in situ* por tripsina (SHEVCHENKO et al., 1996). Alíquotas dos peptídeos foram analisadas em um equipamento do tipo LC-MS/MS, composto por um cromatógrafo líquido Waters nanoAcquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massas Waters Xevo (Manchester, UK), com plataforma quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) e equipado com fonte de nanoeletrospray (nanoESI). O perfil MS/MS foi comparado contra a sequência de proteína prevista de *T. terrestris* nos bancos de dados. As análises de espectrometria de massas foram realizadas pela equipe de proteômica do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências de Vida (LaCTAD – UNICAMP).

4.13 Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (DC) de XyIO (0,48 mg/mL) foram obtidos usando um espectropolarímetro JASCO-715 em tampão fosfato 20 mM,

pH 7,2, usando cubeta de 0,1 cm e comprimento de onda de 200 nm a 280 nm. Um total de seis espectros foi coletado para cada experimento e os espectros finais foram obtidos a partir da subtração do tampão, utilizado como branco, da média dos espectros. A análise espectral do aumento de temperatura foi realizada monitorando a elipticidade a 222 nm de 25 °C a 95 °C, com leitura a cada 2 ° C. A curva de transição foi calculada através da fração desenovelada de XyIO, que é o resultado da subtração da elipticidade de XyIO nativa e da elipticidade em qualquer temperatura testada, dividido pela diferença entre a elipticidade de XyIO nativa e desenovelada:

$$f_D = \frac{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_x)}{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_D)} \quad (2)$$

Onde: fD = fração de proteína desenovelada;

$\Delta\theta_N$ = elipticidade da proteína nativa;

$\Delta\theta_D$ = elipticidade da proteína desenovelada.

As análises dos dados foram feitas pelo *software CDtool* versão 1.4 (*Origin* 2017), as análises de estado de enovelamento foram realizadas pelo *Web Server CAPITO* (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013) e os valores de DC em 200 nm foram plotados contra os valores em 222 nm, para deduzir o estado de enovelamento da XyIO na temperatura de 25 °C.

4.14 Determinação da presença do cofator FAD

A presença do cofator FAD na estrutura da enzima foi detectada através de um *scanning* na região ultravioleta (UV) e de luz visível (VIS) e por fluorescência em SDS-PAGE. Para executar o *scanning*, alíquotas de 200 µL de enzima purificada foram monitoradas por absorbância entre 230 a 1000 nm em leitor de microplaca Infinite 200 PRO (Tecan). Já, para análise de fluorescência em SDS-PAGE, um gel contendo amostras da enzima purificada previamente coradas e

descoloradas, como descrito nos passos anteriores, foi pré-tratado com ácido acético 7%, *overnight* a temperatura ambiente, e visualizado sob luz UV em fotodocumentador para géis (BIORAD) (NISHIKIMI; KIUCHI; YAGI, 1977).

4.15 Ensaio de atividade enzimática e painel de substratos

Os ensaios de atividade enzimática para XyIO foi determinado através de um ensaio cromogênico a fim de quantificar a produção de peróxido de hidrogênio (Lin et., 1991). O ensaio consiste na redução de duas moléculas de H_2O_2 a partir da oxidação de fenol pela enzima peroxidase (HRP). O fenol oxidado, em seguida reage com o composto 4-aminoantipirina (4-AAP) gerando um composto colorimétrico chamado quinoneimina que foi quantificado a 500 nm (APÊNDICE B). O volume total de reação de 200 μ L continha Tris-HCl 50 mM pH 5,5; 4-AAP 0,1 mM, fenol 1 mM, 4 U de peroxidase, diferentes tipos de substratos e 4 μ g de enzima purificada. As reações foram incubadas por 30 minutos a 40 °C. Um total de 22 substratos foram testados compreendendo mono-, di- e oligossacarídeos. Os mono- e dissacarídeos testados na concentração de 10 mM foram: galactose, manose, glicose, xilose, arabinose, celobiose, lactose e maltose. Os oligossacarídeos testados a 0,05 mM foram: xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose, xilohexose, celotriose, celotetraose, celopentose e celohexose. Também foi testada atividade de XyIO nos substratos complexos a 0,1%: xiloglucano, xilana de beechwood, xilana de birchwood, arabinoxilana de centeio e arabinoxilana de trigo. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.16 Determinação de pH ótimo

A determinação do pH ótimo de reação foi feita através da metodologia descrita no tópico 4.15. O substrato utilizado na reação foi celobiose 10 mM e o tampão utilizado foi citrato-fosfato-glicina 50 mM com faixa de pH entre 2,0 e 11 variando a cada 0,5, exceto entre o pH 10 e 11. As condições de reação foram as mesmas descritas anteriormente, exceto pelo tempo de incubação que foi de 60 minutos.

4.17 Determinação de temperatura ótima

A determinação de temperatura ótima para a enzima XylO foi obtida a partir do mesmo protocolo de atividade enzimática citado anteriormente, utilizando como substrato 100 μ M de xilobiose e excesso de peroxidase na reação (FERRARI et al., 2016), cerca de 22,5 U de HRP. A faixa de temperatura testada foi de 20 °C a 60 °C, variando a cada 5 °C. As reações foram incubadas por 30 minutos e as análises foram feitas em duplicata.

4.18 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados a 25 °C utilizando entre 6 e 7 diferentes concentrações dos xilo-oligossacarídeos (XOS): xilobiose e xilotriose (0,025 mM – 2 mM), xilotetraose, xilopentose e xilohexose (0,025 mM – 1 mM). O protocolo de reação foi o mesmo descrito no tópico 4.15, exceto pelo uso de 2U de peroxidase. As reações foram incubadas por 30 minutos e todas as análises foram feitas em triplicata. Os dados cinéticos foram obtidos por meio do *software GraphPad Prism 7*.

4.19 Paineis de íons

O efeito de diferentes íons sobre a atividade enzimática de XylO foi determinado pela adição de 10 mM de íons na reação. Os íons analisados foram: Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Na^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} . As concentrações e os reagentes usados nesta análise foram os mesmos descritos no tópico 4.15, exceto pelo uso de 2U de peroxidase. As reações foram incubadas a 25 °C por 15 minutos. O controle consistiu na reação sem íons e todas as análises foram feitas em triplicata.

4.20 Análise de efeito colaborativo entre uma xilanase GH10 e XylO

Um ensaio de sinergismo entre uma xilanase GH10 de *Aspergillus fumigatus* e a XylO de *T. terrestris* foi feito usando como substrato bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente durante 10 e 20 minutos. Para cada substrato, cerca de 22,5 mg de bagaço acrescido de 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 foi mantido a 30 °C sob rotação de 150 rpm *overnight* para hidratação das fibras. A reação de hidrólise do bagaço consistiu em 1,5% (w/v) de biomassa na presença de 8,3 µg de GH10 mais XylO em 4 diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg) completando um volume final de reação de 1,5 mL. A atividade das enzimas nas mesmas concentrações, isoladamente, também foi analisada (Tabela 3). As reações de hidrólise foram incubadas a 50 °C sob rotação de 150 rpm e em diferentes períodos de tempo (15, 30, 60, 120 e 240 minutos), alíquotas de 100 µL foram coletadas após centrifugação em 4.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. A liberação de açúcares redutores da reação foi mensurada por DNS (MILLER, 1959) e os dados foram quantificados através de uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de glicose (ANEXO B). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Tabela 3 - Condições de cultivo utilizadas para cada um dos substratos (bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por 10 minutos e por 20 minutos).

Condição	GH10 (µg)	XylO (µg)
I	8,13	-
II	8,13	0,5
III	8,13	1,0
IV	8,13	2,0
V	8,13	4,0
VI	-	0,5
VII	-	1,0
VIII	-	2,0
IX	-	4,0

Fonte: Arquivo próprio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise filogenética

A árvore filogenética foi construída com sequências de proteínas que possuem atividade oxidativa em carboidratos e com apenas uma sequência de uma proteína hipotética de *T. terrestris* (XP_003649490.1) (Figura 8). A relação evolutiva entre as sequências, obtida pela metodologia *Neighbor-Joining* também é demonstrada.

A sequência da enzima XyIO (representa pela seta na Figura 8) está anotada nos bancos de dados do NCBI como uma proteína putativa e a sua sequência proteica apresentou alta similaridade com enzimas já caracterizadas e por esse motivo, conhecidas por possuírem atividade em oligossacarídeos como as GOOXs, a XyIO de *M. thermophila* (MtXyIO) e as ChitOs. No entanto, a XyIO de *T. terrestris* (TtXyIO) demonstrou uma maior similaridade com a enzima reticulina oxidase do fungo *Madurella mycetomatis*. A enzima reticulina oxidase catalisa a reação oxidativa de fechamento do anel da reticulina para formar o composto esclerina, que faz parte da via biossintética dos alcaloides benzilisoquinolínicos. A ligação carbono-carbono (C-C) formada durante esta reação é denominada como ponte berberina (do inglês, *berberine bridge*) (DANIEL et al., 2017).

As enzimas do tipo ponte berberina (BBE, *Berberine Bridge Enzymes*) são um subgrupo da superfamília das enzimas oxidativas ligadas ao FAD. Todos os membros desta superfamília possuem um domínio de ligação ao FAD e um domínio de ligação ao substrato. Porém, uma característica particular que diferencia a subfamília das BBE das outras oxidases ligadas ao FAD é que a ligação ao cofator FAD nas BBE ocorre em dois pontos distintos: em uma histidina e em uma cisteína, formando a ligação FAD-6-S-cisteinil,8 α -N1-histidil (DANIEL et al., 2017). Este tipo de ligação foi primeiramente observado por Huang et al., (2005) na estrutura da GOOX de *S. strictum* (SsGOOX).

No banco de dados do CAZy até maio de 2018, apenas 4 enzimas pertencentes a família AA7 foram caracterizadas: a MtXyIO, a SsGOOX, a Carboidrato oxidase de *M. nivale* (MnCO), também conhecida como lactose oxidase e a ChitO de *F. graminearum* (FgChitO). A única XyIO descrita até o

momento na literatura é a do fungo termofílico degradador de biomassa lignocelulósica *M. thermophila* (MtXyIO).

Dentre as enzimas já caracterizadas, a sequência da XyIO do *T. terrestris* (TtXyIO), que também é um fungo termofílico com atividade degradadora em compostos lignocelulósicos, apresentou maior similaridade com a MtXyIO e apresentou 69% de identidade entre as sequências, sugerindo que estas enzimas possuam características estruturais semelhantes. Ferrari et al. (2016) a partir do cristal da MtXyIO constatou que a enzima possui o FAD bicovalentemente ligado a estrutura da proteína nas regiões conservadas de histidina (94) e cisteína (155), classificando esta enzima como pertencente a subfamília das BBE. Esta informação sugere que a TtXyIO seja possivelmente classificada como pertencente a subfamília da BBE, uma vez que esta enzima também possui as regiões conservadas de histina (92) e cisteína (153) na sua sequência (Figura 9).

O grupo das BBE de plantas formou um grupo afastado das flavoproteínas de microrganismos, demonstrando que apesar de possuírem características estruturais semelhantes, como as presenças do cofator FAD acoplado a sequências destas proteínas, existem diferenças que distinguem estas proteínas entre os diferentes reinos. Apesar da ligação bicovalente do FAD ser uma característica da família BBE, proteínas pertencentes a esta família foram identificadas por não possuírem o resíduo requerido para formar a ligação FAD-6-S-cisteinil ou a ligação FAD-8 α -N1-histidil. Este fato questiona a importância da ligação bicovalente nestas proteínas e se está relacionado apenas à estrutura da proteína e/ou a sua função, já que o tipo de ligação bicovalente não é pré-requisito para o correto enovelamento de membros desta família (DANIEL et al., 2017; LEFERINK et al., 2008). No entanto, o poder oxidativo das enzimas bicovalentemente ligadas ao FAD é potencialmente maior (LEFERINK et al., 2008).

Figura 8 - Análise filogenética entre a XyIO e outras enzimas com atividade oxidativa em oligossacarídeos.

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 9 - Alinhamento parcial de TtXyIO, MtXyIO e GOOX mostrando as regiões conservadas de histidina (H) e cisteína (C), sublinhado e negrito.

		*			*	
TtXyIO	GVKVNPKAGGH <u>H</u> SYASFGLGGE	(44)		AFSHGT <u>C</u> PGVGVAG	161	
MtXyIO	GVKANPKSGGH <u>H</u> SYASFGLGGE	(44)		AFSHGT <u>C</u> PGVGVGG	163	
GOOX	GVQISAKGGGH <u>H</u> SYGSYGFGE	(43)		ALSHGT <u>C</u> PAVGVGG	163	

Fonte: Arquivo próprio.

5.2 Amplificação gênica

De acordo com buscas nos bancos de dados do *JGI MycoCosm* (GRIGORIEV et al., 2014) e NCBI, o gene que codifica a enzima TtXyIO (número de acesso no NCBI: XM_003648474.1) está anotado como gene de uma proteína oxidoreductase hipotética que foi detectada no exo-proteoma de *T. terrestris* quando este microrganismo é cultivado em resíduos agrícolas como a palha de alfafa (BERKA, 2011) e em bagaço de cana de açúcar *in natura* e pré-tratado (MULINARI, dados não publicados). Este gene (THITE_2106069) está localizado no cromossomo 1 na região de 40.268 e 42.264 pares de bases (pb). O comprimento total do gene é de 1.997 pb somando as regiões regulatórias, as regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs, *Untranslated Regions*), 3 éxons e 2 íntrons (Figura 10). Os *primers* sintetizados e utilizados neste estudo foram desenhados a partir do códon de iniciação (ATG) e do códon de terminação (TGA) presente na região codificante do gene (ver ANEXO C). Esperava-se que o fragmento amplificado pelos *primers* durante a PCR a partir de amostras do DNA genômico de *T. terrestris* apresentasse 1640 pb o que corresponde a soma dos 3 éxons (464; 538 e 480 pb) com os 2 íntrons (83 e 75 pb). Para amplificação do gene de TtXyIO, diferentes temperaturas de anelamento foram testadas a fim de avaliar em qual temperatura resultaria na síntese de maior número de cópias do gene. O resultado da amplificação gênica encontra-se na figura 11. Em todas as temperaturas testadas houve o aparecimento de bandas com grau de intensidade similar e com o mesmo tamanho molecular na região que corresponde ao esperado pelo gene.

Figura 10 - Esquema mostrando a disposição gênica do gene codificante de TtXyIO.

Fonte: *JGI MycoCosm* (modificada).

Nota: a) Azul: representa as regiões regulatórias e as regiões 5' e 3'-UTR;

b) Vermelho: representa as regiões exônicas;

c) Traço preto: representa os íntrons.

Figura 11 - Gel de agarose 1% com os fragmentos amplificados do gene codificante de TtXyIO de *T. terrestris* em diferentes temperaturas de anelamento.

Fonte: Arquivo próprio.

5.3 Clonagem e expressão do gene que codifica TtXyIO

A clonagem gênica e transformação em células de *E. coli* quimio-competentes foi primeiramente realizada para que houvesse a replicação do plasmídeo através da maquinaria das colônias bacterianas, até atingir uma quantidade de DNA suficiente para transformar o fungo *A. nidulans* A773, uma vez que as células procarióticas possuem um sistema de replicação e condições mais simples de crescimento comparado com o das células eucarióticas, e se replicam em questão de horas a dias, enquanto que os fungos filamentosos requerem um tempo maior de crescimento (NEVALAINEN et al., 2005).

O plasmídeo foi formado através da inserção das cópias do gene amplificado pela PCR no vetor pEXPYR (SEGATO et al., 2012). Este vetor foi desenvolvido para melhorar o sistema de expressão e secreção de proteínas recombinantes em cepas de *Aspergillus*. Através da marca de seleção de resistência a ampicilina do vetor pode-se testar as cepas para confirmar a presença do plasmídeo. Das 4 colônias selecionadas no meio de cultura, 3 foram consideradas positivas devido a presença de bandas no gel através de PCR feitas a partir das colônias (Figura 12).

Figura 12 - Resultado da PCR de colônia feitas a partir das colônias selecionadas no meio de seleção.

Fonte: Arquivo próprio.

A inserção dos plasmídeos no sistema de expressão do fungo filamentoso *A. nidulans* A773 foi feita através da fusão dos protoplastos deste organismo. O meio de seleção das colônias fúngicas tinha como marca auxotrófica a ausência de uracila e uridina, pois o vetor pEXPYR contém o gene (*pyrG*) que corrige a via de síntese destes compostos em *A. nidulans* A773. A expressão e secreção heteróloga da TtXyIO foi analisada por meio de *screening* dos transformantes em SDS-PAGE. Das colônias obtidas no meio de seleção, 7 foram testadas para a produção da enzima TtXyIO, dentre elas, 4 colônias foram consideradas positivas para expressão e secreção de TtXyIO (Figura 13). Entre as colônias positivas foi feito o estoque dos transformantes número 4 e número 6 mostrados no SDS-PAGE, por apresentarem bandas mais definidas e apresentarem maior quantidade de proteínas do volume aplicado ao gel.

Figura 13 - Screening em SDS-PAGE dos transformantes de *A. nidulans* A773 para expressar e secretar a enzima TtXyIO.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: **M**: marcador de peso molecular;

C: controle, *A. nidulans* com o vetor vazio;

1 - 7: colônias testadas para a expressão e secreção de XyIO.

As colônias 3, 4, 5 e 6 foram consideradas positivas para expressão da enzima, dentre elas, as colônias 4 e 6 foram isoladas para o preparo do estoque de transformantes.

Este é o primeiro relato de expressão heteróloga da enzima TtXyIO, em sistema de expressão de fungo filamentoso. Até o momento, apenas a MtXyIO foi identificada e caracterizada nos bancos de dados a partir da expressão homóloga desta enzima. Outros estudos reportaram a expressão heteróloga de outras oligossacarídeos oxidase, especialmente com ação em oligossacarídeos de resíduos C6 como a GOOX de *S. strictum*. No entanto, a SsGOOX foi expressa na levedura *P. pastoris* GS115 (FOUMANI et al., 2011), e em *P. pastoris* KM71 (HUANG et al., 2005). Kiryu et al (2008) expressaram homologamente uma carboidrato oxidoreductase de *Paraconiothyrium* sp KD-3, enquanto que Xu et al. (2001) expressou a enzima MnCO em *A. oryzae* e demonstrou sua atividade em mono-, di- e oligossacarídeos.

5.4 Melhor condição de expressão e secreção de TtXyIO

A fim de definir qual a melhor condição que proporcionasse uma maior quantidade na produção da proteína de interesse, avaliou-se o cultivo do transformante de TtXyIO (transformante número 6) em diferentes condições

(estacionário e agitado), utilizando dois indutores diferentes do promotor da glucoamilase presente no vetor pEXPYR. O promotor da glucoamilase é induzido por maltose e o efeito deste composto sobre o nível de expressão de proteínas foi observado a partir da combinação de 3 concentrações diferentes de maltose (2%, 3% e 5% m/v) com ou sem glicose (1% m/v) no meio de cultivo. O mesmo foi analisado com o indutor *high* maltose que é um composto utilizado na fabricação de cerveja e que possui um menor grau de pureza comparada com a maltose da SIGMA (utilizada neste estudo).

Os parâmetros utilizados para definir qual a melhor condição de expressão e secreção da enzima de interesse foi através da quantificação de proteínas totais presentes no meio de cultivo ao final de 48 horas de incubação, e pela análise dos produtos do meio por SDS-PAGE.

No cultivo estacionário tanto para maltose quanto para *high* maltose, os meios de cultura que foram suplementados com glicose apresentaram maiores quantidades de proteínas totais secretadas no meio (Figura 14A e 14B). No entanto, ao comparar o desempenho entre os indutores, a maltose propiciou a expressão de mais proteínas do que a *high* maltose, mesmo em meios sem a suplementação de glicose (Figura 14A e 14B).

No cultivo agitado, os meios suplementados tendo maltose como indutor da expressão mostraram um maior acúmulo de proteínas totais secretadas (Figura 14C e 14D), porém houve a secreção de cerca de 23 µg/mL de proteínas totais em meios com 2% (m/v) de *high* maltose suplementado com glicose, sendo essa a melhor condição de cultivo para esse indutor. Em meio agitado, a expressão e secreção de proteínas foi maior em meio com 5% (m/v) de maltose suplementado com glicose, atingindo valores próximos ao das melhores condições em meio estacionário, cerca de 30 µg/mL de proteínas totais.

No entanto, não basta apenas avaliar a quantidade de proteínas totais para definir a melhor condição de expressão e secreção da enzima TtXylO, uma vez que os métodos de quantificação de proteínas feitas por espectrofotometria podem sofrer interferências de alguns compostos que podem ser liberados pelo microrganismo no meio de cultivo. Dentre estes compostos, os pigmentos, como a melanina, pode ser produzido por vários organismos, dentre eles o *fungo* *A. nidulans*. Foi demonstrado que este pigmento está associado à quitina presente na parede celular dos fungos (ELLIS; GRIFFITHS, 1974; BULL, 1970;

EISENMAN; CASADEVALL, 2012). A produção de melanina por *A. nidulans* depende de vários fatores entre eles, temperatura, pH e disponibilidade de fontes de carbono (ROWLEY; PIRT, 1972). Apesar da possível interferência na quantificação total de proteínas pela produção de pigmentos, neste trabalho, não foi avaliado a formação de melanina nos meios de cultivo testados.

Figura 14 - Quantificação de proteínas totais produzidas a partir de diferentes condições de cultivo.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: A: cultivo estacionário com diferentes concentrações de maltose com ou sem glicose;
 B: cultivo estacionário com diferentes concentrações de *high* maltose com ou sem glicose;
 C: cultivo agitado com diferentes concentrações de maltose com ou sem glicose;
 D: cultivo agitado com diferentes concentrações de *high* maltose com ou sem glicose.

De um modo geral, meios com menores quantidades de açúcares, como os que não foram suplementados por glicose, apresentaram menores quantidades de proteínas totais. No intuito de avaliar em qual condição a proteína de interesse TtXylO foi superexpressa pelo *A. nidulans* A773, alíquotas do meio, no fim do período de incubação, foram concentradas e avolumadas para o mesmo volume, eliminando interferências no volume de concentração, e analisadas em SDS-

PAGE (Figura 15). As condições que apresentaram maiores quantidades de proteínas totais foram as mesmas que apresentaram mais proteínas no SDS-PAGE, exceto pelo cultivo agitado com 2% (m/v) de *high* maltose suplementado com glicose em que pouca proteína foi observada no gel (Figura 14D e 15D).

As maiores quantidades de proteínas secretadas no meio foram nas condições em que continha maltose, como indutor em meio estacionário, 2% e 3% (m/v) suplementado por glicose e com 5% (m/v) de maltose em meio agitado suplementado com glicose (Figura 14A e 14C), sendo estas mesmas condições que apresentaram maiores quantidades de proteínas no SDS-PAGE (Figura 15A e 15C). No entanto, apesar da proteína de interesse ter sido superexpressa nestas condições, como demonstrado pela presença da banda nos géis, houve também a secreção de uma maior quantidade de proteínas inespecíficas, especialmente nas condições com 2% (m/v) de maltose mais 1% (m/v) de glicose em meio estacionário e com 5% (m/v) de maltose mais 1% (m/v) de glicose em cultivo agitado (Figura 15A e 15C).

Figura 15 - SDS-PAGE das diferentes condições cultivo para expressão da enzima TtXyIO.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: A: cultivo estacionário com diferentes concentrações de maltose com e sem glicose.
 B: cultivo estacionário com diferentes concentrações de *high* maltose com e sem glicose.
 C: cultivo agitado com diferentes concentrações de maltose com e sem glicose.
 D: cultivo agitado com diferentes concentrações de *high* maltose com e sem glicose.
 M*: Marcador de peso molecular;
 M: maltose;
 G: glicose;
 HM: *high* maltose.

O excesso de outras proteínas no meio não é desejo, uma vez que pode haver interferência nas etapas seguintes de purificação da enzima de interesse. Diante disso, a melhor condição de expressão e secreção da enzima TtXyIO foi definida como o meio em que houve alta quantidade de proteínas totais e que apresentaram menores quantidades de proteínas inespecíficas para este estudo. Sendo assim, o melhor meio para expressar a enzima XyIO de *T. terrestris* em cepas recombinantes de *A. nidulans* A773 foi em cultivo estacionário contendo 3% (m/v) de maltose, como indutor, acrescido de 1% (m/v) de glicose no meio.

5.5 Purificação e quantificação

A purificação da enzima TtXyIO foi feita pela utilização de duas metodologias. Primeiro foi feita uma cromatografia de troca iônica, na qual tem por objetivo separar as moléculas de acordo com sua carga. De acordo com a predição do *software Protparam* (GASTEIGER et al.,2005), a enzima TtXyIO possui ponto isoelétrico (pI) de 5,27. Para que a enzima TtXyIO apresentasse a carga desejada para o processo de troca iônica, o extrato bruto contendo a enzima de interesse foi dializado em tampão TRIS-HCl 100 mM pH 7.0 e o mesmo foi utilizado para equilibrar a coluna e eluição da amostra. A enzima se fixou bem na coluna, como pode ser notado pela ausência de bandas na fração *flow-through* e foi observado eluição da enzima nas frações de lavagem (com tampão) e com gradiente de solução salina de 100, 200 e 300 mM (Figura 16).

Figura 16 - SDS-PAGE das frações na cromatografia de troca iônica.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: **M**: marcador de peso molecular;

- 1: fração flow-through;
- 2: fração de lavagem (tampão);
- 3: fração eluída com 50 mM de NaCl;
- 4: fração eluída com 100 mM de NaCl;
- 5: fração eluída com 200 mM de NaCl;
- 6: fração eluída com 300 mM de NaCl;
- 7: fração eluída com 400 mM de NaCl;
- 8: fração eluída com 500 mM de NaCl;
- 9: fração eluída com 1 M de NaCl.

Estas frações foram concentradas e injetadas em uma coluna Superdex 200 10/300 GL para separação a partir do seu peso molecular (Figura 17). O peso molecular predito para TtXyIO é de ~ 53 kDa, mas em todas as análises em SDS-

PAGE a enzima apresentou bandas na região de 66 kDa do marcador de peso molecular. Essa divergência de valores sugere que a enzima TtXyIO é submetida a processos de modificação pós-traducional, provavelmente glicosilação, pela maquinaria do organismo recombinante. A análise de localização de possíveis sítios de glicosilação da enzima TtXyIO foi realizada através do *software* *NetNGlyc 1.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) para N-glicosilação e do *software* *NetOGlyc 4.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) para O-glicosilação. Estes programas mostraram que são preditos 7 resíduos de asparagina (N) a serem N-glicosilados e um sítio positivo para O-glicosilação.

Ferrari et al. (2016) observaram que a MtXyIO apresentou um tamanho molecular de cerca de 60 kDa no SDS-PAGE, enquanto que o peso molecular predito para a enzima também foi de ~53 kDa. Apesar destas enzimas serem caracterizadas como XyIO, o fato de terem sido prospectadas e expressadas em organismos diferentes (a MtXyIO teve sua clonagem e expressão em uma cepa de *M. thermophila* modificada para baixa formação de proteases e [hemi]celulases), pode afetar as modificações pós-traducionais à qual estas enzimas foram submetidas, apresentando assim diferentes graus de glicosilação.

Figura 17 - SDS-PAGE das frações que apresentaram pico na cromatografia de exclusão por tamanho.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: M: marcador de peso molecular;

1-2: frações em que houve a eluição da enzima.

A quantificação da proteína purificada foi feita através do coeficiente de extinção molar de TtXyIO ($93.405 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) calculado pelo *software Protparam* (GASTEIGER et al., 2005) a partir da sequência de aminoácidos da proteína (ver ANEXO D), após a remoção do peptídeo sinal pelo *software SignalP4.1 Server* (NIELSEN, 2017). Ao final do processo de purificação obteve-se uma média de 0,2 mg/mL da enzima TtXyIO.

5.6 Presença do cofator FAD

A presença do cofator FAD na estrutura da proteína foi confirmada por fluorescência em luz UV das bandas da proteína no SDS-PAGE (Figura 18) e por *scanning* na região de luz UV-Visível (Figura 19). O cofator FAD é responsável pela absorção da luz no espectro UV, podendo ser visualizado na sua forma oxidada em dois picos distintos nas regiões de 360 - 380 nm e 440 - 450 nm e também apresenta uma tonalidade amarela que é característica das flavoproteínas (MACHEROUX, 1999). A detecção do FAD na proteína TtXyIO sugeriu que os transformantes obtidos foram capazes de promover a conformação correta da proteína.

Figura 18 - SDS-PAGE dos transformantes tratado com 5% de ácido acético para detectar a presença do cofator FAD na estrutura da proteína.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: M: marcador molecular;

C: controle, A. nidulans com o vetor vazio;

1-3: transformantes testados para a presença do cofator.

Apenas os transformantes 2 e 3 foram positivos para a presença do FAD na estrutura proteica.

Figura 19 - Espectro do scanning UV-vísivel para TtXyIO mostrando os picos presentes no cofator FAD em seu estado oxidado.

Fonte: Arquivo próprio.

5.7 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada no intuito de confirmar a identidade da proteína em estudo neste trabalho. A análise foi feita a partir dos produtos gerados após a digestão das bandas da proteína purificada por tripsina. Do total de produtos obtidos pela digestão, cerca de 36 peptídeos foram formados e confirmados como pertencentes a proteína TtXyIO (Tabela 4). A sequência peptídica da enzima TtXyIO foi confirmada com 71,81 % de cobertura (Figura 20). A massa molecular estimada da enzima foi 53.698,28 Da. Este dado é condizente com o previsto pelo *software* *Protparam* que era de 53.527,13 Da (ANEXO C).

Tabela 4 - Alguns dos peptídeos obtidos e detectados com suas respectivas massas carga obtidos pela análise de espectrometria de massas.

PEPTÍDEOS	m/z
SLVTSALPSSVLQNVSNYWVEK	1211.137
MDNVTLDSTTQIATVQPGAR	1059.53
GAGSNFGIVASFQFK	765.3931
TFAAPSLVTTFQVDLPWK	1011.041
DPNYLFLYEFYDR	877.907
AQAEEVYYR	564.7706
ILGNSYQTQLQGLYYGNSSALQSAMQPILSK	1125.24
TDMPKELNMR	617.7976

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 20 - Aminoácidos detectados (em vermelho) presentes nos peptídeos gerados após digestão por tripsina da enzima XyIO.

```

1  DPLAKRAAID DCLSAAKVPV DTPDSDEWKT DANPFNQRLP YTPVAIAVPT
51 TAEHIQAAVS CAAQVGKVN PKAGGHSYAS FGLGGEDGHL VVELDRMDNV
101 TLDSTTQIAT VQPGARLGHV ATVLYEQGKR AFSHGTCPGV GVAGHSLHGG
151 FGFSSHLHGL ALDWIAGVTV VLANATVVNA SETENPDLFW ALRGAGSNFG
201 IVASFQFKTF AAPSLVTTFQ VDLPWKNASS IASGWAKLQD WVKTDMPKEL
251 NMRILGNSYQ TQLQGLYYGN SSALQSAMQP ILSKLGAKLS DTEESDWMDA
301 FAHYAYSPTI DITGPYNAE TFYSKSLVTS ALPSSVLQNV SNYWVEKARS
351 NSRAWYIIID MFGGANSVAVT NVPANATSFA FRDPNYLFLY EFYDRVYFGS
401 YPSNGFSFLD DWVNIFTSGI NTTQWGMVIN YADPAMSRQA AEEVYYRQNL
451 PRLKQLKKQL DPTQLFDYPQ AIDPTTA

```

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: A cobertura da sequência peptídica da enzima foi de 71,81%.

5.8 Dicroísmo circular e termoestabilidade

A análise de dicroísmo circular (DC) foi realizada a fim de se obter o perfil de termoestabilidade da enzima TtXyIO. A partir de experimentos de desnaturação induzido por temperatura, foi possível obter uma curva típica para a temperatura de desenovelamento da proteína (Figura 21). Através da curva de desnaturação calculou-se a temperatura de desnaturação (T_m , do inglês *melting temperature*) da enzima TtXyIO que foi de 62,7 °C, ou seja, quando a enzima foi submetida a temperaturas iguais ou superiores a de desnaturação cerca de 50% da população de proteínas no meio começam a perder a sua conformação tridimensional e consequentemente sua função biológica. A enzima TtXyIO por ter tido seu gene prospectado de um fungo termofílico e por apresentar uma temperatura de desnaturação superior a 60 °C pode ser considerada uma enzima termoestável. Ferrari et al. (2016) obteve para a MtXyIO temperatura de desnaturação de 65 °C, enquanto que Huang et al (2008) obteve temperatura de desnaturação de 56 °C para a SsGOOX, o que reforça a hipótese de que enzimas provenientes de organismos termofílicos são mais termotolerantes.

Figura 21 - Espectro de dicroísmo circular mostrando a curva de desnaturação térmica da enzima TtXyIO.

Fonte: Arquivo próprio.

Também foi avaliado o comportamento transicional da estrutura secundária da TtXyIO através da análise dos espectros DC ao longo do aumento de temperatura (Figura 22). Na figura 22 é possível observar que a 222 nm a conformação da proteína se manteve praticamente inalterada nas temperaturas entre 25 e 55 °C. Nas temperaturas entre 57 e 61 °C nota-se uma pequena mudança estrutural da população proteica e como esperado, quando a enzima é submetida a temperaturas superiores a de desnaturação a mudança no espectro pode significar perda de estrutura secundária pela população de proteína em solução.

Figura 22 - Espectros de CD de TtXyIO a 222 nm ao longo de aumento de temperatura.

Fonte: Arquivo próprio.

5.9 Temperatura e pH ótimo de reação

A temperatura ótima de reação para a enzima TtXylO foi determinada baseado no protocolo seguido por Ferrari et al. (2016). O protocolo de atividade comumente utilizado para enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio é baseado em um método cromogênico que necessita da presença de outra enzima na reação, a peroxidase (LIN et al., 1991). A quantificação de atividade por este método é feita de forma indireta, por meio da formação de um corante, a quinoneimina, a partir da oxidação do fenol e redução de peróxido de hidrogênio (formada pela ação da enzima oxidativa) pela peroxidase (ver APÊNDICE B). A necessidade de utilizar outra enzima limita este método na determinação de parâmetros como a temperatura, uma vez que o aumento da temperatura pode afetar a atividade catalítica da peroxidase e gerar um resultado falso negativo. A fim de superar essa limitação, neste estudo foi realizada a reação para determinação da temperatura ótima como descrita no tópico 4.16 com excesso de peroxidase na reação. A faixa de temperatura testada consistiu entre 20 e 60 °C.

Nas condições de reação testadas, a enzima TtXylO apresentou uma melhor atividade a temperatura de 25 °C (Figura 23). Apesar da temperatura ótima ter sido em torno de 20-25 °C, a TtXylO manteve cerca de 80% da sua atividade a 40°C e 40% da sua atividade a 60 °C. Ferrari et al. (2016) obtiveram uma temperatura ótima de 30 °C para a XylO do fungo termofílico *M. thermophila*, enquanto que Xu et al. (2001) e Lin et al.(1991) obtiveram temperatura ótima de 50 °C para as enzimas MnCO e SsGOOX de fungos mesofílicos. Esses últimos autores determinaram a temperatura ótima da enzima GOOX através do consumo de oxigênio na reação com um oxígrafo.

Não foi possível realizar as análises de temperatura ótima com um oxígrafo devido a limitações técnicas sofridas durante o período dos experimentos. No entanto, os autores deste trabalho reforçam a importância de realizar novas análises para confirmação destes resultados, em especial, por meio do emprego de técnicas que possibilitem avaliar a atividade da enzima isoladamente, sem o uso de outro composto que possa interferir nos resultados, como a peroxidase.

Figura 23 - Temperatura ótima de reação para a enzima TtXylO.

Fonte: Arquivo próprio.

O pH ótimo obtido para a enzima TtXylO foi de 5,5 (Figura 24). Apesar de Ferrari et al. (2016) terem utilizado tampões com pH 6,0 (80% de atividade) para determinação dos parâmetros cinéticos da MtXylO, esta enzima apresentou pH 7,0 como o seu ótimo. O pH ótimo estimado para a SsGOOX foi de 10 (LIN et al., 1991), e para MnCO foi de 5-7 (XU et al., 2001).

Figura 24 - pH ótimo de reação para a enzima TtXylO.

Fonte: Arquivo próprio.

5.10 Atividade enzimática e parâmetros cinéticos

A especificidade a substratos da enzima em estudo foi determinada através da análise da atividade da enzima em 22 substratos diferentes (Figura 25). Os substratos testados consistiam em açúcares C5 e C6 de mono-, di- e oligossacarídeos. Dentre os substratos testados, a enzima demonstrou melhores resultados em substratos formados por açúcares C5.

No intuito de avaliar melhor a atividade da enzima sobre açúcares C5, foi testada a sua atividade em substratos complexos de xilana e a enzima apresentou uma maior atividade em xilana de birchwood e em xilana de *beechwood* como mostra a figura 25. A partir desses resultados é possível afirmar que a enzima em estudo trata-se de uma xilo-oligossacarídeo oxidase. A TtXyIO é a segunda enzima classificada como pertencente a família das xilo-oligossacarídeo oxidases. A primeira enzima descoberta e identificada com especificidade em XOS foi a MtXyIO (Ferrari et al., 2016). Assim como a MtXyIO, a TtXyIO demonstrou uma preferência por XOS com maiores graus de polimerização, como os X4 para ambas enzimas, e para TtXyIO X5 e X6.

No entanto, a enzima ainda demonstrou possuir um pouco de atividade nos substratos com açúcares C6 como a celobiose e lactose. Quando o gene da TtXyIO foi inicialmente prospectado nos bancos de dados, foi considerado como um gene que codificava uma enzima GOOX. A GOOX possui preferencialmente atividade em C6 e o primeiro substrato em que foi observada atividade da enzima em estudo foi em celobiose. Com isso, alguns parâmetros de reação para TtXyIO como tempo e quantidade de enzima foram obtidos utilizando esse substrato. Quando foi testada a atividade da enzima nos oligossacarídeos de C6, a enzima praticamente não reagiu, com isso analisou-se os oligossacarídeos de C5 e a enzima mostrou maior especificidade nos XOS.

Figura 25 - Painel de atividade em diferentes substratos para TtXyIO.

Fonte: Arquivo próprio.

A partir do perfil de especificidade aos substratos obtidos para a enzima, foi possível determinar alguns parâmetros cinéticos de reação. Como demonstrado na tabela 5, a enzima deste estudo demonstrou maior afinidade com o aumento da cadeia no xilo-oligômero, em especial, xilopentose apresentou menores valores de K_m . A TtXyIO apresentou maior afinidade (menores valores de K_m) aos substratos X2, X3 e X4, quando comparada a enzima MtXyIO. No entanto, os valores de K_{cat} obtidos para a MtXyIO (Ferrari et al., 2016) foram cerca de 36 vezes superiores aos dados obtidos para TtXyIO. Aqui é possível observar que os parâmetros de reação utilizados para determinar os dados cinéticos, tais quais a quantidade de enzima utilizada nas reações (cerca de 4 μ g) e o tempo de reação (30 minutos), afetou consideravelmente os cálculos. Como dito anteriormente, a quantidade de enzima e o tempo de reação foram definidos como ideais a partir de um substrato (celobiose) em que a enzima não possuía tanta especificidade. Em baixas quantidades de substrato, como as utilizadas neste trabalho (25, 50 e 75 μ M dos XOS) a formação do produto da reação foi observada, através do surgimento de uma coloração rosa nos ensaios, após 15 minutos de reação. Esta

foi uma das razões de ter sido adotado um tempo de reação em torno de 30 minutos.

Foi possível observar também que a eficiência catalítica da TtXylO aumentou em consequência ao aumento do grau de polimerização dos oligômeros. Porém, apesar da TtXylO ter apresentado uma boa afinidade aos XOS, a eficiência catalítica da enzima foi fortemente afetada por conta dos baixos valores de K_{cat} (Tabela 5). A MtXylO apresentou valores de K_{cat} na mesma magnitude que a GOOX (VUONG et al., 2013), no entanto, surpreendentemente, a GOOX apresentou eficiência catalítica muito superior ao das XylOs analisadas. Uma explicação para este fato pode estar associado à diferença do sítio de ligação ao substrato entre essas enzimas. O sítio ativo da enzima XylO e da GOOX são bastante similares, porém existem algumas diferenças entre elas: a XylO possui uma leucina na posição 274, uma tirosina na região 376, uma isoleucina na região 378 e um glutamato na região 412, enquanto a GOOX possui, respectivamente, um glutamato, um triptofano e uma glutamina no lugar dos dois últimos aminoácidos citados. A tirosina na posição 376 parece desempenhar a função de proibir a ligação de aldohexoses no sítio ativo da enzima, tornando essa enzima mais específica para açúcares C5 (FERRARI et al., 2016).

Vuong et al. (2013) regeneraram a GOOX de *S. strictum* CBS 346.70 ao seu estado selvagem através de uma dupla substituição de aminoácidos (V38A – N388S). Esses autores observaram que na presença de uma mutação única (V38A), a eficiência catalítica da enzima aumentou em todos os substratos testados inclusive em XOS (VOUNG et al., 2013). Heuts et al (2007) compararam a sequência da FsChitO com a GOOX e realizaram uma mutação sítio dirigida no sítio de ligação ao substrato da enzima a qual demonstrou um ganho na eficiência catalítica da enzima em gluco-oligossacarídeos.

Diante do exposto, recomenda-se a obtenção de novos parâmetros cinéticos em condições apropriadas de reação a fim de analisar a real eficiência catalítica da enzima TtXylO nos substratos de maior especificidade.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos da TtXyIO, MtXyIO e SsGOOX determinados em xilo-oligosacarídeos.

	TtXyIO				MtXyIO (Ferrari et al., 2016)				GOOX (Vuong et al., 2013)			
	Kcat (s ⁻¹)	Km (M ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kcat (s ⁻¹)	Km (M ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kcat (s ⁻¹)	Km (M ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kcat (s ⁻¹)	Km (M ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)
Xilobiose	0,2902 ± 0,01483	0,000465 ± 0,06707	625	11,5 ± 0,5	0,00115 ± 0,00008	10.000	8,7 ± 0,13	0.000057 ± 0,003	152.631			
Xilotriose	0,2771 ± 0,01014	0,0002954 ± 0,03238	938	11,0 ± 0,3	0,00069 ± 0,00004	16.000	10 ± 0,23	0.00008 ± 0,01	129.166			
Xilotetraose	0,272 ± 0,01616	0,0001971 ± 0,02812	1.380,01	11,2 ± 0,3	0,00043 ± 0,00003	26.000	9,7 ± 0,23	0.00007 ± 0,01	138.809			
Xilopentaose	0,2524 ± 0,01619	0,000193 ± 0,02978	1.308,45	ND	ND	ND	10,4 ± 0,3	0.00005 ± 0,01	207.666			
Xilohexaose	0,3129 ± 0,01688	0,000207 ± 0,0267	1.509,40	ND	ND	ND	8,6 ± 0,3	0.00006 ± 0,01	143.333			

Fonte: arquivo próprio.

Nota: ND: não determinado.

5.11 Painel de íons

O efeito dos diferentes íons na atividade da enzima TtXylO é demonstrado na figura 26. Os íons de metais de Zn^{2+} e Na^{2+} apresentaram uma leve melhora na atividade da enzima TtXylO em torno de 6% de atividade relativa para ambos os íons. Lin et al, (1991) também avaliaram o efeito de diversos íons e observaram na atividade de SsGOOX uma melhora em torno de 6% de atividade relativa com íons de Zn^{2+} e 3% com íons Cu^{2+} . Para a TtXylO, os íons Cu^{2+} foram capazes de inibir a enzima, mantendo apenas 35% da sua atividade. No entanto, o íon que apresentou maior efeito negativo na atividade da TtXylO foi o Fe^{3+} . Na atividade da SsGOOX o íon Fe^{3+} manteve 80% da sua atividade relativa enquanto que o Fe^{2+} inibiu completamente a atividade da enzima (LIN et al., 1991).

Figura 26 - Efeito de diferentes íons sobre a atividade da TtXylO.

Fonte: Arquivo próprio.

Nota: O controle consistiu na atividade da enzima sem adição de íons metais.

5.12 Avaliação de atividade colaborativa entre uma xilanase GH10 e TtXylO

O efeito colaborativo entre uma GH10 de *A. fumigatus* e a TtXylO foi avaliado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente por 10 e 20 minutos (Figuras 27 e 28). A análise foi feita a partir da quantificação de açúcares redutores liberados no meio reacional em diferentes tempos.

A enzima GH10 é uma endo- β -1,4-xilanase que cliva as ligações glicosídicas aleatoriamente da cadeia de xilana em regiões que contenham dois resíduos de D-xilopiranosil consecutivos sem ramificações, exceto na região redutora (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Os xilo-oligossacarídeos liberados por meio da hidrólise da GH10 no meio de reação servem de substrato para a TtXylO. Os diferentes pré-tratamento (10 e 20 minutos) aos quais os bagaços utilizados nesse estudo foram submetidos, resultaram em diferentes composições (ver ANEXO E). O bagaço pré-tratado por 10 minutos possui maiores proporções de xilana e menores taxas de lignina enquanto que o bagaço pré-tratado por 20 minutos possui maiores proporções de lignina e menores quantidades de xilana.

Os tratamentos foram conduzidos com diferentes cargas enzimáticas para TtXylO, nos dois tipos de bagaço (Figuras 27 e 28), a fim de avaliar o efeito oxidativo da quantidade de enzima no meio. Como pode ser observado na figura 27, houve um aumento na quantidade de açúcares redutores liberados durante o tratamento enzimático do bagaço pré-tratado por 10 minutos ao longo do tempo em todos os tratamentos, exceto para os tratamentos em que continha apenas a enzima TtXylO.

O efeito oxidativo da enzima pode ser observado nos diferentes tempos nos tratamentos com maior carga enzimática da TtXylO, sendo que em 240 minutos de tratamento houve uma diminuição em torno de 12% dos açúcares redutores no meio, comparado com o tratamento que continha apenas a GH10 (Figura 27). Interessantemente, o tratamento em que a GH10 foi avaliada com menor carga enzimática de TtXylO demonstrou um pequeno aumento na liberação de açúcares redutores no meio em todos os tempos avaliados.

Figura 27 - Análise da atividade colaborativa entre uma xilanase GH10 e a TtXyIO em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente por 10 minutos.

Fonte: Arquivo próprio.

A quantidade total de açúcares redutores liberados da hidrólise do bagaço pré-tratado por 10 minutos foi, no geral, superiores, quando comparados com a hidrólise do bagaço pré-tratado por 20 minutos como era de se esperar, devido as diferentes composições das biomassas testadas.

Nos tratamentos da biomassa pré-tratada por 20 minutos, é possível observar um efeito oxidativo da TtXyIO bem acentuado após 120 minutos, em todos os tratamentos com as diferentes cargas enzimáticas de TtXyIO (Figura 28). No entanto, com 240 minutos de incubação, foi observado nos tratamentos com altas cargas enzimáticas de TtXyIO (2,0 e 4,0 µg), um aumento na liberação de açúcares redutores em torno de 30% com 2,0 µg de TtXyIO e 8% com 4,0 µg de TtXyIO, comparado ao tratamento que utilizou apenas a GH10.

Figura 28 - Análise da atividade colaborativa entre uma xilanase GH10 e a TtXylO em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente por 20 minutos.

Fonte: Arquivo próprio.

Este é o primeiro ensaio, até o momento, em que foi analisado o efeito colaborativo entre uma xilanase e uma xilo-oligossacarídeo oxidase. Os produtos gerados a partir da oxidação da TtXylO não foram avaliados nestes ensaios. Novos estudos serão requeridos para revelar as estratégias utilizadas por essa enzima e para avaliar o potencial catalítico desta na produção de compostos de alto valor agregado, devido principalmente a sua capacidade em formar uma extremidade carboxílica em qualquer tipo de xilo-oligossacarídeo, gerando ácidos aldônicos a partir destes (FERRARI et al., 2016).

6 CONCLUSÕES

O gene putativo para uma enzima oxidativa em oligossacarídeo foi amplificado do DNA genômico do fungo termofílico *T. terrestris*, clonado e expresso de maneira heteróloga na cepa de *A. nidulans* A773. A partir dos estudos bioquímicos, a enzima foi caracterizada como uma xilo-oligossacarídeo oxidase. Além disso, através da comparação entre as sequências dos aminoácidos da enzima TtXyIO e de outras enzimas covalentemente ligadas ao cofator FAD indicam que a TtXyIO pertence a subfamília das enzimas com pontes berberina (*Berberine Bridge Enzymes*, BBE). Essa é segunda enzima identificada, até o momento, como uma xilo-oligossacarídeo oxidase (XyIO).

Em ensaios de colaboração entre a TtXyIO e uma GH10, a TtXyIO apresentou comportamentos distintos quando avaliada com diferentes cargas enzimáticas na hidrólise do bagaço de cana de açúcar. Quando baixas cargas de TtXyIO foram avaliadas houve um aumento na liberação de açúcares redutores enquanto que em altas cargas de enzima, observou-se a oxidação dos XOS gerados pela ação da GH10.

Os produtos gerados a partir da oxidação dos XOS pela TtXyIO, como o ácido xilônico é um dos compostos químicos listados entre os 30 de maior valor agregado, pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos. A descoberta de novos sistemas enzimáticos capazes de gerarem produtos de alto valor a partir de fontes renováveis como a biomassa lignocelulósica tem sido estimulada. Novos estudos são necessários para avaliar os produtos gerados a partir da ação da TtXyIO e seu potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I. et al. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. v. 144, p. 12-18, 2018.
- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 98, p. 5301-5317, 2014.
- ALBERTI, F.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 101, p. 493-500, 2017.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410, 1990.
- BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**. v. 29, n. 10, p. 922-929, 2011.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. **Biotechnology Advances**. v. 34, p. 1260-1274, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BULL, A. T. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls: the nature of polysaccharide and melanin constituents. **Journal of General Microbiology**. v. 63, p. 75-94, 1970.
- CAICEDO, M.; BARROS, J.; ORDÁS, B. Redefining agricultural residues as bioenergy feedstocks. **Materials**. v. 9, n. 635, p. 1-22, 2016.
- CHEAH, W. Y. et al. Biorefineries of carbon dioxide: from carbon capture & storage (CCS) to bioenergies production. **Bioresource Technology**. v. 215, p. 346-356, 2016.
- CRAGG, S. M. et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 29, p. 108-119, 2015.
- DANIEL, B. et al. The family of berberine bridge enzyme-like enzymes: A treasure-trove of oxidative reactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 632, p. 88-103, 2017.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

- De VRIES, R. P. et al. Post-genomic approaches to understanding interactions between fungi and their environment. **International Mycological Association**. v. 2, n. 1, p. 81-86, 2011.
- DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**. v. 30, p. 1627-1640, 2012.
- EISENMAN, H.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 93, n. 3, p. 931-940, 2012.
- ELLIS, D. H.; GRIFFITHS, D. A. The location and analysis in the cell walls of some soil fungi. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 20, p. 1379-1386, 1974.
- FERRARI, A. R. et al. Discovery of a xylooligosaccharide oxidase from *Myceliophthora thermophila* C1. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 291, n. 45, p. 23709-23718, 2016.
- FERRARI, A. R.; LEE, M.; FRAAIJE, M. W. Expanding the substrate scope of chitooligosaccharide oxidase from *Fusarium graminearum* by structure-inspired mutagenesis. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 112, n. 6, p. 1074-1080, 2015.
- FOUMANI, M. et al. Enhanced polysaccharide binding and activity on linear β -glucans through addition of Carbohydrate-Binding Modules to either terminus of a glucooligosaccharide oxidase. **Plos One**. p. 1-18, 2015.
- FOUMANI, M.; VUONG, T. V.; MASTER, E. R. Altered substrate specificity of the gluco-oligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 108, n. 10, p. 2261-2269, 2011.
- FROMMHAGEN, M. et al. Distinct Substrate Specificities and Electron-Donating Systems of Fungal Lytic Polysaccharide Monooxygenases. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n.1080, p.1-22, 2018.
- GAO, W. et al. Engineering extracellular expression systems in *Escherichia coli* based on transcriptome analysis and cell growth state. **ACS Synthetic Biology**. v. 7, n. 5, p. 1291-1302, 2018.
- GASSER, B. et al. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. **Future Microbiology**. v. 8, n. 2, p. 191-208, 2013.
- GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the expasy server. In: WALKER, J. M. ed. **The Proteomics Protocols Handbook**. Humana Press. p. 571-607, 2005.
- GIBSON, D. G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**. v. 37, n. 20, p. 6984-6990, 2009.
- GÓMEZ, F. J.; FERNÁNDEZ, F. J.; VEJA, M. C. Heterologous expression. of proteins in *Aspergillus*. In: GUPTA, V. K. ed. **Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier. p. 55-68, 2016.

GRIGORIEV, I. V. et al. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. **Nucleic Acids Research**. v. 42, p. 699-704, 2014.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 36, n. 6, p. 1089-1098, 2016.

HANSEN, N. M. L.; PLACKETT, D. Sustainable films and coatings from hemicelluloses: a review. **American Chemical Society**. v.9, n. 6, p. 1493-1505, 2008.

HELLEMOND, E. W. V. et al. Occurrence and biocatalytic potential of carbohydrate oxidases. **Advances in Applied Microbiology**. v. 60 p. 17-54, 2006.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, A.; FERREIRA, P.; MARTÍNEZ, A. T. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 93, n. 4, p. 1395-1410, 2012.

HEUTS, D. P. H. M. et al. The role of double covalent Flavin binding in chito-oligosaccharide oxidase from *Fusarium graminearum*. **Biochemical Journal**. v. 413, p. 175-183, 2008.

HEUTS, D. P. H. M.; JANSSEN, D. B.; FRAAIJE, M. W. Changing the substrate specificity of a chito-oligosaccharide oxidase from *Fusarium graminearum* by model-inspired site-directed mutagenesis. **Federation of European Biochemical Societies**. v. 581, p. 4905-4909, 2007.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**. v. 5, n. 45, p. 1-12, 2012.

HUANG, C.-H. et al. 27. Functional roles of the 6-S-Cysteinylyl, 8 α -N1-Histidyl FAD in gluco-oligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, n. 45, p. 30990-30996, 2008.

HUANG, C.-H. et al. Crystal structure of gluco-oligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum*: a novel flavinylation of 6-S-cysteinylyl, 8 α -N1-histidyl FAD. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 46, p. 38831-38838, 2005.

HYEON, J. E.; SHIN, S. K.; HAN, S. O. Design of nanoscale enzyme complexes based on various scaffolding materials for biomass conversion and immobilization. **Biotechnology Journal**. v. 11, n.11, p. 1386-1396, 2016.

KIRYU, T. et al. Purification and characterization of a carbohydrate:acceptor oxidoreductase from *Paraconiothyrium* sp. that produces lactobionic acid efficiently. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 72, n. 3, p. 833-841, 2008.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological of xylanases. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 23, p. 411-456, 1999.

- LEE, C. C. et al. Production of D-xylonic acid from hemicellulose using artificial enzyme complexes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 27, n. 1, p. 77-83, 2017.
- LEE, M. H. et al. Structural characterization of glucooligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 12, p. 8881-8887, 2005.
- LEFERINK, N. G. H. et al. The growing VAO flavoprotein family. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 474, p. 292-301, 2008.
- LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**. v. 6, p. 1-14, 2013.
- LIN, S. F. et al. Purification and characterization of a novel glucooligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum* T1. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1118, n.1, p. 41-47, 1991.
- LIU, H. et al. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**. v. 115, p. 244-248, 2012.
- LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**. v. 42, p. 490-495, 2014.
- MACHEROUX, P. UV-Visible Spectroscopy as a tool to study flavoproteins. In: CHAPMAN, S. K.; REID, G. A. eds. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., v. 131, 1999. Cap. 1.
- MEYER, T. S.; LAMBERTS, B. L. Use of comassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. v. 107, n.1, p. 144-145, 1965.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 79, p. 165-178, 2008.
- MORGENSTERN, I. et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**. v. 116, n. 4, p. 489-502, 2012.
- MOURE, A. et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1913-1923, 2006.
- NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: a review. **Carbohydrate Polymers**. v. 179, p. 28-41, 2018.
- NEVALAINEN, K. M. H.; TE'O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**. v. 23, n. 9, p. 468-474, 2005.

NIELSEN, H. Protein function prediction. In: KIHARA, D. ed. **Methods in Molecular Biology**. Springer. v. 1611, p. 59-73, 2017.

NISHIKIMI, M.; KIUCHI, K.; YAGI, K. Detection of L-Gulono-gamma-lactone oxidase on SDS-polyacrylamide gels by the fluorescence of its covalently bound Flavin. **FEBS Letters**. V. 81, n. 2, p. 323-325, 1977.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**. v. 91, n. 6, p. 659-664, 2009.

PARACHIN, N. S. et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**. v. 38, p. 446-456, 2012.

POLIZELI, M. L. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 9624-9630, 2010.

REY, M. W. et al. Cloning, heterologous expression., and characterization of *Thielavia terrestris* glucoamylase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 111, p. 153-166, 2003.

ROWLEY, B. I.; PIRT, S. J. Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**. v. 72, p. 553-563, 1972.

SAINI, A. et al. Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. **Enzyme Research**. v. 2015, p. 1-15, 2015.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**. v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SEGATO, F. et al. Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of a non-specific endoglucanase family 12 from *Aspergillus terreus* NIH2624. **Biochimica et Biophysica (BBA) - Proteins and Proteomics**. v. 1865, n. 4, p. 395-403, 2017.

SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 51, n. 2, p. 100-106, 2012.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. **Waste Biomass Valor**. 2017.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**. v. 68, n.5, p. 850-858, 1996.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: a focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. v. 5, n. 1, p. 19-30, 2015.

- SU, X. et al. Heterologous gene expression in filamentous fungi. In: SARIASLANI, S.; GADD, G.M.ed. **Advances in Applied Microbiology**. Elsevier. v. 81, p. 1-61, 2012.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- VIIKARI, L. et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v.108, p. 121-145, 2007.
- VUONG, T. V. et al. Xylo- and cello-oligosaccharide oxidation by gluco-oligosaccharide oxidase and variants with reduced substrate inhibition. **Biotechnology for Biofuels**. v. 2, n. 1, p. 1-14, 2013.
- WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**. v. 30, n. 6, p. 1447-1457, 2012.
- WANG, Y. et al. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. **Frontiers in Plant Science**. v. 4, n. 220, p. 1-14, 2013.
- WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**. v. 30, p. 1119-1139, 2012.
- WEIDEMAN, C.; BELLSTEDT, P.; GORLACH, M. CAPITO- A web server based analysis and plotting tool for circular dichroism data. **Bioinformatics**. v. 29, n. 14, p. 1750-1757, 2013.
- WEINACKER, D. et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 1043-1048, 2013.
- XU, F. et al. A novel carbohydrate:acceptor oxidoreductase from *Microdochium nivale*. **European Journal of Biochemistry**. v. 268, p. 1136-1142, 2001.
- YAEGASHI, J.; OAKLEY, B. R.; WANG, C. C. C. Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 41, n. 2, p. 433-442, 2014.
- ZHANG, Y. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

APÊNDICE A - SOLUÇÕES

Abaixo estão descritas as soluções usadas neste trabalho:

Meio SOC:

2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glicose.

Meio LB (Luria-Bertani):

1% triptona; 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl. Em meio sólido acrescenta-se 1,5% de ágar.

Gel de agarose 1%:

0,25 g de agarose em 25 mL de tampão TAE 1X.

Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X

40 mM TRIS; 20 mM acetato; 1 mM EDTA.

DNA loading

0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol FF; 0,25% Orange G; 30% glicerol em água.

Meio mínimo:

5% solução de sais de nitrato 20X; 0,1% elementos traços; 1% glicose; pH 6,5.

Em meio sólido acrescenta-se 1,9% ágar.

Sais de nitrato 20X:

12% NaNO₃; 1,04% KCl; 1,04% MgSO₄; 3,04% KH₂PO₄.

Elementos traços:

2,2% ZnSO₄; 1,1% H₃BO₃; 0,5% MnCl₂.4H₂O; 0,5% FeSO₄.7H₂O; 0,16% CoCl₂.5H₂O; 0,16% CuSO₄.5H₂O; 0,11% Na₂MoO₄.4H₂O; 5% Na₂EDTA.

Solução de lavagem de micélio:

0,6 M MgSO_4

DSPS:

1,1 M KCl; 0,1 M ácido cítrico; 1 M KOH; pH 5,8.

STC 50:

1,2 M sorbitol; 50 mM CaCl_2 ; 50 mM Tris-HCl; pH 7,5.

PEG 60%:

PEG 4000 em STC 50.

Meio de regeneração e seleção:

1,2 M de sorbitol em meio mínimo ágar acrescido de piridoxina.

Gel de poliacrilamida 15%:

Poliacrilamida 30%; 1,5 M TRIS pH 8,8 / 1 M TRIS pH 6,8; SDS 10%; persulfato de amônio 10%; TEMED; diluído em água.

APÊNDICE B – CÁLCULOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os cálculos de atividade enzimática foram feitos por meio da fórmula abaixo:

$$\text{Atividade específica} = \frac{(A_{500\text{nm}}^{\text{teste}} - A_{500\text{nm}}^{\text{branco}}) \times (\text{Volume de reação})}{(\epsilon(Q)) \times (L) \times (T) \times (P)} \times 2$$

Onde:

$A_{500\text{nm}}$: absorvância a 500 nm;

$\epsilon(Q)$: coeficiente de extinção molar da quinoneimina a 500 nm ($12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

L: caminho ótico (0,526 cm);

T: tempo de reação (min);

P: quantidade de proteína na reação (mg).

Ao final, os dados foram multiplicados por 2 porque os cálculos levam em consideração a quantidade de quinoneimina formada. No entanto, para formar 1 molécula de quinoneimina é necessário 2 moléculas de H_2O_2 .

Abaixo está mostrado o princípio da reação:

APÊNDICE C – PUBLICAÇÕES

Durante o desenvolvimento da pesquisa, houve a elaboração e publicação do capítulo de livro intitulado “*The use of synthetic biology tools in biorefineries to increase the building blocks diversification*”, que foi incluído no livro “*Advances in sugarcane biorefinery: technologies, commercialization, policy issues and paradigm shift for bioethanol and by-products*” pela editora Elsevier, em 2018.

Chapter 3

The Use of Synthetic Biology Tools in Biorefineries to Increase the Building Blocks Diversification

André T.V. Hermann, Aline L. Gonçalves, Josman Velasco,
Bianca Oliva, Awana da Silva Lima, Bruno A. França,
Gislene Ferreira, Evandro J. Mulinari,
Carlaile F. de Oliveira Nogueira and Fernando Segato
Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

ANEXO A – CURVA PADRÃO DE BSA

Curva padrão de BSA utilizada para a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.

Figura A1. Curva padrão de BSA.

¹ Dados obtidos de Josman Velasco do laboratório de Biologia Molecular e Sintética (SYMBLab) do Departamento de Biotecnologia da USP - EEL, 2017.

ANEXO B – CURVA PADRÃO DE GLICOSE

Curva padrão de glicose utilizada para quantificar os açúcares redutores liberados durante a hidrólise do bagaço de cana pelo método de DNS.

Figura B1. Curva padrão de glicose.

¹ Dados obtidos de Bruno Alves da França do Laboratório de Biologia Molecular e Sintética (SYMBLab) do Departamento de Biotecnologia da USP - EEL, 2017.

ANEXO C – ORGANIZAÇÃO GÊNICA

Organização gênica do gene THITE_2106069 que codifica a enzima TtXylO, localizado entre a região de 40.268 e 42.264 bp.

```

40068 TCCAGGGGCGCGCGGACGGCACATTGCAGTAGTAAGGATCCGTCCGCACCTCCAACATATACAGACAGTT 40137
40138 GTGGGGGTTGGGGGGGTTGGCTGGGGGAGGGTGGTCCAGATAGGTTACGGCTAACCGGAGGTATTGATTG 40207
40208 CTCCGCGCCCGACGCTAAATTAGCCACGCAATATGATGATGTATCAGCGGTGTGGGCTGAGTGACAAATCA 40277
40278 TCTGTAAACCCCGTGTTTTTCGAGCCTCAGCGGAGCGCCTTCTCAGCGGCAGGCGCCCGAAGGCCAAGAA 40347
40348 CACTTAAACTGACTGGTTCTCGCCATGCGGTGAGGCGAGTGAGCAAGCTTCCCTGTGGGTCTCACCACC 40417
40418 AAGAAAGACGCAATTGTCCGAGTCTCACACGTGAGCGCCATGTTGGTTCCCTTCGCCTTCGCCGTGGCGG 40487
40488 CGGCCCTGGCCGCTGCTGATCCGCTGGCCAAGAGAGCCGCCATCGACGACTGTCTGAGCGCGCCAAGGT 40557
40558 CCCCGTGGACACGCCGACTCGGACGAGTGAAGACCGACGCCAACCCTTCAACCAGAGGCTGCCCTAT 40627
40628 ACCCGGGTTGCTATCGCCGTCCCGACACCGCGGAGCACATCCAAGCCGCGCTCTCTGCGCCGCCCAGG 40697
40698 TGGCGCTCAAGGTGAACCCAAAGGCCGGCGGGCACAGCTATGCATCGTTTGGTCTTGGCGGGGAAGATGG 40767
40768 CCACTCTCGTGGTTGAGCTGACCGCATGGACAATGTGACGCTGGACTCGACGACCCAAATCGCGACGGTC 40837
40838 CAGCCCGGAGCACGCTGGGCCACGTGCGCCACCGTTCTGTACGAGCAAGGAAAGCGGGCGTTTCAGCCACG 40907
40908 GGACTGCCCGAGGTACACACCATAGACGCTCCCTGCTCATGCTGTCTTGCCTTGCCTTCCCTGCAAGT 40977
40978 GGCTGACGTCGGATCGCTGATCAGACCGTGGGAGTGGCCGGTCATTCTTTGCACGCGCGGCTTTGGCTTTA 41047
41048 CCTCGCATTTGCCATGGGCTGGCTCTGGATTGGATCGCCGGGTGACCGTCTGCTGCTCGCAACGCTACCGT 41117
41118 GGTGAACGCTTCCGAGACCGAGAACCCGGACCTCTTCTGGGCGCTGCGCGGCGCCGGTTCCAACCTCGGC 41187
41188 ATCGTGGCATCCTTTTCAGTCAAGACATTGCTGCGCCGTCCCTGGTCACCACGTTCCAAGTCGATTGTC 41257
41258 CCTGGAAGAATGCTTCCTCGATCGCGTCAGGCTGGGCGAAGCTCCAGGACTGGGTCAAGACCGACATGCC 41327
41328 CAAGGAGCTAAACATGCGAATCCTCGGCAACTCGTATCAGACCCAACTCCAAGGCTGTACTACGGCAAC 41397
41398 TCGAGCGCCTGCAGAGCGCCATGCAGCCTATCCTCAGCAAGCTCGGCGCAAGCTGTCCGACACGGAGG 41467
41468 AATCCGACTGGATGGACGCCCTTCGCGCACTACGCTACAGCCGACGATCGACATCACGGGTCCGTATAA 41537
41538 CGCGGTAAGTTCGGCCCTACGTCGCTTTTCCTGCGCAGCATCGCGGCTCGACAGGCTCGGCTCACACGG 41607
41608 ACCGGACAGGCCGAGACGTTCTACTCCAAGAGCTGGTCACCTCGGCGCTCCCGAGCAGCTGCTGCAGA 41677
41678 ATGTGTCCAACTACTGGGTGGAGAAGGCCCGGTCGAACAGCCGGGCTGTTACATCATCATCGACATGTT 41747
41748 CGGCGGCGCAACTCGGCCGTACCAACGTCCTCCGCGAAGGCCAGTCTTTCGCATTCCGCGACCCCAAC 41817
41818 TACCTCTTCTGTACGAGTCTTACGACCGAGTCTACTTCGGATCTTACCCGTCCAACGGCTTCTCGTTCC 41887
41888 TCGACGACTGGGTCAACATCTTCACCAGCGGCTGAACACCACGCAATGGGGCATGTACATCAACTACGC 41957
41958 CGACCCGGCCATGAGCCGGGCCAGGCCGAAGAGGTGTACTACAGGCAGAACCTGCCTCGGCTCAAGCAG 42027
42028 CTCAAGAAGCAGCTGGACCCACCCAGCTCTTCGACTACCCGAGGCCATTGATCCGACCACGGCATGAT 42097
42098 CGTGTGAGTATCCGGGCTACGTGCTTAGGTACATTCATCATGTGATGTGCGTTGTAATACTTACGCCAC 42167
42168 CTGTGTGAGGCGGGGGTTGCCGCCCGGATAAGGTGGATGCAGTGGTGTAAAGTGGAACAAGCAGGGTAG 42237
42238 ATCAAAGTTGAAATTGAAAATGCAGCCGATCTCAGACGCACAGCTGATTATTGCGACCCCTGATGCCGC 42307
42308 CACAAGCGCCCGCAACGAACGAGTAAGTGCAGGCATGATTGACTATTATAGTCATTCATTTTCGATGGC 42377
42378 ATTTAGAAATCCATCCATAACAGGAAATTGGGGACATATCTGAAAGCGCCAAGATCAGAACGCTGTGCCG 42447
42448 TTCCCGGCCAGCGCCGT 42464

```

Fonte: JGI MycoCosm.

Legenda:

TCCAG: regiões regulatórias upstream e downstream;

GTGAC: regiões 5'- e 3'-UTR;

ATGTT: regiões codificantes (éxons);

GTACA: região não codificante (introns)

ANEXO D – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA ENZIMA

Abaixo está apresentado a sequência de aminoácidos da enzima XylO (XP_003648522.1). O peptídeo sinal nativo da enzima encontra-se sublinhado na sequência.

MLVPFAFAVAAALAAADPLAKRAAIDDCLSAAKVPVDTPDSDEWKTDANPFNQRLPYTPVAIAV
PTTAEHIQAAVSCAAQVGKVNPKAGGHSYASFGLGGEDGHLVVELDRMDNVTLDSTTQIATV
QPGARLGHVATVLYEQGKRAFSGTCTPGVGVAGHSLHGGFGFSSHLHGLALDWIAGVTVVLA
NATVVNASETENPDLFWALRGAGSNFGIVASFQKTFAAPSLVTTFQVDLPWKNASSIASGWA
KLQDWVKTDMPKELNMRILGNSYQTQLQGLYYGNSSALQSAMQPILSKLGAKLSDTEESDWM
DAFAHYAYSPTIDITGPYNAAETFYSKSLVTSALPSSVLQNVSNYWVEKARSNSRAWYIIIDMFG
GANSVNTNVPANATSFARDPNYLFLYEFYDRVYFGSYPSNGFSFLDDWVNIFTSGLNITTQW
GMYINYADPAMSRAQAEEVYYRQNLPRKQLKKQLDPTQLFDYPQAIDPTTA

Fonte: NCBI

Número de aminoácidos: 493

Peso molecular: 53.527,13 Da

pI: 5.27

ANEXO E – COMPOSIÇÃO DOS BAGAÇOS

Composição dos bagaços de cana de açúcar pré-tratados hidrotermicamente por 10 e 20 minutos:

Tabela E1 - Composição dos bagaços de cana de açúcar pré-tratados.¹

Bagaço pré- tratado por:	Média dos componentes (%)							
	Lignina	Glucana	Xilana	Arabinosil	Acetil	Extrativos	Cinzas	Total
10 min	26,26 ± 0,18	47,00 ± 1,0	16,05 ± 0,35	0,78 ± 0,02	2,21 ± 0,04	0	0	92,03 ± 1,53
20 min	27,87 ± 0,22	49,25 ± 0,56	13,06 ± 0,10	0,68 ± 0,005	1,81 ± 0,07	0	0	92,87 ± 0,78

¹ Dados obtidos de Fernando Segato do Laboratório de Biologia Molecular e Sintética (SYMBLlab) do Departamento de Biotecnologia da USP – EEL, 2017.