



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

Angelica Rodrigues de Souza

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo
Thermoascus aurantiacus, expressa em *E. coli*, por evolução
dirigida e desenho racional: Produção, purificação, caracterização
bioquímica e biofísica da enzima

São José do Rio Preto
2018

Angelica Rodrigues de Souza

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo
Thermoascus aurantiacus, expressa em *E. coli*, por evolução
dirigida e desenho racional: Produção, purificação, caracterização
bioquímica e biofísica da enzima

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Aplicada, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: FAPESP – Processo:
2011/22461-4

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva
Orientador externo: Jeffrey Mertens
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe
Gonçalves Torres
Colaborador: Dr. Roberto Ruller

São José do Rio Preto
2018

Souza, A. R.

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo *Thermoascus aurantiacus*, expressa em *E. coli*, por evolução dirigida e desenho racional : produção, purificação, caracterização bioquímica e biofísica da enzima / Angelica Rodrigues de Souza. -- São José do Rio Preto, 2018
117 f. : il.

Orientador: Roberto da Silva

Orientador: Jeffrey Mertens

Coorientador: Fernando Araripe Gonçalves Torres

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Fungos termofílicos. 4. Xilanases. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

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

Angelica Rodrigues de Souza

Melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo
Thermoascus aurantiacus, expressa em *E. coli*, por evolução
dirigida e desenho racional: Produção, purificação, caracterização
bioquímica e biofísica da enzima

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Aplicada, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), campus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: FAPESP – Processo:
2011/22461-4

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr. Roberto Ruller
Pesquisador Doutor – CTBE/IBILCE

Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez
Professor Adjunto (Livre Docente em Bioquímica) – IBILCE/UNESP

Dra. Leticia Maria Zanphorlin Murakami
Pesquisadora Doutora – CTBE

Prof.^a Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres
Professora Titular – USP/LORENA

São José do Rio Preto
04 de março de 2016

AGRADECIMENTOS

Com amor naquilo que escolhemos ser e fazer, tudo se faz, tudo se cria, tudo se transforma. Não me vejo tendo traçado outro caminho, ainda que nos momentos mais difíceis, com inúmeras repetições de experimentos para comprovar o resultado obtido...

Falar de todo o trajeto até aqui percorrido seria longo, mas agradecer as pessoas pelas quais cruzaram minha caminhada não. Então aqui vai meu muito obrigada para minha professora Marta da época do parquinho, que me alfabetizou antes mesmo da primeira série; a Professora Vilma por ajudar a despertar amor pelas ciências; aos professores do colégio por me ensinarem a persistir, mesmo quando com máxima dificuldade, na migração da escola pública para particular no ensino médio; aos professores de cursinho; aos professores de minha formação na faculdade, e ao meu orientador (Roberto da Silva) pela confiança depositada em mim; ao co-orientador (Fernando A. G. Torres) pelo aceite na parceria do trabalho e co-orientação. Agradeço a todos pela confiança. Na minha família devo um agradecimento mais que especial a minha MÃE, a minha maior incentivadora de tudo isso!!! Esse título é dela também, pois quando muitos diziam “Ela tem dificuldades” ela traduzia em gestos que me diziam “Vai que você consegue”. Mãe obrigada por me fazer ser assim... otimista e batalhadora sempre. A todos meu muito obrigada.

A FAPESP pelo financiamento a Pesquisa com a aprovação financeira do trabalho (2011-22461-4).

Ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA-Rio Preto), ao Laboratório de Biotecnologia de Leveduras (UnB) e ao Professor Araripe por me receber na UnB.

Ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos por me receber durante período de Pesquisa no Exterior, em especial aos orientadores externos pela colaboração: Jeffrey Mertens, Mike Cotta e Michael Bowman.

E a Deus pela minha vida, pela força da transformação diária e na busca por aprendizado e melhorias.

RESUMO

A proposta inicial deste trabalho foi o melhoramento da termoestabilidade da xilanase do fungo *T. aurantiacus* (XynA_Ta), expressada em *S. cerevisiae* (XynA_Sc), a partir da construção anteriormente obtida em *P. pastoris* (xynA_Pp). Contudo, a reduzida expressão de XynA_Sc, aliada a duas mutações de aminoácidos, motivaram a reclonagem do gene de xynA_Ta em *E. coli* (xynA_Ec). O **Capítulo 1** descreve o estudo da produção e caracterização de XynA_Sc, XynA_Pp e XynA_Ec, anterior as correções das mutações. Estas exibiram ótimos de expressão com 650, 5,8 e 815 U.mL⁻¹, após 96 h e de atividade em pH 5-5,5 e 65-70 °C. XynA_Ec destacou-se com ampla faixa de estabilidade, de 40 a 85 °C, após 1h, e XynA_Pp mostrou 100% de atividade em pH 6-8, após 24 h. XynA_Sc e XynA_Pp apresentaram forte ativação em solventes orgânicos. A XynA_Sc foi inibida em concentrações superiores a 20 mg.mL⁻¹ de substrato. O **Capítulo 2** apresenta resultados da obtenção da forma nativa (corrigida) (XynAc_Ec) e de onze mutantes por MSD. Todas linhagens foram expressas, purificadas e fatores bioquímicos auxiliaram na seleção dos três mais termoresistentes. Estes foram caracterizados, juntamente com XynAc_Ec, frente a fatores biofísicos (CD) e estruturais (por homologia - 1TUX-PDB). Destaque para o mutante H209N com maior termoestabilidade, atividade catalítica e T_m de 71,3 °C. O aumento na estabilidade térmica foi relacionado ao incremento de hélices curtas, pontes salinas e a carga positiva no core catalítico (trabalho publicado). O **Capítulo 3** apresenta resultados da combinação *in silico* dos três mutantes termoestáveis, com base em dados estruturais (homologia - 1TUX-PDB). Q158R / H209N / N257D exibiu maior conteúdo de interações salinas e menor RMSF. Portanto, XynA_Pp, XynA_Ec e H209N são enzimas potenciais para aplicação em bioprocessos; e estudos *in silico* sugerem que mutante Q158R / H209N / N257D seja obtido *in situ*.

Palavras-chave: endo-xilanase, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *E. coli*, termoestabilidade, mutantes.

ABSTRACT

The initial purpose of this work was the improvement of xylanase thermal stability of fungus *T. aurantiacus* (*XynA-Ta*), expressed in *S. cerevisiae* (*XynA-Sc*) from the building previously obtained in *P. pastoris* (*xynA-Pp*). However, the reduced expression of *XynA-Sc*, combined with two mutations of amino acids, led to the recloning *xynA-Ta* gene in *E. coli* (*XynA-Ec*). **Chapter 1** describes the study of the production and characterization of *XynA-Sc*, *XynA-Pp* and *XynA-Ec*, previous mutation corrections. These showed great expression with 650, 5.8 and 815 U.mL⁻¹, after 96 h and activity at pH 5-5.5 and 65-70 °C. *XynA-Ec* displayed wide stability range from 40 to 85 °C, after 1h, and *XynA-Pp* showed 100% activity at pH 6-8, after 24 h. *XynA-Sc* and *XynA-Pp* exhibited stronger activation in organic solvents. The *XynA-Sc* was inhibited by concentrations greater than 20 mg.mL⁻¹ of substrate. **Chapter 2** describes the native correction (*XynAc-Ec*) and construction of eleven mutant obtained by the MSD. All strains were expressed, purified and biochemical factors helped in the selection of the three most heat resistant. These were characterized, along with *XynAc-Ec*, by biophysical (CD) and structural factors (homology - 1TUX-PDB). H209N mutant displayed higher thermal stability, catalytic activity and T_m of 71.3 °C. The increase in thermal stability was related to short helices content, salt bridges, and the positive charge in the catalytic core (published work). **Chapter 3** presents results of *in silico* combination of the three thermostable mutants, based on structural data (homology - 1TUX-PDB). Q158R / H209N / N257D showed higher content of bridges interactions and lower RMSF. Therefore, *XynA-Pp*, *XynA-Ec* and H209N are potential enzymes for applied bioprocesses; and studies *in silico* suggest that mutant Q158R / H209N / N257D should be obtained *in situ*.

Keywords: endo-xylanase, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *E. coli*, thermalstability, mutants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química geral da xilana e ação das enzimas do complexo hemicelulolítico.....	22
Figura 2 – Representação estrutural da endo-xilanase de <i>T. aurantiacus</i> , com enovelamento do tipo barril TIM (α/β) ₈ por visão lateral ao longo do barril.....	25
Figura 3 – Mapa do vetor de expressão pET-28a.....	30
Figura 4 – Mapa físico do vetor Y1PGK-1.....	34
Figura 5 – Mapa do vetor pPIC9.....	37
Figura 6 – Esquema representativo de técnicas de engenharia de proteínas. (a): Desenho racional – mutação sítio dirigida (SDM) . (b): Evolução dirigida – epPCR e DNA shuffling.....	41
Capítulo 1	
Figura 1 – Múltiplo alinhamento de seqüências de aminoácidos das construções de pPIC9xil, yPGKxil e pET32xil contra os modelos do GenBank (AF127529.2) e do PDB (1TUX) do fungo <i>T. aurantiacus</i>	66
Figura 2 – Cromatograma de XynA_Sc purificada por cromatografia de troca ar realizada em sistema FPLC ÄKTApurifier (GE Helthcare).....	69
Figura 3 – (A) Cromatogramas de XynA-Pp purificada por cromatografia de troca aniônica realizada em sistema FPLC ÄKTApurifier (GE Helthcare) e gel SDS-PAGE 12% das frações eluídas.....	70
Figura 4 – Purificação de XynA_Ec após etapa de afinidade (gel da esquerda) e gel filtração (gel da direita). XEc: xil_Ec após gel filtração e concentração em tubos vivaspín.....	71
Figura 5 – A análise de SDS-PAGE 12% de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp recombinantes purificadas. (A) Gel SDS-PAGE revelado por EZBlue e coloração com prata. (B) Gel SDS-PAGE com xilana 1%. (C) Zimograma para XynA_Tau.....	72
Figura 6 – Condições de armazenamento das xilanases recombinantes após 24 h de incubação.....	73
Figura 7 – Efeito do pH e da temperatura na atividade xilanólítica de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp.....	74
Figura 8 – Estabilidade de pH e temperatura sobre XynA_Ec, XynA_Pp e XynA_Sc.....	75
Figura 9 – Gráficos de Michaelis-Menten das xilanases variando-se a concentração	

de xilana beechwood (0,5 – 20 mg.mL⁻¹) em ensaio de atividade xilanolítica realizado a 65 °C pH 5-5,5, durante 5 min de reação para XynA_Sc, XynA_Ec e XynA_Pp.....80

Capítulo 2:

Figure 1 – pH stability profile. -●- xynAc; -■- Q158R; -▼- H209N; and -Δ- N257D.....102

Figure 2 – Secondary structure of XynA and its mutants after purification. (Inset), SDS-PAGE analysis of the endo-xylanase variants after the purification and concentration steps.....102

Figure 3 – Model structure of XynA (WT) built by MODELLER based on the PDB ID code 1TUX. Mutants Q158R, N257D and H209N are highlighted.....103

Figure 4 – Models of XynA (WT) and its mutants. A. Before the simulation. B. After the simulation of 50 ns in water with NaCl (100 mM) at 338 K103

Supplementary Material

Figure S1 – Multiple alignment of TaXyn10 amino acid sequence (GenBank: AF127529.1) and PDB structure model (1TUX) highlighting the eleven mutation sites studied in the present work.107

Figure S2 – RMSF per aminoacid residue of XynA and its mutants in 100 mM NaCl solution, at 338K.....108

Figure S3 – Distribution of the surface charge potential in the substrate binding active site region of XynAc (A) and its mutants Q158R (B), H209N (C) and N257D (D).....108

Capítulo 3:

Figura 1 – RMSF por resíduos dos modelos dos mutantes em solução com NaCl (100 mM) a 338K.....114

Figura 2 – Distribuição do potencial de carga superficial no sítio de ligação ao substrato dos mutantes (A) Q158R/H209N (B) Q158R/N257D, (C) H209N/N257D (D) Q158R/H209N/N257D.....115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais objetivos descritos para cada uma das construções em estudo.....	19
Tabela 2 – Reações de bioconversões e aplicações de hidrolases termoestáveis...	20
Tabela 3 – Algumas cepas de <i>E. coli</i> mais frequentemente utilizadas para produção de proteínas heterólogas e seus fatores chave.....	29
Capítulo 1:	
Tabela 1 – Pares de oligonucleotídeos usados na reação de amplificação/sequenciamento.....	57
Tabela 2 – Efeito dos íons metálicos, quelante, surfactantes e solvente na atividade de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp.....	77
Capítulo 2:	
Table 1 – Oligonucleotide pairs used for plasmid construction and site-directed mutagenesis.....	104
Table 2 – Total protein content, specific activities in the optimum temperature and ideal pH and temperature for all the enzyme variants constructed in this work.....	105
Table 3 – Residual activities of XynA (WT) and the best mutant enzymes at 70 °C and 75 °C and some of their structural features <i>T_m</i> values were monitored by the MRE signal at 220 nm.....	105
Capítulo 3:	
Tabela 1 – Fatores estruturais dos mutantes de XynAc_Ec. Número de ligações Salinas e hélices curtas após 50 ns de simulação em água com NaCl (100 mM), a 338 K, e conteúdo de estrutura secundária relativo a cada mutante.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
AOX	Álcool oxidase
AR	Atividade residual
B-merc	Beta mercaptoetanol
CAP	Proteína receptora
CAZy	Carbohydrate active enZYmes
CD	Circular dichroism
CEN.PK2	Cepa de expressão de <i>S. cerevisiae</i>
DP	Desvio padrão
epPCR	Error-prone PCR
FT	<i>Flow-Through</i>
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GHs	Hidrolases glicosídicas
GS115	Cepa de expressão de <i>P. pastoris</i>
GST	Gene da Glutathione S-transferases
HIS	Histidina
HIS4	Gene marca auxotrófica Histidinol desidrogenase 4
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Quilodálon
K_m	Constante de Michaelis Menten
Kan	Kanamicina
MBP	Gene da Myelin Basic Protein
LacI	Lactose-inducible lac operon transcriptional repressor
LEU2	Gene marca auxotrófica Leucina 2
MSD	Mutação sítio dirigida
Mut^s	Fenótipo denominado
RMSF	<i>Root-mean-square fluctuation</i>
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
URA3	Gene marca auxotrófica Uracila 3
NA	Não aplicado
Ori	Origem de replicação
Tm	Temperatura de melting

T7	Sequência terminadora
PDB	Protein data bank
pET32axil	Plasmídeo do gene de xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em vetor de <i>E. coli</i>
PGKpp	Região promotora do vetor constitutivo de <i>S. cerevisiae</i> (yPGK1)
PGKtt	Região terminadora do vetor constitutivo de <i>S. cerevisiae</i> (yPGK1)
pPIC9xil	Plasmídeo do gene de xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em vetor de <i>P. pastoris</i>
V_{max}	Velocidade Máxima
yPGKxil	Plasmídeo do gene de xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em vetor de <i>S. cerevisiae</i>
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosomes</i>
X	Sequência promotora em <i>S. cerevisiae</i>
XOs	Xilooligossacarídeos
XTa	Xilanase de <i>T. aurantiacus</i>
XynA_Tau	Xilanase de <i>T. aurantiacus</i>
XynA_Ec	Xilanase expressa em <i>E. coli</i>
XynAc_Ec	Xilanase corrigida expressa em <i>E. coli</i>
xynAc_Ec	Gene da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> corrigido
xynA_Ec	Gene da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em <i>E. coli</i>
XynA_Pp	Xilanase expressa em <i>P. pastoris</i>
xynA_Pp	Gene da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> em <i>P. pastoris</i>
2μ	<i>Plasmídeo natural.</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos Gerais	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Enzimas termoestáveis	19
3.1.1. Hidrolases Glicosídicas termoestáveis.....	20
3.1.1.1. Endo-xilanases e mecanismo de hidrólise enzimática.....	21
3.2. Estrutura da endo-β-1,4-xilanases de <i>T. aurantiacus</i> (XynA_Ta) e fatores relacionados à sua termoestabilidade	24
3.3. Sistema microbiano para a clonagem e expressão heteróloga de enzimas termoestáveis	25
3.3.1. Bactéria como sistema de expressão heteróloga.....	26
3.3.2. Fungo como sistema de expressão heterólogo.....	32
3.3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema de expressão heteróloga.....	32
3.3.2.2. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão heterólogo.....	35
3.4. Melhoramento genético de enzimas	40
4. CONCLUSÕES	42
5. REFERÊNCIAS	42
Capítulo 1:	52
1. INTRODUÇÃO	54
2. METODOLOGIA	56
2.1. Obtenção e construções dos plasmídeos recombinantes de xilanase do fungo termofílico <i>Thermoascus aurantiacus</i> (Xil_Tau) em vetor constitutivo de <i>Pichia pastoris</i>, vetor episomal de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, yPGK, e de <i>Escherichia coli</i>, pET32a	56
2.2. Sequenciamento das construções de xilanases	57
2.3. Expressões das xilanases recombinantes	58
2.3.1. Em cepa GS115 de <i>P. pastoris</i>	58
2.3.2. Em cepa CEN.PK2 de <i>S. cerevisiae</i>	58
2.3.3. Em cepa Rosetta-gami de <i>E. coli</i>	59
2.4. Pré-tratamento do extrato bruto, purificações e proteína total	60
2.4.1. Xilanases recombinantes (XynA_Sc e XynA_Pp).....	60

2.4.2. Xilanase recombinantes (Xyna_Ec).....	61
2.5. Atividade xilanolítica.....	62
2.6. SDS-PAGE e Zimograma de endo-xilanase.....	62
2.7. Determinação de fatores bioquímicos das xilanases recombinantes.....	63
2.7.1. Condições de armazenamento das xilanases recombinantes.....	63
2.7.2. Especificidade ao substrato.....	63
2.7.3. pH e temperatura ótimos e de estabilidade.....	63
2.7.4. Efeito de íons metálicos, não metálicos, quelantes, solventes orgânicos e surfactantes na atividade das endo-xilanases.....	64
2.7.5. Parâmetros cinéticos para as xilanases recombinantes.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
3.1. Sequenciamento das construções de yPGKxil, pPIC9xil e pET32xil.....	65
3.2. Expressão das linhagens de xilanase recombinantes em <i>P. pastoris</i>, <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i>.....	67
3.3. Purificação das xilanases recombinantes de estudo.....	68
3.4. Zimograma para xilanases recombinantes.....	71
3.5. Determinação de fatores bioquímicos das xilanases recombinantes.....	73
3.5.1. pH e temperatura ótimo e de estabilidade.....	74
3.5.2. pH e temperatura de estabilidade.....	75
3.5.3. Efeito de íons, agente quelante, surfactante e detergente sob as xilanases recombinantes.....	77
3.5.4. Cinética enzimática.....	79
4. CONCLUSÕES.....	81
5. REFERÊNCIAS.....	81
Capítulo 2:.....	86
1. INTRODUCTION.....	88
2. MATERIAL AND METHODS.....	89
2.1. <i>Cloning of the gene xynA_TA.....</i>	89
2.2. <i>Site-directed mutagenesis.....</i>	89
2.3. <i>Heterologous expression, enzyme purification and quantification.....</i>	90
2.4. <i>Biochemical, biophysical and structural properties of XynA (WT) and mutants.....</i>	91
2.4.1. <i>Effects of temperature and pH on xylanase activity and stability.....</i>	91
2.4.2. <i>Spectroscopic analyses.....</i>	91

2.4.3. <i>Molecular modeling and Molecular dynamics simulation of XynA and its thermostable mutants in solution</i>	92
3. RESULTS AND DISCUSSION	93
3.1. <i>Expression and Purification of XynA and the mutants</i>	93
3.2. <i>Biochemical properties of XynA and the mutants</i>	93
3.3. <i>Spectroscopic analyses</i>	94
3.4. <i>Molecular modeling and Molecular dynamics simulation</i>	95
3.5. <i>Influence of other structural features upon XynA thermostability</i>	96
4. CONCLUSIONS	96
5. ACKNOWLEDGEMENTS	97
6. REFERENCES	97
Capítulo 3:	109
1. INTRODUÇÃO	111
2. METODOLOGIA	112
2.1. Modelagem molecular e dinâmica molecular da xynAc e seus mutantes	112
3. RESULTADOS	113
4. CONCLUSÕES	116
5. REFERÊNCIAS	116

1. INTRODUÇÃO

As endo-1,4- β -xilanases são enzimas responsáveis pela hidrólise da cadeia interna da xilana, o principal componente da hemicelulose, produzindo unidades menores de xilobiose e xilooligossacarídeos. A habilidade das endoxilnases hidrolisar xilana, destacaram-nas como importante enzima para aplicações industriais no tratamento da biomassa residual, branqueamento de papel e produção de xilooligossacarídeos com importantes funções prebióticas. Portanto, dependendo da aplicação final destas enzimas, necessita-se de xilanases capazes de tolerar ambientes extremos, como elevada temperatura ou pH extremamente ácidos e básicos. No entanto, nem sempre estas enzimas possuem naturalmente estas características.

O aumento na produção de enzimas e o melhoramento de características bioquímicas podem ser obtidos por meio de estratégias moleculares, também denominado de tecnologia de DNA recombinante e engenharia de proteína. Dentre estas, destacam-se a produção de proteínas recombinantes heterólogas, melhoramento genético por desenho racional ou mutação sítio dirigida (MSD); e evolução de enzimas por reação da cadeia de polimerase propenso a erros (epPCR) e embaralhamento de DNA, o qual originou-se do inglês DNA *shuffling*. De acordo com a característica desejada os mutantes são selecionados e estudados para melhor compreensão do seu potencial biológico.

Neste sentido, este projeto de Doutorado objetivou inicialmente o melhoramento genético do gene da endoxilânase do fungo *T. aurantiacus* (XynA_Ta) por epPCR apenas. O gene de xilanase clonado em *P. pastoris* (xynA_Pp) foi doado por grupo de pesquisa de Biotecnologia de Leveduras, no qual aluna de mestrado (Fernanda Franco) desenvolveu projeto de clonagem e expressão em cepa de *P. pastoris*, anterior ao trabalho de estudo. Acreditava-se inicialmente que a clonagem e expressão de XynA_Tau em *S. cerevisiae* seria interessante devido ao fato de que o vetor episomal de *Saccharomyces* possui o plasmídeo natural 2 μ , o qual confere também uma origem de replicação em *E. coli*, diferindo-se do vetor de *Pichia*. Este último plasmídeo foi utilizado como molde para amplificação e clonagem em *S. cerevisiae* (XynA_Sc), seguido de etapa de melhoramento por epPCR.

Problemas relativos a reduzida expressão de XynA_Sc, aliado a presença de dois sítios de mutações na sequência de aminoácidos (N60D e A221V) da mesma,

indicaram que realizar estudo de mutação a partir de um gene naturalmente “mutado” poderia conduzir a um estudo difícil de ser analisado devido a dificuldades de comparações dos dados. Portanto, estas linhagens de *xynA_Pp* e *xynA_Sc* foram posteriormente expressas durante este trabalho, sendo o protocolo de expressão de *xynA_Sc* estabelecido e o de *XynA_Pp* executado como determinado em trabalho anterior. *XynA_Pp* não havia sido purificada, o que motivou estudo de purificação desta linhagem juntamente com a linhagem deste trabalho, *XynA_Sc*. Tratavam-se de construções que carregavam naturalmente estes sítios de mutações, mas com perfis completamente diferentes de expressão. Portanto, estudos de purificação e caracterização bioquímica das linhagens de *XynA_Sc* e *XynA_Pp* são apresentados neste trabalho, uma vez que a caracterização da enzima nativa era um dos objetivos do projeto inicial.

Posteriormente, o gene da xilanase foi clonado em *E. coli* (*XynA_Ec*), com as bases corrigidas por MSD, o qual originou a xilanase nativa corrigida (*xynAc_Ec*). Este foi utilizado posteriormente para outras onze reações de MSD e dois *rounds* de epPCR. Mutantes foram caracterizados frente a condições bioquímicas distintas, dos quais mutantes termoestáveis obtidos por MSD foram selecionados e tiveram dados biofísicos e estruturais coletados por CD e modelagem molecular. Diante das dificuldades encontradas no trabalho de expressão em *S. cerevisiae*, dada a facilidade de trabalho com *E. coli*, tempo reduzido para expressão, elevado nível de expressão e de enzima pura, estes três mutantes e a nativa foram utilizados para continuação do trabalho de Doutorado, sendo estudos, *in silico*, de combinação destes três materiais genéticos representativos dos termoestáveis foram conduzidos para seleção de mutantes potenciais para estudos *in situ*.

Com relação aos mutantes em *E. coli* selecionados, objetivou-se caracterizar as construções frente a fatores bioquímicos, biofísicos e estruturais, assim como prover estudos *in silico* a partir da combinação dos mutantes pré-selecionados, com intuito de facilitar etapas posteriores de combinação destes materiais genéticos, contribuindo para economia tempo na bancada e gastos desnecessários com reagentes. Por outro lado com as construções em levedura, objetivou-se comparar os dados bioquímicos das duas linhagens *XynA_Pp* e *XynA_Sc* contra a nativa em *E. coli*, *XynA_Ec*, com a mesma mutação, e checar o efeito de modificação pós-traducional das construções em levedura, comparadas a de bactéria. Trata-se de um

trabalho completo, inovador e de elevada contribuição para o setor de produção de enzimas em território nacional.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

A estratégia central que motivou a execução deste trabalho de doutorado foi o melhoramento genético da termoestabilidade da endo-xilanase do fungo *T. aurantiacus*, XynA_Ta, por estratégia molecular.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos apresentados neste trabalho de tese de Doutorado estão apresentados na **Tabela 1**. Para efeito de melhor compreensão das etapas realizadas a tabela está estruturada em duas colunas. A coluna da esquerda é representativa dos resultados obtidos com o estudo da xilanase de *T. aurantiacus* nativa (ainda com os sítios de mutações) clonada e expressa nos três diferentes organismos, *S. cerevisiae*, *P. pastoris* e *E. coli*, originando XynA_Sc, XynA_Pp e XynA_Ec, respectivamente. A segunda coluna é representativa dos resultados obtidos a partir da correção das mutações não silenciosas da xilanase nativa de *T. aurantiacus* clonada e expressa apenas em *E. coli* (XynAc_Ec e mutantes). Estes dados foram obtidos durante execução de trabalho de doutoramento, com bolsa no país, e no exterior, com a BEPE.

Tabela 1 – Principais objetivos descritos para cada uma das construções em estudo.

XynA_Sc/XynA_Pp/XynA_Ec (nativas)	XynAc_Ec e mutantes
<ul style="list-style-type: none"> • Clonagem e expressão - 3 construções com sítios de mutação • Purificação das linhagens produzidas • Caracterização bioquímica (pH, T°C, sais e cinética) • Seleção do sistema de expressão ideal para XynA_Ta) 	<ul style="list-style-type: none"> • Clonagem Correção da nativa e construção de mutantes por MSD • Expressão e Purificação das linhagens produzidas • Caracterização bioquímica de XynA_Ecc e 11 mutantes (pH, T °C) • Seleção de mutantes termoestáveis <ul style="list-style-type: none"> • Dados biofísicos e estruturais da nativa corrigida e dos mutantes selecionados • Estudos <i>in silico</i> da combinação dos mutantes selecionados para segundo <i>round</i> de mutação

XynA_Sc: xilanase nativa expressa em *S. cerevisiae*.

XynA_Pp: xilanase nativa expressa em *P. pastoris*.

XynA_Ec: xilanase nativa expressa em *E. coli*.

XynA_Ecc: xilanase nativa corrigida expressa em *E. coli*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas termoestáveis

Enzimas termoestáveis tem sido o foco de interesses biotecnológicos, pois apresentam maior tolerância a ambientes estressantes e maior resistência a condições de armazenamento. Dentre as vantagens da utilização de enzimas termo resistentes destacam-se: hidrólise enzimática a elevadas temperaturas, reduzindo o risco de contaminação, aumento da biodisponibilidade, solubilidade dos componentes orgânicos, o coeficiente de difusão dos substratos e conduzindo para maior taxa de conversão de reagentes a produtos (KUMAR; NUSSINOV, 2001).

A produção de enzimas termoestáveis tem crescido através dos avanços na linha de pesquisa em biologia molecular. O isolamento de um grande número de microrganismos termofílicos dos domínios Archaea, Bactéria e Eucaria, a partir de diferentes nichos ecológicos, e suas enzimas com aplicações biotecnológicas importantes, tem sido relatado na literatura (BHALLA et al., 2014; HUNG et al., 2011; QIAO et al., 2014).

3.1.1. Hidrolases Glicosídicas termoestáveis

O mercado de enzimas apresentou um aumento no volume de negócios, movimentando cerca de U\$ 4411,6 milhões em 2013, e é esperado um aumento para U\$ 7652,00 milhões até 2020. Dentre as enzimas de maior interesse, do ponto de vista industrial e aplicado, destacam-se as hidrolases glicosídicas (GHs), dos quais 20% das enzimas do mercado mundial são GHs, ou seja, catalisam a liberação de monossacarídeos a partir de polímeros mais complexos, como a celulose, hemicelulose, pectina e xilana (BAJPAI, 2014). A tabela 2 apresenta algumas das GHs mais popularmente empregadas em bioprocessos.

Tabela 2 – Reações de bioconversões e aplicações de hidrolases termoestáveis.

Enzimas	Faixa de Temperatura (°C)	Reações de Bioconversões	Aplicações
α -Amilase	50-60	amido \rightarrow xarope de dextrose	Produção de maltose e hidrólise do amido
Pululanase	50-60	amido \rightarrow xarope de dextrose	Produção de xarope de glicose
Celulase	45-95	Celulose \rightarrow glicose	Hidrólise da celulose, degradação de polímero em detergentes e sacarificação da biomassa
Xilanase	45-105	Polpa Kraft \rightarrow xilana + lignina	Indústria de polpa/papel e sacarificação da biomassa
Lipase	30–70	Remoção de gordura, hidrólise, interesterificação, alcoólise, amilose	Indústrias de laticínios, óleo, detergentes, polpa, farmacêutica, cosméticos e couro
DNA polimerase	90–95	Amplificação de DNA	Engenharia genética/PCR
Protease	65–85	proteína \rightarrow Aminoácidos e peptídeos	Indústrias de padaria, fermentação, detergentes e couro

De acordo com a IUBMB (*International Union for Biochemistry and Molecular Biology*), a nomenclatura das GHs baseia-se na especificidade ao substrato e, ocasionalmente, no seu mecanismo molecular. No entanto, tal classificação não reflete as características estruturais das enzimas. Uma classificação mais antiga das GHs foi proposta em grupos de famílias (GH-1 a GH-135), de acordo com CAZy (Carbohydrate-Active enZymes; <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>), com base nas semelhanças de sequências de aminoácidos e tipo de enovelamentos

(CANTAREL et al., 2009; DAMÁSIO et al., 2014). Devido ao fato de que os enovelamentos de proteínas podem ser mais conservados do que as suas sequências, novo sistema de organização destas enzimas foi proposto, sendo membros de diferentes famílias agrupadas em "clãs", os quais estão divididos de acordo com famílias relacionadas (GH-A a GH-N) (www.cazy.org), com a maioria destes clãs compostos por membros de 2 ou 3 famílias, exceto o clã GH-A com mais de 19 famílias (CAZY; (FUSHINOBU; ALVES; COUTINHO, 2013; HENRISSAT; BAIROCH, 1996).

Com relação ao mecanismo de catálise, todas as GHs, exceto membros da Família 4, são separadas em duas classes distintas, por um mecanismo de hidrólise ácida, em que dois resíduos de aminoácidos estão envolvidos no sítio ativo das enzimas, no qual um atua como ácido e outro como base. A primeira refere-se as enzimas que catalisam as reações de hidrólise de ligações glicosídicas por um único mecanismo de deslocamento, com inversão da configuração do centro anomérico, liberando uma molécula de água. A segunda classe atua via um duplo mecanismo de deslocamento, com retenção da configuração estereoquímica do carbono anomérico (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005), envolvendo a formação de um intermediário (Enzima-Carboidrato).

3.1.1.1. Endo-xilanases e mecanismo de hidrólise enzimática

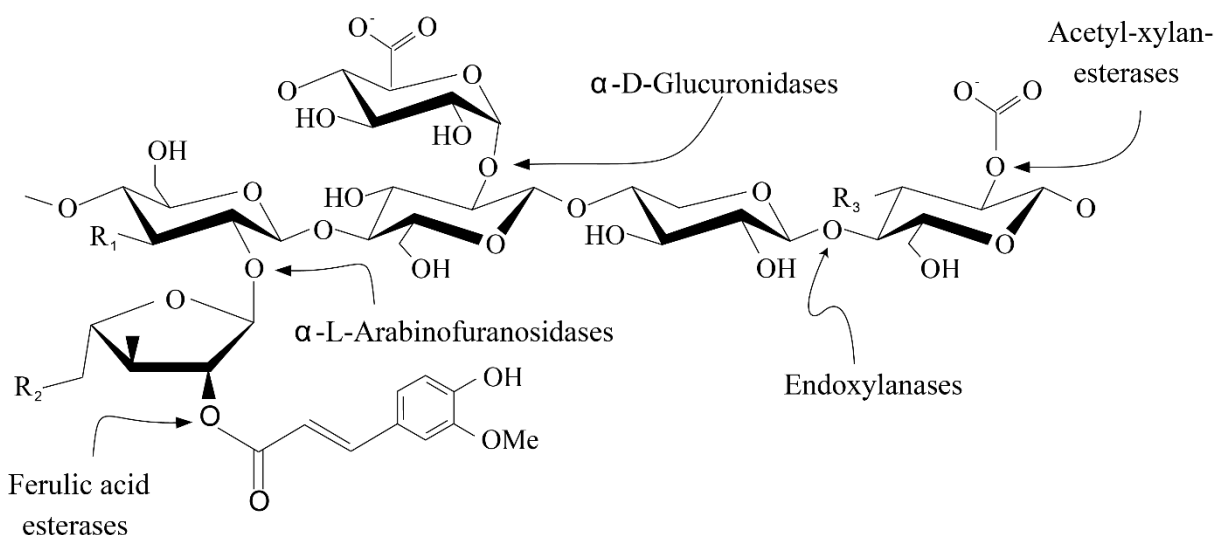
A fração hemicelulolítica consiste de heteropolissacarídeos altamente ramificados e de elevada complexidade estrutural. Os resíduos encontrados na hemicelulose incluem pentoses (xilose, arabinose), hexoses (galactose, galactose, manose, arabinose, fucose) e ácidos urônicos (ácidos glicurônicos e galacturônico) (**Figura 1**). A classificação da fração hemicelulolítica depende do tipo de unidade monomérica que constitui o polímero e é denominada de xilana, manana, galactana ou arabinana (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012), sendo xilana o seu principal constituinte.

As endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas que possuem um papel fundamental na hidrólise da xilana. Compreendem o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação deste polímero. A xilana é composta por uma cadeia principal de resíduos D-xilopiranosil conectados por ligações β -1,4, com sítios de ramificações na estrutura, como resíduos de acetato, D-glucuronato, 4-O-metil-D-

glucuronato e resíduos de L-arabinofuranose. Portanto, a completa degradação deste heteropolissacarídeo de estrutura altamente complexa (**Figura 1**) requer a ação de complexo enzimático, como as endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8), β -1,4-xilosidase (EC 3.2.1.37), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e acetil ou xilana esterase (EC 3.1.1.72) (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Dentre estas enzimas, as endo- β -1,4-xilanases são as enzimas chave que atuam na hidrólise da cadeia de xilana, agindo internamente no esqueleto carbônico de forma aleatória, produzindo unidades menores de xilobiose, duas unidades de xilose, e xilooligossacarídeos, com comprimento da cadeia variado, de dois a dez unidades monoméricas de xilose (POLIZELI et al., 2005). Endo-xilanases são produzidas por uma infinidade de organismos, incluindo bactérias e fungos (AHMED; RIAZ; JAMIL, 2009; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2009), dos quais os fungos destacam-se como os melhores produtores do complexo xilanolítico (BEG et al., 2001). A Figura 1 ilustra os sítios de ação das enzimas do complexo xilanolítico para conversão da xilana a unidades menores.

Figura 1 – Estrutura química geral da xilana e ação das enzimas do complexo hemicelulolítico.
Xylan molecule



(Autoria própria)

Neste sentido, de acordo com COLLINS; GERDAY; FELLER, (2005) é possível verificar que as endo- β -1,4-xilanases pertencem à classificação das hidrolases glicosídicas (GH) das famílias 5, 7, 8, 10, 11, 16, 26, 43, 52 e 62. No entanto, os autores relatam que com olhar mais atento aos dados disponíveis na literatura, apenas

os membros das famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 contém domínios catalíticos distintos com atividade xilanólítica verdadeiramente comprovada. Enquanto, os membros das famílias 16, 52 e 62 foram denominadas de enzimas bifuncionais, os quais contém duplo domínio catalítico: domínio da família GH10 ou 11 e um segundo domínio glicosídeo (FLINT et al., 1993); ao passo que os membros de GH26 são classificados como endo- β -1,3-xilanases (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; www.cazy.org).

Dentre estas famílias, endo- β -1,4-xilanases das famílias 10 (primeiramente denominada de família F, a qual atualmente pertence ao clã GH-A) e 11 (primeiramente denominada de família G, a qual atualmente pertence ao clã GH-C) tem sido extensivamente descritas na literatura. Representantes da família F/10 das endo-xilanases são enzimas de elevada massa molecular, estruturalmente compostos de um domínio de ligação à celulose e um domínio catalítico conectado a um ligante péptico. As xilanases pertencentes a esta família tem um enovelamento do tipo barril TIM (α/β)₈ (BIELY et al., 1997). Por outro lado, representantes da família G/11 apresentam reduzida massa molecular, quando comparadas aos membros F/10. Estas enzimas possuem um enovelamento do tipo β -*jelly roll*. Portanto, devido a sua reduzida dimensão, considera-se que estes representantes possam atravessar os poros da rede hemicelulolítica, contribuindo para eficiência na hidrólise enzimática. Neste sentido, sabe-se a família 10 ou F incluem xilanases com elevada termoestabilidade (DOMINGUEZ et al., 1995).

As Endo e exo-xilanases têm sido amplamente aplicadas em processos biotecnológicos, tais como biobranqueamento de pasta de papel, produção de ração animal, clareamento de sucos de frutas, panificação (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999), na produção de embalagens de filmes compostos de xilana (HANSEN; PLACKETT, 2008), na produção de agentes tensioativos biodegradáveis (DAMEZ et al., 2007), e mais recentemente na produção de xilooligosacarídeos (XOs) com funções prebióticas (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; RUSTIGUEL et al., 2010). TENG et al. (2011) obteve elevado rendimento de XOs usando espiga de milho pré-tratada por explosão a vapor, seguida de hidrólise empregando xilanase termoestável de *Paecilomyces thermophila* J18, a 70 °C.

Atualmente, grandes esforços tecnológicos tem sido concentrados na sacarificação da biomassa lignocelulósica para produção do etanol de segunda geração. Acredita-se que esta linha de produção aumentará 100% durante os próximos dez anos. Neste sentido, as xilanases podem atuar na total utilização da

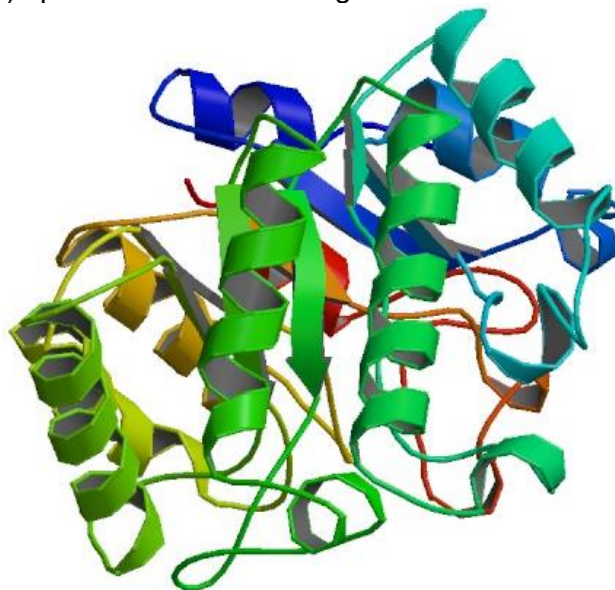
biomassa lignocelulósica, incluindo açúcar de pentoses, derivadas de hidrólise da hemicelulose e associada com a transformação de glicose a etanol. Esta linha de atuação tem sido proposta pelas biorrefinarias (KIM; KIM, 2014), em processos integrados de sacarificação simultânea a fermentação, por exemplo.

Diversos estudos tem sido relatados para produção de xilanases termoestáveis a partir de organismos termofílicos e hipertermofílicos, procariotos e eucariotos, dos quais suas atividades xilanolíticas apresentam uma faixa de atuação de 60 a 100 °C (BHALLA et al., 2014; PALACKAL et al., 2004; QIAO et al., 2014; RÄTTÖ et al., 1994; RUTTERSMITH; DANIEL; SIMPSON, 1992). Xilanases produzidas por organismos hipertermófilos, como *Thermotoga* sp., *Dictyoglomus* sp., *T. marítima*, *T. neapolitana*, *T. themarum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, apresentam temperatura ótima de atividade em torno de 90 °C (CANNIO et al., 2004; LEUSCHNER; ANTRANIKIAN, 1995; SAUL et al., 1994; WINTERHALTER; LIEBL, 1995), enquanto xilanases de *P. furiosus* e de *S. solfataricus*, atuam a 100 °C e 105 °C, respectivamente (HAKI, 2003). Fungos termofílicos, como *Thermomyces thermophiles*, *T. lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomucor indaticae-seudadicae*, produzem xilanases termostáveis com ótimo de ação de 50 até 80 °C (DAMASO et al., 2003; MAALEJ et al., 2009; ZHANG; WOODAMS; HANG, 2011).

3.2. Estrutura da endo- β -1,4-xilanases de *T. aurantiacus* (XynA_Ta) e fatores relacionados à sua termoestabilidade

Esta enzima possui aproximadamente 33 kDa de massa molecular, com um enovelamento típico na forma de barril TIM (β/α)₈, a qual consiste de oito folhas- β arranjadas em um cilindro central rodeado por oito hélices- α (NATESH et al., 1999). Além destas, outras seis curtas hélices- α também estão presentes e dispersas ao longo da cadeia polipeptídica (LASKOWSKI et al., 1993; NATESH et al., 1999). No core catalítico de XynA_Ta há dois resíduos de glutamato, E131 (ácido/base) e E237 (nucleófilo) enterrado na estrutura, mais especificamente na região C terminal, nas folhas β -4 e β -7 (DEREWENDA et al., 1994). Estes dois resíduos de glutamato são conservados nas famílias de xilanases e estão envolvidos na catálise em outras xilanases da família GH-10 (NATESH et al., 1999) (**Figura 2**).

Figura 2 – Representação estrutural da endo-xilanase de *T. aurantiacus*, com enovelamento do tipo barril TIM (α/β)₈ por visão lateral ao longo do barril.



(NATESH et al., 1999).

A figura acima ilustra as visões da estrutura da endo-xilanase aqui investigada. A termoestabilidade da enzima está relacionada a mais de dez interações salinas, das quais R124-E232 é única para estruturas de GH-10, e uma única interação dissulfeto entre os resíduos C255 e C261 na estrutura de XynA_Ta. Outro fator que contribui fortemente para a termoestabilidade é o resíduo de P223 na quarta posição da hélice, que juntamente aos resíduos D219 e D250 contribui para uma embalagem mais eficiente da proteína e maior estabilidade, sendo a presença deste resíduo de P223, após a quarta posição na hélice de XynA_Ta, observado pela primeira vez nos membros de xilanases da família GH-10 (NATESH et al., 1999).

3.3. Sistema microbiano para a clonagem e expressão heteróloga de enzimas termoestáveis

Enzimas nem sempre são produzidas naturalmente em elevada concentração pelos seus organismos e esforços no setor de produção de enzimas recombinantes tem motivado o investimento de energia e suporte financeiro para desenvolvimento e aprimoramento de técnicas (FENEL et al., 2004; TURUNEN et al., 2002). Assim, genes de microrganismos que codificam para a produção de determinadas enzimas tem sido isolados e estudados frente às técnicas de biologia molecular. Dentre as alternativas para o aumento da produção de enzimas, sobretudo as termoestáveis,

com foco neste trabalho, destacam-se a tecnologia de DNA recombinante e modificação genética de proteínas (STEPHENS et al., 2014) Tais alterações possibilitam a facilidade com manuseio de microrganismos não patogênicos, aumento na produtividade enzimática, redução da inibição por glicose durante a expressão, e incrementos nas taxas de O-glicosilações (LYND et al., 2002; DE CASTRO; PEREIRA, 2010), de termoestabilidade, tolerância a mudanças de pH, por exemplo.

Além disso, a engenharia genética de microrganismos tem sido usada com a finalidade de criar novos sistemas para produção de enzimas objetivando um aumento ou na eficiência na expressão e ou atividade. Um grande número de artigos tem sido publicados na codificação de genes de xilanases de organismos procariontes e eucariontes, as quais são expressas em diferentes sistemas, como *E. coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*. Sistemas de expressão para produção de proteínas heterólogas são atraentes devido sua simplicidade e facilidade de manuseio. Isto é devido à rápida habilidade de crescimento em substratos baratos com elevada densidade óptica, a genética de organismos bem caracterizados e a disponibilidade de um número de vetores de clonagem cada vez maior e estirpes hospedeiras mutantes (BEN MABROUK et al., 2013).

De modo geral, a seleção do melhor hospedeiro e sistema promotor para obtenção de proteínas heterólogas é um trabalho dificultado por fatores relacionados a genética dos microrganismos e da própria enzima (TERPE, 2006). Nesta seção será comparado três dos principais sistemas mundialmente mais utilizados em unidades de pesquisas e laboratórios industriais para produção de enzimas (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*) (CAIN; SOLIS; CORDWELL, 2014), descatando suas principais vantagens e desvantagens.

3.3.1. Bactéria como sistema de expressão heteróloga

Existe uma ampla variedade de opções de organismos bacterianos mais utilizados para produção de proteínas heterólogas, dentre estes é possível destacar diferentes cepas de *E. coli*; cepas de *Bacillus*: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. brevis* (UDAKA; YAMAGATA, 1993) e *Caulobacter crescentus* (AWRAM; SMIT, 1998). Outros tantos sistemas menos usuais, como *Streptomyces* (BRAWNER, 1994), bactérias metilotróficas, *Methylobacterium extorquens* (GUTIÉRREZ et al., 2005); cianobactérias, cyanobacterium *Anabaena sp* (DESPLANCQ et al., 2005) também tem

sido utilizadas. *Pseudomonas fluorescens* (SCHNEIDER et al., 2005) e *Ralstonia eutropha* (BARNARD et al., 2004) tem sido relatadas para produção de proteínas heterólogas, com elevado rendimento. No entanto, ainda são raramente utilizados, pois possuem poucos estudos relatados na literatura (TERPE, 2006). Recentemente, *Rhodobacter* (KATZKE et al., 2010) e bactéria ácido láctica (CAIN; SOLIS; CORDWELL, 2014) foram avaliadas para obtenção de proteínas heterólogas.

Portanto, de um modo geral, todas bactérias podem ser usadas para produção de proteínas heterólogas. No entanto, informações desconhecidas como seu sistema de regulação e seu mecanismo, bem como o fato de não possuir um vetor comercial e um sistema promotor compatível são as razões pelas quais estes sistemas não são frequentemente utilizados (TERPE, 2006).

A bactéria gram-negativa *E. coli* foi o primeiro sistema microbiano para produção de enzimas recombinantes (LEE, 1996) e ainda é o organismo mais comumente utilizado para produção das mesmas. Isto é devido as suas técnicas de manipulação genética bem estabelecidas, rápida acumulação de biomassa e baixo custo de manipulação. Este é um organismo bastante conhecido nos laboratórios e diversos vetores de clonagem e linhagens mutantes foram desenvolvidos. Portanto, trata-se do sistema mais comumente utilizado para produção de proteínas industriais e farmacêuticas e possui sistemas de produção em larga escala conhecidos (PETSCH, 2000).

No entanto, este sistema apresenta também algumas desvantagens. Proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* podem acumular lipopolissacarídeos (LPS) também conhecidos como endotoxinas, que são pirogênicas em seres humanos e outros mamíferos, inviabilizando aplicação para fins terapêuticos. Desta forma, para sua aplicação é necessário uma etapa de purificação tornando-as livres desta toxina (PETSCH, 2000).

No que diz respeito ao mecanismo de síntese proteica, existem algumas desvantagens, que tornam a produção de proteínas heterólogas mais ou menos facilitadas. Proteínas recombinantes são facilmente transformadas em agregados insolúveis indesejáveis acumulando-se no citoplasma (GEORGIU; SEGATORI, 2005). Alguns polipeptídeos pequenos, em torno de 10 kDa, podem ainda ser degradados dentro do citoplasma por proteases endógenas (HAMMARSTRÖM et al., 2002). Além disso, a correta formação de ligações dissulfeto, a ausência de chaperoninas moleculares específicas para o correto enovelamento proteico e

reduzida solubilidade podem ocorrer (PEROUTKA III et al., 2011; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008).

Neste sentido, com intuito de solucionar estes problemas, muitos métodos têm sido desenvolvidos, tais como tradução lenta mediante redução de temperatura de expressão (HAMMARSTRÖM et al., 2002), diminuição da concentração de RNAm pela redução na concentração de indutor (HUANG; PERETTI; BRYERS, 1994), otimização do promotor, manipulação das condições de indução (QING et al., 2004), co-expressão de proteínas-alvo com chaperoninas moleculares específicas (DE MARCO; DE MARCO, 2004) e expressão com proteínas fusionadas (AHN et al., 2007).

Parceiros de fusão comerciais, denominados de *tags*, incluindo HIS (histidina) MBP (Proteína de ligação à maltose) e GST (Glutathiona-S-transferase) tem mostrado bom desempenho na expressão para aumento de solubilidade, no entanto não podem ser usados para produção de proteínas de elevado valor comercial (SONG et al., 2011). A redução na degradação de proteínas eucarióticas heterólogas expressas pode ser obtida utilizando-se cepas BL21 e K12, bem como suas derivadas que sejam deficientes em *ompT* e *lon* proteases (PHILLIPS; VANBOGELEN; NEIDHARDT, 1984). As principais cepas frequentemente utilizadas e os fatores para produção de proteína heteróloga estão resumidamente descritas na Tabela 3.

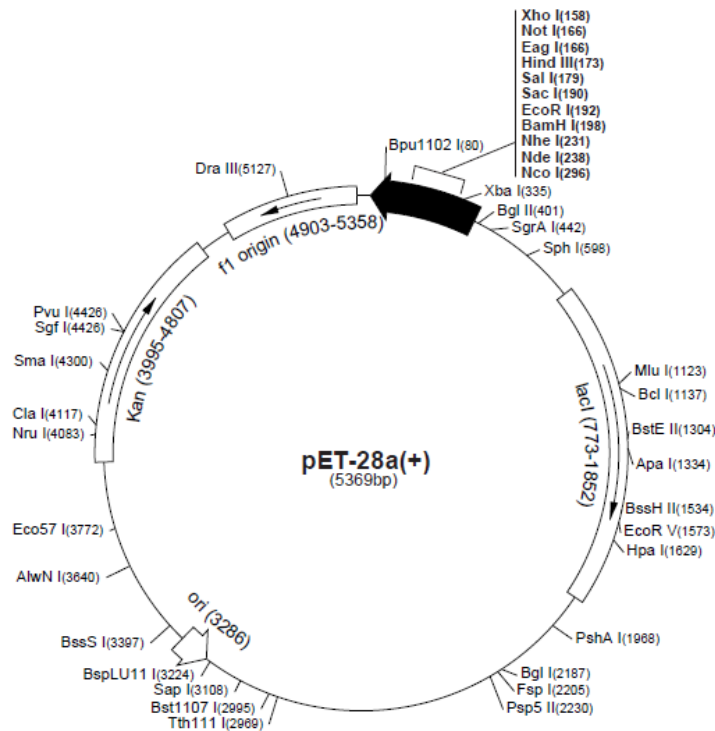
Tabela 3 – Algumas cepas de *E. coli* mais frequentemente utilizadas para produção de proteínas heterólogas e seus fatores chave. Adaptado de (TERPE, 2006).

Cepa de <i>E. coli</i>	Derivação	Fatores chaves
AD494	K-12	<i>trxB</i> mutante, facilita a formação de ligações dissulfetos citoplasmáticas.
BL21	B834	Deficiente em <i>lon</i> and <i>ompT</i> proteases.
BL21 <i>trxB</i>	BL21	<i>trxB</i> mutante; a formação de ligações dissulfetos citoplasmáticas; deficiente em <i>lon</i> e <i>ompT</i> proteases.
BL21 Codon Plus-RP	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente usados em <i>E. coli</i> : AGG, AGA, CCC; deficiente em <i>lon</i> e <i>ompT</i> proteases.
BL21 Codon Plus-RIL	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente usados em <i>E. coli</i> : AGG, AGA, CCC; deficiente em <i>lon</i> e <i>ompT</i> proteases.
BLR	BL21	<i>recA</i> mutante; estabiliza repetições em tandem; deficiente em <i>lon</i> e <i>ompT</i> proteases.
B834	B strain	Met auxotrofia; ³⁵ S-met rotulagem.
C41	BL21	Mutante desenhado para expressão de proteínas de membranas.
C43	BL21	Duplo mutante desenhado para expressão de proteínas de membranas.
Origami	K-12	<i>trxB/gor</i> mutante; facilita muito a formação da ligação dissulfeto citoplasmática.
Origami B	K-12	<i>trxB/gor</i> mutante; facilita muito a formação da ligação dissulfeto citoplasmática; deficiente em <i>lon</i> e <i>ompT</i> proteases.
Rosetta	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente usados em <i>E. coli</i> : AUA, AGG, AGA, CGG, CUA, CCC, e GGA; deficiente em <i>lon</i> e <i>ompT</i> proteases.
Rosetta-gami	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente usados em <i>E. coli</i> : AUA, AGG, AGA, CGG, CUA, CCC e GGA; deficiente em <i>lon</i> e <i>ompT</i> proteases; <i>trxB/gor</i> mutante; facilita muito a formação da ligação dissulfeto citoplasmática.

Outro fator a ser considerado é que para cada tipo de cepa selecionada existe um vetor de expressão para o processo de inserção do gene no vetor e sua subsequente propagação em cepa de *E. coli*. O sistema de expressão pET28a (5,4 Kb), por exemplo, representa um dos vetores de expressão comerciais mais comuns do sistema de *E. coli* pET (NOVAGEN, 2003). Desta forma, a Figura 3 representa um dos mais usuais vetores de expressão comerciais de *E. coli* do sistema pET (pET-28a), o qual permite o controle da expressão e sistema de fusão com vantagens no

processo de purificação e preservação da proteína heteróloga como relatado anteriormente.

Figura 3 – Mapa do vetor de expressão pET-28a. T7 promotor: bases 615-631, Iniciação de transcrição T7: 614, Sequência de codificação T7•Tag: 519-551, Extremidade terminal T7: 404-450, Origem pBR322: 2814, Sequência de codificação bla: 3575-4432.



Fonte: NOVAGEN, 2003.

O vetor acima é representado por diferentes regiões, dentre elas é possível destacar as mais importantes para a expressão de proteínas heterólogas. Destas, destacam-se o promotor, um componente crítico do vetor de expressão, que controla o primeiro estágio de expressão gênica, a ligação da RNA polimerase ao DNA, determinando a frequência na qual o RNAm é sintetizado, sendo o mesmo regulado ou induzido. Muitos sistemas promotores de *E. coli* são descritos na literatura, sendo apenas alguns deles bem caracterizados. Um bom promotor deve ser forte, ter um baixo nível de expressão basal, ser facilmente transferido para outra cepa de *E. coli*, a indução deve ser simples, ter ótima relação custo-benefício e ser independente dos reagentes usados no meio de cultura (TERPE, 2006).

O vetor pET-28a, acima, possui o promotor *lacI*, no qual é induzido pela adição de um análogo de lactose, o isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), caracterizado como o mais popular mecanismo de regulação conhecido para *E. coli* (QUICK; WRIGHT, 2002). Este promotor é regulado por repressão catabólica e estado

metabólico, que é representado pelo nível de AMP cíclico (TERPE, 2006). Para resolver este problema, o sistema T7 DNA polimerase foi desenvolvido, no qual uma variedade de proteínas homólogas e heterólogas foram expressas em elevado nível em cepas de BL21 (DE3), na qual possui o gene T7 polimerase localizado cromossomicamente e encontra-se sob o controle de um promotor derivado do promotor *lac* com sítios de mutações (JAMES; STRATFORD, 2011). A primeira mutação é responsável pelo aumento da força do promotor e diminuição da dependência do AMP cíclico, a outra é responsável por uma proteína receptora chamada de CAP, e por fim, a última é responsável por um promotor forte que é menos sensível a glicose (GROSSMAN et al. 1998). Este conjunto de modificações permite uma forte indução da T7 RNA polimerase com IPTG, mesmo na presença de glicose (PAN; MALCOLM, 2000). Ainda com relação aos componentes do vetor é possível destacar uma origem de replicação (*ori*), um sítio de marca de seleção de resistência ao antibiótico Kanamicina (*Kan*) e uma região de clonagem com sítios de restrição a nucleases.

O vetor pET-28a permite a expressão da proteína recombinante fusionada à resíduos de histidina na extremidade amino (N-terminal) ou carboxi-terminal (C-terminal), o que facilita a purificação por técnicas de cromatografia de afinidade, com resinas de sepharose combinadas com níquel. Além disso, a expressão do gene está sob o controle do promotor do fago T7, que promove a expressão gênica pela indução com IPTG em algumas linhagens de *E. coli*. Os vetores do sistema de plasmídeos para expressão com T7 RNA polimerase (pET) utilizam um promotor do fago T7 que é reconhecido pela RNA polimerase do fago (T7 RNA polimerase), mas não pela RNA polimerase de *E. coli*. Assim, a transcrição do DNA clonado, necessária para a síntese da proteína, só ocorre após a expressão da T7 RNA polimerase na bactéria hospedeira (WILLIAM STUDIER et al., 1990).

Grande quantidade de proteínas não são expressas em linhagens de *E. coli*. Por esses motivos hospedeiros bacterianos como *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, ou *Caulobacter crescentus* podem ser usadas como alternativa interessante para expressão destas proteínas (TERPE, 2006), assim como organismos eucariontes como leveduras, por exemplo.

Embora a bactéria *Escherichia coli* represente uns dos mais poderosos sistemas de expressão heteróloga, várias proteínas eucarióticas de interesse comercial não puderam ser expressas eficientemente nesse microrganismo. Entre as

razões para esses insucessos poderiam ser citados: conformação incorreta, ausência de modificações pós-traducionais e baixos níveis de expressão (TORRES; MORAES, 2000). Assim outros sistemas de expressão foram desenvolvidos, como o sistema de expressão em Leveduras descrito nas seções abaixo.

3.3.2. Fungo como sistema de expressão heterólogo

Leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, a produção de proteínas heterólogas nestes sistemas é um processo mais complexo do que em *E. coli*. As leveduras são microrganismos que têm sido utilizados pelo homem há milhares de anos e cuja manipulação causou um grande impacto na produção de alimentos e, conseqüentemente, vem influenciando o próprio processo de desenvolvimento sócio-econômico da humanidade. O pão, a cerveja e o vinho representam os produtos mais expressivos do processo de manipulação desses microrganismos ao longo do tempo (TORRES; MORAES, 2000).

A expressão heteróloga em leveduras é bem caracterizada e há várias técnicas de manipulação gênica disponíveis, além de possuir a melhor relação custo-benefício em eucariotos. É um sistema ideal para produção em larga escala de proteínas. Nas últimas décadas, genes que codificam enzimas celulolíticas (LYND et al., 2002) e xilanolíticas (PARACHIN et al., 2009) bacterianas e fúngicas tem sido clonados e expressos em sistemas heterólogos de leveduras. Neste sentido, *S. cerevisiae* e *P. pastoris* são amplamente utilizadas como sistema de expressão heteróloga (BROWN; AUFAUVRE-BROWN; HOLDEN, 1998; TORRES; MORAES, 2000), sendo estes dois sistemas devidamente estudados nas seções posteriores.

3.3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expressão heteróloga

Saccharomyces cerevisiae é um microrganismo eucariótico muito bem estudado e conhecido pelo homem. Há muitos anos tem sido usado para fabricação de pães e bebidas alcoólicas (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Informações sobre sua genética, biologia molecular e fisiologia tem contribuído para o entendimento da célula eucariótica, bem como da biologia humana. Esta levedura é um dos sistemas eucarióticos mais bem conhecidos, sua genética é bem dominada, com aproximadamente 3000 genes caracterizados, e seu genoma

totalmente sequenciado, fato este que representou uma das maiores conquistas da Biologia no século XX (TORRES; MORAES, 2000). Por tratar-se de um organismo não patogênico e ser utilizado em processos de fabricação de produtos de consumo humano, há alguns anos foi classificada como organismo seguro (*GRAS - Generally Regarded as Safe*), o que é de suma importância no que se refere à produção de biofármacos por engenharia genética. Desta forma, tem sido cultivada em escala industrial no setor da indústria farmacêutica (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000; TORRES; MORAES, 2000).

Após o advento da tecnologia do DNA recombinante, a levedura *S. cerevisiae* pôde ser empregada em estudos de genética molecular a partir do final dos anos 70, quando esta foi geneticamente transformada pela primeira vez. Desde então, vários tipos de vetores moleculares foram desenvolvidos, inclusive cromossomos artificiais, mais conhecidos como YAC (*Yeast Artificial Chromosomes*) (TORRES; MORAES, 2000).

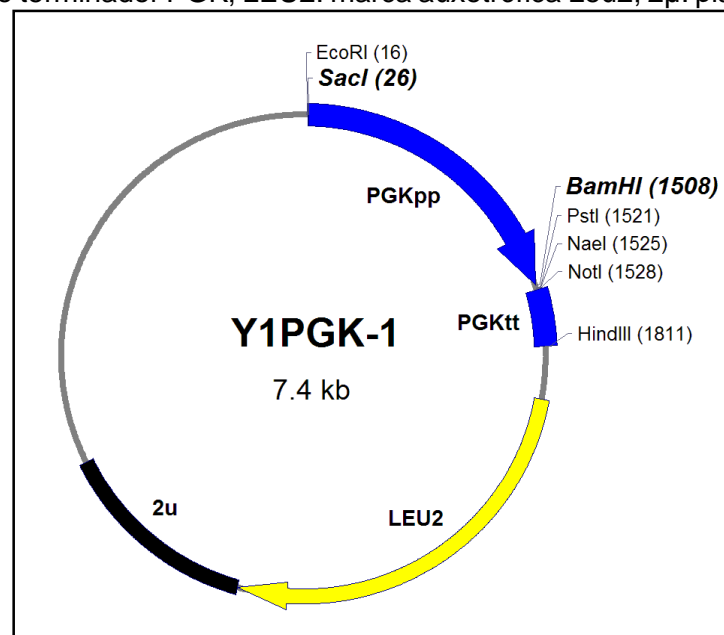
Durante as últimas décadas, estudos de engenharia genética tem permitido criar linhagens de microrganismos capazes de produzir proteínas de interesse, em grandes quantidades e de boa qualidade. Com advento da tecnologia do DNA recombinante, *S. cerevisiae* é um dos organismos que tem sido manipulado geneticamente, com facilidade. Devido a essas vantagens e a possibilidade de se modificar as vias metabólicas, a fim de aumentar o rendimento de produção, muitas proteínas heterólogas são produzidas nesse microrganismo, como por exemplo, a primeira vacina recombinante comercializada, a vacina da hepatite B (GELLISSEN; HOLLENBERG, 1997).

Saccharomyces cerevisiae é um hospedeiro atrativo para a expressão de proteínas heterólogas, pois apresenta a combinação de diversas características importantes, tais como sua fácil manipulação, habilidade de crescimento em diferentes fontes de carbono, ausência de patogenicidade e de produção de substâncias alergênicas (SCHÄFER; WOLF, 2005). Estes sistemas de expressão apresentam vantagens como processamento pós-transcricional e pós-traducional, além de apresentar facilidade de manipulação genética e alta produtividade (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992). Além disso, as leveduras também produzem chaperoninas que auxiliam o dobramento das proteínas que são sintetizadas, principalmente nos casos de proteínas que apresentam grandes quantidades de pontes dissulfeto (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A expressão heteróloga em *S. cerevisiae* é facilitada, pois possui um protocolo de transformação simples e uma taxa de recombinação homóloga muito eficiente *in vivo*. Além disso, é um dos poucos eucariotos que possui um plasmídeo natural, o 2 μ , que permite a construção de vetores para a transferência de genes e sistemas de expressão (BRANDÃO, 1996). Trata-se de um plasmídeo multicópia e contém sequências para propagação tanto em *E. coli*, como em levedura, possuem sequências promotoras (X) e terminadoras (T7) de levedura para uma transcrição eficiente do gene exógeno, nas quais podem ser visualizadas na **Figura 4**, representativa de um típico vetor de expressão de levedura.

Os vectores utilizados para a transformação de células hospedeiras adequadas são, em geral, híbridos entre as sequências derivadas de leveduras e bacterianas. A porção procariótica (bactéria) destes vetores abriga uma origem de replicação (*ori*) e uma sequência conferindo resistência contra um antibiótico específico (*Amp*), como elementos para propagação e seleção de um hospedeiro bacteriano, respectivamente. A porção eucariótica (levedura) da mesma forma contém os elementos para seleção de transformantes de levedura, por exemplo, genes da β -isopropilmalato desidrogenase (LEU2) e oritidina 5'-descarboxilase (URA3) para complementar uma auxotrofia nas respectivas estirpes hospedeiras, como marca auxotrófica de seleção (HINNEN et al., 1994).

Figura 4 – Mapa físico do vetor Y1PGK-1. PGKpp: sítio promotor PGK; Múltiplo sítio de clonagem; PGKtt: sítio terminador PGK; LEU2: marca auxotrófica Leu2; 2 μ : plasmídeo natural.



Fonte: autoria própria.

Trata-se de um vetor constitutivo de *S. cerevisiae*, no qual possui uma origem de replicação para propagação em *E. coli* (ori) e uma origem bacteriana (ColE1), o plasmídeo natural (2 μ), uma marca de seleção auxotrófica de levedura envolvidos no metabolismo da leucina (LEU2), gene que confere resistência à ampicilina para seleção em *E. coli* (Amp), região promotor (PGKpp), região terminadora (PGKtt) e os sítios de restrições entre estas duas regiões.

3.3.2.2. *Pichia pastoris* como sistema de expressão heterólogo

Ao longo das últimas duas décadas, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por possuírem vantagens sobre *S. cerevisiae*. Entre esses novos sistemas, destaca-se *P. pastoris*, uma levedura metilotrófica, ou seja, que é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono (TORRES; MORAES, 2000). O sistema de expressão metilotrófico de *P. pastoris* tornou-se uma das leveduras mais amplamente estudadas, desde o seu desenvolvimento, no início da década de 1970 e tem sido declarada como um dos sistemas mais úteis e versáteis para a expressão de proteínas heterólogas (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012). O genoma de *P. pastoris* é relativamente simples para manipular e kits de expressão comerciais estão disponíveis (INVITROGEN, 2014).

Este sistema de expressão apresenta algumas características que a tornam uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas e é de particular interesse industrial. A primeira é o poderoso e forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da álcool oxidase (AOX) de *P. pastoris* que é regulado por metanol (COS et al., 2006), ou é derivado do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP), um forte promotor constitutivo (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

Álcool oxidase (AOX) é a primeira enzima na via de utilização de metanol induzível, representa mais de 35% de proteína celular total em células do tipo selvagem cultivadas em metanol (SREEKRISHNA ET AL., 1997). Ambos genes AOX1 e AOX2 codificam enzimas funcionais, com o primeiro sendo responsável por até 95% do total de álcool oxidase expressa devido à força relativa de seu promotor (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Os sistemas que utilizam pAOX1 são, portanto, preferidos para a expressão da proteína, e são, de longe, os sistemas mais comuns

utilizados, embora uma significativa expressão de proteínas recombinantes foi relatada em sistemas usando versões truncadas de pAOX2 (KUWAE et al., 2005). Portanto, por ser o sistema preferido e mais relatado pAOX1 será descrito com maiores detalhes.

AOX1 é um sistema regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato. Para ser ativado, o promotor AOX1 requer a presença de metanol, na ausência de indutor, o promotor torna-se reprimido. Além de metanol, o sistema AOX1 não requer glicose para ser plenamente ativado. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. No entanto, ao contrário dos promotores glicolíticos, o promotor AOX1 é firmemente regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol (TORRES; MORAES, 2000).

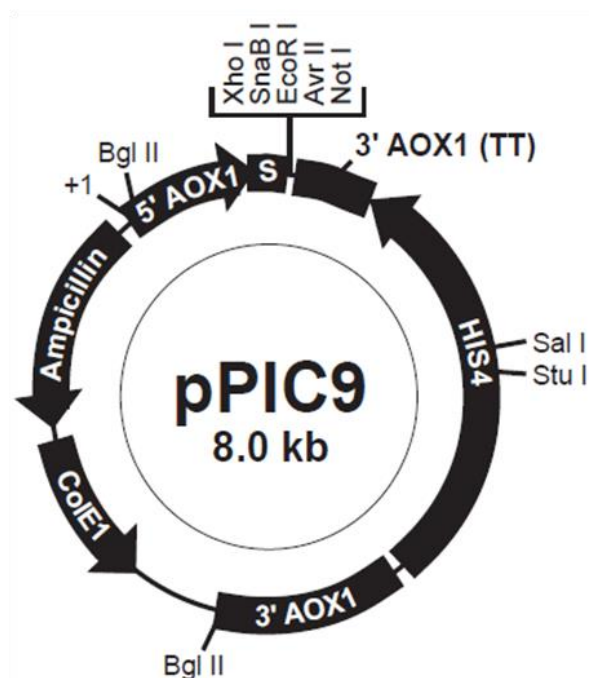
Dentre as vantagens deste sistema destacam-se sua capacidade de secretar proteínas estranhas no meio devido sua fraca capacidade de secreção de proteínas nativas, de modo que os processos de purificação de proteínas heterólogas podem ser simplificados (CEREGHINO; CREGG, 2000); capacidade de realizar modificações pós-traducionais, incluindo glicosilação e formação de ligação dissulfeto, sequências sinais e processamento proteolítico são possíveis e relativamente fáceis (HELLWIG et al., 2001); ausência de endotoxina (ACIK, 2009); proteínas heterólogas podem ser produzidas em níveis elevados, tanto a nível intracelular e extracelular, com capacidade de crescer em meios definidos com alta densidade celular (COS et al., 2006). No entanto, a expressão metilotrófica de *P. pastoris* também tem uma série de desvantagens, tais como potencial de proteólise; glicosilação não nativa; elevado nível de oxigenação do meio; e instabilidade da cultura de *P. pastoris* em metanol, que pode ser ameaçada pela toxicidade do metanol ou a excreção de intermediários oxidativos do catabolismo do metanol, por exemplo, formaldeído, ácido fórmico e peróxido de hidrogênio (GAO; SHI, 2013). Outra questão a ser considerada é que embora este seja um sistema de expressão efetivo, o requerimento de metanol para indução apresenta riscos de incêndio e a saúde, especialmente em operações de larga escala, nas quais grandes quantidades de metanol devem ser armazenadas no local (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

A segunda característica importante de *P. pastoris* é que esta levedura não é considerada uma forte fermentadora, como *S. cerevisiae*. A fermentação realizada por

leveduras gera etanol, o qual, em culturas de alta densidade, pode rapidamente atingir níveis tóxicos (efeito *Crabtree*). Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células. É necessário, pois, atingir níveis de alta densidade celular os quais não são facilmente obtidos com *S. cerevisiae*. Em contraste, as cepas produtoras de *P. pastoris* são facilmente cultivadas a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de peso seco, ou até maiores (TORRES; MORAES, 2000).

Os vetores de *P. pastoris* possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene AOX1, além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada o gene histidinol desidrogenase (HIS4) de *P. pastoris*. Essa marca permite a seleção de transformantes prototróficos His⁺ a partir de uma linhagem hospedeira his4. Um dos vetores mais utilizados é o plasmídeo pPIC9, Figura 8, desenvolvido e patenteado pela empresa Invitrogen.

Figura 5 – Mapa do vetor pPIC9. Fragmento do promotor 5' AOX1: bases 1-948. Sítio do primer iniciador 5' AOX1: bases 855-875. Fator- α de sinal de secreção (s): bases 949-1215; Fator- α do primer iniciador: bases 1152-1172. Múltiplo sítio de clonagem: bases 1192-1241; Sítio do primer iniciador 3' AOX1: bases 1327-1347; Sítio de terminação da transcrição 3' AOX1 (TT): bases 1253-1586. HIS4 ORF: bases 4514-1980. Fragmento 3' AOX1: bases 4870-5626; Origem pBR322: bases 6708-6034. Gene de resistência a ampicilina: bases 7713-6853.



Fonte: (INVITROGEN, 2014).

Dentre as principais características do plasmídeo pPIC9 tem-se que este tem uma sequência sinal de secreção, denominado de S na figura acima, que permite a

expressão de qualquer proteína a ser secretada para o meio extracelular; um múltiplo sítio de clonagem que permite a inserção de qualquer gene que tenha sítio de restrições únicos de XhoI, SnaB I, EcoR I, Avr II; um gene *his4* que codifica para a síntese de histidinol desidrogenase, que compensa a incapacidade da estirpe GS115 de *P. pastoris* para sintetizar histidina, proporcionando um marcador seletivo para células possuindo o plasmídeo pPIC9 transformadas com sucesso, quando cultivadas em meios deficientes em histidina; um gene de resistência a ampicilina que permite a seleção de células transformadas em meios enriquecidos com ampicilina; e um sítio de origem de replicação em *E. coli* (ColE1) permite uma replicação e manutenção das células de *E. coli* (INVITROGEN, 2014).

Desta forma, o gene de interesse geralmente é clonado na região do cassete de expressão em um dos sítios de clonagem que se localizam logo após o sinal de secreção, nesse caso, o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*. O cassete de expressão é liberado pela digestão do plasmídeo com a enzima de restrição BglII, e uma cepa *his4* de *P. pastoris* é transformada por eletroporação. Como em *S. cerevisiae*, o DNA linearizado pode gerar transformantes estáveis quando se integra no genoma por recombinação homóloga. Esses transformantes podem originar-se pela integração do cassete de expressão tanto no locus AOX1 quanto no *his4*. No primeiro caso, pode haver uma substituição completa do gene AOX1 pelo cassete de expressão, o que resulta em um fenótipo denominado Mut^s, caracterizado por um crescimento lento na presença de metanol. Ocasionalmente, o cassete de expressão pode se integrar várias vezes no locus AOX1 (TORRES; MORAES, 2000) Outros vetores, semelhantes ao pPIC9, não possuem sinais de secreção e, portanto, são empregados para a expressão intracelular. Existem variantes do pPIC9 que não possuem o sinal de secreção no cassete de expressão sendo, portanto, ideais para expressão intracelular

Por outro lado, o promotor constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi isolado em 1997 (WATERHAM et al., 1997) e tem sido usado para expressar muitas proteínas heterólogas em células usando glicose ou glicerol como substrato de crescimento (COS et al., 2006), sem os problemas associados com o processo de indução da expressão com metanol com o promotor AOX1. Diferentemente do sistema AOX1, no promotor GAP a síntese de biomassa e proteína ocorre simultaneamente e são diretamente correlacionadas com a dose de genes pGAP-regulada (VASSILEVA et al., 2001). Enquanto que as condições durante a fase

de indução devem ser rigorosamente controladas, em sistemas AOX1, sistemas GAP têm requisitos mínimos de controle (BOER; TEERI; KOIVULA, 2000). Cultivo contínuo, estável e eficiente usando o promotor GAP pode ser conseguido com períodos mais longos de produção de proteína, com duração de até 30 dias (GOODRICK et al., 2001). Genes regulados pGAP são bem expressos quando as células são cultivadas em metanol, glicose ou glicerol.

Muitas proteínas heterólogas tem sido expressas com sucesso em sistema pGAP de *P. pastoris*, com variações significativas nos níveis de expressão baseadas nas propriedades das proteínas expressas. Muitos estudos tem relatado que o sistema pGAP é mais eficiente que o pAOX1 para produção de proteína (DELROISSE et al., 2005), no entanto outros estudos relatam o oposto (VASSILEVA et al., 2001). Pesquisas adicionais são requeridas para determinar quais fatores determinam a eficiência de ambos promotores em termos da expressão de proteínas recombinantes, a fim de projetar o sistema de produção ideal.

Uma das vantagens do promotor GAP com relação ao promotor AOX1 é que, por ser constitutivo, não é necessário mudar a cultura de um meio para outro para induzir expressão. No entanto, dentre as desvantagens: o uso do promotor GAP é apropriado somente para genes cujo produto não seja deletério para a célula, os níveis de expressão a partir do promotor AOX1 são geralmente aumentados quando o metanol é adicionado à cultura com taxas de crescimento limitantes em fermentadores, sendo o mesmo fenômeno não observado com o promotor GAP (TORRES; MORAES, 2000).

Em geral, o processo de produção de proteína heteróloga consiste de três fases como proposto pela Invitrogen Co (CREGG, 2007). Na primeira fase, as células são cultivadas em batelada com o meio inicial em glicerol. Na segunda etapa, quando o glicerol é consumido no meio em batelada, uma estratégia de controle de batelada alimentada é iniciada para a cultura de células de *P. pastoris* aumentar o nível densidade alimentando com glicerol concentrado. Depois de interromper a alimentação durante 1-2 horas para esgotar completamente o glicerol residual no meio, a terceira fase é iniciada pela adição de metanol para induzir a produção da proteína heteróloga. Em alguns casos, existe uma fase de transição entre a fase de crescimento e indução, onde a fermentação é implementada para transferir as células em crescimentos em indução de proteína, alimentando com glicerol com taxas que limitam o crescimento ou mistura de glicerol e metanol. A produção da proteína

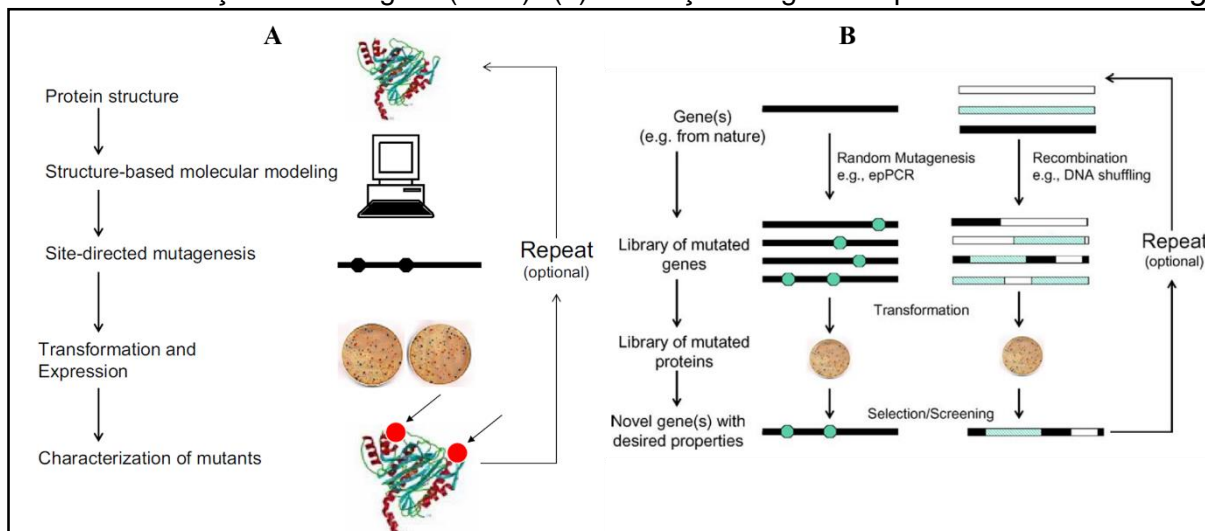
heteróloga é caracterizada com tempo de fermentação muito longo (cerca de 100 h), em que a duração do período de indução é geralmente muito maior do que a de crescimento (GAO; SHI, 2013). Deste modo, o rendimento de proteínas heterólogas é afetada por uma variedade de fatores, tanto a nível genético como de cultura. Assim, de acordo com (GAO; SHI, 2013) modos ou estratégias de produção de proteínas recombinantes por *P. pastoris* foram explorados, sendo fatores físico-químicos investigados e monitorados durante a fermentação, tais como: efeitos da composição do meio, efeito da temperatura de indução, efeitos do pH, efeitos da concentração de oxigênio dissolvido (DO) e efeitos na concentração de metanol.

3.4. Melhoramento genético de enzimas

O desenvolvimento de métodos de manipulação de DNA *in vitro* forneceu novas abordagens em muitas áreas, incluindo a geração de mutantes e a análise da expressão gênica. Essas áreas foram revolucionadas pela capacidade de alterar-se intencionalmente uma ou mais bases, ou unir segmentos distintos de DNA em uma ordem pré-determinada (MADIGAN; MARTINKO, 2010).

Na maioria dos processos, o emprego de enzimas termoestáveis, e ou capazes de tolerar pH extremos são necessárias em bioprocessos. As severas condições físicas e químicas das reações, aliada a reduzida disponibilidade de enzimas naturalmente termoestáveis, restringem a aplicação destas em bioprocessos. Portanto, melhorias na tolerância térmica de xilanases é altamente desejada do ponto de vista industrial. Este fato pode ser obtido por meio de engenharia de proteínas através de abordagens de desenho racional com base em estruturas tridimensionais (BELIËN et al., 2009; FENEL; ZITTING; KANTELINEN, 2006; GEORIS et al., 2000) e evolução de enzimas por mutação aleatória (ZHANG et al., 2010). Para o melhoramento da enzima, estratégias moleculares têm sido empregados, entre as quais se destacam: mutagênese sítio dirigida (MSD), reação em cadeia de polimerase propenso a erros (*epPCR*) e arranjo combinatório de DNA (*DNA shuffling*). Estas estratégias moleculares estão resumidas na Figura 6.

Figura 6 – Esquema representativo de técnicas de engenharia de proteínas. (a): Desenho racional – mutação sítio dirigida (SDM). (b): Evolução dirigida – epPCR e DNA *shuffling*.



Fonte: ZHANG; HIMMEL; MIELENZ (2006)

Desenho racional é a abordagem mais antiga em engenharia de proteínas. A estratégia requer conhecimento detalhado da estrutura da proteína, as causas estruturais da catálise biológica ou modelagem molecular baseado em estrutura, e da relação da estrutura e função. Basicamente, o processo envolve três passos: a escolha de uma enzima apropriada; identificação das posições de aminoácidos a serem alterados, com base na sequência da proteína e da estrutura cristalográfica; e *screening* ou caracterização dos mutantes para seleção da linhagem com a característica desejada (ARNOLD, 2001).

Evolução dirigida é também uma técnica usada para melhorar as limitações de catalisadores biológicos. Reações de *epPCR* e DNA *shuffling* são exemplos de evolução dirigida. Ao contrário da *SDM*, esta é independente de qualquer conhecimento detalhado da relação entre estrutura e função da enzima, e a interação entre a enzima e o substrato (HIBBERT et al., 2005). É dependente dos princípios darwinianos de mutação, seleção e recombinação (STEMMER, 1994), reproduzindo em um ritmo acelerado testes *in vitro* para obtenção de uma propriedade específica da enzima (LEHMANN; WYSS, 2001). No entanto, o sucesso de um experimento de evolução dirigida depende muito do método escolhido de seleção do mutante (HIBBERT et al., 2005). Um importante passo no experimento de evolução dirigida é explorar o espaço da sequência por mutação aleatória baseada na amplificação imprecisa do gene (LIN et al., 2009; STEPHENS; SINGH; PERMAUL, 2009; WONG et al., 2004). No entanto, esta reação nem sempre conduz para o melhoramento da

enzima e requer as vezes estratégias que promovam a taxa de mutação necessária para seleção de mutante com a característica desejada.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho de revisão destacou os microrganismos termofílicos e mesofílicos como bons produtores de enzimas, capazes de tolerar temperaturas elevadas. Enzimas termoestáveis tem sido aplicadas em um grande número de aplicações industriais, sobretudo na conversão de moléculas complexas por mecanismos de hidrólise enzimática que processa-se por mecanismo de reação via duplo deslocamento. No entanto, apresentam uma ampla gama de aplicações ainda desconhecidas, o que justifica o investimento de tecnologias e pesquisas nesta área. Portanto, a necessidade de novas estratégias bioenergéticas, aliadas ao potencial de hidrólise de enzimas termoestáveis e ao desafio no setor de produção de enzimas termo tolerantes, em quantidade que atenda às necessidades dos setores industriais, tem incentivado e aquecido o setor de produção de enzimas. Por esta razão, a produção de enzimas nativas ou modificadas geneticamente é um mercado em expansão. *Esta revisão bibliográfica deu origem ao capítulo, Applications and Benefits of Thermophilic Microorganisms and Their Enzymes for Industrial Biotechnology, do livro, Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications, publicado na editora Springer, editores: Monika Schmoll e Christoph Dattenböck (ANEXO).*

5. REFERÊNCIAS

ACIK, E. Effects of carbon sources and feeding strategies on human growth hormone production by metabolically engineered *Pichia pastoris*. n. September, p. 1–199, 2009.

AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 19–35, ago. 2009.

AHN, K.-Y. et al. Heterologous protein expression using a novel stress-responsive protein of *E. coli* RpoA as fusion expression partner. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6-7, p. 859–866, nov. 2007.

ARNOLD, F. H. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 253–7, 2001.

AWRAM, P.; SMIT, J. The *Caulobacter crescentus* Paracrystalline S-Layer Protein Is Secreted by an ABC Transporter (Type I) Secretion Apparatus. **J. Bacteriol.**, v. 180,

n. 12, p. 3062–3069, 15 jun. 1998.

BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes**. [s.l.] Elsevier, 2014.

BARNARD, G. C. et al. High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification. **Protein expression and purification**, v. 38, n. 2, p. 264–71, dez. 2004.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 2001.

BELIËN, T. et al. Computational design-based molecular engineering of the glycosyl hydrolase family I B. subtilis XynA endoxylanase improves its acid stability. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 22, n. 10, p. 587–596, 2009.

BEN MABROUK, S. et al. Thermostability improvement of maltogenic amylase MAUS149 by error prone PCR. **Journal of biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 601–6, dez. 2013.

BHALLA, A. et al. Novel thermostable endo-xylanase cloned and expressed from bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1. **Bioresource technology**, v. 165, p. 314–8, ago. 2014.

BIELY, P. et al. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151–166, set. 1997.

BOER, H.; TEERI, T. T.; KOIVULA, A. Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. **Biotechnology and bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 486–94, 5 set. 2000.

BRANDÃO, G. Expressão heteróloga do cDNA da Celobiohidrolase (cbhl. 1) do fungo *Phanerochaete crhysosporium* em *Saccharomyces cerevisiae*. 1996.

BRAWNER, M. E. Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 475–481, out. 1994.

BROWN, J. S.; AUFAUVRE-BROWN, A.; HOLDEN, D. W. Insertional mutagenesis of *Aspergillus fumigatus*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 259, n. 3, p. 327–335, 28 ago. 1998.

CAIN, J. A.; SOLIS, N.; CORDWELL, S. J. Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. **Journal of proteomics**, v. 97, p. 265–86, 31 jan. 2014.

CANNIO, R. et al. A xylan-degrading strain of *Sulfolobus solfataricus*: isolation and characterization of the xylanase activity. **Extremophiles: life under extreme conditions**, v. 8, n. 2, p. 117–24, abr. 2004.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D233–8, 1 jan. 2009.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 1 jan. 2000.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource technology**, v. 115, p. 215–21, jul. 2012.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413–433, 2006.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.

COS, O. et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 1, p. 17, 6 jan. 2006.

Cregg, J. M. (Ed). *Pichia Protocols*, 2nd edn. Humana Press, Totowa, NJ.

DAMÁSIO, A. R. L. et al. Understanding the function of conserved variations in the catalytic loops of fungal glycoside hydrolase family 12. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 8, p. 1494–505, ago. 2014.

DAMASO, M. C. T. et al. Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6064–6072, 6 out. 2003.

DAMEZ, C. et al. Alkenyl and alkenoyl amphiphilic derivatives of D-xylose and their surfactant properties. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 2, p. 154–62, 5 fev. 2007.

DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

DE MARCO, A.; DE MARCO, V. Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. **Journal of biotechnology**, v. 109, n. 1-2, p. 45–52, 8 abr. 2004.

DELROISSE, J.-M. et al. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 42, n. 2, p. 286–94, ago. 2005.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, jan. 2009.

DEREWENDA, U. et al. Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of β -1,4-D-glycanases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20811–20814, 1994.

DESPLANCQ, D. et al. Combining inducible protein overexpression with NMR-grade triple isotope labeling in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. **BioTechniques**, v. 39, n. 3, p. 405–411, 2005.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1627–40, jan. 2012.

DOMINGUEZ, R. et al. A common protein fold and similar active site in two distinct families of beta-glycanases. **Nature structural biology**, v. 2, n. 7, p. 569–576, 1995.

FENEL, F. et al. A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II. **Journal of Biotechnology**, v. 108, n. 2, p. 137–143, mar. 2004.

FENEL, F.; ZITTING, A. J.; KANTELINEN, A. Increased alkali stability in *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II by site directed mutagenesis. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 1, p. 102–107, 2006.

FLINT, H. J. et al. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 10, p. 2943–2951, 1 maio 1993.

FUSHINOBU, S.; ALVES, V. D.; COUTINHO, P. M. Multiple rewards from a treasure trove of novel glycoside hydrolase and polysaccharide lyase structures: new folds, mechanistic details, and evolutionary relationships. **Current opinion in structural biology**, v. 23, n. 5, p. 652–9, out. 2013.

GAO, M.; SHI, Z. Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichia pastoris*. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 216–226, fev. 2013.

GELLISSEN, G.; HOLLENBERG, C. P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*- a review. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 87–97, jan. 1997.

GEORGIU, G.; SEGATORI, L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 538–45, out. 2005.

GEORIS, J. et al. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 9, n. 3, p. 466–475, 2000.

GOODRICK, J. C. et al. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. **Biotechnology and bioengineering**, v. 74, n. 6, p. 492–7, 20 set. 2001.

GUTIÉRREZ, J. et al. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylophilic bacterium *Methylobacterium extorquens*. **FEMS microbiology letters**, v. 248, n. 1, p. 125–31, 1 jul. 2005.

GROSSMAN, T. H. et al. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, v. 209, p. 95–103, 1995.

HAKI, G. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, ago. 2003.

HAMMARSTRÖM, M. et al. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 11, n. 2, p. 313–21, fev. 2002.

HANSEN, N. M. L.; PLACKETT, D. Sustainable films and coatings from hemicelluloses: a review. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 6, p. 1493–505, jun. 2008.

HELLWIG, S. et al. Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 74, n. 4, p. 344–52, 20 ago. 2001.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **The Biochemical journal**, v. 316 (Pt 2, p. 695–696, 1 jun. 1996.

HIBBERT, E. G. et al. Directed evolution of biocatalytic processes. **Biomolecular Engineering**, v. 22, n. 1-3, p. 11–19, 2005.

HUANG, C.-T.; PERETTI, S. W.; BRYERS, J. D. Effects of inducer levels on a recombinant bacterial biofilm formation and gene expression. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 9, p. 903–908, set. 1994.

HUNG, K.-S. et al. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1257–1263, jun. 2011.

INVETROGEN. *Pichia* Expression Kit. In: Thermo Fisher Scientific, editor. 2014. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf.

JAMES, S. A.; STRATFORD, M. Chapter 84 - *Zygosaccharomyces* Barker (1901). In: BOEKHOUT, C. P. K. W. F. (Ed.). . **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, 2011. p. 937–947.

KATZKE, N. et al. A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Protein expression and purification**, v. 69, n. 2, p. 137–46, fev. 2010.

KIM, T. H.; KIM, T. H. Overview of technical barriers and implementation of cellulosic ethanol in the U.S. **Energy**, v. 66, p. 13–19, mar. 2014.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389–407, 3 out. 2009.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

KUMAR, S.; NUSSINOV, R. How do thermophilic proteins deal with heat? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1216–1233, ago. 2001.

KUWAE, S. et al. Production of recombinant human antithrombin by *Pichia pastoris*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 264–71, mar. 2005.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 98–105, marc. 1996.

LEHMANN, M.; WYSS, M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 371–375, ago. 2001.

LEUSCHNER, C.; ANTRANIKIAN, G. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 95–114, jan. 1995.

LIN, L. et al. Improved catalytic efficiency of endo-beta-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 671–9, mar. 2009.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 1 set. 2002.

MAALEJ, I. et al. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 158, n. 1, p. 200–12, jul. 2009.

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast (Chichester, England)**, v. 22, n. 4, p. 249–70, mar. 2005.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. **Microbiologia De Brock. edição**,. 12^a. ed. Porto Alegre: editora Artmed, 2010.

NATESH, R. et al. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of molecular biology**, v. 288, n. 5, p. 999–1012, 21 maio 1999. ‘

NOVAGEN. pET System manual. In: Merck KGaA, editor. 2003.
http://download.bioon.com.cn/upload/month_1003/20100314_04f17ef5ae569f1ce0a6rq5Yepyoh4S4.attach.pdf.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34–50, 1 mar. 2000.

PALACKAL, N. et al. An evolutionary route to xylanase process fitness. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 13, n. 2, p. 494–503, fev. 2004.

PAN, S. H.; MALCOLM, B. A. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). **Biotechniques**, v. 29, p. 1234–1238, 2000.

PARACHIN, N. S. et al. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 52–57, jul. 2009.

PEROUTKA III, R. J. et al. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 705, p. 15–30, jan. 2011.

PETSCH, D. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2-3, p. 97–119, 21 jan. 2000.

PHILLIPS, T. A.; VANBOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F. C. Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. **J. Bacteriol.**, v. 159, n. 1, p. 283–287, 1 jul. 1984.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–91, jun. 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, maio 2012.

QIAO, W. et al. Biochemical characterization of a novel thermostable GH11 xylanase with CBM6 domain from *Caldicellulosiruptor kronotskyensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 8–16, set. 2014.

QING, G. et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 877–82, jul. 2004.

QUICK, M.; WRIGHT, E. M. Employing *Escherichia coli* to functionally express, purify, and characterize a human transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 13, p. 8597–601, 25 jun. 2002.

RÄTTÖ, M. et al. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of kraft pulps. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 130–133, mar. 1994.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast (Chichester, England)**, v. 8, n. 6, p. 423–88, jun. 1992.

RUSTIGUEL, C. B. et al. A novel silver-activated extracellular β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 10–15, nov. 2010.

RUTTERSMITH, L. D.; DANIEL, R. M.; SIMPSON, H. D. Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes functional above 100°C. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 672, n. 1 Enzyme Engine, p. 137–141, nov. 1992.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 307, n. 1-2, p. 249–64, jan. 2008.

SAUL, D. J. et al. Secondary structure model for an unusual SSU rRNA from the extremely thermophilic bacterium strain AZ3 B.1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1217, n. 2, p. 211–213, mar. 1994.

SCHÄFER, A.; WOLF, D. H. Endoplasmic reticulum-associated protein quality control and degradation: screen for ERAD mutants after ethylmethane sulfonate mutagenesis. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 301, p. 283–8, jan. 2005.

SCHNEIDER, J. C. et al. Auxotrophic markers pyrF and proC can replace antibiotic markers on protein production plasmids in high-cell-density *Pseudomonas fluorescens* fermentation. **Biotechnology progress**, v. 21, n. 2, p. 343–8, jan. 2005 .

SONG, J.-A. et al. A novel *Escherichia coli* solubility enhancer protein for fusion expression of aggregation-prone heterologous proteins. **Enzyme and microbial technology**, v. 49, n. 2, p. 124–30, 10 jul. 2011.

SREEKRISHNA, K. et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, p. 55–62, 1997.

STEMMER, W. P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 22, p. 10747–10751, 25 out. 1994.

STEPHENS, D. E. et al. Creation of thermostable and alkaline stable xylanase variants by DNA shuffling. **Journal of biotechnology**, v. 187, p. 139–46, 10 out. 2014.

STEPHENS, D. E.; SINGH, S.; PERMAUL, K. Error-prone PCR of a fungal xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability. **FEMS microbiology letters**, v. 293, n. 1, p. 42–7, 1 abr. 2009.

TENG, C. et al. High-level expression of extracellular secretion of a β -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1822–30, jan. 2011.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–22, set. 2006.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotechnol Cien Desenv**, n. 2, p. 20–22, 2000.

TURUNEN, O. et al. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. **Protein engineering**, v. 15, n. 2, p. 141–145, 2002.

UDAKA, S.; YAMAGATA, H. High-level secretion of heterologous proteins by *Bacillus*

brevis. **Methods in enzymology**, v. 217, p. 23–33, jan. 1993.

VASSILEVA, A. et al. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 21–35, jun. 2001.

WATERHAM, H. R. et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 37–44, fev. 1997.

WILLIAM STUDIER, F. et al. **Gene Expression Technology**. [s.l.] Elsevier, 1990. v. 185

WINTERHALTER, C.; LIEBL, W. Two Extremely Thermostable Xylanases of the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1810–1815, 1 maio 1995.

WONG, T. S. et al. Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 3, p. e26, 10 jan. 2004.

ZHANG, H.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Influence of pectinase treatment on fruit spirits from apple mash, juice and pomace. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1909–1913, out. 2011.

ZHANG, P. Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452–81, jan. 2006.

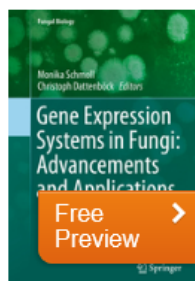
ZHANG, Z.-G. et al. Improving the thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase XT6 by directed evolution and site-directed mutagenesis. **Bioresource technology**, v. 101, n. 23, p. 9272–8, dez. 2010.

ANEXO

» Chemistry » Biotechnology

Fungal Biology

© 2016



Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications

Editors: Schmoll, Monika, Dattenböck, Christoph (Eds.)

We bring together articles of experienced and renowned experts and highlight diverse aspects of gene expression systems of fungi. We will cover a broad array of topics from industrial requirements to recent advancements and novel solutions.

Applications and Benefits of Thermophilic Microorganisms and Their Enzymes for Industrial Biotechnology

Eleni Gomes, Angelica Rodrigues de Souza, Guillermo Ladino Orjuela, Roberto Da Silva, Tássio Brito de Oliveira, and Andre Rodrigues

Book Title: Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications

Editors: Monika Schmoll e Christoph Dattenböck

DOI: 10.1007/978-3-319-27951-0_21

Series Title: Fungal Biology

Copyright: 2016

Publisher: Springer International Publishing

Copyright Holder: Springer International Publishing Switzerland

EBook: ISBN978-3-319-27951-0

Hardcover: ISBN978-3-319-27949-7

Series: ISSN2198-7777

Edition Number 1

Number of pages: 499

Website: <http://www.springer.com/la/book/9783319279497>

CAPÍTULO 1

Expressão de endo-xilanase (GH10) de *T. aurantiacus* em *E. coli*, *S. cerevisiae* e *P. pastoris*: Purificação e caracterização bioquímica para determinação dos fatores relacionados ao poder catalítico e estabilidade das xilanases recombinantes

(Dados serão submetidos a *Microbial Cell Factories*)

Angelica R. de Souza^a, Fernanda C. Franco^b, Maria Cecília M. Chierotti^a, Josiane A. Scarpassa^{a-c}, Roberto Ruller^c, Eleni Gomes^a, Fernando A. G. Torres^c, Roberto da Silva^a

^aUNESP (Universidade do Estado de São Paulo - Júlio de Mesquita Filho, Laboratório de bioquímica e Microbiologia Aplicada, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, BR)

^bUnB (Universidade de Brasília, Laboratório de biotecnologia de leveduras, Brasília, DF, 71605-001, BR)

^cCTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, 13083-100)

RESUMO

As construções proteicas em vetor de *Saccharomyces cerevisiae* (yPGKxil/XynA_Sc) e *Escherichia coli* (pET32axil/XynA_Ec) foram obtidas a partir de plasmídeo clonado em vetor de *Pichia pastoris* (pPIC9xil/XynA_Pp). Estas foram expressas em cepas de GS115, CEN.PK2 e Rosetta-gami, exibindo ótimos de 650 U.mL⁻¹, 5,8 U.mL⁻¹ e 815 U.mL⁻¹, respectivamente. As frações solúveis dos extratos foram purificadas por Cromatografia Líquida. Ambas xilanases apresentaram alta especificidade a xilana beechwood e dois pHs ótimos. XynA_Sc exibiu ótimos de atividade em pH 5/7,5 a 65-70 °C, enquanto xynA_Ec e xynA_Pp em pH 5,5/8,5 a 65 °C. No perfil de estabilidade térmica, após 1h, XynA_Ec exibiu maior resistência a temperatura, com atividade residual de 16 % a 85 °C, enquanto XynA_Sc e XynA_Pp apresentaram atividade residual inferior a 40 % a 65 °C. No perfil de estabilidade de pH, após 24 h 100 % de estabilidade foi exibido por XynA_Ec em pH 5, XynA_Pp na faixa de pH 6 a 8 e XynA_Sc em pH 8,5. Com relação ao efeito de agentes químicos, todas as linhagens foram fortemente inibidas por EDTA, íons Ag²⁺ e Hg²⁺ e ativadas por β-mercaptoetanol, Triton X-100, Tween 20 e SDS. Destaque para o primeiro não-metálico, pois comprovou o efeito de elevada modificação pós-traducional, como adição de ligações dissulfeto não nativas, sobretudo em XynA_Sc, as quais foram neutralizadas pelo β-mercaptoetanol, ativando a enzima fortemente. Os dados iniciais de cinética exibiram valores de K_m e V_{max} de 9,65 (mg.mL⁻¹), 16,06 (mg.mL⁻¹) e 7,66 (mg.mL⁻¹); e 28,58 (U.mL⁻¹), 1136 (U.mL⁻¹) e 58,27 (U.mL⁻¹) para XynA_Sc, XynA_Ec e XynA_Pp, respectivamente. Portanto, XynA_Pp e XynA_Ec foram as xilanases de

destaque neste estudo e apresentam-se como enzimas potenciais para aplicação industrial.

Palavras chave: Sistema de expressão. Endo-xilanase. Caracterização bioquímica. Estabilidade. Poder catalítico.

1. INTRODUÇÃO

As endo-1,4- β -xilanase são enzimas responsáveis pela hidrólise da cadeia interna da xilana, o principal componente da hemicelulose, liberando unidades de xilobiase e xilooligossacarídeos (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006). Endo-xilanases são produzidas por diferentes microrganismos (AHMED; RIAZ; JAMIL, 2009; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2009), dos quais os fungos filamentosos destacam-se como os melhores produtores do complexo xilanolítico (BEG ET AL., 2001).

Nas últimas décadas, as endo-xilanases tem atraído interesses do setor industrial devido sua capacidade de hidrolisar xilana com foco na síntese de bioprodutos com valor agregado aumentado (AACHARY; PRAPULLA, 2009). Dentre estas as principais aplicações, destacam-se tratamento da biomassa residual, branqueamento de papel (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; AACHARY E PRAPULLA, 2009) e produção de xilooligossacarídeos com importantes funções prebióticas (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; SAMANTA ET AL., 2012). Portanto, dependendo da aplicação final destas enzimas, necessita-se de xilanases capazes de tolerar ambientes extremos, como elevada temperatura ou pH extremamente ácidos e básicos. No entanto, nem sempre estas enzimas são produzidas naturalmente em elevada concentração e esforços no setor de produção de enzimas recombinantes tem motivado o investimento de energia e suporte financeiro para desenvolvimento e aprimoramento de técnicas.

A seleção do melhor hospedeiro e sistema promotor para obtenção de proteínas heterólogas é um trabalho dificultado por fatores relacionados a genética dos microrganismos e da própria enzima (TERPE, 2006). Comparando três dos principais sistemas mundialmente mais utilizados em unidades de pesquisas e industriais para produção de enzimas (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e

Pichia pastoris) tem-se fatores positivos e negativos que devem ser levados em consideração.

Sistemas bacterianos apesar de atrativos devido simplicidade no manuseio, genética e fisiologia conhecidas podem ser um entrave para produção de proteínas heterólogas, pois não são capazes de promover modificações pós-traducionais, as quais podem ser essenciais para bioatividade. No entanto, ainda é o sistema de expressão preferido para uma variedade de aplicações (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

S. cerevisiae e *P. pastoris* são hospedeiros alternativos do sistema eucarioto e as mais popularmente empregadas (LYND et al., 2002; PARACHIN et al., 2009). Dentre as vantagens comuns destacam-se capacidade de modificação pós-transcricional e traducional, elevada concentração de proteína e expressão constitutiva. *S. cerevisiae* é um organismo atrativo para produção de biofármacos (OSTERGAARD; NIELSEN, 2000; TORRES; MORAES, 2000), pois apresenta o certificado GRAS (*Generally Regarded as Safe*). Esta levedura produz chaperoninas que auxiliam o dobramento das proteínas heterólogas, trata-se de eucarioto com plasmídeo natural 2 μ , com origem de replicação em *E. coli* (BRANDÃO, 1996). *P. pastoris*, uma levedura metilotrófica, com genética conhecida e de fácil manipulação, é um atraente devido ao forte promotor na transcrição de genes heterólogos: AOX regulado por metanol (COS et al., 2006), uma das suas desvantagens, e o GAP, um forte promotor constitutivo (POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z., 2012). A principal desvantagem destes dois sistemas é o elevado tempo de cultivo das células, o que do ponto de vista industrial, dificulta o processo de síntese de biomoléculas.

Estudos tem sido conduzidos para a clonagem e expressão de xilanases fúngicas. Este trabalho relata a expressão de uma mesma enzima, uma endo-xilanase de organismo termofílico, *T. aurantiacus*, clonada e expressa em três organismos distintos: *P. pastoris*, *S. cerevisiae* e *E. coli*. Objetivou-se por meio deste descrever, a partir de informações bioquímicas, os fatores relacionados ao poder catalítico e estabilidade proteica da endoxilanase, quando expressa em diferentes organismos, considerando-se que a escolha do hospedeiro é crucial para o melhoramento de características bioquímicas de enzimas (TERPE, 2006).

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção e construções dos plasmídeos recombinantes de xilanase do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* (Xil_Tau) em vetor constitutivo de *Pichia pastoris*, vetor episomal de *Saccharomyces cerevisiae*, yPGK, e de *Escherichia coli*, pET32a

O plasmídeo pPIC9xil, clonado em vetor pPIC9 sem o peptídeo sinal nativo, e transformado em cepa GS115 de *Pichia pastoris*, desenvolvido durante mestrado de aluna do grupo, Fernanda Franco, foi gentilmente cedido para propagação do mesmo e continuação dos estudos com esta construção de proteína. Portanto, o mesmo foi utilizado para transferência do cassete de expressão para o vetor episomal de *Saccharomyces cerevisiae*, Y1PGK-1, e para o vetor de *Escherichia coli*, pET32a.

Para a nova construção em *S. cerevisiae*, o plasmídeo foi duplamente digerido com as enzimas *Bam*H I (5'-G'GATCC-3') e *Not* I (5'-GC'GGCCGC-3') durante 2 h a 37 °C. O inserto liberado foi ligado ao vetor Y1PGK-1 (7,4 kb), previamente linearizado com as mesmas enzimas (*Bam*H I e *Not* I). A ligação processou-se O/N a 16 °C com a enzima de ligação T4 DNA (Promega). Todo o produto da ligação foi posteriormente transformado em células competentes de *E. coli* (*XL10gold*), pela técnica de choque térmico e o produto da transformação plaqueado em placa LB/ampicilina (100 µg.mL⁻¹). Controle negativo da transformação, ou seja, sem material genético foi realizado. Algumas colônias transformadas foram selecionadas e cultivadas em LB/ampicilina (100 µg.mL⁻¹) durante 16 h, a 200 rpm de agitação a temperatura de 37°C. Material genético foi extraído por kit de miniprep (Qiagen) e duplamente digerido com as mesmas enzimas de restrições usadas anteriormente, para efeito de comprovação da clonagem.

Para construção do plasmídeo em *E. coli*, alíquota do plasmídeo pPICxil foi utilizada para amplificação do gene de xilanase com Q5 High-fidelity DNA Polimerase (New England Biolabs). A amplificação foi realizada de acordo com as normas do fabricante. O mix de PCR foi preparado para uma concentração final do plasmídeo de 10 ng, 0,5 µM do par de primers do vetor pET32 (**Tabela 1**), 200 µM de dNTPs, 1X tampão de reação Q5, 0,02 U.mL⁻¹ da DNA polimerase Q5 high-fidelity e água estéril para um volume final de 50 µL. A amplificação foi conduzida em um gradiente de anelamento (48,2 °C, 53.4 °C, 56.7 °C, 59.6 °C, 63.4 °C e 65 °C) por 20 s, durante 30 ciclos. Todas as outras etapas foram processadas como estabelecido pelo fabricante.

O produto da amplificação foi purificado pelo kit de purificação PCR prep. Kit (Qiagen) e duplamente digerido com *Nco* I e *Not* I (5' CCATGG 3', 5' GCGGCCGC 3') (New England Biolabs) durante 1 h a 37 °C. O produto digerido foi ligado no vetor pET32a, previamente linearizado nas mesmas condições, com enzima de ligação T4 DNA ligase – Quick ligation kit (New England Biolabs), de acordo com as especificações do fabricante. O produto da ligação foi transformado em células NEB 10-beta (New England Biolabs) e plaqueados em meio LB-ágar suplementado com Amp (100 µg.mL⁻¹). Cauda de histidia foi adicionada as extremidades do gene de xilanase a fim de facilitar etapa de purificação da proteína. O vetor pET32a sem o gene da xilanase foi usado como controle negativo da reação de ligação, transformado e plaqueado nas mesmas condições acima descritas.

Tabela 1 – Pares de oligonucleotídeos usados na reação de amplificação/sequenciamento.

Plasmídeo		Primer sequencing (5'→3')
pPIC9xil	5' AOX	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
	3' AOX	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC
yPGK1xil	5' PGK	GAT CAT CAA GGA AGT AAT TAT CTA C
	3' PGK	CTA TCG ATT TCA ATT CAA TTC AAT
pET32xil	5' <i>Nco</i> I	GG CCA TGG GC CAA GCT GCA CAG AGT
	3' <i>Not</i> I	GG GCG GCC GC TCA CTG CTG CAG G

2.2. Sequenciamento das construções de xinalases

Os materiais plasmidiais do gene de XynA clonado no vetor de *S. cerevisiae* (yPGKxil), do gene de XynA clonado no vetor de *P. pastoris* (pPIC9xil) e de *E. coli* (pET32xil) foram usados como template para as reações de sequenciamento e confirmação das sequencias obtidas. As amplificações dos genes foram processadas com o kit de sequenciamento BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante. Para tanto, foram utilizadas 3,2 pmol dos primers dos vetores do promotor PGK de *S. cerevisiae*, do promotor AOX de *P. pastoris* e do promotor T7 de *E. coli* (Tabela 1) em 10 µL de volume final das reações *Foward* e *Reverse*. A reação foi processada em termociclador MJ Research PTC200 (BioRad). A ciclagem ocorreu como sugerido pelo fabricante. Os produtos amplificados foram sequenciados em 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) e analisados no *software* DNASTAR para obtenção dos *contigs*.

2.3. Expressões das xilanases recombinantes

2.3.1. Em cepa GS115 de *P. pastoris*

O protocolo de expressão foi estabelecido em trabalho anterior (FRANCO et al., 2011) e reproduzido neste. Para tanto, uma colônia isolada 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 %) em frasco de 250mL e incubada a 37 °C sob agitação (200rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 2 a 6 (em torno de 16 a 18 horas). As células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspensas em 100 mL e 250 mL de meio BMMY (idem BMGY, suplementado com metanol 0,5 % a cada 24 h) em frascos aletados de 1 L, obtendo uma OD₆₀₀ 0,4 e incubadas por 96 horas sob as mesmas condições.

2.3.2. Em cepa CEN.PK2 de *S. cerevisiae*

Diferentes testes para a produção da endo-xilanase em meio líquido foram realizados variando-se a fonte de carbono do meio, considerando-se sua marca auxotrófica Leu2⁻. Para tanto, colônias transformantes selecionadas foram pré-inoculadas em frascos de 50 mL com 5 mL de meio mínimo MD (YNBN 0,67 %, (NH₄)₂SO₄ 0,5 % e Glicose 2 %) suplementados com aminoácidos His/Trp/Ura (0,002 %). Os frascos foram mantidos em shaker (New Brunswick Scientific) a 30 °C durante 16 h a 180 rpm de agitação. Contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e quantidade fixa de ($1 \cdot 10^7$ células) inoculada em meio mínimo variando-se a fonte de carbono. Dentre os meios testados destacam-se os meios mínimos todos suplementados com aminoácidos His/Trp/Ura (0,002 %): MD (YNBN 0,67 %, (NH₄)₂SO₄ 0,5 %, Glicose 2 %); MDX (YNBN 0,67 %, (NH₄)₂SO₄ 0,5 %, Glicose 0,5 % e xilana 1,5 % / 2 %); MS (YNBN 0,67 %, (NH₄)₂SO₄ 0,5 %, Sacarose 2 %); MDXB e MDXF (YNBN 0,67 %, (NH₄)₂SO₄ 0,5 %, Glicose 0,5 %, xilana 1,5 % e bagaço de cana / farelo de trigo 1 %), neste último caso, como proposto por PARACHIN e colaboradores, 2009.

As células foram cultivadas nestes meios a 30 °C, sob 180 rpm de agitação por até 120 h em shaker (New Brunswick Scientific). Alíquotas foram retiradas em intervalos de 24 h para contagem de células em câmara de Neubauer, posteriormente

centrifugadas a 5000 xg por 10 min, e o sobrenadante utilizado para ensaio de atividade xilanolítica, açúcar redutor (DNS) (2.5) e densidade ótica (OD) 600 nm e o pellet reservado para quantificação da biomassa. Sempre que possível todas estas análises foram investigadas. No entanto, devido a restrições do próprio meio utilizado algumas destas tornaram-se inviáveis, e nestes casos, pelo menos a atividade xilanolítica foi quantificada.

No entanto, mesmo após cinco tentativas para otimização do teste de expressão da enzima e diante da diminuta taxa de produção dois testes de rompimento de células foram realizados com o pool de células obtidos durante a melhor condição de expressão determinada. Um dos testes foi processado pela combinação de fatores de temperatura e areia lavada como proposto por FERREIRA (2010), com modificações. O segundo teste foi realizado pela combinação de tampão de lise e areia lavada. Ambos sobrenadantes tiveram suas atividades xilanolíticas quantificadas.

2.3.3. Em cepa Rosetta-gami de *E. coli*

A construção pET32xil foi transformada em células de Rosetta-Gami (DE3) (Novagen) e shuffle (New England Biolabs) e cultivadas em meio 50 mL de meio LB suplementado com canamicina ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em frascos de 250 mL. Diferentes concentrações de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG): 0,4, 0,6, 0,8 mM, e a temperatura de indução: 30 ° C e 37 ° C. As células foram cultivadas até 0,5 unidades de densidade ótica a 600 nm e induzidas com IPTG durante 4 horas. Após a expressão da enzima, as células foram recolhidas por centrifugação a 10.000 x g durante 10 min e o conteúdo de proteína intracelular obtidas com BugBuster® 1X (Novagen) na presença de *Lysonase* ($10 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ células), como recomendada pelo fabricante. Frações solúveis e insolúveis foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) (2.6). Atividades xilanolíticas das frações solúveis foram quantificadas (2.5).

2.4. Pré-tratamento do extrato bruto, purificações e proteína total

2.4.1. Xilanases recombinantes (XynA_Sc e XynA_Pp)

a) Ultrafiltração tangencial, liofilização e diálise

Ambas as amostras foram previamente tratadas para remoção de contaminantes de reduzida massa molecular e da coloração do extrato, bem como concentração das linhagens de estudo. Para isto, os extratos enzimáticos foram igualmente tratados por ultrafiltração tangencial em sistema QuixStand Benchtop (GE life science) acoplado ao cartucho de 10000 NMWC (*Nominal Molecular Weight Cutoff*), com 650 cm² de área superficial (GE Helthcare). Consecutivas trocas da solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 foram processadas até concentração das amostras em 20% do volume inicial. Os extratos proteicos foram liofilizados em FR-Drying Digital Unit (ThermoFisher) durante 16 h, solubilizados em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e dialisados em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5, a 4 °C, empregando-se membrana de 10 kDa. O sistema foi mantido sob agitação suave durante os três processos de troca do tampão.

b) Estratégia de purificação em bancada

Os testes de purificação das construções em *P. pastoris* e em *S. cerevisiae* foram realizados em tubos com tampa de 2 mL empregando-se resina de troca aniônica Q-sepharose® Fast flow (Sigma Aldrich). A resina foi preparada a 50% (v.v⁻¹) em água e alíquotas de 1 mL desta foram adicionadas aos tubos. O material em suspensão foi decantado, o sobrenadante descartado e a resina lavada em água e 2,5 mL de solução tampão adicionado: 100 mM (Glicina/HCl pH3; Acetato de sódio pH 4 e pH 5; Tris/maleato pH 6, 7 e 8). O sobrenadante foi removido e 0,5 mL das respectivas soluções tampão adicionadas, com 0,250 mL de solução de enzima pré-tratada (2.4.1-a) a 50% (v.v⁻¹) no tampão de investigação. Esses tubos foram mantidos em agitação em agitador de rolos (Biomixer) por 10 min e o sobrenadante utilizado para ensaio de atividade xilanolítica em microplaca (2.5).

c) Purificação por cromatografia líquida

A etapa de purificação das construções foi processada por cromatografia líquida de alta performance (FPLC) em sistema ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Science).

Os extratos enzimáticos apresentavam níveis de contaminação distintos. No entanto ambos foram submetidos a mesma primeira etapa de purificação. Esta foi realizada por troca aniônica, em coluna aberta 16/12 contendo resina Q-sepharose® Fast Flow (Sigma). A eluição da proteína processou-se em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5, com gradiente de NaCl (0-500 mM), num fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Alíquotas das frações eluídas preservadas para quantificação de atividade xilanolítica (2.5). Alíquotas com atividade foram liofilizadas para efeito de concentração da proteína e o grau de pureza analisado em eletroforese SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) (2.6).

Para a xilanase clonada e expressa em *P. pastoris*, etapa adicional de purificação foi necessária. Deste modo, a solução da etapa anterior foi dialisada (2.4.1-a) em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,0. Esta etapa foi realizada em coluna mono S 5/50 GL (GE Life Sciences), em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,0, com gradiente de NaCl (0-500 mM), num fluxo de 0,3 mL.min⁻¹. A atividade xilanolítica das frações coletadas foi dosada, alíquotas com atividade foram liofilizadas e o grau de pureza analisado em eletroforese SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). Após purificação, fração proteica foi dialisada (2.4.1-a) em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5.

A estimativa da concentração de proteína foi testada pelo método de BRADFORD (1976) e LOWRY (1951), usando BSA (soro albumina bovina) como padrão. No entanto, apenas o método de Lowry foi adequado para quantificação, pois ambas construções precipitaram em solução de Bradford.

2.4.2. Xilanase recombinantes (Xyna_Ec)

A enzima recombinante clonada e expressa em *E. coli* foi purificada por dois passos cromatográfico, a partir do extrato enzimático. O primeiro baseou-se em uma etapa de cromatografia de afinidade devido à presença de His-tag nas extremidades da proteína. A coluna HisTrap™ FF (1mL) (GE Healthcare Life Sciences) foi utilizada para purificação em sistema ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Science) em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e 500 mM imidazol num fluxo de 1 mL.min⁻¹, com dois gradientes de imidazol (10 % e 100 %). Posteriormente amostra foi dialisada para remoção do imidazol (2.4.1.-a) em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7. A segunda etapa foi processada pela técnica de gel filtração em coluna Sephacryl S-200 16/60 (Ge Life Sciences) em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 num fluxo de 0,5 mL.min⁻¹

¹, para remoção de contaminantes de menor massa molecular possivelmente provenientes da ação de proteases no meio. Amostra proteica foi concentrada em tubos concentrador de proteína de polietileno sulfonato - Vivaspín 10000 NMWL e quantificadas a 280 nm em espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio UV-Visible (Agilent Technologies), considerando um coeficiente de extinção molar de 57660 M⁻¹. Atividade xilanolítica das frações coletadas foram dosadas e alíquotas das frações com atividade analisadas em gel SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970).

2.5. Atividade xilanolítica

Atividade xilanolítica foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), sem fenol, num ensaio em micro-placa como descrito por BAILEY; BIELY; POUTANEN (1992) com modificações, em 200 µL de volume reacional, utilizando xilana beechwood 1% (Sigma) como substrato. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por min, utilizando xilose como um produto padrão. Uma reação de controle consistiu na adição da enzima após a incubação da reação com o DNS. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Fatores como tempo ótimo de atividade enzimática (2 min, 5 min, 10 min e 30 min) e concentração ideal do tampão na solução xilana 1% foram analisados.

2.6. SDS-PAGE e Zimograma de endo-xilanase

Géis SDS-PAGE 10% e ou 12% foram preparados para as análises das proteínas de estudo, como proposto por LAEMMLI (1970). Bandas de proteínas foram reveladas pelo método de coloração com prata e ou EZBlue (Sigma). Gel para zimograma de xilanase foi preparado da mesma forma como descrito por LAEMMLI (1970), com 0,5 % de xilana beechwood em solução (HUNG et al., 2011), sendo que para melhor comparação dos resultados, um gel réplica, foi também preparado para revelação com prata e ou EZBlue. As amostras proteicas para SDS-PAGE foram fervidas por 5 min para desnoveamento da proteína.

Gel para zimograma foi lavado com solução a 25% de isopropanol para remoção do excesso de SDS. Após etapa de lavagem, o gel foi incubado durante 30 min a 60 °C em solução tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5 com xilana

beechwood (Sigma) a 0,5% (m/v) e ágar 0,5% (m/v). Posteriormente, o gel foi embebido em solução congo red 0,1% (m/v) durante 1 h sob agitação suave em agitador de bancada, seguido de etapa de descoloração com NaCl 1M por 12 h, sob agitação suave em agitador de bancada. Efeito de contraste pôde ser obtido usando solução de HCl 0,1 M. Bandas ativas foram observadas como bandas claras contra fundo azul escuro (BEGUIN, 1983; HUNG et al., 2011).

2.7. Determinação de fatores bioquímicos das xilanases recombinantes

2.7.1. Condições de armazenamento das xilanases recombinantes

A estabilidade das construções, frente a condição de armazenamento das frações proteicas, foi investigada após período de incubação de 24 h a 0 °C (sem congelamento), 4 °C, -80 °C e 25 °C. Atividades xilanolíticas antes e após o período de incubação foram quantificadas e convertidas em atividade residual (%).

2.7.2. Especificidade ao substrato

A afinidade de xilanases por vários substratos comerciais foi investigada. Para tanto, os seguintes substratos foram testados: xilana beechwood (Sigma) xilana oat spelt (Sigma), Avicel (Merck) e Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma) ambos em solução com 1% de concentração ($m.v^{-1}$) em 25 mM tampão acetato de sódio pH 5-5,5, pela reação padrão de atividade enzimática descrita acima (2.5). Nos próximos passos, estudos de especificidade a substratos lignocelulósico serão conduzidos com resíduo de bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho e farelo de trigo, após tratamento e trituração, como reportado por KOCABAG; GUDER; OZBEN (2015). Tratam-se dos principais resíduos agroindustriais disponíveis como resultado das atividades agrícolas nacionais e com diferentes percentuais no conteúdo de materiais hemicelulolíticos.

2.7.3. pH e temperatura ótimos e de estabilidade

Os perfis de temperatura e pH ótimos foram obtidos como descrito pelo ensaio de atividade xilanolítica, solução de xilana 1% em 25 mM de acetato de sódio pH 5 ou 5,5, tempo de reação enzimática de 5 min a 65 °C. Alíquotas das proteínas foram

diluídas adequadamente no tampão de diálise e o pH ideal foi ensaiado em amplo espectro de pH (3-10,5) pelo ensaio de atividade xilanolítica a 65 °C. Quatro diferentes soluções tampões foram preparadas a 25 mM (pH 3,0: Glicina-HCl; pH 3,5-5: acetato de sódio; pH 5,5-9: tris-aminometano; pH 9,5-10,5: Glicina). Para o perfil de temperatura ótima, alíquotas foram diluídas adequadamente e ensaiadas em amplo espectro de temperatura de 40 °C a 80 °C em 25 mM de tampão acetato de sódio pH 5 para XynA_Pp e 5,5 para XynA_Sc e XynA_Ec.

Para o perfil de temperatura e pH de estabilidade, alíquotas das enzimas previamente preparadas foram incubadas durante 1 h e 24 h, respectivamente, nas mesmas faixas de temperatura e pH descritos, nas condições ótimas ensaiadas e os valores de atividade residual (%) obtidos.

2.7.4. Efeito de íons metálicos, não metálicos, quelantes, solventes orgânicos e surfactantes na atividade das endo-xilanases

Alguns íons metálicos e reagentes podem afetar significativamente as atividades das endo-xilanases (JUTURU; WU, 2012). Deste modo, o efeito de treze íons metálicos foi testado na atividade xilanolítica, dentre estes destacam-se os compostos clorados dos íons K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} e Ag^{3+} ; agente quelante EDTA e os agentes orgânicos Tween 20, DMSO, Triton X-100, SDS e β -mercaptoetanol. Alíquotas das xilanases de estudo foram preparadas e incubadas durante 30 min a 25 °C na presença dos íons clorados, EDTA e SDS nas concentrações de 1 mM e 5 mM; e de Tween20, DMSO, Triton X-100 e β -mercaptoetanol nas concentrações de 0,1% (v.v⁻¹) e 0,25% (v.v⁻¹), em solução aquosa, e as atividades quantificadas. Amostras controles de enzimas nas mesmas condições, na ausência de íons e ou aditivos, foram preparadas e as atividades medidas, os quais foram considerados como 100%, e os efeitos de ativação e ou inibição obtidos a partir deste padrão.

2.7.5. Parâmetros cinéticos para as xilanases recombinantes

Os parâmetros cinéticos foram determinados sob condições padrões de ensaio de atividade xilanolítica (pH 5-5,5 a 65 °C) para xilanases em *S. cerevisiae*, *P. pastoris* e *E. coli* (2,5). As misturas reacionais continham diferentes quantidades de xilana

beechwood como substrato da reação de atividade enzimática (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 e 20,0 mg.mL⁻¹). As constantes cinéticas: K_m e V_{max} foram determinados por Michaelis-Menten usando ajuste não linear, com função hiperbólica do software OriginLab 9.1. Cada experimento foi repetido duas vezes com pontos em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Sequenciamento das construções de yPGKxil, pPIC9xil e pET32xil

O gene de xynA_Tau possui 909 resíduos de nucleotídeos, os quais codificam para 303 resíduos de aminoácidos, desconsiderando o peptídeo sinal da proteína. As sequências de yPGK1xil e pET32xil obtida a partir de pPIC9xil foram alinhadas contra duas sequências utilizadas como modelo, do *GenBank* (AF127529.2) e do PDB (1TUX) (**Figura 1**).

Ainda que a qualidade do sequenciamento para pPIC9xil esteja ruim, pois o mesmo foi realizado apenas como primer do promotor AOX, um total de cinco mutações na sequência de bases nucleotídicas foram identificadas e confirmadas nas outras construções. Destas, duas foram denominadas de mutações não silenciosas, que correspondem a permuta na posição 180, **AAC**→**GAC**, e posição 663, **GTT**→**GCT**, de bases nucleotídicas, as quais estão relacionadas com as permutas nos resíduos de aminoácidos em N60D e A221V, dos modelos para as construções investigadas, em destaque de vermelho na **Figura 1**.

Estudos para investigar a sequência original de XynA_Tau isolada do fungo e utilizada para construção do plasmídeo molde de pPIC9xil será conduzida, pois se estas permutas propagaram-se nas três construções, há duas hipóteses levantadas: ou (a) a sequência isolada do genoma do fungo apresenta naturalmente esta modificação como influência de fatores externos sob o fungo, tal como pressão seletiva e ou adaptativa, ou (b) esta mutação ocorreu durante primeira etapa de amplificação do gene de xynA_Tau para inserção em *Pichia pastoris*.

Figura 1 – Múltiplo alinhamento de seqüências de aminoácidos das construções de pPIC9xil, yPGKxil e pET32xil contra os modelos do GenBank (AF127529.2) e do PDB (1TUX) do fungo *T. aurantiacus*. Região idêntica das quatro seqüências e os sítios de mutações não silênciosas em destaque de cinza e vermelho, respectivamente.

	10 20 30 40 50
TUX	QAAQSVDQLI KARGKVYFGV ATDQNRLTTG KNAAIIQADF GQVTPENSMK
AF127529.1	QAAQSVDQLI KARGKVYFGV ATDQNRLTTG KNAAIIQADF GQVTPENSMK
pPIC9xil	QAAQSVDQLI KARGKVYFGV ATDQNRLTTG KNAAIIQADF GQVTPENSMK
yPGKxil	QAAQSVDQLI KARGKVYFGV ATDQNRLTTG KNAAIIQADF GQVTPENSMK
pET32xil	QAAQSVDQLI KARGKVYFGV ATDQNRLTTG KNAAIIQADF GQVTPENSMK

	60 70 80 90 100
TUX	WDATEPSQGN FNFAGADYLV NWAQQNGKLI RGHTLVWHSQ LPSWVVSITD
AF127529.1	WDATEPSQGN FNFAGADYLV NWAQQNGKLI RGHTLVWHSQ LPSWVVSITD
pPIC9xil	WDATEPSQGD FNFAGADYLV NWAQQNGKLI RGHTLVWHSQ LPSWVVSITD
xynASc	WDATEPSQGX FNFAGADYLV NWAQQNGKLI RGHTLVWHSQ LPSWVVSITD
pET32xil	WDATEPSQGN FNFAGADYLV NWAQQNGKLI RGHTLVWHSQ LPSWVVSITD

	110 120 130 140 150
TUX	KNTLTNVMKN HITTLMTRYI GKIRAWDVVN EAFNEDGSLR QTVFNLVIGE
AF127529.1	KNTLTNVMKN HITTLMTRYK GKIRAWDVVN EAFNEDGSLR QTVFLNVIGE
pPIC9xil	KNTLTNVMKN HITTLMTRYK GKIRAWDVVN EAFNEDGSLR QTVFLNVIGE
yPGKxil	KNTLTNVMKN HITTLMTRYK GKIRAWDVVN EAFNEDGSLR QTVFLNVIGE
pET32xil	KNTLTNVMKN HITTLMTRYK GKIRAWDVVN EAFNEDGSLR QTVFLNVIGE

	160 170 180 190 200
TUX	DYIPIAFRTA RAADPNAKLY INDYNLDSAS KPKTSAIVKR VK-KWRAAGV
AF127529.1	DYIPIAFQTA RAADPNAKLY INDYNLDSAS YPKTQAIVNR VK-QWRAAGV
pPIC9xil	DYIPMAFQTA RAADRMPSCT STITTSXXPS XPQDXXHCQP PSXNGGQLES
yPGKxil	DYIPIAFQTA RAADPNAKLY INDYNLDSAS YPKTQAIVNR VK-QWRAAGV
pET32xil	DYIPIAFQTA RAADPNAKLY INDYNLDSAS YPKTQAIVNR VK-QWRAAGV

	210 220 230 240 250
TUX	PIDGIGSQTH LSAGQGASID AALP-NLASA GTP-EVAIT- -ELDIAGATS
AF127529.1	PIDGIGSQTH LSAGQGASVL QALP-LLASA GTP-EVAIT- -ELDVAGASS
pPIC9xil	PLTALEXQTX XHRWSGSQGS TVFXXXLARG RNPXRVXFPG NWERXXGXXX
yPGKxil	PIDGIGSQTH LSAGQGASVL XALP-LLASA GTP-EVAIT- -ELDVAGASS
pET32xil	PIDGIGSQTH LSAGQGASVL QALP-LLASA GTP-EVAIT- -ELDVAGASS

	260 270 280 290 300
TUX	TDYVDVFNAC LD--VDSCIG ITVWGVADP- -DSWRASTTP LLDGDNFNP-
AF127529.1	TDYVNVFNAC LN--VQSCVG ITVWGVADP- -DSWRASTTP LLDGDNFNP-
pPIC9xil	XRXXPXXRGX LGXXXEXXGG XSPXGGGXXKX GTLGGFKKTP FXFXXGIXXX
yPGKxil	TDYVNVFNAC LN--VQSCVG ITVWGVADP- -DXWRASTTP LLDGDNFNP-
pET32xil	TDYVNVFNAC LN--VQSCVG ITVWGVADP- -DSWRASTTP LLDGDNFNP-

	310 320 330 340
TUX	---KPAYNAI VQLL-----
AF127529.1	---KPAYNAI VQDLQQ----
pPIC9xil	RGXKTXFGGX XXXXGPKXXP XKKXPXKGGX STPKKXYNAS C
yPGKxil	---KPAYNAI VQDLQQX---
pET32xil	-P-KPAYNAI VQD-----

3.2. Expressão das linhagens de xilanase recombinantes em *P. pastoris*, *S. cerevisiae* e *E. coli*

De acordo com protocolo estabelecido por FRANCO (2011) (dado ainda não publicado), o pico de expressão da xilanase em cepa metilotrófica de *P. pastoris* foi obtido após 96 h de indução com valores de aproximadamente 650 U.mL⁻¹. Por outro lado, a produção de xilanase em levedura auxotrófica de *S. cerevisiae* revelou que dentre todos os testes para otimização da expressão em fração solúvel o pico de produção foi obtido após 96 h de expressão em meio mínimo MDX na presença de 0,5% glicose e 1,5% de xilana com valores de 5,8 ± 0,94 U.mL⁻¹ de atividade xilanólítica e 8,87 ± 0,33 U.mg⁻¹ de biomassa quantificados, sendo este protocolo utilizada para escala aumentada em frascos haletados contendo 200 mL de meio. No último sistema de expressão induzida em cepa de *E. coli*, tem-se um máximo observado com 4 h de expressão, 0,4 mM de IPTG a 37 °C de 815 ± 75 U.mL⁻¹, sendo este sistema utilizado para produção em escala aumentada em frascos de 2 L com 500 mL de meio cada.

Estudo de produção de xilanase homóloga do *T. aurantiacus* foi realizada por DA SILVA et al. (2005), o qual relatou pico de produção em fermentação no estado sólido de aproximadamente 65 U.mL⁻¹ a 50° após 96 h de cultivo. Comparando-se a linhagem homóloga com as construções aqui investigadas, XynA_Sc apresentou-se com atividade xilanólítica bastante inferior, de 5,8 U.mL⁻¹ após 96 h. Fato similar foi observado por PARACHIN et al., 2009, em estudo de produção e caracterização de uma xilanase nativa de *Criptomococcus flavus*, CfXYN1, e sua recombinante expressa também em cepa de *S. cerevisiae* MFL, sob o controle do promotor PGK. A enzima recombinante exibiu uma produção de 2,5 U.mL⁻¹, ou seja 2,3 x inferior ao obtido por XynA_Sc, enquanto a homóloga de CfXYN1 apresentou atividade de 120 U.mL⁻¹. Esta diferença pode ser decorrente do efeito sinérgico das três xilanasas no extrato de *C. flavus* e ou da não otimização do meio de expressão, que de acordo com GÖRGENS et al. (2004 e 2005) pode contribuir para o aumento no nível de expressão da enzima secretada, fato este aqui estudado.

Outra questão é que, como relatado por TANAKA et al. (2004), a escolha da cepa de expressão pode ser determinante para obtenção de enzima em concentrações aumentadas. Uma xilanase de *Aspergillus pullulans* quando expressa em cepa de *S. cerevisiae*, mostrou atividade de 1,6 U.mL⁻¹, e quando expressa em *P.*

pastoris o valor observado foi vinte cinco vezes superior. No presente trabalho este fato é facilmente percebido uma vez que as atividades xilanolíticas foram obtidas nas condições otimizadas. *Pichia pastoris* exibiu atividade superior a *S. cerevisiae* em fator de mais de 10 vezes, e extremamente maior para a comparação entre *E. coli* e *S. cerevisiae*. Este fato nos sugere que possivelmente as modificações pós-traducionais nas cepas de levedura (OSTERGAARD; NIELSEN, 2000; TORRES; MORAES, 2002; DEMAIN; VAISHNAV, 2009) podem estar prejudicando a síntese proteica devido ao super efeito de hiperglicosilação em levedura, por exemplo, contribuindo para retenção da proteína no espaço periplasmático mais facilmente observada em sistema de *S. cerevisiae*. Este efeito de aprisionamento foi aqui investigado pelo ensaio de lise celular das células de *S. cerevisiae* produzidas em meio MDX com 0,5 % de glicose e 1,5 % de xilana, sendo detectado atividade xilanolítica duas vezes superior a fração solúvel, indicando que a cepa de *S. cerevisiae* neste trabalho reteve a proteína de estudo no espaço periplasmático, como destacado por BUCKHOLZ; GLEESON (1991).

3.3. Purificação das xilanases recombinantes de estudo

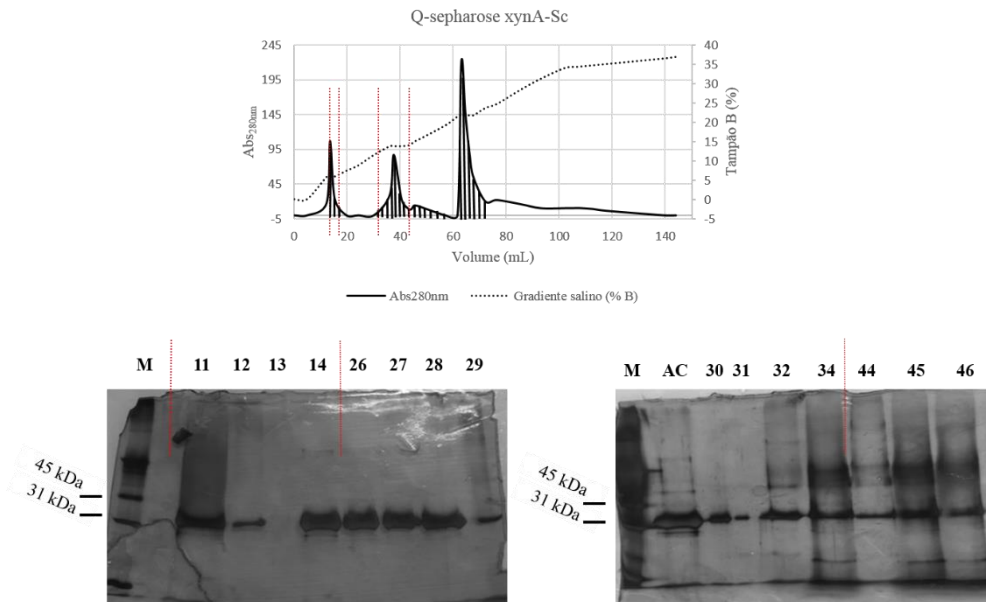
As etapas de pré-tratamento para XynA_Sc e XynA_Pp foram cruciais para diminuir a viscosidade e coloração da solução enzimática, além da concentração das amostras. A etapa de ultrafiltração foi aplicada também para a purificação de uma xilanase extracelular de reduzida massa molecular de cultura de fungo termofílico, *Scytalidium thermophilum* ATCC No. 16454 (KOCABAG; GUDER; OZBEN, 2015), a qual mostrou-se altamente eficiente. Por outro lado, o extrato enzimático de *E. coli* não necessitou de nenhuma etapa anterior para o mesmo efeito, devido a elevada taxa de produção da proteína alvo, bem como maior limpidez do extrato enzimático.

a) XynA_Sc

No ensaio de purificação em pequena escala para XynA_Sc e XynA_Pp foi possível verificar que a enzima não se adsorveu a resina em todos os pHs testados (4, 5, 6, 7 e 8). Este fator facilitou extremamente a purificação das duas construções. Neste caso, o critério de seleção do pH ideal para purificação em coluna foi realizado com base no perfil de contaminação das frações. Deste modo, a condição em pH 5 foi selecionada, pois, dentre as condições ensaiadas apresentava elevada concentração da enzima de investigação e baixa taxa de contaminação. Portanto, as etapas de

purificações realizadas para ambas construções em sistema ÄKTApurifier (GE Helthcare) foram facilmente processadas, ainda que com algumas modificações em relação ao teste em pequena escala (**Figura 2**).

Figura 2 – Cromatograma de XynA_Sc purificada por cromatografia de troca aniônica realizada em sistema FPLC ÄKTApurifier (GE Helthcare).



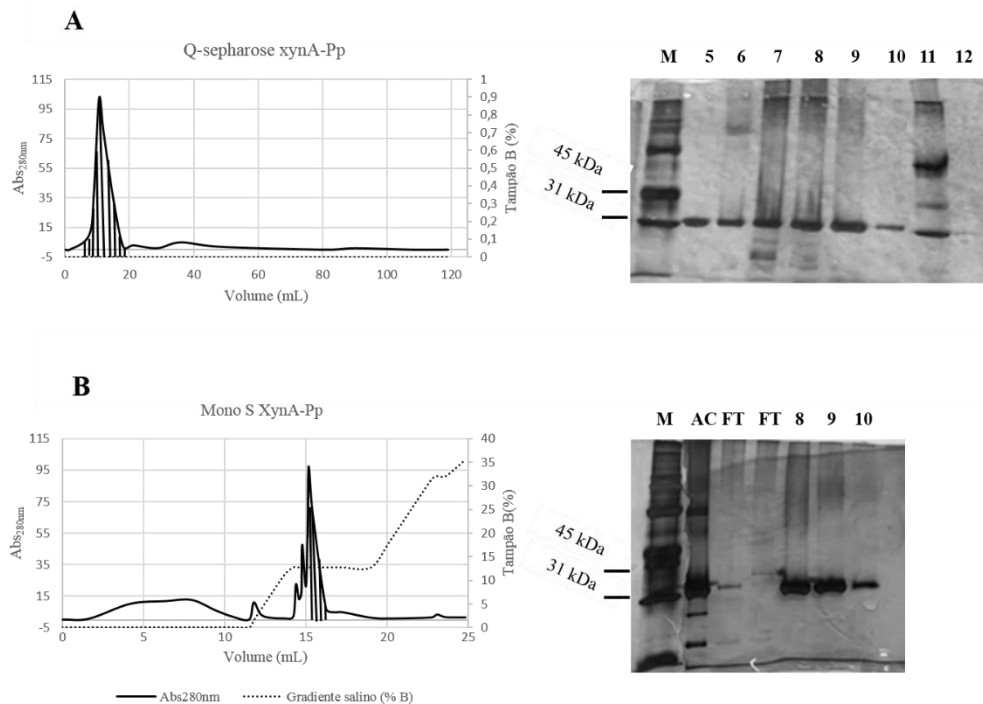
Diferentemente do esperado, após a injeção da amostra e lavagem da coluna a enzima não foi eluída sugerindo que XynA_Sc havia interagido com a resina. Esta foi eluída da coluna mediante gradiente salino de 0 a 40% de NaCl 500 mM. Além disso, a eluição de XynA_Sc ocorreu em diferentes concentrações de NaCl, como visualizado nas áreas pintadas de preto acima. Isto sugere que XynA_Sc sofreu diferentes níveis de interação com a resina. Alíquotas das amostras com atividade xilanolítica foram visualizadas em gel SDS-PAGE 12%. Desta forma, as amostras de menor contaminação em destaque na região do cromatograma, em vermelho, e no gel, as quais foram denominadas de frações 11-13 e 26-29 foram utilizadas para estudos posteriores. A concentração de proteína total quantificada pelo método de Lowry após junção destes tubos foi de $0,57 \text{ mg.mL}^{-1}$.

b) XynA_Pp

A purificação de XynA_Pp processou-se após duas etapas de purificação, as quais correspondem a uma troca aniônica, testada em ensaio em tubo de 5 mL, na ausência de interação da proteína com a resina, seguida de troca catiônica. O

cromatograma da troca aniônica e catiônica, bem como a análise da pureza das frações encontram-se na **Figura 3**.

Figura 3 – (A) Cromatogramas de XynA-Pp purificada por cromatografia de troca aniônica realizada em sistema FPLC ÄKTApurifier (GE Helthcare) e gel SDS-PAGE 12% das frações eluídas. M: Marcador de massa molecular de proteína (BioRad). 5-12: frações eluídas na purificação.

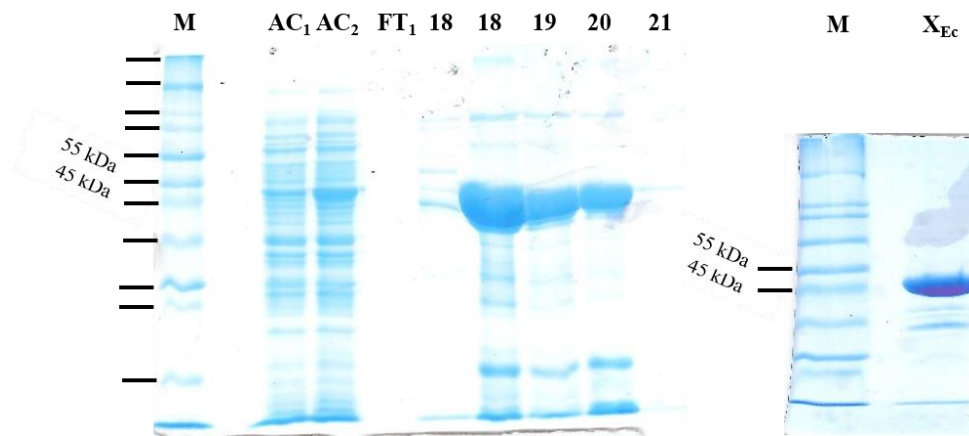


A primeira etapa de purificação consiste de uma troca aniônica. Esta processou-se em concordância com o ensaio de purificação em pequena escala realizado em tubos. As frações tiveram suas atividades xilanolíticas medidas, a região com atividade detectada encontra-se em destaque no cromatograma (tubos 5 a 12) e o nível de pureza destas frações foram analisadas em gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 12% (**Figura 3.A**). As frações da primeira etapa foram dialisadas e utilizadas na etapa de purificação por troca catiônica, a qual encontra-se representada na **Figura 3.B**. Nesta, contaminantes foram eluídos durante a injeção de proteína e lavagem da coluna. Em etapa posterior, mediante ao gradiente salino, XynA_Pp foi eluída com elevado nível de pureza, em comparação com AC (antes da coluna) e utilizada em etapa posterior de caracterização bioquímica da enzima. A concentração de proteína total quantificada pelo método de Lowry foi de $44,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após duas etapas de purificação.

c) XynA_Ec

O extrato enzimático de XynA_Ec foi primeiramente purificado por afinidade e alíquotas com atividade detectada foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% para verificação do nível de pureza (**Figura 4**). Devido à presença de contaminações, as frações foram dialisadas e aplicadas em segunda etapa de purificação, a qual processou-se em coluna Sephacryl S-200. Frações com atividade xilanolítica foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% (**Figura 4**).

Figura 4 – Purificação de XynA_Ec após etapa de afinidade (gel da esquerda) e gel filtração (gel da direita). M: Marcador de massa molecular (Sigma S8445) – 205, 116, 97,4, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20,1, 14,2, 6,5 kDa. FT: flow throw, 18-21: frações eluídas durante o gradiente. XEc: xil_Ec após gel filtração e concentração em tubos vivaspin.

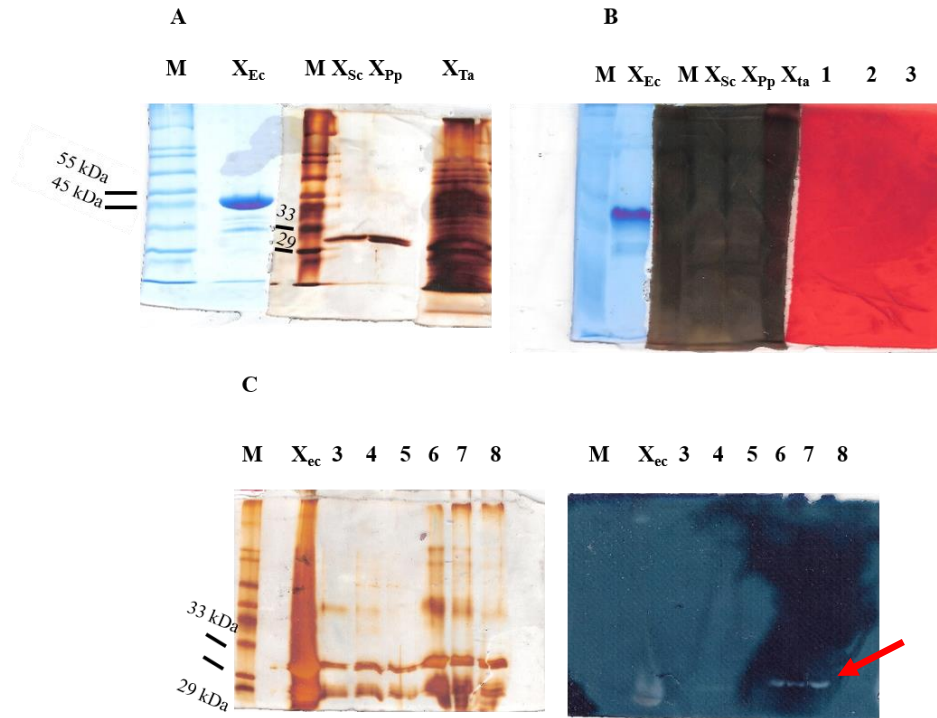


Mesmo após etapa de gel filtração é perceptível bandas de reduzida massa molecular, o que possivelmente pode ser devido a ação proteolítica de enzimas em solução. A concentração de proteína total aqui quantificada por $\text{abs}_{280 \text{ nm}}$, após duas etapas de purificação, foi de aproximadamente $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

3.4. Zimograma para xilanases recombinantes

Alíquotas das proteínas puras de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp foram analisadas em zimograma para xilanase, juntamente com alíquota cedida do extrato enzimático do fungo *T. auranticus* obtido por cultivo em fermentação sólida. Gel espelho foi feito com as mesmas amostras e coradas pelo método de prata (XynA_Sc e XynA_Pp) e EZBlue (XynA_Ec). As amostras sem ferver não tiveram suas atividades xilanolíticas reveladas em zimograma.

Figura 5 – A análise de SDS-PAGE 12% de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp recombinantes purificadas. M: Marcador de massa molecular (Sigma S8445) – 205, 116, 97,4, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20,1, 14,2, 6,5 kDa. XEc/1: xilanase em *E. coli*. XSc/2: xilanase em *S. cerevisiae*. XPp/3: xilanase em *P. pastoris*. XTa: xilanase homóloga de *T. aurantiacus*. (A) Gel SDS-PAGE revelado por EZBlue e coloração com prata. (B) Gel SDS-PAGE com xilana 1%. (C) Zimograma para XynA_Tau.



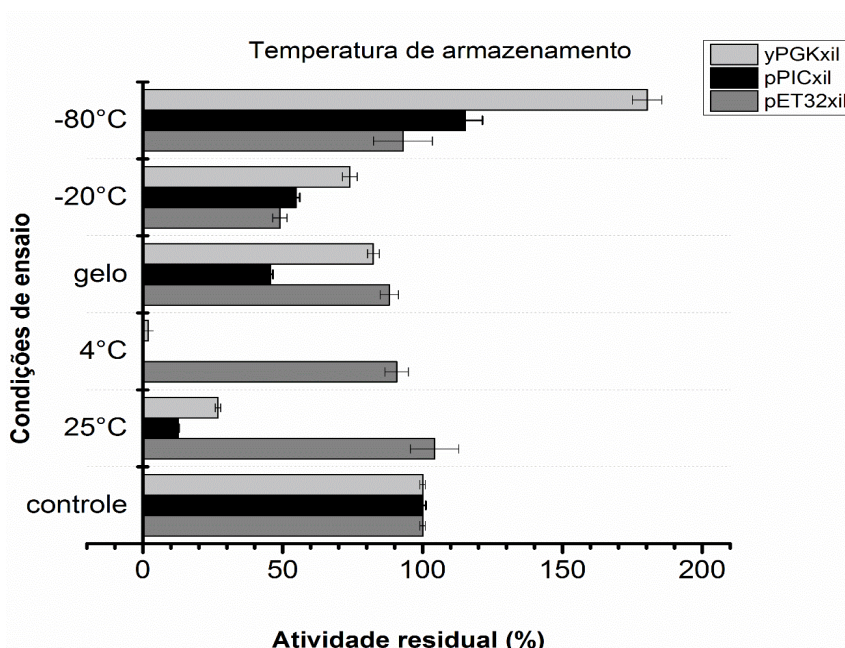
Na **Figura 5.A** tem-se em um mesmo gel (corte) as 3 construções de estudo e de XynA_Tau cedida por outra integrante do grupo de pesquisa para análise comparativa. Neste é perceptivo que as massas moleculares das amostras de Xya_Sc, XynA_Pp e XynA_Tau são aparentemente próximas. A maior diferença é notada pela construção de XynA_Ec com massa molecular consideravelmente maior devido a presença da cauda de histidina fusionada nas extremidades. No entanto, a diferença no conteúdo de regiões hiperglicosiladas das construções será de fato conclusiva apenas após desglicosilação com a endo- β -N-acetilglucosaminidase H (Endo H) como realizado por ZHAO et al., 2013. O gel da Figura 5.B foi feito com xilana 1% para coloração de zimograma (lado vermelho) e para espelho (parte azul e chumbo). As bandas neste gel estão turvas devido a presença de xilana no meio em solução do gel. Não foi possível verificar neste os halos de atividade xilanolítica. Os diferenciais deste gel é que as amostras para a parte vermelha do gel (B) não foram fervidas e também não foi adicionado SDS no gel e tampão de corrida, tão pouco β -mercaptoetanol no tampão de amostra.

Este gel foi repetido apenas para XynA_Tau (**Figura 5.C**), porém na presença dos agentes SDS, tanto em gel como no tampão de corrida, β -mercaptoetanol no tampão de amostra e com fervura das amostras. O resultado foi surpreendentemente positivo. Para este um halo de atividade xilanólítica foi observado. Isto sugere que ou o efeito de ativação da enzima por SDS e β -mercaptoetanol (3.4.3) também é observado em meio sólido (gel) e ou este seria um indicativo de que a enzima necessita de fervura para sua ativação. Este efeito foi reportado para endo-xilanases em SHEN et al. (2012), devido ação das inteínas.

3.5. Determinação de fatores bioquímicos das xilanases recombinantes

Dos fatores relacionados a atividade xilanólítica tem-se que o tempo ótimo de reação para atividade xilanólítica para ambas construções foi de 5 min, concentração de tampão acetato de sódio 25 mM em solução de xilana 1%, pH 5. Todas as frações apresentaram maior especificidade ao substrato comercial de xilana Beechwood, seguida de menor atividade para xilana oat spelt (dado não mostrado). Para os substratos celulolíticos CMC e avicel nenhuma atividade foi detectada, assim como verificado por KOCABAG; GUDER; OZBEN (2015). No teste de armazenamento das frações purificadas foi possível perceber diferenças quanto à estabilidade das três construções (**Figura 6**).

Figura 6 – Condições de armazenamento das xilanases recombinantes após 24 h de incubação.

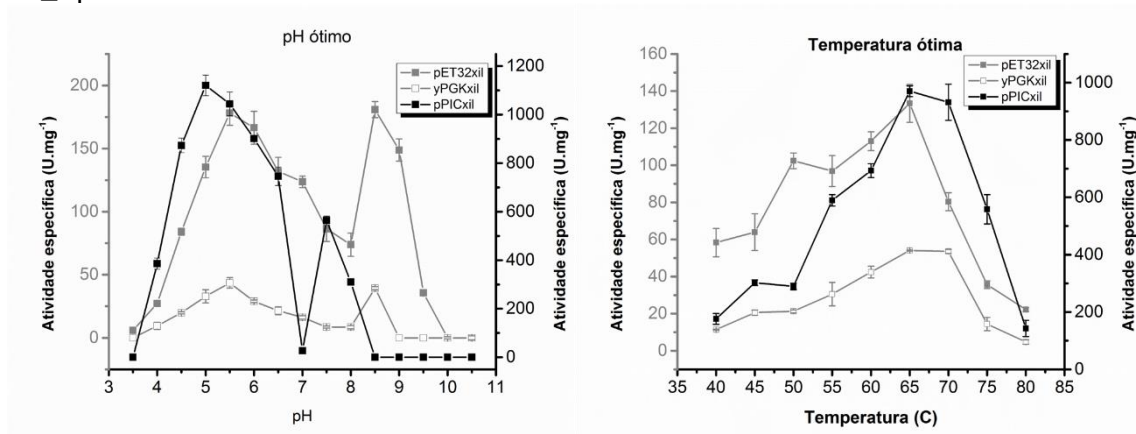


Das três construções a mais estável nas condições de armazenamento testadas foi XynA_Ec, com aproximadamente 90 % de atividade residual obtido, seguido de XynA_Sc e XynA_Pp. Dado interessante observado foi na temperatura de refrigeração de geladeira, XynA_Sc e XynA_Pp mostraram atividades residuais mínima e ou nula. XynA_Ec e XynA_Pp foram ativadas quando armazenadas em freezer -80 °C.

3.5.1. pH e temperatura ótimo e de estabilidade

O perfil de pH ótimo e temperatura ótimos foram observadas diferenças nos perfil dos gráficos (**Figura 7**).

Figura 7 – Efeito do pH e da temperatura na atividade xilanólítica de XynA_Ec, XynA_Sc e XynA_Pp.



O dado de pH ótimo mostrou dois ótimos: um em pH 5 para XynA_Pp com 1150 U.mg⁻¹ de atividade e 5,5 para as construções de XynA_Ec e XynA_Sc, com valores de 182 e 49 U.mg⁻¹, de atividade, respectivamente; e outro em pH básico com ótimo em pH 7,5 para XynA_Pp com aproximadaement 600 U.mg⁻¹ de atividade, e pH 8,5 para XynA_Sc e XynA_Ec, com 49 e 182 U.mg⁻¹. Acredita-se que esta influência seja em decorrência do tampão utilizado.

Com relação ao perfil de temperatura ótimo obtidos foi possível verificar que ambas as construções apresentaram um ótimo de 65 °C, com destaque para XynA_Sc que mostrou o mesmo ótimo em 70 °C. Portanto em relação a valores de pH e Temperatura ótimos obtidos existem poucas ou mínimas diferenças entre as construções. De fato, o que é perceptível é uma diferença com relação a valores de atividade específica, com destaque para XynA_Pp, que apesar de sua reduzida

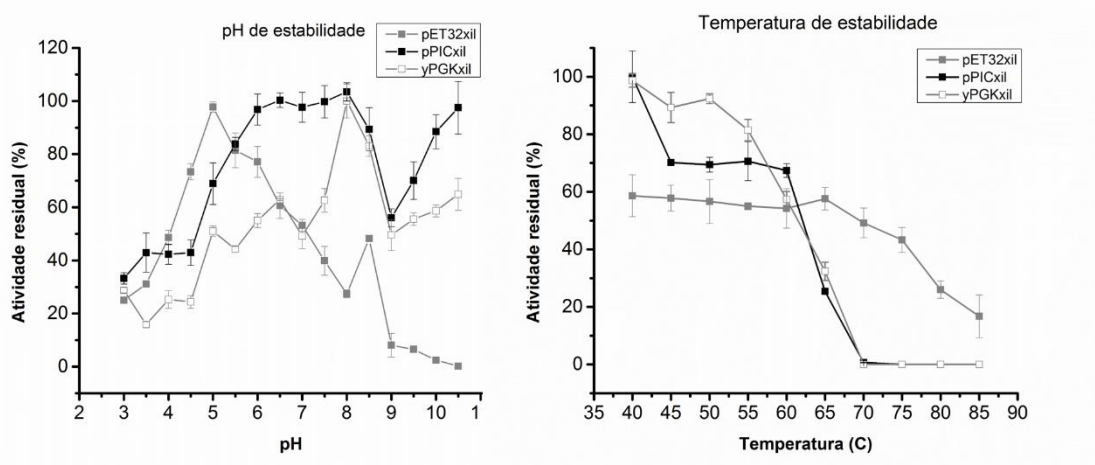
concentração obtida após purificação mostrou um elevado poder de ação catalítica da enzima. WANG et al. (2013) obteve valores de temperatura ótimo na faixa de 60 a 65 °C para linhagens de endoxilanasas de *Geobacillus stearothermophilus* obtida por evolução dirigida e desenho racional. Portanto, as construções tratadas aqui apresentam padrões de temperatura e pH bastante interessantes do ponto de vista de aplicação de endoxilanasas nativas. Por outro lado, estes dados são inferiores aos dados obtidos pela enzima nativa (XynA_Tau) como relatado por TAN; MAYERS; SADDLER (1987), que apresentou ótimo a 80 °C.

ZHAO et al (2013) em estudo conduzido com xilanase recombinantes fúngica termotolerante, expressa em cepa de *P. pastoris* destacou que a enzima exibiu pH ótimo igual a 5,0 em temperatura superior, 75 °C, com dados apresentados em atividade residual (%), não sendo possível aferir sobre o poder catalítico da enzima. PARACHIN et al. (2012) obteve valor ótimo para atividade catalítica de uma xilanase fúngica recombinante clonada e expressa em *S. cerevisiae* em pH 3 e temperatura ótima de 50 °C. De acordo com WANG et al. (2013), uma xilanase fúngica expressa em *E. coli* BL21 apresentou valores ótimos de pH e temperatura igual a 5 e 50 °C, respectivamente.

3.5.2. pH e temperatura de estabilidade

O perfil de pH e temperatura de estabilidade foram observados na **Figura 8**, abaixo.

Figura 8 – Estabilidade de pH e temperatura sobre XynA_Ec, XynA_Pp e XynA_Sc.



Com relação ao dado de estabilidade foi perceptível perfil bastante distintos entre as construções estudadas. XynA_Pp mostrou-se totalmente estável na região de pH 6 a 8, por outro lado, XynA_Ec apresentou 100% de estabilidade apenas em pH 5, na região próxima ao seu pH ótimo, sendo o perfil de estabilidade decrescentes tanto para regiões ácidas como para regiões básicas. XynA_Sc de modo geral apresentou reduzida estabilidade, com valores percentuais inferiores a 60 % para quase todos os pH investigados. Um efeito de ativação foi observado próximo a região do seu segundo pH ótimo, região mais básica. Este efeito pode ser observado nitidamente para XynA_Ec e XynA_Sc.

De modo geral, xilanases estão divididas em dois grandes grupos: xilanases alcalinas e ácidas, de acordo com seu pH ótimo e de estabilidade. Dentre as xilanases estudadas (POLIZELI et al., 2005), o grupo das alcalinas são mais comumente observados e melhor caracterizados (BAJPAI; ANAND; BAJPAI, 2006) devido seu poder de atuação em processos que são realizados em pH básicos, tal como observado em indústrias de papel e celulose. Xilanases ácidas são pouco descritas e caracterizam-se por enzimas potenciais para o melhoramento do processo de conversão da biomassa lignocelulósica em que hidrólise ácida é requerida, por exemplo, durante a produção de bioetanol com sacarificação simultâneas a fermentação (LINDE; GALBE; ZACCHI, 2007). Portanto, de acordo com os conteúdos aqui apresentados, dentre as xilanases estudadas XynA_Ec e XynA_Pp são do ponto de vista industrial as mais interessantes, pois mostraram-se totalmente estáveis em pH 5 e em na faixa de pH 6-8, respectivamente, destacando-se como enzimas potenciais em bioprocessos ácidos e básicos, respectivamente.

Por outro lado, os dados de estabilidade térmica apresentados acima mostraram que dentre as construções analisadas, XynA_Ec mostrou-se mais estável em maior faixa de temperatura (40-85 °C) com atividade residual de 60 % a 24 %, do que quando comparada com as outras construções, que perderam totalmente sua atividade após incubação a partir de 70 °C. Estudo conduzido com linhagens mutantes de endo-xilanases de *Geobacillus stearothermophilus* realizado por WANG et al. (2013) mostraram que as construções apresentaram perda quase que total de atividade a 70 °C após 1 h de incubação. No entanto, comparando-se estas três construções aqui investigadas com sua nativa, que mostrou-se totalmente estável após 8 h a 70 °C (KHANDKE; VITHAYTHIL; MURTHY, 1989), é possível destacar que considerando-se estes dados, as construções aqui investigadas apresentaram

Para melhor compreensão dos dados da tabela os efeitos de ativação aqui relatados foram destacados de azul. Neste sentido, os principais efeitos de ativação das xilanases estudadas foram observados para os componentes não metálicos, tais como β -mercaptoetanol, Triton X-100 e Tween 20, que ativaram fortemente as três linhagens de enzimas estudadas. Destaque para XynA_Sc que exibiu o maior efeito de ativação aqui observado na presença de 5 mM de β -mercaptoetanol com valores percentuais de 270,52% de ativação. Este fato foi também observado por ZHAO et al. (2013) e estudos sugerem que a razão para isto é devido a neutralização dos efeitos da oxidação da ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína (HECK et al., 2006). Diferentemente, β -mercaptoetanol ativou XynA_Ec apenas em maior concentração. Estes dados de super ativação para XynA_Sc, aliada a baixa taxa de produção e aprisionamento da proteína no espaço periplasmático pode ser um indicativo de elevada modificação pós-traducional em cepa de *S. cerevisiae*. DMSO ativou XynA_Ec em ambas concentrações analisadas e XynA_Sc apenas em menor concentração. SDS ativou fortemente as duas linhagens investigadas, apenas em menor concentração. XynA_Sc exibiu valores surpreendentes de 109% de ativação, destacando-se como segundo maior efeito aqui observado. De fato, este efeito de ativação por SDS é não é muito usual, pois de modo geral estudos sugerem um efeito contrário, de inibição. Este fato foi observado para xilanases produzidas por *A. versicolor* (CARMONA et al., 2005) and *Termitomyces sp.* (YANG et al., 2010). O efeito de ativação por componentes não metálicos é de fato um diferencial para aplicação de enzimas em bioprocessos que muitas vezes são realizados na presença de vários aditivos.

Por outro lado, o efeito de ativação devido a presença de íons metálicos em solução enzimática foi menos pronunciado. Para estes, o íon Mn^{2+} e Fe^{3+} apresentou um suave efeito de ativação, quando em menor concentração, para as construções em XynA_Ec e XynA_Pp. Íons K^+ exibiu um aumento na atividade residual em 13,1 % e 51,14 % nas concentrações de 1 mM e 5 mM para XynA_Sc. Por outro lado, XynA_Pp foi ativada por íon Ca^{2+} apenas a 5 mM. Uma tendência geral tem sido reportada por destacar que os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (ZHOU et al., 2009; YANG et al., 2008) exercem efeito de ativação, isto porque esses íons ajudam a estabilizar o complexo Enzima-Substrato, o que pode contribuir para o efeito de aumento na atividade enzimática (JUTURU; WU, 2012).

Uma forte inibição foi observada pelo quelante EDTA para todas as enzimas estudadas, com destaque para XynA_Pp com inibição total e XynA_Sc inibição parcial a 1 mM EDTA e total com 5 mM de EDTA. Efeito menos drástico foi obtido para XynA_Ec com inibição parcial para ambas concentrações. O efeito de redução na atividade pelo EDTA foi relatado anteriormente por YAN et al. (2009) em xilanase de *Streptomyces matensis*. EDTA é utilizado para remoção de metais em solução, portanto a redução da atividade de ambas linhagens sugere que a XynA_Sc e XynA_Pp requerem metal para desempenhar sua atividade (MANDER et al., 2014, SHAH; MADAMWAR, 2005).

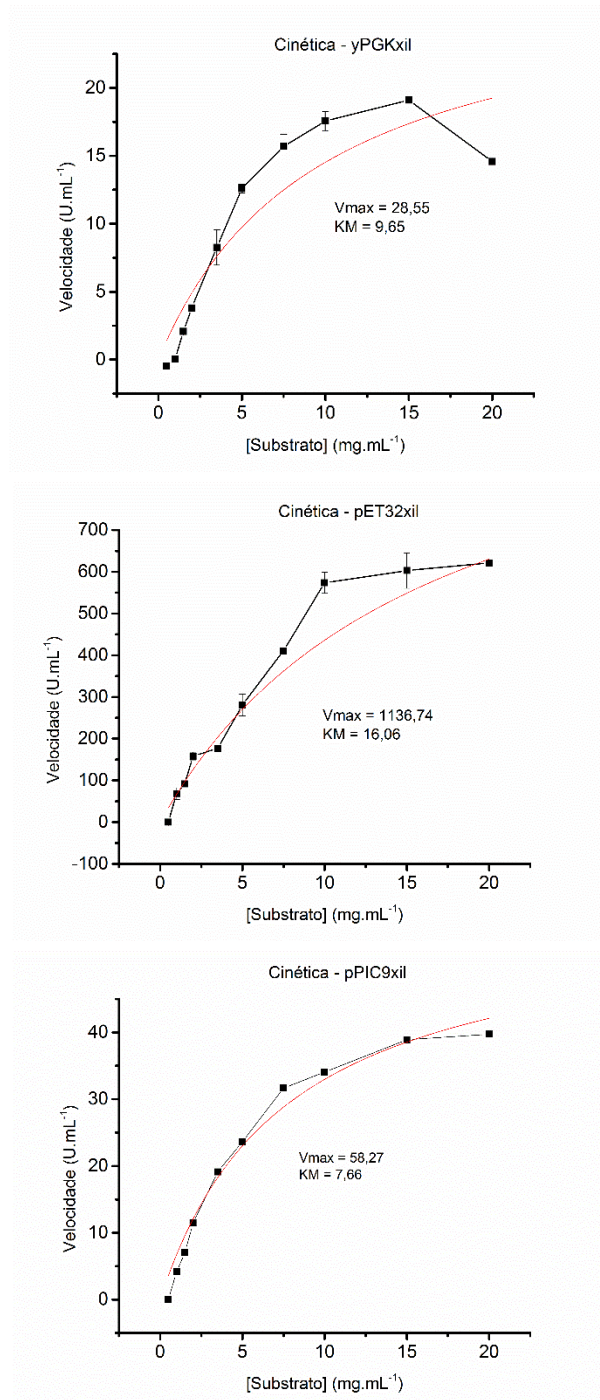
Os outros íons tiveram no geral efeito de inibição em ambas concentrações estudadas. Dentre estes as maiores inibições pronunciadas foram na presença de Hg^{2+} , com forte efeito sob XynA_Ec e XynA_Pp e Ag^+ com inibição total apenas em XynA_Sc a 5 mM. Inibições fortemente pronunciadas devido à presença destes metais foram também observadas por CHAPLA et al. (2013) no estudo de uma endoxilanase de *Aspergillus foetidus* MTCC 489.

3.5.4. Cinética enzimática

Na faixa de concentração de substrato investigada de 0,5 a 20 mg.mL⁻¹, as construções de xilanasas foram compatíveis com o perfil de cinética de Michaelis-Menten (**Figura 9**).

Efeito de inibição pelo substrato foi observado em XynA_Sc em a 20 mg.mL⁻¹. O mesmo não foi observado para as outras enzimas recombinantes estudadas. Para estas curvas os valores de K_m e V_{max} obtidos foram de 9,65, 16,06 e 7,66 mg de xilana.mL⁻¹ e 28,55, 1136,74 e 58,27 U.mL⁻¹, para XynA_Sc, XynA_Ec e XynA_Pp, respectivamente. De modo geral, xilanasas fúngicas apresentam K_m na faixa de 0,5-12,5 mg.mL⁻¹ (TEUNISSEN et a., 1993; CHEN; CHEN; LIN, 1997), pois as enzimas apresentam diferentes afinidades pelo substrato de xilana. Neste sentido, considerando-se que quanto menor o valor da constante K_m , maior a afinidade pelo substrato, estas construções apresentaram diferentes valores de K_m , indicando diferentes níveis de afinidade pelas linhagens estudadas ao substrato comercial xilana beechwood.

Figura 9 – Gráficos de Michaelis-Menten das xilanas variando-se a concentração de xilana beechwood ($0,5 - 20 \text{ mg.mL}^{-1}$) em ensaio de atividade xilanolítica realizado a 65°C pH 5-5,5, durante 5 min de reação para XynA_Sc, XynA_Ec e XynA_Pp.



4. CONCLUSÕES

A endo-1,4- β -xylanase de *Thermoascus aurantiacus* clonada e expressa em três organismos distintos, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* mostrou perfis de expressão e bioquímicos totalmente diferentes. A menor taxa de expressão na fração solúvel foi obtida por XynA_Sc, a qual foi observada maior conteúdo proteico na fração intracelular, possivelmente devido ao efeito de forte modificação pós-traducional, como formação de ligações dissulfeto não nativas que podem prejudicar não somente o processo de transporte para o meio extracelular, como suas características bioquímicas. Este fato foi comprovado pelo forte efeito de ativação quando na presença de β -mercaptoetanol, com valores surpreendentemente elevados, ativação em 270,52% com 0,25% do agente químico, que ocorreu devido a neutralização dos efeitos da oxidação da ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína. Esta forte ação ativadora foi observada também em *Pichia pastoris*, porém em valores percentuais bastante inferiores, com 61,35% de ativação com 0,25% de substância em solução. Portanto, diante destes fatores, *S. cerevisiae* mostrou-se como pior hospedeiro para produção heteróloga de XynA_Tau. *P. pastoris* e *E. coli* mostraram-se como bons organismos para expressão heteróloga de XynA_Tau, com elevada taxa de expressão nas condições ótimas estabelecidas. XynA_Pp destacou-se pela sua considerável estabilidade na faixa de pH neutro ao básico (pH 6-8), caracterizando-se como uma enzima promissora para aplicação em bioprocessos básicos. Por outro lado, XynA_Ec destacou-se pela sua estabilidade em pH 5, ácido, e maior resistência a ampla faixa de temperatura (40 a 85 °C), o que a faz uma enzima atrativa não apenas para atuar como enzima auxiliar no processo de deslignificação da biomassa por hidrólise ácida, como também em bioprocessos que ocorram em temperaturas elevadas.

5. REFERÊNCIAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, 100, p. 991–995, 2009.

AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 19–35, ago. 2009.

BAILEY, M.J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257–270, 1992.

BAJPAI, P.; ANAND, A.; BAJPAI, P.K. *Biotechnology Annual Review*, v. 12, p. 349–378, 2006.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 2001.

BEGUIN, P. Detection of cellulose activity in polyacrylamide gels using congo re-stained agar replicas. **Analytical Biochemistry**, v. 131, p. 333-336, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.

BRANDÃO, G. Expressão heteróloga do cDNA da Celobiohidrolase (cbhl. 1) do fungo *Phanerochaete crhysosporium* em *Saccharomyces cerevisiae*. 1996.

BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. A. G. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Nature Biotechnology**, 9, p. 1067–1072, 1991.

CARMONA, E. C. et al. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Processes Biochemistry**, v. 40, p. 359–364, 2005.

CHAPLA, D. et al. Characterization of purified fungal endoxylanase and its application for production of value added food ingredient from agroresidues. **Food Bioproducts Processing**, n. 91, p. 682-692, 2013.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, n. 115, p. 215–221, 2012.

CHAPLIN, M.; BUCKE, C. **Cambridge University Press**, p. 40–45, 1990. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/>.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413–433, 2006.

CHEN, C.; CHEN, J. L; LIN, T. Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. *Enzyme Microbiology and Technology*, n. 21 p. 91–96, 1997.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.

COS, O. et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 1, p. 17, 6 jan. 2006.

DA SILVA, R. et al. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235–24, 2005.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, jan. 2009.

DUTTA, T. et al. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p.275–282, 2008.

FERREIRA, V. Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração. Tese (**Doutorado em Ciências**) apresentado ao programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

FRANCO, F. Clonagem e expressão heteróloga do gene de uma xilanase de *Thermoascus aurantiacus* em *Pichia pastoris*. Tese (**Mestrado em Microbiologia**) apresentado ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada – Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto, 2011.

GÖRGENS, J. F. et al. Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. **Yeast**, v. 21, p.1205–1217, 2004.

GÖRGENS, J. F.; van Zyl, W. H.; Knoetze, J. H; Hahn-Hägerdal, B. Amino acid supplementation improves heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. , p. 684–691, 2005.

HECK, J. X. et al. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-statecultivation. *Bioresource and Technology*, v. 97, p. 1902–1906, 2006.

HUNG, K.-S. et al. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1257–1263, jun. 2011.

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

KHANDKE, K. M., VITHAYTHIL, P. J.; MURTHY, S. K. Purification of xylanase, b glucosidase, endocellulase and exo cellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 274, p. 491-500, 1989.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389–407, 3 out. 2009.

KOCABAG, D. S.; GUDER, S.; OZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66-75, 2015.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEJEUNE, A. et al. Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 L-lactamase. **Chemistry & Biology**, v. 8, p. 831-842, 2001.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 40, n. 5, p. 1100-1107, 2007.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1951.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 1 set. 2002.

MANDER, P. et al. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS623 using an agro residue substrate. **Process Biochemistry**, n. 49, p. 451-456, 2014.

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

OSTERGAARD, S.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 60, n. 1, p. 34-50, 2000.

PARACHIN, N. S. et al. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 52–57, jul. 2009.

POLIZELI, M. L. et al. Amorim, D. S. 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.

SAMANTA A. K. et al. Production and in vivo evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 466-474, 2012.

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.

SHEN, B. et al. Engineering a thermoregulated intein-modified xylanase into maize for consolidated lignocellulosic biomass processing. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 11, 2012.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**; 33, p. 689-692, 1987.

TANAKA, H.; et al. Acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans*: efficient expression and secretion in *Pichia pastoris* and mutational analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 338–343, 2004.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–22, set. 2006.

TEUNISSEN, M. J. et al. Purification and characterization of a complex bound and a free β -1,4-endoxylanase from the culture fluid of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Archives of Microbiology*, n. 159, p. 265–271, 1993.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotechnol Cien Desenv**, n. 2, p. 20–22, 2000.

WANG, T. et al. Improving catalytic efficiency of endo- β -1, 4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* by directed evolution and H179 saturation mutagenesis. **Journal of Biotechnology**, v. 168, p. 341– 347, 2013.

YAN Q. et al. Properties of xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 58, p. 78-77, 2009.

YANG, Y. et al. Afr. Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 21, p. 2249–2256, 2010.

YANG, Y. et al. Cloning, sequencing and expression of a novel xylanase cDNA from a newly isolated *Aspergillus awamori* in *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4251-4259, 2008.

ZHAO, L. et al. A novel thermophilic xylanase from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing and other industries. **Process Biochemistry**, v. 48 p. 1879–1885, 2013.

ZHOU, C. et al. Heterologous expression of xylanase II from *Aspergillus ussuriensis* in *Pichia pastoris*. **Food Technol biotechnology**, v. 1, p. 90-95, 2009.

CAPÍTULO 2

**Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from
Thermoascus aurantiacus CBMAI 756**

(Dados publicados na *International Journal of Biological Macromolecules*)

Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756

Angelica R. de Souza^a, Gabriela C. de Araújo^b, Letícia M. Zanphorlin^c, Roberto Ruller^c, Jeffrey A. Mertens^d, Michael J. Bowman^d, Eleni Gomes^a, Roberto da Silva^{a*}

^aUNESP (São Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho, Biochemistry and Applied Microbiology Laboratory, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, BR)

^bUNESP (São Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho, Department of Molecular Biophysics, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, BR)

^cCTBE (Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory at National Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, 13083-100, BR)

^dBioenergy Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, USDA – ARS, 1815 N. University St, Peoria, IL 61604, USA)

*Corresponding author: dasilva@ibilce.unesp.br, +55-17-3221-2354.

ABSTRACT

The GH10 endo-xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 (XynA) is industrially attractive due to its considerable thermostability and high specific activity. Considering the possibility of a further improvement in thermostability, eleven mutants were created in the present study via site-directed mutagenesis, using XynA as a template. XynA and its mutants were successfully overexpressed in *Escherichia coli* Rosetta-gami DE3 and purified, exhibiting maximum xylanolytic activity at pH 5 and 65 °C. At 70 and 75 °C, respectively, the three most thermostable mutants (Q158R, H209N and N257D) retained an average of 31-22 %, 46-41 % and 24-10 % higher activity than the wild type (WT). Q158R and N257D were stable in the pH range 5.0 – 10.0, while WT and H209N were alkali-thermostable (pH values 8, 9 and 10). CD analysis demonstrated that the WT and the three mutant enzymes were expressed in a folded form. H209N was the most thermostable mutant, showing a T_m of 71.3 °C. Molecular and dynamics modeling analyses suggest that the increase in H209N thermostability is attributed to a higher number of short helices and salt bridges, which displayed a positive charge in the catalytic core, stabilizing its tertiary structure.

Keywords: protein engineering, rational design, endo-xylanase, site-directed mutagenesis, thermostability.

1. INTRODUCTION

Hemicelluloses are the most abundant heteropolysaccharides in nature, representing about 20-35 % of the lignocellulosic biomass [1], depending on the type of plant. Of great industrial interest, xylan is the main constituent of hemicelluloses and the second most abundant cell wall polysaccharide. It is covalently attached to cellulose, and non-covalently to lignin and other cell wall components that are relevant to the cellular integrity [2,3]. It consists of a homopolymeric backbone of β -1,4-xylopyranose residues, including some branch points, such as α -1,3-arabinose and α -1,2-glucuronic residues [4], releasing xylooligosaccharide units after the hydrolysis catalyzed by the endo-1,4- β -xylanase (E.C. 3.2.1.8) [5].

In the last decade, increased attention has been devoted to endo-1,4- β -xylanases because of their wide range of industrial applications, either alone or in combination with other hemicellulases [6]. These enzymes have been applied in food and feed processing industries, biobleaching of kraft pulp [5,7,8] and at the biofuels industry, where they are employed in the conversion of the lignocellulosic biomass into fermentable compounds [7,9,10]. However, severe reaction conditions, such as extreme temperatures and pH, restrict the industrial applications of endo-xylanases [7,11,12]. In this sense, the improvement of thermostability and thermotolerance of several microbial enzymes (fungal and bacterial), directed evolution, has been reported in literature [12–17].

XynA, the wild-type GH10 endo-xylanase from *T. aurantiacus*, is very attractive for biotechnological applications due to its considerable thermostability and high specific activity [18,19]. It is emphasized that site-directed mutagenesis is a promising strategy for further improvement of enzymes by site-directed mutagenesis [18] in relation to its ability to withstand high temperatures.

Therefore, in the present study, the gene *xynA*, encoding a GH10 xylanase of *T. aurantiacus* CBMAI 756, was cloned and recombinantly overexpressed in *E. coli* for use as a platform for the construction of site-directed mutants. The mutants were subjected to biochemical and biophysical characterization and the three most promising enzymes based on thermostability were chosen for more in-depth studies.

The secondary structure of these proteins was obtained by molecular modeling and the structural features were determined by molecular dynamics, showing the effect of the change of amino acid residues on thermostability. These three mutants were observed to be good candidates for future molecular approaches using directed evolution, such as DNA shuffling or epPCR reactions, in order to construct other even more stable xylanases.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Cloning of the gene *xynA_TA*

The gene *xynA_TA* without signal peptide (909 bp) was amplified with Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) using the primer set pET-28axynA, with plasmid pPIC9xynA as template (Table 1). The forward and reverse primers added *Nco*I and *Not*I restriction sites, respectively, which allowed the ligation of the ORF into a pET-28a expression vector with a C-terminal His6-tag. Both primers were employed in 50 μ L amplification reactions, using 0.2 η g of DNA (pPIC9xynA) and a final concentration of 1 x Q5 buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μ mol. μ L⁻¹ each primer and 0.02 U. μ L⁻¹ of Q5® High-fidelity polymerase. Cycling conditions were performed following kit instructions: initial denaturation at 98 °C for 10 s: 30 cycles at 98 °C for 30 s, 60 °C for 30 seconds and 72 °C for 30 seconds; and final extension at 72 °C for 2 minutes. The amplicon was purified using MinElute PCR Purification kit (Qiagen), linearized and ligated into a pET28a using T4 Ligase (Promega). The biological material was propagated using chemically competent NEB 10-beta *E. coli* cells (New England BioLabs) and plated on LB-agar supplemented with kanamycin (50 μ g.mL⁻¹). After DNA sequencing, competent Rosetta-gami (DE3) cells (Novagen) were transformed with the recombinant plasmid pET-28a_xynA and used for heterologous expression.

2.2. Site-directed mutagenesis

Eleven site-directed mutations were constructed using the Q5® Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs) following the manufacturer's instructions, at a final concentration of 0.5 μ M of each oligonucleotide pair (Table 1) and 25 ng of pET-28a_xynA plasmid DNA as template. The annealing temperature was set at 54 °C. The

mutant constructs were transformed in NEB 5-alpha chemically competent *E. coli* cells and plated on LB agar supplemented with kanamycin ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The effective ligation of all mutant constructs was confirmed by DNA sequence analysis using the primers pET-28axynA (Table1) (Fig. S1).

For all mutations, a rational design was used, based on the three-dimensional structure deposited in PDB (1TUX). C255G was designed to explore the protein expression effect after the change of the unique Cys of the C255-C261 disulfide bond, which is conserved in the majority of the xylanases in family F/10 [20]. Other mutants were proposed to investigate the stability and improve the catalytic power of the xylanase from *T. aurantiacus*. The contribution of the amino acid position on the salt bridge, either buried (R124-Q232) or on the surface (R190-Q150), was investigated for the mutations R124A and R190A. Mutants H209N and H83N were designed to observe whether the His residues are related to the ionization effects of the catalytic Glu residues as reported by Natesh et al. [18]. Mutants L219D, N250D, N257D, Q259D, Q158R and Y181K were constructed to increase the number of acid and basic amino acid residues in XynA, which could contribute to create more salt bridge interactions [21] in its structure.

2.3. Heterologous expression, enzyme purification and quantification

Rosetta-gami (DE3) cells (Novagen) were individually transformed with plasmid constructs pET-28axynA (wild type and mutants Q158R, H209N and N257D) and grown at 37°C and 250 rpm in 50 mL of LB medium supplemented with kanamycin ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Protein expression was induced after 4 hours of growth by the addition of 0.4 mM isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The cells were collected by centrifugation (10 min at 10,000 $\times g$) and disrupted using BugBuster® 1X Protein Extraction Reagent (Novagen) in the presence of Lysonase ($10 \mu\text{L.g}^{-1}$ cells). Both soluble and insoluble fractions were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and enzymatic activity, as described below.

The wild-type (WT) and mutant enzymes were purified from the crude cell extract using a HisPrepFF 16/10 column (GE Healthcare Life Sciences) and an Akta Purifier FPLC system (GE Healthcare Life Sciences). Protein samples were concentrated (Amicon 10000 NMWL concentrators, Merck Millipore) and quantified (Varian Cary 50 Bio UV-Visible spectrophotometer, Agilent Technologies) at 280 nm,

considering a molar extinction coefficient of 57660 [22]. All steps of enzyme expression and purification were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis using (12 %) SDS polyacrylamide gels [23] with Broad Range molecular marker (200-6.5 kDa, Bio-Rad).

2.4. Biochemical, biophysical and structural properties of XynA (WT) and mutants

2.4.1. Effects of temperature and pH on xylanase activity and stability

Unless otherwise stated, the xylanolytic activity was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [24] in a micro-plate assay, as described by [25], in a 5-min reaction, using 1 % xylan from beechwood (Sigma) as substrate. One xylanase unit was defined as the amount of enzyme required to generate 1 μ mol of reducing sugar per min, using xylose as a standard product. A control reaction consisted of the addition of the enzyme after reaction incubation with DNS. All assays were performed in triplicate.

The optimal temperatures for enzymatic activity were tested in reactions performed in 50 mM sodium acetate buffer pH 5, over the temperature range from 40 to 80 °C. Thermostability was assessed by incubation of the enzyme for 1 hour at 70 °C and 75 °C. The residual activities were calculated as percentages of the initial activity without treatment (100 %) [26]. The optimal pH values and pH stability of the enzymes were determined by assays in a wide pH range, using 50 mM of four different buffer solutions (pH 3.0: glycine-HCl; pH 3.5-5: sodium acetate; pH 5.5-9: tris-aminomethane; and pH 9.5-10.5: glycine). Optimal pH was determined at 65 °C, while for the pH stability measurements, the enzymes were first incubated for 24 h without the substrate at room temperature, following assays at 65 °C in pH 5. The residual activities were compared to a control reaction, without treatment (100 %) [26].

2.4.2. Spectroscopic analyses

Circular Dichroism (CD) measurements were carried out in a Jasco-815 spectropolarimeter with a Peltier-type temperature control system. All experiments were analyzed using a protein concentration range of 2-3.5 μ M in 20 mM HEPES buffer, 50 mM NaCl, pH 7.4. Thermal unfolding experiments monitored by CD signal were performed with a melting rate of 1 °C/min at 220 nm. All CD profiles were normalized for molar residual ellipticity (MRE) and the temperature at the midpoint

transition (T_m) was obtained by fitting the CD data to a sigmoidal Boltzmann function using the software Origin 8.1.

2.4.3. Molecular modeling and Molecular dynamics simulation of XynA and its thermostable mutants in solution

The 3-D structures of XynA and its mutants (Q158R, H209N and N257D) were homology-modeled using the program MODELLER 9.9 [27] based on a known crystal structure of XynA (PDB code: 1TUX). They were subjected to Molecular Dynamics (MD) simulation processes for 50 ns at 338 K in water containing 100 mM NaCl and pH5.0, using the GROMACS molecular dynamics package (version 4.5.5) [28, 29]. GROMOS53A6 force field [30] and Single point charge (SPC) as water model [31] were used to construct the models of XynA and the mutants. The temperature was kept constant using V-rescale [32] thermostat with coupling constant $\tau = 0.1 \text{ ps}^{-1}$. Constant pressure was held at 1 atm by a Berendsen barostat [33] with coupling constant $\tau = 0.1 \text{ ps}^{-1}$. Integration of Newton's equation of motion was performed by the leapfrog algorithm with a time step of 2 fs. Long-range electrostatic interaction was treated using fast particle-mesh Ewald electrostatics (PME) [34]. A cutoff of 1.25 nm was implemented for the Lennard–Jones and the direct space part of the Ewald sum for Coulombic interactions. The Fourier space part of the Ewald splitting was computed using the particle-mesh Ewald method [34], with a grid length of 0.15 nm.

Thermostability was monitored by root mean square fluctuation (RMSF), analysis of the secondary structure (Procheck) [35], number of hydrogen bonds (tool `g_hbond`, GROMACS) and salt bridges (Pymol) [36]. The residual α -carbon flexibility and the number of hydrogen bonds were calculated by the tools `g_rmsf` and `g_hbond` from GROMACS, respectively. The evaluation of salt bridges formation was performed using the ESBRI interface [37].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Expression and Purification of XynA and the mutants

XynA and its mutants were successfully expressed as soluble proteins in Rosetta-gami (DE3) cells (Table 2), yielding highly purified bands (Fig. 2) of the expected molecular weight (~ 33 kDa), with minor variations due the amino acid

changes, as analyzed by a molecular mass prediction software (<http://www.expasy.org/proteomics>). The few additional protein bands present on the gel may be proteolytic fragments (lower faint bands) or an *E. coli* protein that has non-specifically bound to XynA (higher band). This is the first report of successful recombinant overexpression of mutant and WT XynA from *T. aurantiacus* using *E. coli*.

3.2. Biochemical properties of XynA and the mutants

As observed in Table 2, XynA (WT) presented the greatest activity at 65-75 °C and pH 5, while all mutants had the highest activity values at 65 °C and pH 4.5-5.0, except for R190A and N257D, which presented slightly different values (70 °C, pH 4.5-5.5). Thus, the following experiments were performed at 65°C and pH 5, as specific activity values for all the enzymes presented only negligible standard deviations in this assay condition.

The pH stability for XynA showed two interesting points: it presented a great stability in the basic area and reduced stability in the acidic zone, while the optimum pH was 5.0. These data suggest that the treatment for 24 h in basic pH exhibited a positive effect, increasing the activity. In the acidic area, the enzyme worked with about 40 % of its stability. Although the optimum pH is around 5, the long incubation time may have caused a destabilizing effect on the tertiary structure, leading to a loss of catalytic activity. Interestingly, Q158R and N257D exhibited higher pH stability profiles than all other mutants, with enzymatic activity remaining constant in the whole pH range investigated (Fig. 1). These data suggest that the mutations on the surface by charged amino acids increased the stability of the whole structure, favoring intramolecular interactions. On the other hand, mutant H209N had a reduced stability compared to the WT, probably because the His residue at position 209 may have an important role on the catalytic site, acting as the ionization effect upon the Glu residues in the catalytic core of the enzyme, such as described by [18]. Therefore, the substitution by an Asn provoked a loss on enzymatic activity (Fig.1).

In thermostability assays, the three best mutants, Q158R, H209N, and N257D, presented a significantly higher residual activity than XynA (Table 3), 1.8 to 2.5 fold higher at 70 °C and 2.6 to 8 fold at 75 °C, thus confirming the success of the site-directed mutagenesis assays and the great potential for use of these three mutant enzymes in future experiments involving thermostability. All other mutants were less

stable than the three selected mutant enzymes (data not shown). In all temperatures, the least activity was observed for N257D and the greatest for H209N. Khandke et al. [20] reported that XynA isolated from *T. aurantiacus* showed full activity after 8 hours at 70 °C. However, this level of stability was not observed in our assays when the enzyme was incubated without substrate. It is unclear from the original work whether the native enzyme was incubated in the presence of substrate, which would provide a stabilizing effect on the enzyme [38], contributing to an increase in its thermostability.

3.3. Spectroscopic analyses

CD spectra analyses (Fig. 2) revealed that XynA and the mutant constructs were purified in a folded conformation, with a negative minimum at 220 nm, suggesting a predominantly α -helix structure for all the proteins. Interestingly, mutants N257D and Q158R had a smaller CD signal at 220 nm than the other two enzymes, especially in the case of Q158R, which might indicate that the enzyme was losing its folded structure. H209N was the most thermostable of the mutants, making it the most successful mutant constructed in this study in terms of thermostability.

To understand how the mutations (Q158R, H209N and N257D) affected the thermostability of the recombinant endo-xylanase (GH10 XynA), these purified constructs were heated to 90 °C and monitored by CD signal at 220 nm. MRE (Mean residue ellipticity) data of each construct were obtained as a function of temperature (Table 3), revealing T_m (melting temperature) values of 70.4 to 71.3 °C, which confirms them to be thermophilic enzymes. More interestingly, XynA (WT) (T_m 70.9 °C) was observed to be more thermostable than most of the other xylanases described in literature [39]. For instance, the GH11 xylanase from *Thermomyces lanuginosus* has a T_m of 66 °C [40], while the GH10 xylanase from *Trichoderma reesei* has a T_m of 62 °C [41]. Furthermore, although the differences among the mutants were small, mutant H209N was slightly more thermostable than XynA and the other constructs, presenting a T_m of 71.3 °C (Table 3).

3.4. Molecular modeling and Molecular dynamics simulation

As observed in the molecular dynamics simulation using MODELLER at 338K (Fig. 3), the secondary structures of all mutants were very similar to that observed for XynA, conserving the $(\alpha/\beta)_8$ TIM-barrel fold structure.

RMSF is a measure of the displacement of a particular atom, or group of atoms, relative to the reference structure. In this study, flexible residues were defined as the residues showing the highest α -carbon flexibility among all the residues in a protein, thus presenting higher RMSF values. Rigid residues were defined as the residues showing the lowest flexibility (lower RMSF values). RMSF results showed the mutants have some high fluctuations in the N-terminal and C-terminal regions, more specifically between β_2 - β_3 and between β_3 - β_4 . However, mutants Q158R, H209N and N257D did not change the RMSF profile in these positions nor the fluctuation of the eight sheets that compose the protein core (Fig. S2). Studies suggest that the protein core is the main determinant of protein stability and activity [42, 43]. For instance, even though the mutation in H209N is close to the protein core (Fig. 3), the stability of core was conserved, therefore xylanase activity was maintained.

Natesh et al. [18] showed that the substrate-binding active site of four xylanase structures from family F/10 occurred in negatively-charged regions. However, XynA and the mutants presented positive and negative charges in the surface of the substrate-binding active site (Fig. S3), with significantly more positive charges in H209N than in the other models. As the highest specific activity ($\sim 1850 \text{ U.mg}^{-1}$) was observed in this mutant, these data may suggest an influence of the charges in the substrate-binding active site on xylanolytic activity, with specific activity increased for the models with a high number of positive charges at the binding active site. In this sense, XynA (1290 U.mg^{-1}) and Q158R (765 U.mg^{-1}) exhibited a similar distribution of charges with buried negative charges, while N257D, which presented the lowest specific activity measured (550 U.mg^{-1}), displayed negative charges more exposed to the surface than the other enzymes.

3.5. Influence of other structural features upon XynA thermostability

As described above, eleven mutants were obtained for this study and revealed interesting characteristics in relation to the changes in the stability profile and the catalytic performance of XynA_TA.

The change of the first cysteine in the C255-C261 disulfide bond, which is conserved in the majority of the F/10 family xylanases [20], by a Gly residue, resulted in reduced activity and thermal tolerance, with almost complete denaturation after 1 hour at 60 °C, confirming that this interaction is crucial for proper protein folding, stability, and activity [44]. Not all three His residues exercise a significant role in enzymatic activity at high temperatures - only H209N, which presented the highest thermostability values in this study (Table 3). The higher number of weak interactions and structural artifacts (short helices and salt bridges) in relation to the native form of XynA might also be related to this increase in thermostability, as suggested by literature [45, 46, 47, 18, 21]. Furthermore, of the other six mutants which were developed with a higher number of acidic and basic amino acids than the native form, only N257D presented an increase in the number of salt bridges and short helices, while Q158R had the number of short helices increased, in both cases improving thermostability.

4. CONCLUSIONS

The endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* had its thermostability successfully improved by SDM. Based on rational design, eleven mutants were proposed, three of which (Q158R, H209N and N257D) exhibited the best performance in thermostability assays. The results of CD indicate that the enzymes were correctly folded. T_m values proved they are thermophilic enzymes, with the mutant H209N presenting the highest T_m . This mutant had an increase of four salt interactions and three short helices and presented a positive charge in the substrate binding active site region. MDS data added important information about the thermostability of the xylanase mutants and WT, revealing a positive correlation of thermostability to the content of positive charges in the enzymatic core. The best mutants generated, as well as XynA (WT), show high biotechnological potential and can be good candidates for

future approaches using directed evolution to obtain other mutants with even greater thermostability, as well as other interesting proprieties for industry.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was entirely funded by FAPESP, with the external scholarship abroad (2014-04272-8), and is related to the research project in Brazil (2011-22461-4). The authors would like to thank V.B.P. Leite's cluster (FAPESP grant 2011/17658-3) for the computational resources and CNPEM – LAM for the acquisition of the biophysical data.

6. REFERENCES

- [1] L. Viikari, A. Kantelinen, J. Buchert, J. Puls, Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41 (1994) 124–129. doi:10.1007/BF00166093.
- [2] M.P. Coughlan, G.P. Hazlewood, beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17 (Pt 3) (1993) 259–289.
- [3] H. Hori, A.D. Elbein, The biosynthesis of plant cell wall polysaccharides, in: T. Higuchi (Ed.), *Biosynth. Biodegrad. Wood Components*, Academic Press Inc., 1985: pp. 109–135.
- [4] C. Zhou, J. Bai, S. Deng, J. Wang, J. Zhu, M. Wu, et al., Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*., *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 831–8. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.035.
- [5] M.L.T.M. Polizeli, A.C.S. Rizzatti, R. Monti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge, D.S. Amorim, Xylanases from fungi: properties and industrial applications., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (2005) 577–91. doi:10.1007/s00253-005-1904-7.
- [6] H. Liu, J.H. Naismith, An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol., *BMC Biotechnol.* 8 (2008) 91. doi:10.1186/1472-6750-8-91.
- [7] Q.K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. Hoondal, Microbial xylanases and their industrial applications: A review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 326–338. doi:10.1007/s002530100704.
- [8] S. Wu, B. Liu, X. Zhang, Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 1210–6. doi:10.1007/s00253-006-0416-4.
- [9] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (1999) 411–456. doi:10.1016/S0168-6445(99)00006-6.
- [10] D.G. Olson, J.E. McBride, A.J. Shaw, L.R. Lynd, Recent progress in consolidated bioprocessing., *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2012) 396–405. doi:10.1016/j.copbio.2011.11.026.
- [11] R. Prade, Xylanases: from biology to biotechnology, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* (1996).

- <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/02648725.1996.10647925> (accessed March 20, 2016).
- [12] O. Turunen, K. Etuaho, F. Fenel, J. Vehmaanperä, X. Wu, J. Rouvinen, et al., A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the α -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermal stability through synergism, *J. Biotechnol.* 88 (2001) 37–46. doi:10.1016/S0168-1656(01)00253-X.
- [13] T. Beliën, I.J. Joye, J.A. Delcour, C.M. Courtin, Computational design-based molecular engineering of the glycosyl hydrolase family I B. subtilis XynA endoxylanase improves its acid stability, *Protein Eng. Des. Sel.* 22 (2009) 587–596. doi:10.1093/protein/gzp024.
- [14] J. Georis, F. de Lemos Esteves, J. Lamotte-Brasseur, V. Bougnet, B. Devreese, F. Giannotta, et al., An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study., *Protein Sci.* 9 (2000) 466–475. doi:10.1110/ps.9.3.466.
- [15] D.Z. Ayadi, A. Hmida Sayari, H. Ben Hlima, S. Ben Mabrouk, M. Mezghani, S. Bejar, Improvement of *Trichoderma reesei* xylanase II thermal stability by serine to threonine surface mutations., *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 163–70. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.014.
- [16] R. Ruller, L. Deliberto, T.L. Ferreira, R.J. Ward, Thermostable variants of the recombinant xylanase A from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution show reduced heat capacity changes., *Proteins.* 70 (2008) 1280–93. doi:10.1002/prot.21617.
- [17] R. Ruller, J. Alponi, L.A. Deliberto, L.M. Zanzorin, C.B. Machado, R.J. Ward, Concomitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant/thermophilic enzyme., *Protein Eng. Des. Sel.* 27 (2014) 255–62. doi:10.1093/protein/gzu027.
- [18] R. Natesh, P. Bhanumoorthy, P.J. Vithayathil, K. Sekar, S. Ramakumar, M.A. Viswamitra, Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*., *J. Mol. Biol.* 288 (1999) 999–1012. doi:10.1006/jmbi.1999.2727.
- [19] L.U.L. Tan, P. Mayers, J.N. Saddler, Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*, *Can. J. Microbiol.* (1987). <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m87-120#.Vu6u5OlrLcc> (accessed March 20, 2016).
- [20] K.M. Khandke, P.J. Vithayathil, S.K. Murthy, Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, *Arch. Biochem. Biophys.* 274 (1989) 491–500. doi:10.1016/0003-9861(89)90462-1.
- [21] M. Sadeghi, H. Naderi-Manesh, M. Zarrabi, B. Ranjbar, Effective factors in thermostability of thermophilic proteins., *Biophys. Chem.* 119 (2006) 256–70. doi:10.1016/j.bpc.2005.09.018
- [22] S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326. doi:10.1016/0003-2697(89)90602-7.
- [23] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685. doi:10.1038/227680a0.
- [24] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing

- Sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428. doi:10.1021/ac60147a030.
- [25] M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, *J. Biotechnol.* 23 (1992) 257–270. doi:10.1016/0168-1656(92)90074-J.
- [26] A. Bhalla, K.M. Bischoff, N. Uppugundla, V. Balan, R.K. Sani, Novel thermostable endo-xylanase cloned and expressed from bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1., *Bioresour. Technol.* 165 (2014) 314–8. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.112.
- [27] A. Šali, T.L. Blundell, Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779–815. doi:10.1006/jmbi.1993.1626.
- [28] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, a DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690. doi:10.1063/1.448118.
- [29] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, et al., GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit., *Bioinformatics.* 29 (2013) 845–54. doi:10.1093/bioinformatics/btt055.
- [30] C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren, A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6., *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1656–76. doi:10.1002/jcc.20090.
- [31] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, J. Herman, *Intermolecular Forces*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1981. doi:10.1007/978-94-015-7658-1.
- [32] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 1–7. doi:10.1063/1.2408420.
- [33] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Comput. Phys. Commun.* 91 (1995) 43–56. doi:10.1016/0010-4655(95)00042-E.
- [34] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J Chem Phys.* 103 (1995) 8577–8593. doi:10.1063/1.470117.
- [35] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291. doi:10.1107/S0021889892009944.
- [36] L. Schrödinger, *The PyMOL Molecular Graphics System*, (2010).
- [37] S. Costantini, G. Colonna, A. Facchiano, ESBRI: a web server for evaluating salt bridges in proteins, *Bioinformation.* (2008). https://www.researchgate.net/profile/Giovanni_Colonna/publication/26552830_ESBRI_A_web_server_for_evaluating_salt_bridges_in_proteins/links/02bfe5117acc4a6cb0000000.pdf (accessed March 31, 2016).
- [38] A. Lejeune, M. Vanhove, J. Lamotte-Brasseur, R.H. Pain, J.-M. Frère, A. Matagne, Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 β -lactamase, *Chem. Biol.* 8 (2001) 831–842. doi:10.1016/S1074-5521(01)00053-9.
- [39] Y. Wang, S. Feng, T. Zhan, Z. Huang, G. Wu, Z. Liu, Improving catalytic efficiency of endo- β -1, 4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* by directed evolution and H179 saturation mutagenesis., *J. Biotechnol.* 168 (2013) 341–7. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.09.014.
- [40] Y. Wang, Z. Fu, H. Huang, H. Zhang, B. Yao, H. Xiong, et al., Improved thermal

- performance of *Thermomyces lanuginosus* GH11 xylanase by engineering of an N-terminal disulfide bridge., *Bioresour. Technol.* 112 (2012) 275–9. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.092.
- [41] J. Jänis, J. Rouvinen, P. Vainiotalo, O. Turunen, V.L. Shnyrov, Irreversible thermal denaturation of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II and its three disulfide mutants characterized by differential scanning calorimetry, *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 75–80. doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.09.012.
- [42] A. Akasako, M. Haruki, M. Oobatake, S. Kanaya, Conformational stabilities of *Escherichia coli* RNase HI variants with a series of amino acid substitutions at a cavity within the hydrophobic core, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 18686–18693. doi:10.1074/jbc.272.30.18686.
- [43] D.N. Woolfson, Core-directed protein design, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 464–471. doi:10.1016/S0959-440X(00)00234-7.
- [44] B. Kong, G.L. Guo, Soluble Expression of Disulfide Bond Containing Proteins FGF15 and FGF19 in the Cytoplasm of *Escherichia coli*, *PLoS One.* 9 (2014) e85890. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085890>.
- [45] G. Auerbach, R. Ostendorp, L. Prade, I. Korndorfer, T. Dams, R. Huber, et al., Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *thermotoga maritima*: the crystal structure at 2.1 Å resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization., *Structure.* 6 (1998) 769–781.
- [46] A.H. Elcock, The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins., *J. Mol. Biol.* 284 (1998) 489–502. doi:10.1006/jmbi.1998.2159.
- [47] R.B. Freedman, Proteins: Structures and molecular properties, *Trends Biochem. Sci.* 10 (1985) 82. doi:10.1016/0968-0004(85)90239-7.

Figure Legends

Figure 1 – pH stability profile. -●- xynAc; -■- Q158R; -▼- H209N; and -Δ- N257D. A clear preferential activity is observed for H209N and XynA (WT) in the basic zone, whereas Q158R and N257D presented a high residual activity in the whole pH range.

Figure 2 – Secondary structure of XynA and its mutants after purification. MRE of mutants showing that all enzymes had a predominantly α -helix profile with a minimum at 220 nm. (Inset), SDS-PAGE analysis of the endo-xylanase variants after the purification and concentration steps. (M) SDS-PAGE molecular weight standard, Broad Range (Bio-Rad) 200; 116.3; 97.4; 66.2; 45; 31; 21.5; 14.4; 6.5 kDa; (line 1) XynA at 3.3 mg.mL⁻¹; (line 2) Q158R at 1.7 mg.mL⁻¹; (line 3) H209N at 0.9 mg.mL⁻¹; (line 4) N257D at 0.13 mg.mL⁻¹.

Figure 3 – Model structure of XynA (WT) built by MODELLER based on the PDB ID code 1TUX. Mutants Q158R, N257D and H209N are highlighted. The red sticks are the amino acids from XynA and the blue sticks are the modified amino acids.

Figure 4 – Models of XynA (WT) and its mutants. A. Before the simulation. B. After the simulation of 50 ns in water with NaCl (100 mM) at 338 K. The helices are in cyan, the sheet in purple and the loops in wheat. The disulphide bridge between C255 and C261 is in orange.

Figure 1

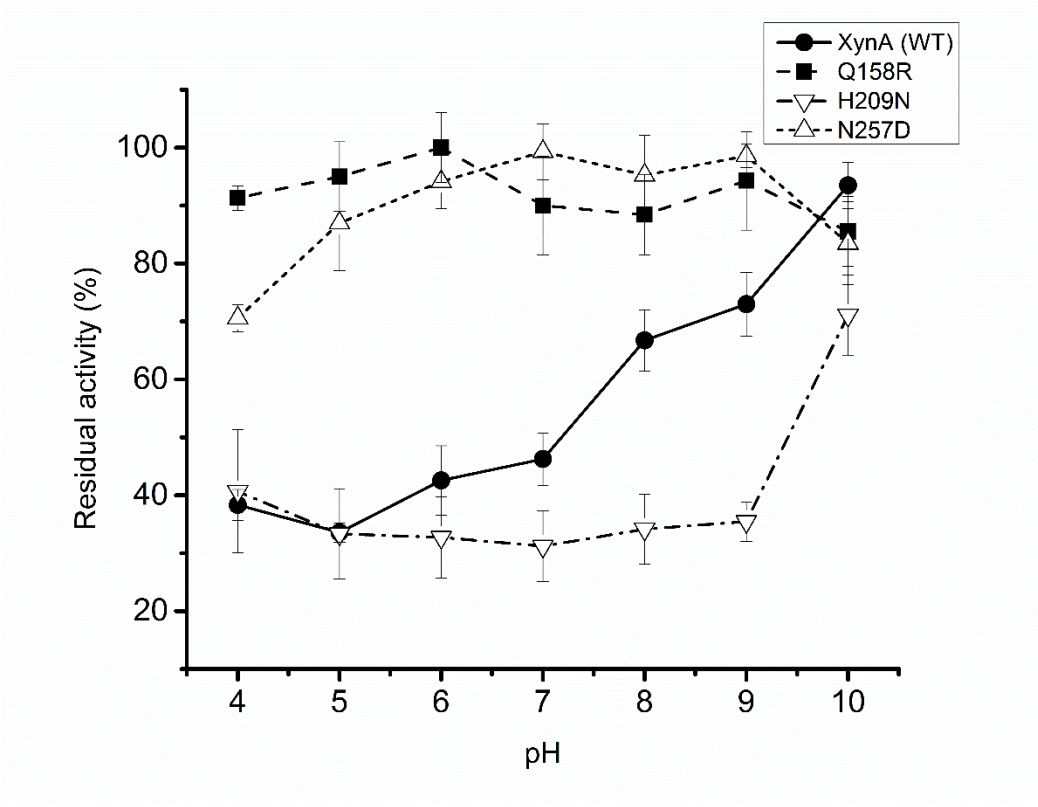


Figure 2

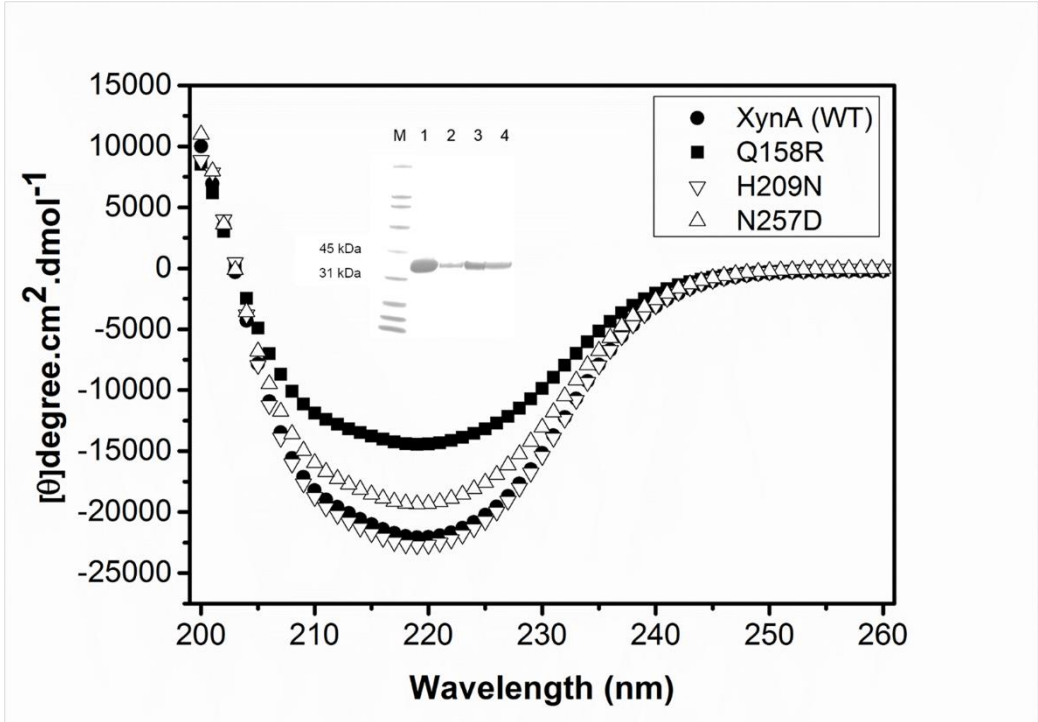


Figure 3

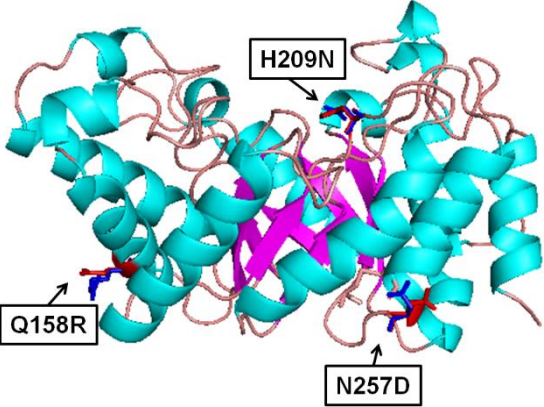
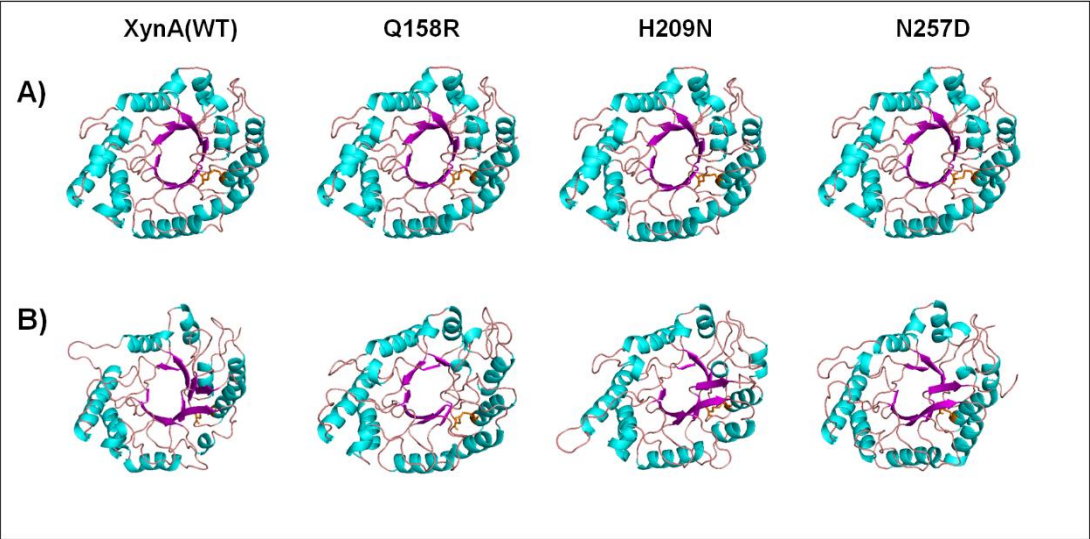


Figure 4



Tables

Table 1 – Oligonucleotide pairs used for plasmid construction and site-directed mutagenesis.

Constructions	Oligonucleotide sequences (5'→3')^(a)
pET28axynA system ^(b)	<i>GGCCATGGG</i> CCAAGCTGCACAGAGT GGGCGGCCGCTCACTGCTGCAGG
R124A	GGCAAGATC <u>G</u> CTGCATGGGACGTG CTTGTACCGGGTCATCAAGG
R190A	CATTGTCAAC <u>G</u> CGTCAAGCAA GCCTGCGTCTTGGGGTACGA
Q158R	GATTGCTTTCC <u>GA</u> ACCGCCCGCG GGGATGTAATCCTCCCCGATG
Y181K	CAGTGCCTCG <u>AA</u> ACCCAAGACGCAG TCGAGGTTGTAATCGTTGAT
L219D	GAGCCAGTGTT <u>GAT</u> CAGGCTCTTCCG CCTGACCAGCGCTGAGGTGCG
H209N	GGATCGCAAACG <u>A</u> ACCTCAGCGCTG TATGCCGTCAATCGGGACTCC
H83N	CCGTGGC <u>A</u> ATACTCTTGTATGG ATCAGCTTTCCATTTTGCTGG
N250D	GATTACGT <u>C</u> GATGTCGTGAACG CGTCGAGCTAGCACCAGCCACG
N257D	CGCTTGCCTC <u>G</u> ACGTGCAGTCC TTCACGACATTGACGTAATCCG
Q259D	CTCAACGTG <u>GAT</u> TCCTGCGTGGG GCAAGCGTTCACGACTTG
C255G	CGTGAACGCT <u>G</u> GCCTCAACGTG ACATTGACGTAATCCGTCGAGC

^(a) The nucleotide alterations achieved by site-directed mutagenesis are underlined.

^(b) Cleavage sites for the restriction enzymes (*Nco*I and *Not*I) are in italics and underlined.

Table 2 – Total protein content, specific activities in the optimum temperature and ideal pH and temperature for all the enzyme variants constructed in this work.

Enzyme Variants	Total protein (mg.100mL ⁻¹)	Specific Activity (U.mg ⁻¹)	Optimum T (°C)	Optimum pH
XynA	3.12	1283.96 ± 39.60	65-75	5
R124A	0.72	855.93 ± 61.71	65	4.5
R190A	6.10	1132.61 ± 19.29	70	4.5
Q158R	0.67	762.74 ± 6.01	65	4.5
Y181K	2.11	1087.41 ± 40.82	65	5
L219D	4.73	1318.53 ± 22.64	65	5
H209N	6.92	1849.03 ± 112.89	65	5
H83N	2.45	17.71 ± 2.41	65	4.5
N250D	0.74	1092.30 ± 108.30	65	5
N257D	3.47	549.88 ± 5.59	70	5.5
Q259D	1.67	922.59 ± 48.22	65	5
C255G	4.82	954.56 ± 45.02	65	5

Table 3 – Residual activities of XynA (WT) and the best mutant enzymes at 70 °C and 75 °C and some of their structural features *T_m* values were monitored by the MRE signal at 220 nm. The number of salt bridges and short helices was obtained after 50 ns simulation in water with NaCl (100mM) at 338K.

	(70 °C) Residual activity (%)	(75 °C) Residual activity (%)	<i>T_m</i> (°C)	Salt bridges	Short helices
XynA	30.28 ± 2.27	5.94 ± 1.99	70.9	13	1
Q158R	61.52 ± 4.70	28.32 ± 5.14	70.9	15	3
H209N	76.52 ± 0.59	47.46 ± 5.99	71.3	17	4
N257D	53.93 ± 2.11	15.91 ± 2.55	70.4	15	2

Supplementary Material

Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756

Angelica R. de Souza Silva^a, Gabriela C. de Araújo^b, Letícia M. Zanphorlin Murakami^c, Roberto Ruller^c, Jeffrey A. Mertens^d, Michael J. Bowman^d, Eleni Gomes^a, Roberto da Silva^{a*}

^aUNESP (São Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho, Biochemistry and Applied Microbiology Laboratory, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, BR)

^bUNESP (São Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho, Department of Molecular Biophysics, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, BR)

^cCTBE (Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, National Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, 13083-100)

^dBioenergy Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, USDA - ARS 1815 N. University St, Peoria, IL 61604, USA)

*Corresponding author: dasilva@ibilce.unesp.br, +55-17-3221-2354, +55-17-3221-2354.

Fig. S1.

```

| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          0          10          20          30
1TUX:A   - -----Q AAQSVDQLIK ARGK-VYFGV ATDQNRLTTG KNAAIIQAD
TaXyn10  - -----Q AAQSVDQLIK ARGK-VYFGV ATDQNRLTTG KNAAIIQAD

| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
40          50          60          70          80
1TUX:A   F GQVTPENSMK WDATEPSQGN FNFAGADYLV NWAQQNGKLI RGHTLVWHS
TaXyn10  F GQVTPENSMK WDATEPSQGN FNFAGADYLV NWAQQNGKLI RGNNTLVWHS

| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
90          100         110         120         130
1TUX:A   Q LPSWVSSITD KNTLTNVMKN HITTLMTRYK GKIRAWDVVN EAFNEDGSL
TaXyn10  Q LPSWVSSITD KNTLTNVMKN HITTLMTRYK GKIAAWDVVN EAFNEDGSL

| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
140         150         160         170         180
1TUX:A   R QTVFLNVIGE DYIPIAFQTA RAADPNAKLY INDYNLDSAS YPKTQAIVN
TaXyn10  R QTVFLNVIGE DYIPIAFRTA RAADPNAKLY INDYNLDSAS KPKTQAIVN

| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
190         200         210         220         230
1TUX:A   R VKQWRAAGVP IDGIGSQTHL SAGQGASVLQ ALPLLASAGT PEVAITELD
TaXyn10  A VKQWRAAGVP IDGIGSQNTL SAGQGASDVQ ALPLLASAGT PEVAITELD

| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
240         250         260         270         280
1TUX:A   V AGASSTDYVN VVNALCLNVQS CVGITVWGVA DPDSWRASTT PLLFDGNFN
TaXyn10  V AGASSTDYVD VVNAGLDVDS CVGITVWGVA DPDSWRASTT PLLFDGNFN

| .....|.....| .....
290         300
1TUX:A   P KPAYNAIVQD LQQX
TaXyn10  P KPAYNAIVQD ----

```

Figure S1 – Multiple alignment of TaXyn10 amino acid sequence (GenBank: AF127529.1) and PDB structure model (1TUX) highlighting the eleven mutation sites studied in the present work. H83N in purple, R124A in light red, Q158R in dark yellow, Y181K in pink, R190A in orange, H209N in dark blue, L219D in light blue, N250D in gray, C255G in yellow, N257D in dark orange and Q259D in dark green.

Fig. S2.

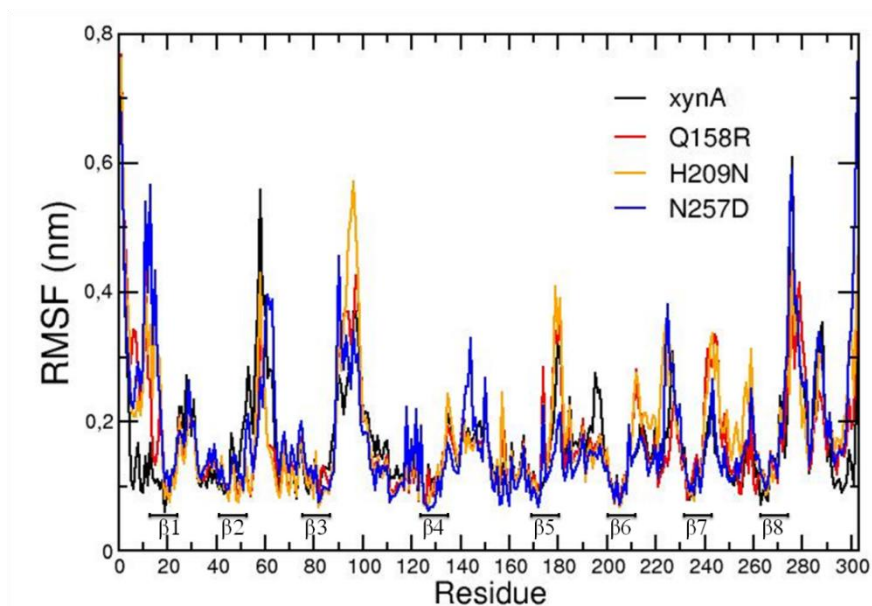


Figure S2 – RMSF per amino acid residue of XynA and its mutants in 100 mM NaCl solution, at 338K. Black, red, orange and blue lines represent XynA (model), Q158R, H209N and N257D mutants, respectively.

Fig. S3.

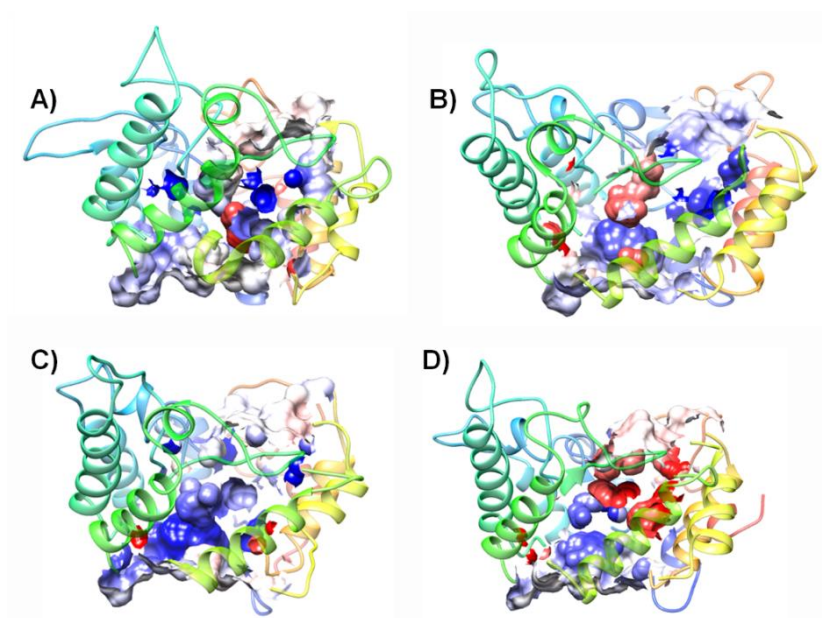


Figure S3 – Distribution of the surface charge potential in the substrate binding active site region of XynAc (A) and its mutants Q158R (B), H209N (C) and N257D (D). Blue represents the positively and red negatively charged regions.

CAPÍTULO 3

Estudo *in silico* das combinações de três mutantes de endoxilanase de *T. aurantiacus* obtidos por mutagênese sítio dirigida, Q158R / H209N / N257D, e determinação de fatores bioquímicos relacionados a estabilidade
(Dados serão submetidos como *short manuscript* a *Journal of Theoretical Biology*)

Angelica R. de Souza Silva^a, Gabriela C. de Araújo^b, Roberto Ruller^c, Roberto da Silva^a

^aUNESP (São Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho, Biochemistry and Applied Microbiology Laboratory, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, BR)

^bUNESP (Sao Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho, Department of Molecular Biophysics, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, BR)

^cCTBE (Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, National Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, 13083-100)

RESUMO

Três mutantes de endo-xilanase de *Thermoascus aurantiacus* (XynAc), Q158R / H209N / N257D, obtidos por mutagênese sítio dirigida a partir de informações estruturais e fatores relacionados a termoestabilidade foram em primeira etapa caracterizados e selecionados (Capítulo 2) dentre os onze mutantes construídos. Estes destacaram-se em relação aos outros devido a melhoria de seus fatores bioquímicos e estruturais relacionados a resistência térmica. Nesta etapa, objetivou-se a partir de estudos de modelagem e dinâmica molecular, por homologia com a estrutura depositada no PDB (1TUX), adquirir informações *in silico* dos mutantes combinados, tomadas as quatro possibilidades de combinações (Q158R/ H209N; Q158R/ N257D; Q158R/ H209N /N257D; H209N /N257D). As características estruturais dos modelos foram determinadas pelo RMSD, RMSF, interações de hidrogênio e interações iônicas. Foi possível concluir que todos os mutantes combinados tiveram o número de interações salinas na estrutura expressivamente aumentadas e Q158R/ H209N /N257D mostrou-se do mais termoestável, com menor RMSF. Portanto, tratam-se de mutantes potenciais que possivelmente podem contribuir para característica de estabilidade térmica e de pH desejada em ambientes de elevado estresse como em biorreatores industriais, justificando a construção dos mesmos *in situ* (laboratório), bem como caracterização e aplicação.

Palavras-chave: modelagem molecular, RMSD, RMSF, estrutura, endo-xilanases.

1. INTRODUÇÃO

As simulações de Dinâmica Molecular (DM) têm sido rotineiramente utilizadas para investigar a estrutura e função de biomoléculas (Steinbach et al., 1993; Karplus & McCammon, 2002). Sua metodologia é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e tem como principal proposta descrever como as posições, as velocidades e as orientações dos átomos que constituem o sistema em estudo variam em função do tempo.

O modelo baseado em estrutura é um modelo minimalista que descreve as propriedades do enovelamento de proteínas e permite explorar uma grande faixa de parâmetros dos sistemas em razoável custo computacional (Pande et al., 1957; Whitford et al., 2009). Neste, a escolha de qual modelo utilizar, modelo com todos os átomos e ou modelo C α , é baseada nas informações que se deseja obter. No presente estudo, foi utilizado o modelo com todos os átomos, uma vez que as informações sobre as cadeias laterais são importantes para o entendimento do empacotamento e interação entre os resíduos de aminoácidos para verificar as interações salinas por exemplo. Deste modo, os parâmetros da expressão do potencial modelo são alcançados por meio da estrutura nativa da proteína depositada no Protein Data Bank (PDB). Neste caso, a endo-xilanase de *Thermoascus aurantiacus* teve sua estrutura previamente resolvida por cristalografia de raios-X e foi depositada no Protein Data Bank (PDB), 1TUX, a qual foi utilizada neste estudo como modelo.

Os dados de RMSD e o RMSF foram aqui utilizados para determinar os fatores estruturais e de estabilidade das construção *in silico*. O valor do desvio da raiz média quadrática (RMSD) é a medida da distância média entre os átomos de uma estrutura de uma molécula em relação a uma estrutura de referência, podendo esta ser a estrutura inicial. No estudo de conformações de proteína o RMSD é calculado através da sobreposição de uma estrutura qualquer com uma estrutura de referência. Por outro lado, a flutuação da raiz média quadrada (RMSF) calcula a flutuação das posições atômicas durante a trajetória. A partir do cálculo do RMSF é possível também obter um arquivo .pdb com valores de RMSF convertidos em valores do fator beta. O fator beta representa através de um espectro de cores qual região é mais estável ou menos estável durante a simulação, sendo as regiões mais estáveis representadas

em azul e as regiões menos estáveis em vermelho. Deste modo prevê-se as estruturas mais estáveis, ou seja, com menos flutuações.

O método de modelagem e dinâmica molecular tem sido utilizadas para prever estruturas proteicas, minimizando o tempo gasto com experimentos *in situ* e economia de materiais, ao otimizar o processo de construção de apenas os mutantes mais atrativos do ponto de vista investigado, com base nas informações levantadas na dinâmica. Estudo similar foi realizado por Cota et al. (2013).

Portanto, esta etapa do trabalho baseou-se nestas teorias estruturais para a criação dos modelos *in silico* dos mutantes termoestáveis previamente selecionados em trabalho anterior (Q158R, H209N e N257D), o qual foi submetido a *International Journal of Biological Macromolecule* (IJBM), e aqui combinados, tomadas as quatro possibilidades de combinações (Q158R/ H209N; Q158R/ N257D; Q158R/ H209N /N257D; H209N /N257D). A proposta aqui levantada foi selecionar quais destas combinações seriam mutantes potenciais, com relação a fatores relacionados a termoestabilidade para obtenção *in situ*, uma vez que esta é uma característica atrativa para o setor industrial. Para tanto, a forma como estes dados foram processados estão descritas abaixo.

2. METODOLOGIA

2.1. Modelagem molecular e dinâmica molecular da xynAc e seus mutantes

Para análise estrutural da XynAc_Ec e seus mutantes foram construídos modelos tridimensionais de cada enzima e estes foram submetidos a simulação de dinâmica molecular para melhor mimetização do ambiente experimental.

Modelos dos mutantes de XynAc_Ec foram construídos com o objetivo de verificar a nível molecular e estrutural como as mutações de aminoácidos propostas estão relacionadas com alguma mudança conformacional, e conseqüentemente, como estas mutações podem influenciar na termoestabilidade e atividade desta enzima. Para a construção dos modelos foi utilizado o método de modelagem por homologia utilizando como molde a estrutura cristalográfica da xilanase termoestável de *T. aurantiacus* (PDB code: 1UTX).

Os modelos preditos foram construídos utilizando o *Modeller* (Šali; Blundell, 1993) que utiliza o método de modelagem comparativa (ou modelagem por homologia) para construção dos modelos. A modelagem comparativa ou por

homologia constitui em modelar a estrutura 3D de uma proteína usando uma estrutura conhecida, já determinada experimentalmente, como um modelo.

Os modelos obtidos foram submetidos à simulação de dinâmica molecular utilizando a ferramenta GROMACS (versão 4.5.5) (Berendsen et al., 1984; Pronk et al., 2013) para análise estrutural dinâmica da xynAc e seus mutantes. As simulações foram realizadas em solução aquosa contendo 100 mM de NaCl e pH 5,0. O campo de força GROMOS53A6 (Oostenbrink et al., 2004) foi utilizada para modelagem da XynAc_Ec e seus mutantes. Em todas as simulações as temperaturas foram mantidas constantes a 338 K e a pressão a 1 atm.

As características estruturais dos modelos foram determinadas pelo RMSD, RMSF, interações de hidrogênio e interações iônicas. O servidor ESBRI (Costantini et al., 2008) foi utilizado para análise das pontes salinas, enquanto ferramentas do pacote GROMACS (versão 4.5.5) foram utilizadas para cálculo de RMSD, RMSF e interações de hidrogênio. A composição de estruturas secundárias também foi realizada para análises das características estruturais dos modelos obtidos.

3. RESULTADOS

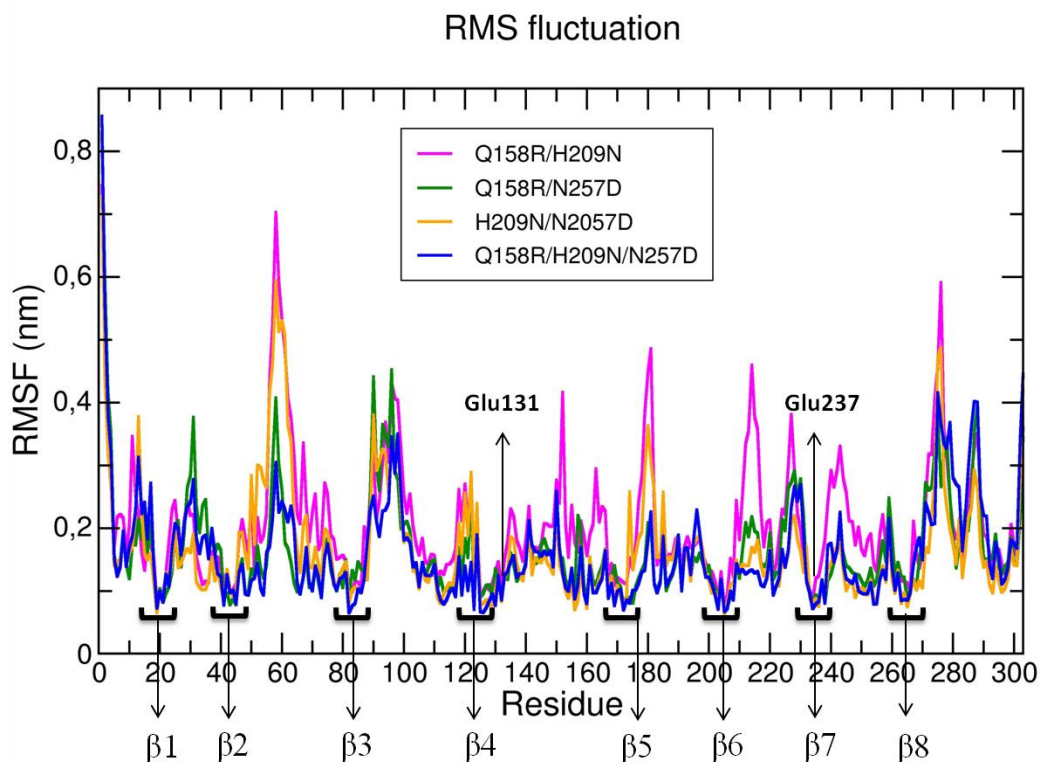
Para uma segunda análise, as mutações Q158R, H209N e N257D foram combinadas de forma a formarem mais quatro mutantes: Q158R/H209N, Q158R/N257D, Q158R/H209N/N257D e H209N/N257D. Esta etapa foi proposta, a fim de verificar a forma como estas combinações das mutações poderiam influenciar estruturalmente e funcionalmente as novas biomoléculas. Para tanto, os modelos foram gerados e os dados de dinâmica molecular, juntamente com as análises de RMSD, RMSF, interação de hidrogênio e salinas, estruturas secundária e carga de superfície foram investigadas.

Tabela 1 – Fatores estruturais dos mutantes de XynAc_Ec. Número de ligações Salinas e hélices curtas após 50 ns de simulação em água com NaCl (100 mM), a 338 K, e conteúdo de estrutura secundária relativo a cada mutante.

	alpha-helix	Beta-sheet	Turn and coil	salt bridges	Short helices
XynAc_Ec	38%	17%	45%	13	1
Q158R/ H209N	40%	15%	45%	53	4
Q158R/N257D	39%	20%	41%	65	4
Q158R/ H209N /N257D	36%	19%	45%	64	2
H209N /N257D	39%	18%	43%	52	4

Os resultados de RMSF mostram flutuações consideráveis na região N-terminal de todos os modelos, estas flutuações em regiões terminais são comuns, pois em geral são regiões mais expostas. As flutuações na região do domínio central da proteína composta pelas oito folhas-beta mantiveram flutuações bem baixas, no entanto, o modelo construído levando em consideração as três mutações (Q158R/H209N/N257D) mostrou-se mais estável, ou seja, flutuações menores ao longo de toda proteína. (Akasako et al., 1997; Woolfson, 2001). O mutante Q158R/H209N/N257D foi aquele que também apresentou menor flutuação nas regiões próximas aos resíduos GLU131 e GLU237, resíduos estes se mostram importantes na interação da xylanase ao substrato. Além disso, este mutante diminuiu a flutuação da região compreendida entre $\beta 2$ e $\beta 3$ e entre $\beta 3$ e $\beta 4$. Baixos valores de RMSF indica alta estabilidade da estrutura da proteína ao longo da simulação, estes resultados sugerem que o mutante Q158R/H209N/N257D se mostra mais termoestável quando comparado aos outros mutantes.

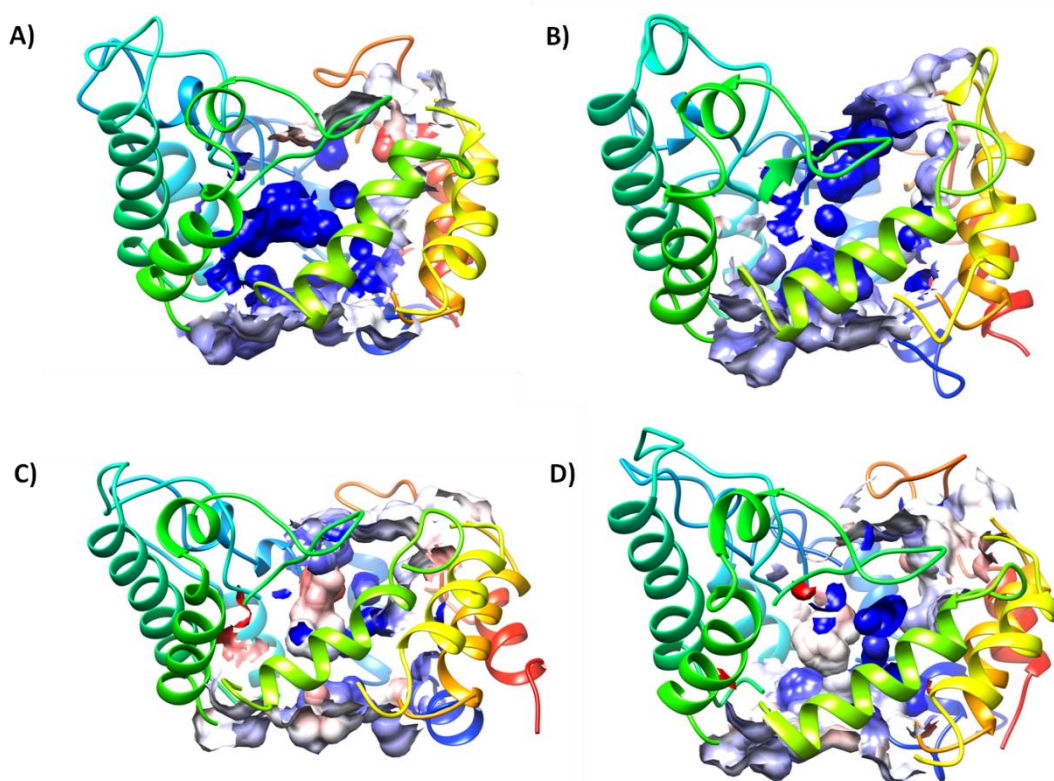
Figura 1 – RMSF por resíduos dos modelos dos mutantes em solução com NaCl (100 mM) a 338K. Linha rosa, verde, laranja e azul representam mutantes Q158R/H209N, Q158R/N257D, H209N/N257D e Q158R/H209N/N257D, respectivamente.



Para uma última análise, as superfícies potenciais de cargas foram analisadas. Os mutantes Q158R/H209N e Q158R/N257D apresentaram superfícies bem similares, com região central da proteína composta por superfícies carregadas

positivamente. Já os mutantes H209N/N257D e Q158R/H209N/N257D tiveram superfícies carregadas de forma mais brandas (vermelho claro e azul claro), o que significa um potencial de carga mais neutro. Nenhum mutante apresentou superfície potencial negativa. Na seção anterior, foi possível observar que este potencial de carga pode estar relacionada à atividade e estabilidade da proteína, e quanto mais positiva esta for maior sua atividade. Sendo assim, os resultados das mutações combinadas sugerem que estas podem contribuir com a estabilidade e atividade da proteína, uma vez que a região do domínio central apresentaram potencialmente cores positivas. O mutante Q158R/H209N/N257D apresentou-se mais estável durante toda a simulação indicando também uma maior estabilidade térmica quando comparado aos outros mutantes (menor valor de RMSF).

Figura 2 – Distribuição do potencial de carga superficial no sítio de ligação ao substrato dos mutantes (A) Q158R/H209N (B) Q158R/N257D, (C) H209N/N257D (D) Q158R/H209N/N257D. Regiões azul e vermelho representam regiões carregadas positiva e negativamente, respectivamente.



4. CONCLUSÕES

Estes dados coletados mostraram-se bastante satisfatórios, pois foram revelados fortes fatores estruturais relacionados a estabilidade das xilanases mutagênicas. De forma geral, todas as estruturas apresentaram um expressivo aumento no conteúdo de interações salinas, Q158R/ H209N/N257D mostrou maior estabilidade durante toda a simulação com baixas flutuações e de forma geral, todos apresentaram conteúdo de carga positivo ou neutro. Portanto, estes dados nos sugerem que estas combinações (*in silico*) revelaram construções que podem apresentar melhoria na termoestabilidade, considerando-se os fatores aqui investigados. Portanto, estas linhagens são possivelmente enzimas potenciais para estudos *in situ*, justificando futuro investimento financeiro e de tempo na obtenção dos mesmos.

5. REFERÊNCIAS

AKASAKO, A.; HARUKI, M.; OOBATAKE, M.; KANAYA, S. Conformational stabilities of Escherichia coli RNase HI variants with a series of amino acid substitutions at a cavity within the hydrophobic core. The Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 30, p. 18686–18693, 1997.

AUERBACH, G.; OSTENDORP, R.; PRADE, L.; et al. Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima: the crystal structure at 2.1 Å resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization. Structure, v. 6, n. 6, p. 769–781. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00078-1, 1998.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of Chemical Physics, v. 81, n. 8, p. 3684–3690. doi: 10.1063/1.448118, 1984.

COSTANTINI, S.; COLONNA, G.; FACCHIANO, A. M. ESBRI: A web server for evaluating salt bridges in proteins. Bioinformatics, v. 3, n. 3, p. 137–138. Retrieved February 16, 2016, , 2008.

COTA, J.; OLIVEIRA, L. C.; DAMÁSIO, A. R. L.; CITADINI, A. P.; HOFFMAM, Z. B.; ALVAREZA, T. M.; CODIMA, C. A.; LEITE, V. B. P.; PATORE, G.; NETOD, M. O.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; SQUINA, F. Assembling a xylanase–lichenase chimera through all-atom molecular dynamics simulations. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, v.1834, 8, p. 1492–1500, 2013.

ELCOCK, A. H. The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *Journal of Molecular Biology*, v. 284, n. 2, p. 489–502. doi: 10.1006/jmbi.1998.2159, 1998.

FREEDMAN, R. B. Proteins: Structures and molecular properties. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 10, n. 2, p. 82. doi: 10.1016/0968-0004(85)90239-7, 1985.

KARPLUS, M. & MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural & Molecular Biology* 9, 646–652 (2002).

NATESH, R.; BHANUMOORTHY, P.; VITHAYATHIL, P. J.; et al. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Molecular Biology*, v. 288, n. 5, p. 999–1012. doi: 10.1006/jmbi.1999.2727, 1999.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1656–1676. doi: 10.1002/jcc.20090, 2004.

PRONK, S.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, p. btt055. doi: 10.1093/bioinformatics/btt055, 2013.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*, v. 234, n. 3, p. 779–815. doi: 10.1006/jmbi.1993.1626, 1993.

STEINBACH, P. J. & BROOKS, B. R. Protein hydration elucidated by molecular dynamics simulation. *PNAS* 90, 9135–9139 (1993).

WHITFORD, P. C. ET AL. An all-atom structure-based potential for proteins: Bridging minimal models with all-atom empirical forcefields. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 75, 430–441 (2009).

WOOLFSON, D. N. Core-directed protein design. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 11, n. 4, p. 464–471. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00234-7, 2001.