



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriela Salvador de Amo

**Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de
Myceliophthora heterothallica F.2.1.4**

São José do Rio Preto
2018

Gabriela Salvador de Amo

**Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de
Myceliophthora heterothallica F.2.1.4**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
Coorientadores: Profa. Dra. Eleni Gomes e Dr. Luciano Takeshi Kishi

São José do Rio Preto
2018

Amo, Gabriela Salvador de.

Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 / Gabriela Salvador de Amo. – São José do Rio Preto, 2018

153 f.: il., tabs.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientador: Eleni Gomes

Coorientador: Luciano Takeshi Kishi

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Xilanases. 4. *Myceliophthora heterothallica* I. Título.

CDU – 574.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriela Salvador de Amo

**Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de
Myceliophthora heterothallica F.2.1.4**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Henrique Ferreira
UNESP – Câmpus de Rio Claro

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
USP – Câmpus de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins
UEMG – Câmpus de Frutal

São José do Rio Preto
13 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pela oportunidade, confiança e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus coorientadores, professora Dra. Eleni Gomes, pelos ensinamentos, disponibilidade e auxílio durante a execução do projeto, e Dr. Luciano Takeshi Kishi, pela imensa contribuição nas análises de bioinformática.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, pelo incentivo à qualificação e concessão de afastamento para dedicação integral ao doutorado ao longo deste último ano.

A todos os colegas de laboratório que me auxiliaram, em especial à Dra. Carolina Bezerra Bussoli, por todos os ensinamentos e pela valiosa contribuição desde o início do projeto, e ao Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva, sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos.

A Lorena, Carlos Eduardo, Eduardo, Cíntia, Raísa, Pâmela, Vanessa, Jéssica e todos os demais colegas pela prazerosa convivência no laboratório.

A minha família, pela compreensão, apoio e incentivo, principalmente aos meus pais, Alder e Rosângela e ao meu marido, Fernando.

A todos os professores e funcionários da UNESP que colaboraram direta e indiretamente para a execução deste trabalho, especialmente ao professor Dr. Henrique Ferreira, pela colaboração durante a etapa inicial do projeto. Muito obrigada a todos!

RESUMO

Xilanases são enzimas que apresentam diversificada aplicação industrial, justificando-se a busca por organismos produtores, bem como efetuar sua caracterização bioquímica e testes de aplicação. A expressão heteróloga destas proteínas é uma ferramenta interessante, pois pode permitir a produção enzimática em larga escala e com uso de meios de cultura simples e de baixo custo. Neste trabalho, um gene codificador de xilanase, pertencente à família GH11, do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* foi isolado via RT-PCR e expresso heterologamente em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. Foi feita uma caracterização bioquímica das enzimas recombinantes purificadas, que apresentaram massa molecular próxima a 25 kDa. A temperatura e pH ótimos da enzima expressa em *E. coli* foram 55 °C e 6,0, respectivamente. A xilanase recombinante expressa em *P. pastoris*, por sua vez, apresentou temperatura ótima de 70 °C e pH ótimo de 6,5. Ambas apresentaram estabilidade em amplo intervalo de pH, porém, diferiram consideravelmente quanto à termoestabilidade, a qual foi superior na enzima expressa em sistema eucarioto. Do ponto de vista industrial, as enzimas possuem características interessantes, tais como elevada especificidade pelo substrato xilana e tolerância a diversos íons e reagentes. Também foi executada uma análise do transcriptoma de *M. heterothallica*, de modo que diversas sequências codificadoras de enzimas lignocelulolíticas, além de xilanases, foram identificadas. Esses dados certamente contribuirão para estudos futuros de clonagem e expressão heteróloga de enzimas degradadoras de biomassa vegetal.

Palavras-chave: biotecnologia, expressão heteróloga, *Myceliophthora heterothallica*, xilanase.

ABSTRACT

Xylanases are enzymes that present diverse industrial applications, justifying the search for producing organisms, as well as to perform their biochemical characterization and application tests. The heterologous expression of these proteins may be interesting as it may allow the enzymatic production in large scale using simple and low cost culture media. In this work, a xylanase encoding gene, belonging to the GH11 family of the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* was isolated by RT-PCR and expressed heterologously in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. A biochemical characterization of the purified recombinant enzymes (Mw around 25 kDa) was performed. The optimal temperature and pH of the enzyme expressed in *E. coli* were 55 °C and 6,0, respectively. The recombinant enzyme expressed in *P. pastoris*, on the other hand, had an optimal temperature of 70 °C and an optimum pH of 6,5. The two enzymes showed stability at a wide pH range, but differed significantly in thermostability, which was higher in the enzyme expressed in eukaryotic system. From the industrial point of view, the enzymes have interesting characteristics, such as high specificity for xylan and tolerance to several ions and reagents. An analysis of the *M. heterothallica* transcriptome was also performed, so that several sequences encoding lignocellulolytic enzymes, in addition to xylanases, were identified. These data will certainly contribute to future studies of cloning and heterologous expression of enzymes degrading plant biomass.

Keywords: biotechnology, heterologous expression, *Myceliophthora heterothallica*, xylanase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Arranjo da parede celular vegetal	21
Figura 2. Estrutura molecular da celulose	22
Figura 3. Unidades formadoras do polímero lignina	23
Figura 4. Monômeros presentes em hemiceluloses	25
Figura 5. Estrutura da xilana com diferentes substituições da cadeia lateral	26
Figura 6. Algumas enzimas envolvidas na degradação da xilana	29
Figura 7. Mecanismo catalítico proposto para xilanases da família GH11	31
Figura 8. Árvore consensual parcimoniosa da região ITS1 do gênero	35

Myceliophthora

CAPÍTULO II

Figura 1. Etapas principais para a promoção da expressão heteróloga de uma proteína	49
Figura 2. Fluxograma das etapas seguidas para isolamento da sequência de interesse	53
Figura 3. Representação esquemática do inserto ligado ao vetor pET-28a(+)	54
Figura 4. Amostra de RNA extraída com uso do reagente Trizol	65
Figura 5. Produto de amplificação obtido com o conjunto de iniciadores 1	65
Figura 6. Amplificação do gene da xilanase presente no vetor pGEM-T em transformantes de <i>E. coli</i> , linhagem DH5 α	66
Figura 7. Alinhamento da sequência obtida (Mh) com sequência codificadora de xilanase do fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> (Mt)	67
Figura 8. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo gene obtido (Mh), com sequência de aminoácidos de uma xilanase do fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> (Mt)	68
Figura 9. Comparação da sequência de aminoácidos obtida com sequências disponíveis no banco de dados GenBank, NCBI	68
Figura 10. Análise dos sítios de restrição encontrados na sequência de nucleotídeos isolada	69
Figura 11. Predição de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos codificada pelo gene obtido no presente estudo	69
Figura 12. Mapa do vetor de expressão (pET-28a_XylMh)	70

Figura 13. Eletroforese demonstrando a digestão do vetor de expressão com as enzimas <i>NcoI</i> e <i>NotI</i>	71
Figura 14. Análise de pellets celulares lisados por aquecimento em diferentes períodos de indução da expressão da proteína recombinante	72
Figura 15. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para mostrar os níveis de expressão das proteínas recombinantes na fração insolúvel (I) e solúvel (S) em diferentes temperaturas de indução	73
Figura 16. Perfil de eluição da amostra em cromatografia de afinidade	74
Figura 17. Análise eletroforética (SDS-PAGE) das amostras após etapas de purificação	75
Figura 18. Perfil de eluição da amostra em cromatografia de gel filtração	75
Figura 19. Análise eletroforética (SDS-PAGE) da xilanase recombinante após remoção da His-tag	77
Figura 20. Determinação do período de incubação ideal para cálculo da velocidade inicial de reação da xilanase recombinante	78
Figura 21. Efeito do pH na atividade xilanolítica	79
Figura 22. Efeito da temperatura na atividade xilanolítica em tampão MES, pH 6,0	81
Figura 23. Efeito do pH na estabilidade de r-ec-XylMh com cauda de histidina após 24 h de incubação a 4 °C	82
Figura 24. Efeito da temperatura na estabilidade de r-ec-XylMh com His-tag	83
Figura 25. Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase recombinante com His-tag em presença de glicerol 50 %	85
Figura 26. Atividade enzimática residual após 24 horas de armazenamento em diferentes temperaturas na presença e ausência de glicerol a 50 %	90
Figura 27. Gráfico de Michaelis-Menten de r-ec-XylMh	92
Figura 28. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da xilanase recombinante r-ec-XylMh	93
Figura 29. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da xilanase recombinante	95
Figura 30. Gráfico de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(D)}$) da xilanase recombinante r-ec-XylMh	95
Figura 31. Temperatura de fusão da xilanase r-ec-XylMh	97

CAPÍTULO III

Figura 1. Representação esquemática do inserto ligado ao vetor pPICZαA	107
Figura 2. Mapa do vetor de expressão para <i>P. pastoris</i> (pPICZαA_XylMh)	111
Figura 3. Eletroforese demonstrando a digestão do vetor pPICZαA_XylMh com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i>	111
Figura 4. Colônias de <i>P. pastoris</i> em meio seletivo após transformação pelo método químico	112
Figura 5. Produtos de amplificação obtidos após PCR de colônia com os iniciadores AOX1 5' e 3'	112
Figura 6. Colônias inoculadas em meio YNB contendo xilana - RBB	113
Figura 7. Produção da xilanase recombinante (U mL ⁻¹) por <i>P. pastoris</i> cultivada em meio BMMY em diferentes períodos após a indução	114
Figura 8. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) do sobrenadante do cultivo de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY para mostrar a expressão da proteína recombinante após diferentes períodos de indução	115
Figura 9. Perfil de eluição da amostra em cromatografia de gel filtração	116
Figura 10. Xilanase recombinante r-pp-XylMh após filtração em gel em resina Superdex 75	116
Figura 11. Determinação do período de incubação ideal para cálculo da velocidade inicial de reação da xilanase recombinante expressa em <i>P. pastoris</i>	117
Figura 12. Efeito do pH na atividade xilanolítica da enzima r-pp-XylMh	118
Figura 13. Efeito do pH na estabilidade da xilanase recombinante após 24 h de incubação a 4 °C	119
Figura 14. Efeito da temperatura na atividade xilanolítica da enzima expressa em <i>P. pastoris</i>	120
Figura 15. Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase r-pp-XylMh	121
Figura 16. Atividade enzimática residual após 24 horas de armazenamento em diferentes temperaturas na presença e ausência de glicerol a 50 %	126
Figura 17. Gráfico de Michaelis-Menten da xilanase recombinante	128
Figura 18. Gráfico com o ajuste dos resultados experimentais à equação de Hill	129
Figura 19. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (<i>E_a</i>) e temperatura ótima da xilanase recombinante r-pp-XylMh	130

Figura 20. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da xilanase r-pp-XylMh	131
Figura 21. Gráfico de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{ad}) da xilanase r-pp-XylMh	131
Figura 22. Temperatura de fusão da xilanase r-pp-XylMh	133
CAPÍTULO IV	
Figura 1. Eletroferograma da amostra de RNA selecionada para construção da biblioteca e sequenciamento do transcriptoma	143
Figura 2. Perfil Bioanalyzer para verificação dos tamanhos dos fragmentos da biblioteca	144
Figura 3: Gráfico dos valores brutos de qualidade do sequenciamento de <i>M. heterothallica</i>	145
Figura 4. Número de ORFs anotadas por família de glicosil hidrolases (GH)	147

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Exemplos e principais características de xilanases de origem fúngica expressas de maneira heteróloga em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	37
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Conjuntos de iniciadores utilizados para a obtenção do gene de interesse	52
--	----

Tabela 2. Tabela de purificação da xilanase recombinante expressa em <i>E. coli</i>	76
---	----

Tabela 3. Efeito de íons clorados na concentração de 1 e 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade xilanolítica da enzima r-ec-XylMh	86
--	----

Tabela 4. Efeito de reagentes e solventes (concentração: 10 mmol L ⁻¹) sobre a atividade xilanolítica de r-ec-XylMh	87
---	----

Tabela 5. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade xilanolítica da enzima r-ec-XylMh com 10 minutos e 24 horas de incubação	89
---	----

Tabela 6. Atividade específica da xilanase recombinante em diferentes substratos	91
--	----

Tabela 7. Coeficientes de temperatura (Q ₁₀) da xilanase r-ec-XylMh estimados com base no gráfico de Arrhenius	94
--	----

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos da inativação térmica irreversível da xilanase recombinante r-ec-XylMh	95
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Tabela de purificação da xilanase recombinante expressa em <i>P. pastoris</i>	116
---	-----

Tabela 2. Efeito de íons clorados na concentração de 1 e 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade da enzima expressa em <i>P. pastoris</i>	123
---	-----

Tabela 3. Efeito de reagentes e solventes (concentração: 10 mmol L ⁻¹) sobre a atividade xilanolítica da enzima recombinante expressa em <i>P. pastoris</i>	124
---	-----

Tabela 4. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade de r-pp-XylMh com 10 minutos e 24 horas de incubação	125
---	-----

Tabela 5. Atividade específica da xilanase r-pp-XylMh em diferentes substratos	127
--	-----

Tabela 6. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) da xilanase r-pp-XylMh	130
Tabela 7. Parâmetros termodinâmicos da inativação térmica irreversível da xilanase r-pp-XylMh	131
CAPÍTULO IV	
Tabela 1. Dados da biblioteca transcriptômica de <i>M. heterothallica</i> obtidos após sequenciamento, montagem e anotação de sequências	145
Tabela 2. Número de ORFs anotadas por classes e famílias disponíveis na plataforma CAZy	146

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNS	Ácido 3, 5 - Dinitrossalicílico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
r-ec-XylMh	Xilanase recombinante expressa em <i>E. coli</i>
r-pp-XylMh	Xilanase recombinante expressa em <i>P. pastoris</i>
GH	Glicosil Hidrolase
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetro
OD	Densidade Óptica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	potencial Hidrogeniônico
pI	ponto Isoelétrico
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
U	Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Introdução e Revisão Bibliográfica	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Biomassa lignocelulósica	21
2.2. Xilana	25
2.3. Enzimas do complexo xilanolítico	27
2.4. Xilanases	30
2.4.1. Classificação	30
2.4.2. Aplicações industriais	32
2.4.3. Fungos filamentosos como fontes de xilanases	34
2.5. Expressão heteróloga de enzimas	36
3. OBJETIVOS PRINCIPAIS	39
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO II - Isolamento de gene codificador de xilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i>, via RT-PCR, e expressão heteróloga do mesmo em <i>Escherichia coli</i>	47
1. INTRODUÇÃO	49
2. OBJETIVOS	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1. Linhagens de microrganismos	50
3.2. Extração de RNA e obtenção da sequência de interesse	51
3.3. Análise da sequência codificadora de xilanase	53
3.4. Obtenção do plasmídeo de expressão em <i>E. coli</i>	54
3.5. Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo pET-28a_XylMh	54
3.6. Ensaio de expressão	55
3.7. Teste de solubilidade	55
3.8. Produção da xilanase recombinante e purificação da enzima	56
3.9. Remoção da cauda de histidina	57
3.10. Caracterização bioquímica da enzima	57
3.10.1. Determinação do tempo de incubação	57
3.10.2. Determinação do pH ótimo	58
3.10.3. Determinação da temperatura ótima	58
3.10.4. Estabilidade em relação ao pH	59

3.10.5. Estabilidade térmica	59
3.10.6. Efeito de íons e reagentes sobre a atividade enzimática	60
3.10.7. Efeito de compostos fenólicos	60
3.10.8. Avaliação das melhores condições de armazenamento	61
3.10.9. Especificidade em relação ao substrato	61
3.10.10. Cinética enzimática	62
3.11. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Extração de RNA e verificação da qualidade das amostras	64
4.2. Isolamento do gene codificador de xilanase	65
4.3. Análise da sequência obtida	66
4.4. Obtenção do vetor de expressão e transformação	70
4.5. Ensaio de expressão da proteína recombinante	71
4.6. Análise da solubilidade da proteína recombinante	72
4.7. Purificação da proteína	74
4.8. Remoção da cauda de histidina	76
4.9. Caracterização bioquímica da enzima recombinante	77
4.9.1. Determinação do tempo de incubação	77
4.9.2. Efeito da cauda de histidina na ação enzimática	78
4.9.3. Determinação do pH ótimo	78
4.9.4. Determinação da temperatura ótima	80
4.9.5. Estabilidade em relação ao pH	82
4.9.6. Estabilidade térmica	83
4.9.7. Efeito de íons	86
4.9.8. Efeito de reagentes e solventes	87
4.9.9. Efeito de compostos fenólicos	88
4.9.10. Análise das condições de armazenamento	90
4.9.11. Especificidade em relação ao substrato	91
4.9.12. Cinética enzimática	92
4.10. Análise da termoestabilidade da xilanase recombinante r-ec-XylMh	93
5. CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98

CAPÍTULO III - Expressão heteróloga de xilanase de <i>Myceliophthora</i> <i>heterothallica</i> em <i>Pichia pastoris</i>	103
1. INTRODUÇÃO	105
2. OBJETIVOS	106
3. MATERIAL E MÉTODOS	106
3.1. Linhagens de microrganismos	106
3.2. Obtenção do plasmídeo de expressão em <i>Pichia pastoris</i>	106
3.3. Transformação de <i>Pichia pastoris</i> com o plasmídeo pPICZ α A_XylMh	107
3.4. Confirmação da transformação de <i>P. pastoris</i>	108
3.5. Análise de transformantes	108
3.6. Expressão da xilanase recombinante em meio líquido	109
3.7. Purificação da enzima recombinante	109
3.8. Caracterização bioquímica da enzima	110
3.9. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível	110
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4.1. Obtenção do vetor de expressão e transformação	110
4.2. Análise de transformantes	113
4.3. Expressão da xilanase recombinante e purificação da enzima	113
4.4. Caracterização bioquímica da enzima recombinante	117
4.4.1. Determinação do tempo de incubação	117
4.4.2. Determinação do pH ótimo e estabilidade em relação ao pH	117
4.4.3. Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade	119
4.4.4. Efeito de íons	122
4.4.5. Efeito de reagentes e solventes	123
4.4.6. Efeito de compostos fenólicos	124
4.4.7. Análise das condições de armazenamento	126
4.4.8. Especificidade em relação ao substrato	126
4.4.9. Cinética enzimática	127
4.5. Análise da termoestabilidade da xilanase recombinante r-pp-XylMh	129
5. CONCLUSÕES	134
REFERÊNCIAS	135

CAPÍTULO IV - Análise do transcriptoma de <i>Myceliophthora heterothallica</i>	138
F.2.1.4, via RNA-seq, para prospecção de genes codificadores de enzimas do complexo lignocelulolítico	
1. INTRODUÇÃO	140
2. OBJETIVO	141
3. MATERIAL E MÉTODOS	141
3.1. Extração de RNA	141
3.2. Construção da biblioteca e sequenciamento do transcriptoma	141
3.3. Análises de bioinformática	142
3.4. Anotação funcional dos transcritos	142
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
4.1. Controle de qualidade das amostras de RNA	143
4.2. Construção da biblioteca transcriptômica	143
4.3. Sequenciamento da biblioteca transcriptômica	144
4.4. Identificação de enzimas ativas em carboidratos	146
5. CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS	150
CONCLUSÕES GERAIS	152
ANEXO 1	153

CAPÍTULO I

Introdução e Revisão Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO

Xilanases são enzimas hidrolíticas que clivam aleatoriamente as ligações β -1,4 do polissacarídeo xilana, principal componente da hemicelulose e um dos principais constituintes da parede celular vegetal (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Em conjunto com celulases e pectinases, as xilanases são responsáveis por cerca de 20 % do mercado mundial de enzimas, uma vez que apresentam uma diversificada aplicação industrial, incluindo a produção de alimentos, medicamentos, adoçantes, solventes, combustíveis e ainda, o branqueamento da polpa de papel (HO, 2018; SHARMA; KUMAR, 2013; WALIA et al., 2017). Dada a importância destas enzimas, justifica-se a busca por organismos produtores, bem como a purificação e a caracterização das mesmas.

As xilanases são produzidas por diversos organismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários, algas, crustáceos, insetos, moluscos e sementes de plantas terrestres. Entre as fontes microbianas, destacam-se os fungos filamentosos, pois estes produzem xilanases extracelulares e em níveis mais elevados que os observados em leveduras e bactérias (MÄKELÄ; DONOFRIO; DE VRIES, 2014; POLIZELI, et al., 2005). Os fungos termofílicos têm atraído especial atenção, visto que as enzimas produzidas por estes organismos podem apresentar maior termoestabilidade, permitindo a sacarificação da biomassa polissacarídica em temperaturas mais elevadas e reduzindo o tempo de reação e a viscosidade do substrato (BERKA et al., 2011).

Embora a síntese de xilanases ocorra em maior quantidade em fungos do que em outros organismos, nem sempre a expressão ocorre em níveis satisfatórios para aplicação comercial, a qual requer uma boa relação custo/benefício, resultante de uma produção rápida e em larga escala, com uso de substratos simples e baratos

(LONSANE et al., 1985). Além disso, a purificação e caracterização de enzimas de interesse podem ser complexas devido à presença de isoenzimas ou outras proteínas que apresentem massa molecular, hidrofobicidade e ponto isoelétrico similares.

Neste contexto, a clonagem e a expressão de genes codificadores de enzimas em um sistema heterólogo se tornam vantajosas. O fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 produz enzimas que atuam na degradação da biomassa vegetal e configura-se como uma espécie promissora para a prospecção de enzimas lignocelulolíticas, incluindo xilanases, que possam ser expressas heterologicamente em leveduras e/ou bactérias.

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica que pode ser geneticamente modificada para produzir enzimas em escala industrial e diversos casos de expressão de proteínas já foram descritos com uso deste microrganismo (KARNAOURI et al., 2013; LI et al., 2018). A expressão heteróloga de proteínas também tem sido bem sucedida utilizando-se como hospedeiro a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, que apresenta como vantagens rápido crescimento, uso de meios de cultivo simples e baratos e linhagens bem caracterizadas (REDDI; BHATTACHARYA; KUMAR, 2002; TANG et al., 2017).

Neste trabalho, um gene codificador de xilanase de *M. heterothallica* foi isolado via RT-PCR, clonado e expresso heterologicamente em *E. coli* e *P. pastoris*, tendo sido realizadas a purificação e caracterização bioquímica das enzimas recombinantes.

Ao longo do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, também surgiu a oportunidade de realização de um estudo do transcriptoma de *M. heterothallica*, via RNA-seq, de modo que diversas sequências codificadoras de enzimas envolvidas com a degradação da biomassa vegetal puderam ser identificadas. Os resultados

obtidos através desta análise permitirão estudos futuros de expressão heteróloga de diversas outras enzimas do complexo lignocelulolítico.

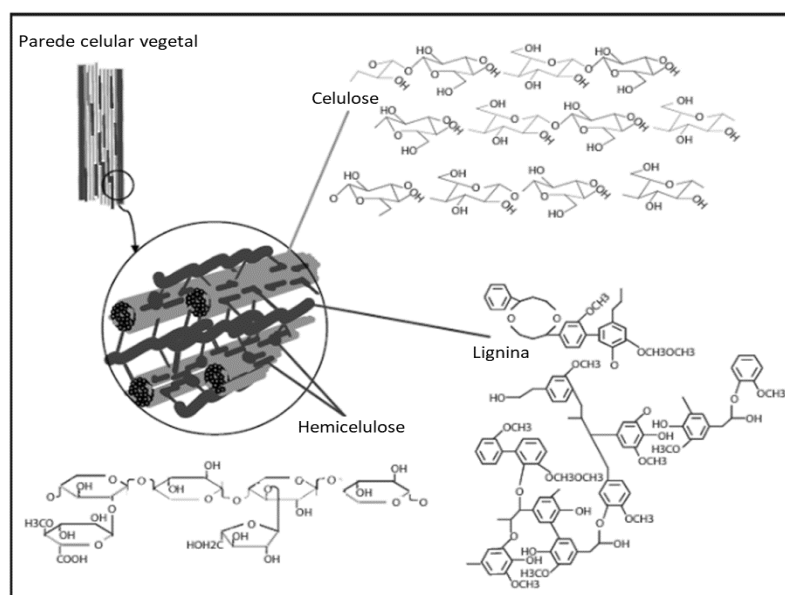
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é um recurso amplamente disponível na natureza, com produção global estimada em 100 bilhões de toneladas por ano. Trata-se de uma fonte de carbono renovável, com potencial para produção de calor, combustíveis, fertilizantes, solventes, produtos farmacêuticos, dentre outros (SHELDON, 2014).

É composta majoritariamente pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, os quais unem-se por ligações covalentes e não covalentes, formando uma complexa estrutura (figura 1). A proporção desses polímeros nas diferentes espécies vegetais é variável, sendo a celulose o componente principal (35 a 50 %), seguido pela hemicelulose (20 a 35 %) e pela lignina (10 a 25 %). Proteínas, lipídeos, extrativos e cinzas compõem a fração remanescente da biomassa vegetal (KUMAR et al., 2009).

Figura 1. Arranjo da parede celular vegetal.

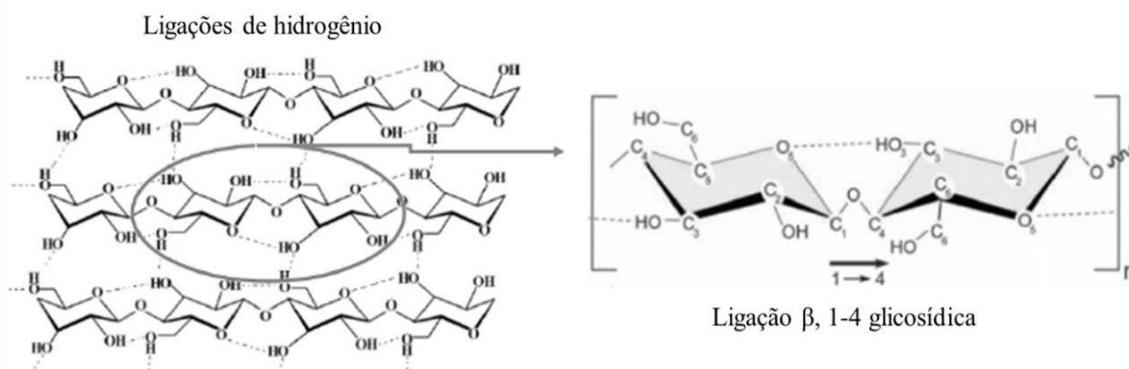


Fonte: adaptado de <http://www.biofuel.webgarden.com/sections/blog/pictures-for-lignocellulose>.

A celulose, polissacarídeo mais abundante do planeta, é um composto linear e insolúvel, formado por resíduos de β -D-glicopiranosose que unem-se por ligações β -1,4-glicosídicas. Cadeias adjacentes organizam-se paralelamente, formando as microfibrilas, que por sua vez, unem-se formando as fibras de celulose. Além das ligações glicosídicas, ligações de hidrogênio também estão presentes, mantendo a estrutura do polímero (figura 2). A fórmula molecular da celulose é $(C_6H_{10}O_5)_n$, em que n representa o grau de polimerização (número de resíduos) da molécula, o qual pode variar entre 9.000 a 10.000, atingindo 15.000 em alguns casos (ROWELL et al., 2005).

Com base no padrão de arranjo das moléculas da cadeia, a ultraestrutura da celulose pode ser classificada em regiões cristalinas e amorfas. O arranjo molecular da celulose é ordenado, rígido e inflexível na região cristalina e é flexível e desordenado na região amorfa (WANG et al., 2017).

Figura 2. Estrutura molecular da celulose, demonstrando as ligações glicosídicas e de hidrogênio (linhas tracejadas) que mantêm a estrutura das fibras.

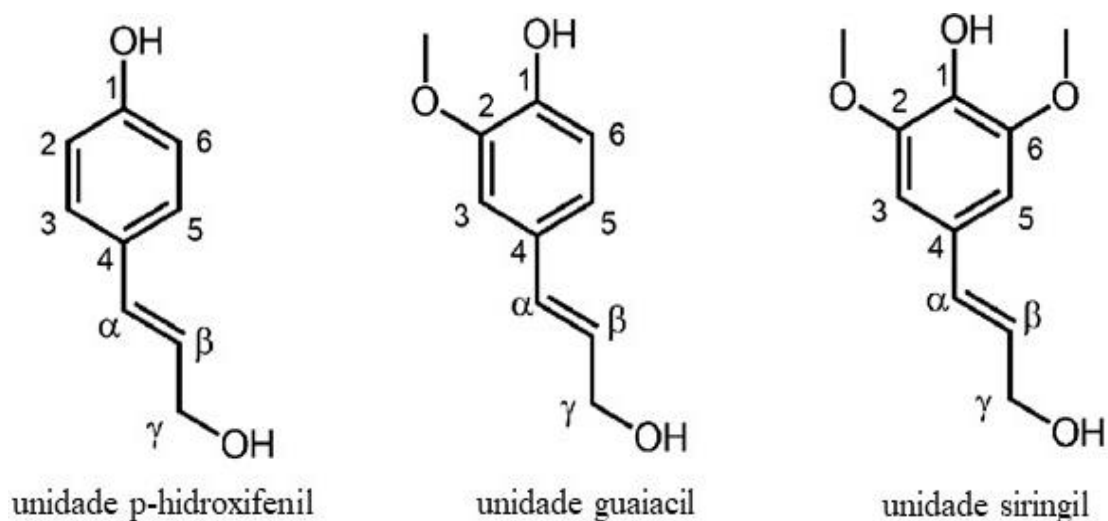


Fonte: adaptado de Moon e colaboradores (2011).

A lignina, por sua vez, apresenta a estrutura mais complexa dentre os constituintes da biomassa vegetal e é considerada um dos materiais mais recalcitrantes da natureza, conferindo firmeza e rigidez à parede celular. Apresenta-se como uma barreira de defesa física e química, dificultando a penetração de

microrganismos fitopatogênicos e o consumo por insetos, protegendo as plantas contra os fatores bióticos e abióticos advindos do ambiente. Essas funções justificam-se por ser encontrada principalmente na parede celular e lamela média das plantas (FIRMINO et al., 2006).

Figura 3. Unidades formadoras do polímero lignina.



Fonte: adaptado de Wang e colaboradores (2017).

Trata-se de um polímero tridimensional amorfo, sintetizado a partir de três precursores primários: álcool p-cumarílico (precursor das unidades p-hidroxifenílicas), álcool coniferílico (precursor das unidades guaiacil) e álcool sinapílico (precursor das unidades siringil) (figura 3). Estas unidades formam a matriz de lignina através de várias ligações (ligações éter, ligações carbono-carbono e ligações éster), e diferentes grupos funcionais se ligam à cadeia lateral, gerando estruturas de lignina extremamente complexas (WANG et al., 2017). Portanto, a lignina não deve ser considerada uma substância química única, mas sim, uma classe de materiais correlatos.

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante na natureza e representa aproximadamente um terço de todo o carbono renovável do planeta (BIELY, 1985). Atua como um importante elo químico entre a celulose e a lignina, como é possível observar na figura 1, sendo ainda importante na manutenção da integridade da celulose, uma vez que auxilia na proteção das fibras contra a degradação por celulasas.

O termo hemicelulose foi introduzido por Schulze, em 1891, para denominar frações isoladas ou extraídas de material vegetal facilmente hidrolisável, quando sua estrutura ainda não era bem conhecida. Este polissacarídeo está presente na parede celular e na lamela média de células vegetais (BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005).

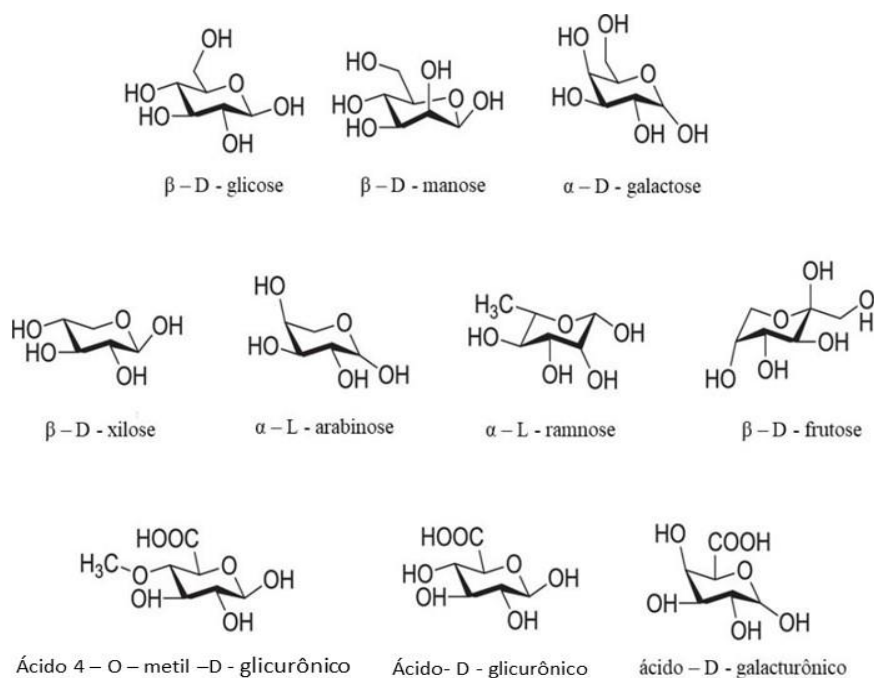
Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta ramificações, possuindo composição química variável não somente entre diferentes espécies vegetais, mas também em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento de uma mesma planta. Ainda em relação à celulose, as hemiceluloses apresentam menor grau de polimerização, em geral, de 80 a 200, bem como característica amorfa (SAHA, 2003).

Os principais monômeros que constituem a hemicelulose são as pentoses xilose e arabinose, as hexoses glicose, manose, ramnose, frutose e galactose, além de ácidos urônicos (figura 4). Tais resíduos são diversamente modificados por acetilação e metilação.

As hemiceluloses podem ser classificadas como xiloglicanas, xilanas, mananas, glicomananas e β -(1→3,1→4)-glicanas (SCHELLER; ULSKOV, 2010). Assim como a lignina, a hemicelulose não é um composto químico bem definido, mas sim, uma classe de componentes poliméricos de fibras vegetais, com propriedades

peculiares a cada uma delas (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; HENRIKSSON; LENNHOLM, 2009; JUTURU; WU, 2014; POLIZELI et al., 2005).

Figura 4. Monômeros presentes em hemiceluloses.

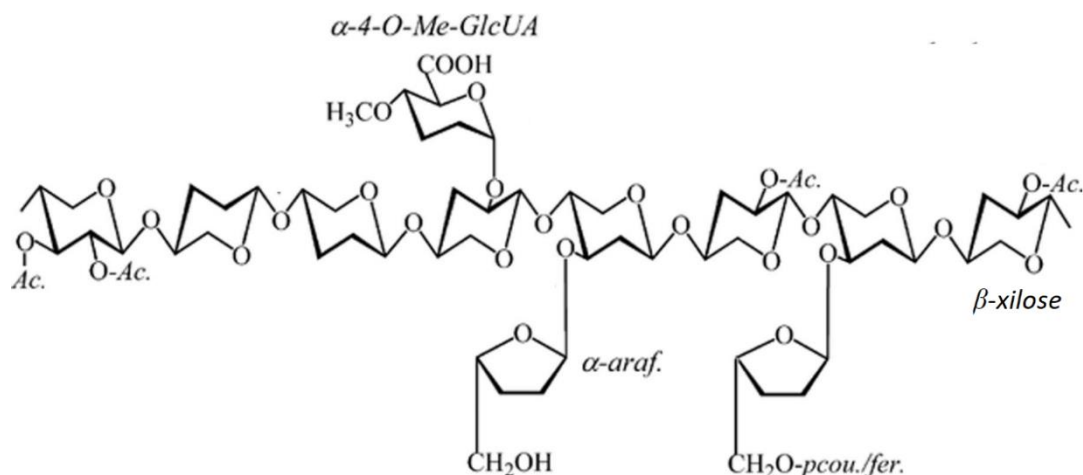


Fonte: adaptado de Wang e colaboradores (2017).

2.2. Xilana

Os polissacarídeos denominados xilanas são frequentemente encontrados como os principais constituintes das hemiceluloses em muitas espécies vegetais. Xilanas são formadas por uma cadeia principal homopolimérica composta por resíduos de D-xilose, os quais unem-se por ligações glicosídicas β -1,4. Além da cadeia principal, a xilana apresenta ramificações laterais que podem ser compostas por resíduos de ácido glicurônico, ácido 4-O-metilglicurônico, arabinose, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e D-galactose (figura 5). As cadeias laterais são responsáveis pela solubilidade, conformação física e reatividade da molécula xilana (JUTURU; WU, 2014; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Figura 5. Estrutura da xilana com diferentes substituições da cadeia lateral. A cadeia principal é composta por resíduos de xilose. Ac: grupo acetil; α -araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: ácido 4-O-metilglicurônico; pcou/fer: ácido p-cumárico/ácido ferúlico.



Fonte: adaptado de Sunna e Antranikian, 1997.

De acordo com os substituintes presentes em sua estrutura, quatro principais famílias de xilanas podem ser definidas: arabinoxilanas (as quais apresentam cadeia lateral composta por L-arabinose); glicuronoxilanas (com a presença de ácido glicurônico ou seu derivado 4-O-metil), glicuronoarabinoxilanas (que apresentam L-arabinose e ácido glicurônico ou seu derivado 4-O-metil) e galactoglicuronoarabinoxilanas (caracterizadas pela presença de cadeias laterais com oligossacarídeos complexos contendo galactose terminal) (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). Cada categoria apresenta, ainda, heterogeneidade em relação ao grau e natureza da ramificação. Homoxilanas, por outro lado, consistem exclusivamente em resíduos de xilose. Este tipo de xilana não é muito comum na natureza, mas foi isolado a partir do capim esparto e do tabaco (CHANDA et al., 1950; EDA et al., 1976).

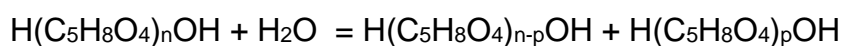
A xilana é encontrada em grandes quantidades em madeiras de lei de angiospermas (15-30 % do conteúdo da parede celular) e madeiras macias de

gimnospermas (7-10 %), bem como plantas anuais (<30 %). Em madeiras de lei, a xilana existe como glicuronoxilana e em madeiras macias, como glicuronoarabinoxilana, enquanto em gramíneas e plantas anuais, arabinoxilana. Em várias madeiras, particularmente nas madeiras de lei, as xilanas são acetiladas (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; SING; MADLALA; PRIOR, 2003).

2.3. Enzimas do complexo xilanolítico

Devido à sua complexidade estrutural, a xilana requer um conjunto de enzimas que atuam sinergicamente para sua completa hidrólise. Estas enzimas, que fazem parte do denominado complexo xilanolítico, são glicosil hidrolases (GH), sendo classificadas em diversas famílias, tais como 10, 11 e 43 (WALIA et al., 2017).

Neste complexo enzimático, destacam-se as endo-1,4-β-xilanases e as β-xilosidases. Endo-1,4-β-xilanases (EC 3.2.1.8), aqui denominadas xilanases, atuam na cadeia principal da xilana, clivando as ligações glicosídicas e promovendo uma redução no grau de polimerização do substrato. Inicialmente, os principais produtos da hidrólise são xilooligossacarídeos, porém, em estágios posteriores, pequenas moléculas, tais como mono, di e trissacarídeos podem ser detectados. Polizeli e colaboradores (2005) descreveram a hidrólise da xilana por uma xilanase da seguinte maneira:



É importante ressaltar que esta equação mostra a estequiometria de um único evento hidrolítico em uma molécula de xilana, porém tal reação pode ocorrer em muitos pontos da cadeia.

As β -xilosidases (EC 3.2.1.37), por sua vez, hidrolisam xilooligossacarídeos e xilobiose, promovendo a liberação de xilose. As β -xilosidases geralmente não hidrolisam xilana, apresentando afinidade inversamente proporcional ao grau de polimerização dos xilooligossacarídeos, sendo assim, altamente específicas. Estas enzimas possuem papel central na hidrólise do substrato, visto que, após a ação das xilanases, ocorre um acúmulo de xilooligossacarídeos, que podem levar à inibição das mesmas.

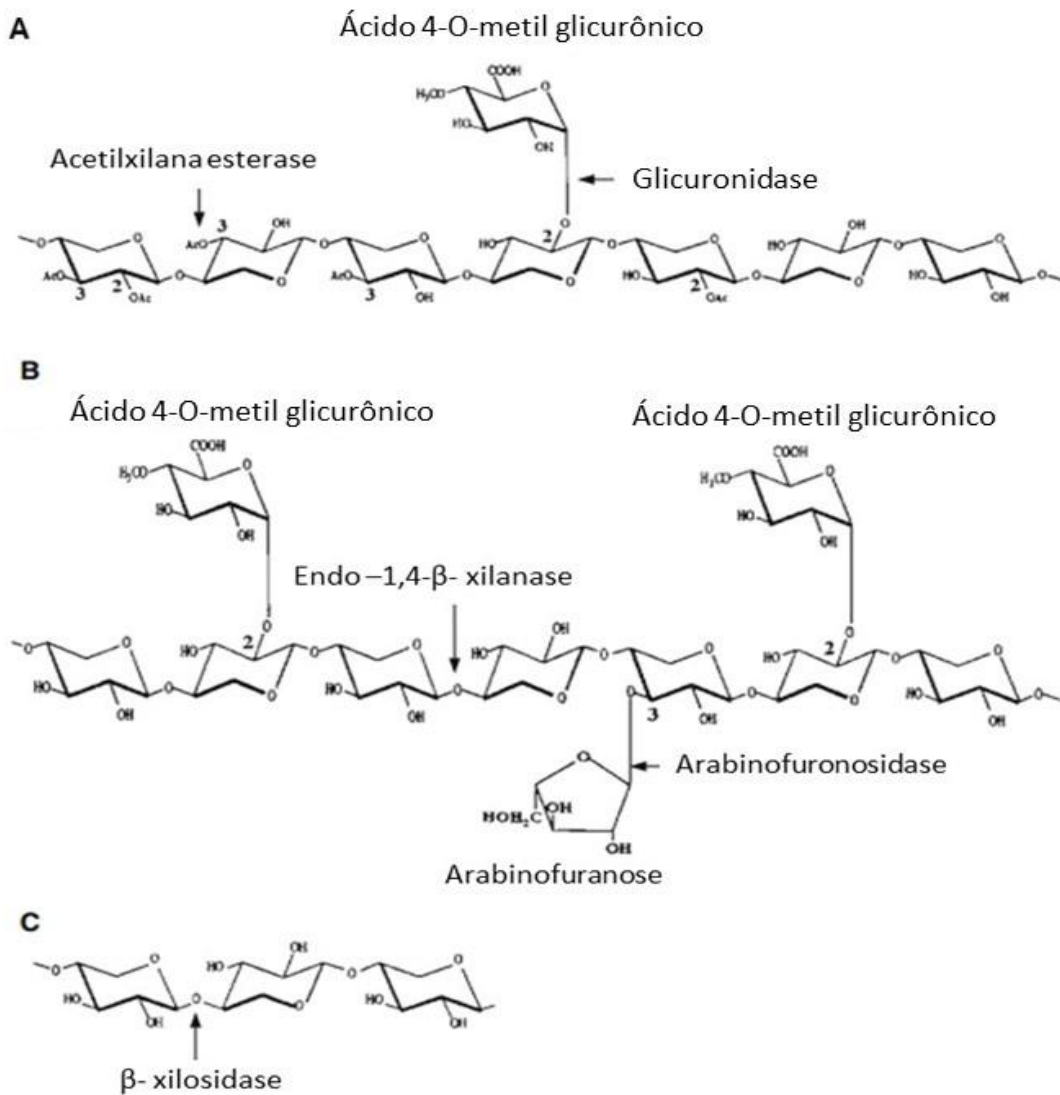
Ao degradar e remover os oligossacarídeos, as β -xilosidases removem também a causa da inibição das xilanases, aumentando a eficiência da hidrólise (ANDRADE et al., 2004; ZANOELO et al., 2004). De acordo com a afinidade por xilobiose ou xilooligossacarídeos maiores, β -xilosidases podem ser classificadas como xilobiasas ou exo-1,4- β -xilanases, respectivamente (BIELY, 1993).

Diversas outras enzimas, denominadas auxiliares ou desramificantes, participam do complexo xilanolítico, tais como arabinofuronosidases, galactosidases, glicuronidases, feruloil esterases, acetilxilana esterases e ácido cumárico esterases (BANERJEE et al., 2010). A ação sinérgica destas enzimas, que atuam nas cadeias laterais, é de extrema importância para a sacarificação da xilana, visto que ramificações podem limitar a formação do complexo enzima/substrato na cadeia principal, limitando a hidrólise (VALENZUELA; DIAZ; PASTOR, 2014)

Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) promovem a clivagem da ligação entre resíduos laterais de arabinofuranoses e xiloses presentes na cadeia central, removendo resíduos L-arabinofuronosil do polímero. Glicuronidases (EC 3.2.1.139) hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α -1,2 entre o ácido glicurônico lateral e a xilose da cadeia central; acetilxilana esterases (EC 3.1.1.72) rompem ligações entre o grupo acetil e os C-2 e C-3 de resíduos de xilose; ácido cumárico esterases e feruloil

esterases, clivam as ligações do tipo éster entre ácido cumárico e ácido ferúlico e os resíduos de arabinofuranose. A ação de algumas enzimas do complexo xilanolítico em distintos tipos de xilanas é demonstrada na figura 6.

Figura 6. Algumas enzimas envolvidas na degradação da xilana: acetilxilana esterase, glicuronidase, endo-1,4- β -xilanase e arabinofuronosidase. A) Glicuronoxilana presente em madeiras de lei. B) Glicuronoarabinoxilana de madeira macia. C) Ação da enzima β -xilosidase.



Fonte: adaptado de Polizeli e colaboradores (2005).

2.4. Xilanases

2.4.1. Classificação

Diferentes formas de classificação de xilanases encontram-se descritas na literatura. Uma delas, proposta por Wong e colaboradores (1988), baseia-se na massa molecular e no ponto isoelétrico (pI) das enzimas, dividindo as xilanases em dois grupos: as de baixa massa molecular (menores que 30 kDa) e pI básico, e as de alta massa molecular (maiores que 30 kDa) e pI ácido. Porém, este padrão não se aplica à todas as xilanases descritas e cerca de 30 % das xilanases, especialmente as de origem fúngica, não se enquadram nessas categorias (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Outras maneiras de classificação propostas basearam-se na estrutura cristalina, propriedades cinéticas, especificidade pelo substrato ou perfil dos produtos gerados, porém, todas apresentaram limitações (JEFFRIES, 1996; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

O sistema de classificação mais completo e utilizado atualmente, fundamenta-se na estrutura primária e comparação de domínios catalíticos, sendo utilizado não apenas para classificação de xilanases, mas de glicosil hidrolases (GH) em geral. De acordo com as características anteriormente citadas, as glicosil hidrolases são classificadas em diversas famílias, com informações disponíveis na plataforma CAZY¹ (Carbohydrate-Active Enzymes) (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Atualmente há 156 famílias de glicosil hidrolases e as xilanases encontram-se presentes nas famílias 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62. Estas enzimas apresentam diferentes estruturas, mecanismos de ação, especificidades pelo

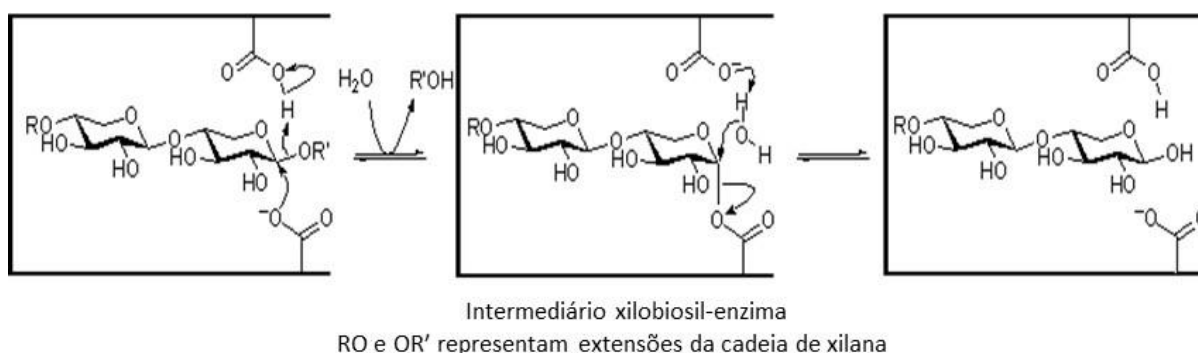
¹ Disponível em <http://www.cazy.org/>, acesso válido em 30/10/2018.

substrato, atividades hidrolíticas e características físico-químicas, sendo as pertencentes às famílias 10 e 11 as mais estudadas (UDAY et al., 2016).

Xilanases da família 10 (GH10), em geral, apresentam maior massa molecular e baixo pl. São muito ativas em xilooligossacarídeos curtos, o que indica pequenos sítios de ligação ao substrato. As enzimas desta família não são altamente específicas, apresentando atividade em substratos celulósicos de baixo peso molecular, tais como celobiose e alguns oligossacarídeos originários de celulose (BIELY, 1993; VAN TILBEURGH; CLAEYSSSENS, 1985). As xilanases da família 11 (GH11), por sua vez, geralmente apresentam baixa massa molecular e em sua estrutura predominam folhas β . São as xilanases “verdadeiras”, uma vez que são ativas somente em substratos compostos por xilose, apresentando, portanto, menor versatilidade em relação às GH10. Em relação ao ponto isoelétrico, podem ser classificadas como ácidas ou básicas (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Seu mecanismo catalítico mostra que são enzimas de retenção, com resíduos de glutamato atuando como nucleófilo e grupo ácido/base (figura 7).

Figura 7. Mecanismo catalítico proposto para xilanases da família GH11.



Fonte: www.cazypedia.org, acesso em 10/5/2018.

2.4.2. Aplicações industriais

Diversas são as aplicações industriais das xilanases. Uma das mais promissoras é a produção de biocombustíveis a partir do material lignocelulósico, o qual, devido ao seu caráter renovável, abundante e baixo custo, constitui matéria prima adequada para a produção de etanol de segunda geração (2G), despertando o interesse de diversos grupos de pesquisa (MORETTI et al., 2012; PRAJAPATI et al., 2018). Para a produção de etanol 2G, porém, é necessário que os açúcares fermentescíveis sejam liberados e expostos à reação enzimática (SÁEZ et al., 2013). Neste processo, as xilanases se tornam fundamentais, visto que sua ação desestrutura o entrelaçamento da hemicelulose, reduzindo o grau de polimerização do substrato, gerando xilooligossacarídeos e, conseqüentemente, facilitando o acesso enzimático à celulose.

Na indústria de papel, as xilanases têm destaque no processo de branqueamento, que consiste na remoção de lignina das polpas químicas para produção de polpa brilhante ou branca, uma vez que a intensidade da cor da polpa está relacionada com a quantidade e estado químico da lignina remanescente. O branqueamento realizado com uso de enzimas ou microrganismos lignocelulolíticos é chamado de biobranqueamento e, por reduzir o uso de cloro como agente clareador e, conseqüentemente, a emissão de efluentes, têm atraído o interesse de indústrias. A importância da xilanase nas indústrias de papel e celulose está relacionada à hidrólise da xilana, que facilita a liberação de lignina da polpa de papel (WALIA et al., 2017).

Na indústria alimentícia as xilanases também apresentam importantes aplicações, como na panificação, por exemplo. Em conjunto com outras enzimas, xilanases podem promover a hidrólise da hemicelulose presente na farinha de trigo,

deixando a massa mais macia e permitindo um melhor crescimento da mesma (CAMACHO; AGUILAR, 2003). Uma vez que a hidrólise de oligossacarídeos promove diminuição da quantidade de materiais insolúveis presentes, xilanases também são utilizadas na clarificação de sucos. Em rações animais, o uso de xilanases promove a redução da viscosidade intestinal do alimento, provendo um aumento de peso e melhor conversão alimentar (HO, 2018).

A produção de xilooligossacarídeos a partir de resíduos industriais têm também ganhado destaque devido às atividades funcionais que os mesmos apresentam. Em decorrência da ingestão destes compostos, atribuem-se diversos efeitos benéficos à saúde, como, por exemplo, o estímulo do crescimento de bifidobactérias na microbiota do trato digestivo (BARRETO; ZANCAN; MENEZES, 2015).

Xilanases podem ser utilizadas em processos tais como maceração do linho, juta e sisal, bem como no refinamento de polpas para a produção de tecidos. Nesses processos, mais uma vez, o papel das xilanases é facilitar a separação das fibras de celulose e remoção da lignina. Produtos resultantes da hidrólise da xilana, como resíduos de β -D-xilopiranosídeo, podem ainda, ser convertidos em solventes e adoçantes, tais como o xilitol, um poliálcool com poder adoçante comparável ao da sacarose (PARAJÓ et al., 1998).

É importante ressaltar que a conversão da xilana em xilose e xilooligossacarídeos pode ser obtida a partir da hidrólise ácida ou enzimática. Apesar de mais rápida, a hidrólise ácida pode gerar compostos tóxicos e, a longo prazo, levar à corrosão de equipamentos. Assim, o interesse pela hidrólise enzimática tem aumentado e diversas xilanases têm sido produzidas comercialmente (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; HO, 2018).

2.4.3. Fungos filamentosos como fontes de xilanases

As xilanases são produzidas por diversos organismos, tais como bactérias, fungos, leveduras, algas, insetos, crustáceos, moluscos e sementes de plantas terrestres. Entre estes produtores, destacam-se os fungos filamentosos, uma vez que produzem xilanases extracelulares e em maior quantidade, em relação aos demais organismos (MANDAL, 2015; POLIZELI et al., 2005).

Os fungos são altamente eficientes na degradação da biomassa vegetal devido ao fato de que, frequentemente, esta é a principal fonte de carbono em seu ambiente natural. Uma vez que os fungos não são capazes de absorver polímeros, é necessário que os mesmos produzam enzimas extracelulares para a degradação e consequente liberação de monômeros ou oligômeros, os quais podem ser absorvidos e metabolizados pelas células. Assim, fungos são reconhecidos como uma excelente fonte de enzimas lignocelulolíticas, incluindo xilanases (MÄKELÄ; DONOFRIO; DE VRIES, 2014).

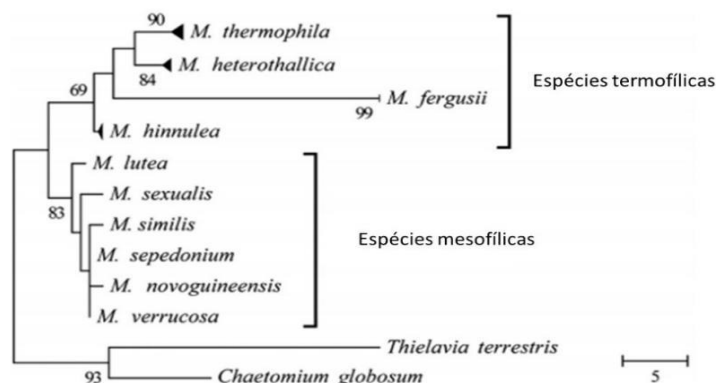
Entre os fungos mesofílicos, os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* destacam-se como bons produtores de xilanases, sendo utilizados na produção de coquetéis enzimáticos comerciais. Nos últimos anos, porém, fungos termofílicos têm despertado grande interesse, uma vez que são capazes de secretar enzimas com maior termoestabilidade. As enzimas produzidas por esses organismos são muito atrativas para uso industrial, pois temperaturas mais elevadas tornam as taxas de conversão mais rápidas, aumentam a viscosidade dos produtos e dos substratos e evitam a contaminação por microrganismos mesofílicos indesejados (KUMAR; SWATI, 2001).

Exemplos de fungos termofílicos com grande potencial são *Chaetomium thermophilum*, *Humicola insolens*, *H. grisea*, *Myceliophthora thermophila*, *M.*

heterothallica, *Talaromyces emersonii* e *Thermoascus aurantiacus*. As xilanases destes fungos geralmente possuem temperaturas ótimas entre 55 e 80 °C, sendo muito estáveis nesta faixa. Estas enzimas costumam ser glicoproteínas e muitas apresentam maior atividade em pH ácido (HO, 2018; POLIZELI et al., 2005).

O gênero *Myceliophthora*, que inclui 10 espécies, é composto por fungos mesofílicos e termofílicos e sua taxonomia foi elucidada por análises filogenéticas, como é possível observar na figura 8 (VAN DEN BRINK et al., 2012). Com base na filogenia e capacidade de cruzamento sexual, isolados originalmente pertencentes a *M. thermophila* foram divididos em duas espécies: *M. thermophila* e *M. heterothallica*, sendo que a última apresenta ciclo reprodutivo com cruzamento².

Figura 8. Árvore consensual parcimoniosa da região ITS1 do gênero *Myceliophthora*. Os números ao lado dos ramos indicam a porcentagem de árvores replicadas em que os táxons associados se agrupam no teste de *bootstrap* (1.000 réplicas).



Fonte: Van den Brink e colaboradores (2013).

A espécie *M. thermophila* tem sido muito estudada e algumas xilanases provenientes deste fungo já foram isoladas e caracterizadas (BASIT et al., 2018; VAN GOOL et al., 2013). Menor quantidade de informação encontra-se disponível para o fungo *M. heterothallica*, porém, estudos demonstram que esta espécie apresenta

² Marin-Felix e colaboradores (2015) propuseram a reclassificação do gênero *Myceliophthora*, sugerindo que as espécies *M. heterothallica* e *M. thermophila* sejam denominadas *Thermostelomyces heterothallica* e *T. thermophila*, respectivamente. Na literatura, é possível encontrar as espécies citadas de ambas as formas (*Myceliophthora* e *Thermostelomyces*).

grande potencial para a produção de enzimas do complexo lignocelulolítico, incluindo xilanases.

Quando cultivado em meio semi-sólido contendo palha de cana, palha de milho e papel, a produção de xilanases por este fungo atingiu, em média, 60 U mL⁻¹ após 72 horas de cultivo (DIAZ et al., 2015). Van den Brink e colaboradores (2013) concluíram que, em relação à *M. thermophila*, isolados de *M. heterothallica* mostraram-se mais eficientes na liberação de açúcares de palha de trigo levemente pré-tratada (com 5% de HCl) com alto teor de xilana. Trata-se, portanto, de uma espécie bastante interessante e promissora.

2.5. Expressão heteróloga de enzimas

Embora muitas espécies de fungos sejam boas produtoras de xilanases, nem sempre a produção ocorre em níveis satisfatórios. Além disso, a necessidade de indução para a expressão das enzimas desejáveis, requer uso de meios de cultura específicos, que podem dificultar o processo. A expressão heteróloga constitui uma ferramenta apropriada para a obtenção de enzimas em larga escala, com uso de meios de cultura de baixo custo, permitindo também, que o processo de purificação da proteína a ser produzida seja mais eficiente. Isto pode ocorrer através da adição de caudas de histidina fusionadas às proteínas recombinantes, permitindo o uso de colunas de afinidade no processo de purificação. Dada a importância industrial que as xilanases apresentam, uma série de estudos de clonagem e expressão heteróloga destas enzimas têm sido conduzidos nos últimos anos (tabela 1).

Vários organismos, tais como bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas e plantas, têm sido utilizados como hospedeiros heterólogos. Todos apresentam vantagens e limitações, de forma que a escolha do hospedeiro ideal deve se basear

nas características da proteína de interesse (ADRIO; DEMAIN, 2010; ROSANO; CECARELLI, 2014).

Tabela 1. Exemplos e principais características de xilanases de origem fúngica expressas de maneira heteróloga em *E. coli* e *P. pastoris*.

Organismo de origem	Hospedeiro heterólogo	Massa molecular (kDa)	pH ótimo; Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	25	5,0; 50	Elgharbi et al., 2015
<i>Aspergillus niger</i>	<i>P. pastoris</i> GS115	20	5,0; 50	Liu et al., 2006
<i>Aspergillus usamii</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	20	4,6; 50	Zhou et al., 2008
<i>Hypocrea orientalis</i>	<i>P. pastoris</i> GS115	29	4,5; 55	Li et al., 2018
<i>Paecilomyces thermophila</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	28	7,0; 75	Zhang et al., 2010
<i>Paecilomyces thermophila</i>	<i>P. pastoris</i> GS115	29	7,0; 75	Fan et al., 2012
<i>Scytalidium acidophilum</i>	<i>P. pastoris</i> X33	25	3,2; 56	Balaa et al., 2006
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	<i>E. coli</i> Rosetta-gami (DE3)	33	5,0; 65	Souza et al., 2016
<i>Thermobifida fusca</i>	<i>P. pastoris</i> X33	41	8,0; 80	Zhao et al., 2015
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>E. coli</i> Origami (DE3)	37	6,0; 60	Tang et al., 2017

Fonte: autoria própria.

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é o hospedeiro bacteriano mais utilizado. Como vantagens é possível citar: genética bem caracterizada e de fácil manipulação, grande abundância de linhagens e vetores disponíveis comercialmente e elevada capacidade de expressão de proteínas recombinantes (as quais pode representar até 50 % do total de proteínas expressas). Como desvantagens, destacam-se a possível formação de corpos de inclusão, decorrentes da baixa solubilidade apresentada por algumas proteínas recombinantes, e a incapacidade de

realização de modificações pós traducionais, tais como a glicosilação (LAMBERTZ et al., 2014).

Diferentes abordagens têm sido empregadas para superar a insolubilidade de proteínas expressas heterologicamente em *E. coli*. Uma delas inclui a purificação de corpos de inclusão, contendo a proteína recombinante, com uso de agentes como ureia e β -mercaptoetanol e posterior re-enovelamento da proteína, ou o uso de temperaturas mais baixas para a expressão, de modo a garantir o correto dobramento. Com relação às modificações pós traducionais, algumas linhagens de *E. coli* disponíveis comercialmente, permitem, por exemplo, a formação de ligações dissulfeto.

Em relação a hospedeiros eucariotos, destaca-se a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Esta levedura apresenta manipulação genética simples, sendo muito similar à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual representa um dos sistemas heterólogos mais bem caracterizados. Outra vantagem refere-se à capacidade de produzir proteínas heterólogas em elevadas quantidades e com secreção para o meio extracelular. Por fim, *P. pastoris* realiza modificações pós traducionais, tais como ligações dissulfeto e glicosilações.

Uma desvantagem quanto ao uso de *P. pastoris* se refere ao uso do metanol, o qual pode oferecer riscos à saúde e à segurança, fato este, que pode comprometer a produção de proteínas de interesse em larga escala ou, ainda, limitar seu uso para a produção de proteínas relacionadas à alimentação. Ainda, durante o cultivo de *P. pastoris*, altos níveis de expressão de proteases podem ser detectados, especialmente, quando as células estão sujeitas a estresse (por exemplo, presença de metanol), resultando na degradação da proteína recombinante (LI et al., 2007; POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

A procura por novas enzimas que possam ter potencial para participar de coquetéis destinados à degradação de resíduos lignocelulósicos justifica investir na prospecção de enzimas fúngicas, seja pela caracterização daquelas disponíveis em cultivo, quanto das obtidas por análises moleculares.

3. OBJETIVOS PRINCIPAIS

Isolar uma sequência codificadora de xilanase do fungo *M. heterothallica* e promover a expressão heteróloga da mesma em *E. coli* e *P. pastoris*, com caracterização bioquímica da enzima.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 116-131, 2010.
- ANDRADE, S. V.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. Effect of carbon source on the biochemical properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1931-1938, 2004.
- BALAA, A. B.; WOUTERS, J.; DOGNE, S.; ROSSINI, C.; SCHAUS, J.; DEPIEREUX, E.; VANDENHAUTE, J.; HOUSEN, I. Identification, cloning, and expression of *Scytalidium acidophilum* XYLI gene encoding for acidophilic xylanase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 269-272, 2006.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; BONGERS, M.; WALTON, J. D. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9097-9105, 2010.
- BARRETO, A. R.; ZANCAN, L. R.; MENEZES, C. R. Obtenção de xilooligossacarídeos por resíduos lignocelulósicos: alternativa para produção de compostos funcionais para alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 821-836, 2015.
- BASIT, A.; LIU, J.; MIAO, T.; ZHENG, F.; RAHIM, K.; LOU, H.; JIANG, W. Characterization of two endo- β -1,4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 233-244, 2018.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BERKA, R. M.; GRIGORIEV, I. V.; OTILLAR, R.; SALAMOV, A.; GRIMWOOD, J.; REID, I.; ISHMAEL, N.; JOHN, T.; DARMOND, C.; MOISAN, M. C.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; LOMBARD, V.; NATVIG, D. O.; LINDQUIST, E.; SCHMUTZ, J.; LUCAS, S.; HARRIS, P.; POWLOWSKI, J.; BELLEMARE, A.; TAYLOR, D.; BUTLER, G.; DE VRIES, R.P.; ALLIJN, I. E.; VAN DEN BRINK, J.; USHINSKY, S.; STORMS, R.; POWELL, A. J.; PAULSEN, I. T.; ELBOURNE, L. D.; BAKER, S. E.; MAGNUSON, J.; LABOISSIERE, S.; CLUTTERBUCK, A. J.; MARTINEZ, D.; WOGULIS, M.; DE LEON, A. L.; REY, M. W.; TSANG, A. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, p. 922-927, 2011.

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Coughland, M. P.; Hazlewood, G. P. (eds) **Hemicelluloses and hemicellulases**. Portland Press, London, p. 29-52, 1993.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286-290, 1985.

CAMACHO, N. A.; AGUILAR, O. G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 159-172, 2003.

CHANDA, S. K.; HIRST, E. L.; JONES, J. K. N.; PERCIVAL, E. G. V. The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*). **Journal of the Chemical Society**, v. 50, p.1287-1289, 1950.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

DIAZ, A. B.; DE SOUZA MORETTI, M. M.; BEZERRA-BUSSOLI, C.; NUNES, C. D. C. C.; BLANDINO, A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 316-323, 2015.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, p. 542-556, 2000.

EDA, S., OHNISHI, A., & KATO, K. Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 359-364, 1976.

ELGHARBI, F.; HLIMA, H. B.; FARHAT-KHEMAKHEM, A.; AYADI-ZOUARI, D.; BEJAR, S.; HMIDA-SAYARI, A. Expression of *A. niger* US368 xylanase in *E. coli*: purification, characterization and copper activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 263-270, 2015.

FAN, G.; KATROLIA, P.; JIA, H.; YANG, S.; YAN, Q.; JIANG, Z. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 11, p. 2043-2048, 2012.

FIRMINO, A.; ABREU, H. D. S.; PORTUGAL, A. C. P.; NASCIMENTO, A. M. D.; SOUZA, E. L. D.; PEREIRA, R. P. W.; MAÊDA, J. M. Alterações ligno-anatômicas

em *Solanum gilo* Raddi por aplicação de cálcio e boro como estratégia de defesa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 394-401, 2006.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Hemocellulose In: EK, M., GELLERSTEDT, G., HENRIKSSON, G. **Pulp and paper chemistry and technonology**. Stockholm. Deustche National Bibliotek, v. 1, p. 72-99, 2009.

HO, H. L. Biotechnology of microbial xylanase: Overview. **Research Advancements in Pharmaceutical, Nutritional, and Industrial Enzymology**, p. 294-326, 2018.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 337-342, 1996.

JUTURU, V.; WU, J.C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.33, p.188–203, 2014.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; PASCHOS, T.; TAOUKI, I.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **PeerJ**, v. 46, 2013. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/46/>>. Acesso em: 17 Out. 2017.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, H.D., SWATI, S., **Modern Concepts of Microbiology**, second revised ed. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 2001.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LAMBERTZ, C.; GARVEY, M.; KLINGER, J.; HEESEL, D.; KLOSE, H.; FISCHER, R.; COMMANDEUR, U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 135, 2014.

LI, H.; WU, H.; JIANG, F.; WU, J.; XUE, Y.; GAN, L.; LONG, M. Heterologous expression and characterization of an acidic GH11 family xylanase from *Hypocrea orientalis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 228-238, 2018.

LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GAO, X. G.; ILANGOVAN, K.; SUZARA, V. V.; DÜZGÜNEŞ, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of recombinant proteins

in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 105-124, 2007.

LIU, M. Q.; WENG, X. Y.; SUN, J. Y. Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan. **Protein Expression and Purification**, v. 48, n. 2, p. 292-299, 2006.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

MÄKELÄ, M. R.; DONOFRIO, N.; DE VRIES, P. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 2-9, 2014.

MANDAL, A. Review on microbial xylanases and their applications. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p.178-187, 2015.

MARIN-FELIX, Y.; STCHIGEL, A. M.; MILLER, A. N.; GUARRO, J.; CANO-LIRA, J. F. A re-evaluation of the genus *Myceliophthora* (Sordariales, Ascomycota): its segregation into four genera and description of *Corynascus fumimontanus* sp. nov. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 619-632, 2015.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941-3994, 2011.

MORETTI, M. S; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L.D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1062-1071, 2012.

MOTTA, F.L.; ANDRADE, C.C.P.; SANTANA, M, H. A. A. Review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, Intech, 2013.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUES, H.; DOMÍNGUES, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1, interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 3, p. 191-201, 1998.

POLIZELI, M.; RIZZATTI, A.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J.; AMORIM, D. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

- POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.
- PRAJAPATI, A. S.; PANCHAL, K. J.; PAWAR, V. A.; NORONHA, M. J.; PATEL, D. H.; SUBRAMANIAN, R. B. Review on cellulase and xylanase engineering for biofuel production. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 38-44, 2018. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ind.2017.0027>>. Acesso em: 21 Set. 2018.
- REDDI, H.; BHATTACHARYA, A.; KUMAR, V. The calcium-binding protein of *Entamoeba histolytica* as fusion partner for expression of peptides in *Escherichia coli*. **Biothechnoloy Applied Biochemistry**. v. 36, p. 213-218, 2002.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.
- ROWELL, R M.; PETTERSEN, R.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M. A. Cell wall chemistry. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. Boca Raton, Fla.: CRC Press, p. 35-74, 2005.
- SÁEZ, F.; BALLESTEROS, M., BALLESTEROS, I., MANZANARES, P., OLIVA, J. M., NEGRO, M. Enzymatic hydrolysis from carbohydrates of barley straw pretreated by ionic liquids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, p. 937-941, 2013.
- SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion, **Journal of Industrial Microbiology and Biothechnology**. v. 30, n. 5, p 279-291, 2003.
- SCHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.
- SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.
- SHELDON, R. A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 950-963, 2014.
- SING, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 3-16, 2003.

SOUZA, A. R.; DE ARAÚJO, G. C.; ZANPHORLIN, L. M.; RULLER, R.; FRANCO, F. C., TORRES, F. A.; MERTENS, J.A.; BOLMAN, M. J.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1, 4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 20-26, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016313058>>. Acesso em: 13 Mar. 2018.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

TANG, F.; CHEN, D.; YU, B.; LUO, Y.; ZHENG, P.; MAO, X.; & HE, J. Improving the thermostability of *Trichoderma reesei* xylanase 2 by introducing disulfide bonds. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 52-59, 2017. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345817300015>>. Acesso em: 13 Mar. 2018.

UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016.

VALENZUELA, S. V.; DIAZ, P.; PASTOR, F.I. Xyn11E from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23: a LppX-chaperone-dependent xylanase with potential for upgrading paper pulps. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 13, p. 5949-5957, 2014.

VAN DEN BRINK, J.; SAMSON, R. A.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; DE VRIES, R. P.. Phylogeny of the industrial relevant, thermophilic genera *Myceliophthora* and *Corynascus*. **Fungal Diversity**, v. 52, n. 1, p. 197-207, 2012.

VAN DEN BRINK, J.; VAN MUISWINKEL, G. C.; THEELEN, B.; HINZ, S. W.; DE VRIES, R. P. Efficient plant biomass degradation by thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1316-1324, 2013.

VAN GOOL, M. P.; VAN MUISWINKEL, G. C. J.; HINZ, S. W. A.; SCHOLS, H. A.; SINITSYN, A. P.; GRUPPEN, H. Two novel GH11 endo-xylanases from *Myceliophthora thermophila* C1 act differently toward soluble and insoluble xylans. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 1, p. 25-32, 2013.

VAN TILBEURGH, H.; CLAEYSSSENS, M. Detection and of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. **FEBS Letters**, v. 187, n. 2, p. 283-288, 1985.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 11, 2017.

WANG, S.; DAI, G.; YANG, H.; LUO, Z. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33-86, 2017.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 305, 1988.

ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 170-176, 2004.

ZHANG, M.; JIANG, Z.; YANG, S.; HUA, C.; LI, L. Cloning and expression of a *Paecilomyces thermophila* xylanase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant xylanase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 688-695, 2010.

ZHAO, L.; GENG, J.; GUO, Y.; LIAO, X.; LIU, X., WU, R.; ZHANG, R. Expression of the *Thermobifida fusca* xylanase Xyn11A in *Pichia pastoris* and its characterization. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 18, 2015.

ZHOU, C., BAI, J., DENG, S., WANG, J., ZHU, J., WU, M., & WANG, W. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usarii* and its expression in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 4, p. 831-838, 2008.

CAPÍTULO II

**Isolamento de gene codificador de xilanase de
Myceliophthora heterothallica, via RT-PCR, e expressão
heteróloga do mesmo em *Escherichia coli***

RESUMO

Um gene codificador de xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica* foi isolado via RT-PCR. O produto de amplificação obtido apresentou elevada similaridade com uma sequência codificadora de xilanase da família GH11 de *M. thermophila*. O inserto foi clonado e ligado ao vetor pET-28a(+), o qual foi utilizado para transformação de células de *Escherichia coli*. Três linhagens bacterianas foram testadas para a expressão da xilanase e, embora a expressão da proteína tenha ocorrido predominantemente na forma insolúvel em todas elas, a linhagem Origami 2(DE3) pLysS foi a mais adequada. A purificação da enzima recombinante, que apresentou massa molecular compatível com a esperada (25 kDa), ocorreu em duas etapas cromatográficas (afinidade e filtração em gel). Em relação à caracterização bioquímica, a temperatura e pH ótimos da xilanase foram 55 °C e 6,0, respectivamente. A enzima apresentou elevada especificidade pelo substrato, estabilidade em amplo intervalo de pH e resistência a diversos íons e compostos fenólicos, além de elevada termoestabilidade em presença de glicerol a 50 %.

Palavras-chave: RT-PCR, *Myceliophthora heterothallica*, *Escherichia coli*, pET-28a(+), xilanase recombinante.

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante é uma ferramenta muito importante na geração de produtos de interesse biotecnológico. Seu advento permitiu a expressão heteróloga de uma série de enzimas com aplicação industrial, incluindo xilanases, tendo também facilitado o processo de purificação e caracterização bioquímica das mesmas. A primeira etapa para a expressão heteróloga de uma proteína consiste na identificação e isolamento da sequência de DNA que a codifica, a qual deve ser ligada a um vetor de expressão, que por sua vez, é inserido em uma célula hospedeira (figura 1) (ONGLEY et al., 2013).

Figura 1. Etapas principais para a promoção da expressão heteróloga de uma proteína.



Fonte: adaptado de Ongley e colaboradores (2013).

As sequências dos genes podem estar disponíveis em bancos de dados públicos ou na literatura, porém, no caso da espécie *Myceliophthora heterothallica*, este tipo de informação não se encontrava disponível. Desta forma, optou-se inicialmente por outra estratégia para o isolamento de uma sequência codificadora de xilanase do fungo *M. heterothallica*, via RT-PCR (reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase). Esta etapa do trabalho é descrita neste

capítulo, que também aborda a expressão heteróloga da xilanase no hospedeiro procarioto, *Escherichia coli*.

2. OBJETIVOS

- Isolar um gene codificador de xilanase de *M. heterothallica*;
- Ligar a sequência codificadora da xilanase em vetor para expressão em *E. coli*;
- Isolar transformantes produtores da enzima recombinante;
- Realizar caracterização da enzima recombinante purificada, incluindo a determinação do pH e temperatura ótimos, termoestabilidade, estabilidade em relação ao pH, efeito de íons na atividade, dentre outros;
- Determinar parâmetros cinéticos e termodinâmicos da xilanase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens de microrganismos

O fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 foi isolado de camas de frango e previamente identificado através de técnicas convencionais e moleculares (ZANPHORLIN et al., 2010). A linhagem de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) foi utilizada para propagação de plasmídeos e as linhagens Origami 2(DE3) pLysS, Rosetta-gami 2(DE3) pLysS e BL21 (DE3) (Novagen) foram utilizadas para a expressão da xilanase.

3.2. Extração de RNA e obtenção da sequência de interesse

M. heterothallica F.2.1.4 foi inoculado em meio sólido de sais acrescido de glicose (0,2 %), carboximetilcelulose (0,5 %), celobiose (0,5 %) e xilana (0,5 %). Após 48 horas de incubação a 45 °C, o micélio foi coletado e triturado com nitrogênio líquido em almofariz. Seguiu-se a extração do RNA total com uso do reagente Trizol (Invitrogen). Para cada amostra de RNA total, foram utilizados cerca de 100 mg do micélio macerado. Após a extração, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1 %. A quantificação e verificação da qualidade das amostras foram realizadas com uso do equipamento NanoDrop (Thermo Scientific®).

Para obtenção do gene codificador da xilanase foi utilizada a técnica de PCR com transcriptase reversa (RT-PCR), utilizando-se o kit *Superscript III first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os iniciadores utilizados para a RT-PCR foram confeccionados com base na análise de sequências codificadoras de xilanases do fungo *Myceliophthora thermophila*, disponíveis no banco de dados “GenBank”, do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), uma vez que sequências codificadoras de xilanases do fungo *M. heterothallica* não se encontravam disponíveis na literatura ou em bancos de dados.

A escolha da espécie *M. thermophila* para a prospecção de sequências codificadoras de xilanases e desenho dos *primers* se deve à elevada proximidade filogenética que a mesma apresenta em relação à *M. heterothallica*, como demonstrado na figura 8 do Capítulo I. Foram confeccionados quatro conjuntos de iniciadores, cujas sequências encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Conjuntos de iniciadores utilizados para a obtenção do gene de interesse.

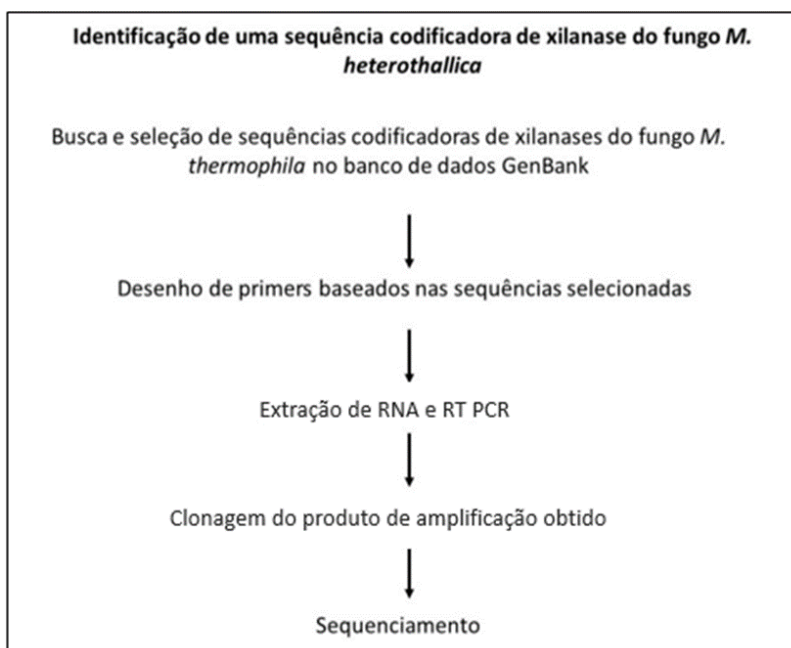
Conjunto de primer	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)	Número de acesso
XylMh_1	Fwd: 5' – ATGGTCTCGTTCACCTCTCCTCC – 3'	60	XM_003667251. 1
	Rev: 5' – TTAGGCCTCCCGGACCTCGATAG – 3'		
XylMh_2	Fwd: 5' – ATGGTTTCTGTCAAGGCAG – 3'	55	XM_003664736. 1
	Rev: 5' – TTAGGCCTGGACGGTGATG – 3'		
XylMh_3	Fwd: 5' – ATGGTTGCTCTCTCTTCTC – 3'	52	XM_003662354. 1
	Rev: 5' – TTACAAGCACTGCGAGTAC – 3'		
XylMh_4	Fwd: 5' – ATGGTCTCCTTCAAGGCC – 3'	55	XM_003663481. 1
	Rev: 5' – TTACCAGACGGTGATATCGG – 3'		

Fonte: autoria própria.

As reações de PCR foram constituídas de tampão de reação 1X, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de primer *forward* e de *reverse* e 1 unidade de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições utilizadas foram 95 °C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento do *primer* por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. A extensão final foi realizada a 72 °C durante 5 minutos. Após as amplificações, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1 %.

O fragmento obtido foi então purificado (*QIAquick PCR purification kit* – Qiagen), ligado ao vetor pGEM-T e sequenciado para confirmação de sua identidade. A figura 2 apresenta um fluxograma das etapas realizadas para a obtenção da sequência de interesse.

Figura 2. Fluxograma das etapas seguidas para o isolamento da sequência de interesse.



Fonte: autoria própria.

3.3. Análise da sequência codificadora de xilanase

A sequência obtida foi comparada com sequências depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando-se o algoritmo de busca BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Outras ferramentas utilizadas para análise da sequência foram Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), para alinhamento, Genscan Output (http://genes.mit.edu/cgi-bin/genscanw_py.cgi), para verificação da presença de íntrons, Nebcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), para análise de sítios de restrição, SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp/>), para verificação da presença de peptídeo sinal e ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) para predição de características da enzima.

3.4. Obtenção do plasmídeo de expressão em *E. coli*

A sequência codificadora de xilanase foi ligada ao vetor pET-28a(+), que apresenta compatibilidade com diversas linhagens de *E. coli* (variantes DE3). Para a obtenção do plasmídeo de expressão (pET-28a_XylMh), foram adicionados uma cauda de histidina (His-tag) e um sítio para TEV protease à porção N-terminal da sequência alvo, a qual teve seu peptídeo sinal removido (figura 3).

Para ligação, o vetor pET-28a(+) foi previamente digerido com as enzimas de restrição *Nco*I e *Not*I. Esta etapa do projeto foi realizada pela empresa Fastbio (Ribeirão Preto, SP).

Figura 3. Representação esquemática do inserto ligado ao vetor pET-28a(+).

Sítio de restrição para <i>Nco</i> I	His-tag	Sítio de reconhecimento para TEV protease	Sequência codificadora da xilanase sem peptídeo sinal	Códon de parada	Sítio de restrição para <i>Not</i> I
--------------------------------------	---------	---	---	-----------------	--------------------------------------

Fonte: autoria própria.

3.5. Transformação de *E. coli* com o plasmídeo pET-28a_XylMh

Para a transformação de *E. coli*, 80 ng do plasmídeo de expressão contendo o gene da xilanase (pET-28a_XylMh) foram misturados a 50 µL de células competentes. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, seguindo-se incubação a 42 °C por 30 segundos e gelo por mais dois minutos. Foram adicionados 200 µL de meio SOC (*Super Optimal Broth*) às células transformadas, as quais foram incubadas a 37 °C por uma hora e meia para regeneração. Na sequência, os transformantes foram plaqueados em meio LB (*Luria Bertani*) acrescido de canamicina (50 µg mL⁻¹).

3.6. Ensaios de expressão

Transformantes foram cultivados em 50 mL de meio LB suplementado com canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 37°C com 200 rpm de agitação, até que a cultura atingisse densidade óptica (OD_{600}) entre 0,6 e 0,8. Uma vez atingida a densidade óptica desejada, as culturas foram induzidas com 0,5 mM de IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) e incubadas a 20°C , com 200 rpm de agitação. Em diferentes intervalos após a indução (2, 4, 8 e 16 horas), uma alíquota dos cultivos foi coletada, centrifugada (para remoção de sobrenadante), e acrescida de tampão de amostra.

Os pellets celulares foram então submetidos a tratamento térmico (100°C durante 5 minutos) para lise celular e análise do perfil de expressão em SDS-PAGE.

3.7. Teste de solubilidade

Para avaliação da solubilidade da proteína recombinante, ensaios de expressão foram novamente realizados conforme descrito no item 3.6, porém, outras duas temperaturas de indução foram analisadas: 29°C e 37°C . Após indução com IPTG, alíquotas dos cultivos foram coletadas e centrifugadas. As células presentes no pellet foram então rompidas para a liberação da proteína recombinante, utilizando-se o kit *BugBuster* (Novagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para lise celular, foi utilizado tampão fosfato (50 mmol L^{-1} de fosfato de sódio, 500 mmol L^{-1} de cloreto de sódio, 10 mmol L^{-1} de imidazol e 5 % de glicerol). Após o rompimento das células, o lisado foi centrifugado a 16.000 xg por 20 minutos, a 4°C , obtendo-se a fração solúvel (sobrenadante) e a insolúvel (*pellet*), as quais foram analisadas em SDS-PAGE.

3.8. Produção da xilanase recombinante e purificação da enzima

Uma vez determinadas as melhores condições para a produção da proteína recombinante na fração solúvel, a mesma foi produzida em larga escala. Para isso, 20 mL de pré-inóculo de bactérias transformantes foram inoculados em 1 litro de meio LB contendo $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina e cultivados a 37°C com 200 rpm de agitação. Após a cultura atingir densidade ótica entre 0,6 e 0,8, a mesma foi induzida com IPTG por 16 horas, tendo sido cultivada a 20°C , com 200 rpm de agitação. Após o cultivo, a cultura foi centrifugada a $5.000 \times g$ por 15 minutos para recuperação das células. O *pellet* foi rompido com uso do kit *BugBuster* (Novagen), seguindo-se as recomendações do fabricante.

O sobrenadante foi então clarificado (centrifugação a $16.000 \times g$, 40 minutos, 4°C) e submetido a cromatografia de afinidade com uso da coluna HisTrap HP, 1 mL, contendo resina Ni Sepharose®, em sistema AKTA (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão A (50 mmol L^{-1} de fosfato de sódio, 500 mmol L^{-1} de cloreto de sódio, 10 mmol L^{-1} de imidazol e 5 % de glicerol). Após a injeção da amostra, as proteínas recombinantes foram eluídas em um gradiente linear de 0 a 100 % com o mesmo tampão, acrescido de 500 mmol L^{-1} de imidazol (tampão B).

As proteínas eluídas foram concentradas e dialisadas utilizando-se o tampão A em coluna Vivaspin 6 (GE Healthcare) e analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Na sequência, a amostra foi submetida à cromatografia de gel filtração em resina Superdex 75 (10/300), previamente equilibrada com tampão fosfato (20 mmol L^{-1} fosfato, 150 mmol L^{-1} NaCl) e novamente analisada em gel de poliacrilamida.

A concentração das amostras de proteínas purificadas foi determinada espectrofotometricamente com uso do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e uma curva padrão com soroalbumina bovina.

3.9. Remoção da cauda de histidina

A remoção da cauda de histidina da enzima recombinante foi realizada através do tratamento com a protease TEV. Após incubação *overnight* a 4 °C, a xilanase foi novamente submetida à cromatografia de afinidade e gel filtração, conforme anteriormente descrito, e analisada em SDS-PAGE.

3.10. Caracterização bioquímica da enzima

Para caracterização bioquímica da xilanase recombinante, a atividade enzimática foi determinada quantificando-se o produto liberado por intervalo de tempo ($\Delta[P]/\Delta t$), através do método de dosagem de açúcares redutores (MILLER, 1959), o qual utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). Os ensaios foram conduzidos em triplicata e realizados em microplacas. Uma curva de calibração foi confeccionada com D-xilose.

Uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio, seguindo a definição da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, IUBMB (NCIUB, 1979).

3.10.1. Determinação do tempo de incubação

Inicialmente, determinou-se o tempo de incubação da reação enzimática durante o qual seria obtida uma relação linear da liberação de produto em função do

tempo. Para este ensaio, 90 μL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 5,5, acrescido de substrato (xilana *beechwood* 1 %, Sigma-Aldrich), foram misturados a 10 μL de solução enzimática. Em seguida, a microplaca foi incubada em termociclador (Veriti Thermal Cycler, Thermo Scientific®) a 50 °C, por diferentes períodos (3, 5, 10 e 15 minutos). Após cada período de incubação analisado, a reação foi paralisada com a adição de 100 μL do reagente DNS, seguindo-se incubação a 95 °C por 10 minutos e resfriamento a 4 °C por 5 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm usando leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®).

3.10.2. Determinação do pH ótimo

Para determinação do pH ótimo, foram utilizados diversos tampões na concentração de 25 mmol L^{-1} para cobrir uma ampla faixa de pH procurando manter a força iônica e composição química dentro de certos limites: glicina, ácido acético, MES e Tris, ajustado para valores de pH entre 3 a 10 com uso de solução 0,5 mol L^{-1} de HCl ou NaOH (OLIVEIRA et al., 2014). O ensaio foi conduzido a 50 °C, misturando-se 90 μL de tampão acrescido do substrato, com 10 μL de solução enzimática. A paralisação da reação enzimática e leitura das placas ocorreram conforme descrito no item anterior.

3.10.3. Determinação da temperatura ótima

A atividade de xilanase foi testada por ensaio enzimático em função das variações da temperatura a intervalos entre 30 a 85 °C nas condições de pH ótimo.

3.10.4. Estabilidade em relação ao pH

Para este ensaio, 10 µL da solução enzimática foram incubados com 20 µL de solução tampão em diferentes valores de pH por 24 horas a 4 °C (o tampão utilizado foi o mesmo descrito no item 3.10.2, porém, sem a adição do substrato). Após a incubação, seguiu-se o ensaio enzimático conforme anteriormente descrito, nas condições de temperatura e pH ótimos.

A atividade obtida para as amostras incubadas em diferentes valores de pH foi denominada atividade residual, a qual foi determinada por comparação à atividade inicial, obtida através de uma amostra controle. O controle foi feito pela incubação de 10 µL de solução enzimática com de 20 µL de água ultrapura, incubados por 24 horas, seguindo-se o ensaio enzimático. Para o cálculo da atividade residual (%), utilizou-se a atividade inicial como referência.

3.10.5. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada por meio da incubação da solução enzimática, na ausência do substrato, por diferentes períodos (10, 30 e 60 minutos), em temperaturas entre 30 a 60 °C. Após a incubação, as amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos e a 4 °C por mais duas horas, para deter o processo de desnaturação e eventualmente permitir o re-enovelamento. Seguiu-se a determinação da atividade residual através de ensaio enzimático nas condições ótimas de temperatura e pH.

O mesmo ensaio foi realizado com a enzima incubada em temperaturas entre 30 a 80 °C na presença de glicerol a 50 %. O controle para o cálculo da atividade residual foi obtido através da determinação da atividade enzimática de uma amostra

que não foi exposta à incubação em diferentes temperaturas. Para o cálculo da atividade residual, utilizou-se a atividade inicial como referência.

3.10.6. Efeito de íons e reagentes sobre a atividade enzimática

O efeito de diversos cátions na forma de sais de cloro, na atividade enzimática, foi avaliado através da adição individual de $ZnCl_2$, $AlCl_3$, $FeCl_3$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, KCl , $MgCl_2$, $NiCl_2$, $LiCl$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ e $CaCl_2$. Para o ensaio, 10 μL de solução enzimática foram incubados com 10 μL de solução dos sais anteriormente descritos, de modo que a concentração final dos mesmos fosse de 1 e 10 $mmol L^{-1}$. Após a incubação, que ocorreu durante 10 minutos, seguiu-se a determinação da atividade residual pelo ensaio enzimático nas condições ótimas de temperatura e pH.

A atividade residual foi comparada ao controle, o qual foi determinado pela mistura de 10 μL de solução enzimática acrescido de 10 μL de água ultrapura. Seguiu-se incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e determinação da atividade enzimática.

O efeito de tensoativos (Triton X-100 e Dodecil Sulfato de Sódio - SDS), solventes (etanol, acetona, isopropanol), glicerol e de agente quelante (ácido etilenodiamino tetra acético, EDTA) também foi avaliado, seguindo-se os procedimentos anteriormente descritos.

3.10.7. Efeito de compostos fenólicos

Para verificação do efeito de compostos fenólicos, a solução enzimática foi exposta aos seguintes compostos na concentração final de 10 $mmol L^{-1}$: ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, ácido vanílico e siringaldeído.

Uma mistura composta por 10 μL de solução enzimática e 10 μL de solução dos compostos anteriormente citados, permaneceu por 10 minutos e 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, determinou-se a atividade enzimática nas condições ótimas de temperatura e pH. A atividade residual foi comparada aos controles, os quais foram determinados pela mistura de 10 μL de solução enzimática acrescido de 10 μL de água ultrapura e incubação pelos mesmos períodos analisados (10 minutos e 24 horas).

3.10.8. Avaliação das melhores condições de armazenamento

A solução enzimática foi armazenada em diferentes temperaturas (-196, -80, -20, 4 e 25 °C), por 24 horas na presença e ausência de glicerol 50 %. Para temperaturas negativas, em que as amostras sofreram o efeito de congelamento, o descongelamento foi feito por imersão das amostras em água à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

A atividade enzimática foi mensurada antes (atividade inicial) e depois do armazenamento (atividade final) e a partir da atividade relativa foi identificada a melhor condição de estocagem da solução enzimática, a fim de garantir a estabilidade da proteína.

3.10.9. Especificidade em relação ao substrato

A especificidade pelo substrato da enzima recombinante foi determinada avaliando-se a atividade enzimática na presença de 4 mmol L⁻¹ de 4-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (pNPX), 4 mmol L⁻¹ de 4-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo (pNPA), 4 % de carboximetilcelulose (CMC), 1 % de Avicel, 1 % de xilana *beechwood* e 1 % de xilana *oat spelt* nas condições ótimas de temperatura e pH.

3.10.10. Cinética enzimática

Para determinação dos parâmetros cinéticos da enzima, a atividade enzimática foi determinada nas condições ótimas de temperatura e pH, variando-se a concentração do substrato entre 1 a 50 mg mL⁻¹. Os valores da Constante de Michaelis K_m e da taxa ou velocidade máxima de reação V_{max} foram obtidos a partir de ajuste não linear de parâmetros utilizando como modelo a equação de Michaelis-Menten ($V_o = (V_{max} \times [S]) / (K_m + [S])$) no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) a partir de resultados da taxa ou velocidade inicial de reação (V_o) em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ obtidos em diferentes concentrações de substrato xilana *beechwood* ($[S]$).

3.11. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

A análise da termodinâmica da desnaturação térmica irreversível foi realizada a partir dos dados obtidos nos ensaios de termoestabilidade, conduzidos em condições ótimas de pH, utilizando-se cálculos propostos por autores que avaliaram a desnaturação térmica de enzimas, usando as equações de 1 a 7 (SAQIB et al., 2010; SAQIB et al., 2012; SIDDIQUI et al., 1997).

Inicialmente, foi confeccionado um gráfico de Arrhenius, o qual consiste na representação do logaritmo natural da atividade xilanolítica versus $1000/T$, em que T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin (temperatura em graus Celsius + 273,15). A partir deste gráfico, foram calculados a temperatura ótima, a energia de ativação da enzima (E_a) e os coeficientes de temperatura (Q_{10}).

A temperatura ótima foi calculada a partir da interseção no eixo x do ponto de encontro entre as retas, obtidas por regressão, das porções ascendente e descendente do gráfico anteriormente mencionado. Já a energia de ativação (E_a) foi calculada pela regressão linear da porção descendente do gráfico de Arrhenius

(correspondente a faixas de temperaturas na qual a estrutura não é sensivelmente afetada), utilizando-se o valor de inclinação da reta multiplicado pela constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), como mostrado na equação 1:

$$E_a = -(\text{inclinação} * R) \quad (\text{equação 1})$$

Os coeficientes de temperatura (Q_{10}) foram calculados pela equação 2 e correspondem ao aumento da taxa de reação ou velocidade a cada dez graus Celsius de elevação da temperatura:

$$\ln Q_{10} = E_a * 10 / R * T^2 \quad (\text{equação 2})$$

Um outro gráfico foi confeccionado com o logaritmo natural da atividade residual em função do tempo de incubação térmica, em minutos. Aplicando-se a regressão linear sobre os resultados obtidos para cada temperatura, foram obtidos os valores das inclinações, que correspondem à taxa de primeira ordem da inativação térmica, $-k_d$ (min^{-1}). A partir deste segundo gráfico, obteve-se o tempo de meia vida da enzima ($T_{1/2}$). Esse valor corresponde ao tempo no qual, em cada temperatura, a atividade cai à metade da original, e foi calculado a partir da seguinte equação:

$$T_{1/2} = \ln 2 / k_d \quad (\text{equação 3})$$

Para calcular a energia de ativação da desnaturação térmica, $E_{a(D)}$ (K J mol^{-1}), foi construído um gráfico do logaritmo natural da taxa de primeira ordem da inativação térmica k_d obtida anteriormente versus $1000/T$. Aplicou-se a regressão linear, sendo a inclinação da reta multiplicada pela constante universal dos gases ($R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), como na equação 4:

$$E_{a(D)} = -(\text{inclinação} * R) \quad (\text{equação 4})$$

Por fim, foram calculados a entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_d), a energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica (ΔG_D) e a entropia de ativação da desnaturação térmica (ΔS_D), com uso das equações a seguir, onde k_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) e h é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$):

$$\Delta H_d = E_{a(D)} - R * T \quad (\text{equação 5})$$

$$\Delta G_D = -(R * T) * \ln [(k_d * h) / (k_b * T)] \quad (\text{equação 6})$$

$$\Delta S_D = (\Delta H_d - \Delta G_D) / T \quad (\text{equação 7})$$

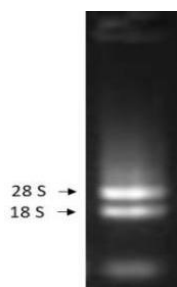
A temperatura de fusão da enzima (T_m) também foi obtida através da construção de um gráfico com a atividade residual versus a temperatura de exposição. A enzima foi exposta a diferentes temperaturas por 30 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de RNA e verificação da qualidade das amostras

A análise em gel de agarose 1 % (figura 4), demonstra a presença das bandas 28S e 18S na amostra de RNA extraída, bem como ausência de DNA contaminante. Em relação à razão de absorbâncias A260/A280, a amostra apresentou valor de 1,96, o que sugere elevado grau de pureza (SAMBROOK, 2001).

Figura 4. Amostra de RNA extraída com uso do reagente Trizol. Gel de agarose 1 %.

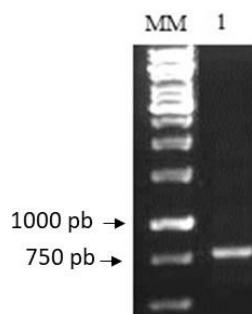


Fonte: autoria própria.

4.2. Isolamento do gene codificador de xilanase

Apenas a reação de amplificação conduzida com o conjunto de iniciadores 1 resultou em um produto com tamanho aproximado de 780 pb (figura 5). As demais reações não geraram produto de amplificação.

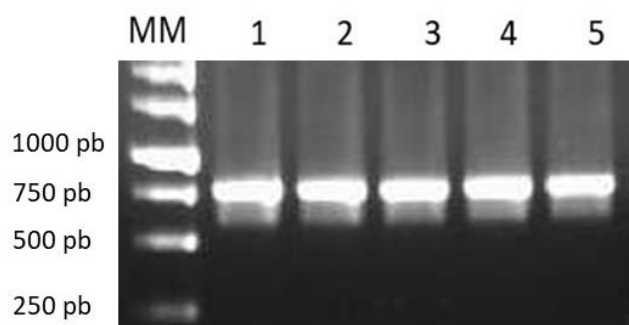
Figura 5. Produto de amplificação obtido com o conjunto de iniciadores 1. MM: marcador molecular 1kb (Thermo Scientific™ *GeneRuler*™). Gel de agarose 1 %.



Fonte: autoria própria.

Para confirmação da clonagem do produto de amplificação obtido em vetor pGEM-T, foi realizada extração de DNA plasmidial de transformantes de *E.coli*, linhagem DH5 α , seguida da amplificação do inserto de interesse. A figura a seguir demonstra a presença do vetor de clonagem, acrescido do inserto, nos clones analisados.

Figura 6. Amplificação do gene da xilanase presente no vetor pGEM-T em transformantes de *E. coli*, linhagem DH5 α . MM: marcador molecular 1 kb (Thermo Scientific™ *GeneRuler*™), 1 a 5: transformantes selecionados.



Fonte: autoria própria.

4.3. Análise da sequência obtida

Após sequenciamento e comparação da sequência obtida com as disponíveis no banco de dados do GenBank, constatou-se que o inserto amplificado apresenta 783 nucleotídeos em sua composição e elevada similaridade com sequência codificadora de uma glicosil hidrolase pertencente à família 11, do microrganismo *Myceliophthora thermophila* (número de acesso: XM_003667251.1, E-value: $4e^{-122}$, identidade: 99 %). A sequência inicia-se com o códon ATG e possui o códon de terminação TAA em sua porção final. Um provável íntron, com 126 pb, foi identificado, conforme alinhamento da figura 7, realizado com uso da ferramenta Clustal Omega.

A presença do íntron foi confirmada com uso da ferramenta Genscan Output (http://genes.mit.edu/cgi-bin/genscanw_py.cgi), que também forneceu a sequência da proteína, a qual apresenta 218 aminoácidos (figura 8). Quando comparada a sequências disponíveis no banco de dados GenBank, a sequência de aminoácidos obtida apresentou 100 % de similaridade com uma glicosil hidrolase da família 11, de *Myceliophthora thermophila* (figura 9).

Figura 7. Alinhamento da sequência obtida (Mh) com sequência codificadora de xilanase do fungo *Myceliophthora thermophila* (Mt) (Clustal Omega).

Mh	ATGGTCTCGTTCACCTCTCCTCCTCACGGCCATCGCCGCTGCGGTGACGACGGCCAGCCCT	60
Mt	ATGGTCTCGTTCACCTCTCCTCCTCACGGCCATCGCCGCTGCGGTGACGACGGCCAGCCCT *****	60
Mh	CTCGAGGTGGTCAAGCGCGGCATCCAGCCGGGCACGGGCACCCACGAGGGGTACTTCTAC	120
Mt	CTCGAGGTGGTCAAGCGCGGCATCCAGCCGGGCACGGGCACCCACGAGGGGTACTTCTAC *****	120
Mh	TCGTTCTGGACCGACGGCCGTGGCTCGGTCGACTTCAACCCCGGGCCCCGCGGCTCGTAC	180
Mt	TCGTTCTGGACCGACGGCCGTGGCTCGGTCGACTTCAACCCCGGGCCCCGCGGCTCGTAC *****	180
Mh	AGCGTCACCTGGAACAACGTCAACAACCTGGGTTGGCGGCAAGGGCTGGAACCCGGGCCCG	240
Mt	AGCGTCACCTGGAACAACGTCAACAACCTGGGTTGGCGGCAAGGGCTGGAACCCGGGCCCG *****	240
Mh	CCGCGCAAGATTGCGTACAACGGCACCTGGAACAACCTACAACGTGAACAGCTGTGCGTTG	300
Mt	CCGCGCAAGATTGCGTACAACGGCACCTGGAACAACCTACAACGTGAACAGC----- *****	300
Mh	TCCTCCTCTTTCTCCCTTTTCGCTTGTTCCTTGATGATTGGGATCCATTTTAAAAGAGA	360
Mt	-----	360
Mh	AGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAGGAAAATAGAAGATAACTAACGCCAAGCTCTGGCAGAC	420
Mt	-----TAC **	420
Mh	CTCGCCCTGTACGGCTGGACTCGCAACCCGCTGGTTCGAGTATTACATCGTGGAGGCATAC	480
Mt	CTCGCCCTGTACGGCTGGACTCGCAACCCGCTGGTTCGAGTATTACATCGTGGAGGCATAC *****	480
Mh	GGCACGTACAACCCCTCGTCGGGCACGGCGCGGCTGGGCACCATCGAGGACGACGGCGGC	540
Mt	GGCACGTACAACCCCTCGTCGGGCACGGCGCGGCTGGGCACCATCGAGGACGACGGCGGC *****	540
Mh	GTGTACGACATCTACAAGACGACGCGGTACAACCAGCCGTCATCGAGGGACCTCCACC	600
Mt	GTGTACGACATCTACAAGACGACGCGGTACAACCAGCCGTCATCGAGGGACCTCCACC *****	600
Mh	TTCGACCAGTACTGGTCCGTCGCGCCGAGAGCGCGTTCGCGGCACCATCGACACGGGC	660
Mt	TTCGACCAGTACTGGTCCGTCGCGCCGAGAGCGCGTTCGCGGCACCATCGACACGGGC *****	660
Mh	AAGCACTTTGACGAGTGGAAGCGCCAGGGCAACCTCCAGCTCGGCACCTGGAAC TACATG	720
Mt	AAGCACTTTGACGAGTGGAAGCGCCAGGGCAACCTCCAGCTCGGCACCTGGAAC TACATG *****	720
Mh	ATCATGGCCACCGAGGGCTACCAGAGCTCTGGATCGGCCACTATCGAGGTCCGGGAGGCA	780
Mt	ATCATGGCCACCGAGGGCTACCAGAGCTCTGGATCGGCCACTATCGAGGTCCGGGAGGCA *****	780
Mh	TAA	840
Mt	TAA ***	840

Fonte: autoria própria.

De acordo com o banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active enZymes), que reúne enzimas envolvidas na quebra, modificação ou criação de ligações glicosídicas, agrupando-as em diversas famílias (LOMBARD et al., 2014), enzimas classificadas na família 11 são exclusivamente xilanases. Portanto, o isolamento de um gene codificador de xilanase do fungo *M. heterothallica* foi realizado com sucesso.

Figura 8. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo gene obtido (Mh), com sequência de aminoácidos de uma xilanase do fungo *Myceliophthora thermophila* (Mt) (Clustal Omega). Os resíduos catalíticos estão destacados em negrito (posições 111 e 203).

Mh	MVSFTLLLLTAIAAAVTTASPLEVVKRGIQPGTGTHEGYFYSEFWTDGRGSVDFNPGPRGSY	60
Mt	MVSFTLLLLTAIAAAVTTASPLEVVKRGIQPGTGTHEGYFYSEFWTDGRGSVDFNPGPRGSY	60

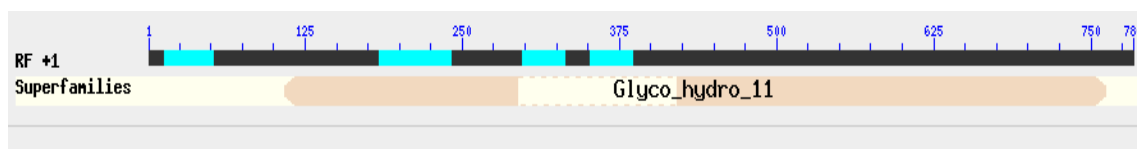
Mh	SVTWNNVNNWVGKGWNPGRKIAAYNGTWNNYNVNSYLALYGWTRNPLV E YYIVEAYGT	120
Mt	SVTWNNVNNWVGKGWNPGRKIAAYNGTWNNYNVNSYLALYGWTRNPLV E YYIVEAYGT	120

Mh	YNPSSGTARLGTIEDDGGVYDIYKTTRYNQPSIEGTSTFDQYWSVRRQKRVGGTIDTGKH	180
Mt	YNPSSGTARLGTIEDDGGVYDIYKTTRYNQPSIEGTSTFDQYWSVRRQKRVGGTIDTGKH	180

Mh	FDEWKRQGNLQLGTWNYMIMATE E GYQSSGSATIEVREA	240
Mt	FDEWKRQGNLQLGTWNYMIMATE E GYQSSGSATIEVREA	240

Fonte: autoria própria.

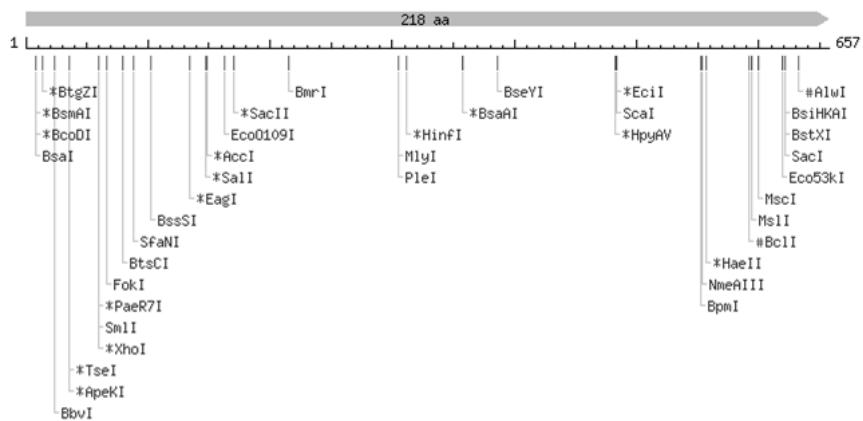
Figura 9. Comparação da sequência de aminoácidos obtida com sequências disponíveis no banco de dados GenBank NCBI, indicando que a proteína pertence à família GH11.



Fonte: autoria própria.

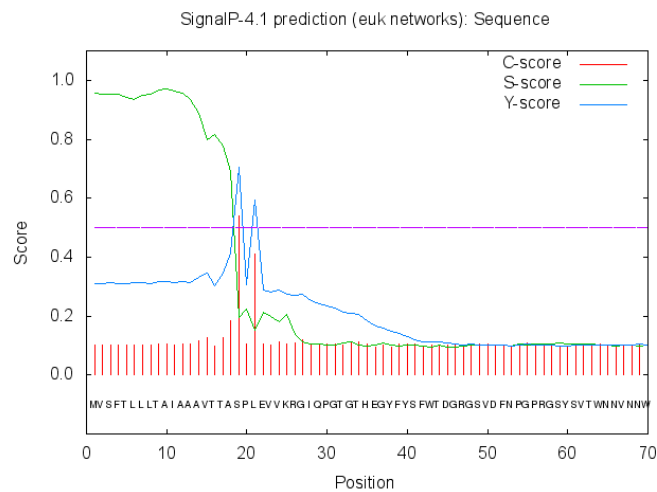
Sítios de restrição presentes na sequência de nucleotídeos também foram identificados através do Nebcutter (figura 10). Esta etapa foi essencial para a seleção das enzimas de restrição a serem utilizadas para digestão do inserto e posterior ligação do mesmo ao vetor de expressão. Um peptídeo sinal entre os aminoácidos 1 a 18 também foi identificado, conforme análise através do Signal P (figura 11).

Figura 10. Análise dos sítios de restrição encontrados na sequência de nucleotídeos isolada (Nebcutter).



Fonte: autoria própria.

Figura 11. Predição de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos codificada pelo gene obtido no presente estudo (Signal P 4.1).



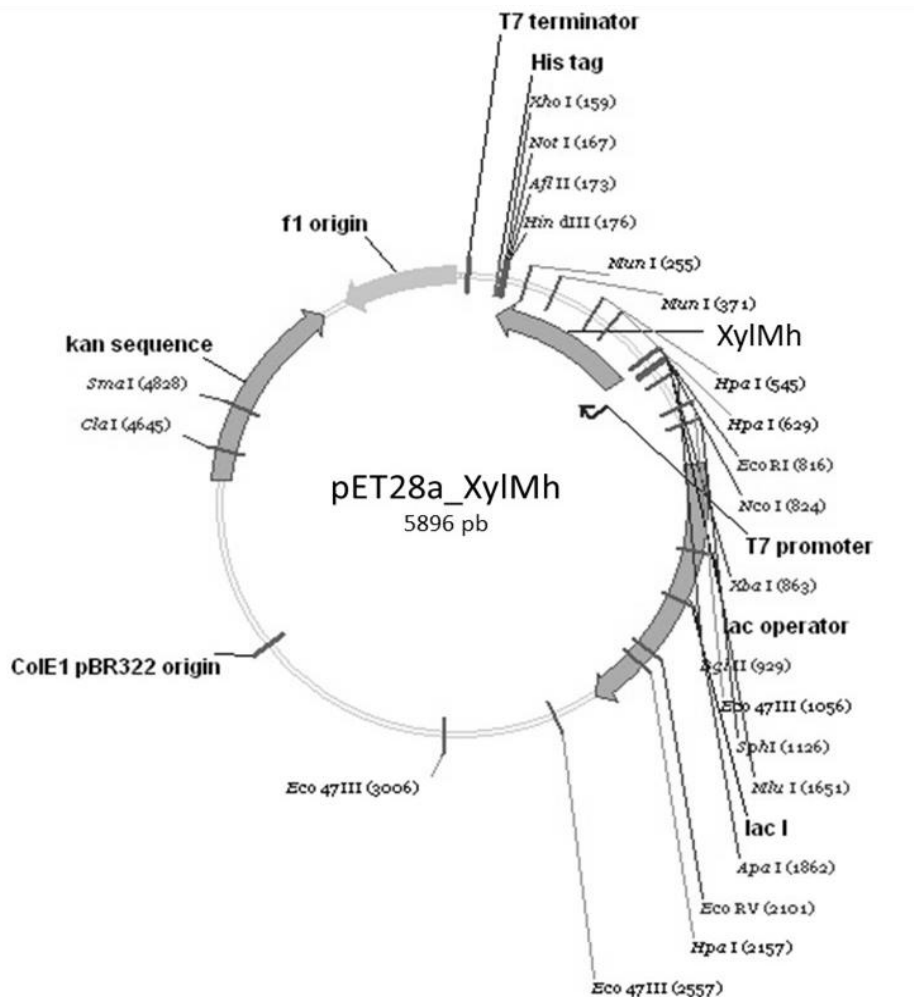
Fonte: autoria própria.

4.4. Obtenção do vetor de expressão e transformação

Conforme descrito anteriormente, esta etapa foi realizada pela empresa Fastbio, a qual também realizou a síntese da sequência sem a presença do íntron e do peptídeo sinal. Optou-se pela síntese do gene devido às dificuldades que foram encontradas durante a etapa de remoção do íntron e ligação ao vetor de expressão. O mapa do vetor de expressão está apresentado na figura 12.

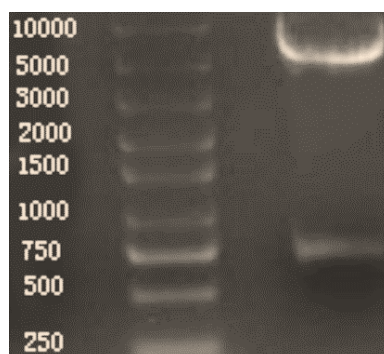
A digestão do vetor pET-28a_XylMh, com as enzimas *Nco*I e *Not*I, foi realizada para confirmação da ligação do inserto de interesse. A figura 13 demonstra que a ligação foi realizada com sucesso, uma vez que, após a digestão, o inserto foi liberado.

Figura 12. Mapa do vetor de expressão (pET-28a_XylMh).



Fonte: imagem fornecida pela empresa Fastbio.

Figura 13. Eletroforese demonstrando a digestão do vetor de expressão com as enzimas *NcoI* e *NotI*.



Fonte: imagem fornecida pela empresa Fastbio.

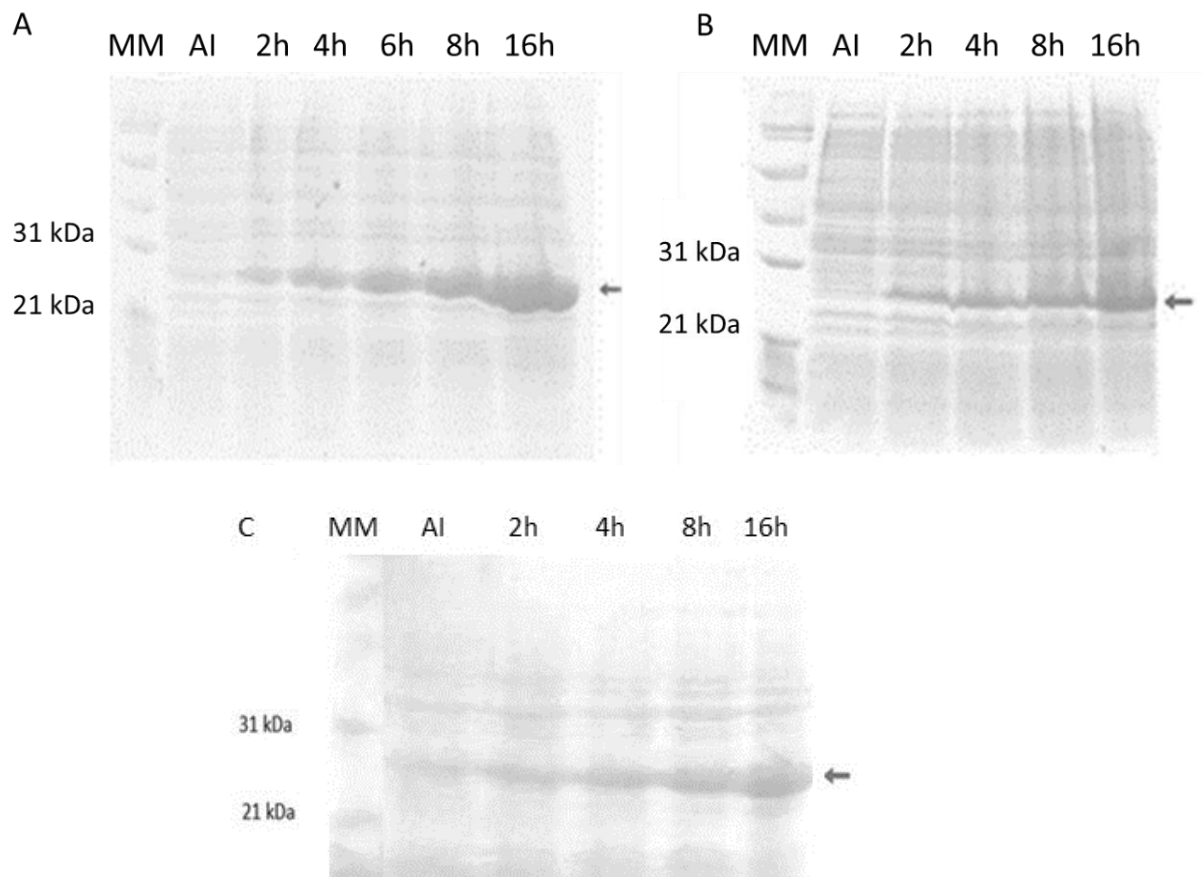
O sequenciamento de plasmídeos extraídos de transformantes das linhagens Origami 2(DE3), Rosetta-gami 2(DE3) e BL21 (DE3) confirmou a presença do vetor de expressão, assim seguiram-se os ensaios de expressão da xilanase recombinante.

4.5. Ensaio de expressão da proteína recombinante

A análise em SDS-PAGE dos *pellets* celulares resultantes do ensaio de expressão conduzido a 20 °C, demonstrou a produção da enzima de interesse, r-ec-XylMh, uma vez que é possível observar uma banda com tamanho compatível ao esperado com elevado nível de expressão (figura 14) nas três linhagens bacterianas testadas. Duas horas após a adição do IPTG, já foi possível observar a enzima recombinante, de modo que sua expressão aumentou progressivamente até 16 horas de indução.

A massa molecular da proteína foi estimada através da relação entre a mobilidade relativa das bandas e o log da massa molecular do marcador, tendo sido estimado o valor de 25 kDa, muito próximo do valor estimado pela ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), que foi 24,8 kDa. Ainda, de acordo com o ProtParam, o ponto isoelétrico (pI) da enzima seria de 6,83.

Figura 14. Análise de pellets celulares lisados por aquecimento em diferentes períodos de indução da expressão da proteína recombinante (0 a 16 h após a adição de IPTG 0,5 mM) por SDS-PAGE. AI: antes da indução. A: Linhagem Origami 2(DE3); B: Linhagem Rosetta-gami 2(DE3); C: Linhagem BL21 (DE3). MM: marcador molecular *Broad Range*, Bio-Rad. A seta indica a expressão da proteína de interesse (aproximadamente 25 kDa).



Fonte: autoria própria.

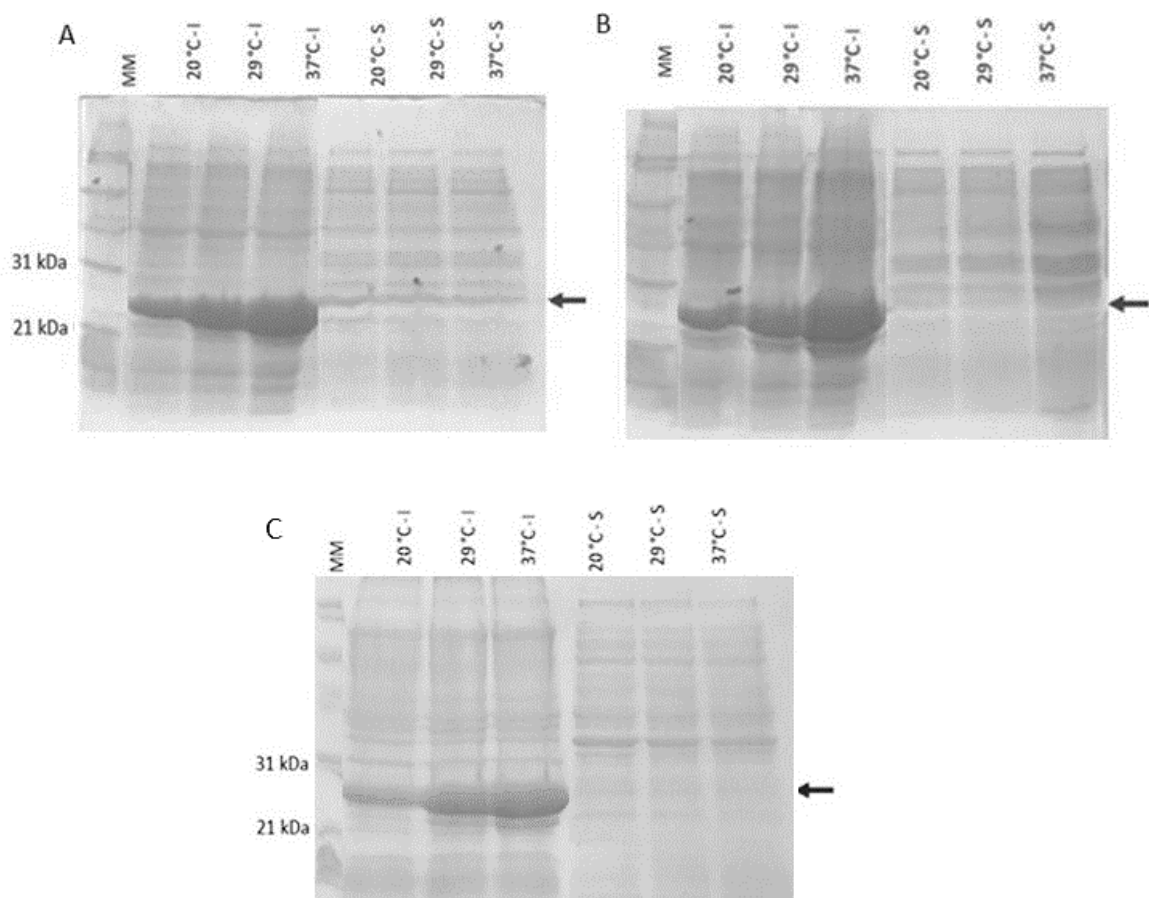
4.6. Análise da solubilidade da proteína recombinante

O teste de solubilidade indicou que a expressão da proteína predominou na fração insolúvel nas três linhagens de *E. coli* e em todas as temperaturas testadas. Na linhagem Origami 2(DE3), porém, observou-se maior quantidade da xilanase na fração solúvel, de modo que esta linhagem foi a escolhida para o prosseguimento dos experimentos (figura 15).

Dentre as temperaturas avaliadas, 20 e 29 °C apresentaram-se como as mais apropriadas para a obtenção da xilanase r-ec-XylMh na fração solúvel, uma vez que

é possível notar um nível ligeiramente maior de expressão da enzima recombinante nestas condições. Estes resultados corroboram com o esperado, uma vez que a diminuição da temperatura de cultivo é uma das estratégias empregadas para o aumento da solubilidade de proteínas recombinantes.

Figura 15. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para mostrar os níveis de expressão das proteínas recombinantes na fração insolúvel (I) e solúvel (S) em diferentes temperaturas de indução. A: linhagem Origami 2(DE3); B: linhagem Rosetta-gami 2(DE3); C: linhagem BL21 (DE3). MM: marcador molecular *Broad Range*, Bio-Rad.



Fonte: autoria própria.

A insolubilidade de proteínas recombinantes ocorre devido à formação de corpos de inclusão, fato que constitui um dos principais desafios na expressão heteróloga de proteínas em hospedeiros procariotos. Assim como observado neste trabalho, Yin e colaboradores (2008) reportaram baixa solubilidade de uma xilanase

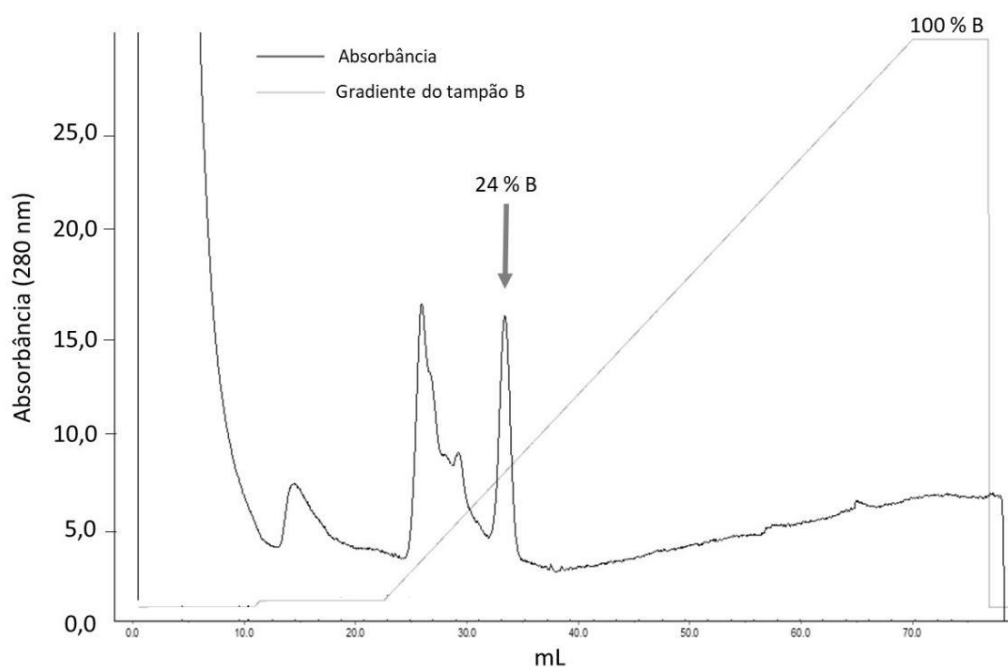
recombinante expressa em *E. coli*, proveniente do fungo *Thermomyces lanuginosus*. Resultado semelhante também foi reportado para a expressão de uma xilanase de *Trichoderma reesei* (OGASAWARA et al., 2006).

A quantidade de xilanase recombinante obtida na forma solúvel, porém, foi suficiente para a realização das etapas posteriores de purificação e caracterização da enzima, dando-se prosseguimento aos experimentos. A produção da enzima foi de $14,75 \text{ U mL}^{-1}$ após o cultivo em larga escala e rompimento das células.

4.7. Purificação da proteína

A eluição da proteína recombinante da resina de afinidade ocorreu quando a concentração do tampão B atingiu 24 % (figura 16).

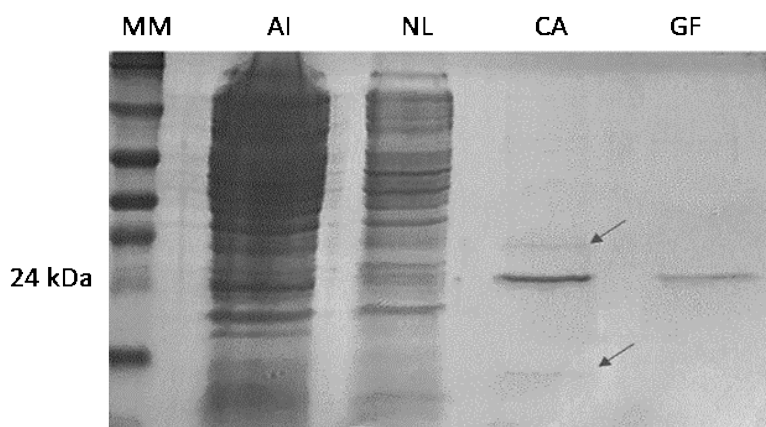
Figura 16. Perfil de eluição da amostra em cromatografia de afinidade. A seta indica o pico correspondente à enzima r-ec-XylMh.



Fonte: autoria própria.

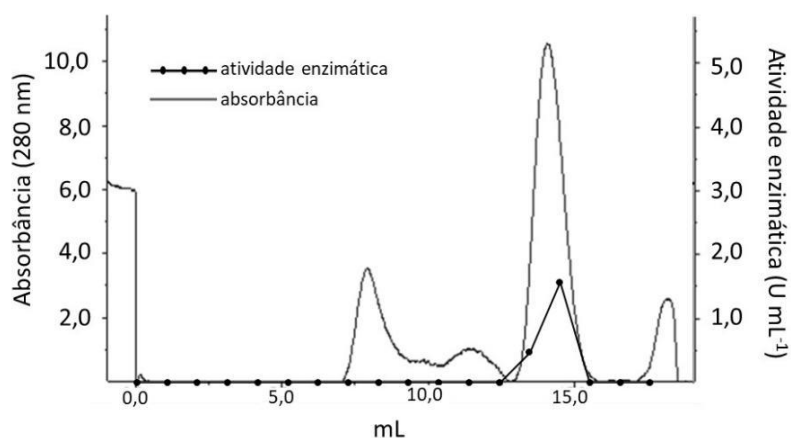
A análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) após a purificação, revelou a presença de outras proteínas, além da xilanase, na amostra (uma com cerca de 30 kDa e outra com aproximadamente 15 kDa) (figura 17). Assim, para melhor purificação da proteína de interesse, uma segunda etapa foi necessária, por meio de filtração em gel (figura 18), após a qual a amostra mostrou-se completamente purificada.

Figura 17. Análise eletroforética (SDS-PAGE) das amostras após etapas de purificação. MM: marcador molecular *Rainbow High Range* GE HealthCare; AI: amostra injetada; NL: proteínas não ligadas à coluna de afinidade; CA: amostra eluída após cromatografia de afinidade; GF: amostra após filtração em gel em resina Superdex 75. As setas indicam proteínas contaminantes presentes na amostra após a cromatografia de afinidade.



Fonte: autoria própria.

Figura 18. Perfil de eluição da amostra em cromatografia de gel filtração (resina Superdex 75).



Fonte: autoria própria.

A tabela a seguir apresenta os resultados obtidos quanto à concentração proteica (mg), atividade total (U) e específica (U mg⁻¹), bem como o rendimento (%) e grau de purificação obtidos em cada etapa realizada.

Tabela 2. Tabela de purificação da xilanase recombinante expressa em *E. coli*.

	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U mg⁻¹)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato	82,94	162,25	1,95	100,00	1,0
Afinidade	0,42	29,21	70,25	18,00	36,0
Gel filtração	0,13	11,31	87,26	6,97	44,1

Fonte: autoria própria.

A recuperação da xilanase foi de 18 % após a cromatografia de afinidade, com purificação de 36 vezes. A recuperação final, após filtração em gel, foi de aproximadamente 7 %, com purificação de cerca de 44 vezes. Ao realizarem a purificação de uma xilanase recombinante por meio de cromatografia de afinidade, Guo e colaboradores (2009) obtiveram recuperação de 17,4 %. Valor de recuperação semelhante também foi reportado por Blank e colaboradores (2014) ao purificarem uma xilanase recombinante de *Thermus brockianus* em coluna de afinidade Ni-NTA.

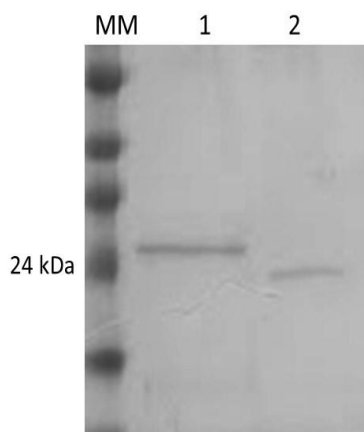
Uma análise da amostra por DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) foi conduzida em colaboração com o grupo de pesquisa dirigido pelo professor Dr. Rhaguvir K. Arni (UNESP/IBILCE) e indicou que a enzima encontrava-se monodispersa, apresentando elevada pureza.

4.8. Remoção da cauda de histidina

Após completa purificação, foi realizada a remoção da cauda de histidina da enzima com TEV protease. Como é possível observar na figura 19, a remoção da His-

tag foi obtida com sucesso, visto que, após o tratamento com TEV protease, verifica-se a diminuição da massa molecular da proteína.

Figura 19. Análise eletroforética (SDS-PAGE) de r-ec-XylMh após remoção da His-tag. MM: Marcador molecular *Rainbow High Range* GE HealthCare. 1: enzima contendo a cauda de histidina; 2: enzima sem a His-tag.



Fonte: autoria própria.

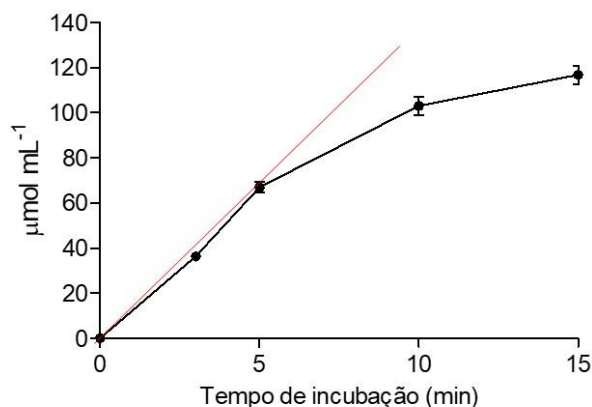
4.9. Caracterização bioquímica da enzima recombinante

4.9.1. Determinação do tempo de incubação

Como a análise cinética formulada por Michaelis e Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913) se baseia na taxa ou velocidade inicial de reação, a análise revelou que o tempo de incubação ideal para a reação enzimática é de 5 minutos, assegurando um aumento linear da liberação do produto em função do tempo. Aos 10 minutos de reação, porém, a inclinação diminuiu, demonstrando um decréscimo da taxa ou velocidade da reação (figura 20).

Com base nestes resultados, determinou-se 5 minutos como o período ideal para a reação enzimática, tendo sido utilizado este tempo de incubação em todos os ensaios subsequentes.

Figura 20. Determinação do período de incubação ideal para cálculo da velocidade inicial de reação da xilanase recombinante.



Fonte: autoria própria.

4.9.2. Efeito da cauda de histidina na ação enzimática

Muitas enzimas expressas heterologicamente são caracterizadas com a cauda de histidina, visto que, frequentemente, a mesma não causa interferência na atividade enzimática (CARSON et al., 2007) e elimina-se um passo no isolamento, diminuindo-se também o custo. Para verificar se essa observação se aplicava também à xilanase r-ec-XylMh, a atividade da enzima com e sem a cauda de histidina foi avaliada nos ensaios para determinação de pH e temperatura ótimos.

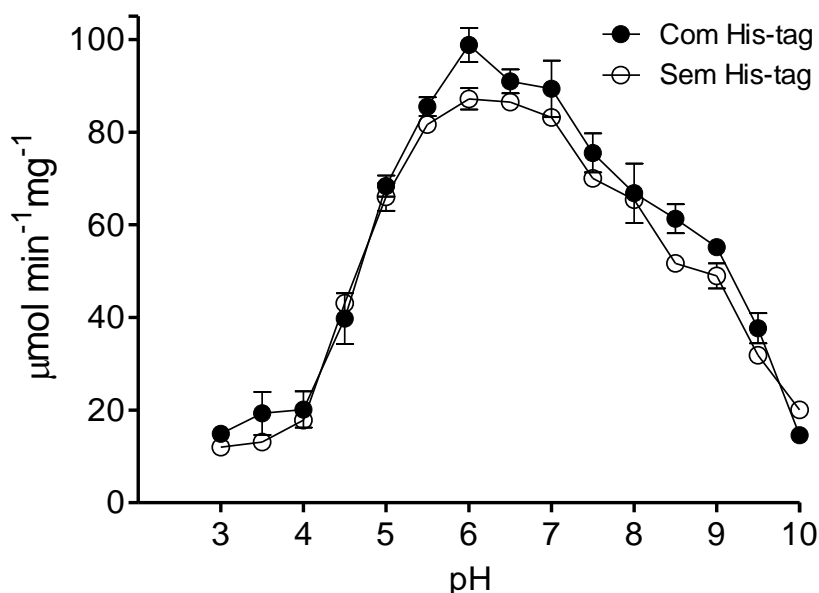
Cabe lembrar que também o sítio de clivagem para remoção da His-tag pela TEV protease faz parte da estrutura, somando com a cauda de His 13 resíduos.

4.9.3. Determinação do pH ótimo

A determinação do pH ótimo foi realizada tanto para a enzima com a cauda de histidina quanto para a enzima que foi tratada com a TEV protease. Para ambos os casos, o comportamento da enzima foi semelhante e a maior atividade xilanolítica foi observada entre os valores de pH 5,5 e 7,0. Para a xilanase com cauda de histidina, nota-se que em pH 6,0 a enzima apresenta maior atividade específica (102,2 µmol

min⁻¹ mg⁻¹). Já a enzima sem a cauda de histidina apresentou atividade específica inferior, com valor máximo de 87,2 μmol min⁻¹ mg⁻¹, também em pH 6,0 (figura 21).

Figura 21. Efeito do pH na atividade xilanolítica.



Fonte: autoria própria.

Uma queda mais brusca da atividade específica foi observada em valores de pH mais ácidos (abaixo de 6,0). Em alguns valores de pH básicos (8,0 a 9,0), a enzima manteve atividade específica superior a 50 % da máxima obtida, porém, em valores superiores (9,5 e 10,0) notou-se uma queda acentuada da ação enzimática.

Diversas xilanases com valores de pH ótimo iguais ou próximos ao que foi observado neste estudo encontram-se descritas na literatura. Um exemplo é a xilanase recombinante proveniente do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, expressa em *E. coli*, a qual apresentou pH ótimo 6,0 (YIN et al., 2008).

Duas xilanases nativas purificadas de *Myceliophthora thermophila* também apresentaram valores de pH ótimo levemente ácidos. Uma das enzimas, que possui massa molecular de 30 kDa, exibiu atividade específica máxima em valores de pH

entre 5,5 e 6,5, enquanto a outra, com massa molecular de 22 kDa, apresentou atividade específica máxima entre 5,5 e 6,0 (VAN GOOL et al., 2013).

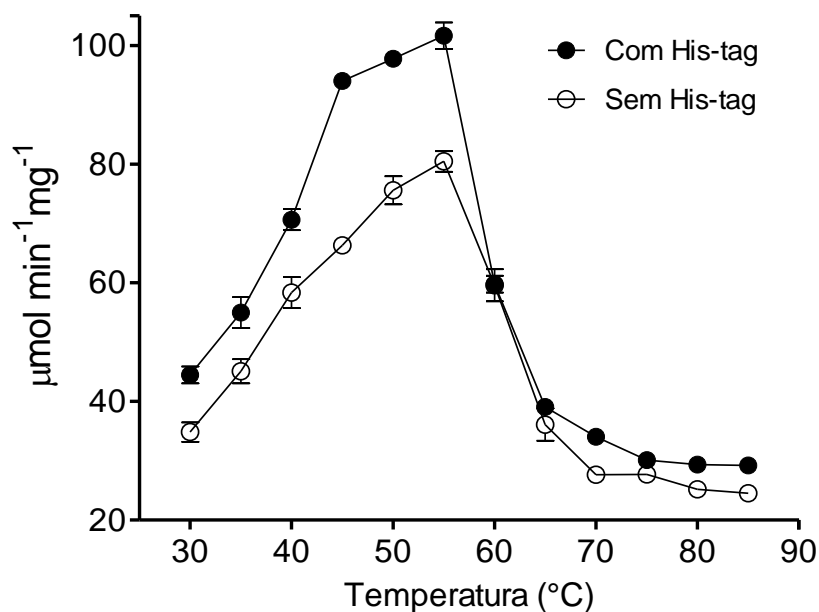
Xilanases da família GH11 apresentam grande similaridade estrutural, porém, os valores de pH ótimo podem ser extremamente variáveis (entre 2,0 e 11,0). Estas enzimas possuem dois resíduos de glutamato altamente conservados que são cataliticamente ativos. Um deles atua como um nucleófilo e o outro como catalisador ácido/base, de modo que os valores de pH ótimo apresentam correlação com o resíduo adjacente ao catalisador ácido/base. Nas xilanases com pH ótimo acima de 5,0, este resíduo é a asparagina e nas xilanases com pH ótimo abaixo de 5,0, este resíduo é o ácido aspártico (JOSHI et al., 2000; LI; WANG, 2011).

Sapag e colaboradores (2002) determinaram a posição do resíduo adjacente ao catalisador ácido/base através do alinhamento de diversas sequências de xilanases de microrganismos. A análise da sequência obtida neste estudo revela que nesta posição, há a presença de um resíduo de asparagina, de modo que seria esperado um pH ótimo acima de 5,0, o que foi observado.

4.9.4. Determinação da temperatura ótima

Assim como para a determinação do pH ótimo, este ensaio também foi conduzido com a enzima recombinante com e sem a cauda de histidina. Novamente, o comportamento da enzima em ambas as condições foi similar, porém, a enzima sem a cauda de histidina apresentou atividade específica inferior à da enzima com His-tag (figura 22). Nas duas situações, a enzima apresentou atividade específica maior na temperatura de 55 °C ($101,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para a enzima contendo a cauda e $80,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para a enzima sem a his-tag).

Figura 22. Efeito da temperatura na atividade xilanólítica em tampão MES, pH 6,0.



Fonte: autoria própria.

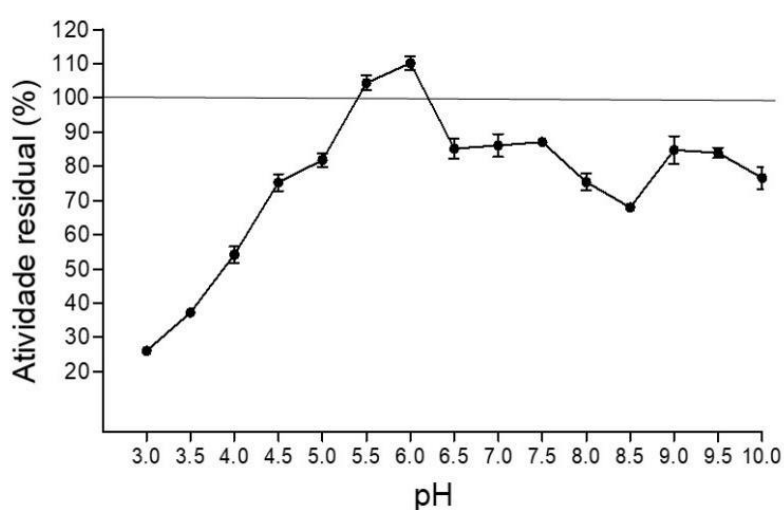
Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com o de Van Gool e colaboradores (2013), que encontraram valores de temperaturas ótimas entre 50 a 60 °C para duas xilanases nativas de *M. thermophila*. Xilanases recombinantes desse mesmo fungo expressas em *Pichia pastoris*, apresentaram valores de temperatura ótima de 60 °C (BASIT et al., 2018).

Os resultados demonstram que a His-tag não causa interferência significativa, e que ainda, houve elevação da atividade específica da enzima contendo a cauda. Além disso, a remoção da cauda requer a incubação da enzima alvo com proteases por longos períodos, o que pode ser prejudicial, bem como uma etapa adicional de purificação (JENNY; MANN; LUNDBLAD, 2003). Assim, os demais experimentos foram conduzidos com a enzima contendo a His-tag.

4.9.5. Estabilidade em relação ao pH

A enzima recombinante apresentou estabilidade em um amplo espectro de pH, mantendo atividade residual superior a 70 % entre valores de pH 4,5 a 10,0. A atividade residual máxima de r-ec-XylMh foi encontrada com a enzima incubada em pH 6,0 (110 %), no qual a mesma apresenta maior atividade (figura 23).

Figura 23. Efeito do pH na estabilidade de r-ec-XylMh com cauda de histidina após 24 h de incubação a 4 °C. O controle (100 %) foi incubado com água ultrapura.



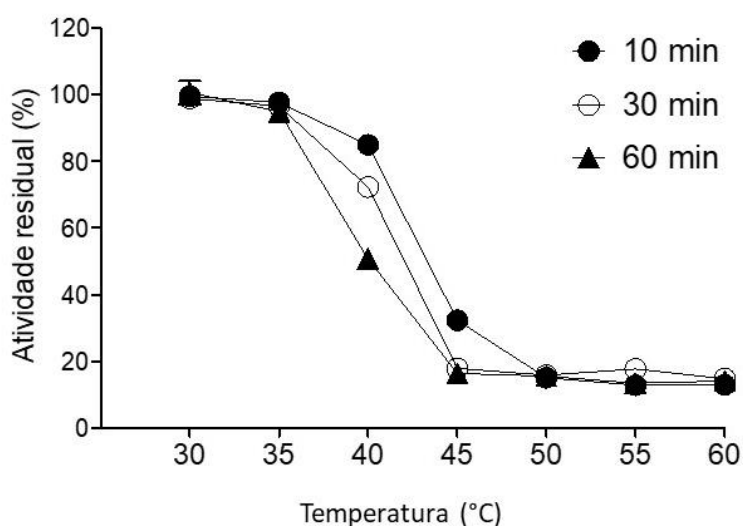
Fonte: autoria própria.

A ampla estabilidade em relação ao pH parece ser uma característica recorrente entre xilanases. Uma xilanase de *Aspergillus niger* apresentou comportamento bastante similar ao apresentado pela enzima recombinante deste estudo, com baixa atividade residual (inferior a 20 %) quando incubada em valores de pH mais ácidos (entre 3,0 e 4,0), e maior atividade quando incubada em valores de pH entre 5,0 e 10,0 (KRISANA et al., 2005). Li e colaboradores (2006) relataram que uma xilanase de *Paecilomyces thermophila* apresentou atividade residual próxima a 100 % quando incubada em valores de pH variando entre 6,0 e 10,0.

4.9.6. Estabilidade térmica

Apesar da temperatura ótima da xilanase recombinante ser 55 °C, a enzima não se mostrou estável nesta temperatura na ausência do substrato. A xilanase manteve 72 % da atividade quando exposta a 40 °C por 30 minutos, e cerca de 50 % de atividade residual quando exposta à mesma temperatura por 60 minutos. Em temperaturas superiores a 40 °C, r-ec-XylMh apresentou baixa termoestabilidade (figura 24).

Figura 24. Efeito da temperatura na estabilidade de r-ec-XylMh com His-tag. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos nas condições ótimas de temperatura e pH.



Fonte: autoria própria.

Rigoldi et al (2018) e Gomes e colaboradores (2007) ressaltam que os mecanismos moleculares envolvidos com a termoestabilidade de proteínas não estão completamente elucidados, porém, algumas características parecem estar presentes mais frequentemente em proteínas termoestáveis, tais como o “efeito hidrofóbico”, ligações dissulfeto e glicosilação. Em relação às ligações dissulfeto, as mesmas não parecem exercer importante papel na termoestabilização de xilanases da família

GH11, uma vez que resíduos de cisteína não são comuns nas sequências destas proteínas (SAPAG et al., 2002).

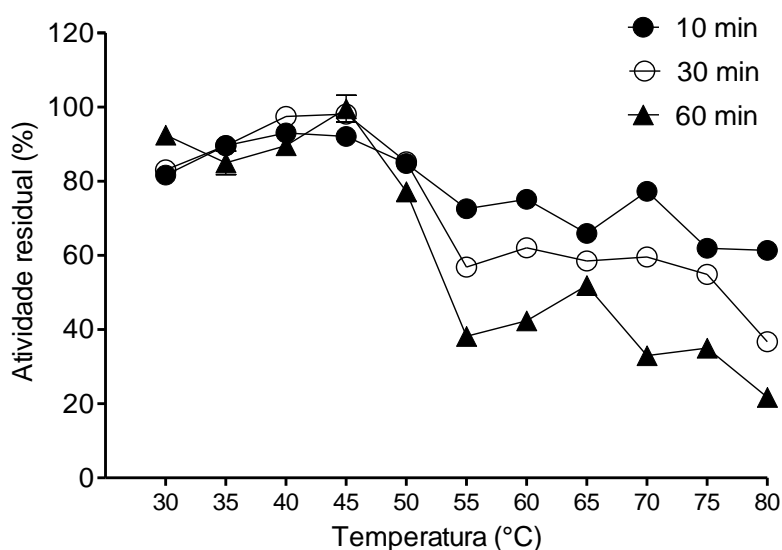
Quanto à glicosilação, a análise da sequência da xilanase recombinante obtida neste trabalho, feita na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> da *Technical University of Denmark*, revela um possível sítio de N glicosilação (Asn-86), de maneira que é possível deduzir de que se trata de uma glicoproteína. Um segundo sítio potencial de N glicosilação provavelmente não ocorre devido à existência de um resíduo de prolina após o de asparagina (Anexo 1). A baixa termoestabilidade observada pode ser decorrente do fato do sistema de expressão procaríoto não realizar esta modificação pós-traducional. Ao expressar uma celulase de *M. heterothallica* em *E. coli* e *P. pastoris*, Bezerra-Bussoli (2016) relatou a ocorrência de glicosilação e maior termoestabilidade na proteína expressa no sistema eucarioto.

Xilanases termoestáveis, porém, já foram expressas com sucesso em *E. coli*. Um exemplo é a xilanase do fungo *Paecilomyces thermophila*, a qual exibiu 60 % de atividade residual após exposição a 85 °C por 30 minutos (ZHANG et al., 2010).

O ensaio de termoestabilidade também foi realizado na presença de glicerol a 50 %, uma vez que este poliálcool, considerado um osmólito estabilizador, pode promover um efeito protetor em enzimas, conferindo a elas, maior termoestabilidade. Isto se deve ao fato do glicerol formar ligações de hidrogênio que contribuem para a manutenção da conformação nativa da proteína. Outra hipótese para a estabilização estrutural, é a formação de uma camada viscosa ao redor da proteína, que reduz sua mobilidade, chamada em inglês de “*mechanical entrapment*” (PAUL; PAUL, 2015). O efeito estabilizador deste aditivo, porém, não é válido para todas as enzimas, uma vez que depende do caráter hidrofílico/hidrofóbico das mesmas (GEORGE; AHMAD; RAO, 2001).

Na presença de glicerol a 50 %, a termoestabilidade da xilanase recombinante foi significativamente superior (figura 25). Quando incubada a 50 °C por uma hora, a enzima manteve sua atividade residual próxima a 80 %. A 65 e 70 °C, a atividade residual mantida foi de aproximadamente 50 e 30 %, respectivamente, quando incubada pelo mesmo período.

Figura 25. Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase recombinante com His-tag em presença de glicerol 50 %. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos nas condições ótimas de temperatura e pH.



Fonte: autoria própria.

Uma xilanase de *Thermomyces lanuginosus* também apresentou melhora significativa em relação à termoestabilidade na presença de glicerol a 20 %. Quando exposta a 70 °C por 30 minutos, a atividade residual da enzima na ausência de glicerol foi próxima a 15 %, na presença de glicerol, porém, a atividade residual, quando sujeita às mesmas condições, foi de cerca de 80 % (CESAR; MRSA, 1996). Efeito similar foi relatado por Shah e Madamwar (2005) ao caracterizarem uma xilanase de *Aspergillus foetidus*.

4.9.7. Efeito de íons

Cinco dos 12 íons testados induziram decréscimo da atividade da xilanase recombinante na concentração de 1 mmol L⁻¹ e dez na concentração de 10 mmol L⁻¹ (tabela 3), não sendo observada nenhuma elevação significativa.

Tabela 3. Efeito de íons clorados na concentração de 1 e 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade xilanólítica da enzima r-ec-XylMh. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student.

	1 mmol L ⁻¹		10 mmol L ⁻¹	
	Atividade Residual (%)	± DP	Atividade Residual (%)	± DP
AlCl ₃	88,05*	0,56	59,36*	2,28
CaCl ₂	82,55*	3,26	80,58*	2,01
CoCl ₂	88,59*	1,70	85,63*	0,94
CuCl ₂	100,27	1,93	84,61*	2,94
FeCl ₃	97,05	4,93	67,10*	2,46
HgCl ₂	101,61	1,13	93,15*	2,08
KCl	94,50	2,46	99,46	0,75
LiCl	96,38	3,60	91,14*	1,51
MgCl ₂	95,84	1,32	93,02	4,17
MnCl ₂	91,95*	2,02	83,44*	2,48
NiCl ₂	96,65	0,56	80,40*	1,13
ZnCl ₂	89,53*	1,87	61,33*	1,51
Controle	100,00	2,69	100,00	2,69

Fonte: autoria própria.

Os efeitos mais notáveis foram encontrados quando realizada a adição de Al³⁺, Zn²⁺ e Fe³⁺ na concentração de 10 mmol L⁻¹ (nesses casos, a atividade residual da enzima foi de 59, 61 e 67 %, respectivamente). O efeito destes íons na diminuição da atividade enzimática foi reportado para outras xilanases (SONG et al., 2013; ZHOU et al., 2009). Nenhum íon, porém, anulou a ação da enzima. Assim, é possível inferir

que a xilanase possui independência em relação a co-fatores e tolerância à presença da maioria dos íons testados.

4.9.8. Efeito de reagentes e solventes

Assim como observado para íons, alguns reagentes e solventes podem também afetar a ação enzimática. O efeito de ativação por componentes não metálicos é um diferencial para aplicação de enzimas em bioprocessos que, muitas vezes, são realizados na presença de vários aditivos ou compostos liberados após pré-tratamentos.

Tabela 4. Efeito de reagentes e solventes (concentração: 10 mmol L⁻¹) sobre a atividade xilanolítica de r-ec-XylMh. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student.

	Atividade Residual (%)	± DP
SDS	18,92*	0,08
Etanol	93,58	3,42
EDTA	87,31*	4,11
Acetona	96,89	1,64
Isopropanol	91,93*	1,44
Triton X-100	98,30	2,57
Glicerol	112,85*	2,25
Controle	100,00	2,19

Fonte: autoria própria.

Dentre os compostos analisados, porém, apenas o glicerol gerou um pequeno aumento na atividade enzimática ainda que em baixa concentração, enquanto o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) gerou uma drástica redução, visto que em sua presença, a enzima manteve apenas 18 % da atividade residual (tabela 4).

A diminuição da atividade enzimática devido ao SDS já foi descrita para diversas xilanases. Um exemplo é a xilanase de *Trichoderma inhamatum*, cuja atividade residual após exposição ao SDS a 2 mmol L⁻¹ foi de 12 %; na concentração de 10 mmol L⁻¹, o SDS anulou por completo a ação desta enzima (SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015). Este efeito ocorre porque o SDS apresenta uma porção hidrofóbica que se liga às proteínas, desestabilizando a sua estrutura tridimensional e promovendo seu desenovelamento, enquanto a porção hidrofílica tem carga negativa, promovendo repulsão eletrostática entre as moléculas de SDS e, dessa forma, a extensão da cadeia desenovelada (VOET; VOET, 2006).

Os demais compostos testados promoveram ligeira diminuição na atividade enzimática. O efeito do EDTA na redução da atividade xilanolítica sugere que a enzima em questão poderia ter como cofator algum cátion não testado (SHAH; MADAMWAR, 2005).

4.9.9. Efeito de compostos fenólicos

Compostos fenólicos podem ser liberados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e podem inibir a hidrólise enzimática e a fermentação. Assim, o efeito destes compostos sobre a ação de glicosil hidrolases tem sido extensivamente avaliado e documentado. Senior e colaboradores (1990) descreveram a inibição de uma xilanase proveniente do fungo *Trichoderma harzianum* por compostos liberados pela lignina. Já Boukari e colaboradores (2011) estudaram os mecanismos de inibição de compostos fenólicos sobre uma xilanase da família GH11 de *Thermobacillus xylanilyticus*, concluindo que a mesma é decorrente de alterações conformacionais na estrutura da enzima.

Importante ressaltar, que o efeito destes compostos sobre a ação de xilanases pode ser variável e a presença de produtos da degradação da lignina não pode ser correlacionada de maneira simples sobre a ação de todas as enzimas, uma vez que o aumento da atividade enzimática, em alguns casos, também já foi documentado (KAYA et al., 2000).

Em relação à r-ec-XylMh, a maioria dos compostos avaliados promoveu um aumento da atividade enzimática após 10 minutos de incubação (tabela 5).

Tabela 5. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade xilanólítica da enzima r-ec-XylMh com 10 minutos e 24 horas de incubação. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student.

	10 minutos		24 horas	
	Atividade residual (%)	±DP	Atividade residual (%)	±DP
Ácido ferúlico	119,11*	1,51	79,09*	2,91
Ácido gálico	112,87*	1,32	58,51*	1,53
Ácido p-cumárico	111,81*	2,12	86,99*	0,92
Ácido siríngico	129,79*	1,72	84,27*	2,08
Ácido vanílico	122,83*	1,86	95,47*	1,65
Ácido 4-hidroxibenzóico	107,61*	0,66	97,18*	0,36
Siringaldeído	104,32*	0,19	97,79*	0,49
Vanilina	99,67	0,89	104,59*	2,14
Controle	100,00	0,23	100,00	0,28

Fonte: autoria própria.

A elevação dos níveis da atividade enzimática, pode ser decorrente de alterações conformacionais que tornariam a região catalítica mais acessível ao substrato. Após 24 horas de incubação, porém, nota-se que alguns compostos promoveram queda expressiva na atividade xilanólítica. Foi o caso do ácido ferúlico e

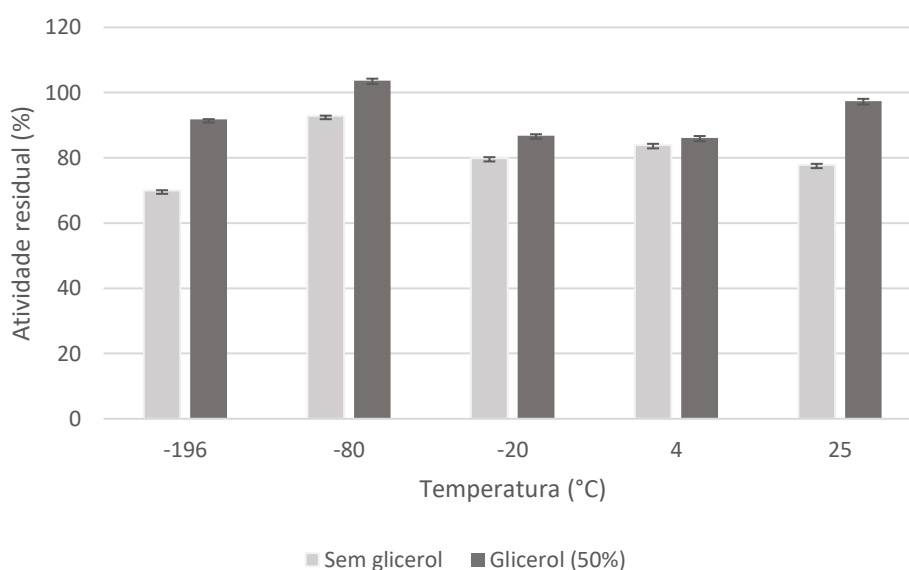
do ácido gálico, para os quais a atividade residual obtida foi de 79 e 58 %, respectivamente. O ácido tânico foi testado, porém a cor inerente ao composto dificultou a realização de um ensaio confiável, por isso não foi incluído na tabela 5.

Os resultados obtidos permitem concluir que a xilanase recombinante é resistente à maioria dos compostos fenólicos testados, apresentando, portanto grande potencial para aplicação industrial.

4.9.10. Análise das condições de armazenamento

A melhor condição para o armazenamento da xilanase foi a -80 °C, na presença de glicerol 50 %, na qual a atividade residual da enzima foi de 103 % (figura 26).

Figura 26. Atividade enzimática residual após 24 horas de armazenamento em diferentes temperaturas na presença e ausência de glicerol a 50 %. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

A adição do glicerol a 50 % promoveu maior atividade em todas as temperaturas de estocagem avaliadas de forma significativa ($p < 0,05$). Os resultados obtidos para o armazenamento nesta condição nas temperaturas de -20 °C e 4 °C foi

idêntico (86 %); a -196 °C, a atividade residual obtida foi de 91 % e a 25 °C, 97 %. Estes resultados confirmam que, conforme discutido anteriormente (item 4.9.6), o glicerol promove um efeito protetor sobre a enzima.

4.9.11. Especificidade em relação ao substrato

A xilanase recombinante apresentou atividade específica de 101,65 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ quando incubada com o substrato xilana *beechwood* e 38,31 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ quando incubada com xilana *oat spelt*. A enzima não apresentou atividade sobre os substratos pNPA, pNPX, CMC e Avicel (tabela 6). Este resultado corrobora com o esperado, visto que a enzima expressa neste trabalho pertence à família GH11, a qual reúne as chamadas xilanases “verdadeiras”, altamente específicas em relação ao substrato.

Tabela 6. Atividade específica da xilanase recombinante em diferentes substratos.

Substrato	Atividade específica (U mg^{-1})	\pm DP
Avicel	0	0
CMC	0	0
pNPA	0	0
pNPX	0	0
Xilana <i>beechwood</i>	101,65	2,23
Xilana <i>oat spelt</i>	38,31	5,25

Fonte: autoria própria.

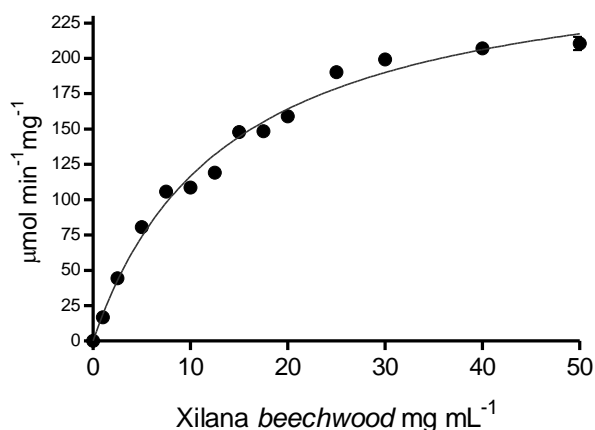
A composição de ambas as xilanas difere na proporção de xiloses: a *beechwood*, para a qual mostrou maior atividade, possui mais de 90 % de resíduos de xilose, e a *oat spelt* tem cerca de 70 % de xilose, 10 % de arabinose e 15 % de glicose, segundo informações do fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Do ponto de vista industrial, esta característica é muito interessante, pois algumas aplicações requerem xilanases que não apresentem atividade celulolítica, tais como o branqueamento da polpa de papel.

4.9.12. Cinética enzimática

No intervalo de concentração do substrato analisado a xilanase recombinante apresentou comportamento compatível com o perfil de cinética de Michaelis-Menten, como é possível observar na figura 27.

Figura 27. Gráfico de Michaelis-Menten de r-ec-XylMh variando-se a concentração de substrato entre 1 a 50 mg mL⁻¹. Ensaio realizado a 55 °C em pH 6,0.



Fonte: autoria própria.

O valor de K_m obtido foi de 13,4 mg mL⁻¹ ($\pm 1,5$) enquanto o valor de V_{max} foi de 274,5 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ($\pm 1,0$). Em geral, valores de K_m descritos para xilanases de origem fúngica variam entre 0,14 a 14 mg mL⁻¹ (VERMA; ANAND; SATYANARAYANA, 2013). Valores próximos aos que foram encontrados neste estudo foram descritos para uma xilanase de *Aspergillus niger* (13,67 mg mL⁻¹) e uma xilanase de *Streptomyces* sp. (12,38 mg mL⁻¹), ambas expressas em *P. pastoris* (CUNHA et al., 2018; WU et al., 2017).

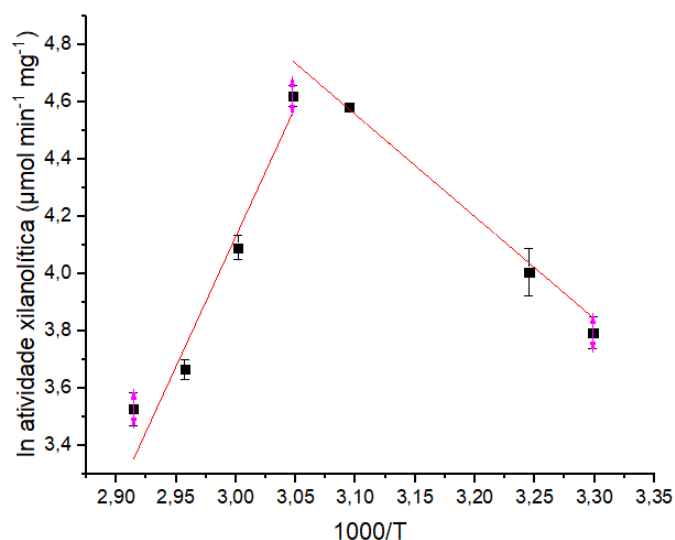
Considerando-se que, simplificadamente, quanto menor o valor de K_m , maior é a afinidade pelo substrato, é possível inferir que a xilanase recombinante expressa neste trabalho apresenta baixa afinidade pelo substrato.

Em relação à V_{max} , Carmona e colaboradores (2005) descrevem um valor muito similar para uma xilanase de *A. versicolor*, a qual apresentou V_{max} de $233,1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ com xilana *birchwood* como substrato, porém este parâmetro depende da concentração da enzima E_T : $V_{max} = [E_T] \times k_{cat}$, onde k_{cat} é o número de transformação, sendo assim inadequado para comparações.

4.10. Análise da termoestabilidade da xilanase recombinante r-ec-XylMh

A temperatura ótima da xilanase recombinante r-ec-XylMh no pH ótimo, calculada a partir do gráfico de Arrhenius (figura 28), foi $55 \text{ }^\circ\text{C}$, mesmo valor obtido por ensaio enzimático.

Figura 28. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da xilanase recombinante r-ec-XylMh.



Fonte: autoria própria.

Já a energia de ativação (E_a) foi 29,71 kJ mol⁻¹, a qual pode ser considerada baixa, sugerindo que não há uma barreira energética elevada para a ocorrência da catálise. Diversas xilanases de origem fúngica, tanto selvagens quanto recombinantes, apresentam energia de ativação similar à encontrada, como as obtidas de *Thielaviopsis basicola*, *Trichoderma reesei* e *Chaetomium thermophilum*, cujos valores são 28,0, 32,1 e 33,0 kJ mol⁻¹, respectivamente (GOLUGURI et al., 2016; GHAFAR et al., 2011; COBOS, ESTRADA, 2003).

Os coeficientes de temperatura (Q_{10}) estão apresentados na tabela 7. Geralmente, o Q_{10} de enzimas varia entre 1 a 2 de modo que os valores encontrados para a xilanase recombinante expressa em *E. coli* podem ser considerados medianos (SAQIB et al., 2010). O decréscimo dos valores de Q_{10} com o aumento da temperatura, evidencia a desnaturação e a perda da função enzimática.

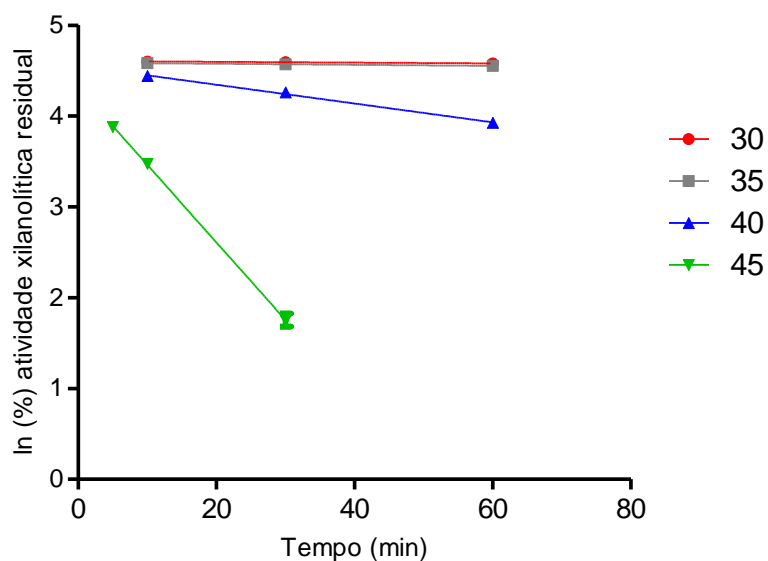
Tabela 7. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) da xilanase r-ec-XylMh estimados com base no gráfico de Arrhenius.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Q_{10}
30	303,15	1,47
35	308,15	1,45
40	313,15	1,43
45	318,15	1,42

Fonte: autoria própria.

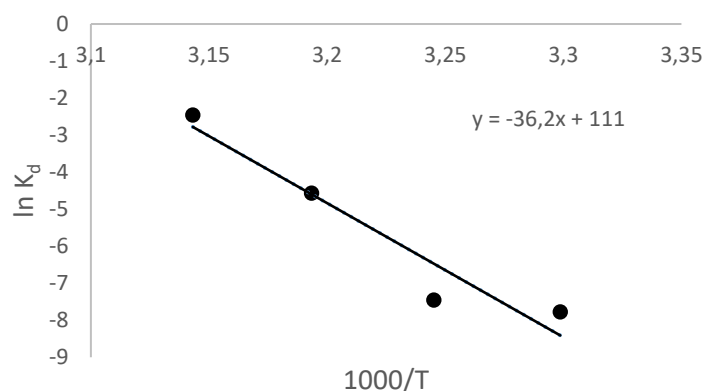
Os gráficos utilizados para cálculo das constantes k_d e da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(D)}$), são apresentados a seguir. Os parâmetros termodinâmicos encontram-se descritos na tabela 8.

Figura 29. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da xilanase recombinante.



Fonte: autoria própria.

Figura 30. Gráfico de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(D)}$) da xilanase recombinante r-ec-XylMh.



Fonte: autoria própria.

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos da inativação térmica irreversível da xilanase recombinante r-ec-XylMh.

Temperatura (°C)	k_d	$T_{1/2}$ (min)	ΔH_d (kJ mol ⁻¹)	ΔG_d (kJ mol ⁻¹)	ΔS_d (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
30	0,00042	1521	298,43	93,88	674,7
35	0,00058	1101	298,39	94,64	661,2
40	0,01036	61,67	298,35	88,71	669,4
45	0,08542	7,48	298,31	84,59	671,7

Fonte: autoria própria.

O valor da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(D)}$), que corresponde à quantidade mínima de energia necessária para desnaturação da enzima, foi de 300,96 kJ mol⁻¹.

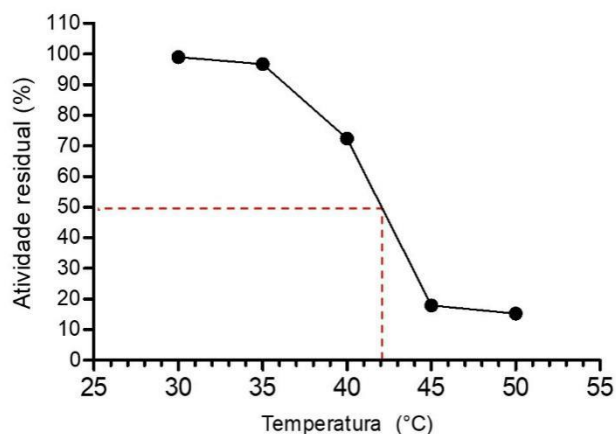
De maneira geral, os demais dados obtidos através da análise da desnaturação térmica irreversível reforçam que a xilanase expressa em hospedeiro procarioto não é termoestável. Em relação à meia vida da enzima, aos 30 °C e 35 °C observa-se um período relativamente elevado (1521 e 1101 minutos, respectivamente). Porém, nota-se intensa redução aos 40 °C e 45 °C, quando o tempo de meia vida observado foi de 61,67 e de 7,48 minutos.

Assim como observado para outras xilanases, o valor de ΔH_d sofreu diminuição com o aumento da temperatura (SAQIB et al., 2010; ZANONI, 2016). Esta variável, porém, não parece ser muito dependente da temperatura, pois seu valor sofre pouca alteração.

Os valores de energia livre de Gibbs (ΔG_d), por sua vez, embora inferiores aos que foram relatados para xilanases termoestáveis, demonstram que a desnaturação térmica da enzima não ocorre espontaneamente (GOLUGURI et al., 2016). Com exceção do valor encontrado para 30 °C, a entropia de ativação da desnaturação térmica (ΔS_d) teve aumento progressivo com o aumento da temperatura, provavelmente devido ao rompimento de ligações não covalentes decorrentes da desnaturação e aumento da desordem do sistema (DORAN, 2002).

A temperatura de fusão obtida para a xilanase recombinante, que corresponde à temperatura na qual a atividade enzimática corresponde à 50 % da inicial, foi 42 °C (figura 31).

Figura 31. Temperatura de fusão da xilanase r-ec-XylMh.



Fonte: autoria própria.

5. CONCLUSÕES

A técnica de RT-PCR permitiu o isolamento de uma sequência codificadora de xilanase da família GH11 do fungo *Myceliophthora heterothallica*. Entre as linhagens bacterianas avaliadas, Origami 2(DE3) pLysS foi a mais adequada para a expressão da xilanase recombinante e, embora a expressão heteróloga da proteína tenha predominado na forma insolúvel, foi possível obter a enzima em sua forma funcional e realizar os ensaios de purificação e caracterização bioquímica.

A xilanase apresentou características interessantes do ponto de vista industrial, porém, baixa termoestabilidade, corroborada pela análise termodinâmica, que pode ser decorrente da ausência de modificações pós-traducionais no sistema procarioto de expressão. Foi observado que o glicerol promove aumento significativo da termoestabilidade da enzima.

REFERÊNCIAS

- BASIT, A.; LIU, J.; MIAO, T.; ZHENG, F.; RAHIM, K.; LOU, H.; JIANG, W. Characterization of two endo- β -1, 4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 233-243, 2018.
- BEZERRA-BUSSOLI, C. **Expressão heteróloga de celulases de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli*, com a purificação e caracterização das enzimas produzidas**. 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- BLANK, S.; SCHRÖDER, C.; SCHIRRMACHER, G.; REISINGER, C.; ANTRANIKIAN, G. Biochemical characterization of a recombinant xylanase from *Thermus brockianus*, suitable for biofuel production. **JSM Biotechnology & Biomedical Engineering**, v. 2, p. 1027, 2014.
- BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- β -1, 4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3, p. 130-138, 2011.
- CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETOBraga, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 359-364, 2005.
- CARSON, M.; JOHNSON, D. H.; MCDONALD, H.; BROUILLETTE, C.; DELUCAS, L. J. His-tag impact on structure. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 63, n. 3, p. 295-301, 2007.
- CESAR, T.; MRŠA, V. Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 4, p. 289-296, 1996.
- COBOS, A., ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 810-818, 2003.
- CUNHA, C. C. D. Q. B., GAMA, A. R., CINTRA, L. C., BATAUS, L. A. M., ULHOA, C. J. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. **Plos one**, v. 13, n. 2, p. e0192996, 2018.

DORAN, P. M.; **Bioprocess Engineering Principles**; Academic Press; New York; 439 p., 2002.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, p. 221-224, 2001.

GHAFFAR, A.; KHAN, S. A.; MUKHTAR, Z.; RAJOKA, M. I.; LATIF, F. Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115. **Molecular Biology Reports**, n. 38, p. 3227–3233, 2010.

GOLUGURI, B. R., THULLURI, C., ADDEPALLY, U., SHETTY, P. R. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC 1467): purification and kinetic characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 82, p. 823-829, 2016.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GUO, B.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- β -1, 4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1107, 2009.

JENNY, R. J.; MANN, K.G.; LUNDBLAD, R. L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. **Protein Expression and Purification**, v. 31, n. 1, p. 1 -11, 2003.

JOSHI, M. D.; SIDHU, G.; POT, I.; BRAYER, G. D.; WITHERS, S. G.; MCINTOSH, L. P. Hydrogen bonding and catalysis: a novel explanation for how a single amino acid substitution can change the pH optimum of a glycosidase 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, n. 1, p. 255-279, 2000.

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, v.80, p. 241-247, 2000.

KRISANA, A.; RUTCHADAPORN, S.; JARUPAN, G.; LILY, E.; SUTIPA, T.; KANYAWIM, K. Endo-1,4-beta-xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: Purification, characterization and gene isolation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 17-23, 2005.

LI, J.; WANG, L. Why substituting the asparagine at position 35 in *Bacillus circulans* xylanase with an aspartic acid remarkably improves the enzymatic catalytic activity? A quantum chemistry-based calculation study. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 5, p. 1009-1014, 2011.

LI, L.; TIAN, H.; CHENG, Y.; JIANG, Z.; YANG, S. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 780-787, 2006.

LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/42/D1/D490/1057423>. Acesso em: 14 Jul. 2017.

MICHAELIS, L; MENTEN, M.L. **Kinetik der Invertinwirkung** Biochem. Zeitung, v. 49, p. 333-369, 1913.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NC-IUB. Units of Enzyme Activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 2, p. 319-320, 1979.

OGASAWARA, W.; SHIDA, Y.; FURUKAWA, T.; SHIMADA, R.; NAKAGAWA, S.; KAWAMURA, M.; OKADA, H. Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 5, p. 995-1003, 2006.

OLIVEIRA, L. C.; OKAMOTO, D. N.; OLIVEIRA, J. R.; KONDO, M. Y.; GOUVEA, I. E.; BITEAU, N.; JULIANO, M. A. Analysis of peptidase activities of a cathepsin B-like (TcoCBc1) from *Trypanosoma congolense*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 7, p. 1260-1267, 2014.

ONGLEY, S. E., BIAN, X., NEILAN, B. A., MÜLLER, R. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 8, p. 1121-1138, 2013.

PAUL, S.; PAUL, S. Molecular insights into the role of aqueous trehalose solution on temperature-induced protein denaturation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 4, p. 1598-1610, 2015.

RIGOLDI, F., DONINI, S., REDAELLI, A., PARISINI, E., GAUTIERI, A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering** v. 2, n. 1, p. 011501, 2018.

SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 3rd ed, Cold Spring Harbor. Laboratory Press, 2001.

SAPAG, A.; WOUTERS, J.; LAMBERT, C.; LOANNES, P.; EYZAGUIRRE, J.; DIPIEREUX, E. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. **Journal of Biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 109-131, 2002.

SAQIB, A. A. N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. U.; HAYAT, U.; BAIG, S. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 196853, 2012.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641 -646, 2010.

SENIOR, D.J.; MAYERS, P.R.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. in: KIRK, T.K; CHANG, H. M. (Eds.), **Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture**, Butterworth-Heinemann, Boston, MA, p. 169–182, 1990.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Processe biochemistry**, n. 40, p. 1763-1771, 2005.

SIDDIQUI, K.; NAJMUS, S. A.; RASHID, M. H.; RAJOKA, M. H. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 325-330, 1997.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; & CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307-313, 2015.

SONG, Y.; LEE, Y. G.; CHOI, I. S.; LEE, K. H.; CHO, E. J.; BAE, H. J. Heterologous expression of endo-1, 4- β -xylanase A from *Schizophyllum commune* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the recombinant enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 3, p. 170-176, 2013.

VAN GOOL, M. P.; VAN MUISWINKEL, G. C. J.; HINZ, S. W. A.; SCHOLS, H. A.; SINITSYN, A. P.; GRUPPEN, H. Two novel GH11 endo-xylanases from *Myceliophthora thermophila* C1 act differently toward soluble and insoluble xylans. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 1, p. 25-32, 2013.

VERMA, D.; ANAND, A.; SATYANARAYANA, T. Thermostable and alkalistable endoxylanase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1: cloning, expression, characteristics and its applicability in generating xylooligosaccharides and fermentable sugars. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 119-130, 2013.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Ed. Médica Panamericana, 2006.

WU, H., LI, H., XUE, Y., LUO, G., GAN, L., LIU, J., MAO, L., LONG, M. High efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloyl esterase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 41-48, 2017.

YIN, E.; LE, Y.; PEI, J.; SHAO, W.; YANG, Q. High-level expression of the xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 275-280, 2008.

ZANONI, J.A. **Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em estado sólido**. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

ZANPHORLIN, L.M.; FACCHINI, F.D.A.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; RODRIGUES, A. SETTE, L.D.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 331-336, 2010.

ZHANG, M.; JIANG, Z.; YANG, S.; HUA, C.; LI, L. Cloning and expression of a *Paecilomyces thermophila* xylanase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant xylanase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 688-695, 2010.

ZHOU, C.; WANG, Y.; WU, M.; WANG, W.; LI, D. Heterologous expression of xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 90-95, 2009.

CAPÍTULO III

**Expressão heteróloga de xilanase de *Myceliophthora*
heterothallica em *Pichia pastoris***

RESUMO

A sequência codificadora de xilanase de *Myceliophthora heterothallica*, previamente identificada e expressa em *Escherichia coli*, foi ligada ao vetor de expressão pPICZαA, o qual foi utilizado para transformação da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, linhagem X33. Transformantes foram inoculados em meio YNB contendo o substrato cromogênico xilana-RBB para avaliação da atividade xilanolítica e um deles foi selecionado para expressão da enzima em meio BMMY. A produção da enzima recombinante atingiu 48,8 U mL⁻¹ após 120 horas de indução com metanol 0,5 %, sendo a massa molecular da xilanase de aproximadamente 25 kDa. A purificação ocorreu em uma única etapa cromatográfica de filtração em gel (resina Superdex 75) e a caracterização bioquímica apontou temperatura e pH ótimos de 70 °C e 6,5, respectivamente. A enzima apresentou estabilidade em amplo intervalo de pH e manteve atividade após incubação por uma hora e meia a 55 °C, apresentando termoestabilidade superior à detectada para a enzima expressa em sistema procarioto. A atividade específica e afinidade pelo substrato também foram maiores do que as observadas para a xilanase recombinante expressa em *E. coli*.

Palavras-chave: *Myceliophthora heterothallica*, *Pichia pastoris*, pPICZαA, xilanase recombinante.

1. INTRODUÇÃO

Leveduras podem ser consideradas hospedeiros heterólogos ideais para expressão de proteínas provenientes de organismos eucariotos, principalmente devido à capacidade de realização de modificações pós traducionais, como glicosilação. A glicosilação é bastante frequente em proteínas de origem fúngica, afetando diversas características das mesmas, como termoestabilidade, afinidade pelo substrato, atividade específica, dentre outras (CHANG et al., 2017).

Saccharomyces cerevisiae e *Pichia pastoris* são leveduras muito utilizadas para expressão heteróloga de enzimas. Nos últimos anos, porém, *P. pastoris* tem recebido maior destaque, uma vez que diversos relatos de hiperglicosilação ou baixos índices de secreção de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae* foram reportados (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991; JUTURU; WU, 2012). Conforme apresentado no capítulo anterior, a expressão da xilanase de *Myceliophthora heterothallica* foi obtida com sucesso em *Escherichia coli*. Porém, apesar de apresentar algumas características interessantes do ponto de vista industrial, a enzima não apresentou termoestabilidade, o que pode comprometer sua aplicação em determinados processos.

Uma vez que um provável sítio de glicosilação foi identificado na enzima de interesse, a expressão da mesma em *P. pastoris* poderia promover esta modificação e, conseqüentemente, a enzima poderia apresentar melhoria na termoestabilidade e em outras características. Assim, a mesma sequência expressa em *E. coli* foi ligada ao vetor pPICZαA, o qual foi utilizado para transformação de *P. pastoris*. Os resultados da expressão heteróloga em sistema eucarioto são apresentados neste capítulo.

2. OBJETIVOS

- Ligar o gene codificador da xilanase em vetor para expressão em *P. pastoris*;
- Isolar transformantes produtores da enzima recombinante;
- Realizar a caracterização bioquímica da enzima recombinante purificada, incluindo a determinação do pH e temperatura ótimos, termoestabilidade, estabilidade em relação ao pH, efeito de íons na atividade, dentre outros;
- Determinar parâmetros cinéticos e termodinâmicos da xilanase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens de microrganismos

A linhagem DH5 α de *E. coli* (Invitrogen) foi utilizada para propagação de plasmídeos e a linhagem X33 de *Pichia pastoris* foi utilizada para a expressão da enzima recombinante.

3.2. Obtenção do plasmídeo de expressão em *Pichia pastoris*

A ligação do gene de interesse ao plasmídeo de expressão em *P. pastoris* (pPICZ α A_XylMh) foi similar à ligação realizada para expressão em *E. coli*. Assim, o peptídeo sinal nativo da enzima foi removido, tendo sido acrescentados uma cauda de histidina e um sítio para TEV protease à porção N-terminal da sequência codificadora da enzima (figura 1). Para ligação, o vetor pPICZ α A foi previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Esta etapa foi realizada pela empresa Fastbio, antes mencionada.

Figura 1. Representação esquemática do inserto ligado ao vetor pPICZαA.

Sítio de restrição para <i>EcoRI</i>	His-tag	Sítio de reconhecimento para TEV protease	Sequência codificadora da xilanase sem peptídeo sinal	Códon de parada	Sítio de restrição para <i>NotI</i>
--------------------------------------	---------	---	---	-----------------	-------------------------------------

Fonte: autoria própria.

3.3. Transformação de *Pichia pastoris* com o plasmídeo pPICZαA_XylMh

A transformação de *P. pastoris* foi realizada por meio do método químico, com uso de acetato de lítio. Uma alíquota de 50 µL de células competentes da levedura, suspensas em solução de acetato de lítio (100 mmol L⁻¹), foi utilizada para a transformação, tendo sido submetida a uma centrifugação e remoção do sobrenadante. Ao *pellet* foram adicionados os seguintes componentes, na ordem apresentada:

- 240 µL de polietilenoglicol (PEG) 50 %;
- 36 µL de acetato de lítio 1 mol L⁻¹;
- 25 µL de DNA de esperma de salmão (2 mg mL⁻¹), o qual foi previamente fervido durante 5 minutos;
- 5 µg do plasmídeo pPICZαA_XylMh, previamente linearizado com a enzima *Sacl*.

Seguiu-se incubação por 30 minutos a 30 °C e 25 minutos a 42 °C. O tubo foi então centrifugado e a solução de transformação foi removida com auxílio de pipeta. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) e mantidas a 30 °C com 240 rpm de agitação por 1 e 4 horas. Após estes períodos, as células foram plaqueadas em meio YPD contendo 100 µg mL⁻¹ do antibiótico zeocina.

3.4. Confirmação da transformação de *P. pastoris*

A confirmação da transformação de *P. pastoris* ocorreu por meio de PCR de colônia, a qual foi realizada utilizando-se *primers* específicos para o promotor AOX1 (5' AOX1 – GACTGGTTCCAATTGACAAGC e 3' AOX1 – GCAAATGGCATTCTGACATCC), presente no vetor de expressão.

Para isso, algumas colônias que cresceram no meio YPD acrescido de zeocina foram selecionadas, e tiveram células coletadas e diluídas em 8 µL de água estéril, as quais foram posteriormente submetidas a tratamento térmico em micro-ondas durante 4 minutos. Posteriormente, 5 µL desta diluição foram utilizados como molde para a reação de PCR, conduzida com os *primers* anteriormente citados (0,4 µmol L⁻¹ cada), acrescidos de 1X tampão de reação, 0,2 mmol L⁻¹ de dNTP, 1,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, e 1 unidade de *Dream Taq* DNA Polimerase (Thermo Scientific).

As condições utilizadas foram 95 °C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. A extensão final foi realizada a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1 %.

3.5. Análise de transformantes

Transformantes foram avaliados quanto à expressão da xilanase recombinante por meio da visualização de halos de hidrólise em meio YNB sólido acrescido do substrato cromogênico xilana-RBB (*Remazol Brilliant Blue-Xylan*). Colônias positivas para a reação de PCR foram inoculadas no meio contendo o substrato xilana-RBB e cultivadas a 28 °C durante 72 horas, tendo sido induzidas com metanol 0,5 %, o qual foi acrescido a cada 24 horas. Duas colônias de *P. pastoris* não transformadas com o

plasmídeo pPICZαA_XylMh também foram inoculadas para serem utilizadas como controle.

3.6. Expressão da xilanase recombinante em meio líquido

Para expressão da xilanase, uma colônia transformante foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1 %, peptona 2 %, tampão fosfato pH 6,0 100 mM, YNB 1,34 %, biotina 4×10^{-5} % e glicerol 1 %) e cultivada a 28 °C com 240 rpm de agitação até atingir densidade óptica acima de 2,0. Uma vez atingida a OD necessária, o cultivo foi centrifugado a 1500 xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 200 mL de meio BMMY, o qual apresenta a mesma composição do meio BMGY, porém, com substituição do glicerol 1 % por metanol a 0,5 %. O cultivo foi realizado em erlenmeyer haletado de 2 L, a 28 °C com 240 rpm de agitação. A cada 24 horas, 1 mL de metanol foi adicionado, visando-se promover a indução da expressão da xilanase recombinante, e 2 mL do cultivo foram coletados para determinação da atividade enzimática e análise do perfil proteico em gel SDS-PAGE.

3.7. Purificação da enzima recombinante

Para purificação, o sobrenadante do cultivo de *P. pastoris*, após a indução da expressão da enzima, foi previamente clarificado (centrifugação a 16.000 xg , 40 minutos, 4 °C), concentrado em coluna Vivaspin 6 (GE Healthcare) e submetido à cromatografia de gel filtração em resina Superdex 75 (10/300), previamente equilibrada com tampão fosfato (20 mmol L⁻¹ fosfato, 150 mmol L⁻¹ NaCl). Após a cromatografia, a amostra foi analisada em SDS-PAGE e quantificada com uso do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich).

3.8. Caracterização bioquímica da enzima

A caracterização bioquímica da enzima foi realizada através do método de dosagem de açúcares redutores (MILLER, 1959), conforme descrito no capítulo anterior (item 3.10). Importante ressaltar que não foi feita remoção da cauda de histidina, portanto, todos os ensaios foram conduzidos com a enzima contendo His-tag.

3.9. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

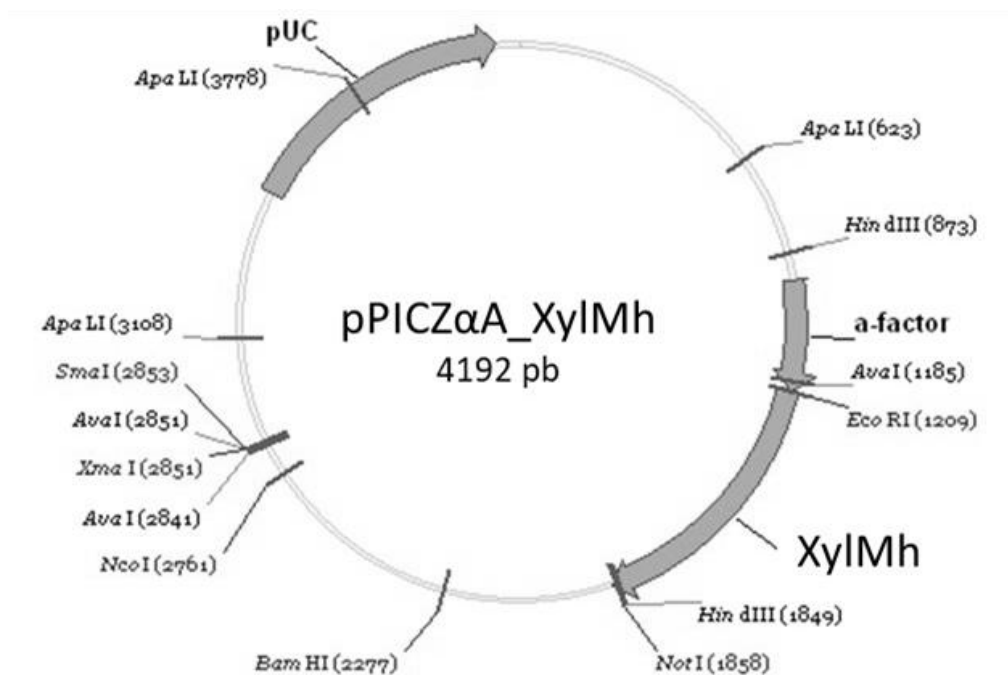
Esta análise foi conduzida conforme anteriormente descrito no item 3.11 do capítulo anterior.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção do vetor de expressão e transformação

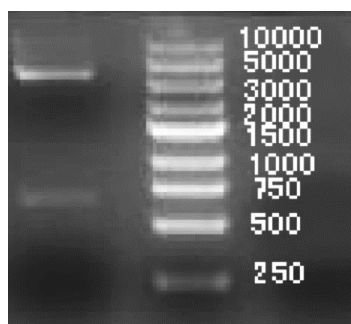
O mapa do vetor de expressão pPICZ α A_XylMh está apresentado na figura 2. A digestão do vetor com as enzimas *EcoRI* e *NotI* comprova que a ligação do inserto de interesse ao plasmídeo foi realizada com sucesso, visto que após a digestão, observa-se a liberação do mesmo (Figura 3).

Figura 2. Mapa do vetor de expressão para *P. pastoris* (pPICZαA_XylMh).



Fonte: imagem cedida pela empresa Fastbio.

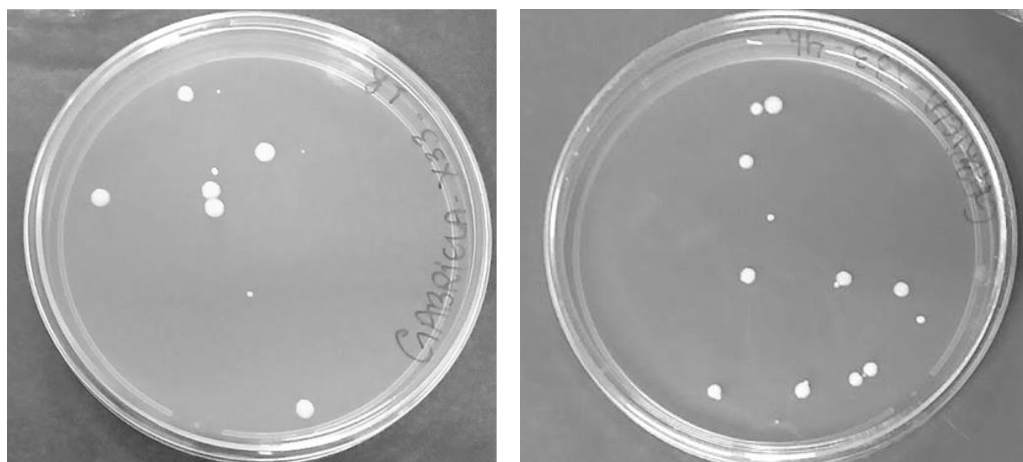
Figura 3. Eletroforese demonstrando a digestão do vetor pPICZαA_XylMh com as enzimas *EcoRI* e *NotI*.



Fonte: imagem cedida pela empresa Fastbio.

Após a transformação, observou-se o crescimento de cerca de quarenta colônias de *P. pastoris* nas placas contendo o antibiótico de seleção (figura 4). Destas, dez foram selecionadas para realização da reação de PCR, visando-se confirmar a transformação.

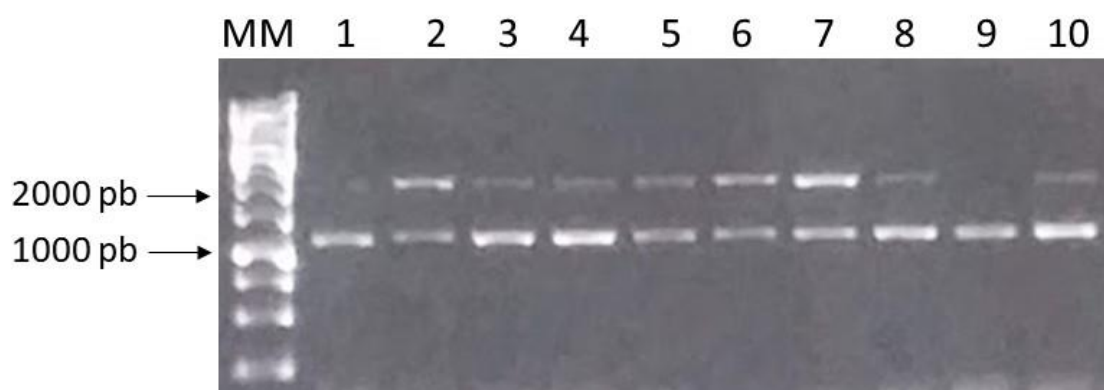
Figura 4. Colônias de *P. pastoris* em meio seletivo após transformação pelo método químico.



Fonte: autoria própria.

Conforme esperado, a reação de PCR gerou dois produtos de amplificação, demonstrados na figura 5. Um deles, com 2,2 kb, corresponde ao gene *AOX1* nativo de *P. pastoris*, o segundo, com cerca de 1,2 kb, corresponde à amplificação do inserto de interesse (656 pb referentes ao inserto, acrescido de 588 pb referente às porções que flanqueiam o mesmo).

Figura 5. Produtos de amplificação obtidos após PCR de colônia com os iniciadores *AOX1* 5' e 3'. MM: marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA ladder, Thermo Scientific. 1 a 10: colônias selecionadas.

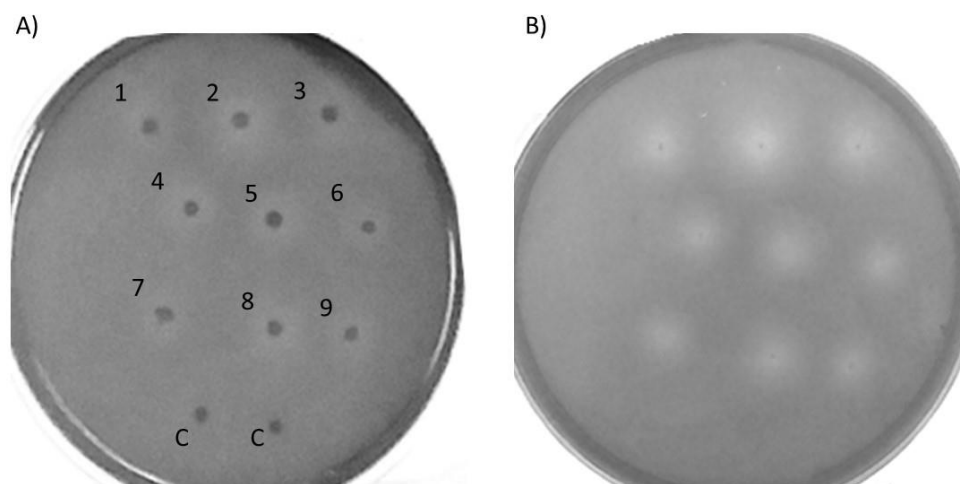


Fonte: autoria própria.

4.2. Análise de transformantes

Foram observados halos de hidrólise ao redor de todos os clones inoculados no meio YNB contendo o substrato xilana-RBB (figura 6). Porém, o halo presente ao redor da colônia 2 foi maior que os gerados pelas demais colônias, de modo que este transformante foi selecionado para expressão da xilanase em meio líquido. Halos de hidrólise não foram observados ao redor das colônias não transformadas com o vetor pPICZ α A_XylMh.

Figura 6. A) colônias inoculadas em meio YNB contendo xilana - RBB. 1 a 9: Transformantes. C: Controles (colônias não transformadas). B) Halos de hidrólise.

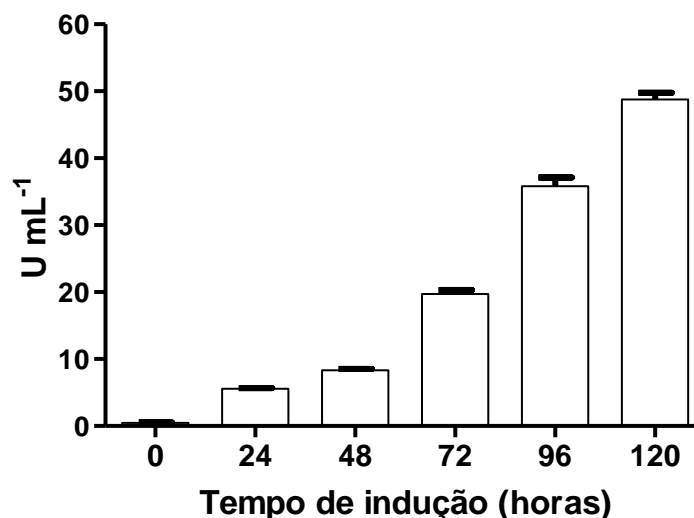


Fonte: autoria própria.

4.3. Expressão da xilanase recombinante e purificação da enzima

A expressão da xilanase recombinante apresentou aumento progressivo ao longo do tempo, com pico de produção após 120 horas de indução, quando a atividade enzimática atingiu 48,8 U mL⁻¹ (figura 7). Uma colônia de *P. pastoris* não transformada com o vetor pPICZ α A_XylMh também foi cultivada, sob as mesmas condições, como controle. Para esta colônia, não foi detectada atividade xilanolítica.

Figura 7. Produção da xilanase recombinante (U mL^{-1}) por *P.pastoris* cultivada em meio BMMY em diferentes períodos após a indução (0 a 120 horas).

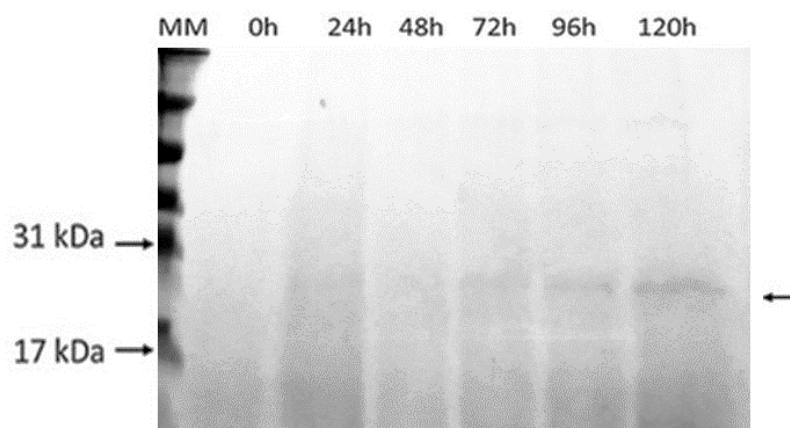


Fonte: autoria própria.

A produção de xilanase obtida neste estudo foi maior que a reportada por Gaffney e colaboradores (2009) que, ao promoverem a expressão heteróloga de uma xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em *P. pastoris*, obtiveram máxima atividade após 120 horas de indução, com produção de $26,8 \text{ U mL}^{-1}$. Outros estudos, porém, relatam maior produção enzimática, como a obtida para a xilanase de *Streptomyces* sp., que atingiu pico de 1374 U/mL , quando expressa em *P. pastoris* (XU et al., 2016). Importante ressaltar que neste caso, porém, a fermentação foi conduzida em maior escala.

A análise em SDS-PAGE do sobrenadante do cultivo confirmou a produção da enzima r-pp-XylMh, uma vez que foi possível observar a presença de uma proteína cujo nível de expressão aumentou ao longo do período de indução (figura 8). Além disso, o peso molecular desta proteína foi correspondente ao esperado (aproximadamente 25 kDa).

Figura 8. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) do sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* em meio BMMY para mostrar a expressão da proteína recombinante após diferentes períodos de indução (0 a 120 horas). MM: marcador molecular *Broad Range*, Bio-Rad.



Fonte: autoria própria.

Os resultados obtidos permitem concluir que a produção da xilanase recombinante de maneira solúvel, em *P. pastoris* é mais vantajosa, uma vez que produção da enzima em relação à bactéria *E. coli*, foi maior (em sistema procarioto, a produção enzimática atingiu $14,8 \text{ U mL}^{-1}$). A levedura também apresentou como vantagem a produção extracelular da proteína, ao passo que em *E. coli*, a produção foi intracelular, demandando uma etapa adicional de rompimento de células.

Em relação à purificação da enzima, inicialmente a amostra foi submetida à cromatografia de afinidade, porém, a proteína r-pp-XylMh não se ligou à resina de níquel.

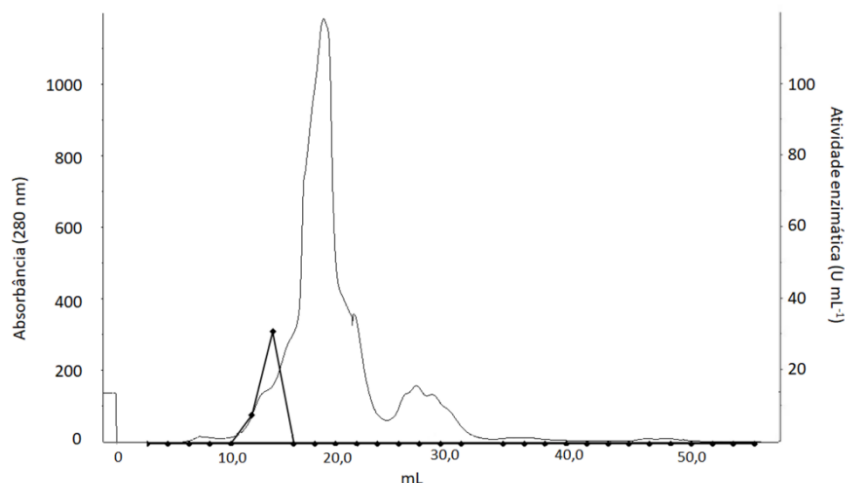
Desta maneira, foi necessária a utilização de outro método de purificação, por meio de filtração em gel, a qual foi realizada com sucesso (figuras 9 e 10). O rendimento e o grau de purificação obtidos foram 21,24 % e 3,14 vezes, respectivamente (tabela 1).

Tabela 1. Tabela de purificação da xilanase recombinante expressa em *P. pastoris*.

	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato	7,4	731,84	98,89	100 %	1,0
Gel filtração	0,5	155,45	310,9	21,24 %	3,14

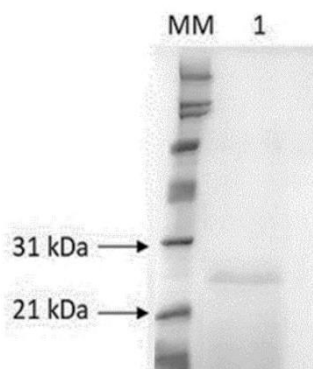
Fonte: autoria própria.

Figura 9. Perfil de eluição da amostra em cromatografia de gel filtração (resina Superdex 75).



Fonte: autoria própria.

Figura 10. 1: Xilanase recombinante r-pp-XylMh após filtração em gel em resina Superdex 75. MM: marcador molecular *Broad Range*, Bio-Rad.



Fonte: autoria própria.

Assim como descrito neste trabalho, uma xilanase recombinante de *Thermomyces lanuginosus* expressa em *P. pastoris* também foi purificada em uma única etapa cromatográfica de filtração em gel, com uso da resina Superdex 75 (DAMASO et al., 2003). Os autores, porém, não citam o rendimento e a purificação

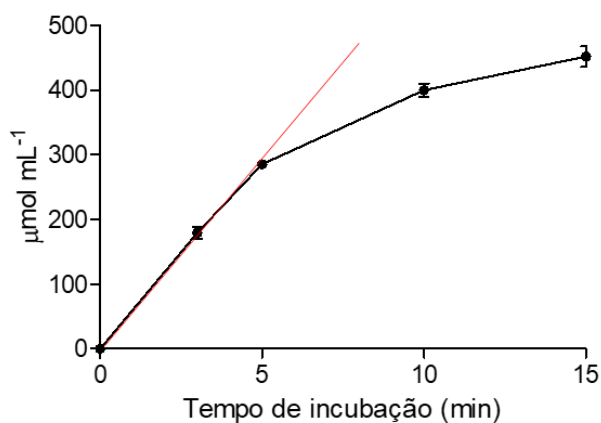
obtidos, impossibilitando comparações. Já Zheng e colaboradores (2013) relatam a purificação de uma xilanase recombinante de *Aspergillus niger* também expressa em *P. pastoris*, com uso de uma etapa de filtração em gel, tendo obtido um rendimento de 32 %.

4.4. Caracterização bioquímica da enzima recombinante

4.4.1. Determinação do tempo de incubação

Assim como observado para a xilanase expressa em *E. coli*, o tempo de incubação ideal para a reação enzimática foi 5 minutos (figura 11), tendo sido observada redução da velocidade da reação acima desse tempo.

Figura 11. Determinação do período de incubação ideal para cálculo da velocidade inicial de reação da xilanase recombinante expressa em *P. pastoris*.



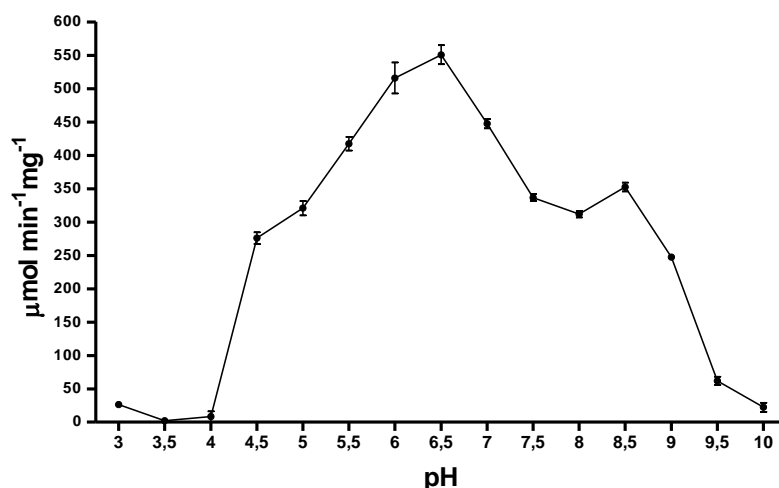
Fonte: autoria própria.

4.4.2. Determinação do pH ótimo e estabilidade em relação ao pH

O efeito do pH na atividade enzimática encontra-se apresentado na figura 12. O maior valor de atividade específica foi observado em pH 6,5 (570,7 μmol min⁻¹ mg⁻¹). Em valores de pH acima de 7,0, nota-se redução da ação enzimática, com queda

pronunciada em pH 9,5 e 10,0. Baixos índices de atividade também foram observados em valores de pH mais ácidos (entre 3,0 e 4,0).

Figura 12. Efeito do pH na atividade xilanólítica da enzima r-pp-XylMh.



Fonte: autoria própria.

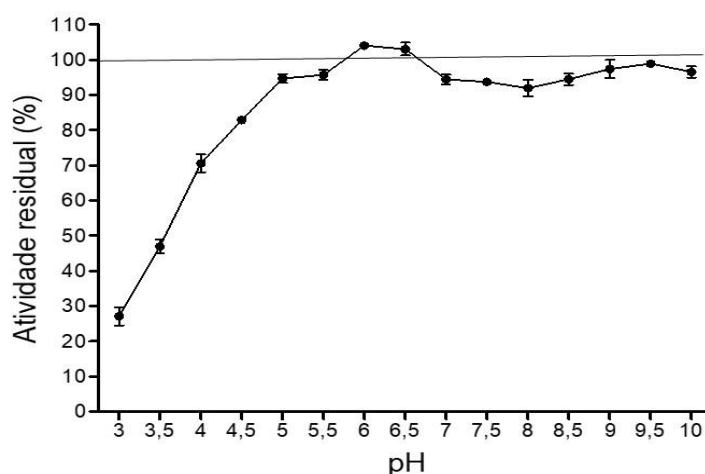
Conforme anteriormente citado, o valor de pH ótimo das xilanases da família GH11 pode ser extremamente variável, porém, valores similares ao observado encontram-se frequentemente relatados na literatura. Basit e colaboradores (2018), por exemplo, reportaram a expressão heteróloga de duas xilanases da família GH11 de *M. thermophila* em *P. pastoris* e encontraram valores de pH ótimo 6,0, e 7,0 para as enzimas. As duas xilanases de *M. thermophila* também tiveram comportamento equivalente ao da enzima recombinante de *M. heterothallica* em outras faixas de pH, com baixa atividade em valores mais ácidos e básicos. Outro exemplo é a xilanase de *Chaetomium thermophilum*, também expressa em *P. pastoris*, a qual apresentou pH ótimo 6,5 (GHAFAR et al., 2011).

Cabe destacar que o pH ótimo da enzima r-pp-XylMh é próximo ao observado para a enzima expressa em sistema procaríoto (cujo valor é 6,0). Portanto, o tipo de hospedeiro heterólogo utilizado parece não afetar significativamente este parâmetro.

Condição similar foi relatada para uma xilanase de *Paecilomyces thermophila*, a qual apresentou o mesmo valor de pH ótimo quando expressa em *E. coli* e *P. pastoris* (FAN et al., 2012; ZHANG et al., 2010).

Quanto à estabilidade da enzima frente ao pH, a xilanase apresentou-se estável em amplo intervalo, assim como quando expressa em *E. coli*, com atividade residual superior a 90 % entre valores de pH 5,0 a 10,0. A estabilidade também foi elevada entre pH 4,0 e 4,5, nos quais a atividade residual permaneceu acima de 70 %. Somente em pH 3,0 e 3,5 a enzima apresentou baixa estabilidade (figura 13).

Figura 13. Efeito do pH na estabilidade da xilanase recombinante após 24 h de incubação a 4 °C. O controle (100%) foi incubado com água ultrapura.



Fonte: autoria própria.

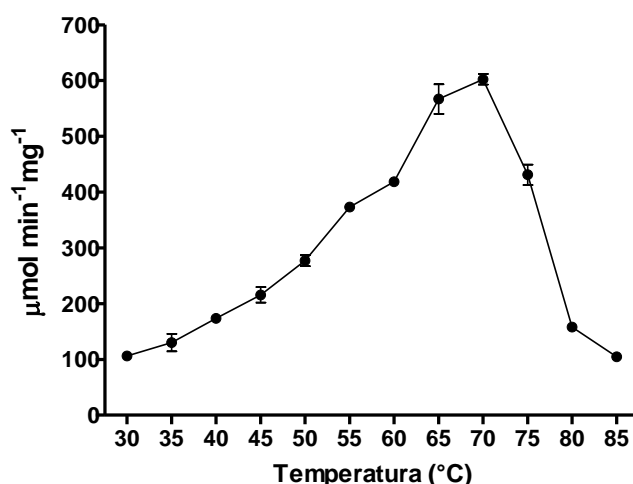
4.4.3. Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade

A enzima apresentou temperatura ótima de 70 °C, na qual a atividade específica atingiu 602,4 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (figura 14). Este valor diferiu significativamente em relação ao encontrado para a enzima expressa no hospedeiro procarioto, que foi 55 °C. Variações nos valores de temperatura ótima para uma mesma enzima, quando expressa em diferentes hospedeiros heterólogos, já foram relatadas. É o caso de uma celulase de *M. heterothallica*, cuja temperatura ótima

diferiu em 5 °C quando expressa em *E. coli* e *P. pastoris* e de uma xilanase de *Bacillus subtilis*, cuja temperatura ótima diferiu em 10 °C quando expressa nestes mesmos hospedeiros (BEZERRA-BUSSOLI, 2016, FONSECA-MALDONADO et al., 2013).

Em relação ao valor encontrado, diversas xilanases de fungos termofílicos expressas heterologamente em *P. pastoris* apresentaram resultados similares, como as xilanases de *Malbranchea cinnamomea* e *Thermomyces lanuginosus*, cujas temperaturas ótimas observadas foram 70 °C e 75 °C, respectivamente (DAMASO et al., 2003; BASOTRA et al., 2018).

Figura 14. Efeito da temperatura na atividade xilanolítica da enzima expressa em *P. pastoris*.

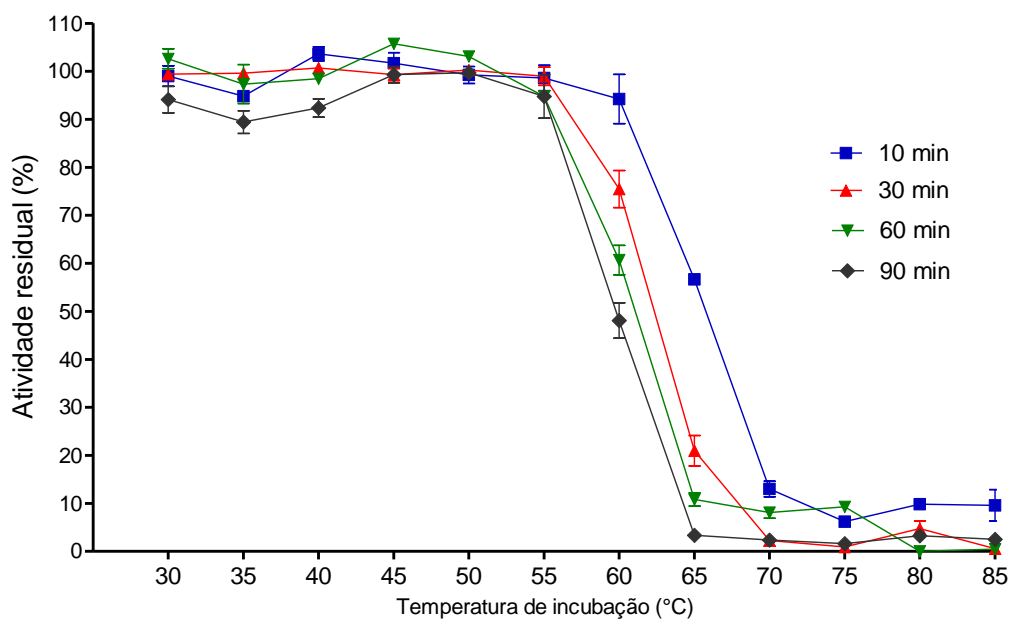


Fonte: autoria própria.

A enzima expressa em sistema eucarioto também apresentou termoestabilidade superior, mantendo-se estável após uma hora e meia de incubação a 55 °C e retendo cerca de 50 % de atividade residual quando exposta a 60 °C pelo mesmo período (figura 15).

Do ponto de vista industrial, a enzima expressa em *P. pastoris* pode ser considerada mais promissora, visto que a termoestabilidade é uma característica bastante desejável.

Figura 15. Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase r-pp-XylMh.



Fonte: autoria própria.

Conforme anteriormente citado, a enzima possivelmente encontra-se glicosilada, apresentando enovelamento diferenciado em relação à xilanase expressa em *E. coli*. A glicosilação é uma modificação pós-traducional que ocorre com frequência e afeta diversas características das proteínas, dentre as quais, a termoestabilidade, possivelmente por proteger regiões instáveis ou o sítio ativo das enzimas. Diversos relatos na literatura apontam aumento da termoestabilidade de xilanases quando expressas em sua forma glicosilada, como uma xilanase da família GH10 de *Aspergillus fumigatus* e uma GH11 de *Bacillus subtilis* (CHANG et al., 2017; FONSECA-MALDONADO et al., 2013).

Importante ressaltar que, ao estudarem o papel da glicosilação na xilanase de *B. subtilis*, Fonseca-Maldonado e colaboradores (2013), reportaram que o fator mais importante para o aumento da estabilidade não foi o número de sítios de glicosilação presentes na proteína, mas sim, a posição dos mesmos. Os autores apontam que o aumento da termoestabilidade possivelmente ocorre devido a efeitos estéricos e que

padrões de glicosilação mais dispersos favorecem a estabilização das interações proteína-glicano. Já Jafari-Aghdam e colaboradores (2005), relatam que a eliminação de uma N-glicosilação em uma glucoamilase de *Aspergillus niger* resultou na exposição de resíduos hidrofóbicos da proteína, gerando a redução da termoestabilidade e aumento da flexibilidade e agregação enzimática.

4.4.4. Efeito de íons

Conforme apresentado na tabela 2, dois íons geraram decréscimo da atividade enzimática na concentração de 1 mmol L⁻¹ e seis na concentração de 10 mmol L⁻¹. Os efeitos mais pronunciados foram notados na presença dos íons Al³⁺, Cu²⁺ e Fe³⁺ na concentração de 10 mmol L⁻¹, para os quais, a diminuição da atividade xilanolítica foi previamente relatada (YANG et al., 2008; ZHOU et al., 2009).

Os íons Mg²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ também geraram redução da atividade enzimática quando presentes na maior concentração avaliada, embora em menor grau. Nenhum íon, entretanto, anulou a atividade xilanolítica concluindo-se que, assim como a enzima expressa em *E. coli*, a xilanase expressa em *P. pastoris* apresenta tolerância à maioria dos íons avaliados.

Tabela 2. Efeito de íons clorados na concentração de 1 e 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade da enzima expressa em *P. pastoris*. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student.

	1 mmol L ⁻¹		10 mmol L ⁻¹	
	Atividade Residual (%)	± DP	Atividade Residual (%)	± DP
AlCl ₃	94,17*	0,88	54,55*	2,11
CaCl ₂	96,47	2,61	99,43	2,51
CoCl ₂	102,82	1,08	104,07	2,43
CuCl ₂	102,01	0,82	57,46*	1,28
FeCl ₃	93,27*	1,91	47,14*	2,78
HgCl ₂	96,47	1,78	98,33	3,66
KCl	102,68	1,41	97,66	3,27
LiCl	96,18	2,24	96,95	1,31
MgCl ₂	102,30	1,17	74,72*	2,11
MnCl ₂	103,16	0,37	76,49*	2,45
NiCl ₂	103,97	1,92	102,54	2,36
ZnCl ₂	102,97	0,70	80,26*	0,29
Controle	100,00	2,15	100,00	2,15

Fonte: autoria própria.

Como observado para a enzima expressa no hospedeiro procarioto, a atividade enzimática não sofreu aumento na presença dos íons testados. A independência em relação a co-fatores já foi reportada para outras xilanases recombinantes de fungos termofílicos. Um exemplo é a xilanase da família GH11 de *Corynascus thermophilus*, também expressa em *P. pastoris* (YANG; ZHANG, 2017).

4.4.5. Efeito de reagentes e solventes

Entre os compostos testados, nenhum gerou aumento na ação enzimática, porém, a redução da atividade residual foi observada para três compostos: SDS (12,12 %), Triton X-100 (86,13 %) e etanol (94 %) (tabela 3). A intensa redução da atividade enzimática causada pelo SDS já havia sido observada para a enzima expressa em *E.*

coli e, conforme anteriormente discutido, provavelmente ocorre devido à interação do SDS com as porções hidrofóbicas da enzima e consequente alteração de sua estrutura tridimensional.

O tensoativo Triton X-100 não afetou significativamente a ação da enzima quando expressa em *E. coli*, porém, teve efeito mais pronunciado sobre a ação da proteína expressa em *P. pastoris*, que apresentou atividade residual, na presença deste composto, de 86,13 %. Há evidências que sugerem que o enovelamento da xilanase possa ter ocorrido de maneira distinta no hospedeiro eucarioto, assim, é possível inferir que porções da enzima, antes não expostas, possam agora estar disponíveis para a interação com este reagente. O EDTA, diferentemente do observado com a enzima expressa em *E. coli*, não afetou a atividade.

Tabela 3. Efeito de reagentes e solventes (concentração: 10 mmol L⁻¹) sobre a atividade xilanolítica da enzima recombinante expressa em *P. pastoris*. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student.

	Atividade Residual (%)	± DP
SDS	12,12*	1,88
Etanol	94,00*	0,37
EDTA	99,57	1,38
Acetona	99,15	2,54
Isopropanol	102,2	1,20
Triton X-100	86,13*	1,21
Glicerol	100,29	2,44
Controle	100,00	0,97

Fonte: autoria própria.

4.4.6. Efeito de compostos fenólicos

O efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica está apresentado na tabela 4. No menor período de incubação avaliado (10 minutos), apenas o siringaldeído não afetou a atividade enzimática, tendo sido observada redução apenas

em presença do ácido gálico (92,46 %). Todos os demais compostos analisados promoveram aumento da atividade enzimática, com destaque para o ácido ferúlico (140,12 %). Já no maior período de incubação testado (24 horas), ácido gálico, vanilina e siringaldeído não afetaram a ação da xilanase, enquanto todos os demais compostos fenólicos geraram aumento da mesma. Os efeitos mais pronunciados foram observados para o ácido siríngico (133,48 %), ácido ferúlico (138,84 %) e ácido vanílico (123,91 %).

Tabela 4. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade de r-pp-XylMh com 10 minutos e 24 horas de incubação. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student.

	10 minutos		24 horas	
	Atividade residual (%)	±DP	Atividade residual (%)	±DP
Ácido p-cumárico	120,76*	2,91	121,18*	2,27
Ácido siríngico	120,25*	3,92	133,48*	2,02
Ácido gálico	92,46*	2,66	102,46	0,30
Ácido ferúlico	140,12*	2,59	138,84*	2,28
Ácido 4-hidroxibenzóico	116,38*	1,07	115,18*	0,34
Vanilina	103,19*	0,92	98,63	1,77
Ácido vanílico	128,03*	0,88	123,91*	2,32
Siringaldeído	101,27	2,03	100,00	2,08
Controle	100,00	0,93	100,00	2,18

Fonte: autoria própria.

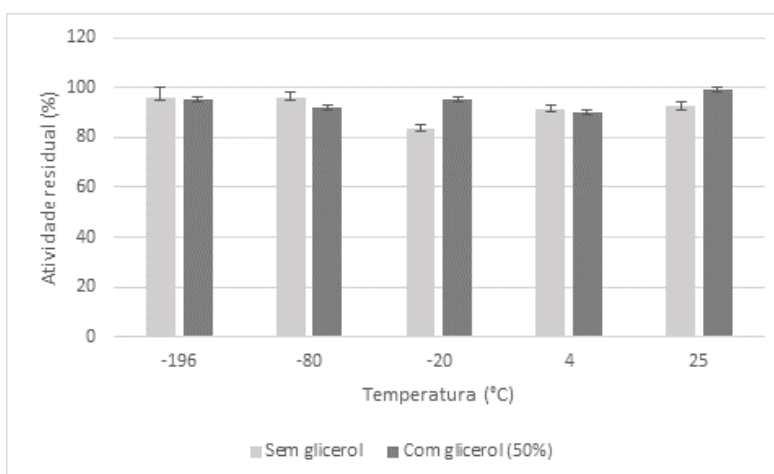
Compostos fenólicos podem ter efeitos variáveis sobre xilanases, aumentando sua atividade em determinadas condições (KAYA et al., 2000). Assim como observado neste estudo, o aumento da atividade enzimática em presença de compostos fenólicos foi relatado para uma xilanase de *Aspergillus terreus* (DE SOUZA MOREIRA et al., 2013). Importante salientar que esta característica torna a enzima muito promissora para a aplicação na produção de etanol de segunda geração. Conforme citado no item

anterior, as diferenças observadas em relação à enzima expressa em sistema procarioto podem ser decorrentes do envelhecimento diferenciado da proteína em *P. pastoris*.

4.4.7. Análise das condições de armazenamento

A enzima manteve maior atividade residual quando armazenada a 25 °C em presença de glicerol (99,29 %). O efeito benéfico do glicerol para o armazenamento também foi observado para a temperatura de -20 °C, porém, nas demais temperaturas testadas, o mesmo não promoveu aumento da ação enzimática (figura 16). Entre as condições avaliadas, -20 °C em ausência de glicerol, é a menos favorável para o armazenamento da enzima, uma vez que a atividade residual observada foi 83,58 %.

Figura 16. Atividade enzimática residual após 24 horas de armazenamento em diferentes temperaturas na presença e ausência de glicerol a 50 %. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

4.4.8. Especificidade em relação ao substrato

De maneira semelhante ao constatado para a enzima expressa em sistema procarioto, a enzima apresentou atividade apenas para os substratos xilana

beechnwood (602,4 U mg⁻¹) e xilana *oat spelt* (337,5 U mg⁻¹), o que ratifica a sua elevada especificidade (tabela 5). Observa-se que a atividade específica da enzima expressa em *P. pastoris* é 5,92 vezes mais elevada que a apresentada pela enzima expressa em *E. coli*, considerando-se o substrato xilana *beechnwood* e 8,81 vezes maior, considerando-se o substrato xilana *oat spelt*.

Efeito semelhante foi relatado por Sriyapai e colaboradores (2011) ao promoverem a expressão heteróloga de uma xilanase de *Actinomadura* sp nos mesmos hospedeiros utilizados neste estudo. A enzima expressa em sistema eucarioto apresentou atividade específica 2,4 vezes maior que a da enzima expressa em *E. coli*, possivelmente devido ao enovelamento mais apropriado que o sistema eucarioto promoveu à proteína recombinante.

Tabela 5. Atividade específica da xilanase r-pp-XylMh em diferentes substratos.

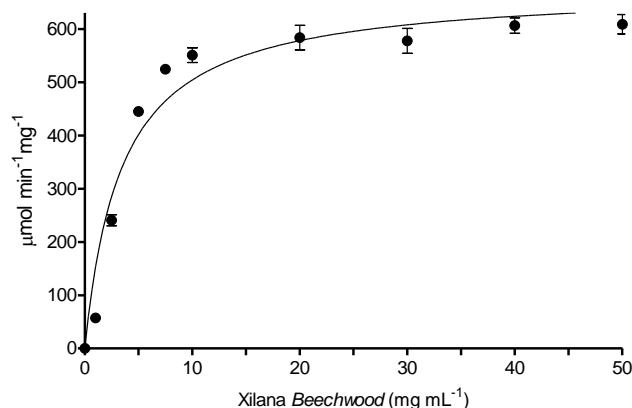
Substrato	Atividade específica (U mg ⁻¹)	±DP
Avicel	0	0
CMC	0	0
pNPA	0	0
pNPX	0	0
Xilana <i>beechnwood</i>	602,35	9,60
Xilana <i>oat spelt</i>	337,53	15,95

Fonte: autoria própria.

4.4.9. Cinética enzimática

O comportamento da enzima não sugere uma cinética como a proposta por Michaelis e Menten no intervalo de concentração de substrato avaliado (1 a 50 mg mL⁻¹) (figura 17). No ajuste à equação de Michaelis-Menten o valor de K_m obtido foi 3,4 mg mL⁻¹ (± 0,47) e o valor de V_{max} foi 677,4 μmol min⁻¹mg⁻¹ (± 21,66).

Figura 17. Gráfico de Michaelis-Menten da xilanase recombinante variando-se a concentração de substrato entre 1 a 50 mg mL⁻¹.



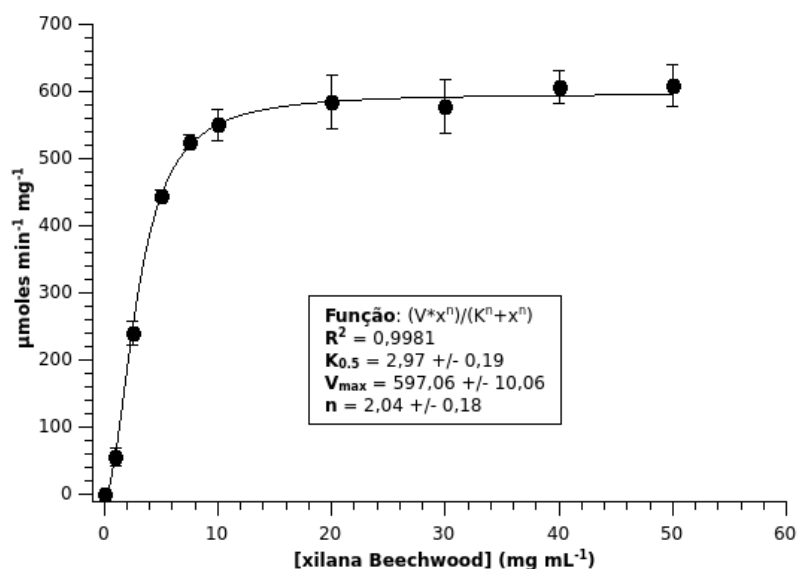
Fonte: autoria própria.

Em relação à enzima expressa em *E. coli*, o valor de K_m aqui obtido é quase quatro vezes menor, o que indica que a enzima expressa em sistema eucarioto apresenta maior afinidade pelo substrato. Esses dados reforçam que *P. pastoris* é um hospedeiro mais adequado para a expressão da xilanase de *M. heterothallica*.

Decidimos testar uma equação alternativa baseada na equação anteriormente citada, conhecida como equação de Hill (MARANGONI, 2003), para enzimas alostéricas: $V_o = (V_{max} * [S]^n)/(K_{0,5}^n + [S]^n)$, onde “n” é a cooperatividade da ligação, lembrando que se esse parâmetro for igual a um a ligação de substrato não é cooperativa. O ajuste neste caso foi adequado conforme mostra a figura 18, estimando uma cooperatividade de $2,0 \pm 0,2$, V_{max} de $597,1 \pm 10,1$ e $K_{0,5}$ (equivalente ao K_m) de $3,0 \pm 0,2$ mg mL⁻¹.

Esse comportamento nos fez aventar a possibilidade da enzima expressa em *P. pastoris* formar oligômeros (dímeros, por exemplo), porém uma estimativa de massa molecular da enzima por filtração em gel em coluna de Superdex 75 mostrou eluição compatível com uma estrutura monomérica. Serão realizados experimentos adicionais para elucidar esta questão.

Figura 18. Gráfico com o ajuste dos resultados experimentais à equação de Hill.

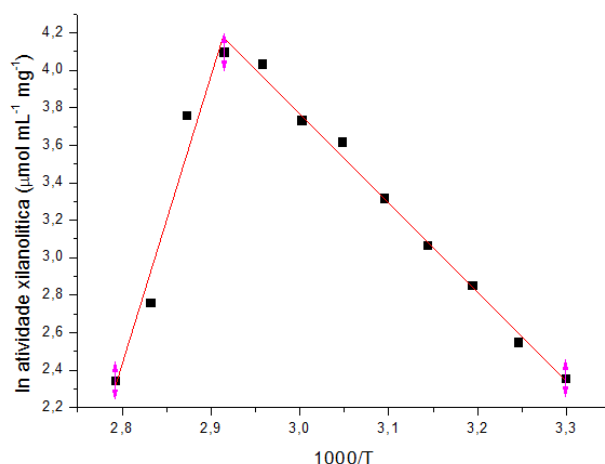


Fonte: autoria própria.

4.5. Análise da termoestabilidade da xilanase recombinante r-pp-XylMh

A temperatura ótima e a energia de ativação (E_a) obtidas foram 69,94 °C e 39,66 kJ mol⁻¹, respectivamente (figura 19). A energia de ativação encontrada é, portanto, superior à da enzima expressa em *E. coli*, cujo valor foi 29,71 kJ; assim, a barreira energética para hidrólise do substrato é ligeiramente superior. A temperatura ótima reflete o ponto no qual ocorre o equilíbrio entre o processo de aumento da atividade catalítica devido ao aumento da temperatura e a queda de funcionalidade devido à desnaturação térmica (MARANGONI, 2003). Em proteínas mais termoestáveis a fase de decréscimo da atividade ocorre em temperaturas mais elevadas.

Figura 19. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da xilanase recombinante r-pp-XylMh.



Fonte: autoria própria.

Os coeficientes de temperatura estão apresentados na tabela 6. Como é possível observar, os valores de Q_{10} diminuem com o aumento da temperatura, conforme esperado, porém são superiores na faixa de temperatura comparável, aos obtidos para a enzima expressa em *E. coli*, provavelmente refletindo a maior estabilidade térmica, pois o Q_{10} se refere à elevação da taxa de reação a cada 10 graus Celsius de aumento da temperatura.

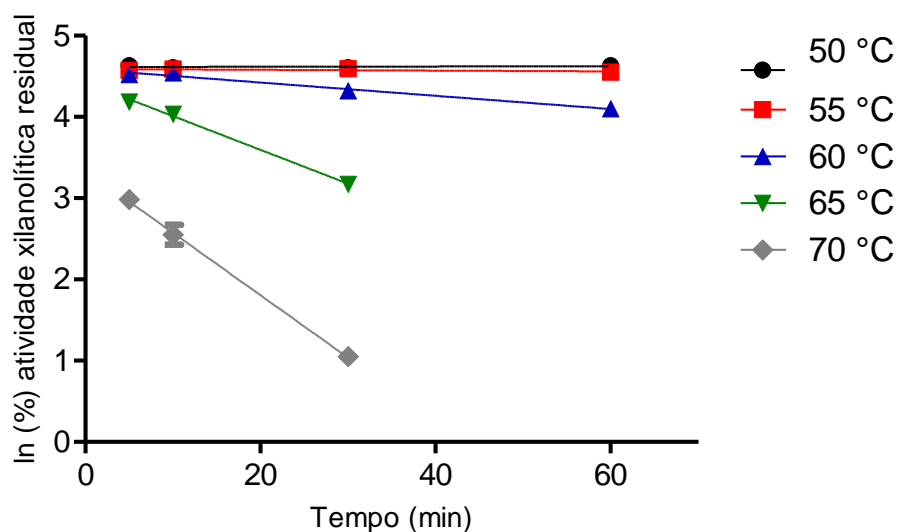
Tabela 6. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) da xilanase r-pp-XylMh estimados com base no Gráfico de Arrhenius.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Q_{10}
40	313,15	1,62
50	323,15	1,57
60	333,15	1,53
70	343,15	1,49
80	353,15	1,46

Fonte: autoria própria.

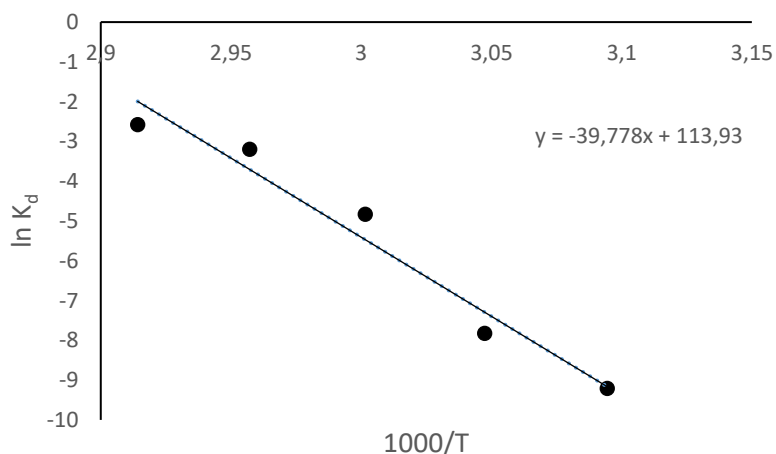
Os gráficos a seguir foram utilizados para cálculo das constantes k_d e da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(D)}$). Os dados termodinâmicos encontram-se na tabela 7.

Figura 20. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da xilanase r-pp-XylIMh.



Fonte: autoria própria.

Figura 21. Gráfico de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{ad}) da xilanase r-pp-XylIMh.



Fonte: autoria própria.

Tabela 7. Parâmetros termodinâmicos da inativação térmica irreversível da xilanase r-pp-XylIMh.

Temperatura (°C)	k_d	$T_{1/2}$ (min)	ΔH_d (kJ mol ⁻¹)	ΔG_d (kJ mol ⁻¹)	ΔS_d (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
50	0,0001	6390	328,02	104,10	692,9
55	0,0004	1597	327,98	101,97	688,7
60	0,008	79,87	327,94	95,26	698,4
65	0,041	15,5	327,89	91,93	697,8
70	0,076	8,4	327,85	88,67	697,0

Fonte: autoria própria.

Os parâmetros termodinâmicos obtidos confirmam a maior estabilidade térmica da enzima expressa em sistema eucarioto na comparação com a enzima expressa em *E. coli*. A começar pela energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(D)}$), cujo valor obtido foi 330,71 kJ mol⁻¹, portanto, superior ao obtido para a enzima expressa em *E. coli* (300,96 kJ mol⁻¹). Este dado mostra que é necessária maior quantidade de energia para a desnaturação da enzima expressa em *P. pastoris*, a qual apresenta, portanto, maior resistência.

O tempo de meia vida a 60 °C, foi de 79,9 minutos, superior ao relatado para uma xilanase do fungo termofílico *Chaetomium thermophilum*, que foi de 72 minutos na mesma temperatura (GHAFFAR et al, 2011). A meia vida é um parâmetro muito importante, uma vez que enzimas utilizadas em determinados processos industriais não só devem apresentar temperaturas ótimas elevadas, mas também devem resistir a maiores temperaturas por maiores períodos.

Os demais parâmetros termodinâmicos sofreram variações similares às observadas para a enzima expressa em *E. coli*, observando-se pequeno decréscimo na variação da entalpia (ΔH_d) e também tendência de diminuição da energia livre (ΔG_d) com o aumento da temperatura. Para comparação, o valor de ΔG_d da enzima expressa em *E. coli* a 30 °C estaria, na enzima expressa em *Pichia*, entre 60 e 65 °C, ou seja, o dobro da temperatura, mostrando uma nítida diferença de termoestabilidade. Como ele depende das contribuições da entalpia e da entropia, é considerado o parâmetro mais fiel para avaliação da estabilidade (MARANGONI, 2003)

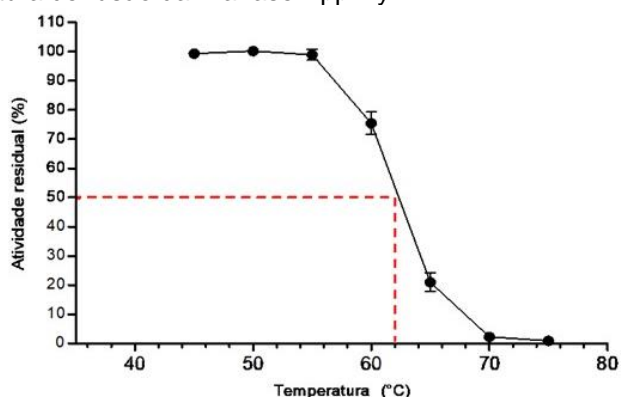
Para proteínas mais estáveis espera-se valores elevados da variação da entalpia, por ela refletir o calor necessário para promover o desenovelamento. No

caso, os valores de ΔH_d da r-ec-XylMh são menores aos da r-pp-XylMh, corroborando a expectativa.

Em relação à entropia (ΔS_d), o maior valor é observado aos 60 °C (698,4 J mol⁻¹ K⁻¹), ocorrendo ligeira diminuição em temperaturas superiores. Os valores da variação entrópica da enzima expressa em *P. pastoris* também são superiores aos obtidos para aquela de *E. coli*. Cobos e Estrada (2003), ao estudarem a desnaturação térmica de uma xilanase de *Trichoderma reesei*, encontraram valores de entropia muito próximos aos observados neste estudo, com variações entre 628 a 634 J mol⁻¹ K⁻¹ entre as temperaturas de 55 a 70 °C.

A temperatura de fusão obtida após 30 minutos de incubação foi 61 °C, aproximadamente 20 °C superior à da xilanase expressa em *E. coli*, calculada nas mesmas condições.

Figura 22. Temperatura de fusão da xilanase r-pp-XylMh.



Fonte: autoria própria.

Os ensaios para determinação dos parâmetros termodinâmicos, em conjunto com os ensaios de termoestabilidade previamente demonstrados (item 4.4.3), apontam que tanto a enzima expressa em *E. coli* quanto a enzima expressa em *P. pastoris* não são estáveis em suas temperaturas ótimas na ausência do substrato. É provável, portanto, que o substrato tenha um efeito estabilizador sobre as enzimas,

como sugerido por Wang e colaboradores (2012), ao estudarem a estabilidade térmica de uma xilanase GH11 de *Thermomyces lanuginosus*.

5. CONCLUSÕES

A expressão da xilanase foi bem sucedida em *Pichia pastoris*, linhagem X33, com pico de produção de 48,8 U mL⁻¹. A enzima recombinante apresentou elevada especificidade pelo substrato, elevada estabilidade em relação ao pH e à temperatura, tendo sido ainda observada resistência a diversos íons, reagentes, solventes e compostos fenólicos.

A análise termodinâmica da enzima recombinante expressa no hospedeiro eucarioto comprova que a mesma é bastante promissora para aplicação em processos industriais.

REFERÊNCIAS

- BASIT, A.; LIU, J.; MIAO, T.; ZHENG, F.; RAHIM, K.; LOU, H.; JIANG, W. Characterization of two endo- β -1, 4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 233-243, 2018.
- BASOTRA, N.; JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T.; PATI, P. K.; TSANG, A.; CHADHA, B. S. Expression of catalytically efficient xylanases from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* for synergistically enhancing hydrolysis of lignocellulosics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 185-192, 2018.
- BEZERRA-BUSSOLI, C. **Expressão heteróloga de celulases de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli*, com a purificação e caracterização das enzimas produzidas**. 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. A. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1067-1072, 1991.
- CHANG, X.; XU, B.; BAI, Y.; LUO, H.; MA, R.; SHI, P.; YAO, B. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermoglycoophilic GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171111, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171111>>. Acesso em: 21 Ago. 2018.
- COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 810-818, 2003.
- DAMASO, M. C. T.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA, N.; ANDRADE, C. M.; ALBANO, R. M. Optimized Expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6064-6072, 2003.
- DE SOUZA MOREIRA, L. R.; DE CARVALHO CAMPOS, M.; DE SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P., RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FERREIRA FILHO, E. X. Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, 2013.

FAN, G.; KATROLIA, P.; JIA, H.; YANG, S.; YAN, Q.; JIANG, Z. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 11, p. 2043-2048, 2012.

FONSECA-MALDONADO, R.; VIEIRA, D. S.; ALPONTI, J. S.; BONNEIL, E.; THIBAUT, P.; WARD, R. J. Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase, **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M113. 485953, 2013. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/early/2013/07/11/jbc.M113.485953.short>>. Acesso em: 21 Ago. 2018.

GAFFNEY, M.; CARBERRY, S.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Purification and characterization of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its functional expression by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 5, p. 348-354, 2009.

GHAFFAR, A.; KHAN, S. A.; MUKHTAR, Z.; RAJOKA, M. I.; LATIF, F. Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 5, p. 3227-3233, 2011.

JAFARI-AGHDAM, J.; KHAJEH, K.; RANJBAR, B.; NEMAT-GORGANI, M. Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: effects on structure, activity and stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics**, v. 1750, n. 1, p. 61-68, 2005.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012.

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, v.80, p. 241-247, 2000.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. Wiley-Interscience, Hoboken NJ, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

SRIYAPAI, T.; SOMYOONSAP, P.; MATSUI, K.; KAWAI, F.; CHANSIRI, K. Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in

Escherichia coli and *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 5, p. 528-536, 2011.

WANG, Y.; FU, Z.; HUANG, H.; ZHANG, H.; YAO, B.; XIONG, H.; TURUNEN, O. Improved thermal performance of *Thermomyces lanuginosus* GH11 xylanase by engineering of an N-terminal disulfide bridge. **Bioresource Technology**, n. 112, p. 275-279, 2012.

XU, Y.; WU, J.; ZHENG, K.; WU, D. A xylanase from *Streptomyces* sp. FA1: heterologous expression, characterization, and its application in Chinese steamed bread. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 663-670, 2016.

YANG, Y.; SHAN, K.; PING, L.; LU, J. Cloning, sequencing and expression of a novel xylanase cDNA from a newly isolated *Aspergillus awamori* in *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 23, p. 4251-4259, 2008.

YANG, Z.; ZHANG, Z. Codon-optimized expression and characterization of a pH stable fungal xylanase in *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, n. 53, p. 80-87, 2017.

ZHANG, M.; JIANG, Z.; YANG, S.; HUA, C.; LI, L. Cloning and expression of a *Paecilomyces thermophila* xylanase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant xylanase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 688-695, 2010.

ZHENG, J.; GUO, N.; WU, L.; TIAN, J.; ZHOU, H. Characterization and constitutive expression of a novelendo-1,4-b-D-xylanohydrolase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 9, p. 1433-1440, 2013.

ZHOU, C.; WANG, Y.; WU, M.; WANG, W.. LI, D. Heterologous expression of xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 90-95, 2009.

CAPÍTULO IV

**Análise do transcriptoma de *Myceliophthora heterothallica*
F.2.1.4, via RNA-seq, para prospecção de genes codificadores
de enzimas do complexo lignocelulolítico**

RESUMO

Amostras de RNA de *Myceliophthora heterothallica*, cultivado em meio indutor de expressão de enzimas degradadoras de biomassa, foram enviadas à empresa MacroGen Inc. (Coréia do Sul) para sequenciamento. Inicialmente, foi realizada a construção da biblioteca de cDNA utilizando-se o kit *TruSeq stranded mRNA (microbe)*, seguindo-se o sequenciamento, com uso da plataforma Illumina HiSeq 2000. A qualidade das sequências foi verificada com o programa FastQC e, após descarte de sequências de baixa qualidade, seguiu-se a montagem *de novo* dos dados com o programa Trinity. Por fim, realizou-se a anotação funcional dos transcritos. 369 ORFs de enzimas pertencentes à plataforma CAZy foram identificadas, incluindo sequências codificadoras de celulasas, xilanases, arabinofuronosidases, xilosidases, entre outras.

Palavras-chave: *Myceliophthora heterothallica*, RNA-seq, transcriptoma, enzimas CAZy.

1. INTRODUÇÃO

A técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq) utiliza o sequenciamento de mRNAs ou cDNAs com o objetivo de compreender o perfil do transcriptoma de uma espécie, o qual corresponde ao conjunto completo de transcritos de uma célula em um determinado momento e condição fisiológica (NAGALAKSHMI et al., 2010; WANG et al., 2009).

Considerando-se que a identificação de sequências codificadoras de enzimas e que a compreensão da expressão gênica em diferentes substratos podem contribuir para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para biomassas características, inúmeros transcriptomas de fungos têm sido sequenciados (DELMAS, et al., 2012; KOLBUSZ et al., 2014; PENG et al., 2017).

Na natureza, os fungos filamentosos são os principais organismos que atuam na decomposição do material lignocelulósico, constituindo-se na principal fonte de enzimas comerciais para este fim (SANCHEZ, 2009). Misturas enzimáticas disponíveis para a despolimerização da biomassa vegetal, geralmente contém dezenas de proteínas derivadas destes organismos, porém, pouco se conhece sobre a maioria das enzimas existentes.

Celulases e hemicelulases são enzimas essenciais para a sacarificação da biomassa e requerem a ação de enzimas acessórias, as quais atuam como facilitadoras, tornando-se importantes para a eficiência da reação de hidrólise. Dentre as enzimas acessórias, destacam-se as galactanases, liases, pectinases e diversos tipos de esterases, que atuam sobre as ligações químicas entre a celulose e os demais polímeros componentes da parede celular (pectina, lignina e hemicelulose) (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012).

Muitas destas enzimas são produzidas em baixíssimas concentrações por fungos e são excelentes candidatas à expressão heteróloga, visando-se a suplementação de coquetéis enzimáticos, uma vez que o aumento da eficiência dos mesmos pode consistir na redução dos níveis de enzimas não essenciais e no aumento das proporções relativas das enzimas críticas (BANERJEE et al., 2010). Desta forma, estudos que envolvam purificação, caracterização ou expressão heteróloga dessas enzimas podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de complexos enzimáticos mais eficientes com aplicação biotecnológica na sacarificação da biomassa vegetal.

2. OBJETIVO

Identificar sequências codificadoras de enzimas que atuam na sacarificação da biomassa lignocelulósica do fungo *M. heterothallica* F.2.1.4, por meio da análise de seu transcriptoma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração de RNA

A extração de RNA, bem como a análise da qualidade das amostras, foi realizada conforme descrito no item 3.2 do Capítulo II.

3.2. Construção da biblioteca e sequenciamento do transcriptoma

Para construção e sequenciamento de biblioteca transcriptômica, as amostras de RNA foram enviadas para a empresa MacroGen Inc (Coréia de Sul), a qual inicialmente realizou controle de qualidade das mesmas com uso do equipamento Bioanalyzer

2100 (Agilent Technologies), aplicando o método RNA Integrity Number (RIN). Uma das amostras foi selecionada para a construção da biblioteca com a metodologia *TruSeq stranded mRNA (microbe)* e posterior sequenciamento do transcriptoma com uso da plataforma Illumina Hiseq 2000 (paired end 2X100 pb).

3.3. Análises de bioinformática

O resultado do sequenciamento foi analisado para verificar a qualidade das sequências com o programa FastQC (v. 0.10.0). Sequências com qualidade phred inferior a 20 foram descartadas utilizando o programa Prinseq (<http://prinseq.sourceforge.net/>). Posteriormente, as sequências “limpas” foram submetidas para uma montagem *de novo* com o programa Trinity (HAAS et al., 2013), utilizando *K-mer* de 25.

3.4. Anotação funcional dos transcritos

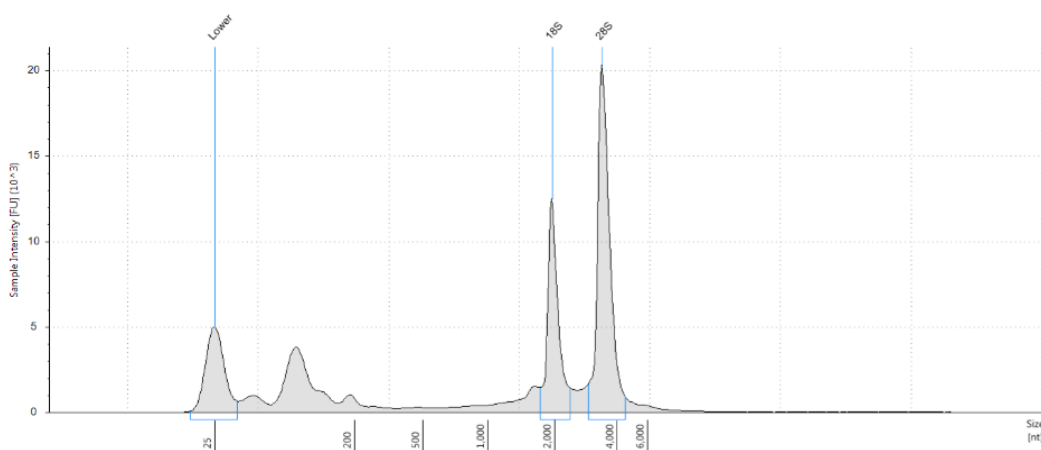
Com os resultados dos transcritos montados foi realizado uma anotação funcional com o programa Trinotate (<https://trinotate.github.io>). Todas as regiões codificantes foram anotadas com os bancos PFAM (FINN et al., 2014), EggNog (NIELSEN, 2017), SignalP (POWELL et al., 2014) e CAZy (LOMBARD et al., 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Controle de qualidade das amostras de RNA

O controle de qualidade realizado pela empresa Macrogen com o equipamento 2100 BioAnalyzer (Agilent) apontou um valor máximo de RIN (10) para uma das amostras de RNA enviada, a qual foi selecionada para o prosseguimento das análises. O método *RNA Integrity Number* (RIN) estima a integridade do RNA e somente amostras com valor de RIN próximo ou maior que 7,0 são selecionadas (figura 1).

Figura 1. Eletroferograma da amostra de RNA selecionada para construção da biblioteca e sequenciamento do transcriptoma.



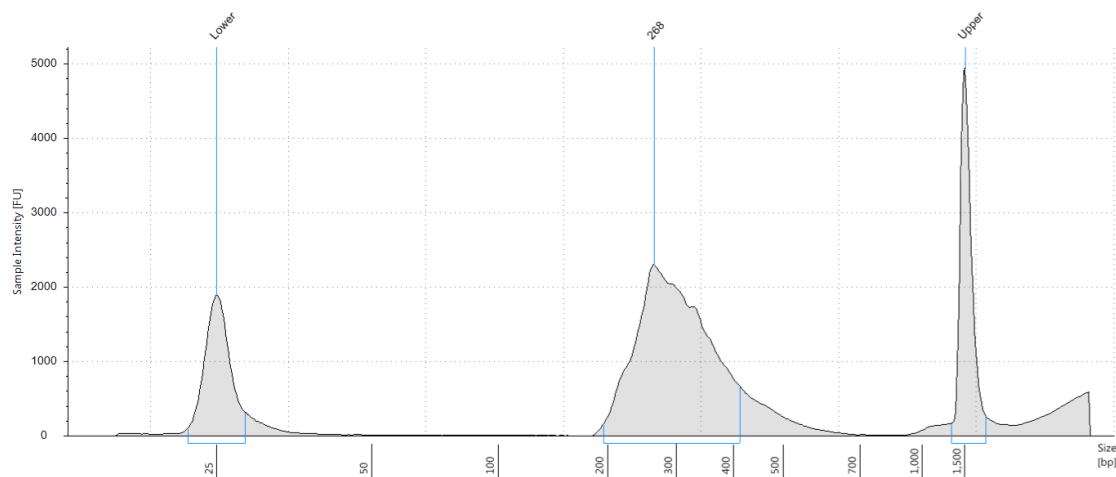
Fonte: imagem cedida pela empresa Macrogen.

4.2. Construção da biblioteca transcriptômica

Os resultados de controle de qualidade da biblioteca construída pela Macrogen demonstram que a concentração foi de $96,46 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, e o tamanho aproximado dos fragmentos de 268 pb (figura 2). Os critérios para controle de qualidade são: concentração superior a $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, e tamanho entre 200 a 400 pb. Desta forma, conclui-se que a biblioteca apresentou boa qualidade e os tamanhos dos fragmentos

estavam de acordo com o esperado. A biblioteca foi sequenciada em ambos os sentidos (2x100 pb), em equipamento HiSeq 2000 Illumina.

Figura 2. Perfil Bioanalyzer para verificação dos tamanhos dos fragmentos da biblioteca. Pela posição dos picos pode-se inferir o tamanho de 268 pb.

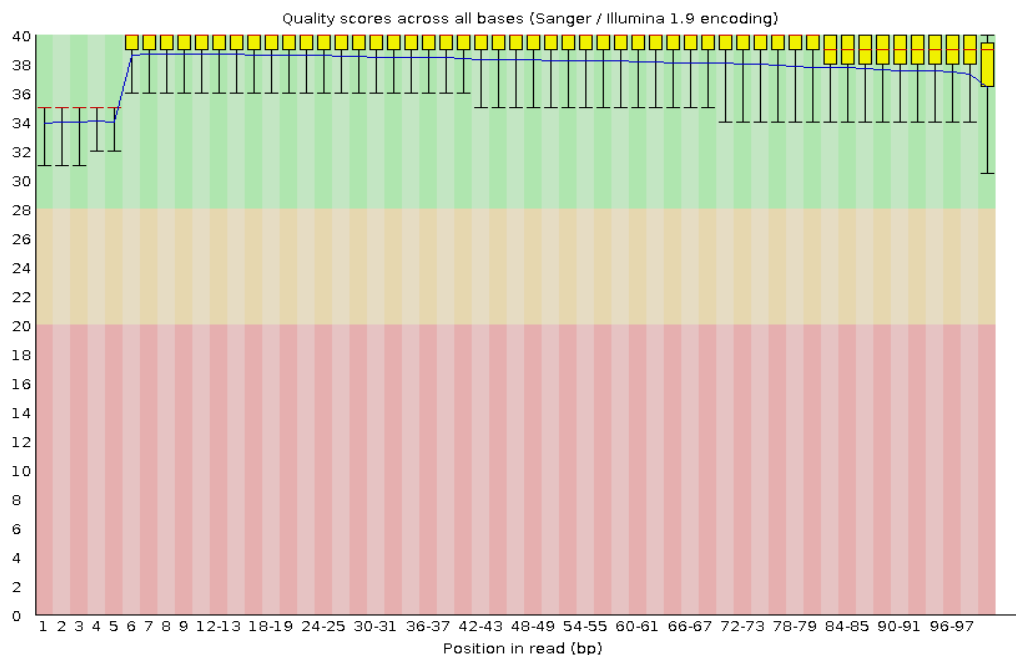


Fonte: imagem cedida pela empresa Macrogen.

4.3. Sequenciamento da biblioteca transcriptômica

O sequenciamento do transcriptoma de *M. heterothallica* F.2.1.4 gerou 17,67 Gb de dados e um total de 17,665,169,468 de bases com 174,902,668 de *reads*. A composição de bases foi estimada em 51,16% de GC e 48,84% de AT. Qualidades FASTQ baseada nos valores Phred foram de Q20 96.915 % e Q30 94.640 % (figura 3).

Figura 3: Gráfico dos valores brutos de qualidade do sequenciamento de *M. heterothallica* F.2.1.4. As barras representam a qualidade referente ao eixo Y (qualidade phred) em sua posição no read, eixo X. A linha vermelha na barra representa o valor médio da qualidade e seu desvio padrão das sequências.



Fonte: imagem cedida pela empresa Macrogen.

A montagem do transcriptoma gerou 30892 contigs, com tamanhos variáveis entre 33314 e 250 pb. O conteúdo de CG dos contigs anotados foi de 58,07%, enquanto o conteúdo de AT foi de 41,93%. A cobertura do transcriptoma foi estimada em 46 X.

Tabela 1. Dados da biblioteca transcriptômica de *M. heterothallica* obtidos após sequenciamento, montagem e anotação de sequências.

Total de reads	174,902,668
Total de pares de base	17,665,169,468 pb
Scaffolds/Contigs	30892
Comprimento médio dos contigs (pb)	937
G+C Total	51.16 %
G+C Codificante	58.07 %
Maior contig	33314
Menor contig	250
Cobertura	46 X

Fonte: autoria própria.

4.4. Identificação de enzimas ativas em carboidratos

A análise do transcriptoma revelou que 369 ORFs apresentaram semelhança com enzimas CAZy, o que corresponde a 4,35 % do total de sequências identificadas neste estudo. Foram anotadas 192 glicosil hidrolases (GH) distribuídas em 55 famílias; 96 glicosil transferases (GT) distribuídas em 34 famílias; 7 polissacarídeo liases (PL) distribuídas em 4 famílias; 18 carboidrato esterases (CE) distribuídas em 8 famílias; 18 moléculas ligadoras de carboidratos (CBM) distribuídas em 7 famílias e 38 enzimas com atividades auxiliares (AA) distribuídas em 11 famílias (tabela 2).

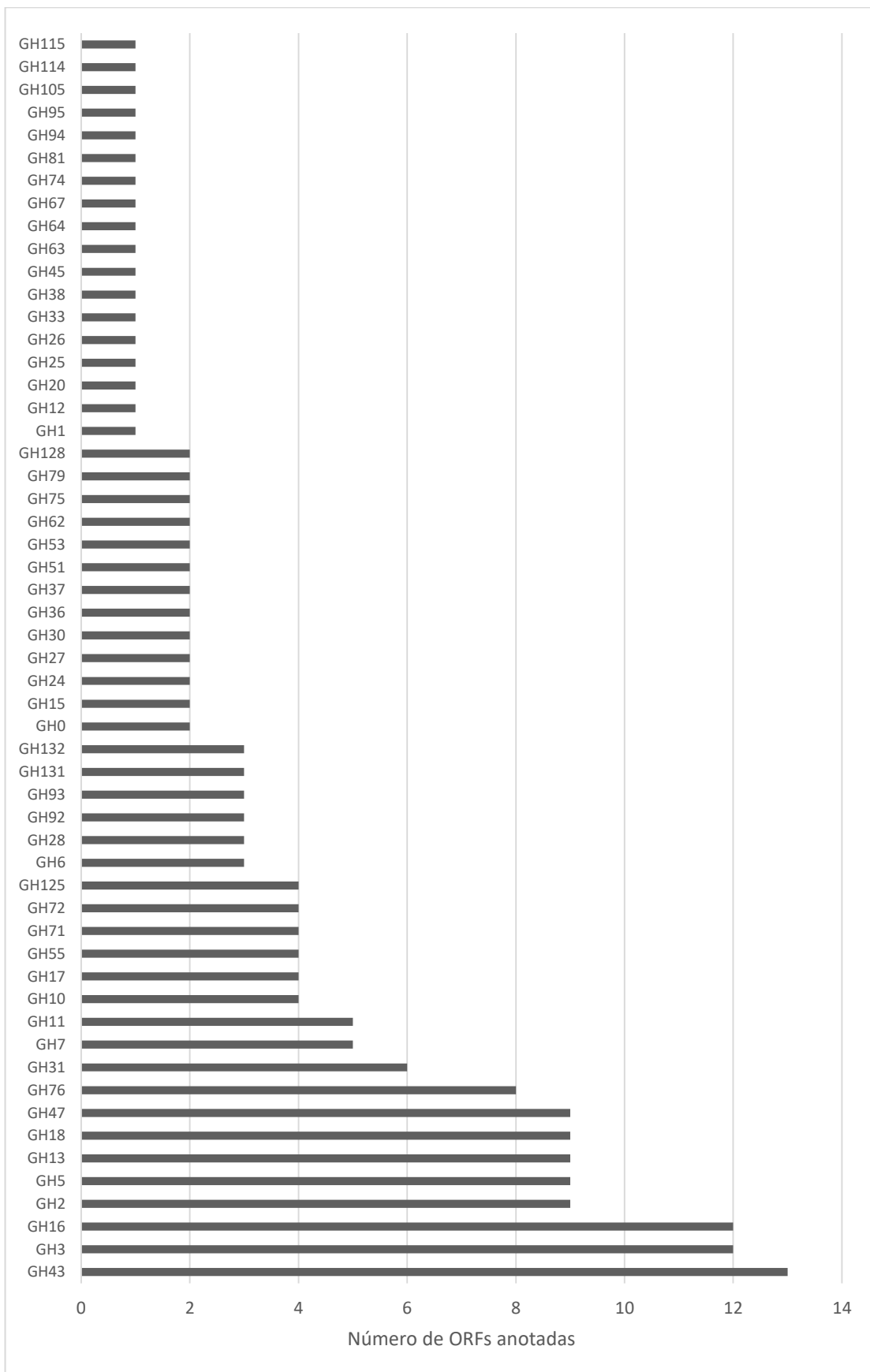
Tabela 2. Número de ORFs anotadas por classes e famílias disponíveis na plataforma CAZy.

Classe	Função geral	Número de ORFs anotadas	Número de famílias anotadas
Glicosil hidrolases (GH)	Hidrólise e/ou rearranjo de ligações glicosídicas	192	55
Glicosil Transferases (GT)	Formação de ligações glicosídicas	96	34
Polissacarídeo liases (PL)	Clivagem não hidrolítica de ligações glicosídicas	7	4
Carboidrato esterases (CE)	Hidrólise de ésteres de carboidratos	18	8
Moléculas ligadoras de carboidratos (CBM)	Adesão a carboidratos	18	7
Atividades auxiliares (AA)	Enzimas redox que atuam junto com as enzimas da plataforma CAZy	38	11
Total		369	119

Fonte: autoria própria.

Dentre as sequências codificadoras de enzimas envolvidas com a sacarificação da biomassa, destacam-se as pertencentes à classe das glicosil hidrolases (GH), as quais correspondem a 52 % das enzimas CAZy anotadas e a mais de 2 % do total de transcritos identificados. A classe das glicosil hidrolases conta atualmente com 156 famílias, tendo sido identificadas 55 delas neste estudo (figura 4).

Figura 4. Número de ORFs anotadas por família de glicosil hidrolases (GH).



Fonte: autoria própria.

As famílias que apresentaram maior número de sequências anotadas foram GH3 (13 ORFs), GH16 e GH43 (12 ORFs cada), as quais exibem grande diversidade de atividades. Enzimas pertencentes à família GH3, por exemplo, podem atuar como β -glicosidases, arabinofuranosidases, β -xilosidases e acetilglicosaminidases. Já as enzimas pertencentes à família GH16 são ativas em ligações glicosídicas β -1,4 e β -1,3 de polissacarídeos, atuando como glucanases, galactosidases ou hialuronidases. Por sua vez, enzimas agrupadas na família GH43 atuam principalmente como α -L-arabinofuranosidases e β -xilosidases.

Um considerável número de enzimas pertencentes às famílias GH2, GH5, GH13, GH18, GH47 e GH76 também foram anotadas, refletindo a complexidade dos substratos presentes no meio de cultura e o grande número de enzimas requeridas para sua degradação.

A análise do genoma de três linhagens da espécie *M. heterothallica* (CBS 203.75, CBS 663.74 e SBP.F1.2.11), realizada por Aguilar-Pontes e colaboradores (2016), demonstra que as famílias de glicosil hidrolases com maior número de sequências anotadas neste estudo correspondem às famílias com maior número de sequências descritas para esta classe. Para a espécie *M. thermophila*, que apresenta morfologia, fisiologia e filogenia muito próximas às de *M. heterothallica*, essas famílias também são as que contam com maior número de sequências descritas dentre as glicosil hidrolases.

Ainda, estudos do transcriptoma de *M. thermophila* apontam que diversos genes pertencentes às famílias GH3, GH16 e GH43 apresentam maior expressão quando o fungo se desenvolve em substratos como aveia, cevada e canola, quando comparado ao desenvolvimento em meio rico em glicose (KOULBUSZ et al., 2014), o

que certamente reforça o importante papel que estas enzimas desempenham na sacarificação de substratos.

5. CONCLUSÕES

O estudo do transcriptoma de *Myceliophthora heterothallica* permitiu a identificação de 369 ORFs pertencentes à plataforma CAZy, das quais, 192 ORFs são referentes a glicosil hidrolases.

Estes dados comprovam o elevado potencial de *M. heterothallica* para a produção de enzimas envolvidas com a degradação a biomassa vegetal e poderão ser utilizados em estudos futuros que envolvam expressão heteróloga, purificação e caracterização de enzimas.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-PONTES, M. V.; ZHOU, M.; VAN DER HORST, S.; THEELEN, B.; DE VRIES, R. P.; VAN DEN BRINK, J. Sexual crossing of thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* improved enzymatic degradation of sugar beet pulp. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 41-55, 2016.

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; BONGERS, M.; WALTON, J. D. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9097–9105, 2010.

DELMAS, S.; PULLAN, S. T.; GADDIPATI, S.; KOKOLSKI, M.; MALLA, S.; BLYTHE, M. J.; IBBETT, R.; CAMPBELL, M.; LIDDELL, S.; ABOOBAKER, A.; TUCKER, G.A.; ARCHER, D. B. Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 8, p. e1002875, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002875>>. Acesso em: 10 Abr. 2018.

FINN, R. D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; COGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; HEGER, A.; HETHERINGTON, K.; HOLM, L.; MISTRY, J.; SONNHAMMER, E. L.L.; TATE, J.; PUNTA, M. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D222–D230, 2014.

HAAS, B. J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P. D.; BOWDEN, J.; COUGER, M. B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M.; MACMANES, M. D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHE, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C. ; HENSCHER, R.; LEDUC, R.D.; FRIEDM, N.; REGEV, A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1494–1512, 2013.

KOLBUSZ, M. A.; DI FALCO, M.; ISHMAEL, N.; MARQUETEAU, S.; MOISAN, M. C.; BAPTISTA, C. S.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A. Transcriptome and exoproteome analysis of utilization of plant-derived biomass by *Myceliophthora thermophila*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 10-20, 2014.

LOMBARD, V.; CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D490–D495, 2014.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. **Current Protocol in Molecular Biology**, New York, v. 1, p. 1-13, 2010.

NIELSEN, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. In: KIHARA, D. (Ed.). **Protein Function Prediction**. New York, NY: Springer New York, v. 1611p. 59–73, 2017.

PENG, M.; AGUILAR-PONTES, M. V.; HAINAUT, M.; HENRISSAT, B.; HILDÉN, K., MÄKELÄ, M. R.; DE VRIES, R. P. Comparative analysis of basidiomycete transcriptomes reveals a core set of expressed genes encoding plant biomass degrading enzymes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 112, p. 40-46, 2017.

POWELL, S. et al. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D231–D239, 2014.

SANCHEZ, C., Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–80, 2012.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics, Madison**, v. 10, p. 57-63, 2009.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, a identificação de um gene codificador de xilanase da família GH11 do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* foi realizada por meio da técnica de RT-PCR. A xilanase identificada foi expressa heterologicamente com sucesso tanto em hospedeiro procarioto (*Escherichia coli*) quanto em hospedeiro eucarioto (*Pichia pastoris*).

A enzima recombinante apresentou características interessantes quando expressa em ambos os hospedeiros, como: estabilidade em ampla faixa de pH, resistência a diversos íons, reagentes, solventes e compostos fenólicos, bem como elevada especificidade pelo substrato, apresentando atividade somente para xilana *beechwood* e xilana *oat spelt*.

Em relação à termoestabilidade, porém, a enzima expressa em *P. pastoris* se mostrou mais promissora e, provavelmente, a glicosilação exerceu importante papel na estabilização da proteína. Além de maior termoestabilidade, a enzima expressa em levedura apresentou ainda atividade específica e afinidade pelo substrato mais elevadas.

Desta forma, conclui-se que *P. pastoris* foi o hospedeiro heterólogo mais apropriado para a expressão da xilanase de *M. heterothallica*, destacando-se ainda como vantagens, a secreção da enzima no meio de cultura e maior produção da mesma de maneira solúvel.

Por fim, ressalta-se que a identificação de sequências codificadoras de enzimas lignocelulolíticas, obtidas através do estudo do transcriptoma do fungo, contribuirão para estudos subsequentes de expressão heteróloga.

ANEXO 1

Predição de sítios de glicosilação da enzima recombinante.

CENTERFO
R BIOLOGI
CAL SEQU
ENCEANA
LYSIS CBS

NetNGlyc 1.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Asn-Xaa-Ser/Thr sequons in the sequence output below are highlighted in **blue**.
Asparagines predicted to be N-glycosylated are highlighted in **red**.

Output for 'Sequence'

Name: Sequence Length: 218

```
MVSFTLLLTAIAAAVTTASPLEVVKRGIQPGTGTHEGYFYSFWDGRGSVDFNPGPRGSYSVTIWNVNNWVGGKGNPGP      80
PRKIAYNGTWNNYVNSYLALYGVTRNPLVEYYIVEAYGTYNPSSGTARLGTIEDDGGVYDIYKTRRYNQPSIEGTSTFD      160
QYWSVRRQKRVGGTIDTGKHFDEWKRQGNLQLGTWNYMIMATEGYQSSGSATIEVREA
.....
.....N.....N.....
.....
.....
```

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	87 NGTW	0.7964	(9/9)	+++
Sequence	122 NPSS	0.7374	(9/9)	++ WARNING: PRO-X1.