

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

EVANDRO JOSÉ MULINARI

Análise do secretoma do fungo termofílico *Thermothielavioides terrestris*: prospecção, expressão heteróloga e caracterizações biofísicas e bioquímicas de algumas enzimas

São Carlos
2019

EVANDRO JOSÉ MULINARI

Análise do secretoma do fungo termofílico *Thermothielavioides terrestris*: prospecção, expressão heteróloga e caracterizações biofísicas e bioquímicas de algumas enzimas

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. João Renato Carvalho
Muniz
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2019

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.

Mulinari, Evandro José

Análise do secretoma do fungo termofílico
Thermothielavioides terrestris: prospecção, expressão heteróloga e caracterizações biofísicas e bioquímicas de algumas enzimas / Evandro José Mulinari; orientador João Renato Carvalho Muniz; co-orientador Fernando Segato - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

171 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Thermothielavioides terrestris. 2. Secretoma. 3. Expressão heteróloga. 4. Bagaço de cana-de-açúcar. I. Muniz, João Renato Carvalho, orient. II. Segato, Fernando, co-orient. III. Título.

Aos meus pais Marisete e Valdecir com amor, admiração e gratidão por me amarem, apoiarem incansavelmente, serem meu porto seguro e exemplo durante toda a minha vida.

Aos meus avós, Alice (*in memoriam*) e Eugênio, Rosa e Nédio pelo amor e exemplo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marisete e Valdecir, aos meus avôs Rosa e Nédio e Alice (*in memoriam*) e Eugênio pelo amor, pelos ensinamentos, pelo constante amparo, dedicação e incentivo.

Ao Prof. Dr. João R. Carvalho Muniz e ao Prof. Dr. Fernando Segato pela convivência, ensinamentos, orientação e oportunidades, que muito contribuíram com meu desenvolvimento científico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Otávio H. Thiemann, ao Prof. Dr. Richard C. Garrat ao Prof. Dr Eduardo Horjales pelos ensinamentos, oportunidades e pela estrutura do Laboratório de Biologia Estrutural.

Aos Técnicos Dra. Susana A. S. Beozzo e Dr. Humberto Pereira pela convivência, ensinamento, suporte e amizade durante todo o período e realização dos experimentos.

Às técnicas Dr. Andressa P. A. Pinto, Derminda I. de Moraes e Dr. Rafael S. Panhota pelos ensinamentos e suporte durante a realização dos experimentos.

À Dr. Tatiana Watanabe pela convivência, ensinamentos, orientação e amizade.

Aos integrantes e amigos dos laboratórios de pesquisa do IFSC e EEL pela convivência e solicitude.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela estrutura, excelência e oportunidade de realização do doutorado. Ao Laboratório e Biologia Estrutural, ao Grupo de Biofísica Molecular e aos laboratórios vizinhos pela estrutura e apoio.

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena USP pela estrutura e oportunidade para realização de experimentos. Ao Laboratório de Biologia Molecular Sintética pela estrutura, suporte e acolhimento durante todas as etapas.

Aos funcionários da biblioteca do IFSC pela assistência e esmero à correção da tese, aos da Secretaria de Pós-Graduação e do Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar pelo apoio constante, aos da Seção Técnica de Informática e Gráfica pelo excelente serviço prestado.

À CAPES pela bolsa de doutorado (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001). À FAPESP pelo projeto financiado (2017/16291-5).

À Gislene Ferreira e à Luísa G. T. Anastácio pela amizade, generosidade e acolhimento.

À Mellina Y. Calori e ao Paulo J. S. Prieto pela amizade, companhia e apoio.

A todos os meus amigos que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, que entre alegrias e tristezas sempre foram presentes, carinhosos e me ajudaram, apoiaram, fazendo a vida valer mais a pena.

“Se quer seguir-me, narro-lhe; não uma aventura, mas experiência, a que me induziram, alternadamente, séries de raciocínios e intuições. Tomou-me tempo, desânimos, esforços.

Dela me prezo, sem vangloriar-me.”

Guimarães Rosa

RESUMO

MULINARI, E. J. **Análise do secretoma do fungo termofílico *Thermothielavioides terrestris*: prospecção, expressão heteróloga e caracterizações biofísicas e bioquímicas de algumas enzimas.** 2019. 171p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O desenvolvimento de enzimas que apresentam maior estabilidade térmica pode tornar o processo de hidrólise de biomassa mais econômico pelo aumento na taxa de hidrólise, diminuição da contaminação dos reatores e maior transferência de massa pela redução da viscosidade do meio. Dessa forma, foram conduzidos experimentos para prospecção e detecção de proteínas presentes no secretoma do fungo termofílico *Thermothielavioides terrestris* cultivado em diferentes fontes de carbono: bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (SCBIN), explodido à vapor (SCBSE) e polpa Kraft branqueada de eucalipto (BEKP), utilizando a técnica de LC-MS/MS. As análises mostraram uma hidrolase de glicosídeo da família 3 (GH3) como a maior constituinte do secretoma em BEKP e uma GH7 contendo módulo de ligação ao carboidrato da família 1 para SCBSE e SCBIN. O conteúdo proteico em SCBIN mostrou um repertório de hemicelulases que representaram 8% do total da contagem de espectros normalizados em comparação a 4% em BEKP e SCBSE, refletindo o efeito da composição da biomassa na regulação das proteínas secretadas. As análises também revelaram a presença de mecanismos oxidativos na degradação da biomassa. A primeira componente da análise de PCA das CAZymes revelou que SCBSE e SCBIN são correlacionados negativamente e que o SCBSE é caracterizado pela intensa remodelagem da parede celular, o que parece estar relacionado a intensa atividade secretória, indicando que o SCBSE possui potencial como meio de autoindução. Em contrapartida, retém muitas enzimas adsorvidas, o que pode ser não produtivo como matéria-prima para obtenção de monossacarídeos. A análise estatística apontou as enzimas diferencialmente secretadas no secretoma e que foram escolhidas para expressão heteróloga. As enzimas TtCel7.2 e TtCel7.3 secretadas em fungo filamentoso e as enzimas TtβXil43, TtAraf54, Tex e TtGal5 expressas em bactéria exibiram temperatura ótima acima de 50 °C e pH ligeiramente ácido. TtCel7.2 e TtCel7.3 exibiram diferenças de atividade e estabilidade térmica com 80% de atividade após 3 horas de incubação à 65 °C.

Palavras-chave: *Thermothielavioides terrestris*. Secretoma. Expressão heteróloga. Bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

MULINARI, E. J. **Secretome analysis of thermophilic fungus *Thiëavia terrestris*: prospecting, heterologous expression and biophysical and biochemical characterization of some enzymes.** 2019. 171p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The development of enzymes that present higher thermal stability, reduce the chances of reactor contamination, increase the hydrolysis rate and intensify the mass transfer by decreasing the viscosity of the medium, favoring a more economical process. Thus, experiments were conducted for the prospecting and detection of proteins present in the secretome of thermophilic fungus *Thermothielavioides terrestris* grown in different carbon sources, such as sugarcane bagasse *in natura* (SCBIN), sugarcane bagasse steam exploded (SCBSE) and bleached eucalyptus Kraft pulp (BEKP) using the LC-MS/MS technique. Analyzes showed one glycoside hydrolase of family 3 (GH3) as the major constituent of the BEKP secretome and one GH7 containing CBM1 in SCBSE and SCBIN. The protein content of the SCBIN condition showed a broad range of hemicellulases, that representing 8% of the total normalized spectra count (NTSC) compared to 4% in BEKP and SCBSE, it reflecting the effect of biomass composition on the regulation of secreted proteins. The analyzes also revealed a proportional content of cellulases and auxiliary activities (AAs), what reveal the presence of oxidative mechanisms in this microorganism during biomass degradation. The first component of PCA analysis of CAZymes revealed that SCBSE and SCBIN are negatively correlated and that SCBSE is characterized by intense cell wall remodeling, which appears to be related to intense secretory activity, indicating that SCBSE has potential as an auto induction media for CAZymes. Statistical analysis indicated the enzymes differentially expressed in the secretoma and that were chosen for heterologous expression later. TtCel7.2 and TtCel7.3 enzymes expressed in filamentous fungus and Tt β Xil43, TtAraf54, Tex and TtGal5 enzymes expressed in bacteria exhibited optimum temperature above 50 ° C and slightly acidic optimum pH. TtCel7.2 and TtCel7.3 exhibited differences in activity and thermal stability with 80% residual activity after 3 hours of incubation at 65 ° C.

Keywords: *Thermothielavioides terrestris*. Secretome. Heterologous expression. Sugarcane bagasse.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Exemplos de interações planta-micróbio nas quais os LPMOs estão envolvidos. (A) Fungos saprófitos que degradam um tronco de madeira. (B) Degradação de frutos por mofo cinza. C) Larvas de uma vespa de madeira alimentando-se de uma árvore assistida por simbioses microbianos. (D) Corte transversal de uma raiz com fungos ectomicorrízicos envolvidos na degradação da matéria orgânica do solo. (E) A luz solar impulsiona o armazenamento de energia e CO₂ no tecido vegetal fotossintético e também pode modular processos destrutivos através da transferência de elétrons fotoinduzida. (F) Uma molécula representativa de LPMO. 31
- Figura 2- Componentes da parede celular podem ser transformados cataliticamente a uma gama de intermediários de combustível e subsequentemente hidrocarbonetos líquidos. 33
- Figura 3- A unidade básica da arquitetura da parede celular da cana-de-açúcar. Microfibrilas (canto superior direito: cerca de 36 moléculas de celulose embaladas na forma de uma estrutura cristalina) são montadas em sete feixes, formando uma microfibrila. 35
- Figura 4- Representação de arabinoxilano hipotético. Cadeia principal de 1,4- β -xilano substituídos por porções únicas e/ou duplas de α -L-arabinofuranosídeo; reticulados covalentemente com lignina ou por meio de uma ligação cruzada diferuloil entre cadeia de arabinoxilano. 36
- Figura 5- Principais unidades da lignin presente no bagaço e na palha da cana-de-açúcar. FA: porções feruladas (estereificada com hemiceluloses); H: unidade p-hidroxifenil; G: unidade guaiacil; S: unidade siringil; S': unidade siringil oxidada contendo um grupo carbonila no C α 37
- Figura 6- Esquema de degradação completa da celulose. CDH: celobiose desidrogenase; AA9: monoxigenase lítica de polissacarídeo que atuam no C4 ou C1 da ligação β -1,4; CBM: módulo de ligação à celulose; CBH1: celobiohidrolase de

terminais redutores; CBH1: celobioidrolase de terminais não-redutores. EG: endoglucanase. 46

- Figura 7- Imagens confocais dos protoplastos da cepa de *Trichoderma reesei* expressando RBGL (β -glucosidase fusionada com DsRed; Vermelho) e corados com corante de membrana e parede celular (colesterol-PEG-FITC; Verde). *Green*: verde; *Red*: vermelho; *Merged*: combinado; *Enlarged*: ampliado. 49
- Figura 8- Colônias de *T. terrestris*. Da esquerda para direita em ágar de aveia, de milho e de extrato de malte 50
- Figura 9- Perfil das proteínas livres e adsorvidas à biomassa secretadas pelo fungo *T. terrestris* durante os dias de cultivo nas diferentes fontes de carbono. A) SCBIN. B) SCBSE. C) BEKP 61
- Figura 10- A) Taxa de degradação da biomassa por quantidade de proteína secretada. B) Atividade de proteases secretadas em azocaseína em função da fonte de carbono. 62
- Figura 11- SDS-PAGE do secretoma de cada tipo de cultivo. 63
- Figura 12- Temperatura ótima de cada secretoma frente a biomassa de onde foram extraídas. 64
- Figura 13- Painel de substratos do secretoma do *T. terrestris* produzido na presença de a) BBEKP, b) SCBSE e c) SCBIN. Os asteriscos representam na análise post-hoc da ANOVA os valores de atividade com $p > 0,05$ entre as atividades dos coquetéis em um dado substrato, significando que a hipótese alternativa: existe diferenças entre as atividades dos secretoma em um dado substrato foi rejeitada. 65
- Figura 14- Distribuição das diferentes funções moleculares das proteínas identificadas no secretoma do *T. terrestris*. As CAZymes foram separadas do agrupamento inicial de atividade e incluídas segunda suas classes CAZy. As divisões dentro de cada agrupamento colorido indicam os domínios relacionados àquela

função. O retângulo “Função molecular” reúne funções não determinadas; GEF: do inglês, *Guanine nucleotide Exchange Factors*; SSDB: do inglês, *Sequence-Specific DNA Binding*. 66

Figura 15- Diagrama de Venn. a) Secretoma total; b) CAZymes totais; c) CAZymes organizadas por domínio de polissacarídeo. 67

Figura 16- NTSC das CAZymes diferencialmente secretadas entre os secretomas. Os retângulos coloridos representam os principais domínios polissacarídicos de atividade das enzimas. 70

Figura 17- *Biplot* de correlação da análise de PCA das enzimas com $\cos^2 > 0,75$ de acordo com o secretoma de origem. Principal domínio de atividade, C: celulose; H: hemicelulose; P: pectina; F: FCW 71

Figura 18- *Heatmap* das CAZymes diferencialmente secretadas e renormalizadas na escala de -1 a 1 dentro de cada relicada. Principal domínio de atividade, C: celulose; H: hemicelulose; P: pectina; F: FCW 78

Figura 19- Mecanismo de degradação da parede celular da cana de açúcar¹⁴ proposto para o fungo *T. terrestris*. O fungo degrada todas as partes da parede celular ao mesmo tempo de forma equilibrada e utiliza as esterases de carboidrato para ter acesso a porção recalcitrante conferida pelas ligações esteres cruzadas do arabinoxilano. A ácido celobiônico fosforilase (GH94) catalisa a conversão reversível intracelular de ácido celobiônico em glicose fosfato e ácido D-glucônico, onde são convertidos em metabólitos secundários e direcionados para vias como a glicólise e a via das pentoses fosfato. A utilização de compostos oxidados pode indicar uma vantagem evolutiva dos organismos celulolíticos/oxidativos, pois esses produtos são inibidores de CBH e β -glicosidases. 80

Figura 20- Uma olhada em uma célula eucariota para ver como as proteínas são produzidas. O DNA no núcleo é "lido" pela RNA polimerase e, em seguida, os ribossomos no citoplasma produzem uma cadeia de aminoácidos que se dobra em uma proteína funcional. 83

- Figura 21- Gel de agarose da amplificação do gene com as extremidades para clonagem tipo Gibson da A) TtCel7.2: 1336 pb e TtCel7.3: 1079 pb. B) Padrão de massas de DNA 97
- Figura 22- SDS-PAGE do perfil de secreção dos transformantes *A. nidulans* A773 pyrG⁺, em que a coluna “0” de ambos os géis corresponde ao transformante com vetor vazio; A) transformantes de 1 a 8 contendo vetor com gene da TtCel7.2; B) transformantes de 1 a 8 contendo vetor com gene da TtCel7.3. MM: Massa molecular em kDa. 98
- Figura 23- Lista de peptídeos identificados por LC-MS/MS. Em vermelho são os peptídeos identificados e que correspondem com os peptídeos da sequência das proteínas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 com 45% e 58% de cobertura, respectivamente. 99
- Figura 24- Perfil SDS-PAGE das frações eluídas com aumento gradativo da concentração de NaCl da purificação da A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 com resina de DEAE Sepharose CL6B. MM: Massa molecular em kDa; 0, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 representam a concentração em mM de NaCl. 99
- Figura 25- Cromatograma de unidades de absorção (sigla em inglês, AU) em 280 nm da eluição (mL) em coluna *HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR* das frações contendo as proteínas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 após purificação por DEAE Sepharose CL6B e C) SDS-PAGE das frações (F) dos picos cromatográficos. MM: Massa molecular em kDa. 100
- Figura 26- Espectros de dicroísmo circular experimental e reconstruído da A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 102
- Figura 27- Curvas de transição térmica com monitoramento da elipticidade em 222 nm da A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 103
- Figura 28- Distribuição da massa molar e sobreposição de cromatogramas de dispersão de luz (raio de Rayleigh) e índice de refração diferencial (dRI) em função do volume de eluição das amostras A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3. 103

- Figura 29- Alinhamento dos modelos estruturais da TtCel7.2 (magenta) e da TtCel7.3 (verde). A) vista de frente do sítio de interação com o substrato e B) Rotação de 90° em torno do eixo vertical. 108
- Figura 30- Superfície eletrostática gerada pela ferramenta *APBS Electrostatics* do Pymol dos modelos das enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3. As cores representam o potencial eletrostático da superfície molecular. entre -5 e +5 kT/e. 109
- Figura 31- Atividade relativa em função do pH das enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3. Os asteriscos indicam que pela análise estatística de *post hoc* não existe diferença significativa de atividade entre o pH ótimo (com maior valor médio de atividade relativa) e aqueles pHs. 110
- Figura 32- Atividade relativa da A) TtCel7.2 e da B) TtCel7.3 em função da temperatura. Os asteriscos indicam que pela análise estatística de *post hoc* não existe diferença significativa de atividade entre a temperatura ótima (com maior valor médio de atividade relativa) e aquelas temperaturas. 111
- Figura 33- Atividade residual após incubação por diferentes períodos e temperaturas das enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3. 112
- Figura 34- Efeito da presença de aditivos na reação enzimática da TtCel7.2 a 60 °C por 5 min. A) Concentração de íons na reação de 0,5 mM (exceto quando especificado). B) Concentração 20x maior do que em A) (exceto quando especificado). Os retângulos coloridos indicam quais aditivos tiveram efeito significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *post hoc*. 114
- Figura 35- Efeito da presença de aditivos na reação enzimática da TtCel7.3 à 50 °C por 10 min. A) Concentração de íons na reação de 0,5 mM (exceto quando especificado). B) Concentração 20x maior do que em A) (exceto quando especificado). Os retângulos coloridos indicam quais aditivos tiveram efeito significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *post hoc*. 115
- Figura 36- Regressão linear da formação de extremidades redutoras (glicose equivalente) por minuto para cálculo da atividade específica. A) TtCel7.2 em tampão

- citrato/fosfato pH 4,5 à 60 °C. B) TtCel7.3 em tampão citrato/fosfato pH 4,5 à 50 °C. 117
- Figura 37- Cinética de Michaelis-Menten para as enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 119
- Figura 38- A) Extração de RNA do *T. terrestris*. MM: Marcador molecular; 1: RNA total. B) PCR do gene da TtGH7.1 (1527 pb) com 10% do volume da solução com a amostra da reação de cDNA com a transcriptase reversa (+) e sem (-). C) Padrão de massas do marcador molecular. 122
- Figura 39- PCR dos genes na tabela 1. O primeiro poço de cada amplificação para clonagem tipo LIC corresponde ao marcador molecular (MM). Número de pares de bases (pb) de cada gene: AA9.1: 921; AA9.5: 687; TtGal5: 1230; GH5b: 1200; GH7.1: 1527; TtXin10A: 933; Tex: 1128; TtβXil43: 1743; TtAraf54: 1551. 123
- Figura 40- SDS-PAGE da purificação em coluna Ni-NTA das construções GH5a, GH5b, TtXin10A, Tex e TtβXil43. MM: massa molecular; bandas das enzimas recombinantes destacadas por um retângulo. 125
- Figura 41- SDS-PAGE da purificação em coluna de exclusão molecular das construções, TtGal5, Tex, TtβXil43 e TtAraf54 MM: massa molecular; bandas das enzimas recombinantes destacadas por um retângulo. 126
- Figura 42- Espectro de dicroísmo circular recalculado pela Dichroweb e experimental A) TtAraf54 e C) Tex. Curva de transição térmica com monitoramento em 222 nm da B) TtAraf54 e D) Tex. 127
- Figura 43- Alinhamento *T-Coffee* modo *M-Coffee* das sequências homólogas da TtAraf54. Exceto o PDB: 1WD3, as restantes são número de acesso *UniProtKB*. 130
- Figura 44- Alinhamento *T-Coffee* modo *Expresso* e representação da predição de estrutura secundária por *PROMALS3D*²³² das sequências homólogas da TtAraf54. Exceto o PDB: 1WD3, 3KMV e 3AKF, as restantes são número de acesso *UniProtKB*. As letras e representam folha-β; h representa hélice-α;

Conservation é a pontuação da conservação calculado pelo programa; *Consensus aa* é o aminoácido consenso na posição; *Consensus ss*: é estrutura secundária consenso presente na posição.

131

Figura 45- A) Alinhamento do modelo estrutural da TtAraf54 (cinza) com a estrutura 1WD4 de *A. kawachii* (rosa) com destaque (vermelho) das regiões não-conservadas do domínio ABD. B) Superfície eletrostática gerada pela ferramenta *APBS Electrostatics* do Pymol da B) TtAraf54 e da C) 1WD4. As cores representam o potencial eletrostático da superfície molecular entre -5 e +5 kT/e.

132

Figura 46- Resultado da predição de glicosilações O-ligadas pelo servidor *NetOGlyc* da sequência da TtAraf54. A região de aminoácidos não-conservados está indicada dentro do retângulo preto. SEQUENCE significa sequência; CARBOHYD significa carboidrato; POSITIVE significa que aquela sequência é positiva para a presença de carboidrato.

134

Figura 47- Alinhamento *T-Coffee* modo *M-Coffee* das sequências homólogas da TtβXil43. Os retângulos em amarelo indicam os aminoácidos conservados do sítio catalítico: nucleófilo: aspartato (D) e doador de próton: glutamato (E). As sequências homólogas estão identificadas pelo número de acesso *UniProtKB*.

135

Figura 48- Resultado da predição de O-glicosilações pelo servidor *NetOGlyc* da sequência da Tex. A região não-conservada está indicada dentro do retângulo preto. SEQUENCE significa sequência; CARBOHYD significa carboidrato; POSITIVE significa que aquela sequência é positiva para a presença de carboidrato.

137

Figura 49- Alinhamento de estrutura com destaque para os resíduos do subsítio -2 e -1: Tex em azul com resíduos em -2: Gln, -1: Trp e Ile. PcXil10 em laranja com -2: Tyr, -1: Trp e Ile. Cex em cinza com -2: Gln, -1: Trp e Val.

138

Figura 50- A) Alinhamento global identificando os pares de interação (traço vermelho) da Cex (*C. fimi*) e da CmXil10 (*C. mixtus*). B) Alinhamento das estruturas da Cex (verde), CmXil10 (laranja) e Tex (azul). 139

Figura 51- Perfil de pH ótimo das enzimas recombinantes. A: TtAraf54; B: TtβXil43; C: Tex na presença de 2Cl-4NF-G₂; D: Tex na presença de xilano. Condições do ensaio de pH ótimo: temperatura de 50 °C. 143

Figura 52- Temperatura ótima das enzimas recombinantes. A: TtAraf54; B: TtβXil43; C: Tex na presença de 2Cl-4NF-G₂; D: Tex na presença de xilano. Condições do ensaio: citrato/fosfato em pH ótimo de cada enzima. 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Temperatura e estabilidade de celulasas termoestáveis de fungos termofílicos e mesofílicos	42
Tabela 2-	Valores do espectro total normalizado (NTSC) e o número (n.) de enzimas tipo CAZyme separado por domínio de ação e por tipo de cultivo. AAs: enzimas de atividade auxiliar; FCW: enzimas que atuam em parede celular de fungo.	68
Tabela 3 -	Classificação das proteínas mais secretadas pelo <i>T. terrestris</i> .	69
Tabela 4-	Lista de oligonucleotídeos iniciadores dos genes de escolha, DNA molde e plasmídeo e tipo de clonagem. Vetor e insertos com extremidade de sobreposição para montagem tipo Gibson em letras minúsculas.	86
Tabela 5-	Lista de oligonucleotídeos iniciadores dos genes de escolha, DNA molde, plasmídeo e tipo de clonagem. Vetor Champion pET SUMO/TA utiliza clonagem tipo TA (pareamento timina e adenina) e o plasmídeo pETTrx-1a/LIC usa clonagem independente de ligação com extremidade de sobreposição (letras minúsculas).	89
Tabela 6-	Parâmetros teóricos da sequência primária após clivagem do peptídeo sinal e predição de sítios de glicosilação.	97
Tabela 7-	Dados de deconvolução dos espectros de CD de 280 a 190 nm utilizando o servidor Dichroweb das enzimas TtCel7.2 e TtCel7.3.	101
Tabela 8-	Medidas de massa molecular experimentais e teóricas de acordo com o estado oligomérico.	104
Tabela 9-	Relação da atividade relativa das enzimas recombinantes nos diferentes substratos testados nas condições de pH e temperatura ótimos. TtCel7.2: pH 4,5 e 60 °C; TtCel7.3: pH 4,5 e 50 °C.	106
Tabela 10-	Dados de massa de proteína das construções escolhidas	124

Tabela 11- Dados de deconvolução dos espectros de CD de 280 a 190 nm utilizando o servidor Dichroweb. 128

Tabela 12- Painel de substratos das enzimas TtAraf54, Tt β Xil43, Tex, TtGal5 à 50 °C e tampão citrato/fosfato pH 4,5. 129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2C-4NF-G ₂	2-cloro-4-nitrofenil-celobiosídeo
4NF	4-nitrofenil
4NF-G ₂ ,	4-nitrofenil-celobiosídeo
4NF-X ₂	4-nitrofenil-xilobiosídeo
AA	do inglês, <i>auxiliary activities</i>
ABD	do inglês, <i>arabinose binding domain</i>
AG	Arabinogalactano I
ANOVA	do inglês, <i>analysis of variance</i>
Araf	arabinofuranosídeo
Arap	arabinopiranosídeo
BEKP	do inglês, <i>bleached eucalyptus kraft pulp</i>
BG	β-glucosidase
BLASTP	do inglês, <i>basic local alignment search tool - protein</i>
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
CAZY	do inglês, <i>carbohydrate active enzymes database</i>
CAZymes	do inglês, <i>carbohydrate-active enzymes</i>
CBH I	CBH de terminal não-redutor
CBH II	CBH de terminal redutor
CBM	do inglês, <i>carbohydrate-binding module</i>
CD	do inglês, <i>circular dichroism</i>
CDD	do inglês, <i>conserved domain database</i>
CDH	celobiose desidrogenase
<i>cDNA</i>	do inglês, <i>complementary DNA</i>
CE	do inglês, <i>carbohydrate esterases</i>
CID	do inglês, <i>collision-induced dissociation</i>
CMC	carboximetil celulose
CRISPR/Cas9	do inglês, <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9</i>
D.O.	densidade óptica
dATP	do inglês, <i>deoxyadenosine triphosphate</i>
DMSO	do inglês, <i>dimethyl sulfoxide</i>

DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNF-G ₂	dinitrofenil celobiosídeo
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTP	do inglês, <i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
DTT	ditiotreitól
dTTP	do inglês, <i>Deoxythymidine triphosphate</i>
EC	do inglês <i>enzyme commission</i>
EDTA	do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EG	etilenoglicol
ESTs	do inglês, <i>expressed sequence tags</i>
FCW	do inglês, <i>fungus cell wall</i>
FDR	do inglês, <i>false discovery rate</i>
FT-MS	do inglês, <i>fourier-transform mass spectrometry</i>
FWHM	do inglês, <i>full width at half maximum</i>
GalNAc	do inglês, <i>N-acetylgalactosamine</i>
Galp	galactopiranosídeo
GAPDH	do inglês, <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
gDNA	do inglês, <i>genomic DNA</i>
GEF	do inglês, <i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GH	do inglês, <i>glycoside hydrolases</i>
GHnc	do inglês, <i>glycoside hydrolase non classified</i>
Glu	glucose
GMC	do inglês, <i>glucose-methanol-choline</i>
GMQE	do inglês, <i>global model quality estimation</i>
GO	Do inglês, <i>Gene Ontology</i>
GPI	do inglês, <i>glycosylphosphatidylinositol</i>
GST	glutathione S-transferase
HP	do inglês, <i>hypothetical protein</i>
HPLC	do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
iRNA	RNA de interferência
Kcat	do inglês, <i>Turnover number</i>
KEGG	do inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
K _M	constante de Michaelis-Menten

KO	do inglês, <i>KEGG orthology</i>
LB	Luria-Bertani
LC-MS/MS	do inglês, <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LIC	do inglês, <i>ligation independent cloning</i>
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LPMO	do inglês, <i>lytic polysaccharide monooxygenase</i>
Man	manose
MIPS:	do inglês, <i>monoisotopic precursor selection</i>
mRNA	RNA mensageiro
NCBI:	do inglês, <i>National Center For Biotechnology Information</i>
NeuAc	do inglês, <i>N-acetylneuraminic acid</i>
Ni-NTA	níquel-nitrilotriacético
NMR	do inglês, <i>nuclear magnetic resonance</i>
NTSC	do inglês, <i>Normalized Total Spectrum Count</i>
PAD	do inglês, <i>pro-oxidant, antioxidant, and detoxification</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAS	do inglês, <i>periodic acid-Schiff</i>
PCA	do inglês, <i>principal component analysis</i>
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polietilenoglicol
PGK	do inglês, <i>phosphoglycerate kinase</i>
pI	ponto isoelétrico
PNGase F	do inglês, <i>peptide-N-glycosidase F</i>
<i>RefSeq</i>	do inglês, <i>reference sequence database</i>
RNA	do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
<i>RNA-Seq</i>	do inglês, <i>RNA-Sequencing</i>
SAARs	do inglês, <i>single amino acids repeats</i>
SCBIN	do inglês, <i>sugarcane bagasse in natura</i>
SCBSE	do inglês, <i>sugarcane bagasse steam exploded</i>
SDS	Sódio dodecil sulfato
SEC-MALS	do inglês, <i>size exclusion chromatography - multi angle light scattering</i>
SOD	superóxido dismutase
SSDB	do inglês, <i>sequence-specific DNA binding</i>

TCA	do inglês, <i>trichloroacetic acid</i>
TEV	do inglês, <i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
T _m	do inglês, <i>melting temperature</i>
UTR	do inglês, <i>untranslated region</i>
V _{max}	velocidade máxima
Xil	xilose

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I: Enzimas de Fungo Termofílico no Cenário da Bioenergia.....	31
1.1	BIORREFINARIAS	33
1.2	A BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	34
1.3	ESTRATÉGIAS PARA MITIGAR A RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	38
1.4	FUNGOS TERMOFÍLICOS	41
1.5	FERRAMENTAS DE SEQUENCIAMENTO DE ÚLTIMA GERAÇÃO	43
1.6	HIDROLASES E OXIDASES DE CELULOSE.....	45
1.7	HEMICELULASES, PECTINASES E ENZIMAS ATIVAS EM LIGNINA	47
2	CAPÍTULO II: O Secretoma de <i>T. terrestris</i> Cultivado em Bagaço de Cana-de-açúcar	49
2.1	OBJETIVOS	51
2.1.1	Objetivos específicos	51
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.2.1	Linhagens, meios de cultura, fonte de carbono e reagentes	52
2.2.2	Condições de cultivo	53
2.2.3	Avaliação do secretoma durante os dias de cultivo.....	53
2.2.3.1	<i>Obtenção do secretoma.....</i>	53
2.2.3.2	<i>Concentração de proteínas totais do secretoma.....</i>	54
2.2.3.3	<i>Atividade de degradação da biomassa do secretoma.....</i>	54
2.2.3.4	<i>Atividade proteolítica do secretoma</i>	55
2.2.4	Composição e caracterização do secretoma mais eficiente	55
2.2.4.1	<i>Obtenção das amostras para composição do secretoma.....</i>	55
2.2.4.2	<i>Análise de peptídeo do secretoma por LC-MS/MS</i>	56
2.2.4.3	<i>Temperatura ótima do secretoma</i>	58
2.2.4.4	<i>Painel de substratos do secretoma</i>	58
2.2.5	Anotação, apresentação gráfica e análise estatística da composição e atividade do secretoma em diferentes biomassas	59
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
2.3.1	Caracterização bioquímica dos coquetéis enzimáticos	60
2.3.2	Análise da espectrometria de massas dos secretomas	65

2.3.3	Análise estatística e de agrupamento das CAZymes	69
2.4	CONCLUSÃO	81
3	CAPITULO III: Expressão heteróloga e Caracterizações Bioquímicas e Biofísicas de (Hemi) celulases de <i>T. terrestris</i>	83
3.1	OBJETIVOS	84
3.1.1	Objetivos específicos	84
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	85
3.2.1	Expressão heteróloga em fungo filamentoso e purificação das enzimas	85
3.2.1.1	<i>Linhagens, clonagem, transformação e meio de cultura</i>	85
3.2.1.2	<i>Expressão das proteínas recombinantes</i>	87
3.2.1.3	<i>Purificação</i>	88
3.2.2	Expressão em bactéria e purificação	88
3.2.2.1	<i>Linhagens, clonagem, transformação e meio de cultura</i>	88
3.2.2.2	<i>Expressão das proteínas recombinantes</i>	90
3.2.2.3	<i>Purificação</i>	91
3.2.3	Identificação por espectrometria de massas LC-MS/MS	91
3.2.4	Estado oligomérico em solução	92
3.2.5	Espectro de dicroísmo circular e transição térmica	92
3.2.6	Ensaio de cristalização	93
3.2.7	Caracterização enzimática	93
3.2.7.1	<i>Painel de substratos</i>	93
3.2.7.2	<i>Temperatura e pH ótimos</i>	94
3.2.7.3	<i>Atividade específica e cinética enzimática</i>	94
3.2.7.4	<i>Painel de aditivos</i>	95
3.2.7.5	<i>Estabilidade térmica</i>	95
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.3.1	Expressão, purificação e caracterizações das enzimas recombinantes em fungo filamentoso	96
3.3.1.1	<i>Triagem dos melhores transformantes e confirmação por LC-MS/MS das proteínas heterólogas</i>	96
3.3.1.2	<i>Purificação</i>	99
3.3.1.3	<i>Estado oligomérico em solução</i>	103
3.3.1.4	<i>Painel de substratos</i>	105
3.3.1.5	<i>Temperatura e pH ótimos</i>	109

3.3.1.6	<i>Estabilidade térmica</i>	112
3.3.1.7	<i>Painel de aditivos</i>	113
3.3.1.8	<i>Atividade específica enzimática</i>	116
3.3.1.9	<i>Cinética enzimática</i>	118
3.3.2	Clonagem, expressão, purificação e caracterizações das enzimas re-combinantes em bactéria	121
3.3.2.1	<i>Clonagem, expressão e purificação</i>	121
3.3.2.2	<i>Espectro de dicroísmo circular</i>	127
3.3.2.3	<i>Painel de substratos</i>	128
3.3.2.4	<i>Temperatura e pH ótimos</i>	142
3.4	CONCLUSÃO	146
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	149
	REFERÊNCIAS	151

CAPÍTULO I

Enzimas de Fungo Termofílico no Cenário da Bioenergia

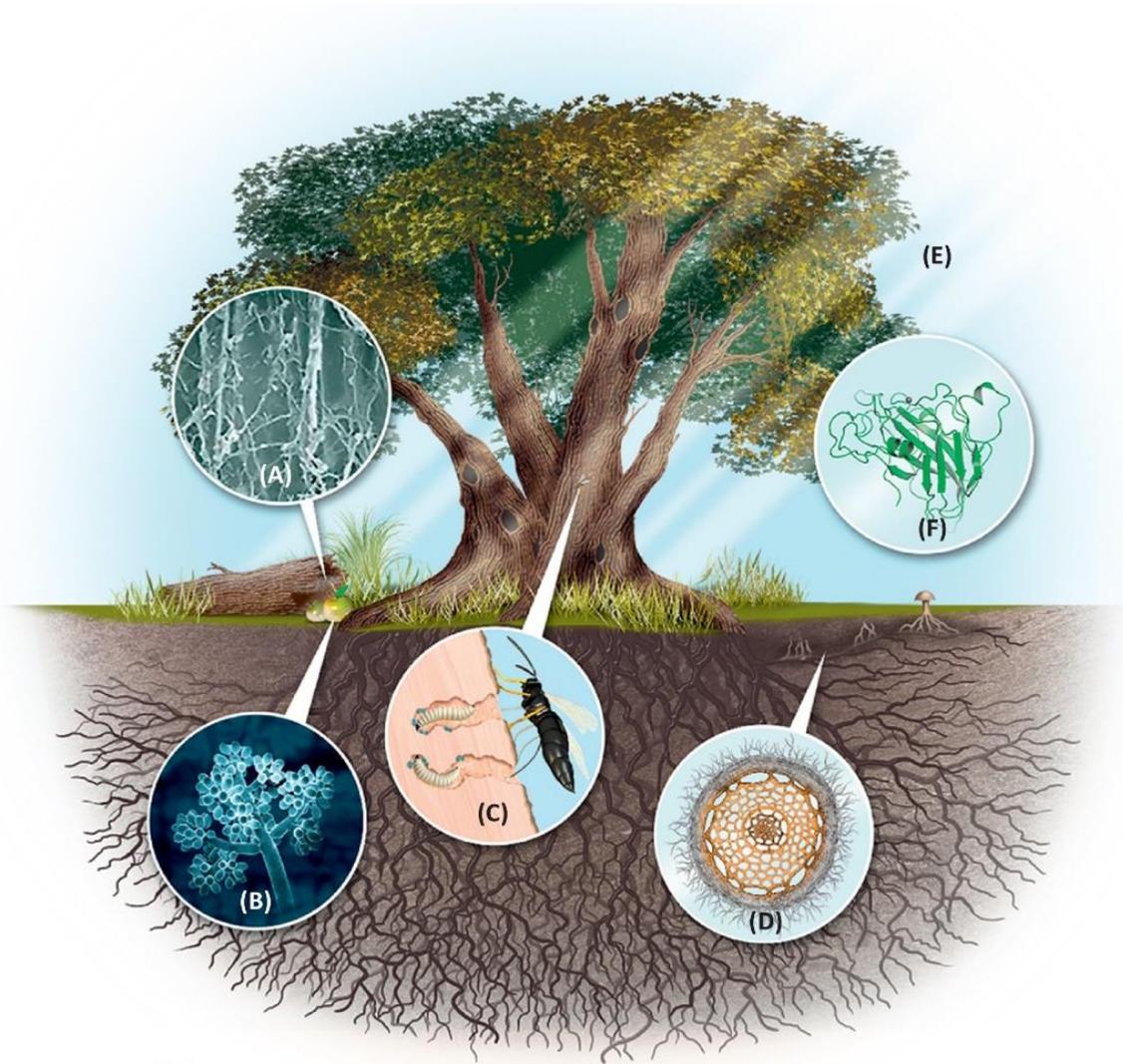


Figura 1 - Exemplos de interações planta-micróbio nas quais os LPMOs estão envolvidos. (A) Fungos saprófitos que degradam um tronco de madeira. (B) Degradação de frutos por mofo cinzento. (C) Larvas de uma vespa de madeira alimentando-se de uma árvore assistida por simbiontes microbianos. (D) Corte transversal de uma raiz com fungos ectomicorrízicos envolvidos na degradação da matéria orgânica do solo. (E) A luz solar impulsiona o armazenamento de energia e CO_2 no tecido vegetal fotossintético e também pode modular processos destrutivos através da transferência de elétrons fotoinduzida. (F) Uma molécula representativa de LPMO.

Fonte: JOHANSEN¹

Historicamente, o impulso em busca de fontes de energias excludente ao petróleo se deu a partir de 1970, quando o preço do barril de petróleo aumentou subitamente. A Crise do Petróleo provocou prolongada recessão no Estados Unidos da América (EUA) e Europa, desestruturou a economia mundial e trouxe a percepção de que fontes fósseis de energias, como o carvão mineral e petróleo, eram finitas. Dessa forma, é possível observar a escassez e o aumento do preço desta fonte não renovável de energia.

Adicionalmente, a crescente convicção em toda a sociedade de que alternativas aos combustíveis fósseis devem ser buscadas com urgência é alicerçada no progressivo reconhecimento em todo o mundo dos desastres ambientais devidas ao aquecimento global. As questões ambientais estão impulsionando o desenvolvimento de tecnologias inovadoras para a produção de energia renovável e "*green products*" a partir de resíduos de biomassa vegetal. A estratégia de utilizar a biomassa como a matéria-prima para a produção de biocombustíveis líquidos tem implicações importantes para compensar as emissões de gases causadores do efeito estufa. No Brasil, o advento da cultura da cana-de-açúcar para produção de etanol de 1ª geração produz grandes excedentes de bagaço e palha, que possui elevado potencial na geração de etanol, conhecido como etanol de 2º geração. Isso sugere significativo aumento na oferta de álcool, sem exigir aumento nas áreas de plantio, destruição de ecossistemas, desmatamento, pressão sobre recursos hídricos e uso intenso de fertilizantes e agroquímicos. Paralelo a isso, a combustão do bagaço é uma parte importante do atendimento à demanda de eletricidade da estação seca no Brasil. O etanol do bagaço de cana é uma das poucas tecnologias já implementadas e demonstradas na geração de energia descarbonizada e que atende aos objetivos do Acordo de Paris, compensando 86% das emissões de CO₂, em comparação ao uso de petróleo.²⁻³

A redução do custo do processo de sacarificação pode ser alcançada através de uma compreensão abrangente da arquitetura e composição da biomassa, além dos mecanismos enzimáticos e de secreção dos microrganismos decompositores dela. Em auxílio a prospecção de enzimas de degradação de biomassa, os estudos de secretoma envolvem a identificação das proteínas transportadas para o meio extracelular. Os genes que codificam estas proteínas são susceptíveis a estímulos ambientais, os quais provocam mudanças drásticas no perfil da transcrição gênica, o qual refletem na secreção de proteínas produzidas em fungos. Os perfis das enzimas secretadas por *Thermothielavioides terrestris* foram muito menos estudados quando comparados a outros eucariotos de interesse industrial, tornando o estudo do secretoma de *T. terrestris* cultivado em bagaço de cana de extrema importância.⁴ Esse capítulo traz uma revisão bibliográfica dos assuntos relacionados ao processo da utilização do bagaço de cana-

de-açúcar como fonte sustentável de energia e a abordagem de microrganismos decompositores da biomassa como estratégia para tornar possível essa tecnologia.

1.1 BIORREFINARIAS

A produção de etanol de segunda geração pelo emprego de enzimas para liberar monossacarídeos fermentescíveis a partir de biomassa não é o único produto que se pode gerar. Através de outros caminhos de conversão dos componentes da parede celular, por exemplo, rotas termoquímicas, catálise química e bioquímica, a partir de moléculas intermediárias, como carboidratos, ácidos carboxílicos, álcoois, furanos, aldeídos, acetonas e fragmentos de lignina, pode ser obtido hidrocarbonetos líquidos e insumos para a indústria química (Figura 2). Portanto, novas tecnologias capazes de utilizar estruturas parcialmente oxigenadas de matérias-primas disponíveis a partir da biomassa – com o mesmo leque e versatilidade que as indústrias petroquímicas fazem com o carbono fóssil – ajudariam a reduzir os custos de produção do etanol de segunda geração (etanol obtido da biomassa lignocelulósica).⁵

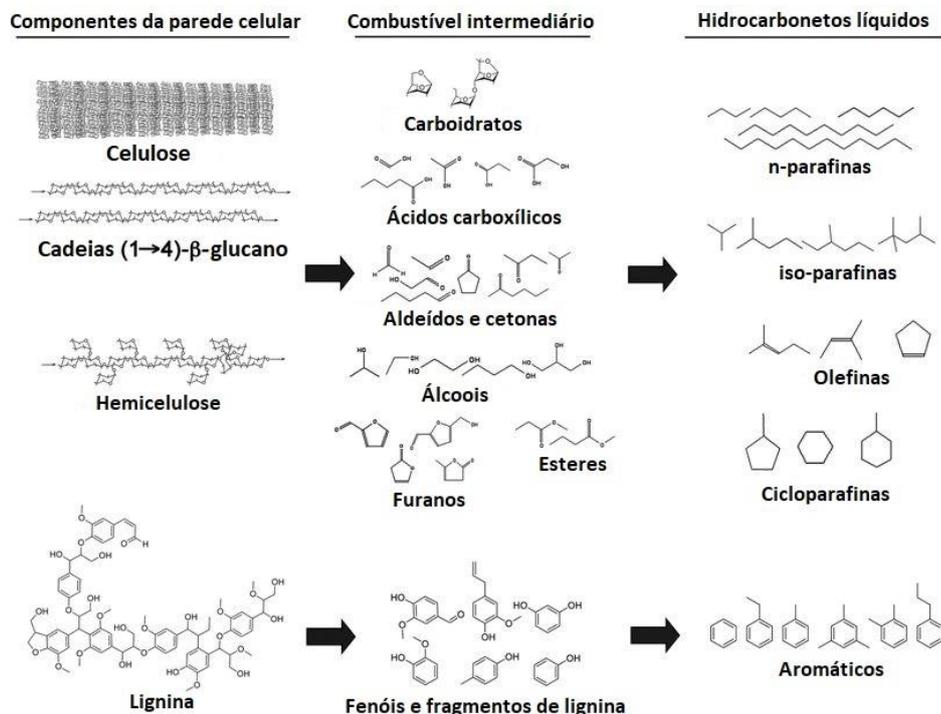


Figura 2 - Componentes da parede celular podem ser transformados cataliticamente a uma gama de intermediários de combustível e subsequentemente hidrocarbonetos líquidos.

Fonte: Adaptada de MCCANN⁵

O pleno aproveitamento energético da cana-de-açúcar, para além do açúcar e etanol de primeira geração (a partir do caldo da cana), está ligado ao atual conceito de biorrefinaria, que

engloba uma vasta gama de tecnologias capazes de separar os recursos da biomassa em seus blocos químicos. Estes podem ser convertidos em produtos de maior valor agregado, como produtos químicos valiosos, pré-bióticos, biocombustíveis, e outros materiais e energia.⁶⁻⁹ Essas tecnologias dependem da conversão dos polissacarídeos da parede celular da planta em açúcares simples, que envolvem atividades sinérgicas de diferentes enzimas de degradação.

Estes são amplamente aplicados nos setores de alimentos e rações, indústrias de papel e têxtil, químico e farmacêutico. O conteúdo energético de uma tonelada de cana-de-açúcar se divide em 35,4% ao açúcar para o consumo, 34,8% referente ao bagaço e 29,8% à palha. Dessa forma, o setor sucroalcooleiro é identificado com maior potencial para implantação comercial da produção de etanol celulósico. Essa característica se deve à biomassa residual gerada pelo processamento da cana (bagaço e resíduos da colheita), instalações prontas para fermentação dos açúcares, obtenção do etanol, armazenamento, distribuição, bem como o tratamento de efluentes.¹⁰

1.2 A BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os principais polissacarídeos presentes na parede celular da cana-de-açúcar podem ser agrupados pelos domínios celulose, hemicelulose e pectina. As microfibrilas de celulose são matrizes p-cristalinas de 2-3 dúzias de cadeias lineares de 1,4- β -D-glucano.¹¹ As regiões amorfas (não-cristalinas) da celulose ocorrem ao longo da microfibrila ou estão associadas ao redor de um núcleo cristalino, bem como as regiões superficiais ordenadas. Na cana de açúcar, a microfibrila é constituída pelas microfibrilas de celulose envolvidas por polissacarídeo da hemicelulose através de ligações específicas polissacarídeo-polissacarídeo devido à proximidade dos polímeros e ligações de hidrogênio (Figura 3). A arquitetura da parede da cana-de-açúcar (gramíneas) é denominada Tipo II, que tem os arabinoxilanos como a principal hemicelulose e proporções relativamente baixas de pectinas.¹² Aproximadamente, a constituição de polissacarídeos da parede celular da cana-de-açúcar possui 28% de celulose, 40% de arabinoxilano, 10% de β -glucano, 8% de xiloglucano e 8% de pectina.¹³

Arquitetura da parede celular da cana-de-açúcar

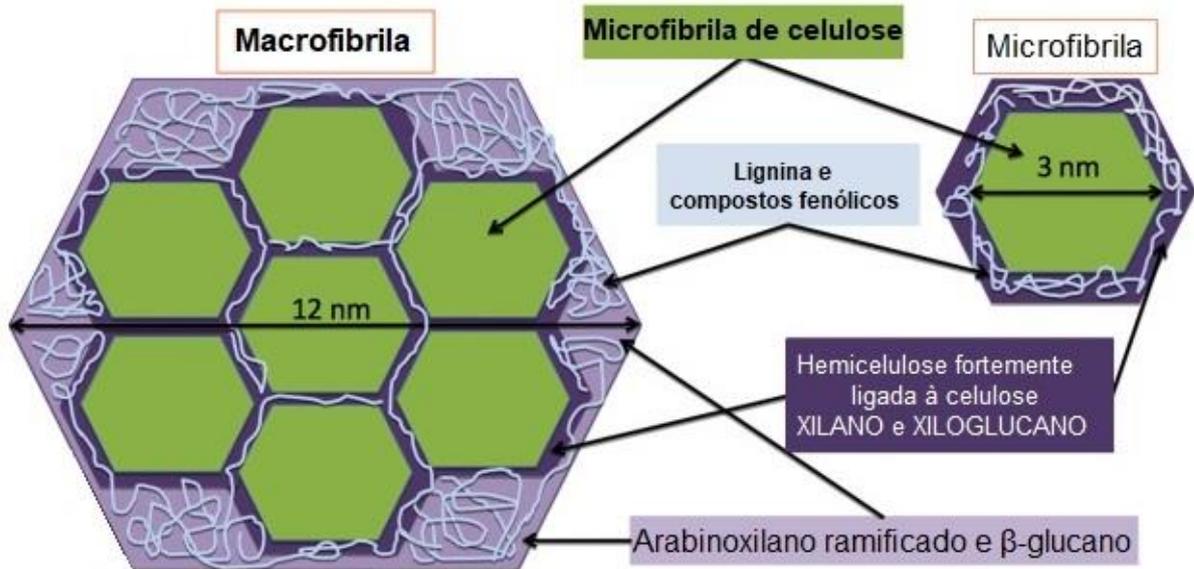


Figura 3 - A unidade básica da arquitetura da parede celular da cana-de-açúcar. Microfibrilas (canto superior direito) possuem cerca de 36 moléculas de celulose embaladas na forma de uma estrutura cristalina. O xiloglucano e os xilanos lineares ligam as microfibrilas de celulose, formando a unidade microfibrilar, que são montadas em sete feixes e incorporadas em uma matriz de arabinoxilanos (ligados por lignina e ácidos diferúlicos), formando uma macrofibrila.

Fonte: Adaptada de BUCKERIDGE¹⁴

Os principais polímeros hemicelulósicos envolvidos na formação desse domínio são o arabinoxilano (1,4- β -xilano, ramificação de 1,3- α -arabinosil, 1,6- α -glucuronil, e O2(3)-acetil, 1,3- α -arabinose-O5-feruloil; Figura 4), β -glucano (1,4(3)- β -glucano), e xiloglucano (1,4- β -glucano, ramificações 1,6- α -xilossil, 1,6- α -xilose-1,2- β -galactosil, O2(3)-acetil), sendo que arabinoxilano é muito mais abundante do que o xiloglucano e liga randomicamente à celulose, mas não específico como o xiloglucano. O xiloglucano é mais fortemente ligado à celulose do que arabinoxilano, por causa do maior número de hidroxilas envolvidas na ligação de hidrogênio, já a maioria do β -glucano não é fortemente ligada a nenhum componente da parede celular, interagindo não-especificamente com a celulose.¹⁵⁻¹⁶ A arabinose da cadeia lateral do arabinoxilano é esterificada pelo ácido ferúlico, gerando uma estrutura macromolecular reticulada através de ligações cruzadas com a lignina e com outros polissacarídeos, que é importante para a manutenção da arquitetura da parede celular (Figura 4).^{14,17-18} Por fim, a macrofibrila é incorporada a uma matriz de pectina e proteínas estruturais.^{17,19}

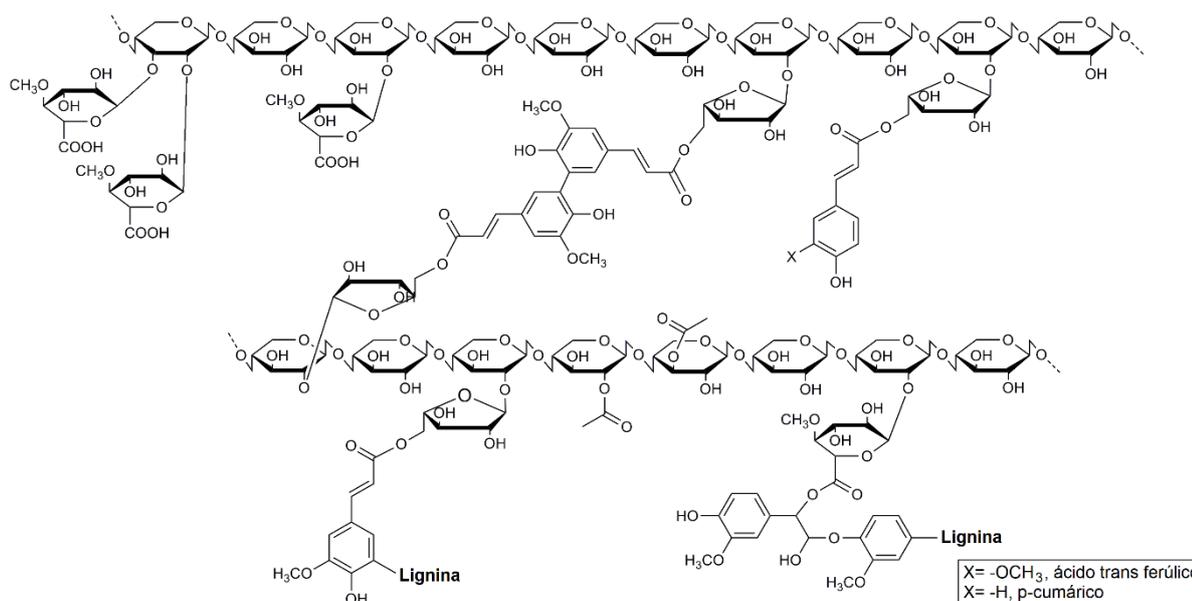


Figura 4 - Representação de arabinoxilano. Cadeia principal de 1,4-β-xilano substituídos por porções únicas e/ou duplas de α-L-arabinofuranosídeo; reticulados covalentemente com lignina ou por meio de uma ligação cruzada diferuloil entre cadeia de arabinoxilano.

Fonte: Adaptada de TOPAKAS²⁰

Apesar de seu baixo conteúdo, as pectinas estão, possivelmente, envolvidas em ligações com lignina, conferindo recalcitrância à hidrólise.²¹ As pectinas representam a classe de polissacarídeos responsáveis pela adesão às células vizinhas, atuando no controle da penetração de outras enzimas na rede de biomassa, pois acredita-se que as pectinas sejam responsáveis pela determinação da porosidade da parede celular.¹⁷ O ramnogalacturonano I é um dos polissacarídeos (1,2-α-rhamnosil-1,4-α-galacturonato) presentes na pectina da cana-de-açúcar, do qual partem ramificação de arabinano linear (1,5-α-arabinano) e galactano (1,3-β-galactano, ramificação 1,6-α-galactosil, 1,6-α-arabinosil; chamado de arabinogalactano II), o qual pode apresentar ligação cruzada com a lignina. O homogalacturonano é o outro componente da pectina, possui cadeia principal de 1,4-α-galacturonano, que podem apresentar cadeia lateral de O2-metil, mas quando não metilado, complexam o Ca²⁺ e formam uma estrutura na forma de caixa de ovos, que possui aparência de um gel.

Juntamente como β-glucano, os polímeros da pectina são os polissacarídeos mais solúveis da parede celular e tendem a ser extraviada durante o processo de moagem e lavagem com água quente da cana para extração da garapa nas usinas.¹⁴ A complexidade de ligações diferentes entre os diversos monossacarídeos, ligações e interações entre os polissacarídeos da parede celular, adicionalmente ao equilíbrio entre essas ligações e a força de cada uma, contribuem para a manutenção do código glicômico proposto por Buckeridge e de Souza.²²

No que tange a lignina, ela é um heteropolímero aromático, onde os seus principais constituintes são os monolignóis álcoois p-cumaril, coniferil e sinapil, diferindo no grau de metoxilação, cujo acoplamento oxidativo combinatório produzem, respectivamente, unidades de lignina p-hidroxifenil, guaiacil e siringil ligadas diferentemente (Figura 5). Essas unidades estão presentes na parede celular em diferentes quantidades nos tecidos da planta e entre espécies: no bagaço de cana-de-açúcar estão presentes na proporção de 2:38:60, enquanto que na palha é de 4:68:28.²³ Dentro da lignina, existem estruturas formadas por essas unidades, que principalmente incluem éter alquila- β -arila, fenilcumaranos, resinóis, espirodienonas e dibenzodioxocinas.²⁴ A subestrutura majoritária no bagaço é a éter alquila- β -arila, seguido pelo fenilcumarano, na fração de 83 e 6%, respectivamente, enquanto que na palha a porcentagem é de 75 e 15%. Devido ao maior teor de siringil e menor grau de condensação no bagaço em relação à palha de cana-de-açúcar, a lignina do bagaço é mais susceptível aos pré-tratamentos.²³

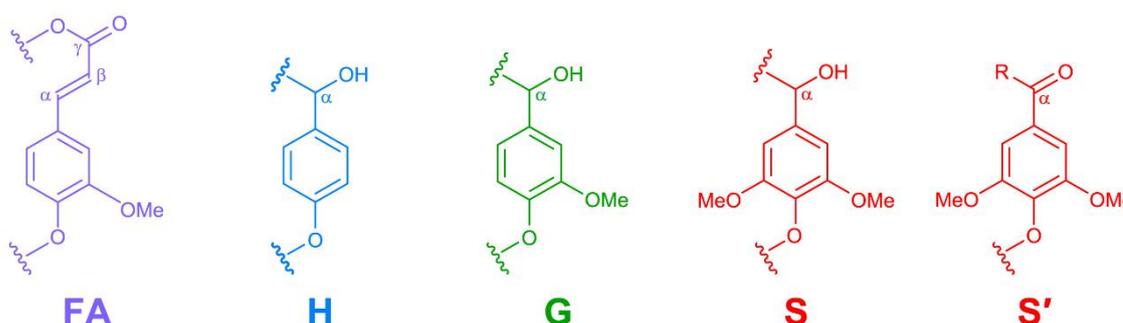


Figura 5 - Principais unidades da lignin presente no bagaço e na palha da cana-de-açúcar. FA: porções feruladas (estereficada com hemiceluloses); H: unidade p-hidroxifenil; G: unidade guaiacil; S: unidade siringil; S': unidade siringil oxidada contendo um grupo carbonila no $C\alpha$

Fonte: Adaptada de DEL RÍO²³

Estas características químicas e estruturais da biomassa afetam a penetração de líquidos e a acessibilidade enzimática, elevando assim, os custos no processo de conversão dos polímeros à monômeros. A composição e o acoplamento dos constituintes da lignina, juntamente com o código glicômico, que considera a complexidade de ligações diferentes entre os polissacarídeos, e estes com a própria lignina, devem ser considerados para otimização dos métodos de pré-tratamento necessários para diminuir a recalcitrância da parede celular e posterior liberação de açúcares fermentescíveis, bem como dos compostos aromáticos valiosos da lignina.

1.3 ESTRATÉGIAS PARA MITIGAR A RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A desconstrução da matriz extracelular de algumas espécies de plantas, usadas como matéria-prima para a produção de bioenergia, continua a ser uma barreira importante para alcançar a produção de bioetanol a custo razoável. Existem dois fatores que afetam a atividade de hidrólise de materiais lignocelulósicos: os relacionados à enzima e os relacionados ao substrato. Os fatores relacionados às enzimas são estabilidade térmica, estabilidade ao pH, efeito de íons metálicos, velocidade de reação, inibição por produto, atividade, processividade, sinergismo, reuso e adsorção. Os relacionados ao substrato são acessibilidade, solubilidade e formação de inibidores.²⁵ Os passos para tornar a biomassa uma matéria-prima amplamente aproveitável compreendem pré-tratamentos que objetivem a desconstrução de sua estrutura nativa, facilitando o acesso das enzimas à celulose, com recuperação da hemicelulose e da lignina; vista que essa última possui alto valor agregado, pois apresenta alta densidade de energia em sua estrutura molecular.

Romper a estrutura cristalina da celulose – uma estrutura altamente compacta, anidra e resistente – é uma etapa crucial para aumentar, significativamente, a taxa de conversão em moléculas simples, uma vez que esse processo está intimamente relacionado ao índice de cristalinidade do substrato. Os conteúdos de lignina e hemicelulose estão associados à taxa de hidrólise, devido ao bloqueio que elas oferecem ao acesso das enzimas à celulose. Também, as interações inespecíficas das enzimas à lignina, como adsorção, podem diminuir o número de enzimas disponíveis, levando a uma diminuição da eficácia da reação.

Os pré-tratamentos podem ser agrupados de acordo com sua natureza e envolvem processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, alguns como: moagem, irradiação, ácido, *organosolv*, líquidos iônicos, explosão a vapor.²⁶⁻²⁸ Esses processos agem de forma diferente e produzem características de desconstrução da biomassa que variam entre si. Combinar os distintos pré-tratamentos de forma apropriada deve priorizar a maximização da hidrólise, considerando um baixo custo operacional de modo a facilitar a recuperação de lignina, hemicelulose ou seus derivados e, ainda, não produzir compostos inibidores (5-hidroximetilfurfural) da subsequente fermentação. Ainda não foi estabelecido um pré-tratamento eficiente que seja economicamente e ecologicamente viável, embora tratamentos como o emprego de ácido acético-peróxido tem gerado deslignificação efetiva e aumento significativo no processo de sacarificação.²⁸

Uma estratégia a ser considerada em adição à acessibilidade ao substrato seria a modificação molecular da composição da parede celular de plantas, tornando-as menos recalcitrantes. Três abordagens recentemente implementadas são: i) mineração de diversidade genética natural em populações estruturadas para identificar genótipos com características desejáveis;²⁹⁻³⁰ ii) abordagens transgênicas para modificar os níveis de expressão de genes relacionados à parede celular;³¹ iii) biologia sintética para desenvolver variantes não encontradas na natureza.³²⁻³³

Em termos de diversidade genética, o conteúdo de lignina em certas populações de álamo mostrou-se correlacionado com o melhoramento do rendimento da sacarificação; assim como um conjunto de genes estavam relacionados com a abundância e constituição de lignina ou com o rendimento da hidrólise. Para ambas análises, foi evidenciado que estas características não estavam relacionadas com a via de síntese da parede celular, e sim de reguladores de transcrição e componentes da via de sinalização.³⁴⁻³⁵ Em vias de desenvolvimento de novas plantas destinadas à bioenergia, duas regiões genômicas isoladas de cana-de-açúcar (*rav1* e *loci epg1*) contem genes essenciais que controlam a degradação de pectina durante a formação de aerênquimas nas raízes da planta.³⁶ Essa descoberta tem sido alvo de interesse para o desenvolvimento de variantes de cana-de-açúcar, que possuem parede celular dos colmos mais susceptível à degradação.³⁷

Com o manejo adequado de culturas de plantas destinadas à bioenergia (cana-de-açúcar, *miscanthus*, *switchgrass*), o seu cultivo em áreas excedentes disponíveis, tal como em terras agrícolas marginais e terras degradadas ou drasticamente perturbadas, poderia contribuir com o aumento do sequestro de carbono da atmosfera, minimizando as causas do aquecimento global. Outros efeitos das plantações para bioenergia, através de rotação de culturas e plantio direto, envolvem redução da sedimentação e erosão de solos e aumento da biodiversidade, reposição de nutrientes e retenção de água.³⁸

Devido às propostas de novas condições de otimização de produção de etanol celulósico, é necessário o estudo de novos microrganismos capazes de tolerar essas situações, bem como a prospecção de novas enzimas adaptadas e estáveis a uma ampla diversidade de meio reacional, como pH, temperaturas mais elevadas, íons, solventes, inibidores, entre outros. No entanto, a produção em larga escala de todas essas enzimas envolvidas no processo de sacarificação da biomassa é dispendioso. Portanto, são necessárias reduções substanciais no custo de produção delas.³⁹

Ao longo dos últimos anos, muito esforço tem sido dedicado à isso, através de ferramentas de biologia sintética, edição de genoma⁴⁰ para redesenhar vias metabólicas, e

desenvolvimento de novos chassis de expressão heteróloga, com o intuito de aumentar a expressão de enzimas em fungos filamentosos.⁴¹⁻⁴² Como consequência, o conceito de *cell factory*⁴³ e biorrefinaria vem ganhando extrema importância.⁴⁴

As celulasas e hemicelulasas mais bem estudadas e amplamente utilizadas são produzidas pelos fungos mesofílicos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (podem ser termotolerantes). A maioria das enzimas desses microrganismos têm temperatura de reação próximas de 40 a ~50 °C, o que requer longos tempos de reação, tornando os reatores mais susceptíveis à contaminação. A implementação de procedimentos com temperaturas mais elevadas diminuiria essa susceptibilidade, aumentariam a taxa de conversão da biomassa a açúcares simples, melhoraria a transferência de massa no processo industrial por diminuição da viscosidade do meio, além de reduzir o volume de água para resfriar o reator, dada a proximidade das temperaturas de esterilização, pré-tratamento com a de reação enzimática.⁴⁵⁻⁴⁷ No entanto, aumentar a temperatura da reação requer o uso de enzimas termoestáveis, que atuariam nessa condição, sendo que, um reservatório potencial de obtenção dessas enzimas pode ser encontrado em organismos termofílicos e as tecnologias de análise de última geração (*omics technologies*) tem sido uma ferramenta imprescindível para se identificar enzimas, fatores de transcrição, transcritos, genes e metabólitos.

O desenvolvimento de uma tecnologia para a produção rentável de combustível líquido é um desafio na atualidade, mas os avanços na compreensão científica necessários para alcançar esse objetivo parecem realizáveis. A compreensão da biodiversidade das enzimas hidrolíticas, oxidativas, esterases, expansinas e módulos de ligação a carboidratos, juntamente com engenharia de proteínas (recombinação tipo SCHEMA, desenho de consenso e quimera, evolução direcionada e estrutura baseada em métodos computacionais) são mecanismos necessários ao estabelecimento de coquetéis enzimáticos mais eficientes, baratos e estáveis – além de fornecerem estudos compreensivos a respeito das bases moleculares que conferem alta estabilidade térmica e taxa catalítica, fornecendo conhecimento para potencializar esses efeitos nas enzimas.

A combinação de todas essas contribuições: pré-tratamento, engenharia genética de plantas, agricultura avançada, prospecção e alta expressão a baixo custo de enzimas mais eficazes, engenharia de proteínas e leveduras capazes de fermentar pentoses eficientemente,⁴⁸ nos aproximará da consolidação de uma biorrefinaria economicamente viável para produção de biocombustíveis e insumos químicos de natureza renovável e sustentável.

1.4 FUNGOS TERMOFÍLICOS

Entre os organismos eucarióticos, apenas um pequeno número de espécies de fungos possuem a capacidade de crescer a temperaturas de 45 °C ou superiores, podendo apresentar uma capacidade mesofílica latente.⁴⁹ Tais fungos compreendem as formas termofílicas e termotolerantes, que são, arbitrariamente, distinguidos em função da sua temperatura mínima e máxima de crescimento. A termofilia em fungos é alvo de interesse industrial, comercial e acadêmico, uma vez que sua habilidade termofílica e suas enzimas termoestáveis são potencialmente atraentes para serem amplamente empregadas na ciência e indústria. Adicionalmente, a compreensão estrutural e função das enzimas termofílicas e termoestáveis fúngicas é, relativamente, inferior em comparação com as de bactérias. Portanto, estudos extensivos e caracterização de resíduos de aminoácidos que influenciam a estabilidade térmica, bem como, as modificações pós-traducionais e a natureza termofílica das enzimas fúngicas são urgentemente necessários para uma melhor compreensão da termoestabilidade dessas proteínas.

As propriedades das enzimas dos fungos apresentam diferenças não só entre espécies, mas também entre as cepas de uma mesma espécie (Tabela 1). As enzimas extracelulares exibem temperaturas ótimas para suas atividades próximas ou acima da temperatura ótima de crescimento do organismo, por exemplo, entre 55 e 80 °C com mais de 50% de estabilidade (Tabela 1),⁵⁰ algumas até apresentam estabilidade à 90 °C.⁵¹ Os dados da Tabela 1 reúnem característica de estabilidade térmica de celulasas de vários fungos mesofílicos e termofílicos. Em geral, celulasas e hemicelulasas de fungos termofílicos demonstram capacidade hidrolítica notavelmente mais eficiente que as de fungos mesofílicos, por apresentarem maiores temperatura ótima e termoestabilidade com longos tempos de meia-vida.^{47, 52-53}

Tabela 1 - Temperatura e estabilidade de celulasas termoestáveis de fungos termofílicos e mesofílicos

Fungo	Classificação crescimento ótimo	Temperatura (°C)	Estabilidade (%)
<i>Humicola grisea</i>	Termofílico	80	75
<i>Fusarium Proliferatum</i>	Mesofílico	55	50
<i>Teheromyces lanuginosus</i> (selvagem e mutante)	Termofílico	70	50
<i>Humicola grisea</i>	Termofílico	70	88
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mesofílico	60	50
<i>Phialophora sp. G5</i>	Mesofílico	70	85
<i>Phialophora sp. CGMCC 3328</i>	Mesofílico	80	45
<i>Phialophora sp. G5</i>	Mesofílico	90	47
<i>Aspergillus fumigatus SK1</i>	Mesofílico	60	50
<i>Rhizopus oryzae</i>	Mesofílico	60	50
<i>Aspergillus fumigatus NS</i>	Mesofílico	60	50
<i>Aspergillus terreus</i>	Mesofílico	60	–
<i>Aspergillus fumigatus AA001</i>	Mesofílico	80	75
<i>Myceliophthora thermophile JCP</i>	Termofílico	60	50
<i>Aspergillus niger</i>	Mesofílico	50	100
<i>Aspergillus flavus ITCC 6720</i>	Mesofílico	45	–
<i>Sporothrix carnis</i>	Mesofílico	80	75
<i>Trichoderma reesei</i>	Mesofílico	75	50
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Termofílico	80	78,90
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Termofílico	70	–

Fonte: Adaptada de SRIVASTAVA⁵³

Entre os microrganismos termofílicos encontra-se a *Thermothielavioides terrestris* e o *Myceliophthora thermophila*, que em 2012 tiveram os genomas e transcriptomas sequenciados e revelaram enzimas com alta eficiência de hidrólise.⁴⁷ O fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* pode secretar enzimas que não só promovem a hidrólise de celulose, mas também a oxidação das ligações glicosídicas – 21% do total do secretoma de *M. thermophila*, produzido em bagaço de cana-de-açúcar, corresponde à enzima celobiose desidrogenase (CDH).⁵⁴ A participação de reações de oxidação acopladas à decomposição da lignina na quebra das cadeias de celulose podem explicar a discrepância observada entre os valores de atividade absoluta em papel de filtro e o verdadeiro potencial da degradação observado em experimentos de hidrólises em biomassa. Esse efeito de degradação de lignina por enzimas como laccase, lignina peroxidases e manganês peroxidases são, atualmente, avaliadas como candidatas a pré-tratamento biológico da biomassa para aumentar os níveis de sacarificação de coquetéis comerciais,⁵⁵⁻⁵⁶

As enzimas termoestáveis de *T. terrestris* é de grande interesse biotecnológico para a degradação da biomassa lignocelulósica e potencial aplicação em bioenergia, aplicações na indústria alimentícia e descontaminação de águas, por produzir uma série de enzimas hidrolíticas e oxidativas.^{47, 57-62}

1.5 FERRAMENTAS DE SEQUENCIAMENTO DE ÚLTIMA GERAÇÃO

O entendimento dos genes expressos no genoma contribui ao melhor entendimento das suas funções, regulação e coordenação com outros genes quando expostos a estímulos internos e externos, sua relação com o metabolismo primário e secundário, interação com outros organismos, patogenicidade e evolução gênica. A análise genômica abrange a construção de mapas genéticos físicos e de transcritos de um organismo, em que as abordagens comparativa e evolutiva entre genomas relacionados impulsionam a compreensão em nível funcional das sequências de DNA codificantes ou de UTR (do inglês, *untranslated region*). Combinado com a técnica de alto rendimento: RNA-Seq (do inglês, *RNA-Sequencing*) aliado a tecnologia de sequenciamento de última geração (*Next Generation Sequence*),^{63,64} *microarray*,⁶⁵ são ferramentas poderosas e eficientes, principalmente em relação ao seu tempo de execução, na análise de transcriptomas junto à programas robustos de bioinformática – beneficiado pelos avanços na capacidade de processamento dos computadores.

A técnica de RNA-Seq tem sido utilizada no estudo do transcriptoma de vários organismos modelos como *Saccharomyces cerevisiae*,⁶⁶ *Caenorhabditis elegans*⁶⁷ e em fungos filamentosos, como *Trichoderma reesei*,⁶⁸ *Myceliophthora thermophila*, *Thermothielavioides terrestris*⁶⁹ e *Aspergillus niger*,⁷⁰ o que tem ajudado no entendimento da complexidade da expressão proteica e regulação gênica, UTRs, captando variações nas sequências como *splicing* alternativos (processo de maturação do pré- mRNA (RNA mensageiro)) e fusão gênica.⁷¹⁻⁷² Isso tem ajudado no entendimento da complexidade da expressão e regulação gênica do secretoma, possibilitando a expressão heteróloga de genes, manipulação genética como *CRISPR-Cas9*⁷³ e *RNAi* (do inglês, *RNA interference*),⁷⁴ para desenvolvimento de organismos com características desejáveis: cepas para produção de proteínas e metabólitos (biologia sintética), melhores matrizes bioenergéticas e nutricionais.

A proteômica é frequentemente vista como o próximo passo no estudo de sistemas biológicos, após genoma ou transcriptoma, é o estudo de um conjunto completo de proteínas em uma célula e suas estruturas e funções nas suas vias fisiológicas. A complexidade das proteínas em relação aos ácidos nucleicos se deve ao fato de que o genoma de um organismo é bastante constante ao longo do tempo e o proteoma muda de célula para célula com base em suas próprias interações bioquímicas, mediada via fatores ambientais. O proteoma de um organismo inclui as proteínas presentes no citoplasma celular e as proteínas que são secretadas para o meio extracelular e a maquinaria envolvida nesse processo (secretoma).⁷⁵ Dentre os principais fatores que influenciam os padrões de secreção em fungos estão as fontes de carbono

por eles utilizadas e o tipo de meio a qual o fungo é cultivado (meio líquido versus meio sólido).⁷⁶ A ferramenta utilizada para estudar as proteínas produzidas é a geração dos peptídeos digeridos enzimaticamente, seguido por separação por cromatografia líquida de alta performance e a identificação por espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS).

Com base no dogma central da biologia molecular, foi geralmente assumido que existe uma correspondência direta entre transcritos e expressão de proteínas. Entretanto, estudos recentes não têm encontrado uma correlação entre números de transcritos e abundância de proteínas.⁷⁷⁻⁷⁹ Parte dessa falta de relação vem do fato de que os transcritos podem ser processadas na célula por *splicing* alternativo, sofrer modificação pós-traducionais (glicosilação, fosforilação, ubiquitinação),⁸⁰ além de que os tempos de meia-vida entre transcrito e produto podem ser diferentes.⁸¹⁻⁸²

O produto final ou intermediário do metabolismo, que é protagonizado pela complexa rede que envolve as sequências de DNA, RNAs, transcritos e proteínas, são os metabólitos. Dessa forma, o metaboloma representa a coleção de todos os metabólitos de um organismo biológico, como intermediários metabólicos, hormônios e outras moléculas de sinalização e metabólitos secundários.⁸³ O metaboloma também é dinâmico e muda constantemente no tempo, porque é um reflexo das reações metabólicas, onde o produto de uma reação enzimática é o substrato de outras reações. A identificação desses analitos é seguido de separação e detecção por LC-MS/MS e NMR (do inglês, *nuclear magnetic resonance*).⁸⁴

O comportamento regulatório das células abrange interações em vários níveis de informação, como genes e transposons, transcritos e RNAs funcionais (interferência, catalíticos), proteínas e enzimas, metabólitos primários e secundários. Esses dados geralmente são buscados através da análise independente do genoma, transcriptoma, proteoma, secretoma e metaboloma, não obstante, não garantem uma suntuosa compreensão do sistema como um todo. Assim, uma análise conjunta dos dados “ômicos”, gerados a partir das mesmas células nas mesmas condições, pode fornecer informações úteis que não podem ser decifradas da análise individual de cada um.

A preferência industrial por fungos filamentosos na produção de enzimas está voltada, principalmente, pela sua excelente capacidade de produção de enzimas extracelulares e novos metabólitos. As ferramentas “ômicas” têm sido amplamente empregadas para explorar enzimas com potencial aplicação biotecnológica, algumas das ferramentas incluem: genômica e transcriptômica (metagenômica e metatranscriptoma também) através do sequenciamento de última geração (*next generation*), secretoma e metabolômica. Um fator associado ao descobrimento de novas enzimas é que, a aquisição dessas informações a nível molecular, tem

ajudado a entender diversos fenômenos biológicos tais como: regulação gênica, via secretória, fatores de transcrição, modificações pós-traducionais, além da compreensão do papel das enzimas na degradação de biomassa, no mecanismo de infecção de hospedeiros e os metabólitos produzidos durante esses processos.^{47, 85}

1.6 HIDROLASES E OXIDASES DE CELULOSE

Pelo menos três tipos de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas da celulose (exoglucanases, endoglucanases e β -glucosidases; Figura 6) são produzidas pela maioria dos microrganismos.⁸⁶ Os fungos estão no topo desses microrganismos degradadores, pois estrategicamente driblam a recalcitrância da biomassa para se alimentar dos polissacarídeos.⁸⁷ As endoglucanases (endo-1,4- β -D-glucanases; EC 3.2.1.4, do inglês, *Enzyme Commission number*), preferencialmente, agem em regiões amorfas e clivam as ligações internas ao acaso das cadeias de glucano, proporcionando extremidades redutoras e não-redutoras de celo-oligossacarídeos para que as celobiohidrolases (CBH, ou exoglucanase, ou 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolase) as ataquem pelo terminal não-redutor (EC 3.2.1.91) e redutor (EC 3.2.1.176). Dessa maneira, as CBHs hidrolisam as extremidades da cadeia de forma processiva, originando celobiose como produto principal. Finalmente, as β -glucosidases (BG; celobiase, ou β -D-glucosideo glucohidrolase, EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose à glicose, além de liberar glicose a partir das extremidades não redutoras dos celo-oligossacarídeos solúveis (Figura 6).

As enzimas hidrolíticas sozinhas, no que se refere às limitações do coquetel, não oferecem mais uma melhoria no processo de degradação da celulose. E é nesse cenário que entram as enzimas não-hidrolíticas – por exemplo as enzimas oxidativas – que vieram aumentar de forma significativa a eficácia do processo de degradação da biomassa.⁸⁷

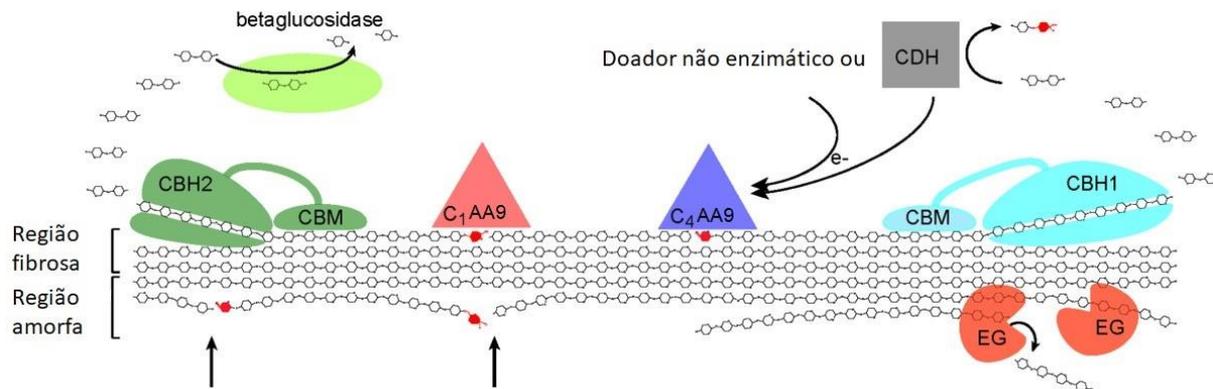


Figura 6 - Esquema de degradação completa da celulose. CDH: celobiose desidrogenase; AA9: monooxigenase lítica de polissacarídeo que atuam no C4 ou C1 da ligação β-1,4; CBM: módulo de ligação à celulose; CBH1: celobioidrolase de terminais reductores; CBH1: celobioidrolase de terminais não-reductores. EG: endoglucanase.

Fonte: Adaptada de HORN⁸⁸

As enzimas oxidorredutoras, como as monooxigenases líticas de polissacarídeo (LPMO, do inglês, *lytic polysaccharide monooxygenase*), oxidam um dos carbonos das ligações glicosídicas (C1 ou C4) de nanofibrilas de celulose expostas na superfície, gerando aldona e lactona (Figura 6). Esse processo produz fragmentos insolúveis menores e mais finos.⁸⁹ Isso permite as hidrolases atuarem nessas regiões cristalinas altamente resistentes e promoverem uma degradação superficial mais rápida e completa.⁹⁰

As LPMOs são classificadas como atividades auxiliares (AAs) e são distribuídas nas famílias AA9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 no banco de dados CAZy. Historicamente, as AA9s eram conhecidas como GH61 (Figura 6) e as AA10s CBM33. As LPMOs também podem atuar em substratos não-celulósicos, como a AA9 de *Neurospora crassa*, que mostrou-se capaz de atacar xiloglucanos e glucomananos;⁹¹ também, uma LPMO da família AA10 de *Kitasatospora papulosa* mostrou-se capaz de atuar em xilano.⁹²

O mecanismo oxidativo das AA9 envolve um doador de elétrons, que é sugerido ser uma celobiose desidrogenase (CDH, do inglês, cellobiose dehydrogenase) – ou também outra glicose-metanol-colina oxidoreductase (GMC), como piranose oxidase, polifenol oxidase ou galactose oxidase⁹³ e um átomo de cobre, que é um ativador de oxigênio molecular.⁸⁷ Neste mesmo contexto, foi verificado que a lignina serve, também, como doador de elétrons. Dessa forma, a lignina durante o processo de degradação da biomassa passou a apresentar um papel essencial e, em vista do processo geral de sacarificação, seu papel deve ser cuidadosamente repensado e equilibrado.

1.7 HEMICELULASES, PECTINASES E ENZIMAS ATIVAS EM LIGNINA

A hemicelulose apresenta maior heterogeneidade e requer ampla atuação de enzimas para gerar seus monômeros constituintes em comparação a celulose. A cadeia principal da hemicelulose pode ser baseada em xilose, glicose e manose, conhecidos como: xilano, arabinoxilano (Figura 4), xiloglucano, manano, glucomanano, galactoglucomanano, galactomanano. Para a hidrólise desses polímeros são requeridas enzimas que atuam na cadeia principal desses polissacarídeos, enzimas que removem as cadeias laterais e enzimas acessórias.⁸⁶ As enzimas acessórias são capazes de hidrolisar as ligações dos grupos acetato e dos ácidos ferúlicos das ramificações.⁹⁴

As xilanases incluem as endoxilanases (EC 3.2.1.8), que atuam na cadeia principal de 1,4- β -xilano, liberando xilo-oligossacarídeos solúveis, que servem de substrato, junto com xilobiose, para as β -xilosidases (EC 3.2.1.37), que liberam xilose dos terminais não-redutores.⁹⁵ As mananases (EC 3.2.1.78) atuam no esqueleto galacto (gluco) manano, liberando predominantemente manobiose e manotriose, substratos para as β -manosidases (EC 3.2.1.25). E as xiloglucanases que hidrolisam especificamente a cadeia principal de xiloglucano (EC 3.2.1.151).

Regiões ramificadas da hemicelulose requerem a intervenção de outras enzimas que atuam nos resíduos de açúcar das cadeias laterais: α -L-arabinofuranosidases hidrolisam ligações 1,2- α e/ou 1,3- α , que ligam arabinose a cadeia de xilose (Figura 4); α -xilosidase (EC 3.2.1.177) hidrolisam resíduos de xilose ligados à cadeia principal do xiloglucano; α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), que hidrolisa ácido glucurônico da cadeia de xilano. As enzimas que atuam nas galactoses da cadeia lateral dos polissacarídeos são α -galactosidase (EC 3.2.1.22) e β -galactosidase (EC 3.2.1.23). E também a α -fucosidase (EC 3.2.1.51) que libera fucose da galactose ligada ao xiloglucano.⁹⁶

Para garantir a quebra total dos diferentes açúcares presentes nas ramificações, são necessárias enzimas acessórias.⁹⁷ As enzimas acessórias são, principalmente, da classe carboidrato esterases (CE) e incluem as esterases de acetil, que hidrolisam as substituições acetil e metil nos resíduos de xilose e glicose; as estereases de feruolil que quebram ligações éster entre ácido ferúlico e arabinose dos arabinoxilanos (Figura 4), esta última ligação éster está envolvida na ligação cruzada de xilano e lignina.⁹⁸⁻⁹⁹

As enzimas capazes de atuar em pectina são as mesmas descritas como enzimas que atuam nas cadeias laterais e enzimas acessórias dos polissacarídeos da hemicelulose, com adição das enzimas da família GH28, que são principalmente: endopoligalacturonases (EC

3.2.1.15), que hidrolisam o homogalacturonano internamente; exogalacturonases (EC 3.2.1.67), capazes de liberar um resíduo de galacturonato do terminal não-redutor da cadeia de galacturonano; rhamnogalacturonases (EC 3.2.1.171), que atuam na ligação do ácido galacturônico-(1-2)- α -rhamnose e as enzimas capazes de liberar açúcares simples de rhamnogalacturonano: α -rhamnosidase (EC 3.2.1.40), responsável por liberar rhamnose; e rhamnogalacturonano galacturonoidrolase (EC 3.2.1.173), que libera galacturonato. As esterases de carboidratos específicas que atuam nesse domínio são as acetil esterases de pectina (EC 3.1.1.-) e as metil esterases de pectina (EC 3.1.1.11). Por fim, existem ainda as polimetilgalacturonato liase (pectina liases, EC 4.2.2.10) e poligalacturonato liase (pectato liase, EC 4.2.2.2), que clivam polissacarídeos contendo ácidos urônicos.

Algumas das enzimas que são ativas em lignina são lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13), versátil peroxidase (EC 1.11.1.16) e lacase multicobre oxidase (EC 1.10.3.-). Lignina e versátil peroxidases podem atuar nos compostos de lignina não fenólicos mais recalcitrantes, enquanto lacase multicobre oxidase e manganês peroxidase oxidam diretamente componentes fenólicos da lignina.¹⁰⁰ Essas enzimas são classificadas com atividades auxiliares e estão reunidas na família AA1 e AA2. O potencial de despolimerização, modificação da lignina e a natureza promiscua em relação ao substrato apontaram para as potenciais aplicações biotecnológicas dessas enzimas como a detoxificação de moléculas orgânicas: degradação de corantes,¹⁰¹ estrogênios,¹⁰² bisfenol A,¹⁰³ entre outros.¹⁰⁴

CAPÍTULO II

O Secretoma de *T. terrestris* Cultivado em Bagaço de Cana-de-açúcar

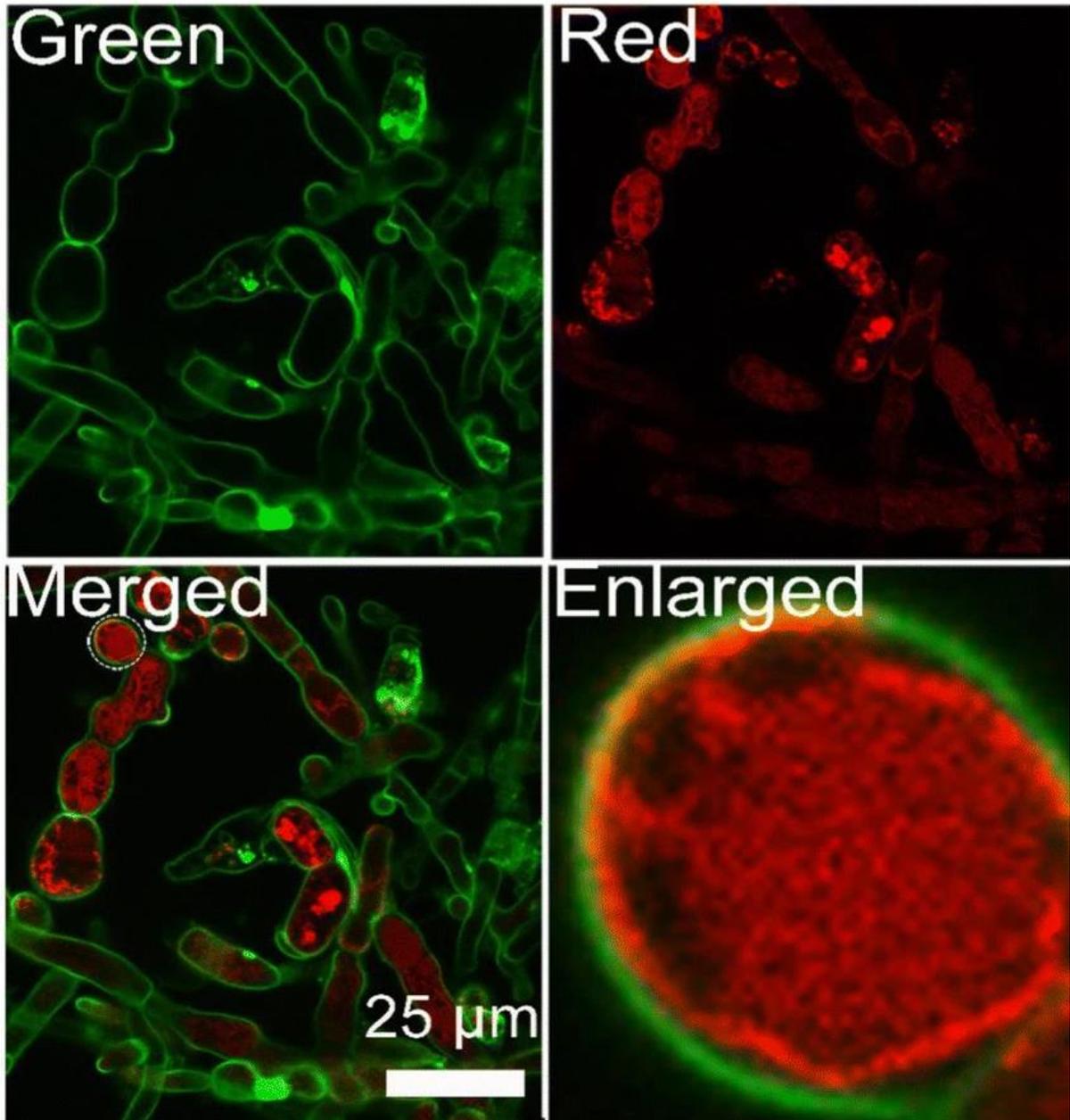


Figura 7 - Imagens confocais dos protoplastos da cepa de *Trichoderma reesei* expressando RBGL (β -glucosidase fusionada com *DsRed*; Vermelho) e corados com corante de membrana e parede celular (colesterol-PEG-FITC; Verde). *Green*: verde; *Red*: vermelho; *Merged*: combinado; *Enlarged*: ampliado.

Fonte: CHENGCHENG¹⁰⁵

Recentemente, o fungo filamentosso termofílico antes nomeado de *Thielavia terrestris* foi reclassificado para *Thermothielavioides terrestris*, após uma análise filogenética multigênica para resolver as relações filogenéticas das espécies atualmente conhecidas em *Thielavia* (Apinis). A etimologia refere-se à sua natureza termofílica e sua semelhança morfológica com *Thielavia sensu stricto*. As espécies *Thielavia* são distribuídas em uma ampla variedade de ecossistemas, vivendo em solos, desertos, solos alcalinos (pH acima de 11); podem ser fungicolous, endófitos, sapróbios; com diferentes temperaturas de crescimento incluindo as formas: psicotolerante, mesofílico, termotolerante ou termofílico.¹⁰⁶ *T. terrestris* cresce com temperatura ótima ≥ 45 °C, podendo ser encontrado em solo de pastagem seca e quente no Reino Unido, Japão, Malásia e Estados Unidos da América, é um fungo de podridão suave (do inglês *soft-rot*), tem aparência cotonosa (Figura 8) e apresenta uma limitada degradação da lignina.¹⁰⁷

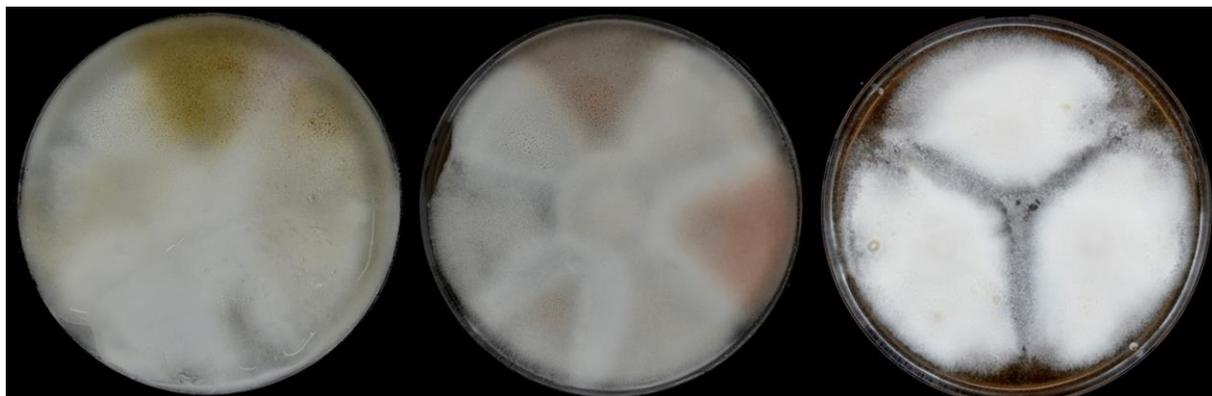


Figura 8 – Colônias de *T. terrestris*. Da esquerda para direita em ágar de aveia, de milho e de extrato de malte. Fonte: WANG.¹⁰⁶

Inicialmente, o fungo *T. terrestris* teve seu genoma sequenciado por Berka *et. al.*,⁴⁷ estes autores também sequenciaram o transcriptoma e anotaram o secretoma do fungo cultivado em 2% de glicose, alfafa e cevada como fonte de carbono. Os dados do secretoma apresentaram baixo número de proteínas, sendo apenas 56 simultaneamente identificadas no secretoma e no transcriptoma, uma vez que 789 transcritos foram sequenciados. Dessa forma, o estudo do secretoma é imprescindível para entender quais são de fato as entidades enzimáticas responsáveis pela degradação dos componentes da parede celular presentes no meio de cultivo.

O capítulo a seguir traz a caracterização e análise estatística do secretoma do fungo termofílico *Thermothielavioides terrestris* cultivado em meio mínimo líquido, bagaço de cana *in natura*, bagaço tratado com explosão a vapor e polpa kraft branqueada de eucalipto como únicas fontes de carbono.

2.1 OBJETIVOS

Identificar e caracterizar o arsenal enzimático secretado pelo fungo termofílico *T. terrestris* no processo de degradação da biomassa lignocelulósica como única fonte de carbono. Como biomassas foram escolhidas a polpa Kraft branqueada de eucalipto (BEKP), bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (SCBIN) e bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento de explosão a vapor (SCBSE).

2.1.1 Objetivos específicos

- ♦ Identificar a melhor forma de produção do pré-inóculo, garantindo homogeneidade e padronização;
- ♦ Preparar as biomassas para introdução no meio de cultivo sem contaminação e livres de açúcares simples;
- ♦ Realizar a dessorção e determinação das proteínas aderidas à biomassa para determinação da atividade do coquetel junto as proteínas solúveis durante os dias de cultivo;
- ♦ Acompanhar a atividade das proteases durante os dias de cultivo para estabelecer uma estratégia de escolha do melhor dia para identificação do secretoma por LC-MS/MS;
- ♦ Determinar a temperatura ótima dos coquetéis frente a atividade nas biomassas;
- ♦ Testar a atividade dos coquetéis nos diferentes polissacarídeos;
- ♦ Normalizar o espectro total dos secretomas;
- ♦ Anotar os domínios e funções das proteínas identificadas;
- ♦ Separar as CAZymes mediante ação sobre os domínios da parede celular de planta e fúngica;
- ♦ Realizar análises estatísticas de PCA, expressão diferencial e agrupamento de dados das CAZymes identificadas;

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A otimização da condição de cultivo do microrganismo foi primordial (não incluídos nessa Tese), pois as características morfológicas do fungo e do seu crescimento tiveram que ser consideradas para uma melhor manipulação. O teste de cultivo do fungo filamentoso *T. terrestris* em diferentes meios (sólidos e líquidos) produz diferentes taxas de crescimento, sendo

que em meio sólido sua aparência cotonosa e de coloração branca (Figura 8).¹⁰⁸ Essa característica dificulta a obtenção de conidiósporos por alça de inoculação para posteriores inoculações, sendo um processo moroso e pouco efetivo, assim, o uso do micélio era mais apropriado para propagação e inóculo.

O micélio foi mais facilmente obtido cultivando o fungo em meio mínimo, dessa maneira, os meios que possuíam fonte complexa de nutrientes, como triptona, extrato de levedura, extrato de malte, batata, pode introduzir um viés em um experimento que objetiva entender a captação do carbono unicamente através da biomassa lignocelulósica. O *T. terrestris* cresce com maior vantagem e adaptação no cultivo com a suplementação do meio com glutamina e tiamina conforme os testes iniciais com diferentes meios de cultivo.

2.2.1 Linhagens, meios de cultura, fonte de carbono e reagentes

O fungo *T. terrestris* linhagem UAMH 3264 utilizada neste trabalho foi adquirida da coleção de microfungos da Universidade de Alberta, Edmonton – Canadá. O fungo *T. terrestris* UAMH 3264 foi cultivado em meio mínimo, previamente descrito,¹⁰⁹ composto por: 50 mL de solução de Clutterbuck¹¹⁰ 20 vezes concentrado (em 1 L de água MilliQ: 120 g de NaNO₃, 10,4 g de KCl, 10,4 g de MgSO₄, 30,4 g de KH₂PO₄), 1 mL de solução de elementos traço 1000 vezes concentrada (em 100 mL de água MilliQ: 2,2 g ZnSO₄, 1 g de H₃BO₃, 0,5 g de MnCl₂.4H₂O, 0,5 g de FeSO₄.7H₂O, 0,16 g de CoCl₂.5H₂O, 0,16 g de CuSO₄.5H₂O, 0,11 g de Na₂MoO₄.4H₂O e 5 g de Na₂EDTA em pH 6,5), 1% de glicose e suplementado com: 0,1 mM de CaCl₂, 5 mM de glutamina e 2,4 µM de tiamina em pH 5,0.¹¹¹

Os meios de cultivo utilizados para compor o secretoma, em diferentes fontes de carboidratos, continham a mesma composição do meio mínimo de crescimento, mas a glicose foi substituída por 1% (m/v) da biomassa em estudo. Os pré-inóculos eram concebidos através do cultivo do fungo em meio sólido em placa de petri (meio mínimo suplementado e 15% de ágar). Os glicerinados para estoque em -80 °C continham 20% de glicerol e 10% de lactose.

As biomassas investigadas foram bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (SCBIN, do inglês, *sugarcane bagasse in natura*), bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (SCBSE, do inglês, *sugarcane bagasse steam exploded*) e polpa kraft branqueada de eucalipto (BEKP, do inglês, *bleached eucalyptus kraft pulp*). Exceto a polpa de celulose, todas as outras fontes foram lavadas com água à 60 °C repetidas vezes e secas em estufa à 60 °C. Todas as biomassas foram processadas por um moinho de facas com peneira de 1 mm. Dois frascos erlenmeyers para cada tipo de biomassa foi autoclavado com um agitador magnético e, depois de resfriados, foram

adicionadas as soluções de glutamina e tiamina, previamente esterizadas por filtração, sendo 1 L de meio o volume final para cada frasco.

Os substratos utilizados: (i) manano (alfarroba), (ii) galactomanano (alfarrobeira/baixa viscosidade), (iii) arabinano (beterraba), (iv) arabinogalactano (lariço), (v) celulose microcristalina (ou AVICEL), (vi) arabinano sem ramificação (beterraba), (vii) xiloglucano (semente de tamarindo), (viii) arabinosilano (trigo/baixa viscosidade), (ix) pectina galactano (tremoço), (x) xilano (faia), (xi) ácido poligalacturônico (pectina de citrus), (xii) β -glucano (cevada), (xiii) carboximetilcelulose (CMC), (xiv) liquenano (musgo) foram adquiridos de Megazyme. Reagentes de grau de biologia molecular foram adquiridos de Sigma-Aldrich. A polpa kraft branqueada de eucalipto foi cedida pela empresa Fibria Celulose S/A (Jacareí – SP), o bagaço de cana *in natura* foi cedido pelo Grupo Cosan (Ibaté - SP) e o bagaço de cana explodido a vapor pelo Prof. Dr. Valdeir Arantes (EEL/USP).

2.2.2 Condições de cultivo

O pré-inóculo do *T. terrestris* foi crescido em frasco erlenmeyer de dois litros com um litro de meio acrescido de glicose por 36 horas à 45 °C. Posteriormente, o meio foi filtrado em papel de filtro (Whatman No. 1) com o auxílio de frasco kitassato, funil de Buchner e bomba de vácuo. O micélio foi lavado sucessivas vezes com água MilliQ autoclavada para retirar a glicose, metabólitos e proteínas remanescentes. Por fim, o micélio filtrado foi colocado em um liquidificador autoclavado e homogeneizado com água MilliQ autoclavada. A concentração do homogeneizado foi estimada através do cálculo da massa seca de 1 mL da solução de micélio.

Para cada condição de cultivo nas diferentes fontes de carbono, realizou-se um teste controle, onde não foi adicionado o organismo, denominado “branco”. A quantidade de micélio inoculado foi de 200 mg e os frascos foram mantidos sob agitação de 160 rpm à 45 °C.

2.2.3 Avaliação do secretoma durante os dias de cultivo

2.2.3.1 Obtenção do secretoma

Durante o cultivo realizado por um período de 11 dias, 5 mL do meio foram coletados diariamente – o frasco foi mantido sobre um agitador magnético para garantir que a biomassa remanescente não decantasse durante a coleta – as amostras foram centrifugadas à 3500xg em tubo de 15 mL por 30 minutos, sob refrigeração. O sobrenadante foi coletado em tubo limpo e,

para dessorção das proteínas adsorvidas à biomassa, o precipitado foi ressuspenso em etilenoglicol (EG) 70% e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, homogeneizado e centrifugado novamente nas mesmas condições. Iguais volumes de sobrenadantes, obtido diretamente do meio de cultivo e o obtido após a dessorção por EG-70% foram misturados e concentrados por membrana de ultrafiltração através de coluna de centrifugação Vivaspin corte de 10 kDa (GE Healthcare Life Sciences), até o volume total da mistura ser igual a metade dela, compondo o que se chama de coquetel enzimático ou secretoma.

2.2.3.2 Concentração de proteínas totais do secretoma

A concentração de proteínas total dos sobrenadantes e da mistura entre eles foi estimada utilizando o método de Bradford¹¹². Uma curva padrão de BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) foi construída em diferentes condições de diluição: água, EG-70% e EG-35% para mimetizar as diferentes condições de solução das proteínas, minimizando a influência do EG na estimativa da concentração das proteínas. O valor do branco foi a medida da absorbância da solução do branco de cultivo (frasco que não era adicionado micélio do fungo). A reação foi realizada em placas de ELISA de 96 poços, com fundo chato, contendo 140 µL de água, 20 µL de amostra e 40 µL de reagente concentrado *Protein Assay Dye* (Bio-Rad), a medida da absorbância da mistura foi feita em microplaca de leitura em 595 nm em espectrofotômetro Infinite M200® espectrofotômetro (Tecan). As reações foram feitas em replicatas para ser reportado o valor médio e o desvio padrão de cada amostra.

2.2.3.3 Atividade de degradação da biomassa do secretoma

Os ensaios da atividade enzimática do coquetel durante os 11 dias de cultivo consistiam de 50 mg de biomassa, 2 µL de azida de sódio 10%, 900 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 e 100 µL de solução do secretoma de cada dia, sob agitação de 900 rpm em banho seco à 45 °C por 24 horas. Para cada coquetel (de cada biomassa), a atividade enzimática foi realizada na mesma biomassa de onde se originou. Após esse processo, a reação foi mantida em gelo e em seguida centrifugada a 13000g.

A concentração de açúcares redutores do sobrenadante foi mensurado pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), com leitura à 540 nm, adicionando iguais volume de reação e solução de DNS, seguido 5 min à 95 °C.¹¹³ O branco do ensaio seguiu as mesmas condições, sem adição do coquetel, que foi adicionado à mistura após a adição da solução de DNS,

suspendendo sua atividade. Todas as reações foram feitas em triplicata e para cada replicada experimental foi realizada triplicata de leitura da absorbância. Uma curva padrão de concentração de glicose foi utilizada para estimar a concentração de açúcares redutores na amostra. A medida da absorbância de 100 μL da reação colorimétrica foi feita em microplaca de leitura em espectrofotômetro Infinite M200® espectrofotômetro (Tecan).

Caso a absorbância das amostras extrapolasse os valores definidos da curva padrão, a solução colorimétrica das amostras era diluída. Para esse caso, foi calculada uma outra curva padrão com glicose, em que a solução também estava saturada e foi utilizada a mesma razão de diluição para leitura. Se os valores da absorbância ainda extrapolassem os dados da curva, era feito novamente uma nova diluição e outra curva padrão.

2.2.3.4 Atividade proteolítica do secretoma

Para medir a atividade de proteases, foi utilizada azocaseína para calcular a atividade proteolítica do coquetel. A reação consistiu em 125 μL de solução de azocaseína 2% em Tris-HCl pH 8,4 e 125 μL do coquetel encubados por 45 min à 45 °C. Após a incubação, adicionou-se 500 μL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% e manteve-se em gelo por 10 minutos. Após, centrifugou-se a reação e 350 μL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 350 μL de NaOH 1 M foi adicionado e incubado por 45 minutos em temperatura ambiente. A leitura da absorbância de 200 μL da solução foi feita em 440 nm em microplaca de leitura de 96 poços em espectrofotômetro Infinite M200® espectrofotômetro (Tecan). As leituras foram feitas em triplicata, o branco da reação foi conduzido sob as mesmas condições, mas no lugar do coquetel, adicionou-se água. Foi utilizado o coeficiente de extinção da azocaseína em 1 M de NaOH igual à 37 $\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para calcular a quantidade de azocaseína degradada.

2.2.4 Composição e caracterização do secretoma mais eficiente

2.2.4.1 Obtenção das amostras para composição do secretoma

Através dos resultados da relação entre a atividade de degradação do coquetel frente à biomassa pela quantidade de proteína total na reação, foi possível escolher o tempo de cultivo que apresentou uma maior razão. Assim, foi feito um novo cultivo para cada biomassa sob as mesmas condições de agitação, temperatura e massa de micélio inoculado. O fungo foi cultivado na presença de BEKP por 3 dias e na presença de SCBSE e SCBIN por 4 dias.

Os cultivos foram filtrados por gravitação em papel de filtro (Whatman No. 1) para separar a biomassa e o micélio remanescente. Este foi misturado com 400 mL de EG-70%, incubado a temperatura ambiente por 15 min, homogeneizado e filtrado em membrana novamente. Por fim, juntou-se as duas frações líquidas e filtrou-se com auxílio de bomba de vácuo com frasco kitassato, funil de buchner e filtro de papel. Em seguida, sucessivas filtrações a vácuo com filtro de vidro sinterizado, iniciando-se com um diâmetro do poro de 40-50 μm , após 20-30 μm e por final 5-10 μm . Posteriormente, o volume total das amostras foi concentrado, inicialmente, em dispositivo com agitação magnética Amicon Stired Cell (Millipore), utilizando membrana Biomax (Millipore), com corte de 10 kDa até um volume entre 50 e 100 mL. Então, esse volume foi reduzido para 2-3 mL com membrana de ultrafiltração através de coluna de centrifugação Vivaspin corte de 10 kDa (GE Healthcare Life Sciences). Aos volumes foi adicionado azida de sódio para impedir crescimento microbiano. A quantidade de proteína foi mensurada usando o método de Bradford como descrito anteriormente.

2.2.4.2 Análise de peptídeo do secretoma por LC-MS/MS

Para a visualização do perfil proteico do secretoma, 15-20 μg de coquetel foi submetido a separação completa por SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) 12% e corado com Coomassie Blue R-250.¹¹⁴⁻¹¹⁵ A imagem do gel foi obtida com o equipamento *Gel Doc EZ* (Bio-Rad) e pelo programa *Image Lab v. 6.0.1*. Quanto à identificação dos peptídeos por LC-MS/MS, a mesma quantidade de proteína de cada condição em triplicata foi submetido a 2-3 cm de separação em gel SDS-PAGE 12% usando o mesmo método acima e em seguida, o gel foi corado também e toda a extensão da separação de cada poço foi cortada e armazenada até envio ao Centro de Genômica e Proteômica da *Oklahoma State University* sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rolf Prade, onde foram processadas para a análise de LC-MS/MS.

A metodologia de preparação e identificação LC-MS/MS das amostras do gel seguiram o protocolo proposto por Voruganti.¹¹⁶ Os pedaços do gel foram lavados com 50% de acetonitrila em 50 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 desidratadas com 100% de acetonitrila e brevemente secadas. Os pedaços foram reidratados e reduzidos com 10 mM de tris (2-carboxietil) fosfina em 50 mM de bicarbonato de amônio por uma hora em temperatura ambiente. Depois da incubação, o tampão redutor foi substituído por 55 mM iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amônio e alquilado por uma hora em temperatura ambiente no escuro.

As amostras foram então enxaguadas com bicarbonato de amônio, desidratado com acetonitrila e reidratado/infiltrado com solução de tripsina $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 50 mM de bicarbonato de amônio. Depois da digestão *overnight* à 37°C , os peptídeos tripsinizados foram extraídos com 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA) e usados subsequentemente na análise de espectroscopia de massas sequencial acopladas a cromatografia líquida (LC-MS/MS), usando um espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific) e um sistema de cromatografia Eksigent NanoLC.

Os peptídeos oriundos da digestão foram analisados por aprisionamento em 5 cm de pré-coluna em configuração *vented column*, seguido por separação analítica em coluna de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 40 \text{ cm}$ empacotada manualmente com *beads Magic C18 AQ* de 1-3 μm , terminando com agulha emissora de aço inoxidável. Os peptídeos foram eluídos utilizando um gradiente de 0-40% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, durante 60 minutos a um fluxo de $250 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Conforme as populações de peptídeos eluíam, o efluente era ionizado por *nanospray* (*New Objective PV-550 nanoelectrospray*) e eram analisadas usando metodologia *Top Speed* de 3 segundos. Cada ciclo inclui uma varredura completa orbitrap FT-MS (espectrometria de massa com transformada de Fourier – resolução nominal de 120.000 FWHM, 300 a 1500 m/z) com o máximo possível de varreduras MS/MS dos dados dependentes. Os íons foram isolados para análise MS/MS usando um quadrupolo (largura de 1,6 m/z), a fragmentação foi gerada por CID (do inglês, *collision-induced dissociation*) e realizadas no setor *linear ion trap*. As configurações MS/MS incluíam: *trigger threshold* de 10.000 contagens; seleção precursor monoisotópico (MIPS sigla em inglês.); energia de colisão normalizada em 35%; ativação Q de 0,25 por 30 ms; rejeição de íons parentais, que tinham estados de carga não atribuídos, que foram previamente identificados como contaminantes em corridas de gradiente em branco, ou que tinham sido previamente selecionados por MS/MS (exclusão dinâmica a 150% da largura do pico cromatográfico observada).

Os arquivos brutos gerados pelo LC-MS/MS foram extraídos usando *extract_msn.exe* (Bioworks 3.3.1) e foram usados para pesquisa de banco de dados com Mascot v2.2.04 (Matrix Science) e X! Tandem v2007.01.01.1 (www.thegpm.org). Os espectros experimentais foram confrontados com os espectros teóricos gerados a partir do banco de dados não-redundante (nr) do *T. terrestris* linhagem NRRL 8126 depositados no NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*) com os seguintes parâmetros: 10 ppm de tolerância de massa do íon parental; 0,6 Da de tolerância dos íons fragmentados; uma única falha de clivagem tríptico; ciclização piroglutamato de glutamina N-terminal; oxidação de metionina; formilação ou acetilação de N-terminal de proteína; alquilação iodoacetamida de cisteína.

A validação dos peptídeos e das proteínas identificadas foi realizada usando o programa Scaffold versão 4.7.5 (*Proteome Software Inc.*) com parâmetros: *Protein Threshold: 5% FDR, Min # Peptides: 2, Peptide Threshold: 99%*. Os dados dos espectros foram convertidos para uma planilha do Excel, onde os espectros totais de cada uma das amostras foram normalizados e as médias das triplicatas e os desvios padrão foram calculados. Assim, os valores quantitativos da contagem do espectro total normalizado (NTSC, do inglês *Normalized Total Sepctrum Counts*) para uma dada proteína do secretoma reflete diretamente à quantidade de proteína secretada frente a fonte de carbono.

2.2.4.3 *Temperatura ótima do secretoma*

A reação de 1 mL continha 50 mM de tampão acetato de sódio pH 4,8, 0,02% de azida de sódio, 10 µg do secretoma e 20 mg de biomassa – de acordo com a origem do secretoma, a biomassa BEKP, ou SCBSE, ou SCBIN, era adicionada. As reações foram realizadas em triplicata sob agitação e nas temperaturas de 20 a 80 °C variando em 10 °C por 24 horas. A reação foi parada em banho de gelo, centrifugadas e o sobrenadante teve seus açúcares redutores revelados pelo método já proposto no item 2.2.3.3 – para cada replicata de reação foi feita uma triplicada de leitura da absorbância. Os brancos das reações foram conduzidos sob as mesmas variantes, todavia, o coquetel foi adicionado depois que a reação estava no gelo.

2.2.4.4 *Painel de substratos do secretoma*

A reação de 100 µL continha 1 µg de coquetel, 0,25% de substrato, tampão 50 mM de acetato de sódio pH 4,8, azida 0,02%. Devido a solubilidade a reação com os substratos de i) a vi) foi incubado por 120 minutos sob agitação, enquanto os substratos de vii) a xiv) sem agitação por 30 minutos. A temperatura para as reações foi baseada na curva de temperatura ótima e foram estabelecidas como: 40 °C para o secretoma do cultivo com BEKP e 60 °C para o secretoma de SCBSE e SCBIN. Os açúcares redutores foram determinados como proposto no item 2.2.3.3.

2.2.5 Anotação, apresentação gráfica e análise estatística da composição e atividade do secretoma em diferentes biomassas

Todas as sequências de proteínas identificadas foram verificadas com o auxílio do programa BLASTP,¹¹⁷ e a anotação da mais provável função da proteína pesquisada respeitou os seguintes parâmetros do alinhamento: $e\ value \leq e^{-10}$; identidade $> 50\%$; cobertura $\geq 80\%$. Os domínios da proteína eram consultados pelo banco de dados CDD (do inglês, Conserved Domains Database) do banco de proteína do NCBI.¹¹⁸ Quando identificado possível domínio de atividade em carboidrato (CAZy), era utilizado o programa SignalP (versão 4.1)¹¹⁹ para identificação de peptídeo sinal e o programa ProtParam¹²⁰ para computar os valores de massa, número de aminoácidos e ponto isoelétrico (pI). Para consultar a possível localização celular das proteínas, as sequências foram analisadas pelo programa FunSeckB2 que prediz a localização celular da proteína baseado no consenso de vários programas de predição¹²¹ e no DeepLoc-1.0.¹²²

Os termos GO das proteínas não CAZymes foram anotados através do correspondente termo KO gerado pela busca no banco de dados Kegg¹²³ através da sequência de aminoácidos. Quando não era retornado correspondência, o termo GO era anotado manualmente utilizando o site AmiGO.¹²⁴ Para cada busca, o KEGG retornava um valor de pontuação para o termo KO, que junto com o termo GO correspondente foi submetido ao programa REVIGO¹²⁵ para computar a frequência da função molecular dentro da lista de proteínas. Cada frequência é relacionada a um valor de ocorrência daquela função, uma vez calculada ocorrência, ela foi normalizada para incluir as CAZymes e as proteínas hipotéticas. Cada representante dentro de uma família CAZy e cada proteína hipotética contribuía com valor de ocorrência igual a um, dessa forma foi possível construir um gráfico do tipo *Treemap* utilizando o programa DrasticTreemap (Drastic Data).¹²⁶

As análises estatística de expressão diferencial das CAZymes entre os cultivos foram conduzidas utilizando o aplicativo XLSTAT para Microsoft Excel, em que foi aplicado o teste de ANOVA de uma via por característica e por grupo, para as correções do teste *post hoc* foi escolhido Benjamini-Hochberg e o nível de significância de 5%. As múltiplas comparações aos pares pelo teste de Tukey foram conduzidas para identificar as proteínas dentro dos cultivos cujo nível de expressão diferem significativamente entre si. As análises de atividade comparativa seguiram o teste de ANOVA e *post hoc* de Tukey. Após selecionadas as proteínas que diferem pelo menos entre um dos cultivos, foi conduzida uma análise de grupamento dos dados utilizando a ferramenta *Heat maps* com escala de cores de vermelho a verde através do

preto. Também análises de componentes principais do tipo covariância foi realizada utilizando o mesmo aplicativo, onde foi possível obter tabelas de correlação entre as variáveis/observáveis e fatores, \cos^2 das variáveis e das observações em relação as componentes principais e o gráfico *biplot* de correlação, coeficiente n/p, com corte para as variáveis de $\cos^2 = 0,75$.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização bioquímica dos coquetéis enzimáticos

O SCBIN é a biomassa remanescente do processo de moagem da cana de açúcar e possui 43,1% de celulose, 25,2% de hemicelulose e 22,9% de lignina. Em seguida, a SCBSE é uma biomassa pré-tratada por explosão a vapor, onde a componente hemicelulose é majoritariamente extraída, restando 6,6%, 57,5% de celulose e 32,5% de lignina.¹²⁷ Por fim, a BEKP que é basicamente uma biomassa branqueada apresenta 85,1% de celulose, 13,9% hemicelulose, 0,1% de lignina.¹²⁸ A biomassa sem pré-tratamento é mais complexa devido a presença da maioria das ligações entre as componentes da parede celular, que fidelizam a recalcitrância observada nessa fonte de carbono, enquanto a pré-tratada possui mais celulose, mas devido ao processo térmico, a lignina hidrofóbica se deposita novamente na forma de gotas sobre a parede celular para minimizar o efeito do contato superficial com a água, favorecendo a oclusão da fibra de celulose, diminuindo a acessibilidade as enzimas,¹²⁹ além de promover a absorção não-efetiva das mesmas sobre a parede celular.¹³⁰ Enquanto que a polpa kraft de eucalipto branqueada é uma biomassa majoritariamente de celulósica cristalina tipo: I α , I β e II,¹³¹⁻¹³³ uma vez que grande parte das regiões amorfas são atacadas durante o processo de *pulping*.¹³⁴

Para obter o maior conteúdo proteico para as análises, foi incluída uma etapa de lavagem da biomassa remanescente do cultivo para dessorção das enzimas potencialmente ligadas. O etilenoglicol 70% foi escolhido por ser eficiente em dessorver as proteínas ligadas e por não ser desnaturante.^{130,135-136} A Figura 9 mostra o perfil proteico secretado pelo fungo nas diferentes condições de cultivo em relação às proteínas livres e as adsorvidas. A concentração de proteínas adsorvidas corresponde a massa de proteína dessorvida dos 4 mL de EG-70% que corresponde ao cultivo dos 5 mL coletados.

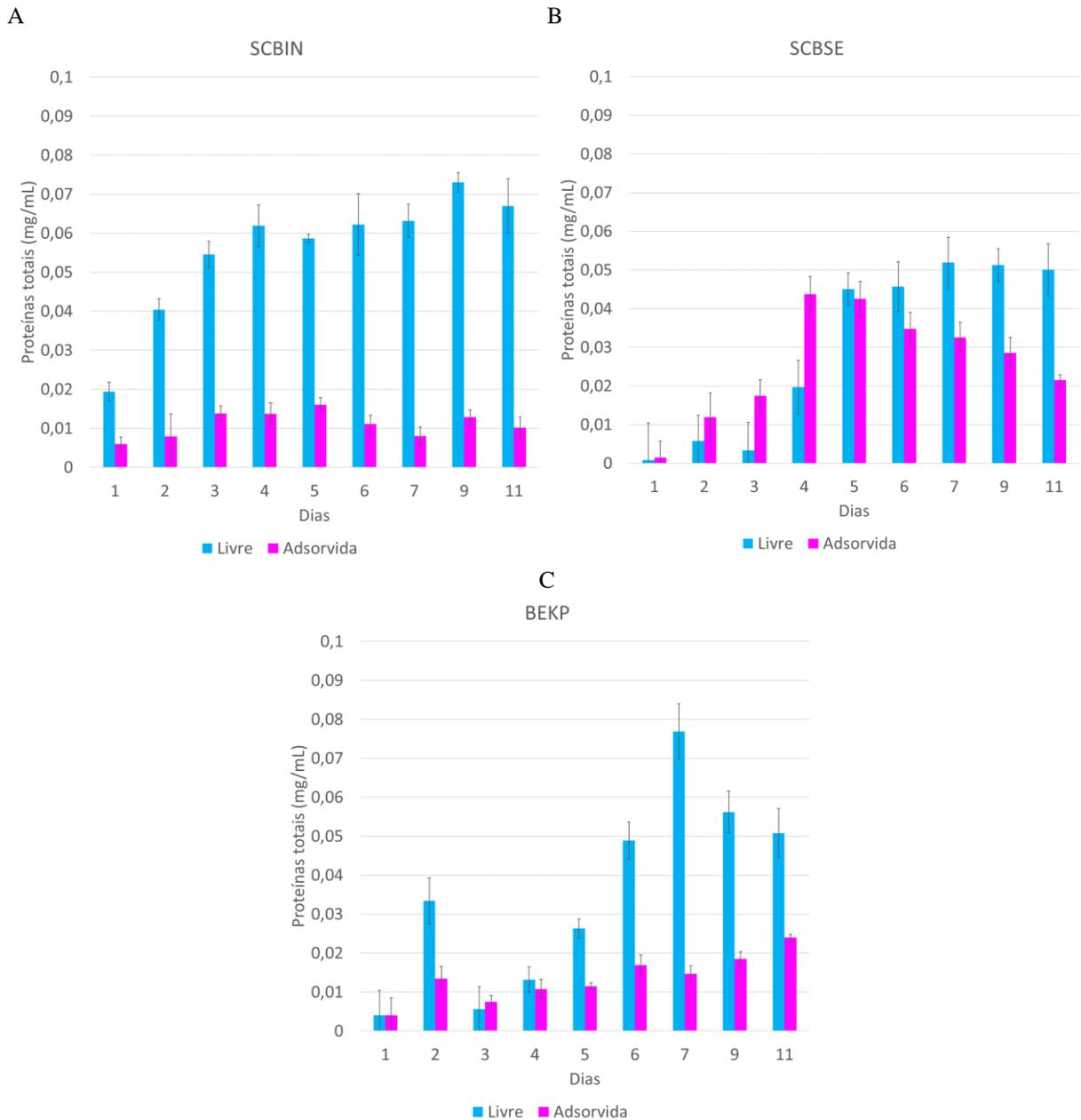


Figura 9 - Perfil das proteínas livres e adsorvidas à biomassa secretadas pelo fungo *T. terrestris* durante os dias de cultivo nas diferentes fontes de carbono. A) SCBIN. B) SCBSE. C) BEKP

Fonte: Elaborada pelo autor

O maior conteúdo de proteínas adsorvidas se encontra no SCBSE em comparação às outras biomassas (Figura 9), onde o maior conteúdo estava no sobrenadante. Isso se deve às mudanças estruturais sofrida pela lignina devido ao tratamento de explosão à vapor, que resulta em maior adsorção não produtiva das enzimas à biomassa.¹³⁰ Dessa forma, esse tipo de pré-tratamento introduz um alerta pois, pode dificultar a reutilização do coquetel em possíveis reatores e pode diminuir a população de enzima efetivas para realizar a hidrólise do bagaço de cana. Ao longo dos dias, a quantidade de proteínas livres em SCBSE aumenta até o quinto dia e depois varia muito pouco, enquanto que a quantidade de proteínas adsorvidas aumenta até o

4º dia e depois reduz conforme a biomassa é consumida no cultivo. Tendo como base o perfil proteico de SCBIN que, após atingido um platô de aproximadamente 0,08 mg/mL, mantém esse valor até o final, o alcance desse platô sugere estar relacionado com a adaptação ao meio de cultivo e consequente equilíbrio entre crescimento e despolimerização da biomassa. A condição BEKP atingiu esse equilíbrio após o sexto dia.

O experimento de atividade degradativa do coquetel, em razão da quantidade de proteínas adicionadas à reação (sobrenadante mais adsorvidas), foi realizado durante os dias de cultivo (Figura 10 A). Essa relação considerou a quantidade de proteínas livres mais desorvidas e foi utilizada como um guia para a análise das amostras por LC-MS/MS, juntamente com a atividade proteolítica das enzimas livres (Figura 10 B). Assim, foi escolhido o 3º dia para o cultivo em BEKP e 4º dia para SCBSE e SCBIN. Concomitante ao processo de hidrólise de biomassa, foi avaliado o poder proteolítico do coquetel durante os dias de cultivo. A reação do sobrenadante (sem a fração adsorvida) na presença de azocaseína revelou um decréscimo da proteólise no terceiro dia de cultivo em todas as biomassas analisadas e um aumento contínuo após esse período (Figura 10 B). Ao final dos dias de cultivo se observa alguns picos (Figura 10 A), mas baseado no gráfico da Figura 10 B), a quantidade de proteases no meio é bastante significativa e intensa, podendo atuar sobre as CAZymes durante a determinação da atividade do coquetel. O aumento da atividade proteolítica com o passar dos dias pode indicar carência de nutrientes (fome), dessa maneira, a escolha ficou focada nos dias iniciais do cultivo para melhor caracterização das enzimas, sem que as proteases influenciassem de maneira expressiva na degradação das proteínas e na contagem de espectros parciais das CAZymes.

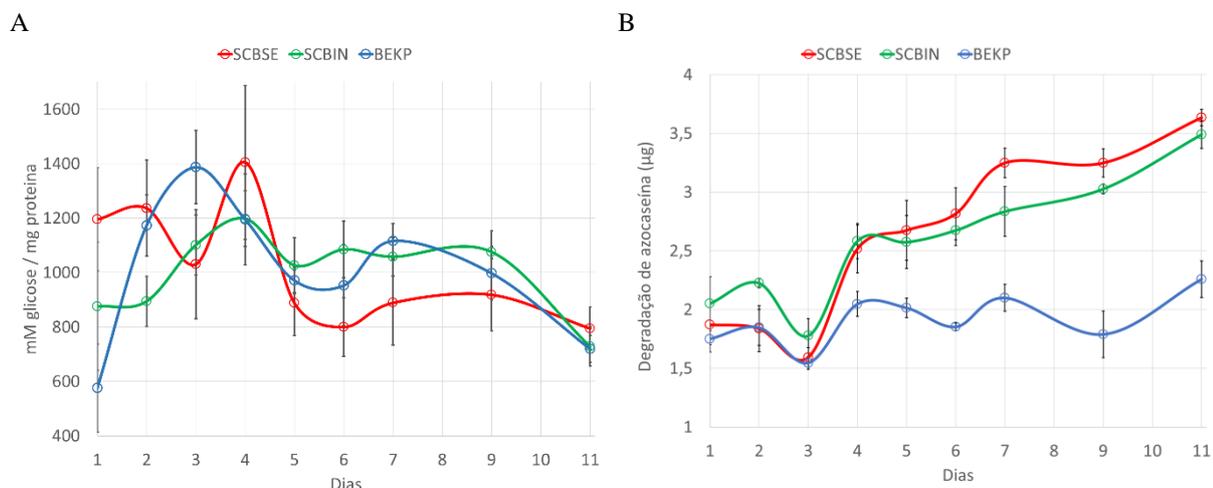


Figura 10 - A) Taxa de degradação da biomassa por quantidade de proteína secretada. B) Atividade de proteases secretadas em azocaseína em função da fonte de carbono.

Fonte: Elaborada pelo autor

O perfil SDS-PAGE de proteínas do secretoma do dia escolhido para cada tipo de cultivo está ilustrado na Figura 11. O arraste observado é devido a utilização de um extrato bruto do meio, em que a presença de inúmeros compostos podem interferir na coloração. A Figura 12 apresenta o gráfico da temperatura ótima de cada secretoma frente a biomassa de onde se originaram, com o intuito de estabelecer a melhor temperatura para a análise da atividade específica de cada coquetel, sobre substratos comerciais.

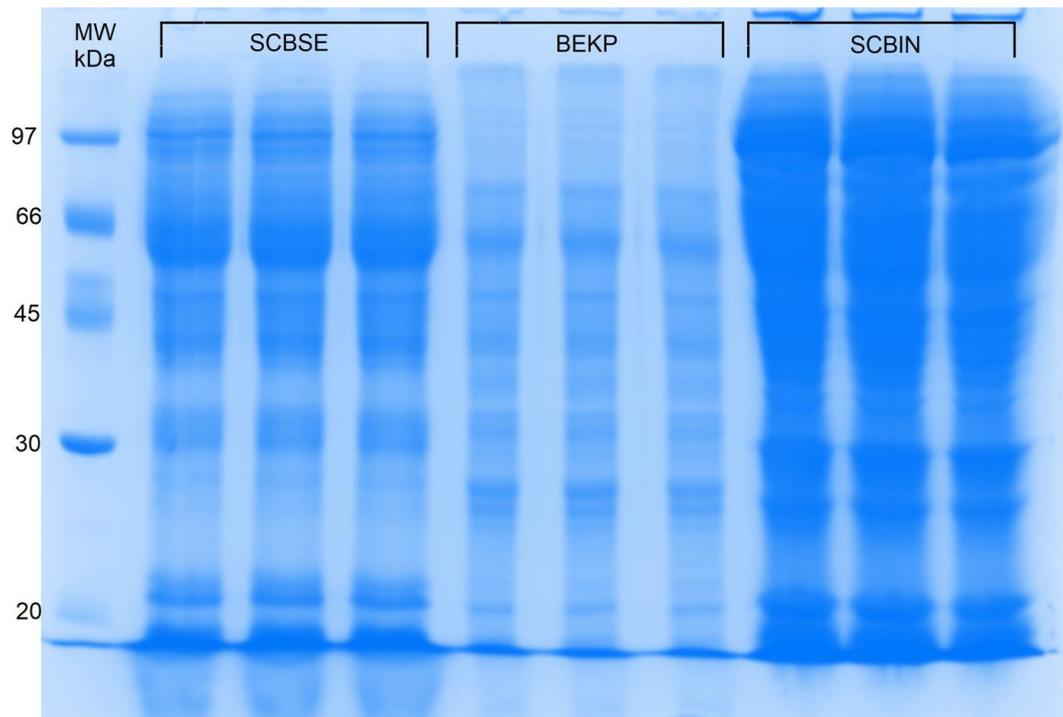


Figura 11 - SDS-PAGE do secretoma de cada tipo de cultivo.
Fonte: Elaborada pelo autor

A decomposição da biomassa por BEKP apresentou um platô entre 30 °C e 60 °C, sugerindo que as proteínas secretadas pelos fungos termofílicos contêm múltiplas enzimas degradativas, algumas das quais apresentam atividade em temperaturas que chegam 60 °C, enquanto outras demonstram atividade em torno de 40 °C (Figura 12).⁴⁷ Essa composição pode estar associada ao comportamento mesofílico latente do *T. terrestris*, que também está presente em muitos fungos termofílicos.⁴⁹ O perfil de temperatura ótima em SCBSE apontou um pico de atividade em 60 °C, sugerindo que um maior número de enzimas nesse secretoma apresentam maior atividade nessa temperatura do que as de BEKP por exemplo.

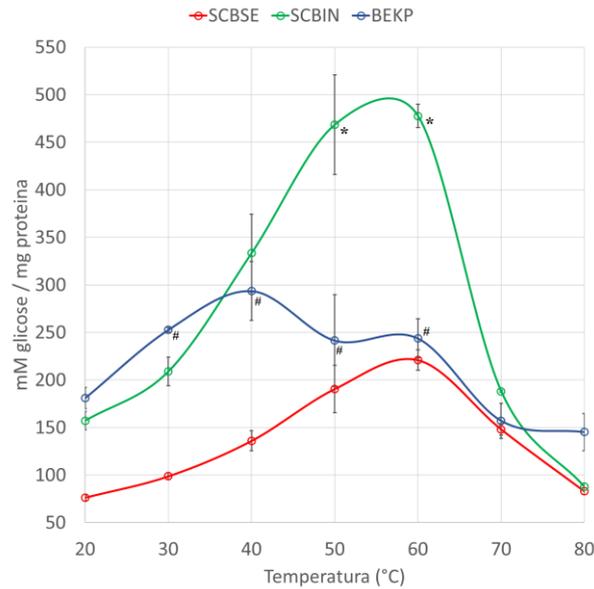


Figura 12 - Temperatura ótima de cada secretoma frente a biomassa de onde foram extraídas. Os asteriscos e os *hashtags* representam na análise post-hoc da ANOVA os valores de atividade com $p > 0,05$ entre as temperatura do mesmo secretoma, significando que a hipótese alternativa: existe diferenças entre as temperaturas foi rejeitada.

Fonte: Elaborada pelo autor

O painel de substratos (Figura 13) ilustra a especificidade de cada secretoma: SCBIN é um coquetel com ampla especificidade nos substratos testados; SCBSE tem maior atividade contra polissacarídeos de glucanos; BEKP apresenta efeito mais pronunciado nos substratos de hemicelulose e pectina do que SCBSE. Os valores do painel são referentes aos açúcares redutores na reação, não avaliando a atividade das enzimas oxidativas do C1 da ligação glicosídica. Portanto, a análise fica sujeita, basicamente, à atividade das hidrolases do coquetel e das oxidases do C4, pois a hidrólise preserva o grupo aldeído ou cetona livre para reação com o DNS.

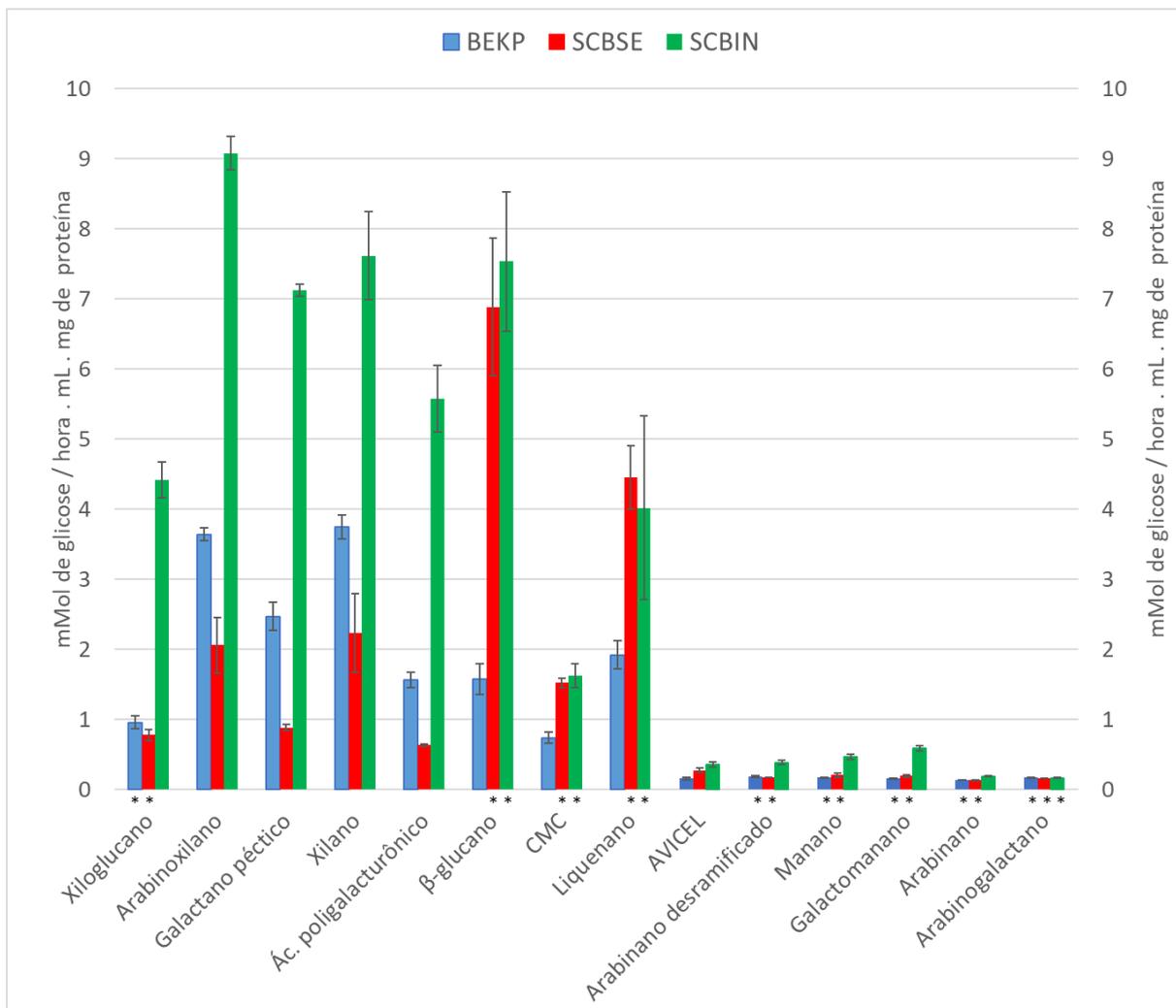


Figura 13 - Paineis de substratos do secretoma do *T. terrestris* produzido na presença de a) BBEKP, b) SCBSE e c) SCBIN. Os asteriscos representam na análise post-hoc da ANOVA os valores de atividade com $p > 0,05$ entre as atividades dos coquetéis em um dado substrato, significando que a hipótese alternativa: existe diferenças entre as atividades dos secretoma em um dado substrato foi rejeitada.

Fonte: Elaborada pelo autor

2.3.2 Análise da espectrometria de massas dos secretomas

Em termos quantitativos de expressão, a análise por LC-MS/MS, com uso dos filtros *Protein Threshold: 5% FDR*, *Min # Peptides: 2*, *Peptide Threshold: 99%*, totalizou 420 proteínas identificadas, sendo 6 contaminantes e 32 proteínas agrupadas por apresentarem peptídeos ambíguos. As possíveis funções moleculares das CAZymes foram apontadas baseadas em análises de alinhamento local (BLAST),¹³⁷ em acordo com os programas de anotação de domínios: CDD,¹³⁸ Pfam,¹³⁹ InterPro.¹⁴⁰ As proteínas com provável atividade em carboidratos foram divididas em categorias mediante a atuação ao substrato: celulases, hemicelulases, pectinases, enzimas atuando em carboidrato específico de parede celular de fungo (FCW, do inglês, *fungus cell wall*).

O total de 414 proteínas foram anotadas (união dos três secretomas), sendo que 48 são proteínas hipotéticas (HP, do inglês, *hypothetical protein*), 134 são possíveis enzimas com atividade em carboidrato (CAZymes), dos quais 35 possuem domínios de ligação ao carboidrato do tipo CBM, XynB e WSC (possível domínio de ligação ao carboidrato). Das proteínas hipotéticas, uma delas é a quarta mais secretada na condição SCBIN com peptídeo sinal predito, massa de 35,8 kDa e pI de 6,80.

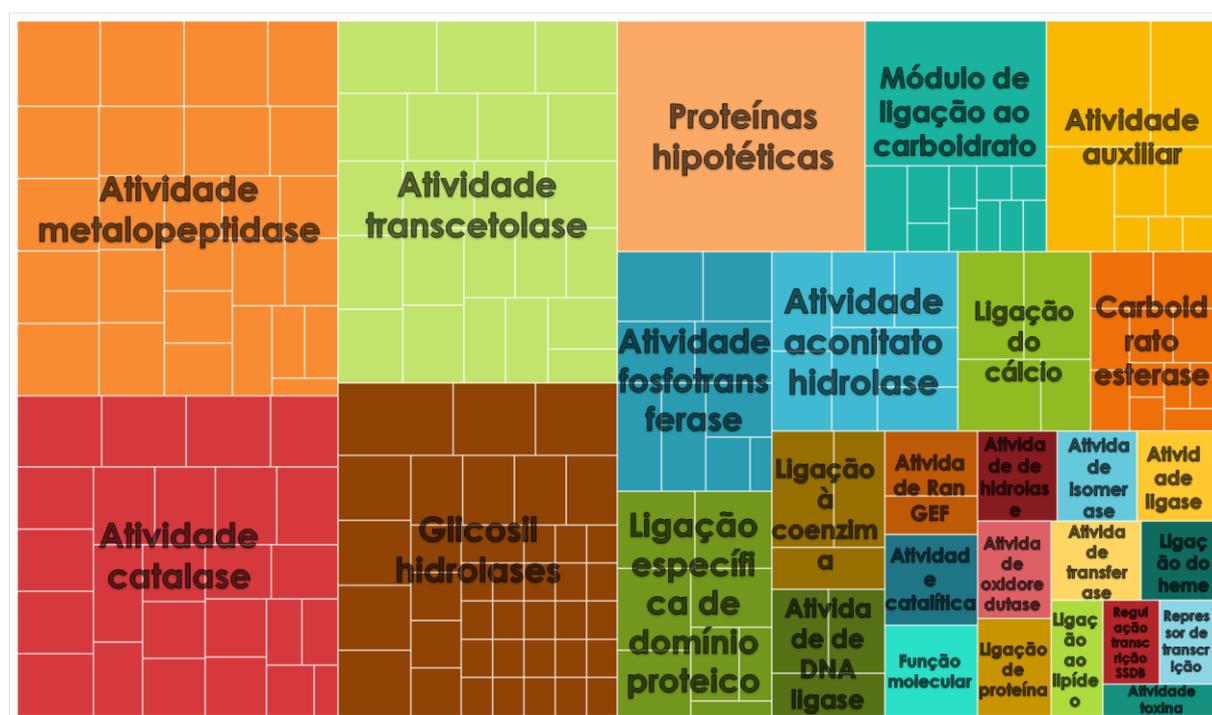


Figura 14 - Distribuição das diferentes funções moleculares das proteínas identificadas no secretoma do *T. terrestris*. As CAZymes foram separadas do agrupamento inicial de atividade e incluídas segundo suas classes CAZy. As divisões dentro de cada agrupamento colorido indicam os domínios relacionados àquela função. O retângulo “Função molecular” reúne funções não determinadas; GEF: do inglês, *Guanine nucleotide Exchange Factors*; SSDB: do inglês, *Sequence-Specific DNA Binding*.

Fonte: Elaborada pelo autor

O *treemap* da Figura 14 inicialmente foi construído utilizando REVIGO¹²⁵ e excluindo as CAZymes e HP, após, o gráfico foi complementado e normalizado com as HP e com as famílias CAZy contando o número de domínios GH, CE, AA e CBM encontrados. Por ele, podemos visualizar a distribuição de funções moleculares anotadas nos secretomas, em que cada divisão representa a função molecular descrita dentro de cada aglomerado (representados por cores). Das funções moleculares anotadas, foi anotada a presença de reguladores e repressores de transcrição e enzimas relacionadas com ligação ao DNA e domínios proteicos. Essas proteínas podem ser extremamente úteis para entender o comportamento do fungo no nível molecular e fornecer informações de promotores e repressores da expressão. Essas

informações servem de base para o desenvolvimento de novos plasmídeos de clonagem em fungo filamentososo e edição de genoma visando o estabelecimento de novos chassis de expressão heteróloga. Também, chama atenção funções moleculares relacionadas à via das pentoses fosfato, como transcetolase., sugerindo que o *T. terrestris* tem grande capacidade de utilizar açúcares de cinco carbonos.

Outras enzimas como as enzimas PAD (do inglês, *Pro-oxidant, Antioxidant, and Detoxification enzymes*) foram anotadas dentro dos secretomas analisados, elas são enzimas detoxificantes e modificadoras de lignina/fenol, como catalase, superóxido dismutase (SOD), peroxidase em geral, citocromo P450, glutatona S-transferase (GST) e aldo-ceto redutase, mas seus papéis específicos na degradação da lignocelulose ainda precisam ser elucidados.¹⁴¹

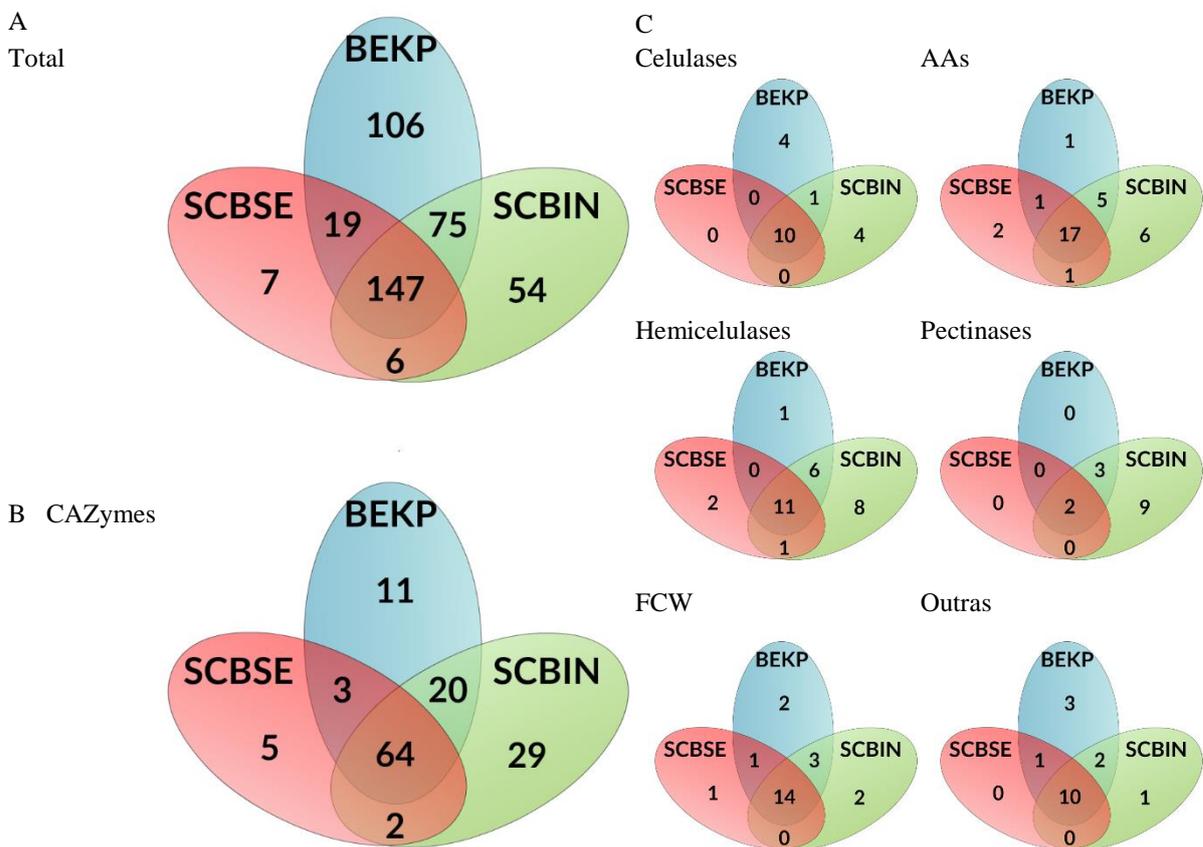


Figura 15 - Diagrama de Venn. a) Secretoma total; b) CAZymes totais; c) CAZymes organizadas por domínio de polissacarídeo.

Fonte: Elaborada pelo autor

A condição BEKP teve o maior número de proteínas identificadas pela análise de LC-MS/MS com 347 proteínas, seguido de 282 para SCBIN e 179 para o SCBSE (Figura 15 A). Majoritariamente, as classes CAZy mais presentes são catalase, metalopeptidase, transcetolase e glicosidases (Figura 14). Em relação as CAZymes, SCBIN totaliza 115, seguindo de 98 em

BEKP e 74 em SCBSE (Figura 15 B); outros diagramas de Veen para cada divisão das CAZymes identificadas pode ser visualizada na Figura 15 C).

A relação entre o número de CAZymes e o número total de proteínas identificadas foi, aproximadamente, 0,46 para SCBIN, 0,44 para SCBSE e apenas 0,33 para BEKP, refletindo diretamente na quantidade de enzimas presentes no secretoma. Pode indicar também as menores atividades observadas no painel da Figura 13 para BEKP, já que 33% do total de proteína adicionada às reações correspondem a CAZymes. Os valores de NTSC e número de enzimas para cada domínio está detalhado na Tabela 2. Por ele, a razão de NTSC pelo número de enzimas é maior para a condição SCBSE, demonstrando que a quantidade secretada pode estar diretamente ligada ao aspecto da biomassa em reter enzimas adsorvidas improdutivamente.

Tabela 2 - Valores do espectro total normalizado (NTSC) e o número (n.) de enzimas tipo CAZyme separado por domínio de ação e por tipo de cultivo. AAs: enzimas de atividade auxiliar; FCW: enzimas que atuam em parede celular de fungo.

Enzimas	BEKP		SCBSE		SCBIN	
	NTSC	n.	NTSC	n.	NTSC	n.
<i>Celulases</i>	70±10	15	104±20	10	84±10	15
<i>AAs</i>	100±20	24	130±20	21	140±20	29
<i>Hemicelulases</i>	30±10	18	40±20	14	90±20	26
<i>Pectinases</i>	11±2	5	6±2	2	46±8	13
<i>FCW</i>	60±12	20	80±20	16	70±10	19

Fonte: Elaborada pelo autor

A classificação das 5 proteínas mais abundantes em cada condição pelo *T. terrestris* (Tabela 3) chama a atenção, devido a presença de catalase-peroxidase nas condições BEKP e SCBIN e uma proteína hipotética que aparece no SCBIN a qual possui peptídeo sinal, mas função desconhecida. As catalase-peroxidases foram classificadas como AA2 segundo os bancos de dados consultados, uma vez que estudos apontam essas enzimas com capacidade de oxidar grupos fenóis da lignina.¹⁴² Um total de 20 proteases foram encontradas na análise e elas podem possuir um papel importante na despolimerização da parede celular, uma vez que as proteínas ricas em prolina/hidroxiprolina, alanina, serina e treonina são encontradas na parede celular e podem estar associadas com arabinogalactano II (arabinogalactano associado à proteína).¹⁴³

Tabela 3 - Classificação das proteínas mais secretadas pelo *T. terrestris*

BEKP			SCBSE			SCBIN		
Proteína	CAZy	NTSC	Proteína	CAZy	NTSC	Proteína	CAZy	NTSC
β -Glucosidase	GH3	21 \pm 3	Celobiosidase	GH7-CBM	31 \pm 3	celobiosidase	GH7-CBM	20 \pm 2
PGK		19 \pm 1	PGK		26 \pm 4	PGK		18,4 \pm 0,5
Celobiosidase	GH7-CBM	15 \pm 2	β -Glucosidase	GH3-CBM	25 \pm 3	Catalase-peroxidase		17 \pm 3
Catalase-peroxidase		15 \pm 2	CDH	AA3	24 \pm 3	GAPDH		15 \pm 3
Redutase de oxido nítrico		13 \pm 2	GAPDH		23 \pm 3	Proteína hipotética		14 \pm 2

Fonte: Elaborada pelo autor

Oito celulasas unicamente secretadas foram anotadas e são divididas entre as condições BEPK e SCBIN; uma AA1, uma AA3 e duas GH16: endo-1,3-1,4-glucanase e liquenase foram encontradas apenas em SCBSE e 4 AA9 apareceram apenas em SCBIN, juntamente com duas AA8. Nenhuma enzima da família AA2 foi reportada em CAZy database para *T. terrestris*, mas em BEKP e em SCBIN foram encontradas uma enzima AA2 catalase-peroxidase, possivelmente envolvida no processo de defesa contra a produção de H₂O₂, podendo atuar em uma ampla gama de compostos aromáticos.^{142,144} Curiosamente, uma catalase-peroxidase com domínio WSC foi encontrada unicamente em BEKP e uma catalase-peroxidase 2 está presente em todas as condições. Vinte possíveis CAZymes anotadas não constam no CAZy database, dentre as quais uma GH55, 11 AAs, 6 CEs e 2 com domínios CBM sem domínio catalítico caracterizado.

2.3.3 Análise estatística e de agrupamento das CAZymes

Avaliando a resposta do organismo entre a biomassa *in natura* e a biomassa pré-tratada, seja ela por explosão a vapor ou branqueada, as análises estatísticas da expressão diferencial da quantidade de proteínas presentes em cada condição são capazes de apontar quais delas sofreram modulação induzida pelo pré-tratamento, sendo possível observar quais proteínas possuem caráter essencial na estratégia de obtenção de energia frente a fonte disponível (Figura 16).

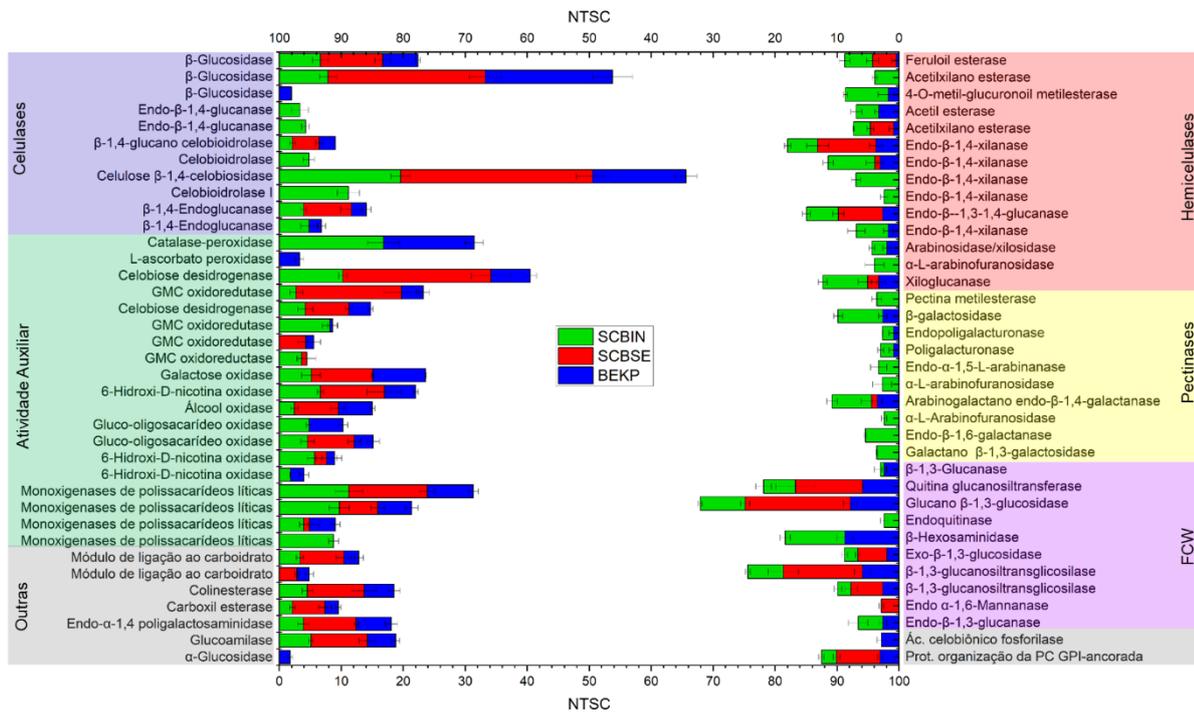


Figura 16 - NTSC das CAZymes diferencialmente secretadas entre os secretomas. Os retângulos coloridos representam os principais domínios polissacarídicos de atividade das enzimas.

Fonte: Elaborada pelo autor

A análise estatística das CAZymes, identificou 73 enzimas diferencialmente secretadas ($p < 0,05$) entre as três condições (Figura 16) e 13 HP diferencialmente secretadas entre as condições (dados não-mostrados). A análise e PCA foi conduzida para revelar a distinção entre os secretomas e quais as principais enzimas responsáveis pela variância observada entre eles através do mapa fatorial *biplot* (Figura 17), em que os fatores 1 e 2 explicam 92,79% da variância observada entre todas as condições. O Fator 1 representa 90% da variação em SCBSE, 72% em SCBIN e 15% em BEKP e corresponde a 70,49% da variabilidade dos dados, enquanto que o Fator 2, representa 76% da variabilidade presente em BEKP, mas compreende apenas a 22,29% da variabilidade de todas as condições de cultivo.

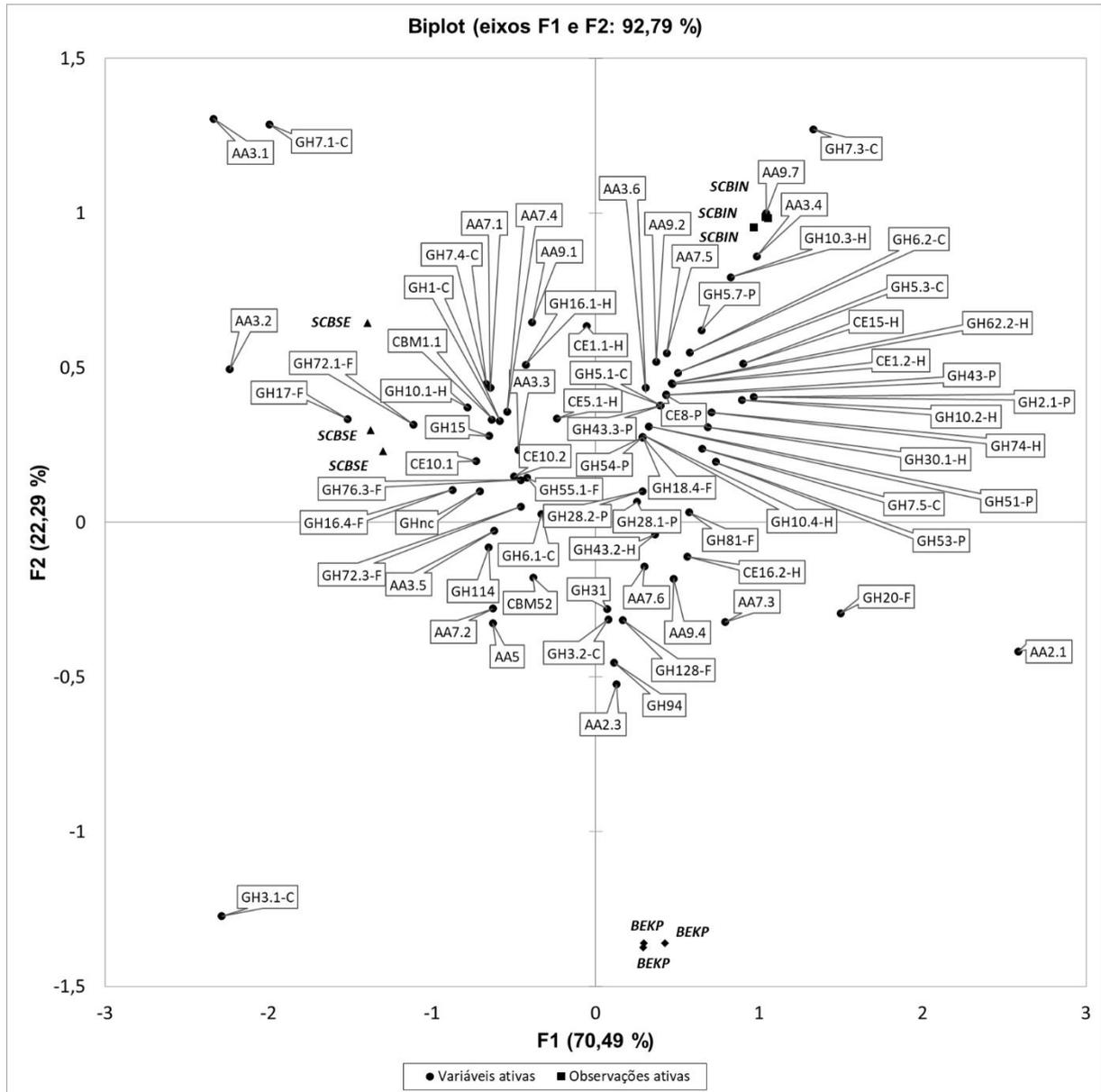


Figura 17 - *Biplot* de correlação da análise de PCA das enzimas com $\cos^2 > 0,7$ de acordo com o secretoma de origem. Principal domínio de atividade, C: celulose; H: hemicelulose; P: pectina; F: FCW. O número após o ponto identifica uma única enzima da família.

Fonte: Elaborada pelo autor

Considerando as contribuições (cosseno²) das variáveis descritivas igual ou maior que 0,75, o secretoma BEKP está correlacionado positivamente com GH3.2 (β -glucosidase), AA2.3 (L-ascorbate peroxidase), GH31 (α -glucosidase), GH94 (ácido celobiônico fosforilase), e negativamente com CE1.1 (feruloil esterase) como característicos de seu secretoma. O SCBSE apresenta correlação positiva com GH76.3 (endo α -1,6-mananase), GH17 (glucano β -1,3-glucosidase), GHnc (nc: do inglês, *non classified*; relacionada com proteína GPI-ancorada de organização da parede celular ecm33), AA3.1 (celobiose desidrogenase), AA3.2 (GMC oxidoreductase), GH55.1 (exo β -1,3-glucosidase), GH114 (endo- α -1,4 poligalactosaminidase),

AA7.2 (álcool oxidase), GH15 (glucoamilase), GH6.1 (β -1,4- celobioidrolase), GH72.1 (β -1,3-glucanosil transglicosilase), CE10.2 (carboxil esterase), GH72.3 (β -1,3-glucanosil transglicosilase), AA3.3 (celobiose desidrogenase), AA3.5 (GMC oxidoreductase), e CE10.1 (colinesterase). Enquanto o secretoma em SCBIN é correlacionado positivamente com uma GH2.1 (β -galactosidase), GH20 (β -hexosaminidase), AA7.3 (gluco oligosacarídeo oxidase), AA2.1 (catalase-peroxidase), GH10.2 (endo- β -1,4-xilanase), CE16.2 (acetil esterase), GH43.2 (β -1,4-xilosidase), GH7.5 (β -1,4-endoglucanase), GH53 (endo- β -1,4-galactanase), GH81 (endo- β -1,3-glucanase) e GH28.1 endopoligalacturonase). De acordo com o fator 1, os secretomas de SCBIN e SCBSE são negativamente correlacionados.

O gráfico da intensidade das celulasas e enzimas com atividade auxiliar diferencialmente secretadas (Figura 16) mostram que as distintas condições de fonte de carbono modularam os níveis de secreção destas proteínas. Na condição SCBSE houve um aumento da secreção das enzimas celulolíticas como: celulose 1,4- β -celobiosidase GH7, β -glucosidase GH3, β -glucosidase GH1, β -1,4-endoglucanase GH7 e β -1,4-glucano celobioidrolase GH6. A condição BEKP contém uma β -glicosidase GH3 exclusivamente secretada e a condição SCBIN possui enzimas exclusivas da família GH6 e GH5.

A atividade contra substratos celulósicos, mensurada para as três condições, é distinta em AVICEL ($p < 0,05$), enquanto que em CMC, SCBIN e SCBSE são semelhantes e maiores do que em BEKP (Figura 13), visto que é a condição com menor quantidade de celulasas detectadas. Era esperada alguma diferença estatística de celulasas em BEKP em relação aos cultivos que pudesse gerar hipóteses a respeito da utilização de biomassa branqueada. No entanto, no conteúdo de celulasas anotados não foi identificada nenhuma em especial para o BEKP, o que sugere que a celulose disponível nas diferentes biomassas não regule a expressão diferencial de nenhuma celulase em particular, levando a hipótese de que a degradação da celulose esteja relacionada a um mecanismo sinérgico entre as enzimas secretadas, ao passo que o secretoma se caracteriza pela intensa atividade hidrolítica e oxidativa. Também, a atividade do painel pode estar mascarada devido ao método de detecção de açúcares redutor utilizado para mensurar a atividade, excluindo a lise da ligação glicosídica dos polissacarídeos oxidados no C1.

Na condição SCBSE em relação aos outros, o aumento observado das celulasas foi acompanhado pelo aumento em AAs, principalmente, por uma celobiose desidrogenase (CDH), previamente descrita,¹⁴⁵ e uma GMC oxidoreductase. Outras enzimas de atividade auxiliar tiveram um aumento discreto nessa condição, como AA9 e AA7. A presença de CDH, AA3 e AA12 no secretoma do *T. terrestris*, pode estar relacionadas com a transferência de elétrons entre elas e as AA9s.¹⁴⁶⁻¹⁵⁰ Em termos de NTSC, a relação entre as AA9 e AA3, identificadas

nas condições SCBIN e SCBSE, são invertidas: enquanto SCBIN tem mais NTSC para AA9 do que para AA3, SCBSE apresenta mais para AA3 do que para AA9, sugerindo que a presença de lignina na biomassa não-tratada seja uma possível fonte de elétrons para a atividade oxidativa das AA9.¹⁵¹⁻¹⁵²

Por outro lado, os aumentos da expressão de AA3 e AA7 podem estar relacionados à sinergia observada entre CDH e CBH I,¹⁵³ possivelmente, também entre oxidases de oligossacarídeo e celulases/xilanases,¹⁵⁴ em que a formação dos ácidos glucônicos a partir do produto das CBH atenuaria o *feedback* negativo sofrido pelas celulases/xilanases.¹⁵⁵⁻¹⁵⁶ Ainda em relação a atenuação promovida pela formação de oligossacarídeos oxidados, a detecção de uma ácido celobiônico fosforilase GH94 na condição BEKP aponta para uma possível solução ao processo de inibição pelo produto, que β -glucosidases podem sofrer quando atuam sobre ácido celobiônico – produto da ação combinada de AA9 e CBH, e da CDH sobre celobiose. O ácido D-glucônico, formado pela catálise da β -glucosidase, atua como um forte inibidor não-competitivo delas, além de ser um substrato ruim,^{152,157} o que pode comprometer a obtenção de carbono pelo fungo. Dessa maneira, é sugerido que a ácido celobiônico fosforilase, GH94, tem um papel importante em muitos fungos celulolíticos, pois catalisa a conversão reversível intracelular de ácido celobiônico em glicose fosfato e ácido D-glucônico, onde são convertidos em metabólitos secundários e direcionados para vias como a glicólise e a via das pentoses fosfato.¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ A geração de produtos potencialmente inibidores pela degradação de oligossacarídeos oxidados, mais a presença de fosforilases, podem indicar uma adaptação evolutiva de microrganismos oxidativos frente a competitividade pela captação de carbono na natureza. Isso ainda levanta hipótese a respeito da estrutura e função das β -glicosidases e CBHs do *T. terrestris*, que podem responder de modo diferente ao *feedback* negativo dos tipos de produtos.¹⁶⁰

Em relação à cana-de-açúcar, por volta de 10% da composição da parede celular é de β -glucano,¹² com isso, a menor expressão diferencial de uma endo- β -1,3-1,4-glucanase em BEKP (Figura 16) pode ser uns dos motivos pela menor atividade observada em β -glucano e liquenano desse coquetel (Figura 13), gerando pouca sinergia devido à baixa expressão de enzimas que atuam em substrato com ligações glicosídicas β -1,3-1,4. Levando em conta que as celulases podem atuar em β -glucano, o NTSC desses tipos de enzimas em BEKP também é o menor dos três coquetéis.

A composição da parede celular da cana-de-açúcar conta com 8% de pectinas, dentre as quais homogalacturano, arabinogalactano e arabinano.¹² Analisando aos substratos pécticos do painel da Figura 13, em galactano péctico, em que SCBIN é o coquetel mais ativo, seguido por

BEKP e SCBSE, a diferença pode corresponder à expressão diferencial de endo- β -1,4-galactanase GH53 entre as condições.¹⁶¹ Diferentemente em arabinogalactano, em que as endo- β -1,6-galactanase GH5 e galactano- β -1,3-galactosidase GH43 unicamente secretadas em SCBIN e β -galactosidase GH2 (Figura 16) não foram suficientes para produzir diferenças significativas ($p=0,106$) de atividade entre os coquetéis. A natureza mais solúvel dessa pectina pode ser perdida durante o processo de moagem nas usinas^{14,162} e constituir uma fração menor da fonte de carbono SCBIN emaranhado à celulose. Isso sugere que essas enzimas secretadas diferencialmente possam ser específicas a estrutura de arabinogalactano da cana-de-açúcar e não a de lariço do painel, onde o resíduo β -1,6-galactopiranosose (Galp) ligado ao esqueleto β -1,3-Galp pode conter resíduos α -1,4-L-arabinofuranose (Araf) ou β -1,6-Galp; diretamente a cadeia principal podem estar ligados também β -1,4-Galp-1,6- β -Galp, ou α -1,6-Araf (informação disponível do substrato comercial da MEGAZYME). A atividade apresentada no painel pode ser devido às enzimas capazes de atuar em arabinogalactano de lariço, mas que são igualmente presentes nos secretomas.

O polissacarídeo majoritário na pectina de cana-de-açúcar é o homogalacturonano,¹² em que a metil-esterificação de ácido galacturônico desempenha um papel nas propriedades físicas da pectina,^{14,163} em vista disso, uma metil esterase de pectina CE8 é unicamente secretada em SCBIN (Figura 16), o que sugere estar relacionado com a trans-esterificação de ligações metil éster em homogalacturano, facilitando sua degradação por poligalacturonases. A atividade do coquetel SCBIN em ácido poligalacturônico indica a presença de enzimas (GH28) capazes de atuar nesse polissacarídeo e em sinergias com as CE de pectina, uma vez que endopoligalacturonases preferem substratos não-esterificados.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵

As acetil esterases e também CE16 podem promover a deacetilação de xilanos para que xilanases possam degradar completamente esse polissacarídeo.¹⁶⁶ As feruloil esterases (Figura 16) são importantes enzimas na desesterificação de polissacarídeos como pré-tratamento da biomassa para facilitar o acesso das hidrolases e oxidases de glicosídeo aos polissacarídeos interligados por ésteres de feruloil ligados à arabinoses e galactoses terminais em hemicelulose e pectinas; além de outras aplicações biotecnológicas, como na produção de compostos fenólicos com capacidade antioxidante.¹⁶⁷

A presença de arabinoxilano (40%) e xiloglucano (8%), em cana-de-açúcar¹² sugere que essas componentes sejam responsáveis pela expressão e diversificação das enzimas em SCBIN, capazes de atuar em polissacarídeos baseados em xilose. A expressão de endoxilanases, principalmente GH10, arabinofuranosidases, β -xilanases (Figura 16), podem ser responsáveis

pela alta atividade do coquetel SCBIN nos substratos testados: arabinoxilano, xiloglucano e xilano, uma vez que os outros coquetéis possuem menores quantidades dessas enzimas.

Há também a necessidade de se correlacionar xilanases com arabinofuranosidades, visto que arabinoxilano é o maior constituinte da hemicelulose e a sinergia entre essas enzimas leva à sacarificação completa desse polissacarídeo. Nesse sentido, destaca-se a presença de uma α -L-arabinofuranosidade GH62 diferencialmente secretada em SCBIN, o que pode contribuir com as diferenças observados no painel da Figura 13, muito embora uma outra GH62 esteja presente em SCBSE, mas em baixa quantidade.

O xiloglucano é a hemicelulose que mais interage fortemente com a celulose através de ligação de hidrogênio. Ele pode ser encontrado em menor quantidade na parede de cana-de-açúcar (SCBIN) e em maiores quantidades na parede de dicotiledôneas, como o eucalipto.^{14,168} Em vista disso, mediante a presença de 13,9% de hemicelulose no BEKP, acredita-se que reste uma parcela aderido à celulose após os tratamentos de *pulping* e branqueamento, o mesmo pode ser sugerido para o SCBSE. Dessa forma, a xiloglucanase presente nos três secretomas (Figura 16) indica que essa enzima tem participação na clivagem desse polissacarídeo fortemente aderido à celulose, para dar acesso às enzimas que atuam nela. A atividade nesse polissacarídeo, no painel da Figura 13, reflete a proporção dessa enzima nos secretomas, o que pode estar relacionado ao conteúdo apresentado pelas biomassas desse polímero. Isso pode indicar um papel crucial dessa enzima durante o processo de degradação enzimática da celulose, que pode representar uma vantagem ao empecilho imposto por essa recalitrância.

A propósito, o coquetel de SCBIN é o único que apresenta uma GH10 (THITE_48486) codificada pelo gene *xynA*, sendo a segunda mais secretada dessa família. Já a GH10 mais secretada (THITE_2117649) nessa condição é codificada pelo gene *xynB* e não corresponde a mais secretada nas outras biomassas, sendo substituída por outra GH10 (THITE_2116333), passando a ser a segunda mais secretada nelas. Segundo estudos, a GH10 codificada pelo gene *xynA* é uma exo-oligoxilanase que pode atuar sinergicamente com endo-xilanase (*xynB*) no processo de infecção em plantas e obtenção de nutrientes.¹⁶⁹ Fazendo uma abordagem de biologia sintética, isso pode indicar que inicialmente os genes são co-expressos, após um limiar, a expressão do gene *xynA* é regulado pela presença de xilose, e a expressão *xynB* é regulado pela expressão de *xynA*. Quando não há xilose disponível, cessa a expressão de *xynA*, que em baixa concentração diminui a expressão de *xynB*. Dessa forma, parece que *xynA* apresenta um importante papel nas bases moleculares de degradação de xilano pelo *T. terrestris*.

A análise diferencial de expressão não apontou diferenças significativas entre manano endo- β -1,4-mannosidase GH5 ($p=0,183$) e α -galactosidase GH27 ($p=0,456$) identificadas no

secretoma, mas a atividade dos coquetéis frente aos substratos manano, galactomanano, foram capazes de produzir diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0,001$). Isso leva a suposição de que alguma enzima com outra função possa ter atividade nesses substratos, embora a presença, mesmo que baixa, de (gluco) manano pode ser encontrada em parede celular de cana de açúcar.¹⁹ Mas deve-se levar em conta as limitações estatísticas e outros fatores, como a taxa de descoberta falsa (FDR) para não "contar" espectros de baixa qualidade em LC-MS/MS – uma proteína presente em pequena quantidade em relação as demais pode fornecer medições quantitativas menos robustas,¹⁷⁰ podendo ser excluídas da lista de proteínas identificadas e prejudicar a quantificação precisa dessas enzimas.

Continuando, existe uma diferença significativa de atividade entre o arabinano desramificado e arabinano de beterraba (Figura 13) nos coquetéis (BEKP: $p=0,022$; SCBSE: $p=0,002$; SCBIN: $p=0,001$), que reflete a especificidade ao substrato das diferentes famílias de arabinofuranosidases: GH2, GH3, GH43, GH51, GH54 e GH62 (Figura 16).¹⁷¹ É possível elaborar que a endo- α -1,5-L-arabinanase GH43 pode atuar processivamente, ou não, em arabinano desramificado, fornecendo 1,5- α -L-arabinofuranosil oligosacarídeos pequenos, que servem de substratos para as GH51 abfA¹⁷² e também para GH62 e GH54. Já o polímero arabinano sofre principalmente ação das GH54 e GH62, que remove arabinofuranose da cadeia lateral, que são ligadas por α -1,3 ao esqueleto de arabinose. As GH43 também podem atuar em arabinano, mas muito devagar, podendo aumentar conforme as arabinoses da cadeia lateral vão sendo removidas. Assim, acredita-se que a diferença na atividade entre os tipos de arabinanos testados resida na maior sinergia entre as enzimas GH43 e GH51 abfA.

A secreção das enzimas que agem sobre parede celular de fungo, FCW (Figura 16) podem estar envolvidas em inúmeros processos quitinolíticos, dependendo da disponibilidade de substrato. A atividade em quitosana e a taxa de crescimento do microrganismo não foram medidos, mas a secreção dessas enzimas podem estar relacionadas à processos de modificação e reciclagem da própria parede celular (GH72, GH17, GH16),¹⁷³ fome (GH55, GH18, GH81), entre outras.¹⁷⁴ As enzimas GH72, GH17 e GH16 foram encontradas no mesmo nível nas culturas de *T. terrestris* em glucose, alfafa e aveia.⁴⁷ Mas a presente análise de proteínas diferencialmente secretadas não identificou o mesmo nível entre SCBSE, SCBIN e BEKP.

A análise de componentes principais, indica a correlação positiva entre as enzimas da família 76, 55, 16, 72, 17 e a GHnc com contribuição para o Fator 1 acima de 0,7 e localizadas no mesmo quadrante que se encontra a condição SCBSE (Figura 17). Assim, sugerindo que a expressão dessas enzimas contribui para as características desse coquetel, enquanto que GH20 e GH81 descrevem melhor SCBIN. Enzimas modificadoras de β -1,3-glucano (FCW) são

essenciais para a morfogênese de parede celular do conídeo e crescimento do micélio;¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ GH20 e GH18 são importantes para utilização de substratos quitinosos como fonte de nutrientes;¹⁷⁷ GH16 podem estar envolvidos na ligação entre β -1,6-glucano e quitina;¹⁷⁸⁻¹⁷⁹ GH76 são especuladas por estarem envolvidas na ligação cruzada de proteínas GPI-ancoradas na parede celular, atuando como transglicosilases;¹⁸⁰ enquanto que GH72 é provavelmente presa à membrana celular através de âncora GPI e pode estar associada à remodelação estrutural da parede celular fúngica, através do direcionamento da elongação de cadeias de β -1,3-glucano.¹⁷³ Por fim, embora sem classificação para a família CAZy, o registro da sequência *RefSeq* do NCBI da GHnc traz anotada a predição de uma âncora GPI, supondo que a enzima possa estar envolvida na remodelação da parede celular fúngica. Com isso, o conjunto dessas enzimas indicam uma atividade de biogênese, reestruturação e auto degradação da parede celular, que devido as características apontadas pela PCA, sugere ser maiores na condição SCBSE.

Uma característica da biomassa SCBSE é sua capacidade de adsorver celulases, de forma improdutiva, o que leva a diminuição do processo de obtenção de carbono pelo organismo. Esse efeito pode ser estressante para o microrganismo levando ao aumento observado no nível de síntese de algumas das CAZymes identificadas em SCBSE atuando em parede celular de planta. Concomitante a isso, a necessidade de síntese de novas enzimas pode estar relacionado com o crescimento de hifas exploradoras, que geralmente está associada com uma taxa de secreção enzimática maior.^{105,181} Isso corrobora a uma maior síntese das proteínas atuando em FCW observado em SCBSE, que supostamente podem ser responsáveis pela modulação e biogênese da parede celular das hifas. Outras proteínas mostraram expressão diferencial entre as fontes de carbono (Figura 16), como aquelas atuando em metabolismo primário e catabolismo (GH31, GH15), ou em galactosaminoglicano (GH114).

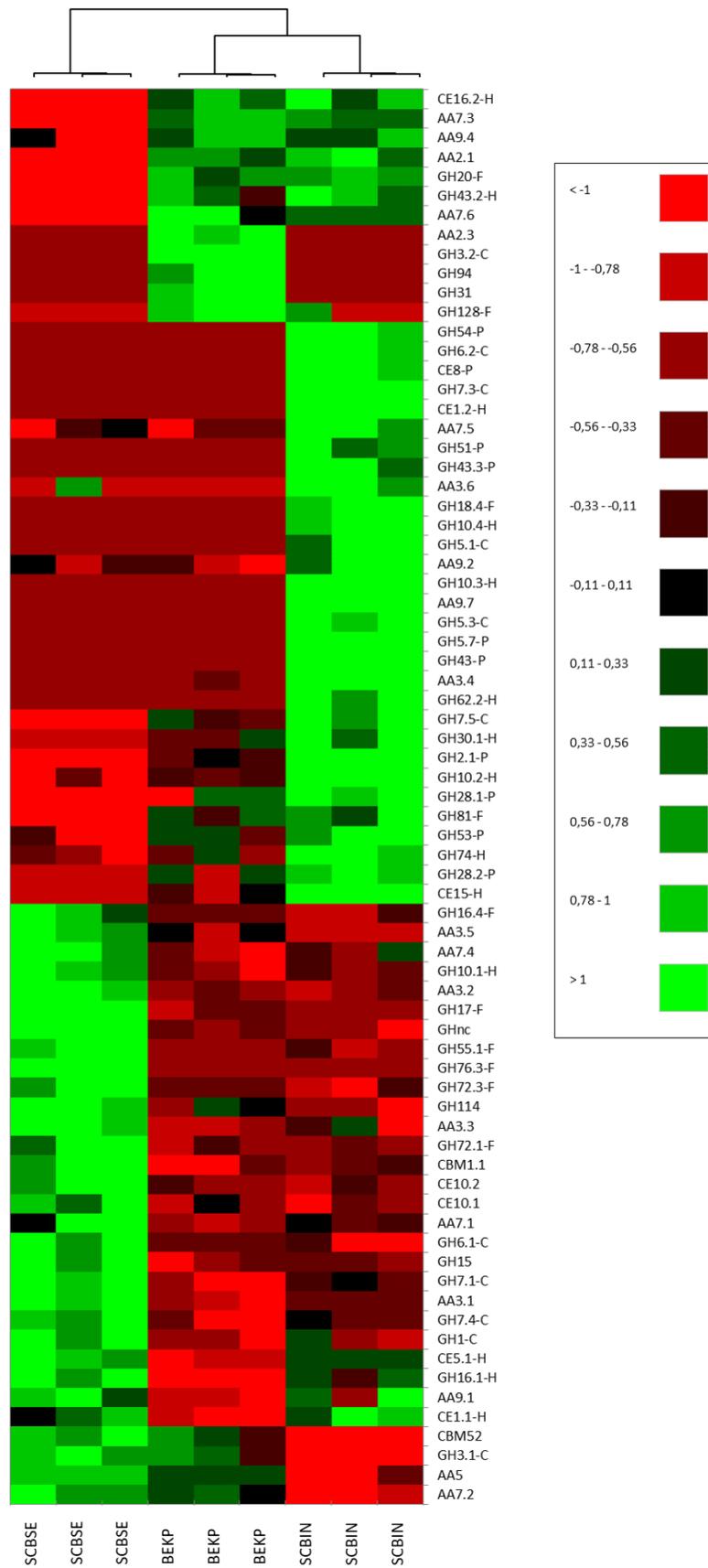


Figura 18 - Heatmap das CAZymes diferencialmente secretadas. É possível identificar pelas cores os grupos de enzimas que caracterizam cada secretoma estudado. Principal domínio de atividade, C: celulose; H: hemicelulose; P: pectina; F: FCW. O número após o ponto identifica uma única enzima da família. Fonte: Elaborada pelo autor

O *heatmap* apresentado na Figura 18, normaliza e organiza as CAZymes diferencialmente secretadas de acordo com sua expressão em cada biomassa com a finalidade de descrever, através da inspeção visual, os grupos de enzimas predominantemente encontrados entre cada tipo de cultivo. De posse disso, pode-se dizer que o secretoma de BEKP apresenta maior atividade de β -glicosidase, amilase e catalase-peroxidase com pouca atividade de xilano esterases (CE5) como principais características desse cultivo. SCBSE possui alto caráter de enzimas atuando em modificação da parede celular fúngica, bem como atividade celulolítica e oxidativa, pois a composição dessa biomassa é majoritariamente de celulose pré-tratada. Quanto às CE10 que aparecem apenas nessa condição, as informações sobre essa classe foram retiradas do CAZy, porque a maioria dos seus representantes possui atividade em substratos não-carboidrato, levando a indagações sobre o papel delas no secretoma de SCBSE.

Um fato curioso é que SCBIN e SCBSE compartilham a mesma origem vegetal, mas compartilham poucas enzimas com alta expressão: um representante de cada família de CE1, CE5, GH16 e AA9 (Figura 18). A atividade da CE1 e da CE5 indica que a hemicelulose remanescente depois do pré-tratamento do SCBSE ainda preserva as ligações ésteres em arabinoxilano, que podem estar associadas a ligações cruzadas com outros polissacarídeos e lignina, conferindo recalcitrância à biomassa. Adicionalmente a isso, celulasas GH5s são muito mais secretadas em SCBIN, enquanto que as GH6 e GH7 que aparecem são distintas entre os dois secretomas. A expressão diferencial dessas enzimas podem estar associadas à disponibilidade dos tipos de celulose dessas biomassas, porque as regiões amorfas e alomorfos (celulose I α , celulose I β , para-cristalina) da celulose são hidrolisadas em diferentes taxas pelas celulasas, sendo que as regiões não-cristalinas, para-cristalina e I α são mais susceptíveis do que a I β na fase inicial de degradação, atingindo taxas similares tardiamente.¹⁸²

A biomassa do bagaço oriundo do processo de moagem nas usinas (*in natura*) pode apresentar frações dos polissacarídeos da hemicelulose e pectina – como arabinoxilano, β -glucano, xiloglucano, homogalacturonano, arabinogalactano e arabinano¹⁹ – bem como preservar as ligações cruzadas existentes entre os domínios presentes na planta. Como se vê na Figura 15 e 17, isso faz com que fungo seja capaz de secretar um arsenal de enzimas muito mais diversificado que nas outras condições de cultivo, caracterizando a natureza mais complexa dessa biomassa e permitindo propor um mecanismo de ação do organismo (Figura 19).

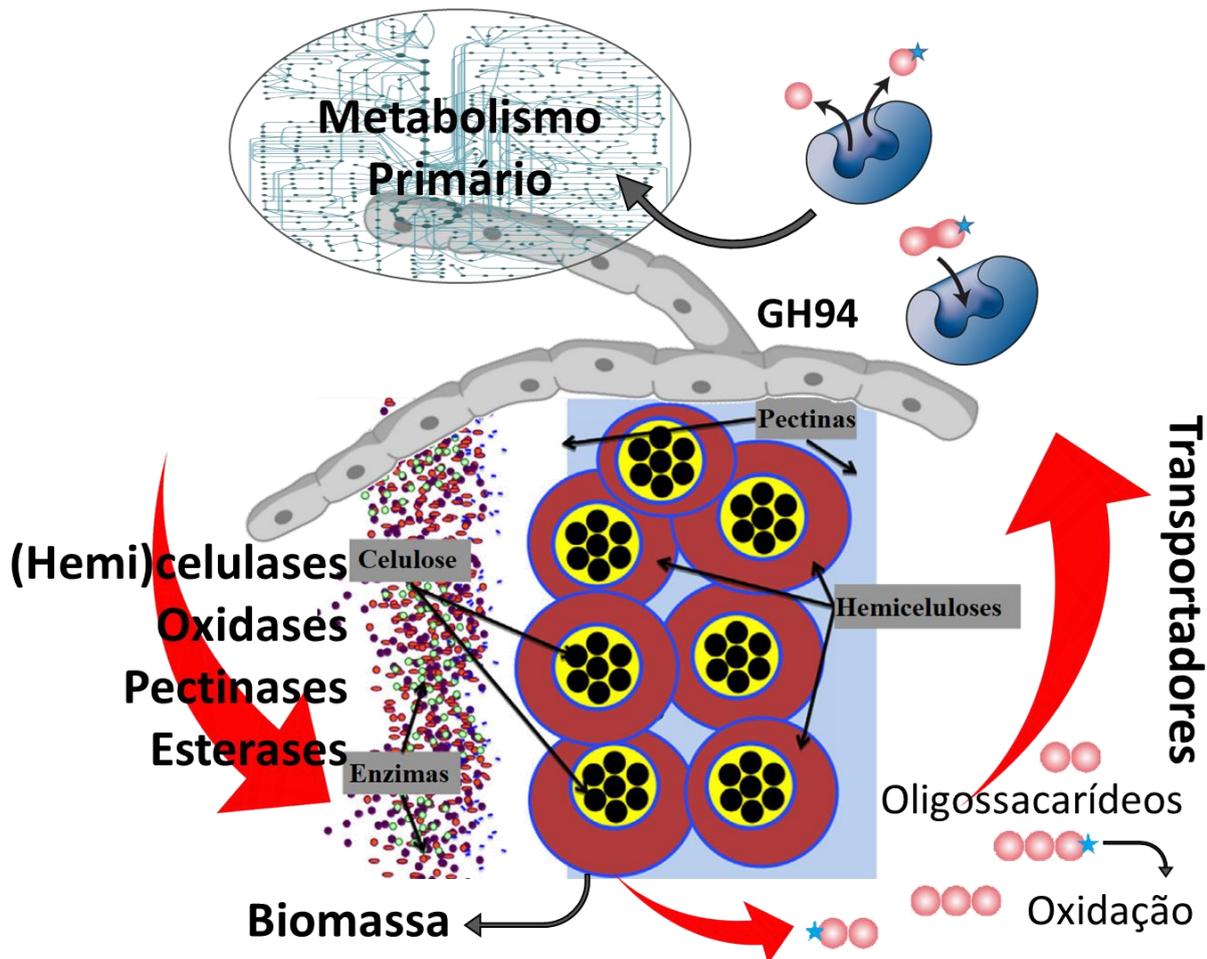


Figura 19 - Mecanismo de degradação da parede celular da cana de açúcar¹⁴ proposto para o fungo *T. terrestris*. O fungo degrada todas as partes da parede celular ao mesmo tempo de forma equilibrada e utiliza as esterases de carboidrato para ter acesso a porção recalcitrante conferida pelas ligações esteres cruzadas do arabinoxilano. A ácido celobiônico fosforilase (GH94) catalisa a conversão reversível intracelular de ácido celobiônico em glicose fosfato e ácido D-glucônico, onde são convertidos em metabólitos secundários e direcionados para vias como a glicólise e a via das pentoses fosfato. A utilização de compostos oxidados pode indicar uma vantagem evolutiva dos organismos celulolíticos/oxidativos, pois esses produtos são inibidores de CBH e β -glicosidases.

Fonte: Elaborada pelo autor

Dessa forma, comparando o NTSC das enzimas que atuam em hemicelulose, pectina e celulose (Tabela 2), com o heatmap (Figura 18) e a origem do secretoma, percebe-se que há expressão de hemicelulases, celulases e AA9s em todos os secretomas, mas pectinases só são altamente secretadas em SCBIN. Então, é sugerido que o mecanismo de degradação adotado pelo *T. terrestris*, inicialmente, é atacar ao mesmo tempo a hemicelulose, pectina e celulose. Concomitante, as CEs possuem papel imprescindível na quebra das ligações cruzadas do arabinoxilano para dar acesso aos polissacarídeos da parede vegetal da SCBIN, indicando que essa recalcitrância é a maior barreira durante o acesso das enzimas ao SCBIN e o mecanismo preferencial adotado pelo *T. terrestris* para acessar os polissacarídeos.

Visto que apenas duas AA2s foram encontradas em SCBIN (a lacase apareceu apenas na condição SCBSE), acredita-se que o mecanismo empregado por essa classe de enzimas seja adotado mais tardiamente conforme vai se esgotando os polissacarídeos não relacionados com a lignina. A expressão das enzimas glicolíticas é acompanhada pela expressão de enzimas oxidativas, mantendo um equilíbrio no fornecimento de monossacarídeos oxidados para abastecimento de carbono privilegiado ao metabolismo primário do fungo através da GH94 (Figura 19). Esse equilíbrio é importante porque, evolutivamente, é desvantajoso disponibilizar uma grande quantidade de monossacarídeos no meio, pois isso favorece o crescimento de outros organismos que competirão pela sobrevivência.

2.4 CONCLUSÃO

As conclusões a respeito do potencial oxidativo das enzimas presentes no secretoma do *T. terrestris* corroboram com os resultados que já foram reportados previamente.⁴⁷ Mas ainda são necessárias investigações a respeito do mecanismo de sinergia da despolimerização da parede celular entre as principais enzimas oxidativas e clássicas, bem como a assimilação dos substratos oxidados pelo organismo, a fim de compreender as bases moleculares que regem a despolimerização de biomassa recalcitrante e seu uso pelo fungo.

O efeito de um pré-tratamento a explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar sobre a expressão de CAZymes pelo fungo filamentosso *T. terrestris* apontaram características que podem ser limitantes ao processo de despolimerização da celulose para aplicações em biocombustíveis e o seu uso direto deve ser repensado para minimizar os efeitos de adsorção não-produtiva das enzimas à biomassa. O rico arsenal de enzimas que atuam na hemicelulose e pectina demonstram o grande potencial em aplicações biotecnológicas, como, por exemplo, a obtenção de pré-bióticos, compostos anti-oxidantes, insumos químicos para indústria química fina, entre outros.

O presente estudo identificou 134 CAZymes de *T. terrestris* distribuídos entre os três tipos de cultivo, sendo que, 73 enzimas apresentam um nível diferencial de expressão, apontando um substancial efeito causado pela fonte de carbono sobre as proteínas secretadas. Um número maior de NTSC de CAZymes foi encontrado em SCBIN e SCBSE, enquanto que, em SCBIN ocorre uma maior diversidade de enzimas, em SCBSE há uma maior expressão de algumas enzimas particulares, principalmente, celulasas e AAs. Acoplado a isso, a dessorção das enzimas à biomassa pré-tratada, SCBSE, pode vir a ser também uma interessante matéria-

prima para a obtenção de um coquetel simplificado de enzimas atuando na despolimerização da celulose e como meio de autoindução.

Por fim, esse trabalho apontou possíveis relações entre as enzimas secretadas pelo *T. terrestris* em função das características da biomassa utilizada, trazendo conhecimento das classes de enzimas mais utilizadas pelo *T. terrestris* para obtenção do carbono frente a biomassa. Levantou a necessidade de se caracterizar mais CAZymes, bem como a necessidade de explorar outras enzimas, que podem ser adjuvantes ao processo de desconstrução da parede celular vegetal e que podem exercer um papel ímpar na assimilação de carbono pelo *T. terrestris*, auxiliando na consolidação da biomassa como fonte de *green products*.

Outros aspectos da contribuição desse estudo apontam para o desenvolvimento de novos chassis de expressão e implementação de rotas bioquímicas que podem auxiliar na fermentação de pentoses, contribuindo no campo de biocombustíveis, de desenvolvimento de novos microrganismos para produção de proteínas recombinantes e de biologia sintética, todos de domínio público.

CAPÍTULO III

Expressão Heteróloga e Caracterizações Bioquímicas e Biofísicas de
(Hemi)celulases de *T. terrestris*

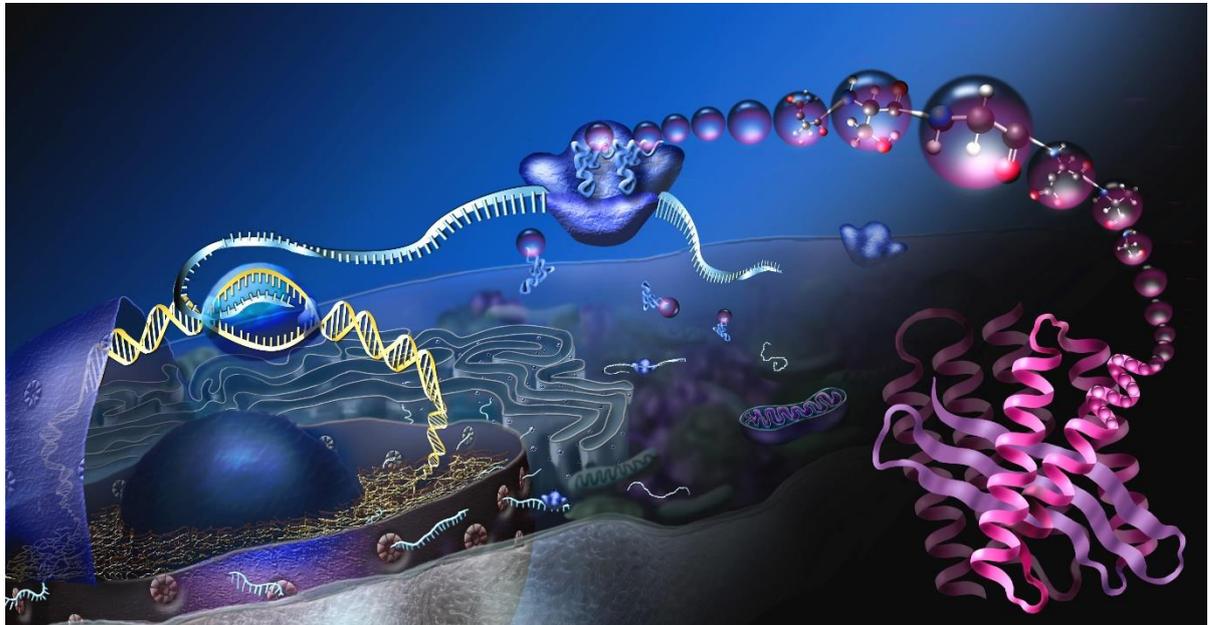


Figura 20 - Uma olhada em uma célula eucariota para ver como as proteínas são produzidas. O DNA no núcleo é "lido" pela RNA polimerase e, em seguida, os ribossomos no citoplasma produzem uma cadeia de aminoácidos que se dobra em uma proteína funcional.

Fonte: RAGER¹⁸³

O presente capítulo propõe evidenciar as distintas propriedades catalíticas e estruturais das diferentes (hemi)celulases de *T. terrestris*. Para a caracterização das CAZymes de *T. terrestris* é necessário obter a enzima recombinante pura, nesse trabalho, foi utilizando dois sistemas distintos de expressão: fungo filamentoso e bacteriano, através de ferramentas de biologia molecular. As particularidades de cada sistema expressão será abordada no decorrer do texto. A expressão heteróloga permite controle da síntese da proteína de interesse, obtenção de maiores quantidades da proteína, facilita as etapas de purificação através de caldas fusionadas, o aumento da solubilidade através de proteínas de fusão, além de outras abordagens, como mutações sítio dirigidas e quimeras.

A obtenção de proteínas puras, o que é facilitado através da expressão heteróloga, garante maior clareza e precisão das características individuais. Além da função da proteína, a estabilidade também é função da estrutura. Dessa forma, a aquisição dos atributos estruturais correlacionados com as caracterizações bioquímicas, podem contribuir com o conhecimento sobre essa relação, fornecendo subsídios para trilhar as bases moleculares responsáveis por elas e para sua manipulação a nível molecular.

3.1 OBJETIVOS

Expressar em organismo heterólogo (fungo filamentoso ou bactéria) as enzimas com atividade em carboidrato, que exibiram maior abundância nos secretomas, ou que apresentaram secreção diferencial, além daquelas com o potencial de aplicação em descontaminação de água. Após a obtenção das proteínas recombinantes solúveis, caracterizá-las cineticamente, determinar a estrutura tridimensional, avaliar sua tolerância térmica e analisar seus potenciais de aplicações biotecnológicas.

3.1.1 Objetivos específicos

- ♦ Escolher e desenhar os oligonucleotídeos iniciadores dos genes escolhidos;
- ♦ Extrair o DNA genômico (gDNA) do *T. terrestris* cultivado com glicose;
- ♦ Amplificar através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) os genes sem introns e os que serão expressos em fungo filamentoso utilizando o gDNA como molde;
- ♦ Extrair o mRNA da cultura do *T. terrestris* em SCBIN e sintetizar a primeira fita de cDNA (do inglês, complementary DNA);
- ♦ PCR dos genes que serão clonados em bactéria utilizando o cDNA como molde;

- ♦ Conduzir as reações de anelamento entre inserto e vetor de cada tipo de construção, transformar em bactéria e fazer PCR de colônia dos transformantes;
- ♦ Extrair os plasmídeos e direcionar a transformação nos sistemas de expressão heteróloga para cada construção;
- ♦ Escolha de transformante com maior nível de expressão da proteína de interesse solúvel;
- ♦ Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes;
- ♦ Medir e deconvoluir o espectro de dicroísmo circular e de T_m das amostras;
- ♦ Determinar o estado oligomérico e testes de cristalização;
- ♦ Definir o pH e a temperatura ótimos das amostras, atividade específica e cinética de Michaelis Menten;
- ♦ Testar a influência da temperatura de incubação em diferentes tempos e a influência de íons na atividade das enzimas;

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Expressão heteróloga em fungo filamentososo e purificação das enzimas

3.2.1.1 Linhagens, clonagem, transformação e meio de cultura

O *T. terrestris* UAMH 3264 foi cultivado em meio suplementado e com glicose (sessão 2.3.1) por 48 horas, depois o micélio fresco foi filtrado em papel (Whatman No. 1) e utilizado no sistema *FastDNA Kit* (MP Biomedicals) para extração de DNA genômico (gDNA).

Dois genes das enzimas hidrolases de glicosídeos da família 7 do *T. terrestris* foram escolhidos para estudo. O gDNA do *T. terrestris* foi utilizado como molde na PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) usando *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) para obtenção dos genes amplificados e com as extremidades de sobreposição para clonagem utilizando o método Gibson Assembly (Tabela 4),¹⁸⁴ O plasmídeo pEXPYR¹⁰⁹ foi incubado por uma hora a 37 °C com enzima de restrição XbaI (New England Biolabs) para linearização e posterior amplificação por PCR para adição das extremidades de sobreposição (Tabela). Os resultados das amplificações das PCRs foram analisados através de gel de agarose.

Tabela 4 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores dos genes de escolha, DNA molde e plasmídeo e tipo de clonagem. Vetor e insertos com extremidade de sobreposição para montagem tipo Gibson em letras minúsculas.

Identificação	Acesso	Molde	Plasmídeo	Oligonucleotídeos iniciadores das fitas	
				Senso	Antissenso
TtCel7.2	XM_003653428	gDNA	pEXPYR/ Gibson	cattacacctcagcaATGGCGCCCAA GTCTACAGTTCTG GCC	gtcccgtgccggTTACTAGTGG CTGCACTCGCTCTTGTAC GTGCT
TtCel7.3	XM_003649434	gDNA	pEXPYR/ Gibson	cattacacctcagcaATGACC CTACGGCTCCCTGTCATCAG C	gtcccgtgccggTTACTAGTTCT TCGTGGTAGACCCGATGT CGCC
pEXPYR	Segato <i>et al</i> ¹⁰⁹	pEXPYR	-	ccggcacgggacTTCTAGTGATTT AATAGCTCCATGTCAACA	cattgctgagggtgaatgATGCTGG GGGTG

Fonte: Elaborada pelo autor.

A reação para montagem da construção entre vetor e inserto – que inclui a atividade 5'-3' da enzima T5 exonuclease – foi incubada por uma hora a 50 °C e continha 250 ng do gene, 50 ng de vetor e 5 ul de Gibson *Assembly Master Mix* (New England Biolabs). Após, a reação foi transformada por choque térmico em *E. coli* DH5 α quimicamente competente¹⁸⁵ – em seguida, foi plaqueada em meio Luria-Bertani (LB) sólido (15 g.L⁻¹ de ágar) com ampicilina. Após incubação por 16 horas à 37 °C as colônias foram escolhidas randomicamente para confirmação da construção por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores dos próprios genes através de análise em gel de agarose. As confirmadas, foram incubadas em LB com ampicilina, 150 rpm, 37 °C por 16 horas para extração e purificação do plasmídeo com *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). As imagens dos géis de agarose foram reveladas e analisadas através do equipamento *Gel Doc EZ* (Biorad) e pelo programa *Image Lab v. 6.0.1* (Bio-Rad).

A transformação e seleção em fungo filamentosos seguiu o protocolo proposto por Segato *et al.*¹⁰⁹ *Aspergillus nidulans* linhagem A773 (*pyrG89;wA3;pyroA4*) foi adquirido do *Fungal Genetic Stock Center* (USA) e foi cultivado em meio mínimo (sessão 2.3.1) adicionados de piridoxina (1mg.L⁻¹), uracila e uridina (2,5 mg.L⁻¹ cada) em pH 6,5, 37 °C,¹⁰⁹ a 37 °C, 180 rpm, por 16 horas. O micélio foi coletado por filtração com filtro de papel (Whatman N°1), lavado com 0,6 M de MgSO₄ e ressuspenso em 5 mL de DSPS (1,1 M de KCl, 0,1 M de ácido cítrico e pH ajustado para 5,8 com KOH e esterilizado por filtração) adicionado de 100 mg de enzimas de lise de *Trichoderma harzianum* (Sigma Aldrich), 100 mg de lisozima de clara de ovo de galinha (Sigma Aldrich) e 100 mg de fração de albumina bovina V (Sigma Aldrich). A mistura foi incubada a 30 °C por duas horas à 100 rpm. Os protoplastos foram separados por filtração com uma camada de membrana *Miracloth* (Calbiochem) e lavados duas vezes por

centrifugação a 4 °C, 4500xg por 10 minutos com 50 mL de STC (1,2 M Sorbitol, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de CaCl₂, pH 7,5). O precipitado final foi ressuspensionado em 1 mL de STC e mantido em banho de gelo até transformação.

Em um tubo tipo falcon de fundo redondo foi adicionado 10 µg de plasmídeo em um volume final de 50 µL de STC, 150 µL de suspensão de protoplastos (~10⁸) e incubado em temperatura ambiente por 15-20 minutos. Após, foi adicionado 2 mL de 60% de PEG 4000 em STC, agitado cuidadosamente e incubado por 15-20 minutos em temperatura ambiente. A essa mistura de transformação foi adicionado mais 8 mL de STC e verteu-se 1 mL sobre placas de meio mínimo (sessão 2.2.1) sólido (20 g.L⁻¹ de ágar) de recuperação de protoplastos e seleção de transformantes (1 mg.L⁻¹ de piridoxina, 1,2 M de sorbitol, sem uracila, sem uridina e sem ácido 5-fluorótico). As placas foram incubadas a 37 °C e após um dia, foram invertidas e os transformantes foram selecionados durante o 2º e 3º dia pela reversão da marca de auxotrofia, conferindo a capacidade de crescer em meio ausente de uracila e uridina. Os transformantes foram transferidos para placas com meio mínimo sólido adicionado de 1 mg.L⁻¹ de piridoxina para produção de esporos.

3.2.1.2 Expressão das proteínas recombinantes

Os esporos de cada transformante foram inoculados em placas de petri (60 x 15 cm) com meio de expressão: meio mínimo (sessão 2.2.1) adicionado de 1mg.L⁻¹ de piridoxina e 2% de *high* maltose (WE Consultoria), em condições estáticas a 37 °C por dois dias para seleção do transformante com maior nível de secreção da proteína recombinante. O controle da secreção foi o *A. nidulans* A773 transformado com vetor sem gene de interesse (denominado aqui de vetor vazio) e o perfil secretado foi analisado por SDS-PAGE. A cepa com maior nível de expressão foi escolhida para cultivo em maior escala.

O cultivo de um litro de meio foi filtrado com membrana *Miraclon* (Calbiochem) e concentrado em *Amicon Stirred Cell* (Millipore), utilizando membrana *Biomax* (Millipore), com corte de 10 kDa até um volume entre 50 e 100 mL, quando foi adicionado igual volume de tampão 0,1 M de Tris (trisaminometano) pH 7,5 e novamente concentrado até 50 mL para posterior purificação.

3.2.1.3 Purificação

O cultivo concentrado e tamponado foi aplicado em coluna de troca iônica com resina *DEAE Sepharose CL6B* (GE Healthcare Life Science), com fluxo por gravidade, equilibrada com 0,05 M de Tris-HCl pH 7,5 e eluições de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1 M de NaCl. As frações foram analisadas por SDS-PAGE e aquelas com a proteína recombinante foi purificada em coluna *HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR* conectada ao cromatógrafo *Äkta Pure 25M System* (GE Healthcare Life Science) e equilibrada com tampão 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl. As frações com absorvância em 280 nm foram analisadas em SDS-PAGE.

Os géis de SDS-PAGE após revelados com *Coomassie Blue R-250* e analisados foram documentados pelo equipamento *Gel Doc EZ* (Biorad) e pelo programa *Image Lab v. 6.0.1* (Bio-Rad).

3.2.2 Expressão em bactéria e purificação

3.2.2.1 Linhagens, clonagem, transformação e meio de cultura

O RNA total foi obtido usando o sistema *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), onde o micélio do fungo foi cultivado em meio com biomassa (BEKP, BCSE e SCBIN) de acordo com a condição de expressão da enzima de interesse nas diferentes fontes de carbono (sessões 2.3.1 e 2.3.2). Após extração do RNA total, ele foi tratado com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) e foi utilizado no sistema *SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) para síntese do cDNA.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados com purificação tipo *Standard Desalting* (IDT/Belo Horizonte – MG). As PCRs para amplificação dos genes de interesse foram conduzidas utilizando a enzima *Phusion High-Fidelity DNA* polimerase (New England Biolabs) para obtenção dos genes amplificados com as características de clonagem de acordo como o plasmídeo de expressão escolhido (Tabela 5): *Champion pET SUMO* (Thermo Fischer Scientific) e pETTrx-1a e analisadas em gel de agarose.

Tabela 5 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores dos genes de escolha, DNA molde, plasmídeo e tipo de clonagem. Vetor Champion pET SUMO/TA utiliza clonagem tipo TA (pareamento timina e adenina) e o plasmídeo pETTrx-1a/LIC usa clonagem independente de ligação com extremidade de sobreposição (letras minúsculas).

Identificação	Acesso	Molde	Plasmídeo	Oligonucleotídeo iniciadores das fitas	
				Senso	Antissenso
TtAA9.1	XM_003655332	cDNA	Champion pET SUMO/TA	CACGCGACCTTCCAGG ACCTC	TTAGAGGCACTGCGAGTA GTACGG
TtAA9.5	XM_003648710	cDNA	Champion pET SUMO/TA	CACTCCATCTTCCAGA GAGTCTCGGTC	TTAGCAGGAGATCGGGGC GGGTC
TtGal5	XM_003654727	cDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgGCCCCAAA TTCTTCACCCTTC	gacccgacgcggtaACTCAGCG TATTTCTAACCATCG
TtGH5.b	XM_003655881	gDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgGCCGGCGT GGCCCTTCCGCTGCAC	gacccgacgcggtaCGGCTGCT GCGTCATCTTCCACATGT CGC
TtGH7.a	XM_003653460	cDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgCAGCAGGC CTGCACACTCACGG	gacccgacgcggtaGAGGCACT GGTAGTACCAGTCGTTCA G
TtXin10A	XM_003650926	cDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgGCGCCGGC GCTGGACAGCCGCCA G	gacccgacgcggtaCTGAGACA GCAGCTGGACAATGGCGT TGTAGGCAG
Tex	XM_003654510	gDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgGATGGCCT CAACGTCCGGGCTAAG	gacccgacgcggtaCAAGCACT GAGAGTACCAGTCGTTGG
TtβXil43	XM_003657108	gDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgGCCCCGGG CCCCGCGCAAAAC	gacccgacgcggtaTGTCTCCTC CTGCCCGAGGCTGTCC
TtAraf54	XM_003649387	gDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgGGCCCTTG CGACATCTACGCCTCG GGGGG	gacccgacgcggtaCGCCGCCA ACCCCGTCTCCACCACCC
TtLcc1	XM_003656122	gDNA	pETTrx-1a/LIC	cagggcgccatgTCTCCCCT GAGTTTAGCG	gacccgacgcggtaCTGATACG TCAAATACTCCTCTGG

Fonte: Elaborada pelo autor.

As clonagens tipo do LIC (do inglês, *Ligation Independent Cloning*)¹⁸⁶ seguiram o protocolo disponível online pelo *Helmholtz Zentrum München*.¹⁸⁷ A linearização do vetor pETTrx-1a/LIC foi feita utilizando Eco31I (Thermo Fischer Scientific), em seguida, a reação foi analisada e purificada em gel de agarose com *Agarose Gel Extraction Kit* (Cellco Biotec) e a obtenção das extremidades de sobreposição entre inserto e vetor pela T4 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), que apresenta atividade exonuclease 3'-5' até ser balanceada pela

atividade de polimerase através da inserção de um 2'-desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfatado presente na reação – no caso do vetor um dTTP (2'-desoxitimidina 5'-trifosfato) e do inserto um dATP (2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato). O vetor e o inserto tratados e purificados com *PCR Purification Kit* (Cellco Biotec) foram misturados na razão molar 1:3 para proceder o anelamento entre as extremidades.

Os insertos para as clonagens tipo TA com o plasmídeo comercial linearizado *Champion pET SUMO*, após PCR, foram adenilados na extremidade 3' com Taq DNA polimerase recombinante (Thermo Fischer Scientific): 1 mM dATP, 1x tampão de reação, 5U Taq, DNA para 10 µL de reação, que foi conduzida em termociclador por 15 minutos à 72 °C. Em seguida o inserto foi ligado ao vetor com T4 DNA ligase (Thermo Fischer Scientific) na razão 1:1 pmol em termociclador a 22 °C por duas horas e à 16 °C por dez horas.

Após as etapas de anelamento e ligação das construções. As reações foram transformadas em choque térmico em *E. coli* DH5α quimicamente competentes,¹⁸⁵ seguido de plaqueamento em meio LB sólido (15 g.L⁻¹ de ágar) com canamicina. Randomicamente as colônias que cresceram foram selecionadas para PCR de colônia com oligonucleotídeos iniciadores da região promotora e terminadora da RNA polimerase do bacteriófago T7 para confirmação das construções através da visualização em gel de agarose. As confirmadas foram cultivadas em meio LB com canamicina para extração e purificação plasmidial com *Fast-n-Easy Plasmid-Prep* (Cellco Biotec).

Alíquotas de 50 µL *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 (Novagem) quimicamente competentes foram preparadas seguindo o mesmo protocolo da DH5α¹⁸⁵ e transformadas por choque térmico com os plasmídeos contendo a construção dos genes de interesse.

As imagens dos géis de agarose foram reveladas e analisadas através do equipamento *Gel Doc XR* (Biorad) e pelo programa *Image Lab v. 6.0.1* (Bio-Rad).

3.2.2.2 Expressão das proteínas recombinantes

Os transformantes foram cultivados em frascos erlenmeyers com chicanas de 2 L com 500 mL de meio auto-indutor ZYP-5052¹⁸⁸ à 37 °C e 150 rpm até atingir densidade óptica de 0,6, momento em que a temperatura foi reduzida para 17 °C e a cultura foi mantida em rotação por 16-18 horas. A cultura foi centrifugada a 4000xg à 4 °C por 40 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão 50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 0,5% de Triton X-100, 10% de glicerina, pH 8,0. Para a lise das células por sonicação em banho de gelo, foi adicionado 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), 5 mM de DTT

(ditiotreitól), com ciclos de 10 segundos ligado, 15 segundos desligado. O lisado foi clarificado em centrifuga a 30000xg durante 20 minutos e o sobrenadante foi separada para a etapa de purificação.

3.2.2.3 Purificação

O sobrenadante da etapa de clarificação foi carregado em coluna de bancada para purificação por afinidade Ni-NTA (níquel-nitrilotriacético) agarose (Qiagen) com fluxo por gravidade, utilizando tampão de equilíbrio 50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 10% de glicerina, pH 8,0. As eluições ocorreram com a adição de imidazol no tampão de equilíbrio nas concentrações: 10, 30 e 300 mM. Após analisadas as eluições em SDS-PAGE, a fração contendo a proteína recombinante foi dialisada para remoção do imidazol e clivagem com TEV (do inglês, *Tobacco Etch Virus*) protease por 16 horas à 4 °C. Uma amostra dessa reação é analisada por SDS-PAGE para verificar a clivagem e consequente deslocamento da banda no gel devido a remoção da proteína de fusão e calda de histidina.

Novamente, a amostra foi aplicada na coluna de Ni-NTA agarose para separação da proteína de interesse das demais: proteína de fusão com calda de histidina, TEV protease, que possui calda de histidina não clivável, proteína não clivada e contaminantes que interagiram com a resina. Geralmente, a fração não-ligada dessa etapa corresponde a proteína recombinante e a eluição com imidazol é feita em uma única etapa, com 0,3 M. O volume com a proteína de interesse é concentrada para ser aplicada em coluna de cromatografia por exclusão de tamanho (*Superdex*) acoplada ao *Äkta* (GE Healthcare Life Sciences) em tampão 0,050 M de Tris-HCl e 0,2 M de NaCl, pH 8,0. As frações com absorção em 280 nm foram analisadas por SDS-PAGE.

As imagens dos géis de SDS-PAGE após coradas com *Coomassie Blue R-250* foram adquiridas através do equipamento *Gel Doc EZ* (Biorad) e pelo programa *Image Lab v. 6.0.1* (Bio-Rad).

3.2.3 Identificação por espectrometria de massas LC-MS/MS

A banda referente ao tamanho esperado da proteína recombinante foi recortada do gel SDS-PAGE e preparado para digestão em gel com tripsina seguindo o protocolo estabelecido pelo LNBio (Laboratório Nacional de Biociências).¹⁸⁹ Os fragmentos tripsinizados seguiram metodologia de análise descrita em Aragão *et al.*,¹⁹⁰ onde foram separados por coluna C18 (100 um x 100 mm) em cromatógrafo *nanoAcquity UPLC* (Waters) acoplado a um *Q-Tof Premier*

Mass Spectrometer (Waters), com fluxo de 0,600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e gradiente de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico por 45 minutos. O espectrômetro de massas operou em modo *Top Three*, em que um espectro MS é adquirido seguido por análise MS/MS dos três picos mais abundantes detectados.

Os espectros foram adquiridos usando o programa *MassLynx* v.4.1 e os arquivos brutos foram convertidos para uma lista de picos em formato “.mgf” sem a soma das varreduras usando o programa *Mascot Distiller* v.2.6.2.0 (Matrix Science Ltd.). Os espectros experimentais foram pesquisados contra o banco de dados de sequências não-redundantes do NCBI do organismo *T. terrestris* NRRL 8126 utilizando o programa *Mascot Daemon Engine* v.2.3.2 (Matrix Science Ltd.) com os parâmetros: modificações fixas como carbamidometilação, modificações variáveis como oxidação de metionina, uma falha de clivagem de tripsina e tolerância de 0.1 Da para íons precursores e fragmentados.

3.2.4 Estado oligomérico em solução

A técnica de espalhamento de luz multiangular acoplada a uma coluna de exclusão de tamanho molecular foi utilizada para determinar o estado oligomérico das proteínas em solução. O sistema consistia de um cromatógrafo *Waters 600 HPLC* (Waters) conectado a uma coluna *Superdex 75 10/300 GL* ou *Superdex 200 10/300 GL* (GE Healthcare Life Sciences), cuja saída estava acoplada a equipamento composto por um instrumento de espalhamento de luz *DAWN HELEOS* e um refratômetro *Optilab T-rEX* (Wyatt Technology). O sistema foi equilibrado com tampão 25 mM de Tris-HCL pH 8,0 e 300 mM de NaCl, fluxo de 0,5 mL/min., volume de injeção de 50 μL . Os dados experimentais e os valores da massa molecular das amostras foram analisados através do programa *ASTRA* v. 7 e apresentados em *Origin 2018* (Origin Lab Corporation).

3.2.5 Espectro de dicroísmo circular e transição térmica

Os espectros de dicroísmo circular (CD) das amostras foram obtidos no equipamento *Jasco-715* ou *Jasco-810* (Jasco International Co) acoplado a um controlador de temperatura tipo *peltier* (PTC 423S / 15), em cubeta de quartzo de 0,1 cm e tampão 20 mM de fosfato pH 7,2. O comprimento de onda do espectro de CD foram de 280 a 200 nm a 100 nm. min^{-1} , com tempo resposta de 1 segundo e largura de banda de 1 nm, os dados experimentais foram coletados a cada 0,2 nm e 6 espectros por amostra. A rampa de temperatura para monitoramento

da mudança no espectro de CD foi de 25 a 100 °C a 1 °C.min⁻¹, com acúmulo de 3 espectros e com monitoramento em 222 nm e tempo resposta de 32 s para o J-810 e 16 s para J-715. Os dados foram convertidos com o programa *Spectra Manager* (Jasco International Co), analisados o programa *CDtool v. 1.4* e os gráficos construídos com *Origin 2018* (OriginLab Corporation). Para notação da curva de desenovelamento térmico foi usada a seguinte notação:

$$f_D = \frac{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_x)}{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_D)} \quad (1)$$

f_D = fração de proteína desenovelada

$\Delta\theta_N$ = elipticidade da proteína nativa

$\Delta\theta_D$ = elipticidade da proteína desenovelada

$\Delta\theta_x$ = elipticidade da proteína em qualquer temperatura

3.2.6 Ensaio de cristalização

O ensaio de cristalização foi conduzido em robô *ARI Gryphon* (Art Robbins Instruments), com placa *Intelli-Plate 96-3 Low Volume Reservoir* (Art Robbins Instruments), utilizando as concentrações iniciais das enzimas de 28, 14 e 6 mg.mL⁻¹ com composição da gota de 1:1 das soluções de cristalização do sistema *Morpheus I, BCS Screen e SGI Screen* (Molecular Dimensions). As placas foram armazenadas em sala refrigerada à 18 °C.

3.2.7 Caracterização enzimática

3.2.7.1 Paineis de substratos

A atividade de 1 µg de enzima recombinante em 100 µL de reação foi conduzida em tampão 25 mM citrato/fosfato/glicina pH 4,5 (ou como especificado) e 0,25% de substratos de origem natural adquiridos de Megazyme: β-glucano, CMC, xiloglucano, poligalacturônico, arabinano desramificado, arabinogalactano de lariço galactomanano, liquenano, manano, arabinano, xilano, pectic galactano, arabinoxilano de trigo, ramnogalactoronano, galactano, arabinano linear, celobiose e de origem sintética adquiridos de Megazyme: 4-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo (4NF-Araf), 4NF-α-L-arabinopiranosídeo (4NF-Arap), 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (4NF-β-Gal), 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (4NF-Glu), 4-nitrofenil-β-

D-xilopiranosídeo (4NF-Xil), 4-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (4NF-Man), 2-Cloro-4-nitrofenil- β -celobiosídeo (2Cl-4NF-G₂), 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (4NF- α -Gal). As reações foram feitas no mínimo em triplicatas e conduzidas em termociclador *T100 Thermal Cycler* (Biorad) à 50 °C (ou como especificado) por 30 minutos e as reações foram paradas com a adição de 100 μ L de solução reveladora: os substratos de origem natural foram testados quanto a presença de açúcares redutores pelo método de Miller¹¹³ (sessão 2.2.3.3) e os substratos sintéticos foram testados quanto a presença da molécula 4-nitrofenil em solução com 10% de carbonato de sódio, com absorção em 400 nm –¹⁹¹ exceto 2-Cloro-4-nitrofenil que foi testado com adição de solução 2% de Tris-HCl pH 9,0, com absorção em 400 nm.¹⁹² As leituras foram feitas em placas de 96 poços (Greiner) em espectrofotômetro *Spectramax Plus 384* (Molecular Devices).

3.2.7.2 Temperatura e pH ótimos

Tampão citrato/fosfato/glicina pHs de 2 a 10 com incremento de 0,5 foi adicionado à reação de 100 μ L na concentração final de 25 mM, 0,25% de substrato e 1 μ g de enzima. As reações foram feitas no mínimo em triplicata e mantidas em termociclador *T100 Thermal Cycler* (Biorad) à 50 °C por 15 minutos. As reações com substratos poliméricos foram paradas com DNS (540 nm), os substratos baseados em 4NF com 10% de carbonato de sódio (400 nm) e os 2Cl-4NF com 2% de Tris-HCl pH 9,0 (400 nm) – sessão 3.2.7.1. A leitura foi feita em placa de 96 poços (Greiner) em espectrofotômetro *Spectramax Plus 384* (Molecular Devices).

Após a descoberta do pH que conferia a maior atividade, as reações para determinar a temperatura ótima foram compostas da mesma forma, mas no pH ótimo de cada enzima. As variações de temperatura foram conduzidas em termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e cada temperatura foi conduzida no mínimo em triplicata. As reações foram paradas e as absorbâncias foram lidas da mesma forma que acima citado.

3.2.7.3 Atividade específica e cinética enzimática

Para determinar a quantidade de enzima usada na reação de 100 μ L, foi construída um teste de velocidade para cada concentração de enzima, mantendo o substrato fixo (CMC 0,25%) e medindo a atividade de 0,5 a 8,5 minutos em condições ótimas de pH e temperatura e em tampão citrato-fosfato. Após estabelecido uma relação linear dentro desse período, foi calculado a atividade específica em U/mg de enzima, onde 1 U é definido como o montante de

enzima requerida para liberar 1 μmol de glicose equivalente por minuto e por mg de CMC. Uma vez a concentração de enzima fixada, o substrato foi variado de 0,5 a 0,045% na reação para estabelecer a cinética de Michaelis-Menten. A reação iniciou com a adição da enzima quando a solução estava em equilíbrio dentro do termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems), durou 4 minutos para TtCel7.3 e 3,5 minutos para TtCel7.2 e foi parada com DNS. Em seguida a reação seguiu o protocolo para determinação de açúcares redutores descrito na sessão 2.2.3.3 e transferida para uma placa de leitura de 96 poços (Greiner) e lida em espectrofotômetro *Spectramax Plus 384* (Molecular Devices). Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten foram determinados por regressão não-linear dos pontos à curva utilizando *Origin 2018* (OriginLab Corporation).

3.2.7.4 Painele de aditivos

A composição da reação para avaliar o efeito de aditivos continha 1 μg da solução de enzima, CMC 0,25%, 0,025 M de tampão citrato-fosfato no pH ótimo de cada enzima e de solução de aditivo, cuja a concentração final foi 1 vez e 20 vezes de: 0,5 mM CoCl_2 , 0,5 mM MnSO_4 , 0,5 mM CuSO_4 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM ZnSO_4 , 0,5 mM KCl , 0,5 mM CaCl_2 , 0,5 mM LiCl_2 , 0,5 mM NiSO_4 , 0,5 mM EDTA, 40 mM NaCl , 0,20% DMSO, 0,20% Tween, 0,20% Triton. Após reação em termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) por 10 minutos na temperatura ótima de cada enzima. Todos os aditivos foram testados em triplicada e as reações foram parada com adição de DNS igual ao protocolo da sessão 2.2.3.3, transferida para placa de 96 poços (Greiner) e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro *Spectramax Plus 384* (Molecular Devices).

3.2.7.5 Estabilidade térmica

A incubação da enzima em diferentes temperaturas e períodos, antes de realizar a reação enzimática, foi testada para avaliar a estabilidade térmica. O volume da reação enzimática de 100 μL era dividida em dois: 1 μg de enzima recombinante em 50 μL de tampão citrato-fosfato 25 mM no pH ótimo de cada enzima e outros 50 μL contendo 0,5% de CMC em mesmo tampão. O volume correspondente à enzima era incubado por 5, 15, 30, 60 e 180 minutos nas temperaturas de 45 a 95 $^\circ\text{C}$ com incremento de 5 $^\circ\text{C}$. O volume correspondente ao substrato era mantido em banho de gelo. Após a incubação da enzima, a reação era mantida a 4 $^\circ\text{C}$ e adicionado os outros 50 μL contendo o substrato, em seguida, a mistura era incubada por 10

minutos na temperatura ótima de cada enzima. Após esse tempo, a reação era parada pela adição de igual volume de DNS e a medida de açúcares redutores seguiu roteiro da sessão 2.2.3.3 e as leituras da absorbância foram feitas em placa de 96 poços (Greiner) em *Spectramax Plus 384* (Molecular Devices).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Expressão, purificação e caracterizações das enzimas recombinantes em fungo filamentoso

3.3.1.1 Triagem dos melhores transformantes e confirmação por LC-MS/MS das proteínas heterólogas

Os genes de hidrolases de glicosídeos da família 7 foram amplificados do DNA genômico do *T. terrestris* por PCR adicionando as extremidades de sobreposição para clonagem tipo Gibson (Figura 21). Após a etapa de clonagem, o plasmídeo recombinante foi usado para a transformação das células DH5 α e a confirmação dada por PCR de colônia. Os plasmídeos foram extraídos, purificados e usados na etapa de transformação em protoplastos de *Aspergillus nidulans* A773 (*pyrG89;wA3;pyroA4*). A seleção dos transformantes *A. nidulans* (*pyrG*⁺) parte da capacidade de crescerem em meio não suplementado com uracila e nem uridina, devido à reversão da auxotrofia pela marca de seleção presente no vetor pEXPYR, que é o gene da orotidina 5'-fosfato carboxilase (*anpyrG*) de *Aspergillus niger* (*an*) flanqueado por sequências MATE1.

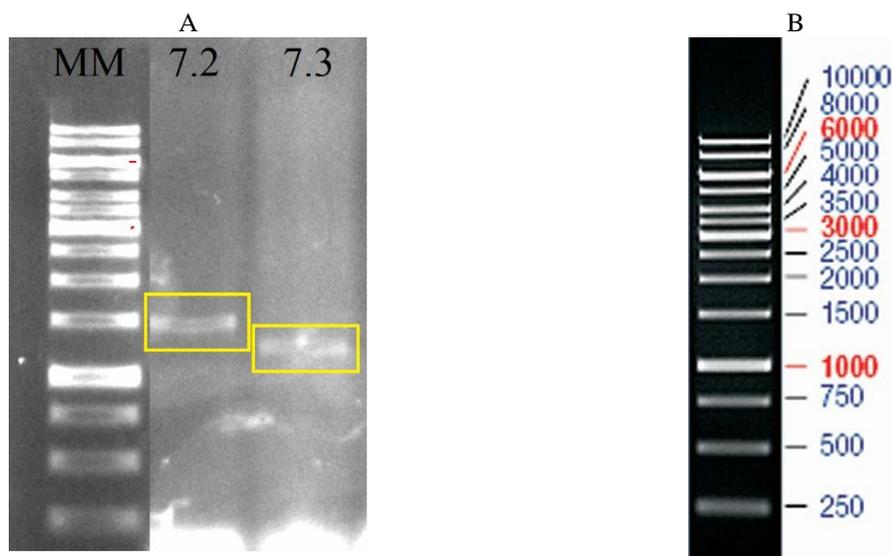


Figura 21 - Gel de agarose da amplificação do gene com as extremidades para clonagem tipo Gibson da A) TtCel7.2: 1336 pb e TtCel7.3: 1079 pb. B) Padrão de massas de DNA

Fonte: Elaborada pelo autor

A sequência primária das proteínas foi submetida ao SignalP 4.0¹¹⁹ para processamento do peptídeo sinal e obtenção da proteína madura para cálculo da massa teórica, ponto isoelétrico (pI) e coeficiente de extinção molar (ϵ) através do programa PROTPARAM,¹²⁰ os valores encontram-se na Tabela 6, juntamente com a predição teórica de sítios de N-glicosilação¹⁹³ e O-glicosilação putativos.¹⁹⁴

Tabela 6 - Parâmetros teóricos da sequência primária após clivagem do peptídeo sinal e predição de sítios de glicosilação.

Proteína madura	Aminoácidos	Massa molar (kDa)	pI	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	N-glicosilação	O-glicosilação
TtCel7.2	404	43,42437	5,07	61975	6	5
TtCel7.3	319	33,31401	5,20	41370	2	7

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os transformantes foram cultivados em meio de expressão por 48 horas para avaliar o nível de secreção das GH7s recombinantes e escolha da cepa com maior nível de expressão. De acordo com a Figura 22, as bandas mais fortes, que se espera ser a proteína recombinante fortemente induzida, apresentam um deslocamento em relação à massa teórica da Tabela 6. Também, na mesma tabela, encontra-se o número de sítios putativos de glicosilações do tipo “N” e “O” preditos para as proteínas recombinantes, o que sugere grande chance das proteínas sofrerem esse tipo de modificação pós-traducional. Dessa forma, a quantidade de sítios e número de resíduos de açúcar adicionados podem modificar a mobilidade eletroforética das proteínas em SDS-PAGE.¹⁹⁵ A vastidão das cadeias de glicanos faz com que eles não intercalem

com o SDS da mesma forma que os aminoácidos em uma cadeia peptídica e, juntos com os açúcares terminais carregados, podem alterar a carga negativa uniforme promovida pelo SDS, o qual camufla as cargas intrínsecas das cadeias laterais dos aminoácidos e mantém a cadeia linearizada durante a eletroforese.

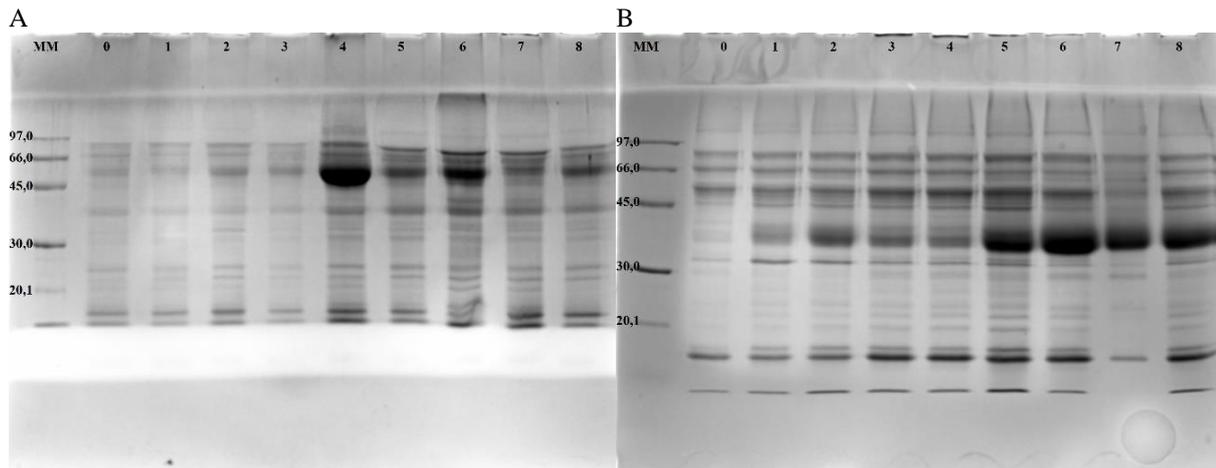


Figura 22 - SDS-PAGE do perfil de secreção dos transformantes *A. nidulans* A773 pyrG⁺, em que a coluna “0” de ambos os géis corresponde ao transformante com vetor vazio; A) transformantes de 1 a 8 contendo vetor com gene da TtCel7.2; B) transformantes de 1 a 8 contendo vetor com gene da TtCel7.3. MM: Massa molecular em kDa.

Fonte: Elaborada pelo autor

Assim, o gel SDS-PAGE dos 8 diferentes transformantes da TtCel7.2 e da TtCel7.3 comparados com o transformante contendo o vetor vazio exibiram diferentes níveis de expressão (Figura 22), sendo o transformante 4 da TtCel7.2 e o 6 da TtCel7.3 os que mais produziram as proteínas de interesse, cuja bandas foram recortadas do gel para identificação da proteína recombinante por LC-MS/MS.

Na Figura 23, está ilustrado em vermelho os peptídeos tripsinizados da proteína heteróloga identificados correspondentes aos peptídeos teóricos gerados pelo Mascot, sendo a cobertura das correspondências de 45% e 58% respectivamente às proteínas TtCel7.2 e TtCel7.3 do *T. terrestris*. Dessa forma, os transformantes puderam seguir com as etapas de produção em larga escala das proteínas, seguido de purificação e caracterizações enzimáticas e biofísicas.

A					B						
1	MAPKSTVLAA	WLLSSLAAAQ	QIGKAVPEVH	PKLTTQKCTL	RGGCKPVRTS	1	MTLRLPVISL	LASLAAGAVV	VPRAEFHPPL	PTWKCTTSGG	CVQQNTSVVL
51	VVLDSSARSL	HKVGDPTSC	SVGGDLCSDA	KSCGKNCALE	GVDYAAHGVA	51	DRDSKYAAHS	AGSRTESDYA	AMGVSTSGNA	VTLYHYVKTN	GTLVPASPRI
101	TKGDALTLHQ	WLKGADGTYR	TVSPRVYLLG	EDGKNYEDFK	LLNAELSPDV	101	YLLGADGKYV	LMDLLNQELS	VDVDFSALPC	GENGAFYLSE	MAADGRGDAG
151	DVSQLVCGMN	GALYFSEMEM	DGGRSPLNPA	GATYGTGYCD	AQCPKLDIFIN	151	AGDGYCDAQC	QGYCCNEMDI	LEANSMATAM	TPHPCKGNNC	DRSGCGNPNY
201	GELNTNHTYG	ACCNEMDIWE	ANALAQALTP	HPCNATRVYK	CDTADCEGQP	201	ASGQRGFYGP	GKTVDTSKPF	TUVTQFAASG	GKLTQITRKY	IQNGREIGGG
251	VGVCDENGCS	YNPSNFGVKD	YYGRNLTVDT	NRKFTVITQF	VTSNGRADGE	251	GTISSCGSES	STGGLTGMGE	ALGRGMVLAM	SIWNDAAQEM	AWLDAGNNGP
301	LTEIRRLYVQ	DGVVIQNHAV	TAGGATYDSI	TDFCNATAT	WTQQRGGLAR	301	CASGGGSPSV	IQSQHPDTHV	VFSNIRWGD	GSTTKN	
351	MGEAIGRMV	LIFSLWVDNG	GFMNWLDNNG	AGPCNATEGD	PALILQQHPR						
401	ASVTFSNIRW	GEIGSTYKSE	CSH								

Figura 23 - Lista de peptídeos identificados por LC-MS/MS. Em vermelho são os peptídeos identificados e que correspondem com os peptídeos da sequência das proteínas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 com 45% e 58% de cobertura, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.1.2 Purificação

Os transformantes escolhidos foram plaqueados em meio mínimo sólido com piridoxina e incubados a 37 °C para produção de esporos e posterior inoculação em placas de Petri com meio de expressão líquido em condições estacionárias a 37 °C. O micélio foi separado, devidamente descartado e o meio foi concentrado e tamponado em pH acima do pI das proteínas (Tabela 6) para serem carregadas em coluna de troca iônica *DEAE Sepharose CL6B*.

O gel da Figura 24 exibe o perfil das frações eluídas com gradativo aumento de NaCl para obtenção da proteína com maior grau de pureza. O perfil da TtCel7.2 (Figura 24 A) mostra duas bandas difusas em 300 e 400 mM e o da TtCel7.3 (Figura 24 B) apresenta bandas desde 0 a 500 mM de NaCl, o que sugere existir populações com diferentes estados de cargas intrínsecas, podendo ser atribuído aos diferentes padrões de glicosilação das proteínas.

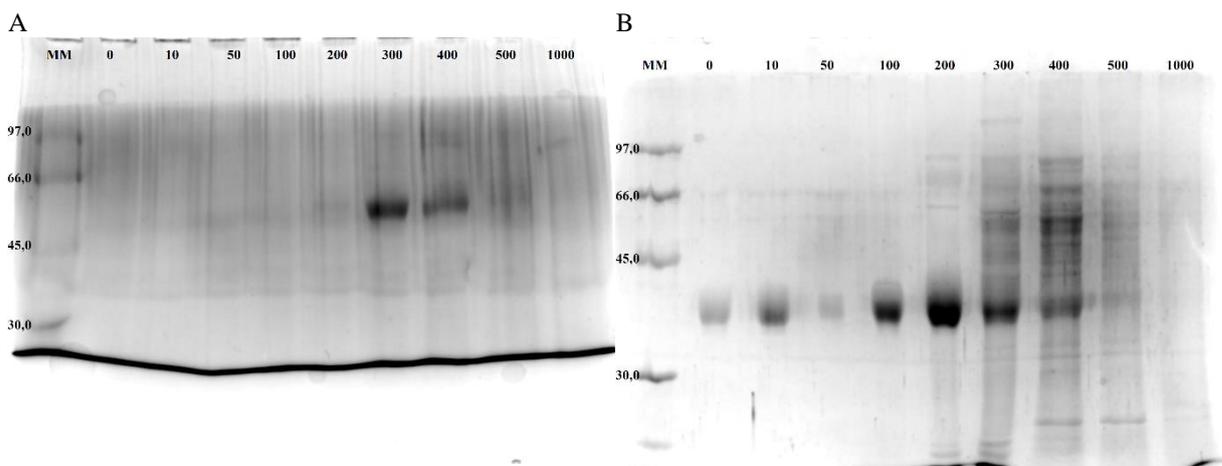


Figura 24 - Perfil SDS-PAGE das frações eluídas com aumento gradativo da concentração de NaCl da purificação da A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 com resina de *DEAE Sepharose CL6B*. MM: Massa molecular em kDa; 0, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 representam a concentração em mM de NaCl.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fração de 300 mM de NaCl da TtCel7.2 e as frações de 100 e 200 mM de NaCl da TtCel7.3 foram concentradas para serem injetadas em sistema *Äkta* acoplado com coluna de *Sephacryl* equilibrada para separação por exclusão de massa molecular. O cromatograma da purificação encontra-se na Figura 25 A e B juntamente com a imagem de SDS dos picos cromatográficos (Figura 25 C) mais intensos, os quais pode se estimar qualitativamente o grau de pureza alcançado pelas etapas de purificação.

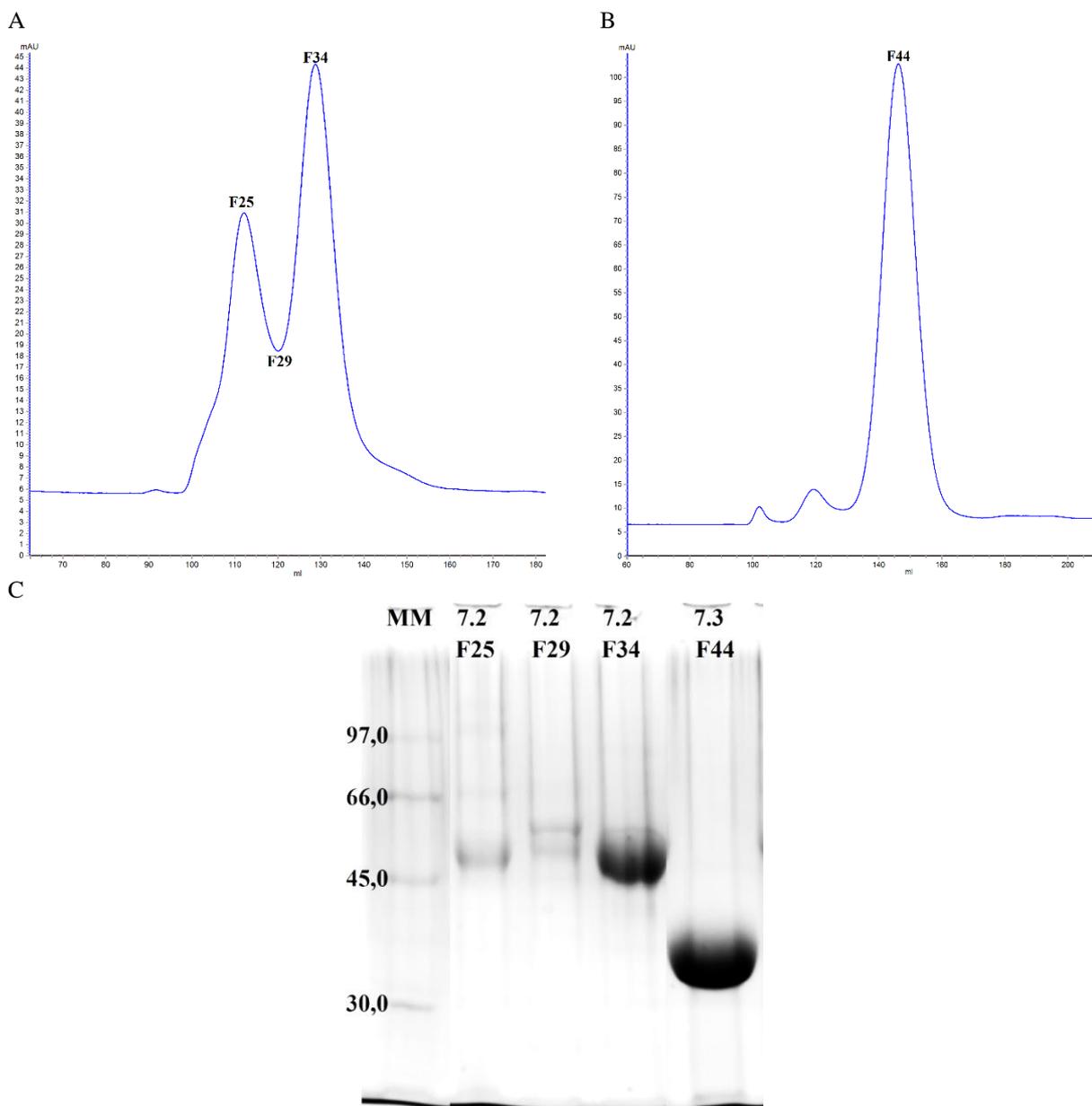


Figura 25 - Cromatograma de unidades de absorção (sigla em inglês, AU) em 280 nm da eluição (mL) em coluna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR das frações contendo as proteínas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3 após purificação por DEAE Sepharose CL6B e C) SDS-PAGE das frações (F) dos picos cromatográficos. MM: Massa molecular em kDa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com a análise dos perfis cromatográficos e de eletroforese, a pureza das amostras F34 da TtCel7.2 e a F44 da TtCel7.3 foi considerada satisfatória, pois não apresentou nenhuma banda ou pico de impureza que fosse equiparável à quantidade de proteína de interesse obtida nessa fração, portanto, as amostras seguiram com as etapas de caracterizações.

3.3.1.3 Espectro de dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular foi utilizado para avaliar o enovelamento das proteínas, a fim de qualificar o conteúdo de estruturas secundárias presentes nas amostras. Os mínimos e máximos do sinal de CD ocorrem devido as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ e a intensidade das transições depende dos ângulos de torção Φ e Ψ . A transição $n \rightarrow \pi^*$, que envolve elétrons não ligados do oxigênio do carbonil, acontecem um pico negativo em 222 nm para hélices α , um positivo em 196 nm para folhas β e um positivo em 212 nm para estruturas sem ordenação. Já a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, um pico positivo em 192 e um negativo em 208 nm são característicos de hélices α ; um pico negativo em 218 nm ocorre para as folhas β e um negativo em 195 nm para estruturas sem ordenação.¹⁹⁶

A região de 178 a 190 nm, mais precisamente de 160 a 190 nm também pode ser monitorada, mas é alcançada apenas com fonte de luz sincrotron devido a melhor relação sinal/ruído,¹⁹⁷ no espectropolarímetro utilizado, as medidas foram realizadas entre 190 a 200 nm, permitindo a deconvolução dos dados para estimativa da informação estrutural das amostras (Tabela 7). O valor de *NRMSD* mostrou bom ajuste do espectro reconstruído em relação ao experimental (Figura 26).

Tabela 7. Dados de deconvolução dos espectros de CD de 280 a 190 nm utilizando o servidor Dichroweb das enzimas TtCel7.2 e TtCel7.3.

<i>Enzima</i>	<i>Estrutura 3D</i>	<i>Conjunto de dados</i>	<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>NRMSD</i>
TtCel7.2	β <i>Jelly Roll</i>	Set 4	0,05	0,13	0,17	0,10	0,24	0,30	0,046
TtCel7.3			0	0,03	0,28	0,14	0,23	0,31	0,033
H1: Hélice α regular		S1: Folhas β regular					D: Desordenadas		
H2: Hélice α destorcida		S2: Folhas β distorcida					V: Voltas		
NRMSD: do inglês, <i>normalized root mean square deviation</i>									

Fonte: Elaborada pelo autor.

A composição de estruturas secundárias das enzimas foi ligeiramente diferente, mas prevaleceram estruturas de folhas- β como maioria, o que vai ao encontro da arquitetura característica das proteínas dessa família (β *Jelly Roll*), compondo 27% para TtCel7.2 e 42% para TtCel7.3. Quanto à hélices- α a estrutura da TtCel7.2 mostrou maior composição (18%) em

relação a TtCel7.3 (3%), o que remete a natureza mais compacta da TtCel7.3, já que possui menor massa comparada à TtCel7.2, sugerindo que o conteúdo de hélices- α pode funcionar como adereços à enzima, podendo gerar diferenças entre adsorção ao carboidrato, estabilidade térmica, cinética enzimática, interação com íons, atividade em substratos, estado oligomérico.

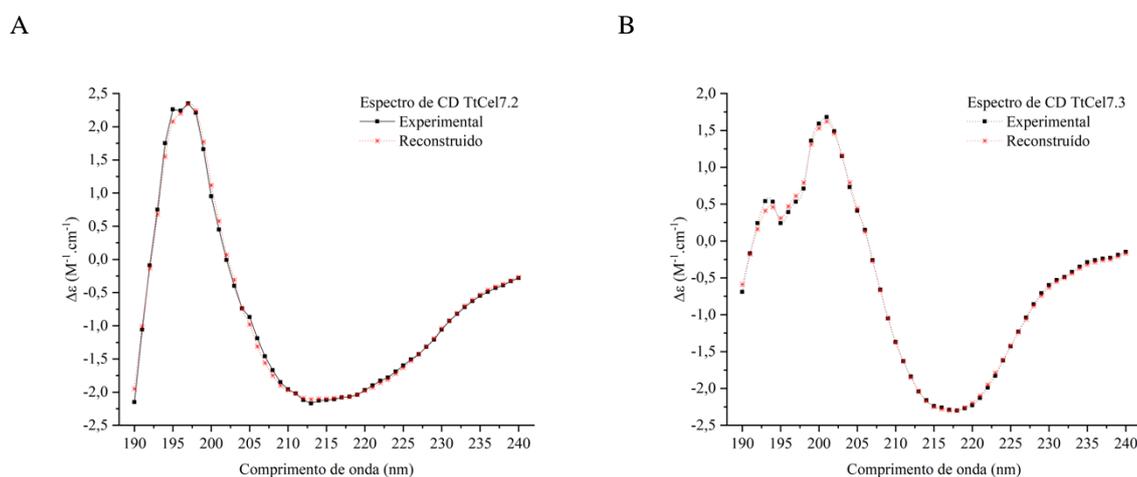


Figura 26 - Espectros de dicroísmo circular experimental e reconstruído da A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3
Fonte: Elaborada pelo autor

O espectro foi capaz de analisar o enovelamento das proteínas, tratam-se de enzimas ordenadas com padrão estrutural tipo β -jelly roll,¹⁹⁸ característico de folhas β , como mostra o gráfico com pico em 218 nm (Figura 26 A e B). O monitoramento da elipticidade ocorreu em 222 nm (devido a melhor relação sinal/ruído) em função do aumento da temperatura, o que possibilitou a construção de uma curva de transição térmica entre os estados enovelado e desenovelado, que por ajuste sigmoidal, foi obtido o valor da temperatura de transição (T_m , do inglês *melting temperature*). As curvas de transição térmica das estruturas resultaram em um T_m de 56,4 °C para TtCel7.2 e 53,4 °C para TtCel7.3 (Figura 27). As diferenças entre as temperaturas de transição podem estar relacionadas com o maior conteúdo de hélices α na TtCel7.2 (Tabela 7), o que pode ter deslocado a temperatura de transição devido ao maior efeito cooperativo do enovelamento.

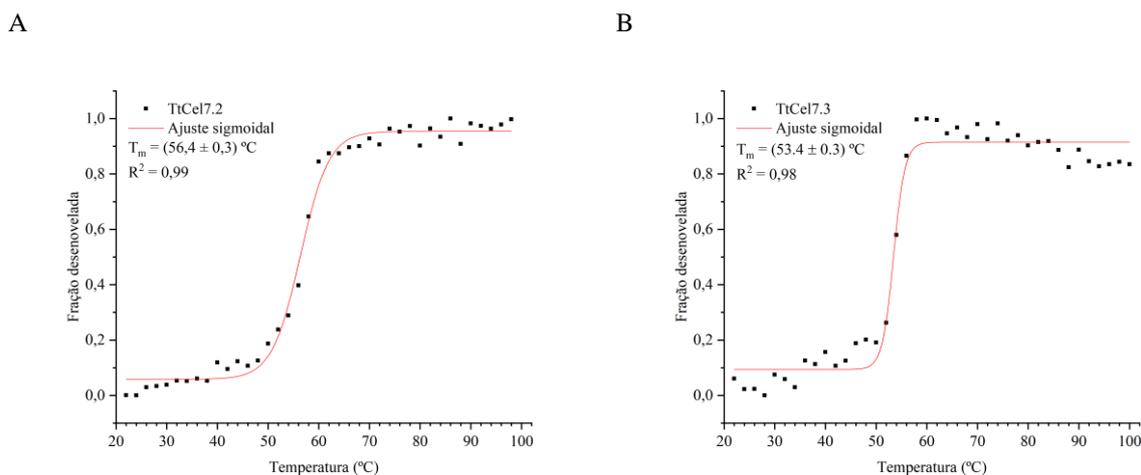


Figura 27 - Curvas de transição térmica com monitoramento da elipticidade em 222 nm da A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3

Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.1.3 Estado oligomérico em solução

O estado oligomérico das proteínas em solução foi medido através de SEC-MALS, as amostras foram injetadas em um sistema HPLC, conectado a uma coluna de separação por exclusão molecular, acoplada a um MALS (do inglês, *multiangle light scattering*). O sistema mensura o índice de refração do fluxo que eluia da coluna, juntamente com o raio de Rayleigh das dispersões da luz incidente em três diferentes ângulos. Com esses dados, os valores de massa foram calculados pelo programa *ASTRA* através do raio de Rayleigh das dispersões apenas onde havia mudança no índice de refração e cuja relação entre incremento do índice de refração e de concentração (dn/dc) seja igual a 0,185, típico de proteínas (Figura 28).¹⁹⁹

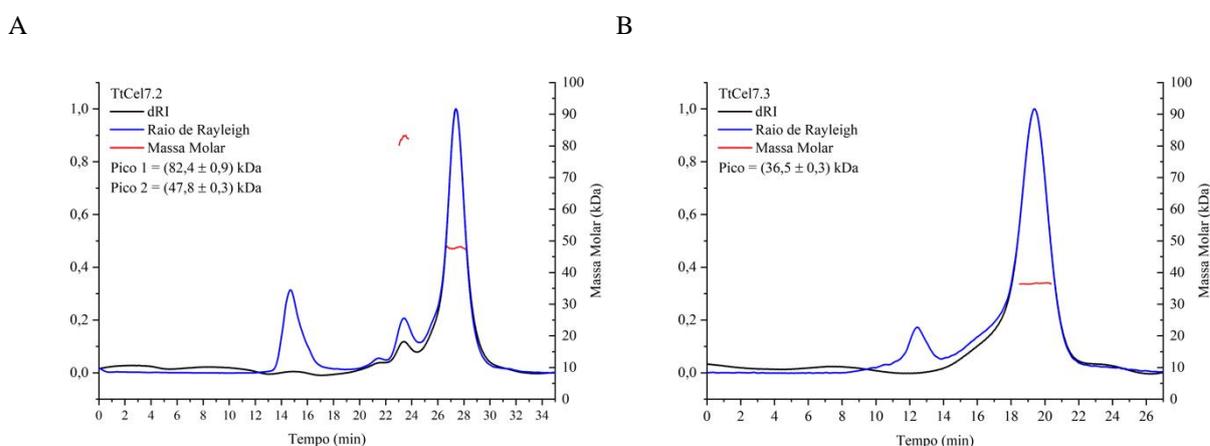


Figura 28 - Distribuição da massa molar e sobreposição de cromatogramas de dispersão de luz (raio de Rayleigh) e índice de refração diferencial (dRI) em função do volume de eluição das amostras A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3.

Fonte: Elaborada pelo autor

De acordo com as medidas apresentadas pelo ASTRA (Tabela 8), a enzima TtCel7.2 apresenta duas formas oligoméricas em solução, dímero e monômero, apresentando 82,4 e 47,8 kDa e a fração de massa de 6,4 e 93,6%, respectivamente. Esse dado corrobora com o cromatograma de purificação (Figura 25 A), em que se observa a presença de dois picos e nenhum contaminante na região de 80 kDa na imagem SDS-PAGE dos picos cromatográficos (Figura 25 C). Para a enzima TtCel7.3 o experimento apontou apenas a forma monomérica em solução como a predominante, apresentando massa experimental de 36,5 kDa.

Tabela 8 - Medidas de massa molecular experimentais e teóricas de acordo com o estado oligomérico.

	Estado oligomérico	Massa molecular experimental (kDa)	Massa molecular teórica (kDa)	Desvio (kDa)	Desvio relativo (%)
TtCel7.2	Monômero	47,8 ± 0,3	43,4	4,4	10
TtCel7.2	Dímero	82,4 ± 0,3	86,8	-4,4	10
TtCel7.3	Monômero	36,5 ± 0,9	33,3	3,2	10

Fonte: Elaborada pelo autor

Embora as medidas experimentais de massa das enzimas e seus estados oligoméricos possuem precisão de uma casa decimal, existe 10% de desvio entre os valores teóricos e os experimentais (Tabela 8). A medida de massa para o dímero da TtCel7.2 ficou subestimado em relação a predição teórica baseado na sequência de aminoácidos, enquanto que as massas de ambos os monômeros ficaram superestimadas (Tabela 8). A princípio e como mostram as predições de O-glicosilação e N-glicosilação (Tabela 6), juntamente com o perfil de mobilidade em SDS-PAGE, já se esperava uma medida superestimada da massa de ambas as proteínas, porque as glicosilações aumentariam o raio hidrodinâmico dos monômeros, mudando o espalhamento de luz. Mas se esperava que esse efeito atuasse sobre o dímero, resultando em uma massa superestimada também, no entanto, não foi o que se observou.

A presença de glicosilações nas enzimas recombinantes podem ser, inicialmente, detectadas por diferentes métodos colorimétricos como PAGE e *Western Blot*: usando o método PAS (do inglês, *Periodic acid-Schiff*),²⁰⁰ que colore de magenta as bandas de glicoproteínas contra um fundo rosa claro ou sem cor; usando biotina para rotular glicoproteína, seguido por reconhecimento com estreptavidina-peroxidase e detecção colorimétrica com tetrametilbenzidina, ou quimiluminescência através de substrato para a peroxidase.²⁰¹ Lectinas e concavalinas reconhecem glicosilações e podem estar conjugadas com biotina ou peroxidase, seguido de detecção por quimiluminescência ou colorimétrica.

Geralmente, as N-glicosilações apresentam muitas ramificações, podendo contribuir com 3,5 kDa ou mais à estrutura da glicoproteína, enquanto que as O-glicosilações apresentam de um a quatro resíduos, embora possam ser mais numerosas.²⁰² Caso a diferença entre a massa da proteína glicosilada e não-glicosilada possa ser detectada por SDS-PAGE, a remoção das glicosilações pode ser alcançada através de processo químico ou enzimático e, uma vez que os glicanos tenham sido liberados da glicoproteína, podem ser analisados por espectrometria de massa (MS) ou, após marcação fluorescente, por HPLC ou MS, ou ambos. As N-glicosilações podem ser removidas pela PNGase F (do inglês, *Peptide-N-Glycosidase F*), que libera integralmente a estrutura de oligossacarídeos ligados à asparagina (N-glicosilações) pela hidrólise do grupo amino da cadeia lateral da asparagina. Para as O-glicosilações, é necessário as suas remoções da proteína através de um conjunto de exoglicosidases utilizadas para hidrolisar os sacarídeos até o núcleo Gal- β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc (Gal: Galactose, GalNAc: N-acetylgalactosamine) ancorado à serina/treonina, que é removido por O-glicosidases.²⁰³ A remoção dos ácidos siálicos ou NeuAc (do inglês, *N-acetylneuraminic acid*) terminais das cadeias é feita pela α -(2-3,6,8,9)-neuraminidase,²⁰⁴ que expõe a estrutura composta pelos monossacarídeos. Outras enzimas também podem ser associadas para remoção de outras estruturas específicas de O-glicosilações, como β -(1-4)-galactosidase e β -N-acetil glucosaminidase.²⁰⁵⁻²⁰⁶

3.3.1.4 Paineis de substratos

As celulasas da família 7 são responsáveis pela clivagem das ligações 1,4- β glicosídicas da cadeia de celulose, mas alguns membros também são capazes de atuar nas ligações em xilano e quitosana, bem como em ligações 1,3-1,4- β glicosídicas de liquenano ou β -glucano. Os membros dessa família podem ser do tipo endo ou exoglucanases de terminal redutor e atuam por mecanismo de retenção da configuração do carbono anomérico.¹⁹⁸

Quando a sequência das enzimas é submetida ao alinhamento local, através dos parâmetros padrões do BLASTP,¹¹⁷ o programa retorna várias endo- β -1,4-glucanases de organismos diversos, como o resultado do alinhamento para ambas, sendo as 100 primeiras sequências com cobertura maior que 95%, *e-value* menor que 10^{-134} e identidade maior que 50,24% para TtCel7.2, cobertura maior que 98%, *e-value* menor que 10^{-108} e identidade maior que 48,24% para TtCel7.3. Sendo assim, já é esperado maiores atividades em substratos com ligações glicosídicas β -1,4 entre monômeros de glicose, tal como a celulose.

A Tabela 9 revela que a maior atividade para ambas as enzimas foi em β -glucano, que apresenta ligações 1,4- β e 1,3- β nas proporções entre 4:2 e 3:2, respectivamente. Outro substrato com mistura de tipo de ligação entre os monômeros de glicose e que as enzimas tiveram atividade de 39% para TtCel7.2 e 43% para TtCel7.3, foi o liquenano, com proporção de ligação 2:1 para os tipos de ligação 1,4 e 1,3- β , respectivamente. A alta atividade nesse tipo de substrato está mais relacionada à acessibilidade ao esqueleto do polissacarídeo do que quanto à capacidade das enzimas em hidrolisar ligações 1,3- β – atividade esta esperada para liquenases – em comparação ao CMC (14% para TtCel7.2 e 11% para TtCel7.3), que é um substrato puramente 1,4- β e de mais difícil acesso, em que os grupos carboximetil podem interferir na atividade enzimática.

Tabela 9 - Relação da atividade relativa das enzimas recombinantes nos diferentes substratos testados nas condições de pH e temperatura ótimos. TtCel7.2: pH 4,5 e 60 °C; TtCel7.3: pH 4,5 e 50 °C.

Substratos	Atividade relativa (%)	
	TtCel7.2	TtCel7.3
<i>β-Glucano</i>	100,0 \pm 0,7 ^D	100 \pm 7 ^C
<i>Xiloglucano</i>	42 \pm 1 ^E	27,7 \pm 0,4 ^D
<i>Liquenano</i>	39 \pm 2 ^F	43 \pm 2 ^E
<i>Arabinoxilano</i>	29,2 \pm 0,7 ^C	2,0 \pm 0,3 ^A
<i>Xilano</i>	28 \pm 1 ^C	7,7 \pm 0,2 ^B
<i>CMC</i>	14,5 \pm 0,9 ^G	11 \pm 1 ^B
<i>Galactano péctico</i>	0,8 \pm 0,2 ^{A, B}	1,5 \pm 0,3 ^A
<i>Galactano</i>	0,7 \pm 0,2 ^{A, B}	0,1 \pm 0,1 ^A
<i>Arabinano desramificado</i>	0,5 \pm 0,2 ^{A, B}	0,7 \pm 0,1 ^A
<i>Galactomanano</i>	0,5 \pm 0,1 ^{A, B}	0,4 \pm 0,1 ^A
<i>Ramnogalacturonano</i>	0,0 \pm 0,6 ^A	0 \pm 1 ^A
<i>Manano</i>	0,0 \pm 0,5 ^A	0,1 \pm 0,9 ^A
<i>Arabinano</i>	0,00 \pm 0,03 ^{A, B}	0,2 \pm 0,3 ^A
<i>Arabinogalactano</i>	0,2 \pm 0,1 ^{A, B}	0,0 \pm 0,2 ^A
<i>Ác. Poligalacturônico</i>	1 \pm 1 ^B	2,0 \pm 0,9 ^A

^{A, B, C...} Subconjuntos homogêneos entre os quais existe diferença significativa ($p < 0,05$), mas não dentro deles, pelo teste de *post hoc*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Também, é interessante observar a atividade de ambas as enzimas em xiloglucano, que é um polissacarídeo composto por um esqueleto de glicose ligadas por 1,4- β e ramificações majoritariamente de 1,6- α -xilossil e 1,6- α -xilose-1,2- β -galactossil, podendo representar um possível impedimento estérico à interação entre o sítio ativo da enzima com o esqueleto do substrato. Mas em relação a esse substrato, a TtCel7.2 tem 42% em comparação aos 27,7% da TtCel7.3, indicando um sítio ativo, provavelmente, mais adaptável da TtCel7.2 às ramificações de substratos baseados em glicose.

Como já relatado para as celulases da família 7 essas também apresentam atividade em xilano,¹⁹⁸ com porcentagem de 29,2% para TtCel7.2 e 7,7% para TtCel7.3 – adicionalmente, em arabinoxilano – 29,2% e 2,0% para TtCel7.2 e TtCel7.3, respectivamente. O arabinoxilano é um polissacarídeo mais ramificado que o xilano, embora este possa apresentar 13% de 4-O-metil- α -glucuronosil, com aproximadamente 38% de substituições 1,2 e 1,3- α -arabinosil. Isso sugere que a TtCel7.2 possui um sítio menos seletivo à substratos baseados em xilose com diferentes graus de ramificações, em comparação à TtCel7.3, que possui muito menor atividade nesse tipo de substrato e já apresentou dificuldade em acomodar ramificações como observado em xiloglucano.

Embora exista atividade em xilano para TtCel7.3, ela é bem menor do que para TtCel7.2, indicando que o sítio da TtCel7.2 é mais promiscuo quanto a constituição do esqueleto do polissacarídeo, isso pode ser uma consequência de um sítio ativo mais adaptável as ramificações, pois também a atividade da TtCel7.3 é menor para substratos ramificados. Observa-se então uma possível diferença entre os sítios ativos das enzimas: seguindo a ordem de atividade para TtCel7.3, sua preferência descende dos polissacarídeos com esqueleto de glicose dos menos para os mais ramificados, seguido por CMC e pelos substratos de xilano; já para a TtCel7.2, a ordem descende pelo critério da constituição da cadeia principal, de glicose para xilose, do que pelo grau de ramificações.

Como essas diferenças podem estar relacionadas ao maior conteúdo de hélices- α da TtCel7.2 em relação à TtCel7.3, a estrutura modelada por homologia, através do servidor Swiss-Model,²⁰⁷ pode contribuir com uma inspeção visual da localização dessas hélices, que podem dar uma ideia do porquê das atividades nos substratos investigados. Dessa forma, a região do aminoácido do 20 ao 423 da TtCel7.2 e do 18 ao 336 (correspondem à proteína sem o peptídeo sinal) foi selecionada para construção automática de um modelo estrutural por homologia. O modelo escolhido para a TtCel7.2 foi o PDB: 2XSP (1,7 Å), uma celobioidrolase de *Heterobasidion annosum* com identidade sequencial de 50,76%; para a TtCel7.3 foi uma endoglucanase de *Trichoderma harzianum* PDB: 5W0A (2.9 Å).

Os parâmetros do modelo da TtCel7.2 (Figura 29, na cor magenta) foram: GMQE (do inglês, *Global Model Quality Estimation*, com valores entre 0 e 1) de 0,79 (número próximos de 1 indicam maior confiabilidade do modelo), QMEAN de -1,38, pontuação *MolProbability* de 1,54 e Ramachandran favorável de 94,22%. Para a TtCel7.3 (Figura 29, na cor verde): GMQE (do inglês, *Global Model Quality Estimation*, com valores entre 0 e 1) de 0,81, QMEAN (do inglês, *Qualitative Model Energy Analysis*) de -1,34, *MolProbability* de 1,87 e Ramachandran favorável de 94,89%. Pelas imagens dos modelos gerados (Figura 29) é possível observar a

arquitetura estrutural tipo β *Jelly Roll* em ambos os modelos, que é característico das enzimas pertencentes a família 7. Também, nota-se que a estrutura da TtCel7.3 é mais compacta e apresenta bem menos adereços estruturais, como as hélices- α , ao redor do núcleo de folhas- β do que a TtCel7.2, como a deconvolução dos dados de CD estimaram: 18% e 3%, respectivamente.

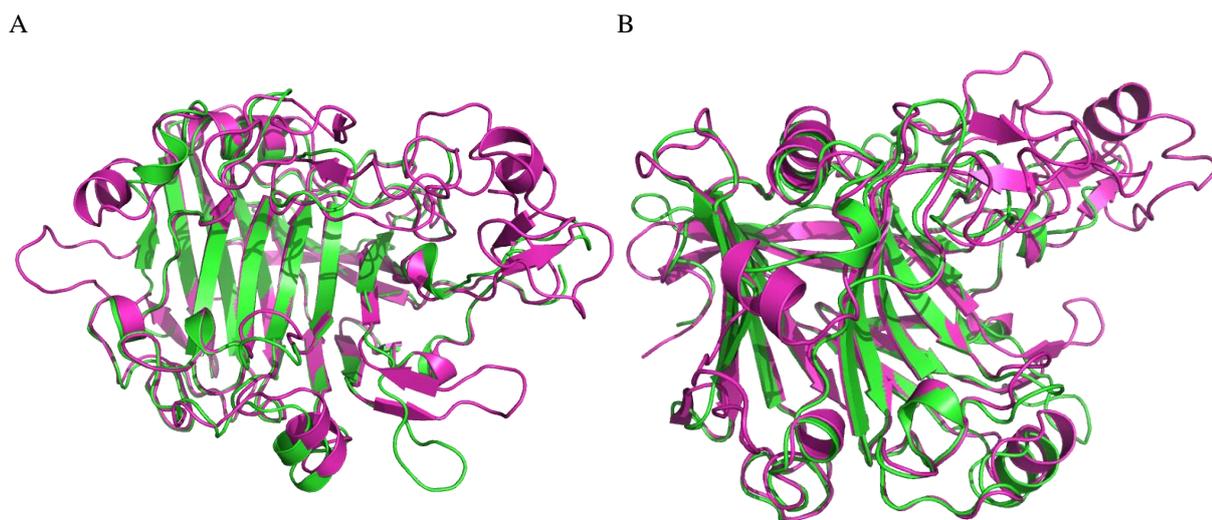


Figura 29 - Alinhamento dos modelos estruturais da TtCel7.2 (magenta) e da TtCel7.3 (verde). A) vista de frente do sítio de interação com o substrato e B) Rotação de 90° em torno do eixo vertical.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O alinhamento dos modelos estruturais da Figura 29 evidencia que a diferença no número de aminoácidos entre as enzimas está concentrada na região do bolso de ligação ao substrato. Esses aminoácidos adicionais que a TtCel7.2 possui em relação a TtCel7.3 permitem que a superfície dessa fenda seja capaz de abrigar as ramificações dos substratos, em contraposição a uma estrutura mais estreita da TtCel7.3 (Figura 30). Outra questão, é a possível flexibilidade decorrente do número maior de voltas e hélices- α , que decoram o bolso de ligação ao substrato na estrutura da TtCel7.2, em contraposição a estrutura mais rígida da TtCel7.3.

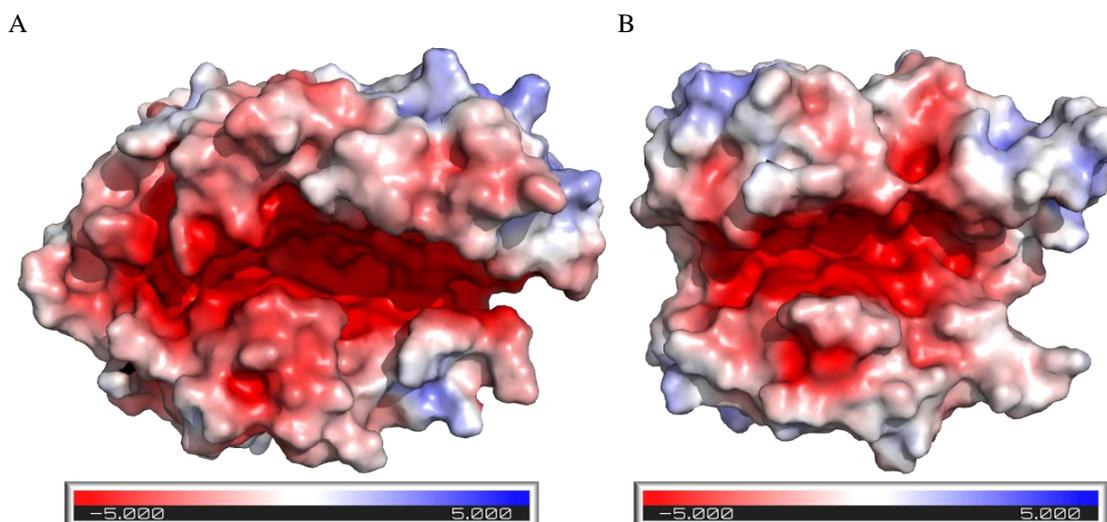


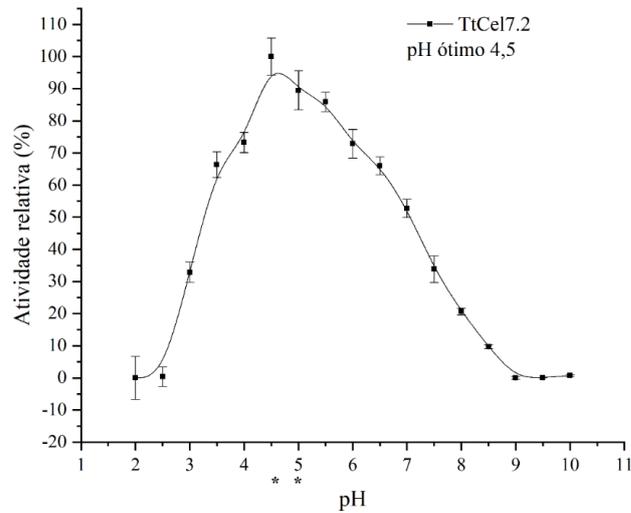
Figura 30 - Superfície eletrostática gerada pela ferramenta *APBS Electrostatics* do Pymol dos modelos das enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3. As cores representam o potencial eletrostático da superfície molecular, entre -5 e +5 kT/e.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.1.5 Temperatura e pH ótimos

Como o CMC é um substrato padrão para endocelulases em geral e mais barato, ele foi escolhido para determinar as próximas caracterizações. O pH em que foi medida a máxima atividade para ambas as celulases foi 4,5. No entanto, a TtCel7.3 apresentou uma atividade acima de 80% para um faixa de pH entre 3,5 e 5,5 (Figura 31 A), enquanto a TtCel7.2 ficou entre 4,5 e 5,5 (Figura 31 B). A sintonização mais fina do pH na reação pode indicar que a maioria das interações responsáveis pela ligação ao substrato sejam de natureza eletrostática em comparação a uma faixa de pH mais ampla, que pode apresentar natureza de interação do tipo *van der Waals*, ou de empilhamento π , ou hidrofóbica, cujo estado de protonação das cadeias laterais dos aminoácidos não influencie tanto a atividade da enzima.

A



B

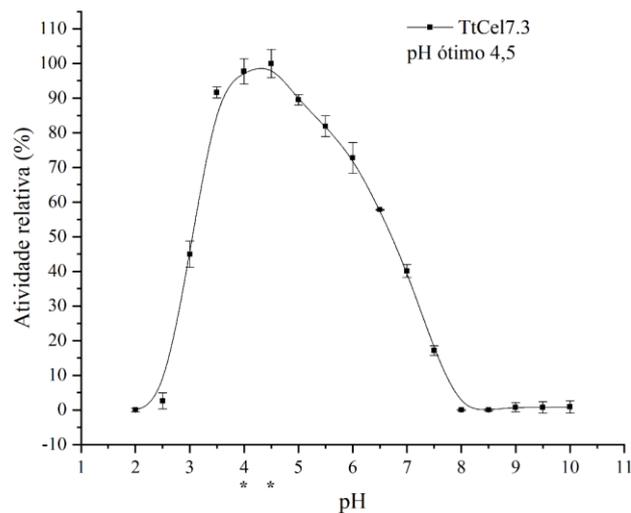


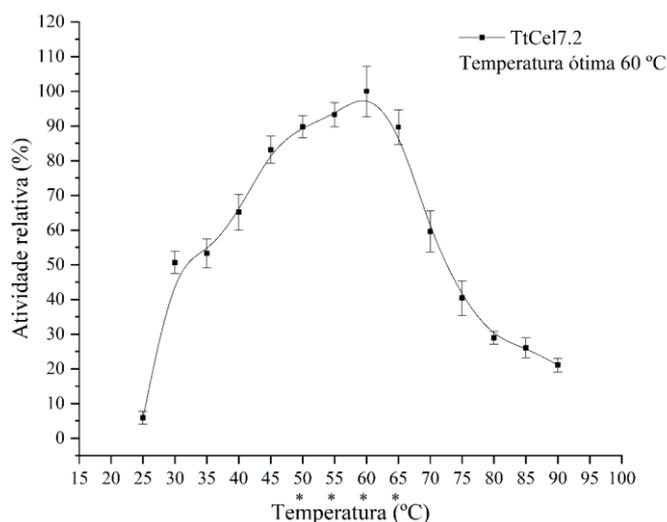
Figura 31 - Atividade relativa em função do pH das enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3. Os asteriscos indicam que pela análise estatística de *post hoc* não existe diferença significativa de atividade entre o pH ótimo (com maior valor médio de atividade relativa) e aqueles pHs.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já a temperatura pode influenciar na taxa de encontros efetivos entre o substrato e a enzima, bem como na flexibilidade para acomodar o mesmo, resultando em maior taxa de reação. No entanto, a temperatura, ao mesmo tempo que seu aumento favorece a cinética de reações, pode causar o desenovelamento das proteínas, gerando perda da estrutura e, conseqüentemente, perda da atividade. Ao analisar a atividade da TtCel7.2 em função da temperatura, ela manteve-se acima de 80% dentro de uma faixa de 45 a 65 °C, apresentando

máxima entre 50-65 °C (Figura 32 A). Já a TtCel7.3 apresentou uma faixa mais ampla com mais de 80% de atividade, indo de 35 a 65 °C, com máxima entre 45-55 °C (Figura 32. B).

A



B

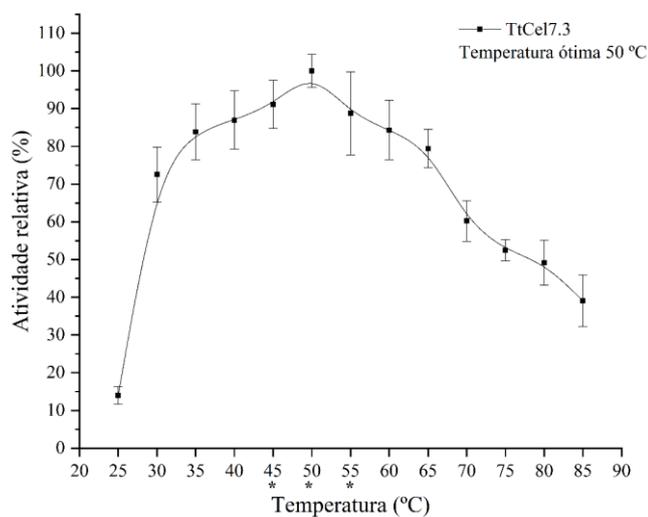


Figura 32 - Atividade relativa da A) TtCel7.2 e da B) TtCel7.3 em função da temperatura. Os asteriscos indicam que pela análise estatística de *post hoc* não existe diferença significativa de atividade entre a temperatura ótima (com maior valor médio de atividade relativa) e aquelas temperaturas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Mais uma vez a TtCel7.3 apresentou características distintas da TtCel7.2, que podem ter repercutido na probabilidade da TtCel7.3 alcançar um estado de transição com o substrato em temperaturas próximas de 35 °C, ocorrendo a catálise enzimática. Essas características podem estar relacionadas com a estrutura dos aminoácidos próximos ao sítio de interação com

o substrato da TtCel7.2. Lembrando que, em termodinâmica, quanto maior a energia do sistema, maior o número de estados possíveis, isso sugere que a TtCel7.3 alcança o estado de transição com o substrato em uma faixa de temperatura maior do que a TtCel7.2. Assim, espera-se que a estrutura da fenda de ligação ao substrato da TtCel7.3 traga uma restrição aos estados possíveis de conformação, favorecendo o estado de ligação com o substrato. Conforme visto no modelo estrutural de ambas as enzimas (Figura 29), a temperatura ótima maior para a TtCel7.2 pode indicar que o aumento da energia do sistema contribui para o aumento da energia das estruturas que decoram a fenda e isso reflita diretamente no estado de transição entre a enzima e o substrato.

3.3.1.6 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima reflete a manutenção estrutural frente a intervalos de temperatura e tempo, que ainda preservem a atividade catalítica nas condições ótimas da reação enzimática (pH e temperatura). O gráfico da Figura 33 reúne o comportamento da atividade residual após a incubação das enzimas TtCel7.2 e TtCel7.3 por 5, 15, 30, 60 e 180 minutos em diferentes temperaturas.

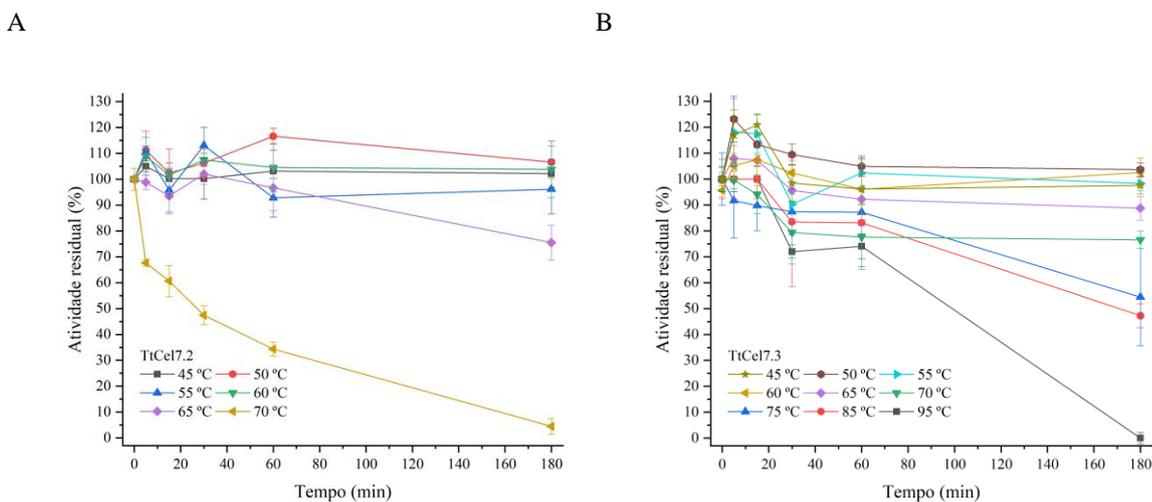


Figura 33 - Atividade residual após incubação por diferentes períodos e temperaturas das enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A TtCel7.2 após 180 minutos em 60 °C ainda mantém 100% de atividade catalítica e em até 65 °C ainda preserva 80% da atividade. Mas quando ela é incubada à 70 °C por 5 minutos sua atividade cai para valores menores que 70%, após 30 minutos já perdeu 50% de sua atividade e em 180 minutos, praticamente, ela já está inativada (Figura 33 A). Paralelamente, o

T_m do CD é 56,4 °C, o que sugere que menos da metade da população de enzimas está cataliticamente ativa em 60 °C, mas que podem ser suficientes para manter a atividade alta nas condições ótimas de reação. Também, que na reação à temperatura ótima de 60 °C o substrato ajuda a estabilizar a estrutura das enzimas, produzindo um efeito cooperativo no enovelamento delas, pois não se viu precipitado na cubeta de CD e nem nos tubos da reação, indicando que nessa temperatura o desenovelamento possa ser reversível. Por fim, por pelo menos 180 minutos de incubação, a TtCel7.2 consegue manter em 100% sua taxa de reação na temperatura ótima de 60 °C.

Já a TtCel7.3 mostrou um perfil menos homogêneo em relação à atividade residual para os mesmos intervalos de tempos (Figura 33 B), sendo experimentada até a temperatura de 95 °C para ser possível observar uma redução em 50% da atividade com 30 minutos de incubação. Até 60 °C a enzima mantém 100% da sua atividade com no mínimo 180 minutos de incubação e, com o mesmo tempo de incubação, praticamente 90% em 65°C. Mas com 180 minutos à 85 °C, a enzima ainda apresenta mais de 50% de atividade. Em contraponto, o T_m do CD da TtCel7.3 foi de 53,4 °C e menor do que a da TtCel7.2 (56,4 °C), o que pode sugerir que até 65-70 °C a enzima possa apresentar desenovelamento reversível, sendo necessário avaliar essa condição por CD, medindo o espectro de aquecimento e arrefecimento da TtCel7.3.

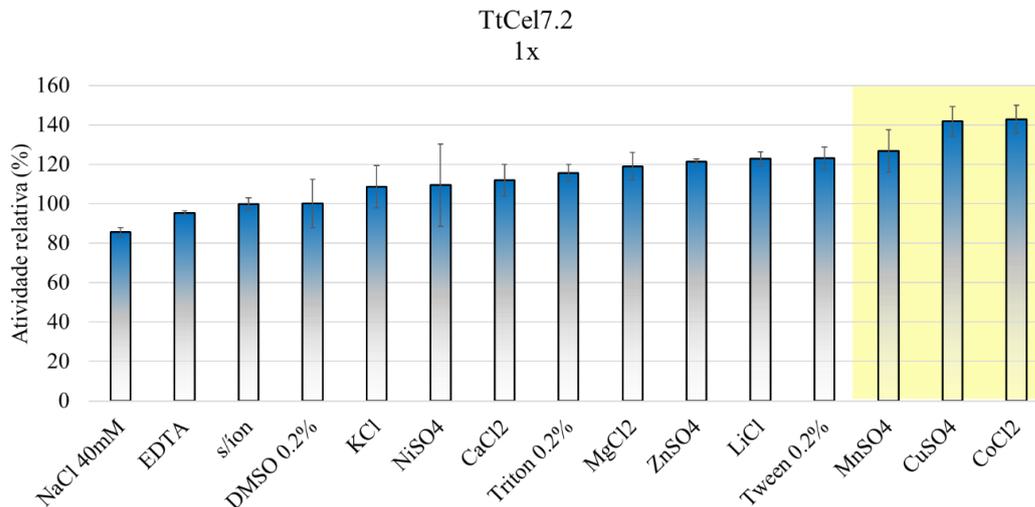
Essa estabilidade térmica apresentada pela TtCel7.3 parece ser bastante vantajosa em relação a TtCel7.2, o que remete às características estruturais distintas entre as duas e que podem ser atribuídas a essa capacidade. Retomando a figura dos modelos das enzimas (Figuras 29 e 30), os adereços estruturais do bolso de ligação ao substrato da TtCel7.2 pode ser desvantajosa acima de ~65 °C em relação à estabilidade estrutural do que a estrutura mais aparada da TtCel7.3, que parece atribuir maior rigidez e estabilidade térmica. Curiosamente, lembrando que *T. terrestris* apresenta enzimas com características mesofílicas e que, provavelmente, evoluiu de um ancestral mesofílico, a “pôda estrutural” da TtCel7.2 deu origem a TtCel7.3 com maior estabilidade estrutural, que pode ter auxiliado na adaptação evolutiva do fungo em sobreviver em um ambiente mais quente. O motivo para o fungo manter a TtCel7.2 pode ser especulada pela capacidade de formar dímero e isso estar relacionado à maior tolerância pela inibição do produto, ou à estabilidade estrutural.¹⁶⁰

3.3.1.7 Painel de aditivos

O efeito da presença de íons na reação enzimática foi avaliado com a intenção de encontrar possíveis contribuições ao melhoramento da performance catalítica da enzima.

Assim, o efeito inibitório ou ativador dos aditivos em duas concentrações na reação enzimática foi testado e, nas Figuras 34 e 35, encontra-se o gráfico do efeito deles para as enzimas TtCel7.2 e TtCel7.3, respectivamente.

A



B

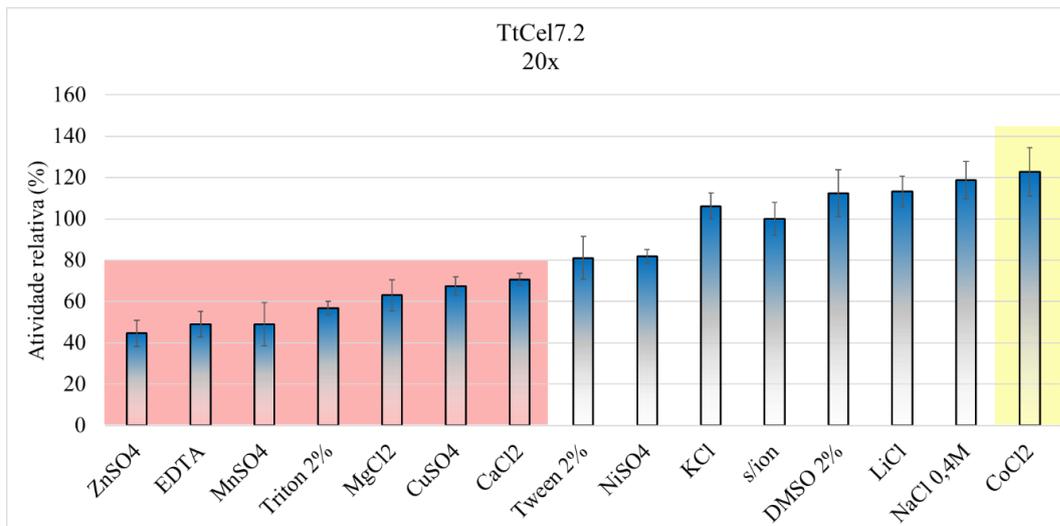


Figura 34 - Efeito da presença de aditivos na reação enzimática da TtCel7.2 a 60 °C por 5 min. A) Concentração de íons na reação de 0,5 mM (exceto quando especificado). B) Concentração 20x maior do que em A) (exceto quando especificado). Os retângulos coloridos indicam quais aditivos tiveram efeito significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *post hoc*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise estatística dos efeitos dos aditivos 1x na reação enzimática da TtCel7.2 (Figura 34 A) mostrou que nenhum deles teve efeito inibitório, pois não houve diminuição significativa ($p < 0,05$) com o controle (reação sem íons). No entanto, foi observado um aumento significativo da atividade enzimática para os íons Mn^{+2} , Cu^{+2} e Co^{+2} , na concentração de 0,5 mM em comparação à reação sem adição, potencializando para ~127-140% a atividade – os demais não tiveram efeito significativo.

Quando testado os mesmos aditivos em concentração maior (Figura 34 B), a maioria produziu efeito depressor em comparação à catalise sem aditivo, são eles: Zn^{+2} , EDTA, Mn^{+2} , Triton, Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , diminuindo a atividade para ~70-45% – e apenas o Co^{+2} teve efeito potencializador de ~23% na reação 20x em relação à catálise sem a presença dele. No entanto, com análise de *post hoc* entre as reações 1x e 20x para cada aditivo, o aumento da concentração do Co^{+2} não influenciou na reação, mas para os íons Mn^{+2} e Cu^{+2} passaram a apresentar efeito inibitório com o aumento da concentração em 20x. Por fim, os aditivos Na^{+1} , Li^{+2} , DMSO, K^{+1} e Ni^{+2} não fizeram diferença na reação, nas concentrações analisadas (Figura 34 B).

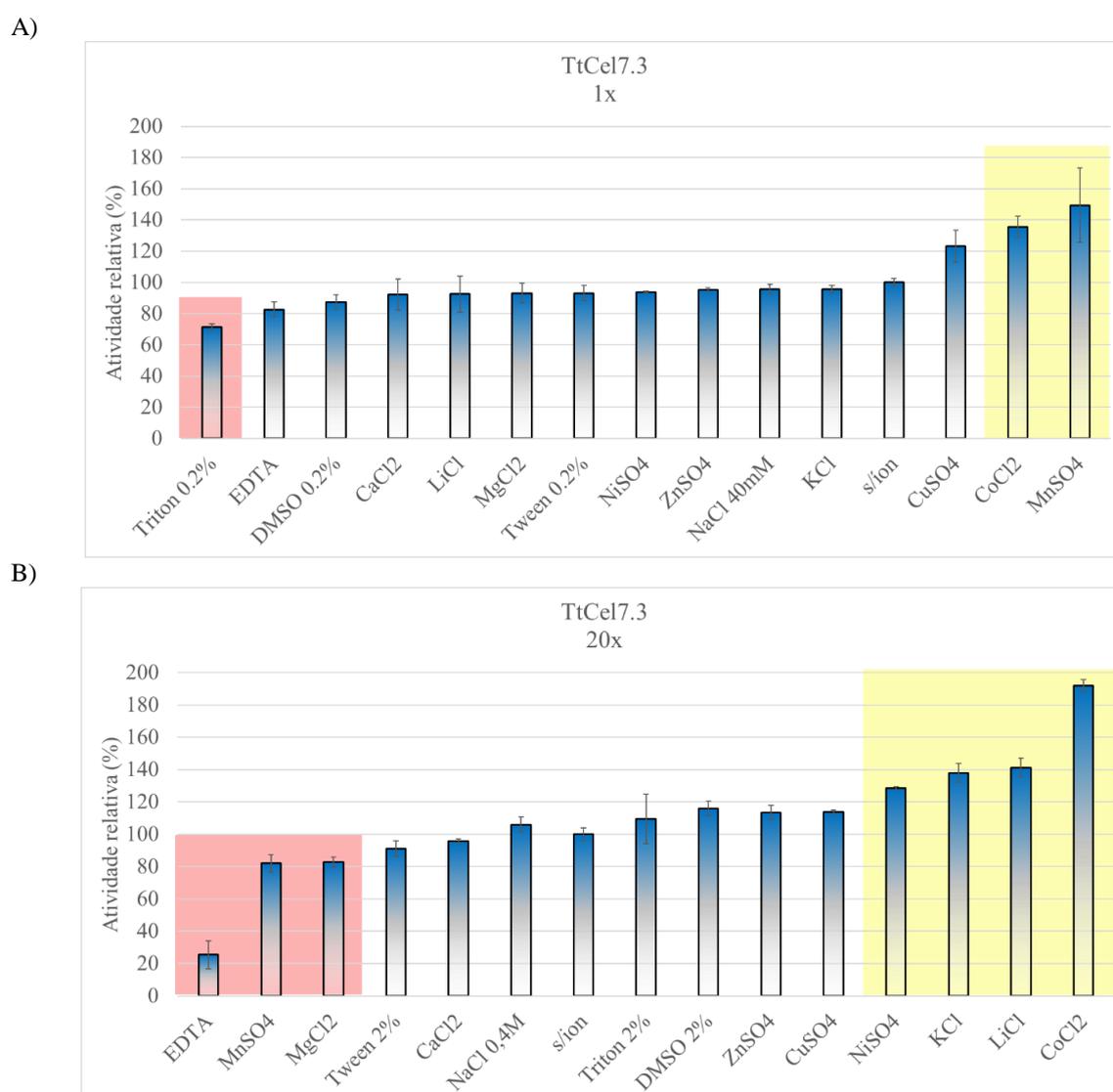


Figura 35 - Efeito da presença de aditivos na reação enzimática da TtCel7.3 à 50 °C por 10 min. A) Concentração de íons na reação de 0,5 mM (exceto quando especificado). B) Concentração 20x maior do que em A) (exceto quando especificado). Os retângulos coloridos indicam quais aditivos tiveram efeito significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *post hoc*.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os íons Co^{+2} e Mn^{+2} na reação enzimática da TtCel7.3 (Figura 35 A) potencializaram em 136-150% a atividade enzimática na concentração de 0,5 mM, enquanto que o Triton 0,2% teve efeito inibitório de ~71%, em comparação com a reação sem adição de íons – os outros aditivos não surtiram efeito significativo na reação ($p > 0,05$). Quando os mesmos aditivos foram testados em concentrações maiores (Figura 35 B), os íons Ni^{+2} , K^{+1} , Li^{+1} e Co^{+2} potencializaram a reação em ~128-192% – já os aditivos EDTA, Mn^{+2} e Mg^{+2} diminuíram a reação para ~25-83%. Nesse caso, o Mn^{+2} que a 0,5 mM teve efeito potencializador, em 10 mM produziu o efeito contrário, diminuindo a reação de 150 para 82% respectivamente.

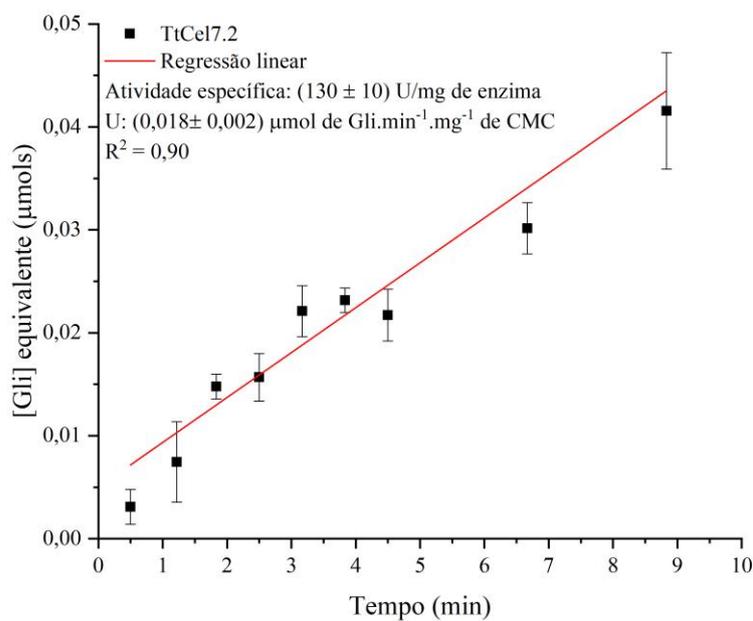
Os íons de cobalto podem ter um papel na estabilização da homogeneidade estrutural da TtCel7.2, aumentando a taxa de enzimas produtivas na reação, o que pode favorece-la – bem como na TtCel7.3 pode ter um papel preventivo na formação de agregados, o que resulta em aumento da atividade. Além desse fator, outros efeitos potencializadores podem incluir: (i) a coordenação dos grupos funcionais dos aminoácidos e moléculas de água, proporcionando a geometria do estado de transição e diminuindo os obstáculos entrópicos da reação pelo posicionamento do nucleófilo;²⁰⁸⁻²¹⁰ (ii) São capazes de mudar o pKa e a reatividade das cadeias laterais de aminoácidos;²¹¹⁻²¹² (iii) através de efeito eletrostático, podem desempenhar papel significativo na catálise sem interagir diretamente com os aminoácidos do sítio ativo;^{208,213} (iv) podem favorecer a convergência dos graus de liberdade, diminuindo a flexibilidade e posicionamento de alças e voltas, contribuindo para maior eficiência das interações entre substrato e enzima; (v) também, pode ser observado mudança na dinâmica da cinética enzimática, por aumento da relação K_{cat}/K_M , tanto pelo aumento da afinidade pelo substrato (K_M), quanto pelo aumento do número de renovação da enzima (K_{cat}). No entanto, o íon pode atuar de forma insatisfatória, dependendo da natureza do aditivo ou da concentração, por não favorecer a termodinâmica da reação, resultando em efeito supressor da atividade enzimática, como visto acima.

3.3.1.8 Atividade específica enzimática

O cálculo da atividade específica das enzimas TtCel7.2e TtCel7.3 (Figura 36) iniciou com a variação da concentração da enzima, mantendo fixo a concentração de substrato e dentro de dez minutos de reação. A concentração enzimática, que produziu uma taxa constante de formação de terminais redutores a partir de CMC, durante um intervalo de tempo, sob condições ótimas de temperatura e pH, foi considerada para o cálculo da unidade de atividade, que é

definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de glicose equivalente por minuto e por mg de CMC.

A



B

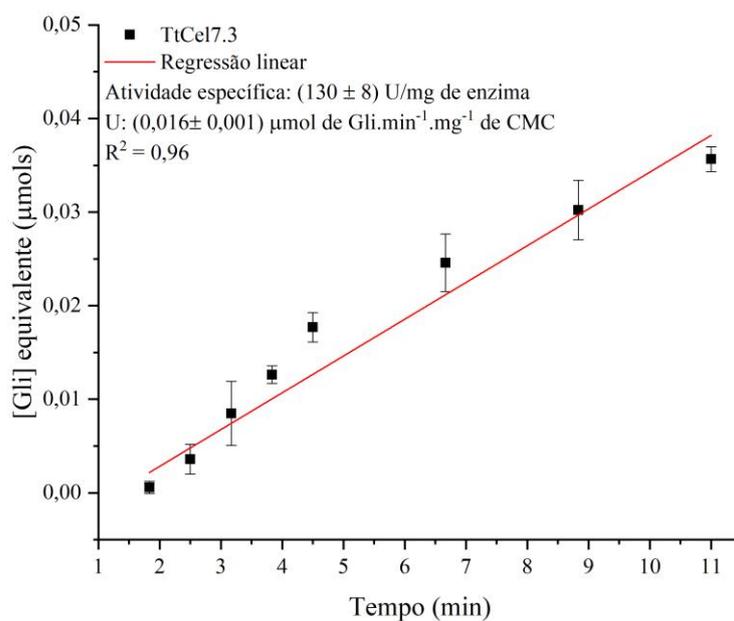


Figura 36 - Regressão linear da formação de extremidades redutoras (glicose equivalente) por minuto para cálculo da atividade específica. A) TtCel7.2 em tampão citrato/fosfato pH 4,5 à 60 °C. B) TtCel7.3 em tampão citrato/fosfato pH 4,5 à 50 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

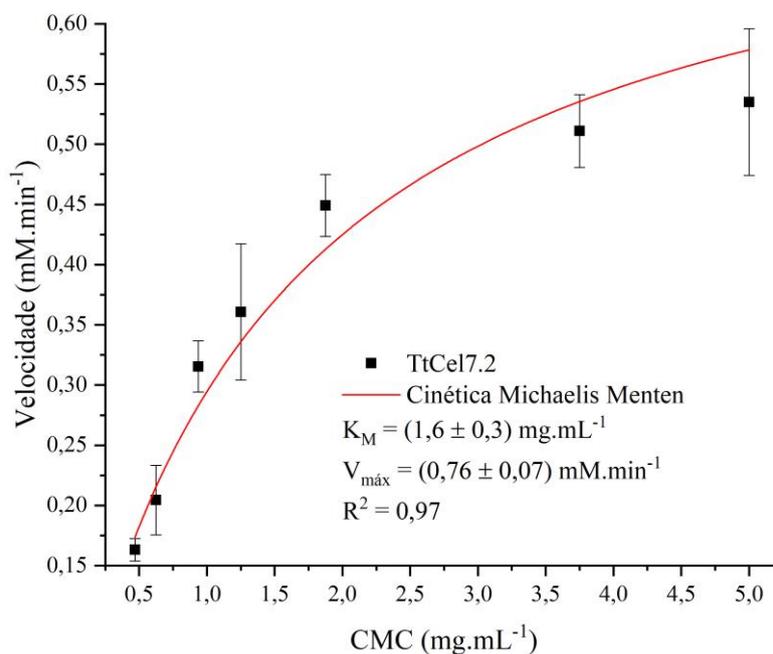
Os gráficos da Figura 36 representam a taxa de formação de produto das enzimas nas seguintes concentrações reacionais: 0,014 mg.mL⁻¹ para TtCel7.2 e 0,012 mg.mL⁻¹ para TtCel7.3. O valor da taxa de hidrólise em função do tempo das enzimas foi calculado pelo coeficiente angular da regressão linear dos pontos mensurados, cujo valor foi normalizado pela quantidade de substrato utilizado na reação (0,25 mg). Por último, para o cálculo de atividade específica, os valores de U foram divididos pela quantidade de enzima adicionada na reação.

Em termos de U e de atividade específica para essas condições, as duas enzimas exibiram valores semelhantes. As condições desse ensaio utilizaram valores de CMC de 2,5 mg.mL⁻¹ na reação, pois valores muito alto (~6,5 mg.mL⁻¹, dados não mostrados) não permitam tempo hábil de reação *endpoint* – a reação entrava em equilíbrio rapidamente e apresentava uma taxa constante de formação de produto, mesmo com variações na quantidade de enzima. Os valores de atividade específica mensuram as características cinéticas de primeira ordem da enzima, dando a informação sobre a velocidade inicial (V_0) da formação de produto, procurando atenuar os efeitos da viscosidade do substrato e, conseqüentemente, a taxa de difusão da enzima no meio. A cinética de Michaelis-Menten precisou ser analisada com o intuito de diferenciar as enzimas estudadas, pois, a cinética abrange as regiões de cinética de primeira ordem e de ordem zero, que detêm informações a respeito da constante de afinidade (K_M), número de renovação (K_{cat} , conhecido do inglês como *turnover number*) e eficiência catalítica (K_M/K_{cat}).

3.3.1.9 Cinética enzimática

Dando continuidade à caracterização cinética das enzimas, o estabelecimento da quantidade necessária de enzima para manter uma taxa constante de formação de produto ao longo do tempo, em uma concentração intermediária de substrato, permitiu a variação da concentração do substrato para estabelecer a curva característica de Michaelis-Menten. Na Figura 37 A e B estão representados o gráfico de Michaelis-Menten para as enzimas e neles estão indicados os parâmetros característicos da curva, K_M e $V_{m\acute{a}x}$.

A



B

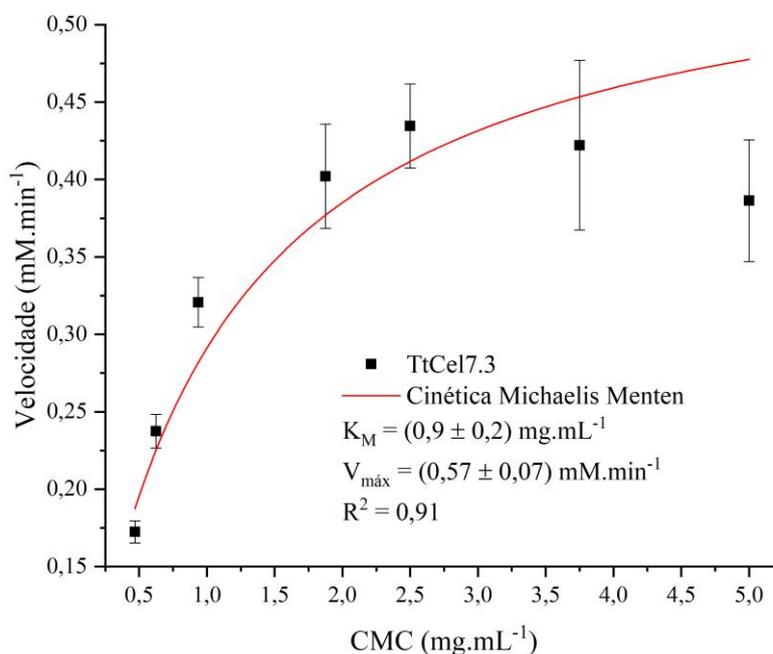


Figura 37 - Cinética de Michaelis-Menten para as enzimas A) TtCel7.2 e B) TtCel7.3
Fonte: Elaborada pelo autor

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten para ambas as enzimas foram distintos, tanto para a afinidade ao substrato como o número de renovação da enzima. Em valores de K_M , a TtCel7.3 possui quase o dobro de afinidade pelo CMC do que a TtCel7.2 e, em relação ao

K_{cat} , o número de reações enzimática por unidade de tempo para a TtCel7.2 foi de 600 s^{-1} e para a TtCel7.3 400 s^{-1} , indicando que as eficiências catalíticas das enzimas estão na mesma ordem de grandeza. Portanto, aproximadamente, ambas apresentam a mesma eficiência catalítica, considerando que as subunidades do dímero da TtCel7.2 sejam cataliticamente ativos.

Em termos de ordem de grandeza de K_M/K_{cat} em $M^{-1}.s^{-1}$ necessita que o K_M esteja em concentração molar e a massa molecular do CMC por ser um polímero, segundo a empresa Megazyme, não pode ser determinado. Então, foi feita uma estimativa, utilizando a informação que o CMC utilizado possui substituições de 4-5 grupos carbometil a cada dez unidades de anidroglicose e grau de polimerização de ~ 1000 , resultando no valor estimado de 191,25 kDa. Assim, o valor de K_M/K_{cat} para a TtCel7.2 e para a TtCel7.3 foi de $10^6 M^{-1}.s^{-1}$. Esse valor pode representar a taxa de formação de produto toda vez que há encontro entre enzima e substrato e ele é restringido pela taxa de difusão dos componentes da reação no meio (valores entre 10^8 e $10^9 M^{-1}.s^{-1}$), portanto, pode sofrer com a viscosidade do CMC.

Para efeito de comparação entre $V_{m\acute{a}x}$ calculado pela cinética de Michaelis-Menten (Figura 37) e pelo coeficiente angular (V) do gráfico da Figura 36, o valor de V para TtCel7.2 foi de $(0,044 \pm 0,005) \text{ mM}.min^{-1}$ e para a TtCel7.3 foi $(0,039 \pm 0,003) \text{ mM}.min^{-1}$, muito abaixo do $V_{m\acute{a}x}$ (Figura 37), o que é pertinente, visto que as condições de cálculo de cinética de Michaelis-Menten necessitam que as enzimas estejam saturadas com o substrato. Por isso os valores de especificidade enzimática entre as duas enzimas foram semelhantes, pois indica que o substrato era um limitante da reação naquelas condições e não apenas os parâmetros intrínsecos de cada enzima em relação a catálise enzimática.

É importante destacar que uma solução de CMC acima de $10 \text{ mg}.mL^{-1}$ já é muito viscosa e de difícil manipulação, visto as barras de erros dos gráficos da Figura 37, portanto, a limitação de concentrações analisadas ficaram restritas a essa dificuldade, pois se priorizou a diluição seriada, partindo de uma concentração de 2% de CMC, sempre mantendo o mesmo volume de cada concentração adicionado na reação. O tempo máximo de reação considerado foi de 3,5 minutos para a TtCel7.2 e de 4 min para a TtCel7.3, pois procurou-se evitar os problemas de difusão da enzima relacionados à viscosidade do substrato. Também, como o CMC é um polímero com ~ 1000 unidades, uma única molécula pode ser catalisada em partes menores inúmeras vezes, bem como a enzima pode adsorver ao polímero não especificamente e reduzir o número de unidade catalíticas no meio. Vale pontuar que a cinética da TtCel7.2 parece não ter atingido $V_{m\acute{a}x}$ e a da TtCel7.3 indica possível inibição pelo produto, sendo necessário planejar, ou representar o experimento de outra maneira a se averiguar tais comportamentos.

3.3.2 Clonagem, expressão, purificação e caracterizações das enzimas recombinantes em bactéria

3.3.2.1 Clonagem, expressão e purificação

Os estudos de clonagem das enzimas da Tabela 1 foram realizados com base em uma biblioteca de cDNA e gDNA de *T. terrestris*. A biblioteca de cDNA foi preparada a partir da cultura de 4 dias do fungo em meio mínimo suplementado com glutamina e timina, sendo a única fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar in natura. O meio é filtrado e a parte sólida passa pelo processo de extração de RNA utilizando o *kit RNeasy Plant* (Figura 38 A), para posterior clivagem com *DNase I* e síntese da primeira fita de cDNA, através da reação com transcriptase reversa *SuperScript IV*, finalizando com tratamento com *RNase*.

Com a obtenção do cDNA sem gDNA (que contém os introns), as sequências dos genes que codificam as enzimas escolhidas foram obtidas no banco de dados *RefSeq* do NCBI. Baseado na sequência de cada mRNA, um par de oligonucleotídeos iniciadores foram planejados e sintetizados para a amplificação e posterior utilização na clonagem tipo LIC e clonagem tipo TA, através da técnica de PCR. A reação do controle negativo da reação de obtenção do cDNA (sem *SuperScript IV*) foi testada para a presença de DNA genômico nas bibliotecas através da PCR da sequência da GH7.1 (Figura 38 B), uma das enzimas mais expressas, para garantir só a amplificação da sequência codificante das enzimas que sofrem *splicing*.

As PCR foram realizadas com o sistema *Phusion*, que consiste em uma DNA polimerase de alta fidelidade tipo *blunt-end*, e como molde para amplificação as bibliotecas de *T. terrestris*. As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose e o produto da reação de amplificação purificado através de kits comerciais dependendo do grau de especificidade da amplificação (única ou mais bandas no gel), se por extração do gel ou direto da reação (Figura 39).

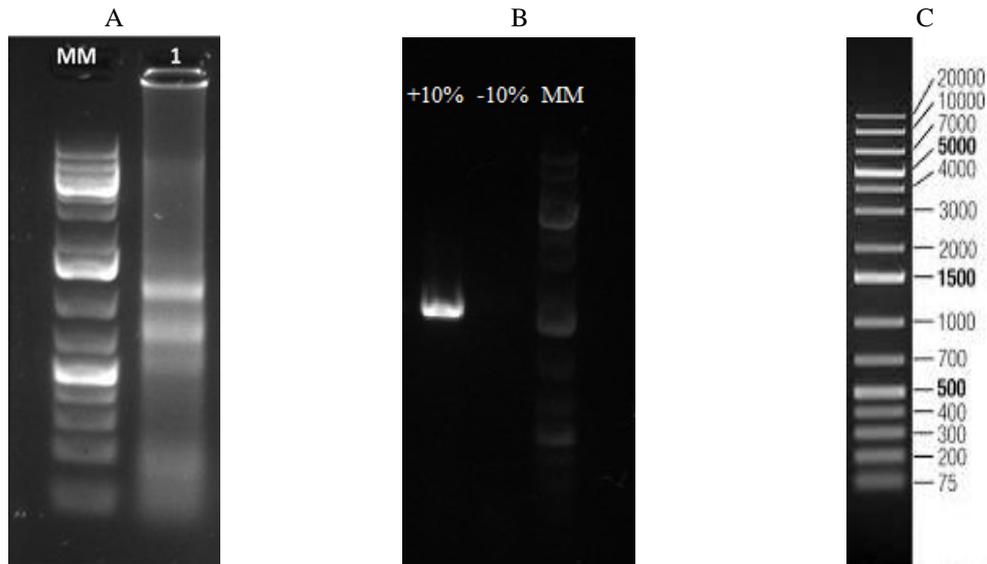


Figura 38 - A) Extração de RNA do *T. terrestris*. MM: Marcador molecular; 1: RNA total. B) PCR do gene da *TtGH7.1* (1527 pb) com 10% do volume da solução com a amostra da reação de cDNA com a transcriptase reversa (+) e sem (-). C) Padrão de massas do marcador molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para clonagem tipo LIC, reagiu-se cada inserto amplificado com a enzima T4 polimerase, na presença de dATP, para formação de extremidades coesivas de ligação ao sistema LIC. O fragmento foi então anelado ao vetor de expressão pETTrx-1a/LIC linearizado e previamente tratado com a enzima T4 polimerase, na presença de dTTP. Os insertos para as clonagens tipo TA com o plasmídeo comercial linearizado Champion pET SUMO, após PCR, foram adenilados na extremidade 3' com Taq DNA polimerase recombinante. Em seguida o inserto foi ligado ao vetor com T4 DNA ligase.

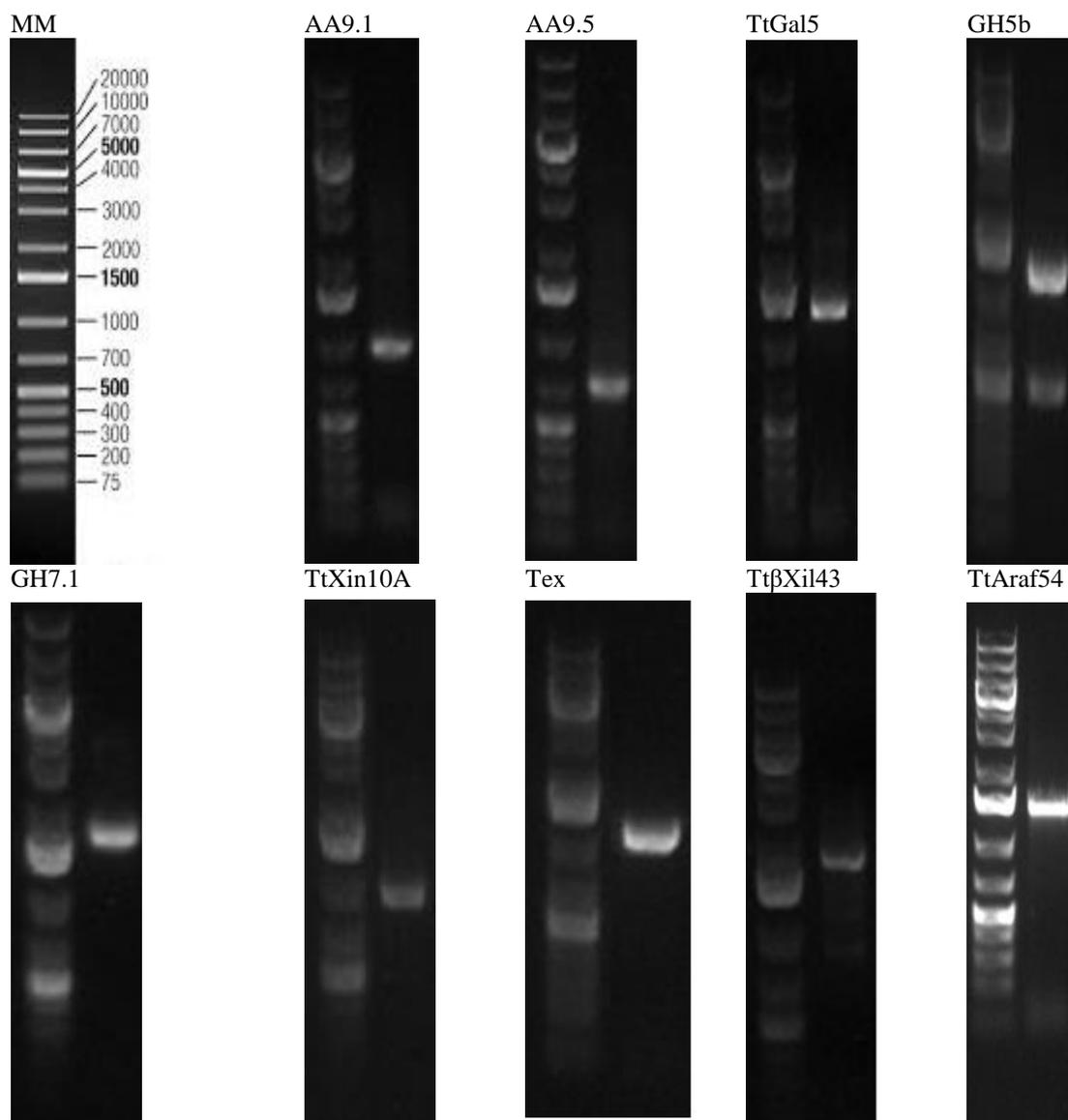


Figura 39 - PCR dos genes na tabela 1. O primeiro poço de cada amplificação para clonagem tipo LIC corresponde ao marcador molecular (MM). Número de pares de bases (pb) de cada gene: AA9.1: 921; AA9.5: 687; TtGal5: 1230; GH5b: 1200; GH7.1: 1527; TtXin10A: 933; Tex: 1128; TtβXil43: 1743; TtAraf54: 1551.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, as reações foram utilizadas para transformar as células de *E. coli* DH5α quimicamente competentes. A presença do plasmídeo nos clones recombinantes foi avaliada através de PCR de colônia, em que a amplificação utilizou os mesmos oligonucleotídeos iniciadores dos genes ou do vetor pET para confirmar a presença do gene de interesse na altura do gel correspondente a ele. As colônias positivas foram incubadas em meio líquido por 16 h e o DNA plasmidial das construções foram extraídos com o auxílio de *Kit* comercial.

O DNA plasmidial das construções (Tabela 5) foram utilizados para transformar células de expressão *E. coli* Rosetta gami 2 (DE3). A avaliação inicial de expressão proteica foi realizada visando-se avaliar o sistema para obtenção de enzima solúvel. As cepas transformadas

foram cultivadas aerobicamente a 37 °C em meio de autoindução ZYP-5052 até atingirem a densidade ótica (D.O., em 600 nm) entre 0,6-0,8. Em seguida, foi diminuída a temperatura para 18 °C por 16 h. Após concluído o período de expressão, as células foram centrifugadas e lisadas por ultrassom (sonicação). O lisado obtido foi centrifugado e as frações solúvel e insolúvel submetidas à análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para avaliação dos níveis de expressão das enzimas. A massa molecular das proteínas recombinantes de cada construção está anotada na Tabela 10.

Tabela 10 - Dados de massa de proteína das construções escolhidas

	AA9.1	AA9.5	GH5a	GH5b	GH7.1	TtXin10A	Tex	TtβXil43	TtAraf54
<i>Proteína fusionada (kDa)</i>	45,3	38,4	59,1	58,0	67,2	47,9	54,35	77,4	66,7
<i>Proteína madura (kDa)</i>	31,3	24,4	45,1	44,0	53,2	33,9	40,4	63,4	52,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fração solúvel foi submetida à purificação por afinidade utilizando coluna de bancada com resina de níquel (Ni-NTA) para interação com a calda de histidina presente nas construções. As frações de eluição foram 10, 30 e 300 mM de imidazol (Figura 40). Na Figura 40, a TtβXil43 foi a enzima que teve maior rendimento na fase solúvel em relação as demais. A GH5a, GH5b e TtXin10A apresentaram maior fração no precipitado, com uma pequena porção na fração de 300 mM de imidazol, o que pode ser improdutivo para as etapas posteriores de purificação. Assim, para tentar aumentar a fração dessas enzimas na fase solúvel, novos tampões de lise, ou até mesmo novo meio de cultivo, devem ser testados para favorecer o aumento da solubilidade dessas enzimas.

Após essa primeira purificação, o tampão das frações de 300 mM foi trocado, por centrifugação, para a retirada do imidazol e modificado para o pH 7,5 e subsequente clivagem com a Tev protease, na presença de 2 mM de DTT por 16 h à 4 °C. A reação com a Tev foi carregada na coluna de níquel novamente, onde a fração não ligada foi coletada porque, uma vez clivada, as enzimas de interesse (enzima madura) não interagiriam mais com a coluna – para evitar interação inespecífica das enzimas clivadas com a resina de níquel, uma fração de 5 mM de imidazol foi adicionada na coluna. Como a Tev protease recombinante possui calda de histidina não-autoclivável, ela fica presa a coluna juntamente com as enzimas que não foram clivadas e as proteínas de fusão presas pela calda, além de contaminantes que possuem afinidade inespecífica pela resina acima de 30 mM de imidazol.

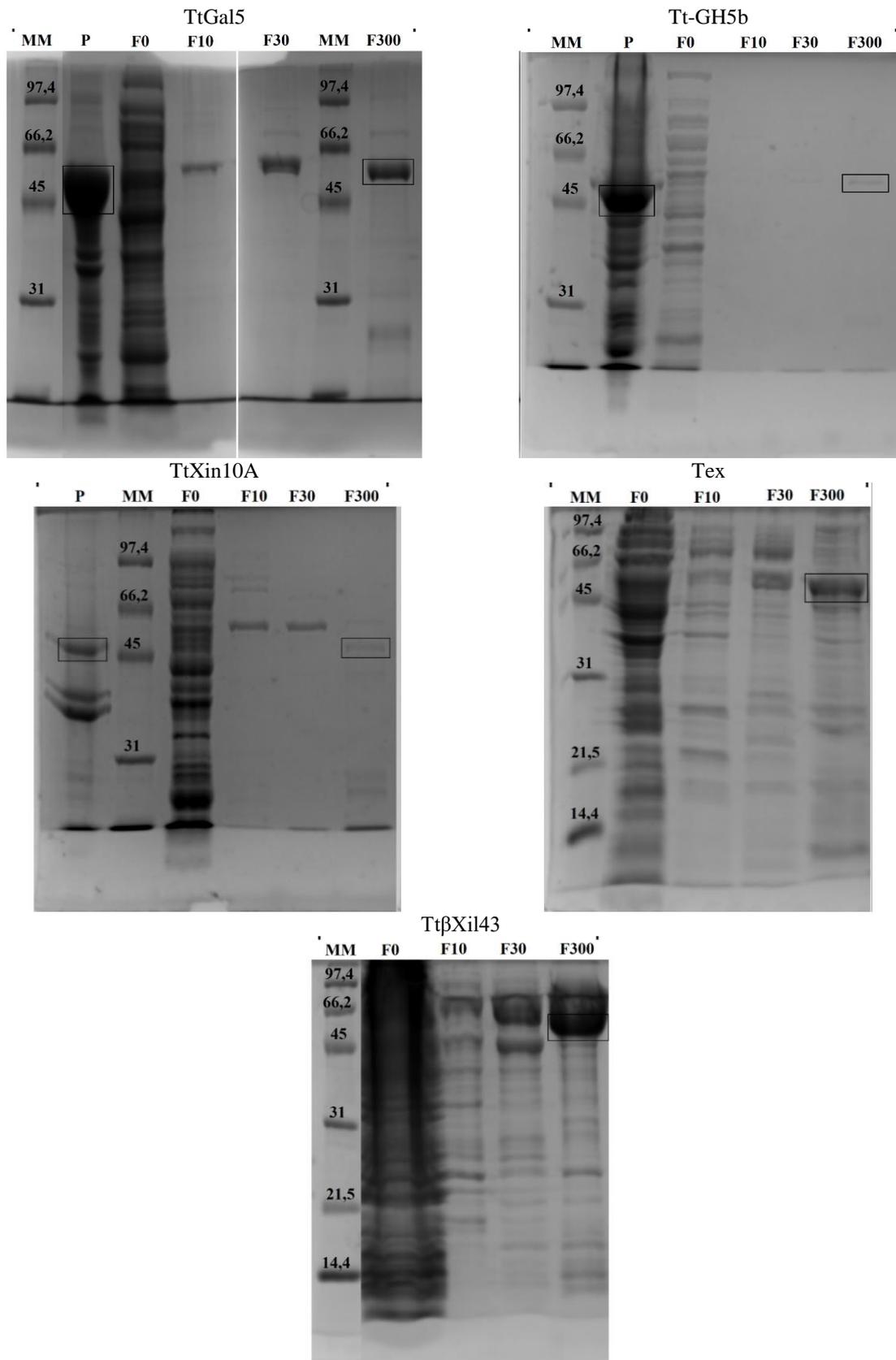


Figura 40 - SDS-PAGE da purificação em coluna Ni-NTA das construções GH5a, GH5b, TtXin10A, Tex e TtβXil43. MM: massa molecular; bandas das enzimas recombinantes destacadas por um retângulo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A fração não-ligada foi concentrada e aplicada em sistema *Akta*, acoplado com uma coluna *Superdex 200 10/300* (GE) para a purificação por exclusão molecular (*Superdex*), com o intuito de aumentar a pureza e homogeneidade das amostras. As frações correspondentes aos picos cromatográficos foram coletados e analisados por SDS-PAGE (Figura 41). Os tubos referentes às frações onde apresentavam amostras com a massa molecular da enzima madura foram coletados e armazenados para testes iniciais de atividade e caracterização.

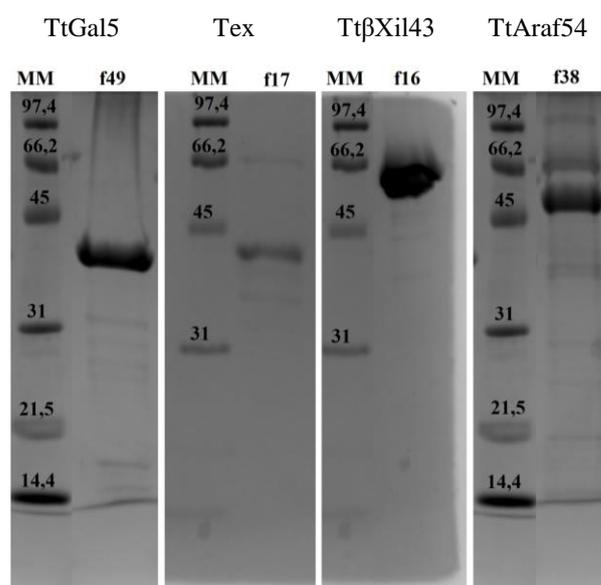


Figura 41 - SDS-PAGE da purificação em coluna de exclusão molecular das construções, TtGal5, Tex, TtβXil43 e TtAraf54 MM: massa molecular; bandas das enzimas recombinantes destacadas por um retângulo. Fonte: Elaborada pelo autor.

A purificação da TtAraf54 (Figura 41) deve ser acompanhada com gradiente de concentração de imidazol em sistema *Akta* acoplado com coluna Ni-NTA para obtenção de frações mais puras. No entanto, o equipamento utilizado para registrar as imagens nos géis de SDS-PAGE é bastante sensível, a intensidade de algumas bandas das proteínas recombinantes excede a sensibilidade do equipamento, como a TtAraf54, atingindo um máximo na escala, o que se equipara com os contaminantes (mesmo sendo superior em população). As ocorrências de bandas referentes a impurezas presentes nas imagens foram consideradas insignificantes em relação à proteína recombinante para os testes iniciais que seguem, tanto porque a análise a olho nu e subsequente testes enzimáticos iniciais ocorreram antes da digitalização das imagens.

3.3.2.2 Espectro de dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular foi utilizado para avaliar o enovelamento das proteínas e para estimar o conteúdo de estruturas secundárias presentes nas amostras. O espectro de 280 a 190 nm (Figura 42 A e 42 C) foi coletado e subtraído do espectro do tampão, escalonado para delta épsilon ($\Delta\epsilon$) para deconvolução dos dados através do *Dichroweb*. Uma vez que se tratam de enzimas intrinsecamente ordenadas com padrão estrutural característico, é possível fazer uma estimativa do conteúdo de estruturas secundárias (Tabela 11) para comparar com o esperado diante da arquitetura estrutural da família CAZy que pertencem.

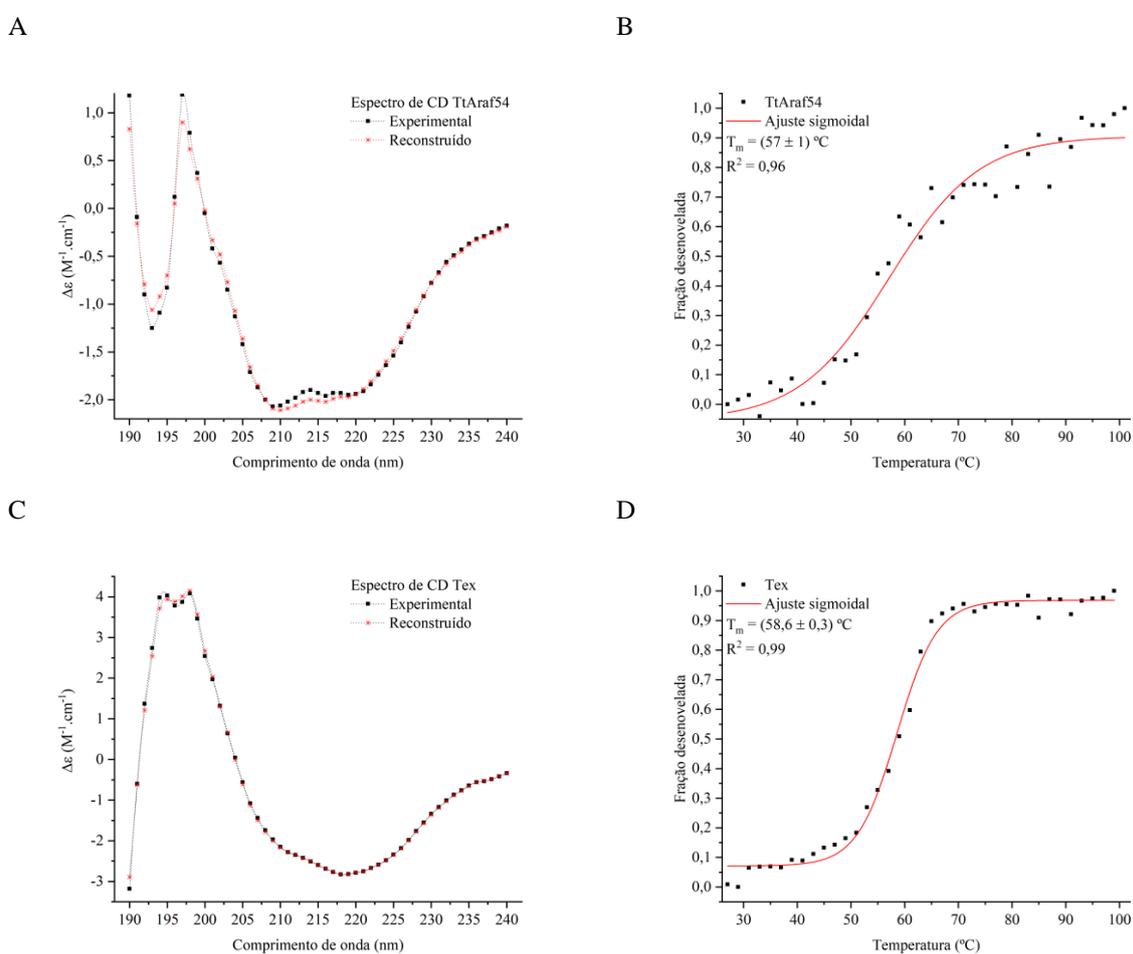


Figura 42 - Espectro de dicroísmo circular recalculado pela Dichroweb e experimental A) TtAraf54 e C) Tex. Curva de transição térmica com monitoramento em 222 nm da B) TtAraf54 e D) Tex.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O monitoramento da elipticidade em 222 nm em função do aumento da temperatura, possibilitou a construção de uma curva de transição térmica entre os estados enovelado e desenovelado, que por ajuste sigmoidal, foi obtido o valor da temperatura de transição (T_m , do

inglês *melting temperature*) – valores indicados nos gráficos (Figura 42 B e 42 D). Os valores de T_m de 57 e 58,6 °C para TtAraf54 e Tex refletem uma estabilidade estrutural elevada, sugerindo as características termofílicas dessas enzimas. A curva de transição térmica peculiar da TtAraf54 pode indicar que a proteína não seja monômero em solução, apresentando outros estados oligoméricos.²¹⁴

Tabela 11 - Dados de deconvolução dos espectros de CD de 280 a 190 nm utilizando o servidor Dichroweb.

<i>Enzima</i>	<i>Estrutura 3D</i>	<i>Conjunto de dados</i>	<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>NRMSD</i>	
TtAraf54	β <i>Jelly Roll</i>	Set 4	0,03	0,03	0,25	0,13	0,22	0,34	0,069	
Tex	Barril TIM (β/α) ₈		0,08	0,14	0,18	0,10	0,26	0,24	0,034	
H1: Hélice α regular		S1: Folhas β regular					D: Desordenadas			
H2: Hélice α distorcida		S2: Folhas β distorcida					V: Voltas			
NRMSD: do inglês, <i>normalized root mean square deviation</i>										

Fonte: Elaborada pelo autor.

A composição de estruturas secundárias (Tabela 11) da enzima TtAraf54 indica 6% de composição de hélices- α , 38% para folhas- β e 22% de voltas, enquanto que para Tex a composição de hélices- α é de 22%, para folhas- β 28% e voltas 26%. Em termos da classificação estrutural das famílias: GH10 tipo Barril TIM (β/α)₈²¹⁵ e GH54 tipo β *Jelly Roll*,²¹⁶ se espera maior conteúdo de hélices α para a Tex em comparação à TtAraf54 e com composição de folhas β e voltas na mesma proporção, pois o Barril TIM é uma estrutura que intercala folhas- β e hélices- α conectados por voltas, formando um núcleo de interface entre as folhas- β com o exterior rodeado pelas hélices- α .

3.3.2.3 Painel de substratos

Das enzimas recombinantes, duas delas foram anotadas como xilanases, a TtXin10A e a Tex. A xilanase com atividade de endo 1,4- β - são codificadas pelo gene *xynB*, como é a Tex, já as enzimas codificadas pelo gene da *xynA* são enzimas que, apesar de apresentarem alta identidade sequencial com xilanases clássicas (>60%), elas são exo-oligoxilanases. A TtXin10A é a segunda enzima pertencente à família GH10 mais secretada no secretoma do *T. terrestris* em bagaço de cana *in natura* e somente nessa condição, sendo a Tex a primeira. Portanto, não foi possível detectar a atividade da TtXin10A em xilano e devido a ausência de oligossacarídeos de xilose. Uma outra abordagem seria a caracterização da TtXin10A em ensaios de sinergismo com a Tex, mas não houve tempo para serem realizados e incluídos nesse trabalho.

A especificidade catalítica das enzimas pertencentes as famílias TtAraf54, TtβXil43, Tex e TtGal5 frente a hidrólise de diferentes polissacarídeos foi investigada e os resultados em termos de atividade relativa encontram-se na Tabela 12. Essa etapa é importante, pois o substrato mais específico é utilizado nas próximas caracterizações enzimáticas.

Tabela 12 - Painel de substratos das enzimas TtAraf54, TtβXil43, Tex, TtGal5 à 50 °C e tampão citrato/fosfato pH 4,5.

Substrato	Atividade relativa (%)			
	TtAraf54	TtβXil43	Tex	TtGal5
4NF-α-Araf	100±3 ^B	51,3±0,5 ^H	0,17±0,03 ^{B,C}	15±4 ^{A,B,C}
4NF-α-Gal	2±2 ^A	4,12±0,07 ^{D,E,F}	ND	40±5 ^{A,B,C,D}
4NF-β-Gal	0,8±0,5 ^A	4,09±0,02 ^{D,E,F}	ND	38±4 ^{A,B,C,D}
4NF-β-Glu	0,0±0,1 ^A	2,6±0,1 ^{D,E,F}	ND	ND
4NF-β-Xil	2,2±0,2 ^A	100,00±0,09 ^I	1,47±0,02 ^C	ND
4NF-α-Arap	0,6±0,8 ^A	2,8±0,1 ^{D,E,F}	1,54±0,01 ^C	67±9 ^{B,C,D}
4NF-β-Man	2±1 ^A	4,6±0,4 ^{E,F}	ND	ND
2Cl-4NF-G ₂	0±1 ^A	6,5±0,3 ^F	100±4 ^G	ND
β-glucano	4±2 ^A	2,46±0,06 ^{D,E,F}	5,1±0,4 ^{C,D}	0±1 ^A
CMC	0±9 ^A	1,6±0,2 ^{D,E}	1±1 ^C	0,0±0,7 ^A
Xiloglucano	20±10 ^A	0,4±0,5 ^{C,D,E}	0,9±0,2 ^C	10±10 ^{A,B}
Ác. Poligalacturônico	20±20 ^A	0,0±,6 ^{B,C}	9,6±0,4 ^D	34±9 ^{A,B,C,D}
Arabinano desramificado	3±2 ^A	1,90±0,08 ^{D,E}	1,06±0,09 ^C	10±10 ^A
Arabinogalactano	8±9 ^A	1,0±0,3 ^{C,D,E}	0,19±0,08 ^{B,C}	90±20 ^{C,D}
Galactomanano	8±5 ^A	3,5±0,4 ^{D,E,F}	0,5±0,2 ^C	0±8 ^A
Liquenano	18±8 ^A	0,9±0,9 ^{C,D,E}	2±2 ^{C,D}	00±20 ^A
Manano	00±10 ^A	0,2±0,3 ^{C,D,E}	0,0±0,4 ^{B,C}	ND
Arabinano	3±3 ^A	1,1±0,1 ^{C,D,E}	0,00±0,02 ^{B,C}	80±60 ^{C,D}
Xilano	2±2 ^A	1,1±0,2 ^{C,D,E}	72±4 ^F	14±7 ^{A,B,C}
Arabinoxilano	1±2 ^A	20±2 ^G	73±2 ^F	9±5 ^{A,B}
Ramnogalacturonano	17,2±0,9 ^A	0±1 ^A	0,0±0,6 ^A	70±10 ^{B,C,D}
Galactano	15±15 ^A	0±5 ^{A,B}	36±1 ^E	100±40 ^D
Cellobiose	20±20 ^A	0±1 ^A	0±7 ^{A,B}	30±30 ^{A,B,C}

ND: não determinado
^{A, B, C...} Subconjuntos homogêneos entre os quais existe diferença significativa (p<0,05), mas não dentro deles, pelo teste de *post hoc*

Fonte: Elaborada pelo autor.

Atividade das enzimas que atuam em arabinofuranosídeo: TtAraf54 e TtβXil43

Existem cinco famílias CAZy²¹⁷ que abrigam enzimas com atividade α-L-arabinofuranosidases: GH62, GH54, GH51, GH43, GH3 e GH2, que variam em estrutura, especificidade ao substrato e mecanismo catalítico.¹⁷¹ Elas são responsáveis por catalisarem a hidrólise de resíduos de L-arabinose ligados por ligações α-1,2-, α-1,3- e α-1,5-L-arabinofuranosídica,²¹⁸⁻²¹⁹ geralmente, encontrados em polissacarídeos naturais como arabinanos, arabinoxilanos e arabinogalactanos. Dentro das seis famílias apresentadas, apenas a GH43 e a GH62 apresentam mecanismo de inversão, enquanto que as demais são enzimas de retenção.²²⁰⁻²²¹

No painel de substratos apresentado (Tabela 12), há duas enzimas com atividade em resíduos de α -L-arabinofuranose, TtAraf54 e Tt β Xil43. A TtAraf54 exibiu 100% de especificidade em 4NF- α -L-Araf com $p < 0,05$, enquanto que em 4NF- β -Xil (2,2%) e nos substratos poliméricos foi detectada baixa atividade, inclusive naqueles que apresentam substituições de α -L-arabinose: arabinano (3%), arabinoxilano (1%) e arabinogalactano (8%), mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. A análise de alinhamento múltiplo do domínio catalítico de sequências homólogas de GH54s (Figura 43) indicaram um glutamato 230 (contando da metionina inicial) como nucleófilo e aspartato 305 como doador de prótons, utilizando como referência a α -L-arabinofuranosidase B de *Aspergillus kawachii* com estrutura terciária resolvida e complexada com ligante (PDB: 1WD3).²²²

```

TtAraf54      FDYGNAETSSQDTGNHMEAIYFGSSTYWGSGNGNPWIMADLENGLFSGGKAGKNTNDPTISYRFTTAIVKGEPNQWAI
Q4WL66      FDYGNAETSSRDTGNHMEAIYFGDNTIWGTGSGSGPWIMADLENGLFSGSSPDNNSGDPSISYRFLTAVVKGKQNWAI
Q0CEE5      FDYGNAETSSDGTGNHMEAIYFGDNTVWGSAGSGPWIMADLENGLFSGSSTKNNAGDPSVSYRFLTAIVKGEPNQWAI
Q2UIM2      FDYGNAEVSNTDTGNHMEAIYGDNTVWGSAGSGPWIMADLENGLFSGLSSTNNAGDPSISYRFVTAIVKGEANQWAI
Q92455      FDYGNAETNSRDTGNHMEAIYFGDSTVWGTGSGKGPWIMADLENGLFSGSSPGNNAGDPSISYRFVTAIVKGEANQWAI
O74288      FDYGNAETSSLDGTGNHMEAIYGTNTAWGYGAGNGPWIMADLENGLFSGQSSDYNAGDPSISYRFVTAIVKGGPNLWAI
P42255      FDYGNAETSSDGTGAGHMEAIYLGNSSTWGYGAGDGPWIMVDMENNLFSGADEGYNSGDPSISYRFVTAIVKGGADKWI
1WD3        FDYGNAETSSDGTGAGHMEAIYLGNSSTWGYGAGDGPWIMVDMENNLFSGADEGYNSGDPSISYRFVTAIVKGGADKWI
U6BLZ9      FDYGNAEVSDDTGNHMEAIYFGDLTAYGTGSGSGPWIMADLENGLFSGFNAKNAEDPSSYRFVTAIVKGGPNKWI
*****...  *** ***** * * : * * .***** :*:*.**** . * : *:*:* * * : * : * : * :

TtAraf54      RGADATAGGLSTFYSGARPA--NGYNPMKKEGAIILGIGGDNNSNGAQGTFYEGAMTSGYPSDATENAVQADIVAAKYA-
Q4WL66      RGANAASGSLSTFYNGARPS-VSGYNPMSKEGAIILGIGGDNNSNGAQGTFYEGVMTSGYPSDATENSQANIVAAKYA-
Q0CEE5      RGANAASGSLSTYNGARPN-ASGYNPMKKEGAIILGIGGDNNSIGAQTGYEGVMTSGYPSDATENSQANIVAAKYA-
Q2UIM2      RGANAASGSLSTYYSGARPS-ASGYNPMKKEGAIILGIGGDNNSNGAQGTFYEGVMTSGYPSDATENSQADIVAAKYA-
Q92455      RGGNAASGSLSTFYSGARPQ-VSGYNPMSKEGAIILGIGGDNNSNGAQGTFYEGVMTSGYPSDATENSQANIVAARYA-
O74288      RGGNAASGSLSTYNGIRPTDASGYNPMKKEGAIILGIGGDNNSVSAQTGYEGAMTDGYPDDATENSQADIVAAKYA-
P42255      RGGNAASGSLSTYYSGARPD-YSGYNPMSKEGAIILGIGGDNNSNGAQGTFYEGVMTSGYPSDDVENSQENIVAACYV-
1WD3        RGANAASGSLSTYYSGARPD-YSGYNPMSKEGAIILGIGGDNNSNGAQGTFYEGVMTSGYPSDDTENSQENIVAACYV-
U6BLZ9      RGGNAASGSLSTFYNGSRPN-ARGYNPMSKEGAIILGIGGDNNS-----
*.:*:* * *:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 43 - Alinhamento *T-Coffee* modo *M-Coffee* das sequências homólogas da TtAraf54. Exceto o PDB: 1WD3, as restantes são número de acesso *UniProtKB*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com a classificação das GH54s, o painel indica que a tAraf54 é uma enzima α -L-arabinofuranosidase tipo A, em contraste com as do tipo B, que em adição à atividade em 4NF- α -L-Araf apresentam atividade em hemiceluloses contendo arabinose, como arabinano, arabinogalactano e arabinoxilano.²²³⁻²²⁴ No entanto, não é o que revela a análise de domínios no *InterPro*²²⁵ e *Pfam*,²²⁶ que indicam domínio de α -L-arabinofuranosidase B do aminoácido 29 ao 342 e domínio de ligação à arabinose (ABD, do inglês, *arabinose binding domain*) do aminoácido 405 ao 537 – nomeada de CBM42.^{222,227}

À vista disso, a sequência de aminoácidos do 343 ao 537 foi submetida ao servidor *T-Coffee*²²⁸ modo *Expresso* para alinhamento estrutural dessa região com proteínas de diversos organismos do banco de dados não-redundantes *UniProtKB/SwissProt*.²²⁹ O alinhamento

retornou diversas regiões não conservadas na TtAraf54 (Figura 44), dentro das quais foram consideradas de baixa complexidade pelo *SMART*²³⁰ e *Pfam*,²²⁶ sendo uma delas de repetição compostas por 4 treoninas e 9 serinas (338-351). Consultando a região genômica que codifica para as proteínas homólogas às TtAraf54 de outros organismos como: *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium expansum*, todas elas, assim como para *T. terrestris*, não possuem intron na sequência, indicando que as regiões não-conservadas da TtAraf54 não possuem relação com a perda de processamento pós-transcricional (*splicing*) devido a algum evento evolutivo a nível genômico.

Para investigar a influência dessas regiões no ABD, a sequência da proteína foi submetida a uma modelagem automática por homologia no servidor *Swiss-Model*,²⁰⁷ utilizando como molde uma α -arabinofuranosidase B de *Aspergillus kawachii*, com 64,38% de identidade (PDB: 1WD3, 1,75 Å).²²² A estrutura modelada apresentou pontuação para *GMQE* de 0,79 (número próximos de 1 indicam maior confiabilidade do modelo), *QMEAN* de -1,74, *MolProbity*²³¹ de 1,79 e Ramachandran favorável de 91,63%.

```

Conservation:
TtAraf54:T_terrestris 1 TSSQASSKALAPGTLISLRAATTTSSSSSSSSAPQYLTHNTTAAALTLPQIPLTTTRSRRTAPPFSFQHQQATWKVHPALGTAAE-AGCISLESAAAPGTFL 101
1WD3:A_kawachii 1 --SLVSGPSFTSGEVVSLRVTT-----FGYTRTYIAHTDIT-----VNTQVDDSSSTLKEEASWTVVVTGLAN----SQCFSPESVDTPGSI 78
3KMY:C_thermocellum 1 -----WELVPLGANSGLDGVISIQSNNVTPGYL 27
3AKF:S_avermitilis 1 -----SGTISLESANYPGYL 16
ALCGD1.1:A_clavatus 1 VTSLTSGPALTIVGSAISLRATT-----SCCTTRYLAHTGST-----INTQVSSASATTLKQQAATWVTVRTGLAN----SGCFSPESKDTPGSFI 80
Q0CEE5.1:A_terreus 1 -----SGPALTIVGSSISLRATT-----SCCTTRYLAHNGST-----VNTQVSSSSSTALRQQASWTVRAGLAN----SACFSPESKDTPGSFI 75
O74288.1:A_nidulans 1 TTSLISGPALTIVGDTVSLRVTT-----SGYDTRYIAHTGST-----INTQVSSSSSTLKQQASWTVRAGLAN----SACFSPESKDTPGSFI 84
Q92455.1:T_reesei 1 -----SGPALTIVGSSISLRATT-----ACCTTRYIAHSGST-----VNTQVSSSSSTALRQQASWTVRAGLAN----NACFSPESKDTPGSFI 75
U6BL29.1:P_canescens 1 -----LTVGSSISLRATT-----LCCTTRYVAHNGST-----VNTQVSSSSSALRQQASWTVRAGLAN----SECFSPESVDTPGSI 71
F42255.1:A_niger 1 --SLVSGPSFTSGEVVSLRVTT-----PGYTRTYIAHTDIT-----VNTQVDDSSSTLKEEASWTVVVTGLAN----SQCFSPESVDTPGSI 78
Consensus_aa:
.....LhSgS.lSLRhhT.....st.hspYlHhSsoT.....lsTps.potssohb+QQAaWp.l.stLts....s.hhShES.shPg.@l
Consensus_ss:
          eeeeeee          eeeee  e          eeeeeee          eeeeeee          eeeee  ee

Conservation:
TtAraf54:T_terrestris 102 RHTGGGAFTLALHPDDGTQKQFREDATFCALLEGGLGGGSDGDASGGDV-VAIRSWNYPTRYLRRYGGVYAASNGEGGNEFDAAAGFHEEVNWWVETGLAA 201
1WD3:A_kawachii 79 RHYN---FELLNANDGKQFHEDATFCQAAL-----NGEG-TSLRSWSYPTRYFRHYENLVYAASNG-GVQTFDSKTSFNNDVVSFEIETAFAS 163
3KMY:C_thermocellum 28 RHSN---YDLSLEKNDGTSLFASATFKIVPGL-----ADPSY-ISFQSYNFPTRYIRHYN----- 79
3AKF:S_avermitilis 17 RHKN---YEVVVEKNDGSSAFKNDASFSRRAGL-----ADSADGIAFESYNYPGRYLRHY----- 68
ALCGD1.1:A_clavatus 81 RHSN---FALVLNNDGKQFREDATFCQAAGL-----NGQG-SSIRSWSPTRYFRHYSNLVYAASNG-GVHTFDAAAGSFNDDVSVSWISSGFA- 164
Q0CEE5.1:A_terreus 76 RHYD---FVLQLSANDGKQFYEDATFCQPSGL-----NGQG-SSIRSWNYPTRYFRHYNNLVYAASNG-GVHTFDATG SFNDDVSVWVSTGFA- 159
O74288.1:A_nidulans 85 RHSN---FALLNANDGKTLFSEDATFCPODSF-----NDDGTSIRSWNYPTRYFRHYENLVYAASNG-GVNTFDATAAFDDVSVWVADGFA- 169
Q92455.1:T_reesei 76 RHSN---FGLVLNANDGSKLFAEDATFCQAAGI-----NGQG-SSIRSWNYPTRYFRHYNNLVYAASNG-GVHTFDATAAFDDVSVWVGGFA- 159
U6BL29.1:P_canescens 72 MHNH---FVLLKSNNDGKALHEAATFCQDLGL-----NGKG-NSIRSWNYPTRYFRHYENLVYAASNG-GVHKFDNPAFDDVSVWVVSASFA- 155
F42255.1:A_niger 79 RHYN---FELLNANDGKQFHEDATFCQAAL-----NGEG-TSLRSWSYPTRYFRHYENLVYAASNG-GVQTFDSKTSFNNDVVSFEIETAFAS 163
Consensus_aa:
RHps...@.L.Lp.NDGop.F.EsATPt...th.....sps...thcS@s@PTRYhRHY.ssIYhASNG.GspPdtsthtFp--vs@VjstHA.
Consensus_ss:
ee          eeeee  hhhhh  eeee          eeeee          eeeee  eeeee          eeeee

```

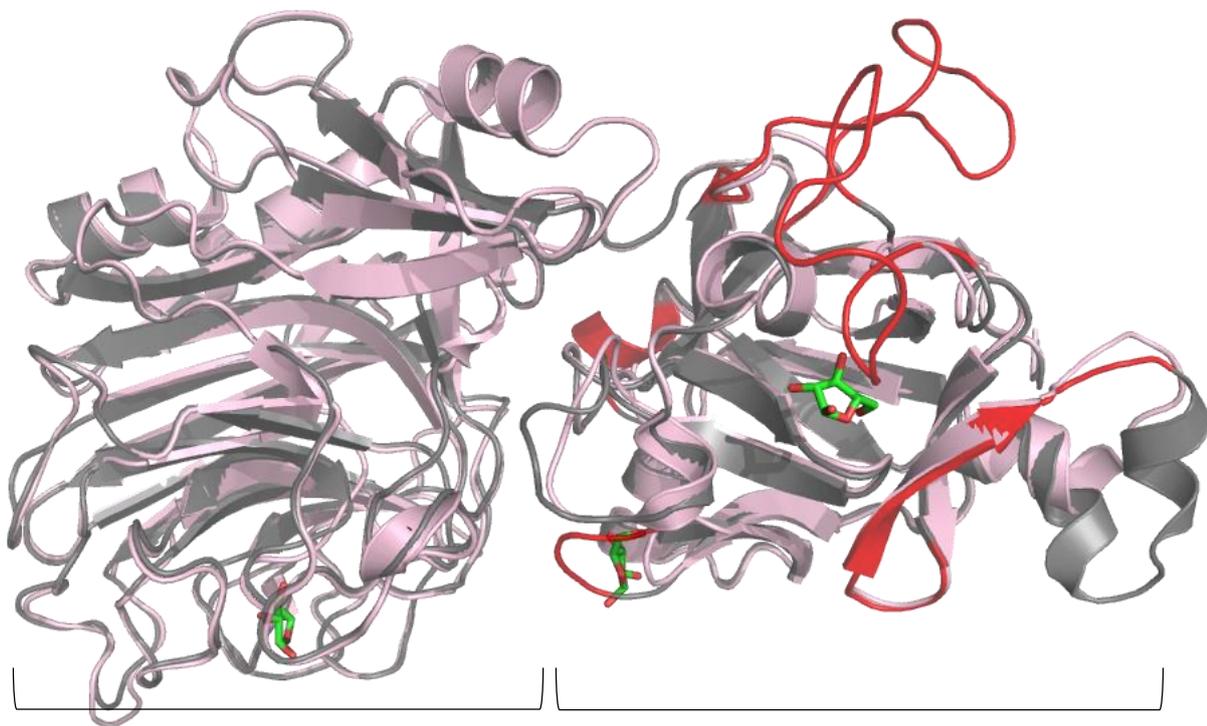
Figura 44 - Alinhamento *T-Coffee* modo *Expresso* e representação da predição de estrutura secundária por *PROMALS3D*²³² das sequências homólogas da TtAraf54. Exceto o PDB: 1WD3, 3KMY e 3AKF, as restantes são número de acesso *UniProtKB*. As letras e representam folha- β ; h representa hélice- α ; *Conservation* é a pontuação da conservação calculado pelo programa; *Consensus aa* é o aminoácido consenso na posição; *Consensus ss*: é estrutura secundária consenso presente na posição.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modelo gerado foi alinhado no *Pymol*,²³³ usando a ferramenta *SUPER*, com o modelo PDB: 1WD4, uma enzima de *A. kawachii* complexada com arabinose. As regiões não conservadas, apontadas no *T-Coffee* (Figura 45), foram coloridas em vermelho. Das 3 arabinoses ligantes presentes na estrutura da 1WD4, uma está localizada no sítio ativo do domínio catalítico e as outras duas com sítios distintos no domínio de ligação à arabinose. A análise visual das estruturas mostra duas regiões em vermelho da TtAraf54 que obstruem o sítio

de ligação à arabinose (Figura 45): o sítio proximal ao domínio catalítico apresenta uma pequena alça (421-423), obstruindo o local de ligação da arabinose. O sítio distal apresenta uma região desordenada (338-351) que, além de bloquear a ligação da arabinose, causa uma protuberância que pode inviabilizar a acomodação da cadeia do polissacarídeo. Essas características estruturais desfavoráveis no domínio de ligação ao carboidrato, causadas pelas regiões não conservadas, podem sugerir a incapacidade da TtAraf54 recombinante de ser ativa em polissacarídeos com substituições laterais de arabinofuranose.²³⁴

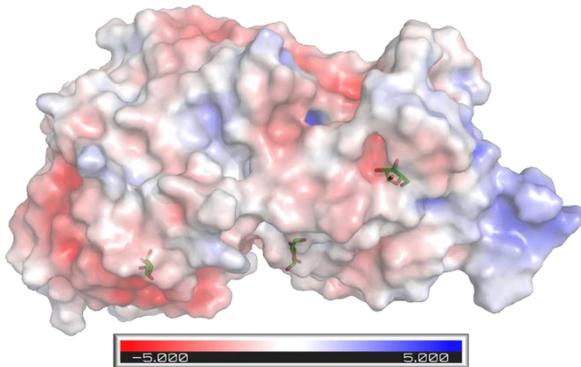
A)



Domínio catalítico

Domínio de ligação à arabinose (ABD)

B)



C)

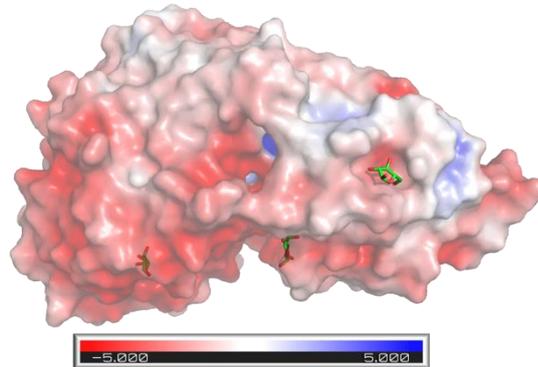


Figura 45 - A) Alinhamento do modelo estrutural da TtAraf54 (cinza) com a estrutura 1WD4 de *A. kawachii* (rosa) com destaque (vermelho) das regiões não-conservadas do domínio ABD. B) Superfície eletrostática gerada pela ferramenta *APBS Electrostatics* do Pymol da B) TtAraf54 e da C) 1WD4. As cores representam o potencial eletrostático da superfície molecular entre -5 e +5 kT/e.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma dessas regiões são sequências simples que envolvem a repetição de um único aminoácido chamadas de SAARs (do inglês, *single amino acids repeats*) – como a região desordenada constituída pela repetição de Thr e Ser do sítio distal de ligação – os classificadores de domínios indicam essa região como de “baixa complexidade” ou como “regiões intrinsecamente desordenadas”. Apenas ~15% das SAARs estão presentes em qualquer domínio funcional conhecido, enquanto ~74% das repetições estão presentes nas regiões desordenadas. Isso sugere que as SAARs aumentam a funcionalidade das proteínas fornecendo flexibilidade, estabilidade e atuando como espaçadores entre os domínios,²³⁵ bem como se vê para a TtAraf54, cuja região de 343-404 compreende a região de repetição 338-351 e que separa o domínio catalítico ao de ligação ao substrato.

Embora algumas dessas repetições de certos aminoácidos sejam toleradas pelas proteínas, indicando uma pressão de seleção positiva por trás do acúmulo de SAARs, outras levam a um estado de doença monogênico.²³⁶ Algumas dessas regiões, que em condições normais não são estruturadas, podem passar de estados desordenados para estados ordenados ao se conectar a um parceiro interagente,²³⁷⁻²³⁸ ou passar por mudanças pós-traducionais, como glicosilação.²³⁹⁻²⁴⁰ No entanto, uma compreensão geral da importância e distribuição funcional de SAARs ainda não foi estabelecida.²³⁶

Levando em consideração que a enzima recombinante pertence a um eucarioto que possui mecanismos de modificações pós-traducionais e o sistema de expressão da proteína recombinante é um procarioto, essas mudanças podem levar a um mal enovelamento do domínio ABD, resultando na perda da capacidade de atuar em polímeros. Submetendo a sequência de aminoácidos aos servidores *NetNGlyc*¹⁹³ e *NetOGlyc*,¹⁹⁴ para predição de sítios de glicosilações, nota-se que existem seis posições de O-glicosilações na região distal de ligação à arabinose (338, 339, 344, 345, 347 e 348; Figura 46), sugerindo que a glicosilação pode ter um papel fundamental no enovelamento dessa porção da proteína, o que pode resultar na capacidade de se ligar à polissacarídeos. Mas, considerando o espaçamento entre os domínios como uma estratégia de aumentar o grau de liberdade entre eles, as glicosilações também servem de proteção às proteases, como no *linker* de algumas CBHs que separa a porção catalítica do CBM, já que uma região menos estruturada é mais favorável à proteólise. Essas hipóteses podem ser investigadas com ensaios de atividade da TtAraf54 expressa em sistema eucarioto, como o *A. nidulans* A773. No entanto, para a presente enzima recombinante, a hipótese de obstrução dos sítios de ligação pelas regiões não-conservadas parece ser a possível causa da divergência na atividade esperada para α -arabinofuranosidases B com domínio ABD.

SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	332	332	0.517686	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	337	337	0.5	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	338	338	0.548149	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	339	339	0.509299	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	340	340	0.322434	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	341	341	0.293227	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	342	342	0.340955	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	343	343	0.382963	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	344	344	0.567847	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	345	345	0.59131	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	346	346	0.467484	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	347	347	0.5	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	348	348	0.518174	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	349	349	0.282153	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	355	355	0.329294	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	358	358	0.184758	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	359	359	0.346739	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	360	360	0.352581	.	.	

Figura 46 - Resultado da predição de glicosilações O-ligadas pelo servidor *NetOGlyc* da sequência da TtAraf54. A região de aminoácidos não-conservados está indicada dentro do retângulo preto. SEQUENCE significa sequência; CARBOHYD significa carboidrato; POSITIVE significa que aquela sequência é positiva para a presença de carboidrato.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A próxima possível arabinofuranosidase é da família 43 e as 13.435 enzimas classificadas como pertencentes à essa família são subdivididas em 37 subfamílias, das quais 37 enzimas pertencem à subfamília 14, incluindo a Tt β Xil43. Essa subfamília possui características comuns: todas são de origem fúngica, atividade em arabinoxilano e em 4NF- β -Xil.²⁴¹ Há também a ocorrência de um domínio C-terminal encontrado unicamente nessa família de hidrolases de glicosídeos (até a presente elaboração dessa Tese – outubro, 2019), sem uma aparente função e nomeado de X19. Esse domínio C-terminal adota enovelamento tipo concavolina-A, que consiste de um sanduíche de folhas- β , cuja presença pode estar relacionada ao aumento da estabilidade da proteína.²⁴¹ O alinhamento múltiplo do domínio catalítico de enzimas homólogas e utilizando a anotação da α -L-arabinofuranosidase de terminal não-redutor de *Bacteroides ovatus*,²⁴² revelaram como nucleófilo o aspartato 39 e o glutamato 218 (contando desde a metionina inicial) como doador de prótons para Tt β Xil43 (Figura 47).

```

TtβXil43      YNPNVLPGWHS DPSCVHVDGIFYCVTSTFISFPGLPIYASRDLINWKHVSHVWNRESQLPGYSWATV-AQQHGMYAATIR
A7LXT8       YSNPVIPIGFHPDPSVCKAGDDYYLVNSSFQYFPGVPLFHSKDLVHWEQIGNCLTRPSQLDLTN---A-NSGSGIFAPTIR
P45982      --NPILKGFYDPDSICRKGDDFYLVCSFVYAPGVPIFHTKDLAHFEQIGNILDRESQLPLSG---D--ISRGIFAPTIR
A7LXU0      FRNPITGMNPDPSICRVGDDFYLVSTFEYFPGVPLVYHSKDLVHVKLIGHALSRPENPLMG---CNASTGGQYAPTLR
A9ZND1      --NPILKGFNPDPSIVRVGDDYYIATSTFEWFPGIQLHHSRDLINWRLVGHALTRTSQLNMMG---M-DNSEGVYAPALT
P07129      --NPVLKGFNPDPSICRAGEDYYMAVSTFEWFPGVQIYHSKDLIHWRLAARPLQKTSQLDMKG---N-PDSGGVWAPCLS
P77713      --NPILTGFNPDPSLCRQGEDYYIATSTFEWFPGVRIYHSRDLDKNWSLVSTPLDRVSMMDMKG---N-PDSGGIWPAPCLS
P94489      --NPVLKGFNPDPSICRAGEDYYIAVSTFEWFPGVQIYHSKDLVNWHLVAHPLQRVSQLDMKG---N-PNSGGVWAPCLS
Q9WXE8      YRNPX-----SDPDVIRVGNKXYMVASDFH-XMGMQVLESDDMVXWRYISQIYRRFNEPGWDA--NL-HYAGGSWAPSIR
              **      .**      :      *      *      *      *      :      :      *      :      .      :      *      :      *      :
TtβXil43      YRAGTFYVICEYLVGAV-K--DAGVLFRTTNPFDAAWSDALTFP---VDKIDPDLFWDDEEDNNNNINNSTRTNTTDE
A7LXT8       YNDGVFYMITTNVS-----GKGNFLVHTTDPDRSEWSEPVWLE---QGGIDPSLYFED-GKCFMVS-----
P45982      EHNGIFYMITTNVS-----SGGNFIVTAKDPAGPWEPEYYLGEDEAPGIDPSLFFDDDGKCYVGT-----RPNP
A7LXU0      YHDGTFYVIGTNYGGK----GSQGVFVYTAKNPAGPWSDPVWVG---NMYVDPSEIEFIDGKMYFLSP-----
A9ZND1      YSDGTFWLCFSNVHSCRGNWMTSPSYVVTADSIEGPWSEVPVIG---NYGFDPSLFHDDDGKCYLNM-----IWGG
P07129      YADGQFWLIYSDIKVVD-GPFKDGHNLYLVTAADVDGEWSDPVRLN---SSGFDPSLFHDPSPGKYYVLLNM-----LWDH
P77713      YADGKFWLLYTDVKIVD-SPWKNGRNF LVTAPSIEGPWSEPIPMG---NGGFDPSLFHDDDGKYYIYR-----PWGP
P94489      YSDGKFWLIYTDVKVVD-GAWKDCHNYLVTCETINGDWESEPIKLN---SSGFASLFHDTDGKYYLLNM-----LWDH
Q9WXE8      YHSGLFYVYFCTP-----DEGLYMSTASNAPGWPAPLHLVKR-VAKWEDPCPFWDEDGQAYIGRS-----
              * * : :      :      *      *      *      *      :      :      *      :      *      :
TtβXil43      N-KAYVATQGIQLQELDLTTGAI-TRPTSLWNGTG--GVWPEGPHLYKKDGYYYLLIAEGGTALDHSITMARLHRLTQRS
A7LXT8       -----PDGYINLCEIDPMTGKQLSSKRIWNGTG--GRYAE GPHIYKKDGYWYLLISEGGTELGHKVTIARSRYID--G
P45982      DGVRVYNGDWEIWWQELDLEQMKLVGPSMAIWKALKDVIWPEGPHLYKKDGYYYLLHAEAGTSFEHAISVARSKELF--K
A7LXU0      -----DNQGSFLLGVMDPETGTVEALRKVASGLG--GSSPEGPHFYKIGDYYIYMSAEGGTGYEHREVIQRSKSPW--G
A9ZND1      R-AKTNFFGGIIMQEFDADGKLVGAPKTVFEGTE--LGCTEGPQLLKKDDYYLLITAEAGGTERNHAVTVCRSKHIW--G
P07129      R-EKHHSFAGIALQEYSVSEKKLVGERKVIKGTG--IKLTEAPHLYYINDVYLLTAEGGTRYEHAATIARSSRID--G
P77713      R-HHSNPHNTIVLQAFDPQTGLSPERKTLFTGTG--LCYTEGAHLYRHAGWYLLMAAEGGTSYEHAVVLRSKNID--G
P94489      R-IDRHSFGGIVIQEYSDKEQLIGKPKVIFEGTD--RKLTEAPHLHYHIGNYYLLTAEGGTRYEHAATIARSANIE--G
Q9WXE8      ----QHGAGPIIVHRMSADGKTLLEDEGKTVYEGP----IAEGTKFMKRNGWYLLIIEGGV-----
              :      :      .      :      *      *      *      *      :      :      *      :      *      :

```

Figura 47 - Alinhamento *T-Coffee* modo *M-Coffee* das sequências homólogas da TtβXil43. Os retângulos em amarelo indicam os aminoácidos conservados do sítio catalítico: nucleófilo: aspartato (D) e doador de próton: glutamato (E). As sequências homólogas estão identificadas pelo número de acesso *UniProtKB*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelo painel de substratos (Tabela 12), a TtβXil43 apresentou maior e moderada atividade em 4NF-β-Xil (100,00%) e 4NF-α-L-Araf (51,3%), respectivamente, com $p < 0,05$ para ambas pelo teste de *post hoc*, sugerindo que a TtβXil43 é um β-xilosidase, o que é consistente com a observação que as β-xilosidases são capazes de clivar as ligações α-L-arabinofuranosil – também algumas arabinofuranosidases de clivar ligações β-D-xilopiranosil.²⁴³⁻²⁴⁴ Geralmente, essa sobreposição de atividade para uma única enzima da família 43 estão relacionadas as conformações estericamente similares da α-L-arabinofuranose e da β-D-xilose perto da ligação glicosídica.^{241,245-246}

Nos substratos poliméricos (Tabela 12), a enzima TtβXil43 exibiu atividade razoável em arabinoxilano (20%, *post hoc* com $p < 0,05$), que possui posições unicamente e duplamente substituídas de α-1,2- e/ou α-1,3-L-arabinofuranose. Quando as xiloses da cadeia principal desse polissacarídeo são duplamente substituídas, elas se tornam particularmente recalcitrantes ao ataque enzimático de xilanases.²⁴⁷ Dessa forma, conhecer a capacidade da enzima em liberar a arabinofuranose de uma das posições duplamente substituídas é imprescindível para a utilização dessa enzima no aumento do potencial industrial desse polissacarídeo.²⁴⁸ No entanto,

uma análise mais a fundo do produto de hidrólise dessa enzima deve ser investigado para avaliar a possível capacidade em clivar ligações duplamente substituídas.

Atividade endoxilanase: Tex

A endoxilanase da família 10 de *T. terrestris* (Tex) exibiu atividade significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros substratos pelo xilano e arabinoxilano igualmente, com atividade moderada em galactano e alta em 2Cl-4NF-G₂ (Tabela 12). Isso mostra uma certa promiscuidade em relação a conformação de pirano da xilose, da glicose e da galactose da cadeia principal desses polissacarídeos. A alta atividade em 2Cl-4NF-G₂ pode indicar uma atividade de 1,4- β -glucanase, mas a baixa atividade em substratos como CMC, liquenano e β -glucano inviabiliza essa hipótese, sugerindo que a Tex não tenha especificidade para substratos poliméricos baseados em glicose, mas em substratos de origem sintética ou com pequenas cadeias.

As enzimas da família 10 são enzimas de retenção da configuração anomérica do carbono, e foram categorizadas primariamente como endo-1,4- β -xilanasas, que apresentam modesta a alta atividade em celobiosídeos e baixa atividade em CMC,²⁴⁹⁻²⁵¹ o que, erroneamente, levou a essas enzimas a serem chamadas de exo-celulases na literatura.²¹⁵ A Tex apresenta a característica de afinidade por substrato parecida com enzima da família 10 de *Cellulomonas fimi* (Cex). A análise da sequência primária da Tex através do PROSITE²⁵² e InterPro²²⁵ mostraram a presença de um CBM tipo 1 do aminoácido 359 ao 395 (apresenta 4 cisteínas conservadas), doador de próton glutamato 150, nucleófilo glutamato 259 e uma região desordenada do 332 ao 355, que sugere ser a conexão entre os domínios hidrolase de glicosídeo e CBM.

Consultando o banco de dados do SMART, a análise mostra duas regiões de baixa complexidade: 171-188 e 332-362. A primeira região apresenta a seguinte sequência: PAYIPIAFAAAAEADPDA e a segunda: GSSPPPSTTTTAAATTTTPPSGGGGNGCTAP, ambas regiões podem ser consideradas SAARs, pois apresentam repetições do mesmo aminoácido e podem ter alguma influência na estrutura ou função da enzima, assim como observado na TtAraf54, mas o painel não revelou nenhuma discrepância. Notavelmente, a posição da região de baixa complexidade de 332-362 é entre os domínios catalítico e de ligação ao carboidrato, podendo indicar que a função de SAARs na Tex, e também na TtAraf54, está relacionada à função de flexibilidade entre os domínios, aumentando o grau de liberdade e independência de cada domínio em atuar no polissacarídeo.

Além disso, uma consulta nos servidores de predição de glicosilação indicaram o tipo O-ligada nas posições 329 e 332 (Figura 48), o que pode acarretar em modulações estruturais dessa região, antes prevista como de baixa complexidade, e também fornecendo uma barreira às atuações de proteases. Baseando-se nas repetições de treoninas e serinas como causa de glicosilações em mucinas, as SAARs que aparecem tanto em TtAraf54 e Tex podem indicar um evento evolutivo que possibilitou uma maior atividade, solubilidade e estabilidade a essas proteínas para serem secretadas.

SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	305	305	0.213277	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	313	313	0.683377	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	314	314	0.894891	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	318	318	0.917909	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	319	319	0.933187	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	320	320	0.880224	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	321	321	0.91686	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	322	322	0.974656	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	323	323	0.926943	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	326	326	0.976726	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	327	327	0.972571	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	328	328	0.970721	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	329	329	0.929027	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	332	332	0.877681	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	340	340	0.387242	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	353	353	0.119088	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	356	356	0.100442	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	357	357	0.28304	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	363	363	0.0125248	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	367	367	0.0222086	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	372	372	7.28228e-06	.	.	

Figura 48 - Resultado da predição de O-glicosilações pelo servidor *NetOGlyc* da sequência da Tex. A região não-conservada está indicada dentro do retângulo preto. SEQUENCE significa sequência; CARBOHYD significa carboidrato; POSITIVE significa que aquela sequência é positiva para a presença de carboidrato.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa forma, a região do aminoácido 21 ao 330 foi selecionada para construção automática de um modelo estrutural por homologia através do servidor Swiss-Model,²⁰⁷ com o intuito de otimizar a modelagem da região catalítica. A estrutura escolhida foi PDB: 6Q8M (1,42 Å) de *Aspergillus aculeatus* com identidade sequencial de 54,25%, o modelo apresentou parâmetro GMQE de 0,80 (número próximos de 1 indicam maior confiabilidade do modelo), QMEAN de -1,55, pontuação *MolProbity* de 1,25 e Ramachandran favorável de 97,06%.

Com as coordenadas do modelo para Tex, foi possível alinhar duas estruturas da Cex (uma com ligantes, PDB: 1EXP e outra sem ligante, PDB: 2EXO) através do método *Super* implementado no PyMOL (Figura 49).²³³ Assim no subsítio -2, a Gln-89 da Tex ocupa a mesma posição que a Gln-87 da Cex e a Gln-88 de uma xilanase de *Streptomyces lividans* (SIXil10), sugerindo ser responsável pela acomodação do grupo hidroximetil da hexose devido a maior flexibilidade, em contraste com a rigidez da Tyr-87 de *Pseudomonas cellulosa* (PcXil10),

explicando a diferença de atividade em 4NF-G₂ entre Cex e PcXil10,²⁵³⁻²⁵⁴ o que pode ser estendido para a Tex.

Já no subsítio -1, essa atividade em 4NF-G₂ ainda estaria relacionada ao Trp-313 da PcXil10 (Trp-281 para Cex) que teria uma mudança conformacional restrita devido à interação hidrofóbica com a Leu-314 (Val-282 para Cex) não comportando o hidroximetil da glicose.²⁵⁵ Essa rigidez poderia ser observada para Tex, uma vez que o Trp-286 poderia interagir com a Ile-287 da mesma maneira que na PcXil10, indo contra a atividade em 2Cl-4NF-G₂ (Figura 49) – pior ainda para SIXil10 que o Trp-274 estaria com a conformação restrita devido a interação de empilhamento com a Arg-275. Dessa forma, Andrews *et al*²⁵³ mostrou que a mutação da Leu-314 não teve efeito significativo na atividade contra 4NF-G₂ da PcXil10, mas reduziu drasticamente a atividade em 4NF-X₂ (4-nitrofenil-xilobiosídeo), indicando que a Leu possui um papel crucial na ligação de xilopiranosídeo e, aparentemente, menos crítico para glucopiranosídeo.

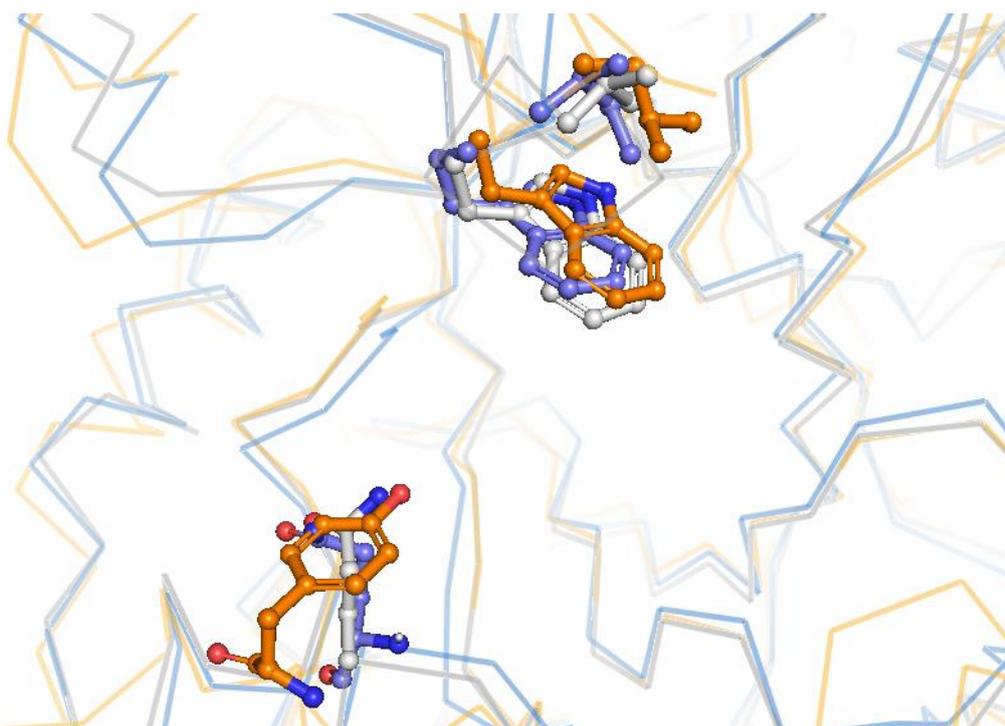


Figura 49 - Alinhamento de estrutura com destaque para os resíduos do subsítio -2 e -1: Tex em azul com resíduos em -2: Gln, -1: Trp e Ile. PcXil10 em laranja com -2: Tyr, -1: Trp e Ile. Cex em cinza com -2: Gln, -1: Trp e Val.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, estendendo a explicação de Ducros *et. al.*²⁵⁶ é sugerido que ambos Trp e seu parceiro de interação tornam-se desordenados, sugerindo que a flexibilidade na localização do parceiro permite que o resíduo aromático adote uma nova posição para acomodar a glicose.

Mais tarde, foi observado que quando essa interação abrange um conjunto de aminoácidos, ela pode tornar a movimentação mais rígida, resultando em menor atividade em 4NF-G₂ – como é o caso da xilanase de *Cellvibrio mixtus* (CmXil10) em comparação à Cex, já que no subsítio -2 ambas apresentam Gln (Gln-120 para CmXil10).²⁵⁷ A análise dessa região, por alinhamento e comparando a estrutura modelada da Tex com a CmXil10 e a Cex (Figura 50 A), mostrou que a Phe-286 e Pro-287 da Cex (Phe-340 e Pro-341 da CmXil10) possui um espaçamento de um aminoácido em relação a dupla Trp-281 e Val-282 (Trp-336 e Leu-337 da CmXil10), esse posicionamento parece ser suficiente para que as duplas não interajam.²⁵⁷ Em relação a Tex, ela não possui essa dupla de resíduos e a alça que abriga essas interações é mais curta do que nas outras estruturas (Figura 50 B), logo é esperado que esse truncamento de aminoácidos favoreça a flexibilidade dessa região, assim como na Cex.

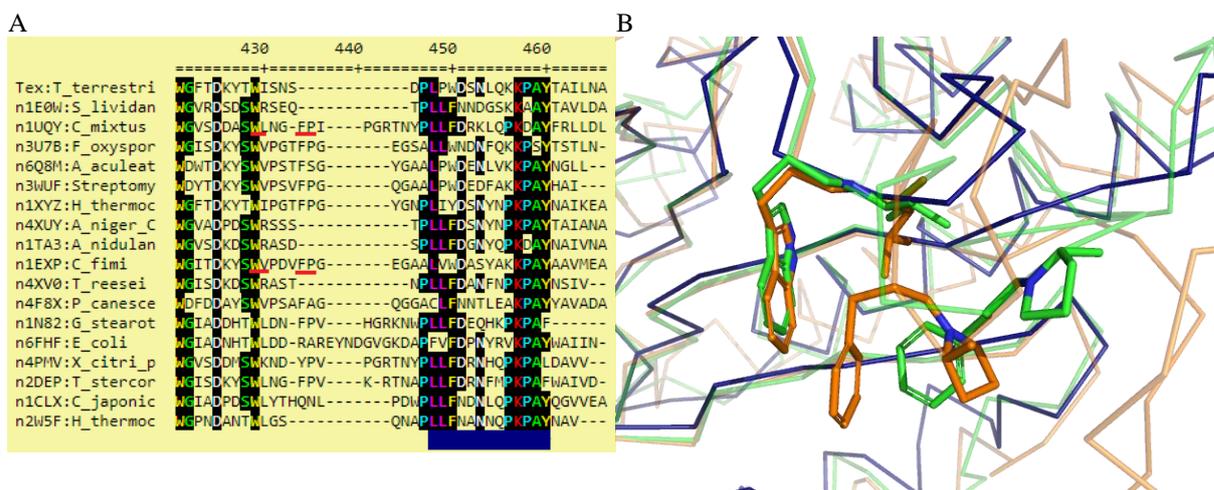


Figura 50 - A) Alinhamento global identificando os pares de interação (traço vermelho) da Cex (*C. fimi*) e da CmXil10 (*C. mixtus*). B) Alinhamento das estruturas da Cex (verde), CmXil10 (laranja) e Tex (azul).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Adicionalmente, é sugerido que a alta eficiência catalítica da Cex contra 4NF-G₂, 4NF-X₂ e DNF-G₂ (dinitrofenil celobiosídeo) não é um reflexo da ligação eficiente de resíduos de açúcar na região glicona do sítio ativo (subsítios de -1 ao -3), mas sim devido à afinidade relativamente alta para grupos fenólicos na região aglicona (subsítios +1 e +2) da fenda de ligação ao substrato.^{253,258} Essa hipótese remete as tomatinases relacionadas a membros da família 10. Tomatinas pertencem a uma classe de moléculas chamadas de saponinas, que são glicídeos e consistem de um aglicona, esteroidal ou tripernóide, ligada a um ou mais açúcares.²⁵⁹ Moléculas como α -tomatina possui efeito tóxico e muitos fungos patógenos produzem tomatinases para remover os açúcares da cadeia como forma de destoxicá-la,²⁶⁰ em

contra partida, também apresentam efeitos anticarcinogênico, cardioprotetor e outros benefícios à saúde humana.²⁶¹

Embora não tenha sido relatada nenhuma atividade de xilanase para tomatinases,^{260,262-263} não exclui a hipótese de xilanases apresentarem atividade em tomatinas ou saponinas, já que a parte aglicona, como já mencionado, pode ser bem acomodada no sítio ativo de xilanases com alta atividade em 4NF-glicosídeo. Mas essa atividade deve ser mensurada, bem como análises estruturais capazes de explicar as bases moleculares relacionadas às possíveis diferenças, uma vez que a sequência de aminoácidos de tomatinases e glucanases são altamente homólogas.²⁶⁰

Atividade da galactanase TtGal5

Observando a atividade da TtGal5 nos substratos sintéticos com maiores atividades, não há diferença significativa pelo teste de *post hoc* ($p > 0,05$) entre 4NF- α -Gal ou 4NF- β -Gal, nem em relação à conformação da arabinose na forma pirano há uma preferência, como se vê em 4NF- α -Araf (Tabela 12). Em adição a isso, nos substratos poliméricos, as maiores atividades foram em arabinogalactano, ramnogalacturonano e galactano, que compreendem o subconjunto homogêneo D pelo teste de *post hoc*, os quais possuem substratos baseados em galactose, indicando que a TtGal5 pode ser uma galactanase.

Arabinogalactano tipo I (AG-I) são polissacarídeos com cadeia principal de β -1,4-galactano, covalentemente ligado a região ramnogalacturonano I de pectinas,²⁶⁴ com ramificações de grupos ferúlicos ligados em O-6,²⁶⁵⁻²⁶⁶ arabinofuranose em O-5 e arabinopiranosse terminais ligadas à galactose.²⁶⁷ Tipo II de arabinogalactanos (AG-II) são altamente complexos e frequentemente ligados a proteínas, são constituídos de cadeia principal de β -1,3-galactano com ramificações de mono ou oligossacarídeos de galactoses em O-6, apresentando açúcares terminais nas ramificações como L-arabinofuranose, L-arabinopiranosse, L-ramnose, entre outros.²⁶⁸⁻²⁶⁹ O substrato arabinogalactano de lariço adquirido de *Megazyme* apresenta ramificações 1,6- α -Araf, 1,6- β -Gal-1,6- β -Gal, 1,6- β -Gal-1,4- α -Araf e 1,4- β -Gal-1,6- β -Gal.

Utilizando a sequência da proteína sem o peptídeo sinal da TtGal5, o resultado do *Blast*¹³⁷ com parâmetros padrões retornou alinhamentos globais com pontuação acima de 200 para enzimas com função β -galactanase, e 1,6- β -galactanase. Junto a isso, a classificação do banco de dados CAZy das 14.081 enzimas pertencentes a família 5, 563 são caracterizadas e possuem mecanismo de retenção, das quais apenas 2 são endo-1,6-galactanases: uma de *Aspergillus niger* e outra de *Fusarium oxysporum*, que possuem com a TtGal5 56,15 e 55,03%

de identidade, cobertura de 94 e 95% e *e-value* abaixo de e^{-162} , respectivamente. O banco de dados Pfam por similaridade à endoglucanase A de *Clostridium cellulolyticum* apontou uma tríade de aminoácidos pertencentes ao sítio ativo: histidina-171, glutamato-223 como doador de próton e glutamato-346 como nucleófilo.²²⁶ Mas com parâmetros de alinhamento local dos domínios celulase entre as duas sequências muito ruins: identidade de 30,00%, cobertura de 24% e *e-value* de 0,13. Portanto, os bancos de dados carecem de melhor anotação das características desse tipo de enzima da família 5, pois ainda há pouca informação estrutural e funcional a respeito delas.

Sabendo que endo- β -1,6-galactanses (EC 3.2.1.164) podem degradar AG-II²⁷⁰⁻²⁷¹ e, mediante aos polissacarídeos empregados no painel, apenas o arabinogalactano de lariço poderia ser substrato mais específico para a atividade da TtGal5, assim como foi pobremente detectado. Além do mais, houve uma dificuldade referente a observação de uma atividade sobressalente às residuais apresentadas nos demais polissacarídeos, como galactano e ramnogalacturonano, mensurado através dos açúcares redutores na reação pelo método de Miller.¹¹³

Isso pode estar relacionado ao baixo número de ramificações de dissacarídeos β -1,6-presentes nos substratos empregados, sendo mais apropriado identificar os produtos de hidrólise utilizando um HPLC ou espectroscopia de massas. Já a atividade nos substratos sintéticos como 4NF- β -Gal, 4NF- α -Gal e 4NF- α -Arap podem indicar uma baixa seletividade pelos açúcares terminais das 1,6- β -galactoses ligadas à cadeia principal, já que a estrutura do anel desses 4NF-glicosídeos é similar. Portanto, a enzima recombinante TtGal5 pode ser uma β -1,6-galactanase que desmembra preferencialmente β -1,6-galactobiose de AG-II.

Em termos da importância dessas enzimas, o uso de enzimas que degradam AG-I e AG-II podem beneficiar o branqueamento de polpas de celuloses utilizadas na indústria de papel, uma vez que os galactanos, assim como xilanos, podem estar quimicamente ligados com a lignina.²⁷²⁻²⁷³ Pectinas de resíduos agroindustriais como polpa de beterraba sacarina e polpa de batata são ricas em pectina, no entanto a habilidade de gelificação delas é menor do que pectinas de maçã e citros. A razão vem da hipótese da abundância de açúcares neutros das cadeias laterais, como os galactanos.²⁷⁴ Muitas dessas pectinas, incluindo a de soja, na alimentação animal, são tratadas com o uso de enzimas que atuam em AG-II para redução da viscosidade e aumento da digestibilidade dos ingredientes na ração.²⁷⁵⁻²⁷⁶ Uma forma de agregar valor nutricional seria o emprego de galactanases para a produção de prebióticos, como os galactooligosacarídeos.²⁷⁰

A expressão *in situ* de β -galactosidase/galactanase demonstrou-se relacionada ao processo de amolecimento e solubilização de pectinas e hemiceluloses em mamão papaia. Essa potencial capacidade das isoformas de β -galactanases/galactanases de papaia em hidrolisar pectina e hemicelulose pode indicar que os galactanos podem exercer estruturalmente ligações cruzadas entre os componentes da parede celular, o que aumenta sua recalcitrância.²⁷⁷ O processo de amadurecimento do mamão papaia tem sido alvo de interesse em engenharia de pectina pois o amolecimento do fruto propõe uma facilitação da degradação da parede celular. Esse processo também ocorre no aerênquima da cana-de-açúcar e está sendo estudado para melhoramento genético a fim de viabilizar a produção do etanol de segunda geração em larga escala.³⁶

Enzimas que são capazes de hidrolisar 4NF-glicosídeos possuem potencial atividade em glicosídeos naturais. Os glicosídeos são os compostos que apresentam uma molécula de açúcar ligada a uma molécula não glicídica (aglicona) como: terpenóides, esteróides, flavonóides, quinonóides, lignanas, outros fenólicos simples e isotiocianatos. A diversidade estrutural deles é resultado da grande quantidade de variedades e configurações estereoquímicas do componente de açúcar, apresentando atividade biológica diferente para o mesmo aglicona.²⁷⁸

O paeonolídeo e ginsenosídeo Rb2 contém aglicona aromático conjugado com α -L-arabinopiranosil-(1,6)- β -D-glucopiranosídeo e são utilizados como medicamentos fitoterápicos em países do leste asiático. As enzimas presentes na microbiota do intestino humano são capazes de clivar o α -L-arabinopiranosídeo, tornando esses compostos disponíveis à absorção, demonstrando a importância do metabolismo do α -L-arabinopiranosidase no intestino.²⁷⁹ Enzimas com atividade em 4NF-glicosídeos, como TtAraf54, Tt β Xil43, até mesmo Tex e TtGal5, refletem potencial interesse na obtenção de agliconas com aplicação biotecnológica, seja na indústria farmacêutica, na alimentícia, entre outras.²⁸⁰⁻²⁸¹ O processo de melhoramento das propriedades sensoriais do vinho, pode ser alcançada pela hidrólise de açúcares presentes nos glicídeos responsáveis pelo aroma e sabor, como monoterpenos e norisoprenoides.²⁸²

3.3.2.4 Temperatura e pH ótimos

A eficiência catalítica da enzima é intimamente influenciada pelo pH e temperatura na qual se dão as interações intermoleculares efetivas entre ela e o substrato. Desse modo, é esperado encontrar uma curva de pH onde se exiba a máxima conversão enzimática do substrato em produto, o qual está intimamente relacionado às cargas das cadeias laterais dos aminoácidos que fazem parte do sítio ativo. Enquanto a temperatura ótima tem relação com a energia do

sistema, em que a flexibilidade da enzima é influenciada por ela e reflete diretamente na taxa de encontro efetivos entre a enzima e substrato.

Ao comprovar experimentalmente a influência do pH e da temperatura na catálise enzimática das enzimas estudadas, se observa que os pHs (Figura 51) estão deslocados para região mais ácida, sendo 3,5-4,0 para TtAraf54 e 4,5-5,0 para Tt β Xil43. Para a Tex o pH ótimo muda conforme muda o substrato na reação, para 2Cl-4NF-G₂ o pH foi 5,0 e em xilano entre 6,5-7,5. Isso pode estar relacionado à natureza dos compostos, sendo o xilano um polissacarídeo natural e o 2Cl-4NF-celobiose um composto sintético e menor. Dessa forma, não apenas as cargas dos aminoácidos catalíticos devem ser levadas em conta na taxa de reação, mas também as cargas das cadeias laterais dos aminoácidos relacionados a acomodação do substrato nos sítios de reconhecimento adjacentes aos resíduos catalíticos, pois o posicionamento é importante para a hidrólise.

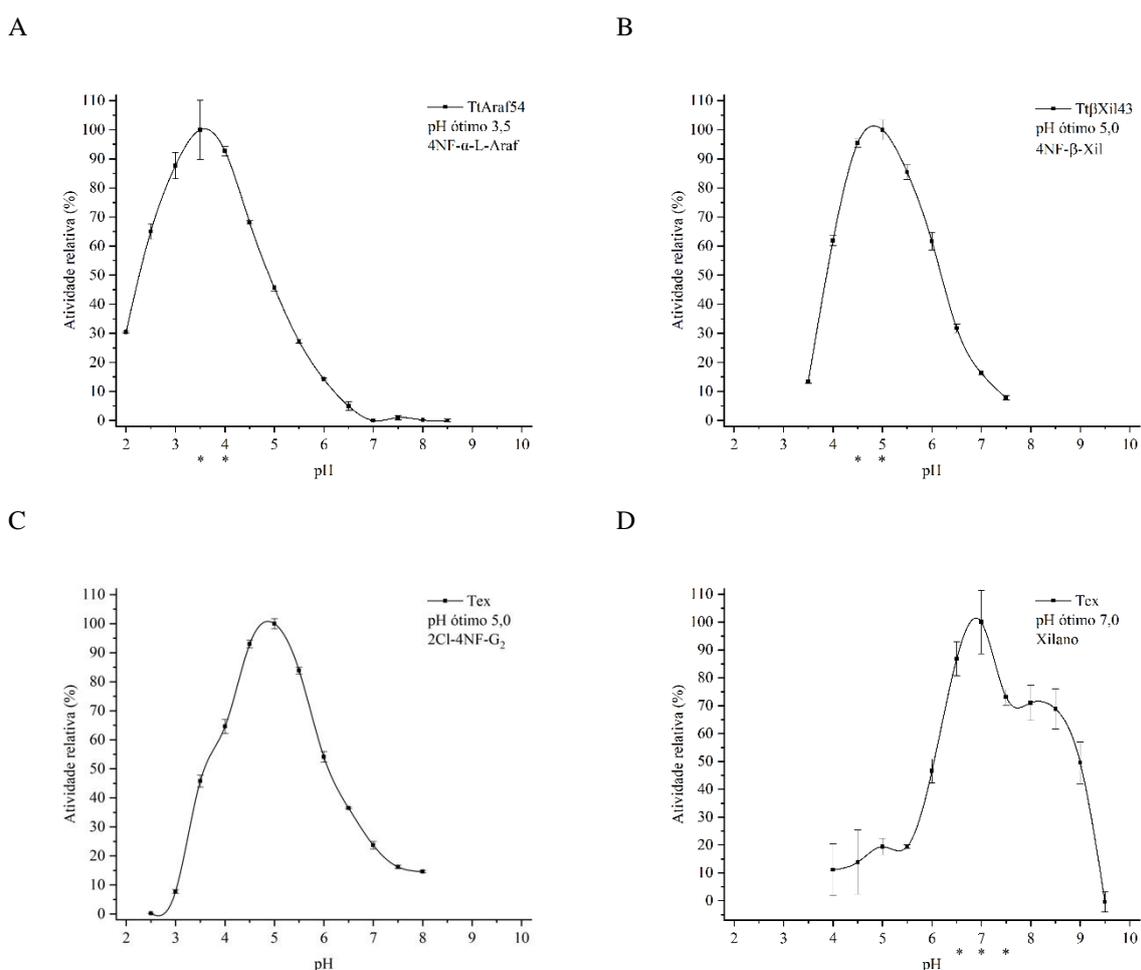


Figura 51 - Perfil de pH ótimo das enzimas recombinantes. A: TtAraf54; B: Tt β Xil43; C: Tex na presença de 2Cl-4NF-G₂; D: Tex na presença de xilano. Condições do ensaio de pH ótimo: temperatura de 50 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação a Tex já foi discutido que a alta eficiência catalítica contra 2Cl-4NF-G₂ é devido à afinidade relativamente alta para grupos fenólicos na região aglicona (subsítios +1 e +2) da fenda de ligação ao substrato. A temperatura ótima para diferentes substratos da Tex (Figura 52 C e D) refletem também a importância da diferença do posicionamento e acomodação do substrato para a atividade catalítica – enquanto que o xilano é uma molécula maior que o Cl₂-4NF-G₂, com temperatura de 50 °C em comparação aos 65 °C para o substrato sintético. Os 65 °C para o 2Cl-4NF-G₂ reflete um estado de agitação térmica onde a estrutura da proteína começa a ser prejudicada pela temperatura, como mostra o desnaturamento térmico por CD ($T_m = 58,6$ °C), enquanto que para o substrato polimérico, a temperatura ótima ficou abaixo do T_m , sugerindo a importância da integridade da estrutura para a atividade enzimática – talvez a acomodação em função do tamanho da cadeia do substrato seja influenciada pela energia térmica do sistema reacional.

Um outro ponto a ser levantado é o tempo de reação, que foi de 10 minutos, enquanto as medidas de obtenção da transição térmica por CD demoraram horas, por causa da obtenção dos espectros de 280 a 190 nm a cada 2 °C. Nesse caso, o tempo e o tamanho do substrato podem ser um fator que influencie para uma maior temperatura ótima na presença do substrato sintético, uma vez que as proteínas ainda não estão totalmente desenoveladas.

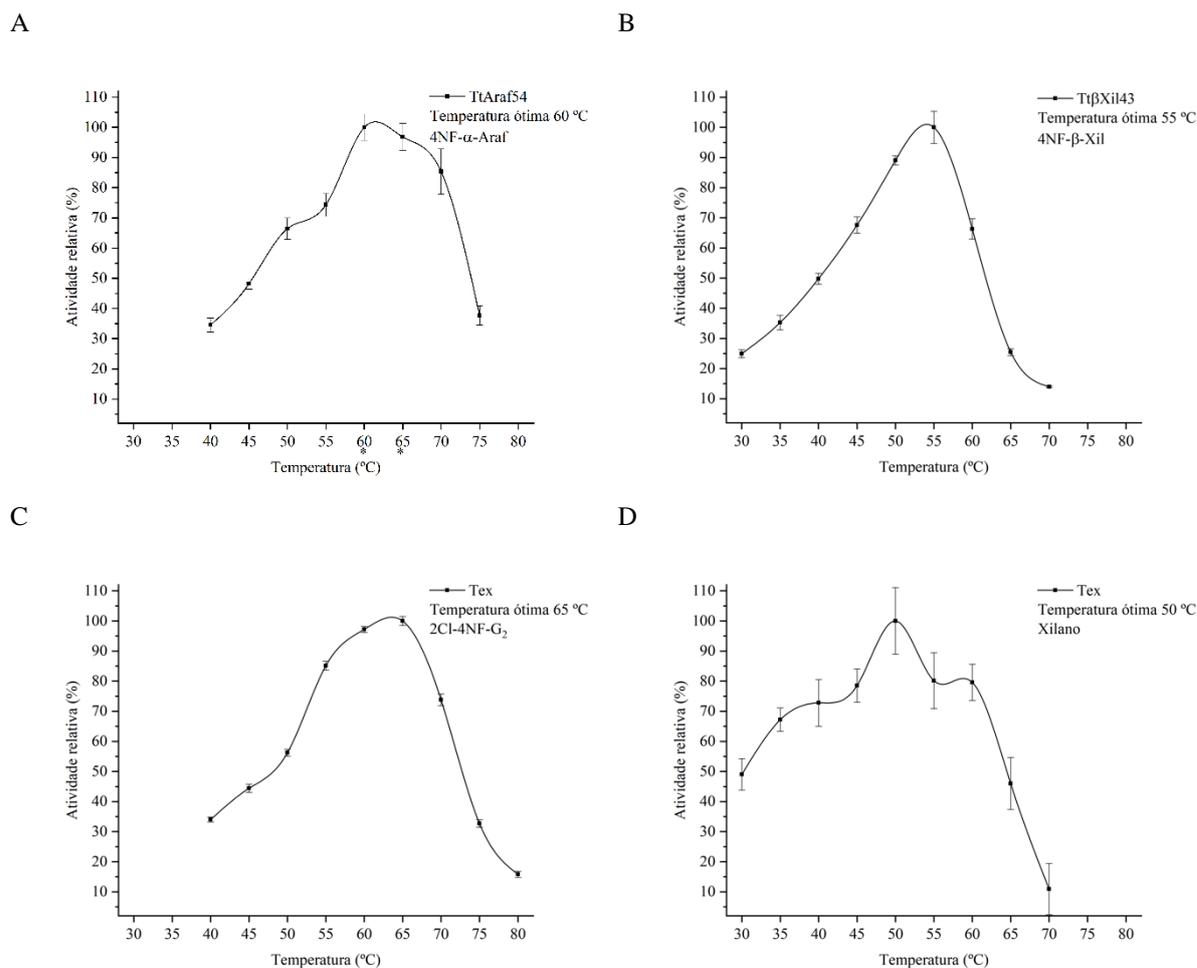


Figura 52 - Temperatura ótica das enzimas recombinantes. A: TtAraf54; B: Tt β Xil43; C: Tex na presença de 2Cl-4NF-G₂; D Tex na presença de xilano. Condições do ensaio: citrato/fosfato em pH ótico de cada enzima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A mesma situação também ocorre para a TtAraf54, que apresenta temperatura ótica de 60-65°C (Figura 52 A) e um T_m de 57 °C, possivelmente o mesmo deve ser observado para Tt β Xil43 (Figura 52 B), cuja temperatura ótica foi de 55 °C (dados de T_m por CD não realizado). Os valores de temperatura ótica acima de 55 °C são temperaturas elevadas, se comparadas as enzimas produzidas por fungos (Tabela 1), e, devido sua origem fúngica, podem apresentar elevada estabilidade térmica quando incubadas em maiores temperaturas (experimento não realizado).

Portanto, é importante destacar a natureza do substrato onde a enzima é caracterizada, uma vez que os valores obtidos podem não ser extrapolados para uma possível aplicação da enzima em um substrato diferente, diminuindo seu poder de catálise. Ainda, é importante destacar que as diferenças entre os tampões onde foi feito espectroscopia de CD e a reação enzimáticas são bem diferentes, podendo contribuir para uma maior estabilidade estrutural da enzima.²⁸³ Nesse caso, 20 mM de fosfato de sódio pH 7,2 pode ser desfavorável durante o

processo de medida da transição térmica, resultando em T_m menor do que o apresentado na temperatura ótima (citrato-fosfato). Ainda existe outro fator, o próprio substrato e os produtos, que ao interagirem com a enzima, podem atuar como estabilizadores da estrutura, favorecendo o aumento da temperatura da reação. O experimento de *Thermofluor* (ou do inglês, *differential scanning fluorimetry*) pode medir a curva de fluorescência do cromóforo interagente com a região hidrofóbica da proteína em diversas condições tamponantes e de aditivos em função do aumento da temperatura. Essas medidas fornecem os valores de T_m relacionados com a estabilidade estrutural da proteína nas diversas condições testadas, inclusive do tampão de reação, que podem ser mais fielmente comparados com a temperatura ótima da enzima.

3.4 CONCLUSÃO

Todas as enzimas caracterizadas apresentaram temperatura ótima acima de 50 °C e pH ótimo ligeiramente ácido. Os valores de T_m por CD sugerem que existe uma influência do tampão e dos substratos no estabelecimento da temperatura ótima de reação, bem como, o aumento da termoestabilidade das enzimas.

A Tex apresentou temperatura e pH ótimos diferentes para o xilano (50 °C e 7,0) e para o 2Cl-4NF-G₂ (65 °C e 5,0). A TtAraf54, embora possua o ABD, não apresentou atividade em polissacarídeo e exibiu temperatura ótima em 4NF-Araf de 60 °C e pH de 3,5. Já a Tt β Xil43 é uma β -xilosidase com atividade de arabinofuranosidase, tem pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 55 °C. Ambas Tex e TtAraf54 tem alta probabilidade de serem glicosiladas, o que sugere que essas modificações podem conferir estabilidade térmica e características estruturais que podem refletir na especificidade do substrato no caso da TtAraf54. A TtGal5 carece de caracterização de atividade em substrato, que identifique os produtos liberados na reação catalisada por ela.

As TtCel7.2 e a TtCel7.3 parecem exibir diferenças estruturais importantes mediante à identidade sequencial que apresentam (44,39%), podendo fornecer conhecimentos das bases moleculares que regem as diferenças de: estabilidade térmica: 80% de atividade residual à 65°C e 70 °C por três horas para 7.2 e 7.3, respectivamente; da influência de Co⁺² na potencialização em 50% da atividade enzimática das enzimas; do estado oligomérico dimérico da TtCel7.2 em relação a inibição do produto; e da atividade da TtCel7.2 abrigar substratos ramificados com maior promiscuidade em relação à cadeia principal do polissacarídeo.

Por fim, a construção do conhecimento em relação a estrutura, função e estabilidade das enzimas só é atingida através das características individuais de cada uma, explorando seus

atributos bioquímicos e estruturais. Dessa forma, a ampla caracterização das enzimas é extremamente importante. A compreensão dessa relação fundamental pode contribuir no campo de desenvolvimento de novas enzimas cataliticamente mais ativas, processivas, estáveis, que podem ser empregadas para aprimorar processos laboratoriais e indústrias mais vantajosas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com base na geração da grande quantidade de dados fornecida pelos dados do secretoma, junto com o transcriptoma realizado por Berka *et. al.*,⁴⁷ o desenvolvimento do *T. terrestris* como chassi de expressão de proteínas, representa uma alternativa à produção econômica de CAZymes e pode contribuir com os conhecimentos de domínio público dos processos biológico relacionado à alta secreção de proteínas em fungo filamentosos.⁴¹ Essa abordagem pode ser conduzida através de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e também por CRISPR/Cas-9 e iRNA,²⁸⁴ que possibilitem a obtenção de transformantes com características desejáveis e otimização de promotores constitutivos e indutivos, com a finalidade de obter uma cepa com alto nível secreção de proteínas de interesse.

Ao que se refere às enzimas recombinantes em bactéria, inicialmente, caracterizadas, necessita-se ainda finalizar suas caracterizações bioquímicas, bem como, realizar testes de estabilidade gerada por tampões, aplicando a técnica de *Thermofluor*. Concomitante a isso, otimizar as condições de cristalização de todas as proteínas para a construção de um modelo estrutural tridimensional, com o intuito de correlacionar com a estabilidade térmica e atividade. Mediante a isso, produzir mutantes que avaliem a influência de determinados códons e íons na termotolerância das enzimas TtCel7.2 e TtCel7.3, bem como caracterizar o produto de hidrólise de ambas. Investigar o papel da glicosilação na atividade em polissacarídeo da TtAraf54 através da expressão em *Aspergillus nidulans* A773. Continuar com a caracterização heteróloga de enzimas oxidativas na detoxicação de águas por moléculas orgânicas. Caracterizar algumas proteínas hipotéticas altamente presentes no secretoma a fim de corroborar com o conhecimento de novos domínios catalíticos presentes no processo de degradação do bagaço de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- 1 JOHANSEN, K. S. Lytic polysaccharide monoxygenases: the microbial power tool for lignocellulose degradation. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 11, p. 926-936, 2016.
- 2 JAISWAL, D. et al. Reply to: Brazilian ethanol expansion subject to limitations. **Nature Climate Change**, v. 9, n. 3, p. 211-212, 2019.
- 3 _____. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. **Nature Climate Change**, v. 7, p. 788, 2017. doi: 10.1038/nclimate3410
- 4 GIRARD, V. et al. Secretomes: the fungal strike force. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 597-608, 2013.
- 5 MCCANN, M. C.; CARPITA, N. C. Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4109-18, 2015.
- 6 SANNIGRAHI, P. A.; RAGAUSKAS, A. J.; TUSKAN, G. A. Poplar as a feedstock for biofuels: a review of compositional characteristics. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 2, p. 209-226, 2010.
- 7 LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169-72, 2008.
- 8 GONCALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293-9, 2012. doi.:10.1016/j.biortech.2012.05.062
- 9 BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; SQUINA, F. M. Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 123-129, 2013. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.062
- 10 SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **O setor sucro-alcooleiro e o domínio tecnológico**. São Paulo: NAIPE/USP, 2007.
- 11 MCCANN, C. Architecture of the primary cell wall. In: LOYD, C. W. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. New York: Academic Press, 1991. p. 109-129.
- 12 DE SOUZA, A. P. et al. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013.
- 13 LEITE, D. et al. Cell wall changes during the formation of aerenchyma in sugarcane roots. **Annals of Botany**, v. 120, n. 5, p. 693-708, 2017.
- 14 BUCKERIDGE, M. S.; GRANDIS, A.; TAVARES, E. Q. P. Disassembling the glycomic code of sugarcane cell walls to improve second-generation bioethanol production. In: RAY, R. C., RAMACHANDRAN, S. (Ed.). **Bioethanol production from food crops**. New York: Academic Press, 2019. cap. 2, p.31-43.

- 15 DE LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 2, p. 157-163, 2001.
- 16 MIKKELSEN, D. et al. Interactions of arabinoxylan and (1,3)(1,4)- β -glucan with cellulose networks. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 4, p. 1232-1239, 2015.
- 17 BUCKERIDGE, M. et al. The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance. In: LAM, E.; CARRER, H., et al (Ed.). **Compendium of bioenergy plants: sugarcane**. New York: CRC Press, 2016. p.31-50.
- 18 RALPH, J. Hydroxycinnamates in lignification. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 65-83, 2010.
- 19 BUCKERIDGE, M. S. et al. Sugarcane cell wall structure and degradation: from monosaccharide analyses to the glycomic code. In: BUCKERIDGE, M. S.; DE SOUZA, A. P. (Ed.). **Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane**. Berlin: Springer, 2017. p.7-19.
- 20 TOPAKAS, E., et al. **Enzyme aided extraction of bioactive components from biomass**. Disponível em: < <https://www.chemeng.ntua.gr/biotechmass/extraction.html> >. Acesso em: agosto, 2019.
- 21 DE SOUZA, A. P. et al. How cell wall complexity influences saccharification efficiency in *Miscanthus sinensis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4351-4365, 2015.
- 22 BUCKERIDGE, M. S.; DE SOUZA, A. P. Breaking the “Glycomic Code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 4, p. 1065-1073, 2014.
- 23 DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322-338, 2015. doi: 10.1016/j.biombioe
- 24 RALPH, J. et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1-2, p. 29-60, 2004.
- 25 SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.061.
- 26 SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- 27 SILVEIRA, M. H. et al. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. **ChemSusChem**, v. 8, n. 20, p. 3366-90, 2015.
- 28 MOTA, T. R. et al. Hydrogen peroxide-acetic acid pretreatment increases the saccharification and enzyme adsorption on lignocellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111657, 2019. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111657.

- 29 SINDHU, A. et al. Maize Brittle stalk2 encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity. **Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 1444-59, 2007.
- 30 SATTLER, S. E.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; PEDERSEN, J. F. Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. **Plant Science**, v. 178, n. 3, p. 229-238, 2010.
- 31 VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010.
- 32 MARRIOTT, P. E. et al. Range of cell-wall alterations enhance saccharification in *Brachypodium distachyon* mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 40, p. 14601-14606, 2014.
- 33 KALLURI, U. C. et al. Systems and synthetic biology approaches to alter plant cell walls and reduce biomass recalcitrance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 9, p. 1207-16, 2014.
- 34 STUDER, M. H. et al. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 15, p. 6300-6305, 2011.
- 35 PORTH, I. et al. Genome-wide association mapping for wood characteristics in *Populus* identifies an array of candidate single nucleotide polymorphisms. **New Phytologist**, v. 200, n. 3, p. 710-26, 2013.
- 36 TAVARES, E. Q. P. et al. The control of endopolygalacturonase expression by the sugarcane RAV transcription factor during aerenchyma formation. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 2, p. 497-506, 2019.
- 37 ALISSON, E. **Pesquisadores avançam no desenvolvimento da "cana papaia"**. Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/pesquisadores-avancam-no-desenvolvimento-da-cana-papaia/30065/>>. Acesso em: junho 2019.
- 38 LAL, R. World crop residues production and implications of its use as a biofuel. **Environment International**, v. 31, n. 4, p. 575-84, 2005.
- 39 DIPARDO, J. **Outlook for biomass ethanol production and demand**. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/ee45/c5efd06ba570b7c12e597037fefffaa2b6c1.pdf>>. Acesso em: setembro 2019.
- 40 MARTINS-SANTANA, L. et al. Systems and synthetic biology approaches to engineer fungi for fine chemical production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 117, 2018. doi: 10.3389/fbioe.2018.00117.
- 41 DAMASIO, A. et al. Editorial: advances in the regulation and production of fungal enzymes by transcriptomics, proteomics and recombinant strains design. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 157, 2019. doi:10.3389/fbioe.2019.00157

- 42 ALAZI, E.; RAM, A. F. J. Modulating transcriptional regulation of plant biomass degrading enzyme networks for rational design of industrial fungal strains. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 133, 2018. doi: 10.3389/fbioe.2018.00133.
- 43 MEYER, V. et al. The cell factory *Aspergillus* enters the big data era: opportunities and challenges for optimising product formation. In: KRULL, R.; BLEY, T. (Ed.). **Filaments in bioprocesses**. Berlin: Springer, 2015. p.91-132.
- 44 SHARMA, A. et al. Thermophilic Fungi and Their Enzymes for Biorefineries. In: TIQUIA-ARASHIRO, S. M.; GRUBE, M. (Ed.). **Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance**. New York: Springer, 2019. p.479-502.
- 45 MARGARITIS, A.; MERCHANT, R. F. J.; YAGUCHI, M. Thermostable cellulases from thermophilic microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 327-367, 1986.
- 46 VIKARI, L. et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In: OLSON, L.(Ed.). **Biofuels**. Switzerland: Springer Nature, 2007. p.121-145.
- 47 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. 922-7, 2011.
- 48 HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.
- 49 MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461-88, 2000.
- 50 LI, D. C.; LI, A. N.; PAPAGEORGIOU, A. C. Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 308730, 2011. doi:10.4061/2011/308730
- 51 ZHAO, J. et al. Two neutral thermostable cellulases from *Phialophora* sp. G5 act synergistically in the hydrolysis of filter paper. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 404-410, 2012. doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.027
- 52 LI, D.-C.; PAPAGEORGIOU, A. C. Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. **Enzyme Research**, v.2011, n.1, p.308730, 2011.
- 53 SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. 3, p. 2379-2386, 2018.
- 54 DOS SANTOS, H. B. et al. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **AMB Express**, v.6, n. 103, 2016. doi: 10.1186/s13568-016-0276-y
- 55 KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 302-314, 2009.

- 56 HATAKKA, A. I. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 350-357, 1983.
- 57 HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-16, 2010.
- 58 BREUIL, C.; WOJTCZAK, G.; SADDLER, J. Production and localization of cellulases and β -glucosidase from the thermophilic fungus *Thielavia terrestris*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 9, p. 673-676, 1986.
- 59 DURAND, H.; SOUCAILLE, P.N.P.; TIRABY, P. S. G. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, n. 4, p. 175–180, 1984.
- 60 GILBERT, M.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 147–153, 1992.
- 61 ROSGAARD, L. et al. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 2, p. 493-8, 2006.
- 62 MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 95-120, 2007. doi:10.1007/10_2007_066.
- 63 WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57, 2009.
- 64 METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 39, n. 3-4, p. 295-311, 2001.
- 65 DONSON, J. et al. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1-2, p. 75-97, 2002.
- 66 NAGALAKSHMI, U. et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. **Science**, v. 320, n. 5881, p. 1344-9, 2008.
- 67 WILHELM, B. T. et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. **Nature**, v. 453, n. 7199, p. 1239-43, 2008.
- 68 RIES, L. et al. Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 541, 2013. doi: 10.1186/1471-2164-14-541
- 69 KOLBUSZ, M. A. et al. Transcriptome and exoproteome analysis of utilization of plant-derived biomass by *Myceliophthora thermophila*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 10-20, 2014. doi: 10.1016/j.fgb.2014.05.006

70 DE SOUZA, W. R. et al. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, p. 40, 2011. doi:10.1186/1754-6834-4-40 .

71 ANGELINI, C.; COSTA, V. Understanding gene regulatory mechanisms by integrating ChIP-seq and RNA-seq data: statistical solutions to biological problems. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, p. 51, 2014. doi: 10.3389/fcell.2014.00051

72 TEMBE, W. D. et al. Open-access synthetic spike-in mRNA-seq data for cancer gene fusions. **BMC Genomics**, v. 15, p. 824, 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-824

73 HSU, P.D.; LANDER, E.S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262-1278, 2014.

74 FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806, 1998.

75 TJALSMA, H. et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 515-47, 2000.

76 PAPER, J. M. et al. Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Proteomics**, v. 7, n. 17, p. 3171-83, 2007.

77 YEUNG, E. S. Genome-wide correlation between mrna and protein in a single cell. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 583-585, 2011.

78 GHAZALPOUR, A. et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 6, p. e1001393, 2011.

79 GYGI, S. P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.

80 MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 583, n. 24, p. 3966-3973, 2009.

81 HARGROVE, J. L.; SCHMIDT, F. H. The role of mRNA and protein stability in gene expression. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 12, p. 2360-2370, 1989.

82 SCHWANHÄUSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, p. 337, 2011. doi:10.1038/nature10098.

83 FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **International Journal of Genomics**, v. 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

84 BHATNAGAR, D. et al. The 'omics' tools: genomics, proteomics, metabolomics and their potential for solving the aflatoxin contamination problem. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2008.

- 85 KAUL, S.; SHARMA, T.; K DHAR, M. "Omics" Tools for better understanding the plant-endophyte interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 955-955, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.00955.
- 86 SEGATO, F. et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588-613, 2014.
- 87 KUBICEK, C. P.; KUBICEK, E. M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 51-57, 2016. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.08.028
- 88 HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.
- 89 VILLARES, A. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40262, 2017. doi: 10.1038/srep40262.
- 90 EIBINGER, M. et al. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35929-38, 2014.
- 91 AGGER, J. W. et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6287-92, 2014.
- 92 CORRÊA, T. L. R. et al. An actinobacteria lytic polysaccharide monooxygenase acts on both cellulose and xylan to boost biomass saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 117, 2019.
- 93 FROMMHAGEN, M. et al. Boosting LPMO-driven lignocellulose degradation by polyphenol oxidase-activated lignin building blocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 121, 2017.
- 94 POLIZELI, M.L.T et al. Enzymes involved in the biodegradation of sugarcane biomass: challenges and perspectives. In: BUCKERIDGE, M. S.; DE SOUZA, A. P. (Ed.). **Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane**. Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p.55-79.
- 95 WAKIYAMA, M. et al. An extracellular endo-1,4-beta-xylanase from *Aspergillus japonicus*: purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 227-9, 2010.
- 96 NISHINARI, K. et al. 2.19 - Storage plant polysaccharides: xyloglucans, galactomannans, glucomannans. In: KAMERLING, H. (Ed.). **Comprehensive glycoscience**. Oxford: Elsevier, 2007. p.613-652.
- 97 QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotechnología Aplicada**, v. 28, n. 4, p. 205-215, 2011.

- 98 SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-28, 2003.
- 99 SMAALI, I. et al. Biocatalytic conversion of wheat bran hydrolysate using an immobilized GH43 beta-xylosidase. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 338-44, 2009.
- 100 WANG, X.; YAO, B.; SU, X. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3373, 2018.
- 101 KNOP, D. et al. Limits of versatility of versatile peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 14, p. 4070-4080, 2016.
- 102 LLORET, L. et al. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 3, p. 124-131, 2010.
- 103 FUKUDA, T. et al. Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 3, p. 704-706, 2001.
- 104 PARDO, I. et al. Development of chimeric laccases by directed evolution. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 12, p. 2978-2986, 2012.
- 105 LI, C. et al. Tracking localization and secretion of cellulase spatiotemporally and directly in living *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 200, 2019.
- 106 WANG, X. W. et al. Phylogenetic re-evaluation of *Thielavia* with the introduction of a new family Podosporaceae. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 155-252, 2019. doi: 10.1016/j.simyco.2019.08.002.
- 107 TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000.
- 108 SAMSON, R.; CRISMAN, M. J.; TANSEY, M. Observations on the thermophilous ascomycete *Thielavia terrestris*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 69, n. 3, p. 417-423, 1977.
- 109 SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 100-6, 2012.
- 110 CLUTTERBUCK, A. J. Sexual and parasexual genetics of *Aspergillus* species. In: BENNETT, J. W.; KLICH, M. A. (Ed.). *Aspergillus: biology and industrial applications*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. v. 23, p. 3-18.
- 111 ROY, B. P.; ARCHIBALD, F. Effects of kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1855-63, 1993.
- 112 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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

- 113 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- 114 SHAPIRO, A. L.; VIÑUELA, E.; MAIZEL JR, J. V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 815-820, 1967.
- 115 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- 116 VORUGANTI, S. et al. The anticancer drug AUY922 generates a proteomics fingerprint that is highly conserved among structurally diverse Hsp90 inhibitors. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 8, p. 3697-3706, 2013.
- 117 BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >. Acesso em: abril 2018
- 118 PROTEIN - NCBI. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> >. Acesso em: abril 2018.
- 119 PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v.8, n.10, p.785-6, 2011.
- 120 GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (Ed). **The proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, 2005, p. 571-607.
- 121 MEINKEN, J. et al. FunSecKB2: a fungal protein subcellular location knowledgebase. **Computational Molecular Biology**, v. 4, n. 4, p. 1-17, 2014. doi: 10.5376/cmb.2014.04.0007
- 122 ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3387-3395, 2017.
- 123 KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.
- 124 CARBON, S. et al. AmiGO: online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 2, p. 288-289, 2008.
- 125 SUPEK, F. et al. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21800, 2011.
- 126 DRASTICDATA. DrasticData. Disponível em: < <https://www.drasticdata.nl/index.htm> >. Acesso em: abril 2018.
- 127 ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274-279, 2012.

128 TONOLI, G. H. D. et al. Cellulose micro/nanofibres from eucalyptus kraft pulp: preparation and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 80-88, 2012.

129 DONOHOE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 913-25, 2008.

130 KUMAR, L. et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 201-208, 2012.

131 NISHIYAMA, Y. et al. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose 1(alpha), from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 47, p. 14300-14306, 2003.

132 NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose 1 beta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 31, p. 9074-9082, 2002.

133 LANGAN, P.; NISHIYAMA, Y.; CHANZY, H. A revised structure and hydrogen-bonding system in cellulose II from a neutron fiber diffraction analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 43, p. 9940-9946, 1999.

134 POLETTI, M. et al. Crystalline properties and decomposition kinetics of cellulose fibers in wood pulp obtained by two pulping processes. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 4, p. 679-685, 2011.

135 RAHIKAINEN, J. L. et al. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 270-8, 2013. doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.075.

136 HONG, J. et al. Bioseparation of recombinant cellulose-binding module-proteins by affinity adsorption on an ultra-high-capacity cellulosic adsorbent. **Analytica Chimica Acta**, v. 621, n. 2, p. 193-9, 2008.

137 ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

138 MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D200-D203, 2017.

139 FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279-D285, 2016.

140 _____. InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D190-D199, 2017.

141 LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41-41, 2013.

- 142 BROWN, M. E.; CHANG, M. C. Exploring bacterial lignin degradation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 1-7, 2014. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.11.015
- 143 GASPAR, Y. et al. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1-2, p. 161-176, 2001.
- 144 BATEMAN, A. et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158-D169, 2017.
- 145 LANGSTON, J. A. et al. Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 6, p. 802-12, 2012.
- 146 _____. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 7007-7015, 2011.
- 147 PHILLIPS, C. M. et al. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 12, p. 1399-406, 2011.
- 148 GARAJOVA, S. et al. Single-domain flavoenzymes trigger lytic polysaccharide monooxygenases for oxidative degradation of cellulose. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. doi: 10.1038/srep28276.
- 149 MATHIEU, Y. et al. Activities of secreted aryl alcohol quinone oxidoreductases from *Pycnoporus cinnabarinus* provide insights into fungal degradation of plant biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2411-2423, 2016.
- 150 VARNAI, A. et al. The Pyrroloquinoline-quinone-dependent pyranose dehydrogenase from coprinopsis cinerea drives lytic polysaccharide monooxygenase action. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 11, 2018. doi: 10.1128/AEM.00156-18.
- 151 FELBY, C. et al. Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalyzed oxidation of wood fibers from beech (*Fagus sylvatica*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 459-464, 1997.
- 152 CANNELLA, D. et al. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012. doi: 10.1186/1754-6834-5-26.
- 153 WANG, M.; LU, X. F. Exploring the synergy between cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* and cellulase from *Trichoderma reesei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00620.
- 154 FERRARI, A. R. et al. Discovery of a xylooligosaccharide oxidase from *Myceliophthora thermophila* C1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 45, p. 23709-23718, 2016.

155 IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; ERIKSSON, K. E. L. Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 101-106, 1998.

156 BEY, M. et al. Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes. **Microbial Cell Factories**, v. 10, 2011. doi: 10.1186/1475-2859-10-113

157 DALE, M. P. et al. Reversible inhibitors of beta-glucosidase. **Biochemistry**, v. 24, n. 14, p. 3530-3539, 1985.

158 NIHIRA, T. et al. Discovery of cellobionic acid phosphorylase in cellulolytic bacteria and fungi. **FEBS Letters**, v. 587, n. 21, p. 3556-3561, 2013.

159 LI, X. et al. Cellobionic acid utilization: from *Neurospora crassa* to *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, 2015. doi: 10.1186/s13068-015-0303-2

160 TOYAMA, D. et al. A novel β -glucosidase isolated from the microbial metagenome of Lake Poraquê (Amazon, Brazil). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): proteins and proteomics**, v. 1866, n. 4, p. 569-579, 2018

161 WATZLAWICK, H.; HERAVI, K. M.; ALTENBUCHNER, J. Role of the ganSPQAB operon in degradation of galactan by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 20, p. 2887-2896, 2016.

162 CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 445-476, 1996. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.445

163 VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263-275, 2009.

164 OSTERYOUNG, K. W. et al. Analysis of tomato polygalacturonase expression in transgenic tobacco. **Plant Cell**, v. 2, n. 12, p. 1239-1248, 1990.

165 PARENICOVA, L. et al. pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, v. 345, p. 637-644, 2000. doi: 10.1042/0264-6021:3450637.

166 BIELY, P. et al. *Trichoderma reesei* CE16 acetyl esterase and its role in enzymatic degradation of acetylated hemicellulose. **Biochimica et Biophysica Acta: general subjects**, v. 1840, n. 1, p. 516-525, 2014.

167 DAMASIO, A. R. L. et al. Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6759-6767, 2013.

168 SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263-289, 2010.

- 169 SANTOS, C. R. et al. Molecular mechanisms associated with xylan degradation by *Xanthomonas* plant pathogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 46, p. 32186-32200, 2014.
- 170 ZHOU, J. Y. et al. Improved LC-MS/MS spectral counting statistics by recovering low-scoring spectra matched to confidently identified peptide sequences. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 11, p. 5698-5704, 2010.
- 171 WILKENS, C. et al. GH62 arabinofuranosidases: Structure, function and applications. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 792-804, 2017.
- 172 KOSEKI, T. et al. Role of Two α -L-arabinofuranosidases in arabinoxylan degradation and characteristics of the encoding genes from shochu koji molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 232-241, 2003.
- 173 HURTADO-GUERRERO, R. et al. Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 13, p. 8461-8469, 2009.
- 174 GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology-SGM**, v. 158, p. 26-34, 2012. doi: 10.1099/mic.0.052613-0.
- 175 MOUYNA, I. et al. GH16 and GH81 family beta-(1,3)-glucanases in *Aspergillus fumigatus* are essential for conidial cell wall morphogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 1285-1293, 2016.
- 176 MOUYNA, I.; HARTL, L.; LATGE, J. P. Beta-1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00081.
- 177 LOPEZ-MONDEJAR, R. et al. The beta-N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. **FEBS Journal**, v. 276, n. 18, p. 5137-5148, 2009.
- 178 CABIB, E. et al. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 921-935, 2007.
- 179 _____. Assembly of the yeast cell wall Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29859-29872, 2008.
- 180 KITAGAKI, H. et al. Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1011-1022, 2002.
- 181 VINCK, A. et al. Hyphal differentiation in the exploring mycelium of *Aspergillus niger*. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 693-699, 2005.
- 182 PU, Y. Q.; ZIEMER, C.; RAGAUSKAS, A. J. CP/MAS C-13 NMR analysis of cellulase treated bleached softwood kraft pulp. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 5, p. 591-597, 2006.

183 RAGER, N. **File: How proteins are made NSF.jpg**. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:How_proteins_are_made_NSF.jpg>. Acesso em: setembro 2019.

184 GIBSON, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343, 2009.

185 CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 7, p. 2172-2175, 1989.

186 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069-6074, 1990.

187 MÜNCHEN, H. Z. **PEPF Protein expression and purification**. Disponível em: <<https://www.helmholtz-muenchen.de/pepf/protocols/cloning/index.html>>. Acesso em: agosto 2019.

188 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005.

189 PROTOCOLS. Disponível em: <<https://lnbio.cnpem.br/facilities/mass-spectrometry/sample-preparation/>>. Acesso em: novembro 2019.

190 ARAGAO, A. Z. et al. Novel processed form of syndecan-1 shed from SCC-9 cells plays a role in cell migration. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43521, 2012.

191 FAN, Y. et al. Cloning, expression and structural stability of a cold-adapted β -galactosidase from *Rahnella* sp. R3. **Protein Expression and Purification**, v. 115, p. 158-164, 2015. doi: 10.1016/j.pep.2015.07.001.

192 MCCLEARY, B. V. et al. Novel substrates for the measurement of endo-1,4- β -glucanase (endo-cellulase). **Carbohydrate Research**, v. 385, p. 9-17, 2014. doi: 10.1016/j.carres.2013.12.001

193 GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **Prediction of N-glycosylation sites in human proteins**. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>>. Acesso em: agosto 2019.

194 STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **EMBO Journal**, v. 32, n. 10, p. 1478-88, 2013.

195 SHIRAI, A. et al. Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 16, p. 10745-10752, 2008.

196 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses-a review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101-120, 2009.

- 197 WALLACE, B. Synchrotron radiation circular-dichroism spectroscopy as a tool for investigating protein structures. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 7, n. 5, p. 289-295, 2000.
- 198 STAHLBERG, J. **Glycoside hydrolase family 7**. Disponível em: < https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_7 >. Acesso em: fevereiro 2019.
- 199 FOLTA-STOGNIEW, E. Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance, and refractive index detectors. In: NEDELKOV, D.; NELSON, R. W. (Ed.). **New and emerging proteomic techniques**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p.97-112.
- 200 ZACHARIUS, R. M. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 148-152, 1969. doi: 10.1016/0003-2697(69)90383-2.
- 201 BAYER, E. A.; BENHUR, H.; WILCHEK, M. Analysis of proteins and glycoproteins on blots. **Methods in Enzymology**, v. 184, p. 415-427, 1990. doi: 10.1016/0076-6879(90)84301-V.
- 202 BROCKHAUSEN, I., STANLEY, P. O-GalNAc glycans. In: VARKI A., et al. (Ed.). **Essentials of glycobiology**. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- 203 IWASE, H.; HOTTA, K. Release of O-linked glycoprotein glycans by endo- α -N-acetylgalactosaminidase. In: HOUNSELL, E. F. (Ed.). **Glycoprotein analysis in biomedicine**. Totowa, NJ: Springer, 1993. p.151-159.
- 204 UCHIDA, Y.; TSUKADA, Y.; SUGIMORI, T. Enzymatic properties of neuraminidases from *Arthrobacter ureafaciens*. **The Journal of Biochemistry**, v. 86, n. 5, p. 1573-1585, 1979.
- 205 WILKINS, P. P.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18732-18742, 1996.
- 206 HÄRRD, K. et al. The carbohydrate chains of the β subunit of human chorionic gonadotropin produced by the choriocarcinoma cell line BeWo: novel O-linked and novel bisecting-GlcNAc-containing N-linked carbohydrates. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, n. 2, p. 785-798, 1992.
- 207 WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.
- 208 SIGEL, R. K.; PYLE, A. M. Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 1, p. 97-113, 2007.
- 209 SMITH, C. A.; RAYMENT, I. X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, v. 35, n. 17, p. 5404-17, 1996.

- 210 SAGI, I. et al. The penta-coordinated vanadium formed on binding of ADP-vanadate-Mg (II) to CF₁-ATPase functions as a transition-state inhibitor. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 6, n. 3, p. 409-410, 1999.
- 211 KESVATERA, T. et al. Focusing of the electrostatic potential at EF-hands of calbindin D(9k): titration of acidic residues. **Proteins**, v. 45, n. 2, p. 129-35, 1 2001.
- 212 HARRIS, T. K.; TURNER, G. J. Structural basis of perturbed pK_a values of catalytic groups in enzyme active sites. **IUBMB Life**, v. 53, n. 2, p. 85-98, 2002.
- 213 SCHWEINS, T. et al. The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn²⁺ versus Mg²⁺. **Journal of Molecular Biology**, v. 266, n. 4, p. 847-56, 1997.
- 214 MAROUFI, B. et al. Structural studies of hen egg-white lysozyme dimer: comparison with monomer. **Biochimica et Biophysica Acta: proteins and proteomics**, v. 1784, n. 7-8, p. 1043-1049, 2008.
- 215 WITHERS, S. **Glycoside hydrolase family 10**. Disponível em: < https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_10 >. Acesso em: junho 2019.
- 216 FUSHINOBU, S. **Glycoside hydrolase family 54**. Disponível em: < https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_54 >. Acesso em: junho 2019.
- 217 CARBOHYDRATE active enzymes database. Disponível em: < <http://www.cazy.org/> >. Acesso em: julho 2019.
- 218 KANEKO, S. et al. Purification and substrate specificities of two α -L-arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 4021-4027, 1998.
- 219 SAHA, B. C. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 403-423, 2000.
- 220 LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D490-D495, 2013.
- 221 PITSON, S. M.; VORAGEN, A. G.; BELDMAN, G. Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. **FEBS Letters**, v. 398, n. 1, p. 7-11, 1996.
- 222 MIYANAGA, A. et al. Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44907-44914, 2004.
- 223 VINCENT, P. et al. New α -L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the abfB gene and characterization of the enzyme. **Biochemical Journal**, v. 322, n. 3, p. 845-852, 1997.

- 224 ROMBOUTS, F. et al. The arabinanases of *Aspergillus niger*—purification and characterisation of two α -L-arabinofuranosidases and an endo-1,5- α -l-arabinanase. **Carbohydrate Polymers**, v. 9, n. 1, p. 25-47, 1988.
- 225 MITCHELL, A. L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D351-D360, 2018.
- 226 EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D427-D432, 2018.
- 227 NOGAWA, M. et al. An alpha-L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* containing a noncatalytic xylan-binding domain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3964-3968, 1999.
- 228 DI TOMMASO, P. et al. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. W13-W17, 2011. doi: 10.1093/nar/gkr245
- 229 UNIPROT CONSORTIUM. The universal protein resource (UniProt). **Nucleic acids Research**, v. 36, p. D190-D195, 2008. doi: 10.1093/nar/gkm895
- 230 LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D302-D305, 2011.
- 231 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, Pt 1, p. 12-21, 2010.
- 232 PEI, J.; KIM, B.-H.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 7, p. 2295-2300, 2008.
- 233 DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter on Protein Crystallography**, v. 40, n. 1, p. 82-92, 2002.
- 234 DE WET, B. J. M. et al. Characterization of a family 54 α -L-arabinofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 975-983, 2008.
- 235 KARLIN, S.; BURGE, C. Trinucleotide repeats and long homeopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 4, p. 1560-1565, 1996.
- 236 KUMAR, A. S.; SOWPATI, D. T.; MISHRA, R. K. Single amino acid repeats in the proteome world: structural, functional, and evolutionary insights. **PloS One**, v. 11, n. 11, p. e0166854, 2016.
- 237 DUNKER, A. K. et al. Intrinsically disordered protein. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 19, n. 1, p. 26-59, 2001.

238 TOMPA, P.; FERSHT, A. **Structure and function of intrinsically disordered proteins**. Miami: Chapman and Hall/CRC, 2009.

239 LEIKAUF, G. D. et al. Mucin apoprotein expression in COPD. **Chest**, v. 121, n. 5, p. 166S-182S, 2002.

240 ECKER, M. et al. O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. **EMBO Reports**, v. 4, n. 6, p. 628-632, 2003.

241 MEWIS, K. et al. Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1686-1692, 2016.

242 HEMSWORTH, G. R. et al. Structural dissection of a complex *Bacteroides ovatus* gene locus conferring xyloglucan metabolism in the human gut. **Open Biology**, v. 6, n. 7, p. 160142, 2016.

243 BRÜX, C. et al. The structure of an inverting GH43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 1, p. 97-109, 2006.

244 JORDAN, D. B. β -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium*: catalyzed reactions with natural and artificial substrates. In: ADNEY, W.S.; MCMILLAN, J.D.; MIELENZ, J.; KLASSON, K.T. (Ed.). **Biotechnology for fuels and chemicals**. New Jersey: Humana Press, 2007. p.257-269.

245 LAGAERT, S. et al. β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 316-332, 2014.

246 HUY, N. D. et al. Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 152-159, 2013.

247 GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 444-455, 2010.

248 SØRENSEN, H. R. et al. A novel GH43 α -L-arabinofuranosidase from *Humicola insolens*: mode of action and synergy with GH51 α -L-arabinofuranosidases on wheat arabinoxylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 850-861, 2006.

249 GRÉPINET, O.; CHEBROU, M.; BÉGUIN, P. Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (xynZ) of *Clostridium thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 10, p. 4582-4588, 1988.

250 HAAS, H. et al. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): general subjects**, v. 1117, n. 3, p. 279-286, 1992.

251 SHARECK, F. et al. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. **Gene**, v. 107, n. 1, p. 75-82, 1991.

- 252 SIGRIST, C. J. A. et al. New and continuing developments at PROSITE. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D344-D347, 2012.
- 253 ANDREWS, S. R. et al. Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10: tyrosine 87 and leucine 314 play a pivotal role in discriminating between glucose and xylose binding in the proximal active site of pseudomonas cellulosa xylanase 10a. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 23027-23033, 2000.
- 254 NOTENBOOM, V. et al. Exploring the cellulose/xylan specificity of the β -1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation. **Biochemistry**, v. 37, n. 14, p. 4751-4758, 1998.
- 255 WHITE, A. et al. Crystallographic observation of a covalent catalytic intermediate in a β -glycosidase. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 2, p. 149, 1996.
- 256 DUCROS, V. et al. Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10 structural and kinetic analysis of the *Streptomyces lividans* xylanase 10A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 23020-23026, 2000.
- 257 PELL, G. et al. The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 9597-9605, 2004
- 258 CHARNOCK, S. J. et al. The topology of the substrate binding clefts of glycosyl hydrolase family 10 xylanases are not conserved. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 48, p. 32187-32199, 1998.
- 259 PRICE, K. et al. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 27-135, 1987.
- 260 ROLDÁN-ARJONA, T.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; RUIZ-RUBIO, M. Tomatinase from fusarium oxysporum f. sp. lycopersici defines a new class of saponinases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 10, p. 852-861, 1999.
- 261 FRIEDMAN, M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9534-9550, 2013.
- 262 SEIPKE, R. F.; LORIA, R. *Streptomyces scabies* 87-22 possesses a functional tomatinase. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 23, p. 7684, 2008.
- 263 KAUP, O. et al. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 10, p. 1090-1098, 2005.
- 264 MORITA, M. Polysaccharides of soybean seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 626-630, 1965.
- 265 RALET, M.-C. et al. Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 263, n. 2, p. 227-241, 1994.

266 COLQUHOUN, I. J. et al. Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 263, n. 2, p. 243-256, 1994.

267 HUISMAN, M. M. et al. The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. **Carbohydrate Research**, v. 330, n. 1, p. 103-114, 2001.

268 KNOX, J. The extracellular matrix in higher plants. 4. developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 11, p. 1004-1012, 1995.

269 PONDER, G.; RICHARDS, G. Arabinogalactan from Western larch, part III: alkaline degradation revisited, with novel conclusions on molecular structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 1997.

270 SAKAMOTO, T.; ISHIMARU, M. Peculiarities and applications of galactanolytic enzymes that act on type I and II arabinogalactans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5201-5213, 2013.

271 SAKAMOTO, T. et al. Characterization of *Fusarium oxysporum* beta-1,6-galactanase, an enzyme that hydrolyzes larch wood arabinogalactan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 3109-3112, 2007.

272 HORTLING, B.; TAMMINEN, T.; PEKKALA, O. Effects of delignification on residual lignin-carbohydrate complexes in normal pine wood and pine wood enriched in compression wood. 1. Kraft pulping. **Nordic Pulp & Paper Research Journal**, v. 16, n. 3, p. 219-224, 2001.

273 LUONTERI, E. et al. Purification and characterization of *Aspergillus* β-D-galactanases acting on β-1, 4- and β-1, 3/6-linked arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 2, p. 155-168, 2003.

274 HWANG, J.; PYUN, Y.; KOKINI, J. Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. **Food Hydrocolloids**, v. 7, n. 1, p. 39-53, 1993.

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

276 TWOMEY, L. et al. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 108, n. 1-4, p. 71-82, 2003.

277 LAZAN, H. et al. Papaya β-galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 847-853, 2004.

278 YANG, C.-R.; TANAKA, O. (Ed.). **Advances in plant glycosides, chemistry and biology**. Kunming: Elsevier, 1999. v.6.

279 VIBORG, A. H. et al. Discovery of α -l-arabinopyranosidases from human gut microbiome expands the diversity within glycoside hydrolase family 42. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 51, p. 21092-21101, 2017.

280 FERREIRA, L. R. et al. Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 526-535, 2013.

281 KŘEN, V. Glycoside vs. aglycon: the role of glycosidic residue in biological activity. In: FRASER-REID, B. O. et al (Ed.). **Glycoscience: chemistry and chemical biology**. Berlin: Springer, 2008. p.2589-2644.

282 GONZÁLEZ-POMBO, P. et al. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidases. **Food Chemistry**, v. 143, p. 185-191, 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.107.

283 SAJEDI, R. H. et al. Purification, characterization, and structural investigation of a new moderately thermophilic and partially calcium-independent extracellular alpha-amylase from *Bacillus* sp TM1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 41-50, 2004.

284 XU, J. et al. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 35, 2015.