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

FELIPE CARDOSO RAMOS

Avaliação da termoestabilidade e aplicação biotecnológica de endo-xilanases GH11 obtidas por otimização *in silico*

Campinas
Junho de 2017

FELIPE CARDOSO RAMOS

Avaliação da termoestabilidade e aplicação biotecnológica de endo-xilanases GH11 obtidas por otimização *in silico*

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

Orientador: Dr. Roberto Ruller
Coorientadora: Dra. Leticia Maria Zanphorlin Murakami

Campinas
Junho de 2017

Ramos, Felipe Cardoso.
Avaliação da termoestabilidade e aplicação biotecnológica de endoxilanases GH11 obtidas por otimização in silico/ Felipe Cardoso Ramos. -- São José do Rio Preto, 2017
98 f. : il., tabs.

Orientador: Roberto Ruller
Coorientador: . Letícia Maria Zanphorlin Murakami
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Etanol. 3. Bioetanol. 4. Endo-xilanases 5. Termoestabilidade. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 661.722

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

FELIPE CARDOSO RAMOS

Avaliação da termoestabilidade e aplicação biotecnológica de endo-xilanases GH11 obtidas por otimização *in silico*

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Dr. Roberto Ruller
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)
Orientador

Dr. Mário Tyago Murakami
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)

Dr. Clelton Santos
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Campinas
30 de junho de 2017

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
Marie Curie

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmão, que estiveram sempre ao meu lado em qualquer situação. Dedico também aos meus professores, amigos e a Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira mente à minha família, por me apoiar de forma incondicional ao longo de todo o mestrado.

Os meus amigos de CTBE, especialmente os parceiros de Ilha2.

A todos os amigos que fiz ao longo dessa caminhada no estado de São Paulo.

À minha grande amiga e parceira Luciana que me acompanhou também nessa jornada.

Ao Laboratório de Ciências e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

À Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP.

A Vinicius Contessoto e Prof. Dr. Vitor Leite do Departamento de Física do IBILCE/ UNESP pela colaboração.

Ao meu orientador Roberto Ruller pela oportunidade de trabalhar no grupo.

À Letícia Zanphorlin pela coorientação.

À CAPES pelo financiamento.

A Deus.

Resumo

O processamento da biomassa lignocelulósica para a produção do etanol de segunda geração (E2G) e outras aplicações requer enzimas termoestáveis capazes de operar sob altas temperaturas e longos períodos de incubação. Nesse contexto, reportamos aqui a validação experimental preliminar de uma abordagem *in silico* para a obtenção enzimas hidrolíticas termoestáveis. Simulações computacionais da endo-xilanase GH11 de *Bacillus subtilis* (XBS) usando a metodologia de otimização de interações eletrostáticas (EIO) indicaram três resíduos (K99, R122 and K154) críticos para o aumento da termoestabilidade através da substituição de cargas. Assim, analisamos os efeitos da mutação K99E em diversas propriedades da XBS selvagem (XBS^{WT}) e também de uma XBS obitida *in vitro* através de evolução dirigida (XBS^{M6}). Após expressão heteróloga em células de *Escherichia coli* BL21 e purificação através de cromatografia de afinidade, realizamos a caracterização bioquímica e biofisica das enzimas. Além disso, conduzimos estudos de termotolerância incubando as enzimas em condições industriais (pH 4,8 e 50 °C). Finalmente, realizamos testes de suplementação de um coquetel enzimático comercial esperando obter melhoras no processo de hidrólise da biomassa. Os resultados mostraram que a mutação K99E foi capaz de aumentar a temperatura de desnaturação térmica (T_m) das enzimas em aproximadamente 1 °C e melhorar a termotolerância de XBS^{WT} e XBS^{M6} sem alterar suas condições ótimas. Somado a isso, a enzima $XBS^{M6+K99E}$ apresentou melhor performance nos ensaios de suplementeção. Estes resultados sugerem que a abordagem de EIO pode ser usada como estratégia inicial para o desenho de novas endo-xilanases GH11 termoestáveis, capazes de suportar as condições operacionais empregadas na industria de E2G.

Palavras-chave: endo-xilanases GH11, termoestabilidade, E2G, otimização *in silico*

Abstract

Processing of lignocellulosic biomasses for second-generation bioethanol (SGB) production and others applications requires thermostable enzymes able of operating under high temperatures and long incubation periods. In this context, we report here the preliminary experimental validation of an *in silico* approach for engineering hydrolytic enzymes towards thermostability. Previous computational simulations of GH11 endo-xylanase from *Bacillus subtilis* (XBS) using the electrostatic interaction optimization (EIO) methodology indicated three amino acid residues (K99, R122 and K154) critical for increasing thermostability through charge replacement. Thus, we analyzed the effects of the K99E mutation on several proprietes of two XBS enzymes: the wild-type XBS (XBS^{WT}) and an XBS obitited in vitro by directed evolution (XBS^{M6}). After heterologous expression in *Escherichia coli* BL21 cells and purification by affinity chromatography, we performed the biochemical and biophysical characterization of enzymes. We also conducted thermotolerance studies, incubating the enzymes under industrial conditions (pH 4.8 and 50 ° C). Finally, we performed supplementation assays of a commercial enzyme cocktail hoping to obtain improvements in the biomass hydrolysis process. The results showed that the K99E mutation was able to increase the enzymes thermal denaturation temperature (T_m) by approximately 1 °C and improve thermotolerance of XBS^{WT} and XBS^{M6} without alter its optimum conditions. In addition, the enzyme $XBS^{M6+K99E}$ showed better performance in the cocktail supplementation trials. These results suggest that the EIO approach can be used as initial strategy for the design of new thermostable GH11 endo-xylanases able of overcome the operating conditions employed in the SGB industry.

Keywords: GH11 endo-xylanases, thermostability, SGB, *in silico* optimization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parede celular primária.…… ……..……..…21

Figura 2. Parede celular primária do tipo II, presente em monocotiledôneas commelinales……....22

Figura 3. Celulose e celobiose, e enzimas hidrolíticas……..…...…23

Figura 4. Estrutura da glicoarabinoxilana (GAX) e enzimas envolvidas na sua hidrólise……..……..……...…25

Figura 5. Representação da estrutura química da 1,3-1,4-β-D-glicana (BG) e enzimas hidrolíticas.……..……..……...26

Figura 6. Esquema representando a estrutura repetitiva da xiloglicana mais comum em cana-de-açúcar (XXGG) e enzimas hidrolíticas……..…26

Figura 7. Estrutura da lignocelulose (esquerda) e o fracionamento dos seus polímeros (celulose, hemicelulose e lignina) através do pré-tratamento (direita).……..…28

Figura 8. Dobramento característico das endo-xilanases GH11, conhecido como β-sanduíche. …….35

Figura 9. Esquema representando as reações de desdobramento (1) e agregação (2)…….……...37

Figura 10. Representação esquemática do modelo TK-SA de interação entre resíduos carregados……..……....43

Figura 11. Estrutura da endo-xilanases GH11 de *B. subtilis* (XBS) e substituições avaliadas no trabalho…….…….....49

Figura 12. Fluxograma representando as GH11s de *Bacillus* avaliadas através desse trabalho…….……..…….50

Figura 13. Fluxograma ilustrando as etapas do trabalho……..…....51

Figura 14. Expressão de XBS, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e XBS^{M7} ……..……...61

Figura 15. Purificação por cromatografia de afinidade de XBS^{WT} e XBS^{K99E} ……..…..62

Figura 16. Purificação por cromatografia de afinidade de XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$ ..……63

Figura 17. Análise de SDS-PAGE das enzimas após reunião das frações de purificação. ……..……64

Figura 18. Caracterização das condições ótimas de pH e temperatura.……..…...…..…65

Figura 19. Termotolerância bioquímica…….....67

Figura 20. Curvas de cinética enzimática. …….……...…69

Figura 21. Efeito da adição de cátions mono e bivalentes na atividade enzimática. ……71

Figura 22. Perfis de dicroísmo circular (CD)……..……..……...73

Figura 23. Perfis de desnaturação térmica das enzimas. ..……..74

Figura 24. Perfis de desnaturação térmica expressos em termos de fração desnaturada (F_d). ……...75

Figura 25. Termotolerância biofísica. ……...……..……77

Figura 26. Termotolerância biofísica, valores de $[\theta]_{\lambda = 220nm}$ em função do tempo ($[\theta]_t$). ……..……...79

Figura 27. Análise de dose-resposta para avaliação da concentração ótima de enzima nos ensaios de suplementação……...…81

Figura 28. Hidrólise de 50 mg de bagaço de cana-de-açúcar resultante de pré-tratamento alcalino (24 h) ……..…..……82

Figura 29. Valores de ΔG_{qq} por resíduo em 25 °C e pH 6,0……..…...84

Figura 30. Valores de ΔG_{qq} por resíduo em 50 °C e pH 4,8. …...……85

Figura 31. Valores de ΔG_{qq} por resíduo em nas condições ótimas de cada enzima……..86

Figura 32. Estrutura cristalográfica da enzima XBS^{WT} (PDB: 1XXN (Murakami *et al.,* 2005) e modelos de homologia de XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$, mostrando o entrono dos resíduos K99 e E99. ……..88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de cinética enzimática. ……..……..…69

Tabela 2. Valores de $\Delta[\theta]_t$ após 120 horas de incubação……..……..…78

Tabela 3. Valores de ΔG_{qq} global obtidos com as simulações de TK-SA. ……..…….87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E2G	Etanol de Segunda Geração
ART	Açucares Redutores Totais
BC	1,4-β-D-glicana
BGSC	*Bacillus Genetic Stock Center*
BG	1,3-1,4-β-D-glicana
CEs	Carboidrato Esterases
CLC	Complexos lignina-carboidrato
CD	Dicroísmo circular
EP-PCR	*Error-Prone* PCR
GAX	Glicoarabinoxilana
GEE	Gases de Efeito Estufa
GH11	Endo-xilanases da família GH11
GHs	Glicosídeo Hidrolases
GM	Glicomananas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IMAC	Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados
MC	Monte Carlo
OIE	Otimização de Interações Eletrostáticas
TK-SA	Tanford–Kirkwood corrigido para Acessibilidade ao Solvente
XBS	Endo-xilanase GH11 de *Bacillus subtilis*
XBS^{WT}	XBS selvagem
XBS^{K99E}	XBS com a mutação K99E
XBS^{M6}	XBS com mutação seis mutações geradas *in vitro*
$XBS^{M6+K99E}$	XBS com mutação seis mutações geradas *in vitro* e K99E
XG	Xiloglicana

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....18
1.1 Produção de etanol no Brasil.....18
1.2 Etanol de segunda geração (E2G).....19
1.3 Os principais componentes da parede vegetal.....20
1.3.1 Celulose.....22
1.3.2 Hemicelulose.....24
1.3.3 Lignina.....27
1.4 Pré-tratamento.....27
1.4.1 Métodos de pré-tratamento físicos.....28
1.4.2 Métodos pré-tratamento químicos.....29
1.4.2.1 Pré-tratamentos ácidos.....29
1.4.2.2 Pré-tratamentos alcalinos.....29
1.4.3 Métodos de pré-tratamento físico-químicos.....30
1.4.4 Métodos biológicos de pré-tratamento.....30
1.5 Degradação enzimática dos polímeros da parede celular vegetal.....31
1.6 Endo-xilanases.....33
1.6.1 Endo-xilanases da família GH11.....33
1.7 Termoestabilidade enzimática.....35
1.8 Vantagens das aplicações de GHs termoestáveis para tecnologias do E2G.....38
1.9 Estudos para a obtenção de endo-xilanases GH11 termoestáveis.....39
1.9.1 Bioprospecção e evolução dirigida na termoestabilidade de xilanases.....39
1.9.2 Glicosilação e termoestabilidade de xilanases.....41
1.10 Otimização de interações eletrostática (OIE).....41
2 JUSTIFICATIVA.....45
3 OBJETIVOS.....47

4 MÉTODOS.....48
4.1 A obtenção e a estratégia para o estudo das endo-xilanases GH11 mutantes.....48
4.2 Fluxograma experimental.....51
4.3 Expressão em *Escherichia coli* das endo-xilanases recombinantes…51
4.3.1 Análise de expressão das endo-xilanases.....52
4.4 Extração das enzimas recombinantes.....52
4.5 Purificação por cromatografia.....53
4.6 Caracterização bioquímica.....53
4.6.1 Valores ótimos de pH e temperatura.....53
4.6.2 Avaliação da termotolerância bioquímica.....54
4.6.3 Determinação de parâmetros cinéticos das endo-xilanases. 55
4.6.4 Efeito da adição de cátions e EDTA sobre a atividade enzimática.....56
4.7 Caracterização biofísica.....56
4.7.1 Termotolerância biofísica.....58
4.8 Ensaios de suplementação da hidrólise enzimática (sacarificação enzimática).....58
4.8.1 Determinação da concentração enzimática para suplementação.....59
4.8.2 Ensaio de suplementação do coquetel comercial Celluclast®.….....59
4.9 Simulações de TK-SA.....60
5 RESULTADOS E DISCUSSÂO.....61
5.1 Expressão heteróloga das endo-xilanases GH11.....61
5.2 Purificação das endo-xilanases por cromatografia de afinidade IMAC... 62
5.3 Caracterização bioquímica das endo-xilnases GH11.....64
5.3.1 Condições ótimas de pH e temperatura.....64
5.3.2 Termotolerância bioquímica.....66
5.3.3 Determinação de parâmetros cinéticos das endo-xilanases GH11.....68

5.3.4 Efeito da adição de cátions e EDTA sobre a atividade de endo-xilanse....71
5.4 Caracterização biofísica das enzimas....72
5.4.1 Estudo do perfil da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)....72
5.4.2 Desnaturação térmica das endo-xilanases GH11....74
5.4.3 Avaliação da termoestabilidade estrutural por CD nas condições de hidrólise....76
5.5 Hidrólise enzimática....80
5.5.1 Determinação da concentração de endo-xilanase para suplementação....80
5.5.2 Ensaios de suplementação do coquetel comercial....81
5.6 Novas simulações de TK-SA....84
6 CONCLUSÃO....89
7 REFERÊNCIAS....91
8 ANEXOS....98

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção de etanol no Brasil

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de etanol desde 1975, com o início do programa Pró-Alcool, que surgiu impulsionado pela crise mundial do petróleo. Produzindo mais de 20 bilhões de litros de etanol por ano, o país é hoje o maior produtor depois dos Estados Unidos, que obtém etanol a partir do milho (Coelho & Guardabassi 2014; FIESP 2013). O processo de fabricação brasileiro envolve a fermentação de açúcares presentes no caldo de cana, com consequente produção do chamado vinho de fermentação, do qual o etanol é recuperado através de destilação (Azevedo *et al*., 2012). O bagaço gerado no processamento da cana-de-açúcar é queimado para a produção de vapor e, posteriormente, eletricidade. Esse processo torna a produção de etanol autossuficiente em energia, podendo o excedente ainda ser utilizado para abastecer a rede nacional de energia elétrica, diminuindo assim a dependência das usinas hidroelétricas e termoelétricas (Coelho & Guardabassi 2014).

O etanol têm contribuído largamente para a redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) no Brasil, pois grande parte do CO_2 liberado durante o ciclo de vida do etanol é incorporado pela fotossíntese da cana-de-açúcar (Macedo *et al*., 2004). Apesar da utilização de combustíveis fósseis em algumas etapas da cadeia produtiva do etanol, como durante a colheita e distribuição, estudos mostram que a substituição da gasolina pelo etanol hidratado (95,1%-96%) é capaz de reduzir as emissões em até 1,7 $tCO_2eq./m^3$ (toneladas de CO_2 equivalente por m^3 de etanol). No caso do etanol anidro (≥ 99,6%) esse número é ainda maior, chegando a 2,6 $tCO_2eq./m^3$ (Macedo *et al*., 2004; Macedo *et al*., 2008). Dessa maneira, o etanol obtido a partir da cana-de-açúcar tem demonstrado ser capaz de atender à crescente demanda nacional por energia, de maneira sustentável e pouco poluente.

1.2 Etanol de segunda geração (E2G)

Apesar de bem-sucedido em vários aspectos, o atual programa brasileiro de produção de etanol necessita de melhorias no sentido de aumentar a sua produtividade (Dias *et al*., 2011). Isso porque o processo de produção tradicional exige áreas de cultivo muito extensas, o que contribui para o desmatamento e, a longo prazo, pode conflitar com a produção de alimentos, pois o consumo de etanol aumenta a cada ano (FIESP 2013). Uma das alternativas propostas é a produção do etanol a partir do bagaço da cana-de-açúcar, denominado de etanol de segunda geração (E2G). O bagaço é composto de biomassa vegetal lignocelulósica e possui grande quantidade de carboidratos na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) em sua composição (Figura 1), os quais podem ser utilizados para a produção de etanol após serem pré-tratados e hidrolisados, possibilitando produzir mais etanol por hectare de cana plantada.

A obtenção do etanol 2G envolve quatro etapas principais, são elas: (i) o pré-tratamento dos da biomassa para fracionamento dos polímeros que a compõe, o qual pode ser feito através de métodos físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos (Haghighi Mood *et al*., 2013); (ii) a hidrólise da celulose e hemicelulose (sacarificação); (iii) a fermentação dos açucares (C5 e C6) produzidos e (iii) a recuperação do etanol por meio de destilação (Axelsson *et al*., 2012). Apesar de promissora, a produção de etanol 2G em escala industrial ainda é muito limitada, exigindo a superação de inúmeros desafios científicos e tecnológicos. O maior deles consiste na dificuldade em se converter enzimaticamente a biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis, pois a estrutura complexa, compacta e recalcitrante da matéria lignocelulósica torna difícil a hidrólise de seus componentes (Nigam & Singh 2011).

1.3 Os principais componentes da parede vegetal

A biomassa lignocelulósica é derivada da parede celular vegetal (Chundawat *et al*., 2011), a qual é formada por um emaranhado de fibras que envolvem a celulose e a protegem da ação de microrganismos e enzimas, o que limita a aplicação desse tipo de material para a produção de etanol. As células vegetais possuem dois tipos de parede celular: primária e secundária. A parede primária (Figura 1) é formada na fase de crescimento celular, ela contém celulose e uma rede hidratada (65 % água) consistindo de hemicelulose e pectinas, com algumas proteínas estruturais (Pauly & Keegstra 2008). Baseada na sua composição de polissacarídeos, a parde primária pode ser classificada em tipo I ou tipo II.

A parede primária do tipo I estão presentes em dicotiledôneas e monocotiledôneas não-commelinales. Em adição à celulose, a parede primária tipo I contém xiloglicano como principal constituinte da hemicelulose, além de grandes quantidades de polissacarídeos pépticos (Carpita & Gibeaut 1993).

Na parede tipo II, o tipo de parede da ordem Poales (tal como gramíneas, incluindo cana-de-açucar), o arabinoxilano é a principal hemicelulose (Figura 2). As paredes tipo II possuem alta porcentagem de celulose e apenas quantidades negligenciáveis de pectinas e proteínas (Carpita 1996).

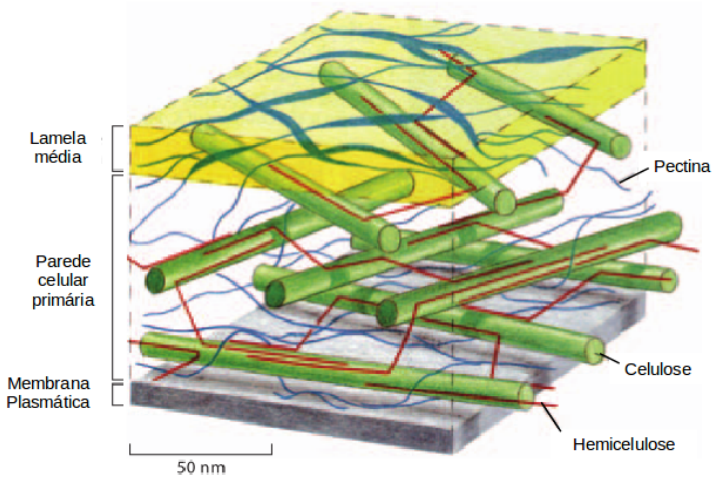


Figura 1. Parede celular primária. Adaptado de Scheller *et al.,*, 2010.

A parede celular secundária, depositada uma vez que o alongamento celular cessa, é geralmente mais espessas que a parede primária e pode conter várias camadas. O arabinoxilano e/ou mananas são os principais elementos da hemicelulose nesse tipo de parede celular. Outra característica da parede secundária é que a água é largamente substituída para lignina, tornando a parede celular quase impenetrável às enzimas hidrolíticas (Pauly & Keegstra 2008)

Quando consideramos a biomassa para produção de biocombustíveis, devemos levar em conta que as plantas superiores diferem substancialmente no que se refere à constituição da parede celular, quanto qualitativa quanto quantitativamente. Em relação à biomassa obtida da cana-de-açúcar, sabe-se que ela é composta principalmente por celulose (32-55%), hemicelulose (27-32%) e lignina (19-25%), esses três componentes somam juntos mais de 90% da parede celular (Pauly & Keegstra 2008; Guimarães *et al*., 2009). Outros componentes incluem minerais silicatados (1-4%) e extrativos (1,6-7,5%),

os quais podem conter ceras, carboidratos e compostos aromáticos (Masarin *et al*., 2011; Guimarães *et al*., 2009; Rezende *et al*., 2011; Kwa *et al*., 2008).

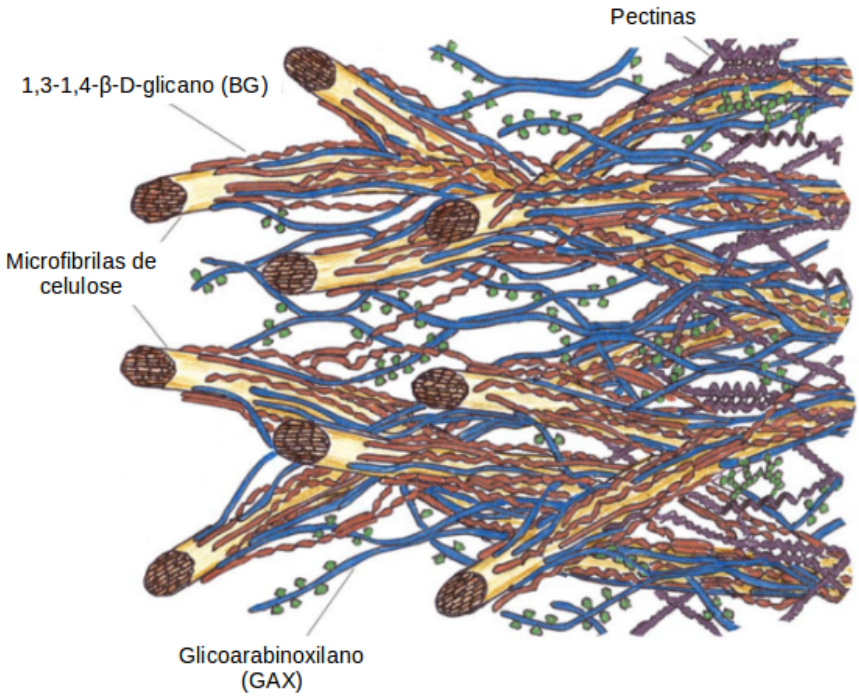


Figura 2. Parede celular primária do tipo II, presente em monocotiledôneas commelinales. Exceto pela presença de pectinas, a imagem é bastante representativa da parede primária de cana-de-açúcar. Adaptado de Bucceridge *et al.,*, 2004.

1.3.1 Celulose

A celulose é o principal componente da matéria vegetal, sendo constituída por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β(1→4), formando cadeias lineares de 1,4-β-D-glicana (BC) (Figura 3), em que a unidade repetitiva é a β-D-glicose. O grau de polimerização da celulose pode variar de 100 a 1.000 unidades, dependendo da fonte da qual é obtida (Chundawat *et al*., 2011). As moléculas de celulose

interagem fortemente por meio de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, formando fibrilas elementares (de 3 a 5 nm de diâmetro) insolúveis, as quais podem apresentar morfologia amorfa ou cristalina. A morfologia cristalina torna a celulose altamente resistente à hidrólise, sendo responsável por baixas taxas de sacarificação (Fengel & Wegener 1985).

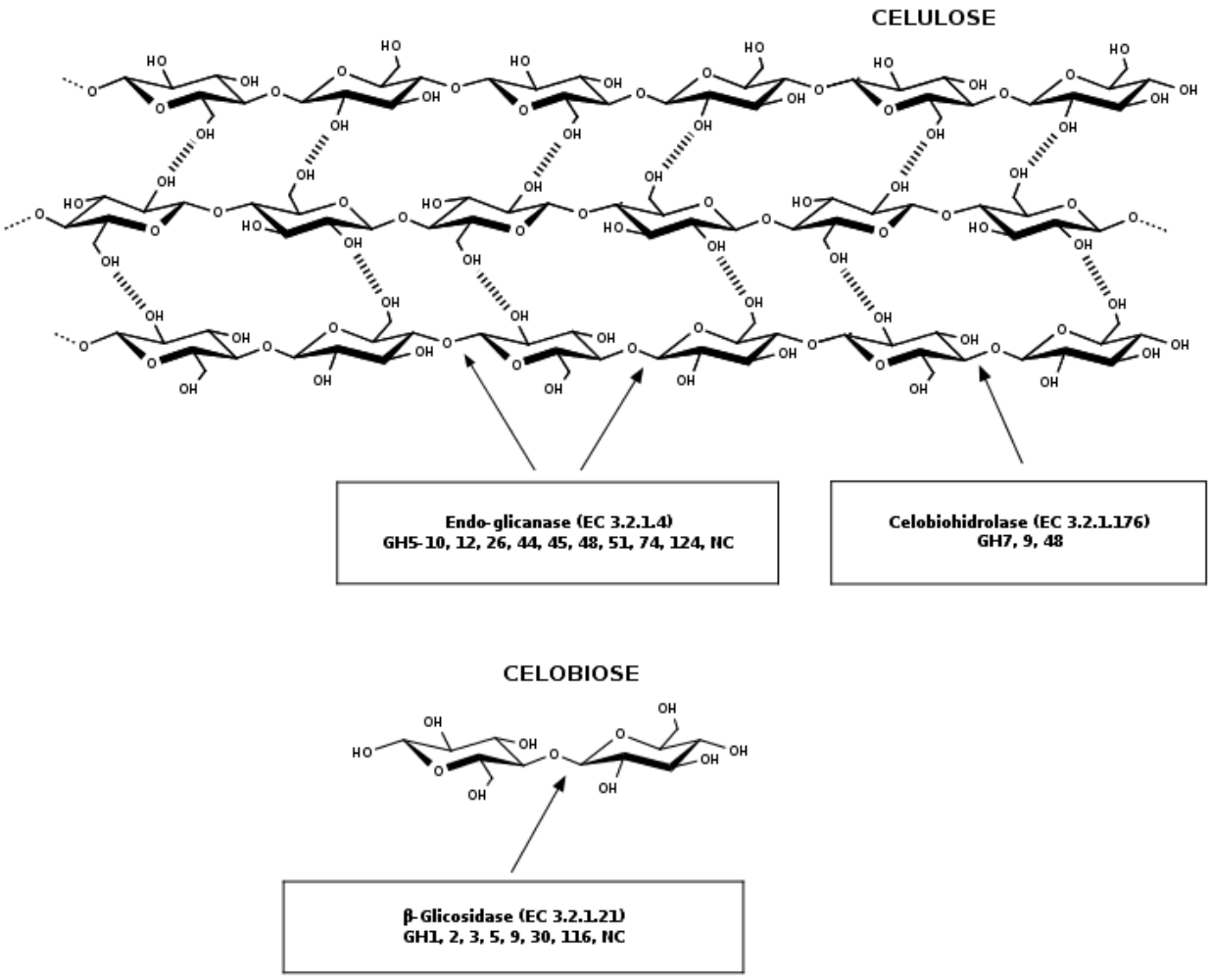


Figura 3. Celulose e celobiose, e enzimas hidrolíticas. A celulose é composta por cadeias de 1,4-β-D-glicana, as quais interagem por meio de ligações intermoleculares. A figura mostra ainda as enzimas que atuam na hidrólise da celulose e da celobiose. O esquema foi produzido utilizando-se o programa MarvinSketch 15.6.1. (NC = GHs ou CEs ainda não classificada)

1.3.2 Hemicelulose

Ao contrário da celulose, a hemicelulose possui estrutura variável e amorfa, sendo composta por heteropolímeros formados por resíduos de hexoses e pentoses, podendo ainda conter ácidos urônicos. Os polímeros que compõem a hemicelulose podem ser classificados de acordo com o açúcar que compõe a cadeia principal, a exemplo das xilanas (resíduos de β-D-xilose) e glicanas (β-D-glicose) (Pauly & Keegstra 2008), conectados geralmente através de ligações do tipo β(1→4).

Em monocotiledôneas comelinídeas (as quais incluem as gramíneas, como a cana-de-açúcar), a xilana é o principal componente da hemicelulose. Estudos indicam que a parede celular secundária de gramíneas é composta principalmente por um tipo específico de xilana, conhecido como glicoarabinoxilana (GAX) (20-40%), mas contém ainda outros componentes como a 1,3-1,4-β-D-glicana (BG) (2-15%), xiloglicana (XG) (2-5%) e glicomananas (GM) (0-2%). Da mesma forma, a parede celular primária, é composta majoritariamente por GAX (40-50%), podendo conter ainda uma pequena quantidade de GM (0-5%) (Scheller & Ulvskov 2010). As estruturas da GAX, BG e XG, são mostradas com detalhes nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente, bem como as enzimas responsáveis pela degradação desses componentes da hemicelulose.

A GAX é uma molécula linear de 1,4-β-D-xilana que apresenta cadeias laterais compostas por resíduos de α-L-arabinose, podendo ainda apresentar resíduos de ácido α-D-glicurônico e ácido 4-O-metil-α-D-glicurônico (Figura 4). Da mesma forma que ocorre com outros componentes da hemicelulose, a GAX pode conter grande quantidade de acetilações na cadeia principal, as quais têm demonstrado prejudicar a ação hidrolítica de endo-xilanases (Souza *et al*., 2013).

É comum também ocorrer a adição de ácido ferúlico às cadeias laterais de α-L-arabinose por meio de ligações éster, o que constitui outro fator de recalcitrância, pois é através do ácido ferúlico que a GAX se liga a outros componentes da hemicelulose e à lignina, neste último caso

formando os chamados complexos lignina-carboidrato (CLC) (Chundawat *et al*., 2011).

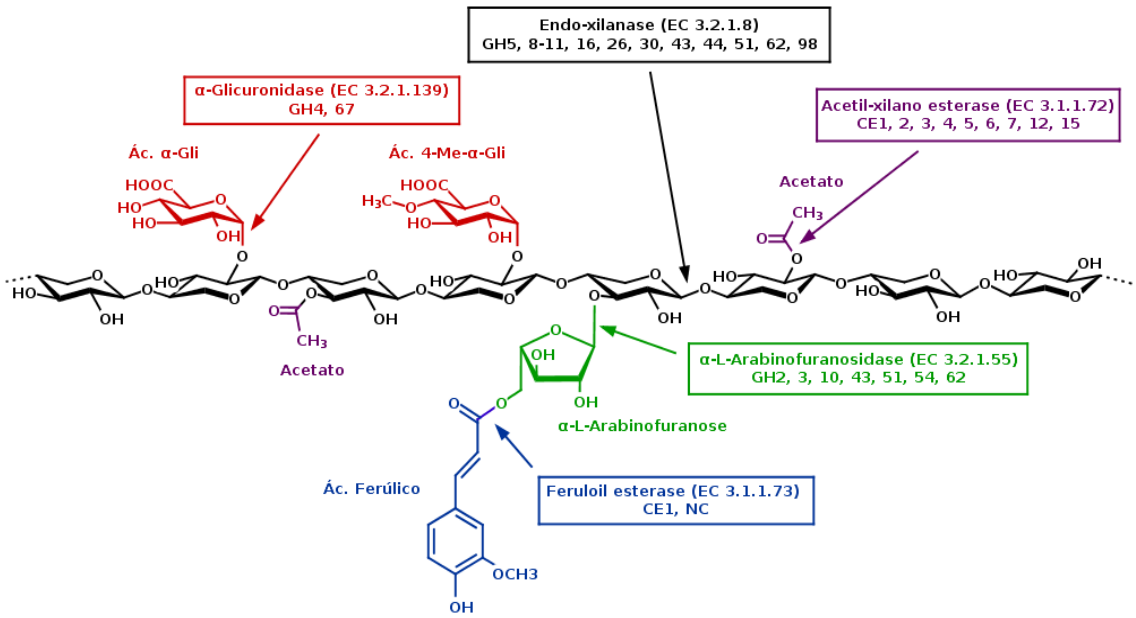


Figura 4. Estrutura da glicoarabinoxilana (GAX) e enzimas envolvidas na sua hidrólise. O esquema mostra a cadeia principal de 1,4-β-D-xilana (preto) com cadeias laterais de α-L-arabinfuranose (verde), ácido α-D-glicurônico (α-Gli) e ácido 4-O-metil-α-D-glicurônico (4-Me-α-Gli) (vermelho). É comum também a adição de ácido ferúlico (azul) às cadeias laterais de α-L-arabinfuranose e acetato (roxo) à xilana, por meio de ligações éster. São mostradas ainda as enzimas responsáveis pela desconstrução do GAX, as quais podem ser classificadas em GHs ou CEs (CAZy 2016), as setas indicam onde as ligações são rompidas. O esquema foi produzido utilizando o programa MarvinSketch 15.6.1 (NC = não classificada)

Depois da GAX, a BG é o polissacarídeos mais comum da hemicelulose de monocotiledôneas comelinídeas (Scheller & Ulvskov 2010), sendo constituída geralmente por unidades de três ou quatro resíduos de β-D-glicose (celotriosil e celotetrasil), unidos por ligações β(1→4) com ligações β(1→3) entre eles (Figura 5).

O XG, por sua vez, é menos expressivo que a BG e GAX na hemicelulose de comelinídeas, o XG mais comum nesse grupo de plantas é o XXGG (Scheller & Ulvskov 2010), formado por uma cadeia principal de 1,4-β-D-glicano contendo unidades repetitivas de quatro resíduos de β-

D-glicose, os dois primeiros possuindo cadeias laterias de α-D-xilose (X) e os dois últimos sem ramificações (G) (Figura 6).

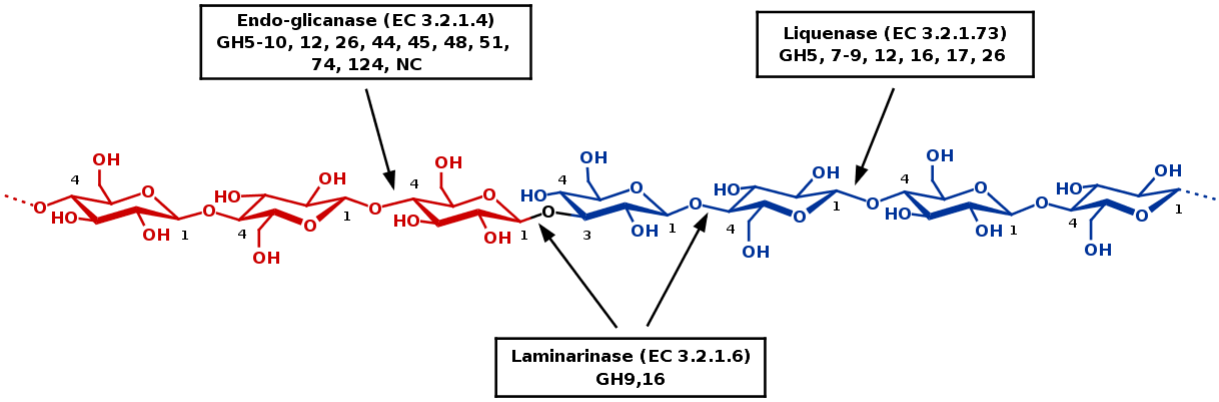


Figura 5. Representação da estrutura química da 1,3-1,4-β-D-glicana (BG) e enzimas hidrolíticas. São mostrados as unidades celotriosil (vermelho) e celotetrasil (azul) da BC, unidos por uma ligação β(1→3). Estão indicadas também as GHs que atuam na degradação do BG, endonucleases e liquenases atuam sobre as ligações β(1→4) e a enzima laminarinase hidrolisa ambas as ligações β(1→e) e β(1→4) (CAZy 2016). (NC = não classificada)

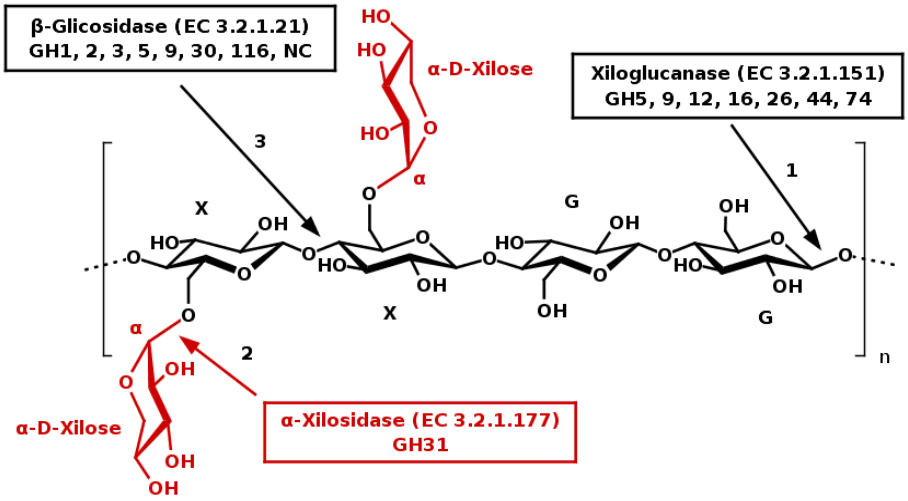


Figura 6. Esquema representando a estrutura repetitiva da xiloglicana mais comum em cana-de-açúcar (XXGG) e enzimas hidrolíticas. A xiloglicana mais comum em cana-de-açúcar é a XXGG, formada por unidades repetitivas de quatro resíduos de β-D-glicose, os dois primeiros possuindo cadeias laterias de α-D-xilose (vermelho) ligadas à cadeia principal de 1,4-β-D-glicana (preto) por meio de ligações do tipo α(1→6). São mostradas ainda as enzimas que agem na hidrólise da xiloglicana, de acordo com a sequência numérica mostrada, de forma que a α-xilosidase e a β-glicosidase atuam apenas após a despolimerização da xiloglocana em subunidades XXGG pela xiloglicanase (Eklöf 2011). (NC = não classificada)

1.3.3 Lignina

A lignina é outro importante constituinte da parece celular vegetal. Diferentemente da celulose e da hemicelulose, a lignina é uma molécula não sacarídica que apresenta natureza amorfa (heterepolimérica), com estrutura tridimensional altamente complexa e é sintetizada a partir da polimerização desidrogenerativa de três unidades monoméricas básicas (monolignóis): os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Yang *et al*., 2011). Depois da celulose, a lignina é o composto orgânico mais abundante na natureza e possui a função de conferir rigidez e resistência à parede celular vegetal, constituindo a principal defesa das plantas contra microrganismos. A lignina é capaz de adsorver enzimas hidrolíticas, dificultando o seu acesso à celulose e atuação enzimática. Além disso, a própria degradação da lignina provoca a liberação de compostos fenólicos capazes de inibir GHs e proteínas acessórias, contribuindo ainda mais para a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (Limayem & Ricke 2012).

1.4 Pré-tratamento

Em bioprocessos, a resistência natural da parede celular vegetal à degradação por microrganismos e enzimas é chamada de recalcitrância (Brethauer & Studer 2015). Para superar a recalcitrância da lignocelulose e obter açucares fermentescíveis, um processo de pré-tratamento é necessário como primeira etapa para a obtenção de etanol 2G. Geralmente, o objetivo do pré-tratamento é desestabiliza a estrutura da parede celular e aumentar o acesso das enzimas hidrolíticas aos polímeros de açúcar (Figura 7). Existem quatro categorias principais de pré-tratamentos: físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (Haghighi Mood *et al*., 2013). É comum métodos de diferentes naturezas serem empregados na fase de pré-tratamento, seja simultaneamente ou em etapas separadas.

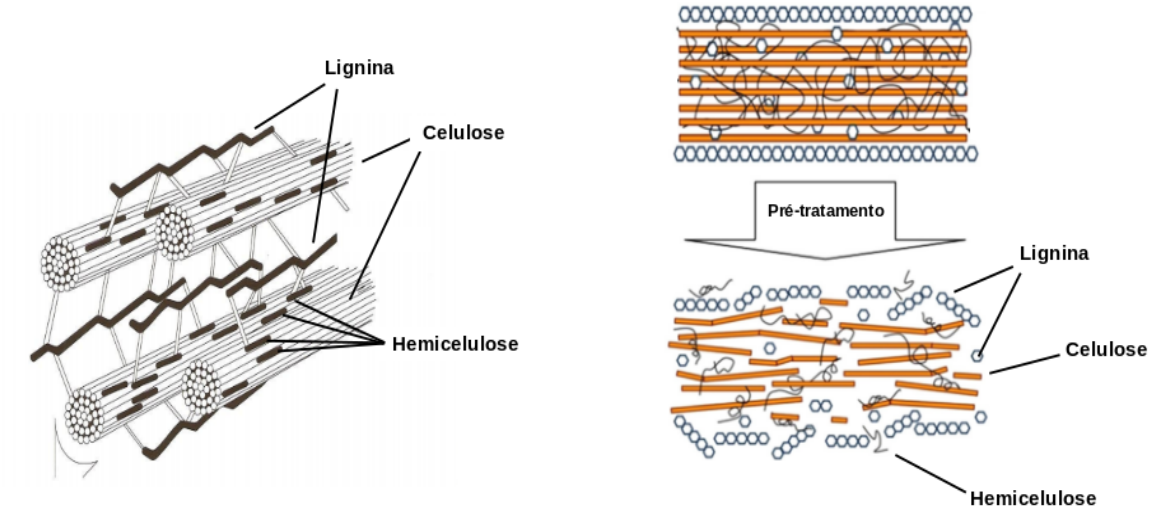


Figura 7. Estrutura da lignocelulose (esquerda) e o fracionamento dos seus polímeros (celulose, hemicelulose e lignina) através do pré-tratamento (direita).

1.4.1 Métodos de pré-tratamento físicos

O objetivo dos pré-tratamentos físicos, como moagem, corte, extrusão, congelamento e radiação é aumentar a área de superfície e reduzir o tamanho de partícula de materiais lignocelulósicos (Harun *et al*., 2011). Além disso, tais métodos levam à diminuição do grau de polimerização e descristalização da matéria-prima. O método físico mais empregado é a moagem, usada como primeira etapa de muitos processos de pré-tratamentos. Moagem de bolas, de discos, com martelos, ou moagem coloidal são técnicas comuns na indústria de etanol (Haghighi Mood *et al*., 2013). Dependendo da técnica empregada, o tamnho final das particupar pode compreender entre 0,2 e 30 mm (Sun & Cheng 2002).

1.4.2 Métodos de pré-tratamentos químicos

Uma diversidade de pré-tratamentos químicos são atualmente empregadas ou investigados, tal como ácido sulfúrico, ácido fosfórico, amônia, NaOH, líquidos iônicos e co-solventes orgânicos (Brethauer & Studer 2015).

1.4.2.1 Pré-tratamentos ácidos

O pré-tratamento químico do tipo ácido, em particular empregando ácido sulfúrico, é o mais usado para a biomassa lignocelulósica (Haghighi Mood *et al*., 2013) e tem o objetivo de preservar a maior percentagem de celulose na fração de sólidos totais, denominada de celulignina.

Em tal pré-tratamento, os polissacarídeos da parede celular (principalmente a hemicelulose), são hidrolisadas a monossacarídeos, levando a uma maior acessibilidade das enzimas à celulose. Os pré-tratamentos ácidos podem ser realizados com baixa concentração de ácido em altas temperaturas ou com altas concentrações de ácido em temperaturas mais amenas (Hendriks & Zeeman 2009). Industrialmente, o uso só ácido diluído é mais atrativo, uma vez que diminui a corrosão dos equipamentos e produz menos substância inibidoras da fermentação, tais como: inibidores do tipo furano, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e 2-furfuraldeído (2-FAL) (Pedersen *et al*., 2010; Almeida *et al*., 2007).

1.4.2.2 Pré-tratamentos alcalinos

A maior vantagem desse tipo de pré-tratamento é remover a lignina, grupos acetil, e ácidos urônicos que limitam o acesso das enzimas à celulose (X. Li *et al*., 2010). A solubilização da celulose e da hamicelulose empregando tal método é menor do que no pré-tratamento ácido . O pré-tratamento com NaOH é conhecido por induzir o “inchaço” da celulose, provocando o aumento da porosidade e área superficial da biomassa, causando também a quebra das ligações éster entre a lignina e a hemicelulose por meio de reações de saponificação (Sun & Cheng

2002). Os métodos alcalinos podem operar em temperaturas amenas e não requerem reações complexas (Haghighi Mood *et al*., 2013). No entanto, as principais desvantagens são o tempo de permanência prolongado (de horas a dias) e a necessidade de neutralização ou lavagem da mistura pré-tratada (M. Li *et al*., 2010). Hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio ($CaOH_2$) e amônia são os pré-tratamentos alcalinos mais empregados.

1.4.3 Métodos de pré-tratamentos físico-químicos

Os pré-tratamentos físico-químicos consitem geralmente em uma combinação de altas temperaturas (ou pressão) e agentes como vapor ou água, induzindo modificações estruturais mas também químicas na biomassa. A explosão a vapor é um exemplo desse tipo de pré-tratamento e consiste na quebra de componentes estruturais por aquecimento a vapor e cisalhamento, os quais induzem a auto-hidrólise das ligações glicosídicas (Haghighi Mood *et al*., 2013). Outro exemplo é o pré-tratamento hidrotérmico que emprega altas temperaturas (160 - 220 °C) e pressões para manter a água no estado líquido e em contato com a biomassa sem adição de agentes químicos ou catalizadores. No pré-tratamento hidrotérmico, a alta temperatura produz a auto-ionização da água, gerando íons hidrônio que atacam ligações éter na hemicelulose (Mosier *et al*., 2005). Ambos os pré-tratamentos de explosão a vapor e hidrotérmico são voltados para a degradação da hemicelulose, preservando a celulose na fase insolúvel.

1.4.4 Métodos biológicos de pré-tratamento

Os pré-tratamentos biológicos são métodos que empregam agentes vivos na decomposição da biomassa, sem adição de componentes químicos adicionais (Haghighi Mood *et al*., 2013). São técnicas “verdes”, que utilizam microrganismos (especialmente fungos)

para converter a lignocelulose em compostos mais acessíveis para a hidrólise e subsequente produção de etanol 2G. Uma maior eficiência entre os pré-tratamentos biológicos tem sido atingido com os fungos de podridão negra, uma vez que os fungos de podridão branca atacam principalmente a celulose (Chen *et al*., 1995; Dashtban *et al*., 2010). De acordo com Mood *et al.,*, 2013, dentre os fungos de podridão negra conhecidas, o mais eficiente para o pré-tratamento da biomassa pertence à espécie *Phanerochaete chrysosporium* (Haghighi Mood *et al*., 2013). Apesar do baixo consumo de energia, a não necessidade de instalações complexas ou adição de agentes químicos, os pré-tratamentos biológicos ainda enfrentam muitas dificuldades de implementação que impedem sua aplicação industrial, tais como: o tempo de processamento, necessidade de grandes áreas e monitoramento contínuo do crescimento microbiano (Wyman *et al*., 2005).

1.5 Degradação enzimática dos polímeros da parede celular vegetal

Uma vez pré-tratada, a biomassa lignocelulósica é submetida a etapa de sacarificação ou hidrólise enzimática a partir de um conjunto de enzimas contidas em coquetéis enzimáticos que agem em sinergismo e que atuam em condições específicas e limitadas.

A desconstrução enzimática dos polissacarídicos da biomassa vegetal até açucares ferentescíveis (frações C5 e C6) envolve a ação de basicamente duas grandes classes de enzimas, denominadas de glicosídeo hidrolases (GHs) e carboidrato esterases (CEs).

Enzimas GHs são enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas em polissacarídeos naturais, produzindo mono- ou oligossacarídeos (Yang *et al*., 2011). Elas são classificadas em diferentes famílias, de acordo com a sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional do domínio catalítico (Yeoman *et al*., 2010). Atualmente,

esse sistema de classificação compreende 133 famílias (GH1-133), organizadas em 14 diferentes clãs (Lombard *et al*., 2014). As CEs, por sua vez, hidrolisam ligações éster presentes nos componentes da parede celular, liberando acetato e compostos fenólicos (Yeoman *et al*., 2010). A classificação das CEs compreende atualmente 16 famílias (CE1-16) e segue princípios semelhantes àqueles empregados para as GHs (Lombard *et al*., 2014).

Uma grande diversidade de GHs é geralmente necessária para a sacarificação completa ou parcial da biomassa vegetal. Enzimas que atuam na degradação da celulose, por exemplo, agem hidrolisando ligações glicosídicas do tipo β(1→4) entre resídios de β-D-glicose, tal como as endo-glicanases (EC 3.2.1.4) e celobiohidrolases (EC 3.2.1.176), além de β-glicosidases (EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose produzida pelas duas primeiras enzimas (Figura 3). Recentemente, uma nova classe de enzimas fúngicas capazes de degradar a celulose foi descoberta, denominadas de monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO). As LPMO são metaloenzimas dependentes de cobre que produzem radicais livres em seu sítio ativo, os quais atuam na oxidação das ligações β(1→4) da celulose, em sua forma cristalina principalmente (Morgenstern *et al*., 2014).

A converção da hemicelulose exige a utlização tanto de GHs quanto de CEs. A degradação do GAX fica a cargo das endo-xilanases (EC 3.2.1.8), α-glicuronidases (EC 3.2.1.139), α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72) e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (Figura 4). As enzimas endo-glicanases (EC 3.2.1.4), liquenase (EC 3.2.1.73) e laminarinase (EC 3.2.1.6) agem sobre a BG (Figura 5). Outras enzimas atuam ainda na hidrólise da XG, como a xiloglucanase (EC 3.2.1.151) (Figura 6), e do GM, a exemplo da β-mananase (EC 3.2.1.78).

A degradação enzimática da lignina, por sua vez, é desempenhada principalmente por enzimas oxidorredutoras tais como lacases (EC

1.10.3.2) e peroxidases de alto poder redox como as manganês peroxidases (EC 1.11.1.13) (Martínez *et al*., 2005).

1.6 Endo-xilanases

Como já abordado, grande parte a da parede celular vegetal de cana-de-açúcar é composta por xilana (GAX), de forma que as enzimas endo-xilanases são de extrema importância na degradação dessa biomassa. As endo-xilanases são enzimas hemicelulolíticas (hemicelulases) que realizam a endo-hidrólise da β-1,4-D-xilana (EC 3.2.1.8), a exemplo da GAX (Collins *et al*., 2005; Lombard *et al*., 2014). Devido à sua grande variedade estrutural, as endo-xilanases são classificadas em 14 diferentes famílias (GH5, 8-11, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62, 98) (Lombard *et al*., 2014; CAZy 2016), sendo as da família GH11 consideradas como endo-xilanases “verdadeiras”, pois possuem alta especificidade de substrato, apresentando pouca ou nenhuma ação sobre outros componentes da hemicelulose.

1.6.1 Endo-xilanases da família GH11

A GH11 é uma das famílias de GHs mais bem caracterizadas e é constituída apenas por endo-xilanases. As GH11, por serem atamente específicas e bastante caracterizadas, são largamente empregadas em processos industriais (Paës *et al*., 2012). Além de possuírem potencial para agir na conversão da lignocelulose para a produção de etanol 2G e subprodutos, endo-xilanases GH11 possuem uma série de outras aplicações. Elas são geralmente empregadas na clarificação de sucos, na fabricação de pães, na indústria de rações e produção de xilo-oligosacarídeos (XOs) (Paës *et al*., 2012; Vázquez *et al*., 2000). Tais enzimas são empregadas ainda na indústria de papel, durante o branqueamento da poupa celulósica, processo que demanda tanto

enzimas termoestáveis como tolerantes a condições alcalinas, pois ocorrem em temperaturas de até 80 °C e pH acima de 10,0 (Ruller *et al*., 2014).

As endo-xilanases GH11 possuem um dobramento característico conhecido como β-sanduíche, o qual consiste em duas folhas β (A e B) com cadeias antiparalelas formando uma estrutura côncava de duas camadas em volta do sítio catalítico (Collins *et al*., 2005). A folha β A é formada de seis cadeias β, nomeadas de A1 até A6, e a folha β B por nove cadeias β, nomeadas de B1 à B9, podendo algumas GH11 não possuir todas as quinze cadeias.

Apenas uma hélice α está presente na estrutura da GH11, posicionada próximo à face hidrofóbica da folha β B. A estrutura como um todo lembra o formato de uma mão direita, de maneira que as folhas β A e B formam regiões conhecidas como “dedos” e “palma”, e a região de volta entre as cadeias β B7 e B8 é conhecida com “polegar”. Alguns autores fazem ainda referência a uma região denominada de “corda”, localizada entre as cadeias β B5 e B9 (Figura 8).

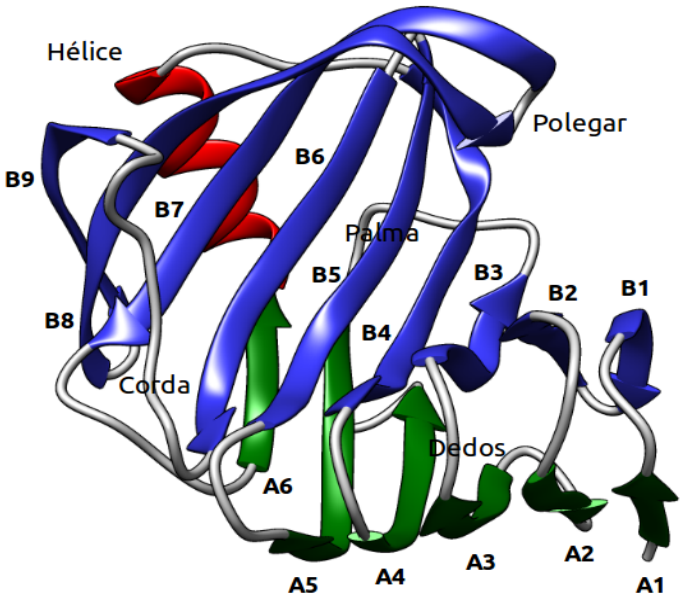


Figura 8. Dobramento característico das endo-xilanases GH11, conhecido como β-sanduíche. Na figura, a folha β A é mostrada em verde e a folha β B em azul. A região contendo a hélice α (Hélice), ao fundo, está representada em vermelho. Outras regiões caracteríticas das GH11 são também indicadas (Dedos, Palma e Polegar). A figura foi gerada utilizando o programa UCSF Chimera (Pettersen *et al*., 2004) (PDB: 2VUJ).

1.7 Termoestabilidade enzimática

A utilização de enzimas é uma prática comum na indústria química e de bioprocessos tecnológicos (Sanchez & Demain 2011). Além da produção de biocombustíveis, as enzimas possuem uma vasta gama de aplicações, que vão desde a síntese de medicamentos e intermediários farmacêuticos até a composição de biossensores eletroquímicos. No entanto, boa parte dos biocatalisadores naturais não tolera as condições nas quais os processos industriais ocorrem, tais como: (i) valores extremos de pH, temperatura ou salinidade; (ii) presença de solventes orgânicos, fluidos supercríticos ou líquidos iônicos; e (iii) presença de inibidores naturais das enzimas produzidos ao longo do processo (Polizzi

et al., 2007; Silveira *et al*., 2012; Ilmberger *et al*., 2012; De Giuseppe *et al*., 2014). Dessa forma, um grande esforço tem sido empregado na otimização de processos enzimáticos sob condições extremas (Illanes *et al*., 2012; Liszka *et al*., 2012). Uma especial atenção tem sido atribuída à obtenção de enzimas estáveis em temperaturas elevadas, devido às vantagens que tais enzimas são capazes de conferir aos processos, incluindo àqueles que ocorrem em condições amenas (Yeoman *et al*., 2010).

A estabilidade enzimática pode ser definia como a capacidade de uma enzima preservar sua conformação nativa (ou enovelada) sob a influência de forças disruptivas (Yeoman *et al*., 2010). Quando a ação desestabilizante ocorre devido ao aumento de temperatura, se trata então de termoestabilidade. O processo de desnaturação térmica pode se dar tanto reversível quanto irreversivelmente, dependo da temperatura e de fatores estruturais intrínsecos que definem a termoestabilidade de uma enzima (Stepankova *et al*., 2013; Gomes *et al*., 2007).

A desnaturação reversível é ocasionada pela quebra das ligações não-covalentes (ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, eletrostáticas, etc.) que estabilizam a enzima e é caracterizada por um equilíbrio entre os estados nativo e desenovelado (ou parcialmente desenoelado) (Daniel *et al*., 1996; Paës *et al*., 2012). No entanto, além da ruptura de interações, pode ocorrer também a exposição ao solvente de resíduos que compõem o núcleo hidrofóbico, levando à agregação proteica, desnaturação irreversível e consequente inativação definitiva da enzima (Figura 9) (Paës *et al*., 2012).

Muitas vezes as duas formas de desnaturação estão interrelacioandas, mas referem-se a processos diversos e, por isso, são quantificados de maneira diferente (Polizzi *et al*., 2007). A desnaturação reversível (ou desdobramento) está relacionado à chamada estabilidade termodinâmica (ou conformacional) e pode ser acessada por parâmetros como a energia livre de desdobramento (ΔG_u) e a temperatura de

desnaturação (T_m) da enzima. O processo de desnaturação irreversível (ou agregação), por sua vez, está relacionado à estabilidade cinética e é comumente medido pelo valor da constante de inativação (k_d) ou pelo tempo de meia-vida da enzima ($\tau_{1/2}$) em uma determinada temperatura (Stepankova *et al*., 2013; Polizzi *et al*., 2007).

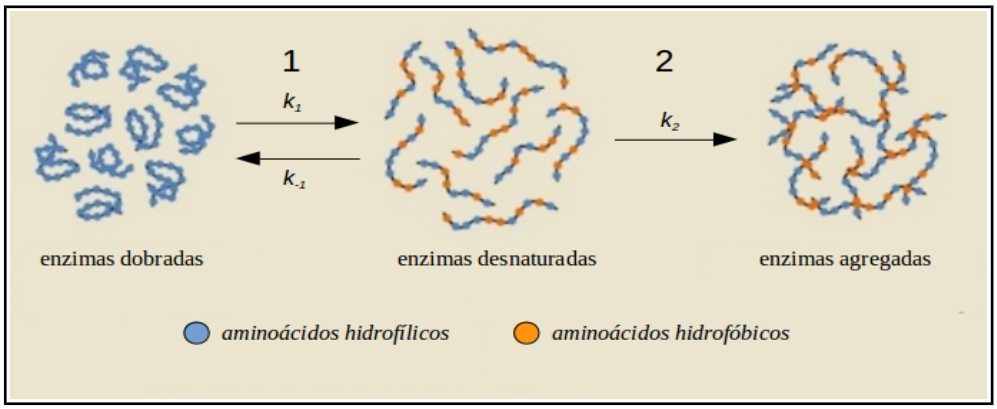


Figura 9. Esquema representando as reações de desdobramento (1) e agregação (2). Quando em temperaturas elevadas, as enzimas podem sofrer desnaturação reversível (desdobramento), induzida pela ruptura das interações não-covalentes, ou desnaturação irreversível (agregação), causada pela exposição dos aminoácidos do núcleo hidrofóbico da molécula (Kumar *et al*., 2000)

O advento da tecnologia do DNA recombinante possibilitou o desenvolvimento de diversas abordagens de termoestabilização de enzimas baseadas em técnicas de clonagem molecular e mutagênese. Além de permitir a obtenção de biocatalizadores mais eficientes, esses estudos têm fornecido informações importantes para a determinação dos mecanismos estruturais que governam a termoestabilidade enzimática (Yu & Huang 2014; Murakami *et al*., 2005; Dumon *et al*., 2008; Yeoman *et al*., 2010; Ruller *et al*., 2014).

Embora os mecanismos moleculares envolvidos na termoestabilização de enzimas não sejam ainda completamente

entendidos, é possível perceber algumas características gerais associadas a esse processo. Segundo Sziágy & Závodszky, 2000, enzimas termofílicas, apesar de similares as enzimas mesofílicas em estrutura primária e terciária, possuem geralmente um conteúdo maior de hélices α e folhas β (Gomes *et al*., 2007; Szilágyi & Závodszky 2000). Além disso, outros fatores apontados como capazes de conferir termoestabilidade são: (i) o aumento do empacotamento hidrofóbico, (ii) o maior número de interações envolvendo resíduos carregados (Radestock & Gohlke 2011; Vieille *et al*., 2001), (iii) o ancoramento das extremidades N- e C-terminal (Sterpone & Melchionna 2012), e o (iv) aumento da acessibilidade ao solvente (Ruller *et al*., 2008). De acordo com Radestock & Gohlke, 2011, essas adaptações têm a capacidade de induzir uma maior rigidez estrutural sem comprometer, porém, a motilidade de regiões funcionais como o sítio ativo (Radestock & Gohlke 2011).

1.8 Vantagens das aplicações de GHs termoestáveis para tecnologias do E2G

A conversão da lignocelulose pré-tratada em escala industrial requer a utilização de coquetéis enzimáticos produzidos comercialmente para o E2G, compostos majoritariamente por GHs, e produzidos por fungos filamentosos tais como *Aspergillus* sp., *Trichoderma reesei* e *Penicilium ps.*. A etapa de pré-tratamento que antecede a etapa de hidrólise, geralmente é concuida em temperatura acima de 100 °C. Para o segundo estágio de hidrólise, há necessidade de resfriamento do processo até 50 °C, e a adição dos coquetéis enzimáticos comerciais. Assim, são importantes os estudos de coquetéis de enzimas termofílicas para serem aplicadas nesta etapa, pois diminuiram os custos e o tempo do resfriamento até as condições atualmente empregadas. Além disso, enzimas presentes nesses coquetéis devem ser capazes de operar por

longos períodos de incubação, sendo a termoetabilidade altamente requisitada nesse tipo de bioprocesso.

Enzimas termoestáveis conferem uma série de vantagens ao processo em questão, entre as quais podemos citar: (i) maior atividade específica, permitindo diminuir a quantidade de enzima empregada no processo; (ii) a possibilidade de armazenamento em condições ambientes, diminuindo os custos com refrigeração; e (iii) a redução significativa dos riscos de contaminação microbiana, devido à possibilidade de se operar em temperaturas mais elevadas (Viikari *et al*., 2007). Por esses motivos, um grande esforço tem sido empregado no sentido de se obter GHs mais estáveis sob altas temperaturas (Yeoman *et al*., 2010).

1.9 Estudos para a obtenção de endo-xilanases GH11 termoestáveis

Endo-xilanases GH11 termoestáveis têm sido obtidas través de diversas bordagens experimentais, tais como: (i) bioprospecção, através de métodos dependentes e independentes de cultivo; (ii) evolução dirigida, combinando mutagênese aleatória e triagem funcional; e (iii) adição de grupos glicosídicos (glicosilação), induzida por expressão em células de levedura.

1.9.1 Bioprospecção e evolução dirigida na termoestabilidade de xilanases

Dumon *et al.,*, 2008 clonaram mais de 200 endo-xilanases a partir de uma grande diversidade de amostras de solo, dentre as quais selecionaram uma endo-xilanase GH11 ambiental termoestável (XAT) (GenBank: EU591742) com o domínio catalítico de 194 resíduos (21,2 kDa), temperatura ótima de aproximadamente 65 °C e T_m igual a 76,2 °C (Dumon *et al*., 2008). A XAT apresenta 87% de similaridade com a GH11

de *Holomastigotoides mirabile* (GenBank: AB469374). A partir do gene da XAT selvagem, empregando mutagênese por saturação (GSSM^{TM}) e triagem funcional, foram identificadas 15 mutações pontuais promissoras (T4L, S9P, Q10S, T13F, T13Y, N14H, Y18F, S25E, N30V, Q34C, Q34H, Q34L, S35E, S71T, e S194H), capazes de aumentar o valor de T_m da enzima em 1-8 °C. Realizando todas as combinações possíveis, empregando a tecnologia *GeneReassembly*, foi então construída uma biblioteca contendo possivelmente 12.288 mutantes únicos. Uma segunda triagem realizada a 86 °C para 4 x 10^4 clones da biblioteca revelou a presença de 200 clones com termoestabilidade aumentada. Uma varredura final a 90 °C identificou uma variante hipertermoestável da XAT (XAT^{M7}) contendo 7 mutações (S9P, T13F, N14H, Y18F, Q34L, S35E, e S71T), que apresentou temperatura ótima de aproximadamente 75 °C e T_m estimado em 101,1 °C. Em ensaios de termotolerância, a XAT^{M7} foi capaz de reter quase 100% de sua atividade inicial após 60 min de incubação a 73 °C, enquanto que a XAT reteve apenas aproximadamente 13,53 % após 5 min na mesma temperatura.

A partir de isolados obtidos da coleção BGSC (*Bacillus Genetic Stock Center*, Columbus – EUA), Ruller *et al.,*, 2006 realizaram a expressão heteróloga e caracterização de uma endo-xilanase GH11 de *Bacillus subtilis* (XBS) (GenBank: WP_003231377). A XBS possui 185 resíduos (22 kDa), os valores ótimos de pH e temperatura estimados foram de aproximadamente 6,5 e 55 °C, respectivamente (Ruller *et al*., 2006). Posteriormente, combinando as técnicas de *error prone PCR* (EP-PCR) e *DNA shuffling*, Ruller *et al.,*, 2008 obtiveram mutantes da XBS com valores aumentados de temperatura ótima em relação à enzima nativa. Dentre essas variantes, a mais termoestável (XBS^{M4}) apresentou quatro mutações (Q7H, G13R, S22P e S179C) e temperatura ótima em torno de 75 °C (Ruller *et al*., 2008). Recentemente, empregando as mesmas técnicas, Ruller *et al.,*, 2014 produziram mutantes termoestáveis e tolerantes a condições alcalinas, de forma que a melhor mutante

selecionada (XBS^{M8}) apresentou oito mutações (Q7H, G13R, S22P, S31Y, T44A, I51V, I107L e S179C), temperatura ótima de 80 °C, e pH igual a 8,0 (Ruller *et al*., 2014). Nesses estudos, a termoestabilidade foi atribuída principalmente ao aumento da acessibilidade ao solvente e melhor empacotamento do núcleo hidrofóbico.

1.9.2 Glicosilação e termoestabilidade de xilanases

Qu & Shao, 2011 realizaram a primeira expressão heteróloga em *Escherichia coli* e caraterização de uma GH11 obtida de *Bacillus pumilus* (XBP) (GenBank: WP_041109430). Segundo os autores, a forma madura da enzima possui um domínio catalítico de 207 resíduos (23 kDa), com atividade ótima em pH 6,6 e temperatura 50 °C. Quando incubada a 60 °C ao longo de 2 h, a XBP reteve menos de 20% de sua atividade inicial (Qu & Shao 2011). A obtenção de uma XBP termoestável e alcalofílica foi realizada por Thomas *et al.,*, 2014, os quais realizaram a expressão heteróloga da enzima em *Kluyveromyces lactis*. A XBP expressa em *K. lactis* apresentou atividade máxima no intervalo de temperatura de 50-60 °C e pH 9-10, a enzima foi capaz de reter 100% da sua atividade após incubação a 60 °C durante 1 h, se mantendo ativa por mais 4 horas com 23 % de atividade residual na mesma temperatura (Thomas *et al*., 2014). Uma possível explicação para o aumento da termoestabilidade da XBP expressa em *K. lactis* pode ser a ocorrência de glicosilações realizadas pela levedura, tal como descrito para outras proteínas (Zhou *et al*., 2011).

1.10 Otimização de interações eletrostática (OIE)

Além dos métodos experimentais descritos anteriormente, outra forma de obter enzimas termoestáveis é realizando estudos de otimização estrutural com base em simulações moleculares (Damborsky & Brezovsky 2014). Ultimamente, tem se verificado que interações entre resíduos

carregados constituem um fator determinante para a estabilidade proteica (Schweiker & Makhatadze 2009). De fato, comparando proteínas homologas de organismos mesofílicos e termofílicos, é possível perceber que as últimas tendem a apresentam uma maior quantidade de interações eletrostáticas, a maioria localizadas na superfície proteica (Makhatadze *et al*., 2003; Schweiker & Makhatadze 2009). Além disso, interações entre resíduos carregados parecem também estar envolvidas na estabilização de proteínas obtidas por meio de evolução dirigida (ED) (Wunderlich *et al*., 2005; Wunderlich & Schmid 2006). Sendo assim, alguns estudos envolvendo o planejamento de enzimas termoestáveis têm focado na otimização de interações eletrostáticas (OIE), de maneira a melhorar a distribuição de cargas da molécula, a maioria desses trabalhos envolve o emprego de simulações computacionais (Schweiker & Makhatadze 2009).

O modelo teórico mais empregado para descrever essas interações é o Tanford–Kirkwood, corrigido com um termo de acessibilidade ao solvente (TK-SA) (Tanford *et al*., 1957). Segundo o TK-SA, a molécula de proteína é representada como uma esfera de baixa constante dielétrica e impenetrável ao solvente, e os grupos carregados são representados como cargas pontuais, ocupando posições fixas nessa esfera (Figura 10).

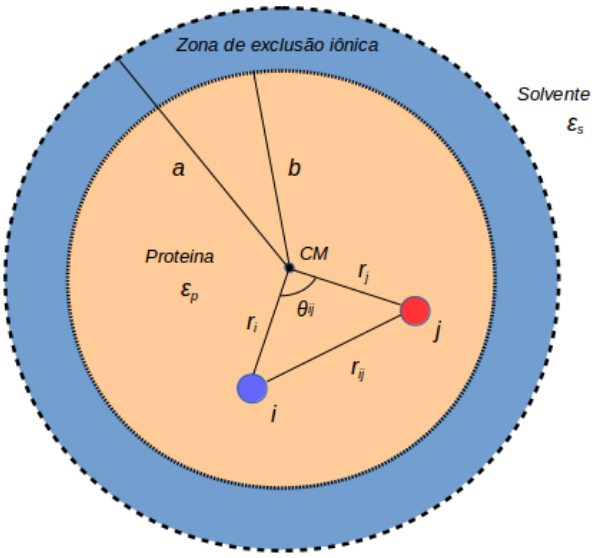


Figura 10. Representação esquemática do modelo TK-SA de interação entre resíduos carregados. A proteína é representada pela esfera central de constante dielétrica ε_p, raio *b* e centro de massa CM. Ela está inserida em uma esfera maior de raio *a*, que representa a zona de exclusão iônica. Estas duas esferas estão imersas em água, representada pela constante dielétrica ε_s. Os parâmetros r_i , r_j, e θ_{ij}, descrevem a posição relativa em relação ao CM das cargas *i* e *j*, separadas uma da outra por uma distância r_{ij}.

O modelo TK-SA é baseado na física clássica (lei de Coulomb) e permite obter as energias de interação eletrostática (E_{ij}) entre cada par de carregado, de forma que:

$$E_{ij} = e^2 \left(\frac{A_{ij} - B_{ij}}{2b} - \frac{C_{ij}}{2a} \right) \cdot \left(1 - SA_{ij} \right) \qquad (1)$$

onde *e* é a unidade de carga, *b* é o raio da esfera que representa a proteína e está relacionado com o tamanho da mesma, e *a* é o raio da zona de exclusão iônica.

Os termos A_{ij}, B_{ij}, and C_{ij} são definidos por Tanford & Kirkwood, 1957 (Tanford *et al*., 1957): A_{ij} representa a energia entre as cargas no ambiente de baixa constante dielétrica (interior proteico, ε_p = 4), B_{ij} reflete a contribuição de ambos os ambientes de baixa e alta constantes dielétricas (solvente, ε_s = 78.5 para a água), e C_{ij} descreve a força iônica

do solvente. A acessibilidade média ao solvente dos resíduos *i* e *j* é representada pelo termo SA_{ij}, descrito previamente por Ibarra-Molero *et al.,*, 1999 (Ibarra-Molero *et al*., 1999).

O termo SA_{ij} aplica penalidades energéticas às cadeias laterias carregadas que compõem o núcleo proteico, as quais tendem a ser desestabilizantes devido ao efeito hidrofóbico (Strickler *et al*., 2006). Os valores de E_{ij} calculados através da Equação 1 permitem estimar a energia livre de interação eletrostática (ΔG_{qq}) global, bem como para cada resíduo carregado da proteína, derivação esta que foge do escopo desta revisão.

O primeiro passo para se estabilizar proteínas por meio da abordagem de OIE é calcular ΔG_{qq} para os resíduos da molécula selvagem, empregando-se o modelo TK-SA. A seguir, são realizadas análises Monte Carlo (MC) para selecionar mutantes com maior estabilidade (com base no valor de ΔG_{qq} global). Após isso, um novo cálculo de ΔG_{qq} por resíduo é realizado para as variantes selecionadas, sendo esses valores confrontados com os obtidos para a proteína selvagem. Assim, resíduos com interações desfavoráveis ($\Delta G_{qq} > 0$) podem ser então substituídos por outros de carga neutra ou oposta, tornando a enzima mais estável. Devido ao termo SA_{ij}, as mutações estabilizantes se restringem basicamente à superfície proteica, tal como observado experimentalmente (Ruller *et al*., 2008; Ruller *et al*., 2014). Essa metodologia de evolução *in silico* tem sido aplicada com sucesso na estabilização de proteínas como ubiquitina (Loladze & Makhatadze 2002), α-lactalbumina (Permyakov *et al*., 2005), acilfosfatase (Gribenko *et al*., 2009) e proteínas de choque térmico (Makhatadze *et al*., 2004; Motono *et al*., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a necessidade de estudos e obtenção de enzimas mais eficazes frente às condições adversas de temperatura empregadas na indústria do E2G, no presente trabalho, realizamos a validação experimental preliminar de uma abordagem *in silico* para a otimização de endo-xilanases GH11 com foco na termoestabilidade. O desenvolvimento de GHs termoestáveis tem o potencial de impactar positivamente a economia do bioetanol. Espera-se que, futuramente, o processamento enzimático da biomassa possa ser empregado tanto para a produção de biocombustíveis quanto para a obtenção de substâncias de relevância industrial, como pentoses, hexoses (denominados de carboidratos de segunda geração), xilo-oligômeros e celu-oligômeros (pré-bióticos e nutracêuticos).

Esses subprodutos da ação de GHs e CEs podem ser explorados como uma alternativa para diminuir os custos elevados que atualmente limitam a viabilidade das chamadas “biorrefinarias”, as quais permitirão obter, além de etanol E2G, compostos químicos (xilitol e ácidos orgânicos para a indústria química), além de outros a partir da biomassa, ao invés do petróleo (Yeoman *et al*., 2010).

Uma vez que as enzimas representam por volta de 25% do custo total da produção de E2G, novas estratégias para reduzir a carga enzimática devem ser explorados. Ou seja, são necessárias mais eficientes, específicas e resistentes às condições industriais. Existem, atualmente, uma diversidade de métodos de otimização de enzimas, sendo que a maioria emprega técnicas de biologia molecular, modificando-as geneticamente e melhorando sua propriedades. Diversos estudos experimentais buscaram a obtenção de endo-xilanases GH11 termoestáveis através da evolução dirigida (ED) ou mutagênese sítio-específica (Dumon *et al*., 2008; Ruller *et al*., 2014; Cheng *et al*., 2015). Entretanto, apesar de bem-sucedidos, tais métodos experimentais

envolvem altos custos e também tempo experimental. Por isso, os métodos computacionais vêm surgindo como uma alternativa para aprimorar o processo de melhoramento de enzimas. Sendo assim, buscamos com esse trabalho, validar experimentalmente a eficácia da *in silico* de otimização de interações eletrostáticas (OIE) utilizando o método TA-SA para a termoestabilidação de GHs, algo ainda não realizado para essa classe de enzimas.

Assim, esperamos com esse trabalho contribuir para o entendimento dos princípios estruturais relacionais à termoestabilidade das enzimas GH11, bem como avaliar a relevância das interações eletrostáticas nesse processo.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi a avaliação da termoestabilidade e possível aplicação biotecnológica de endo-xilanases GH11 obtidas através de otimização *in silico*.

Os objetivos específicos foram:

1 - Realizar a expressão em *Escherichia coli* e purificação das enzimas XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$.

2 - Caracterizar bioquimicamente e biofísicamente as enzimas por meio da determinação dos valores ótimos de pH e temperatura, parâmetros cinéticos (K_m e K_{cat}), tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$), perfil de dicroísmo circular (DC) e cálculo da temperatura de desnaturação (T_m).

3 - Realizar a suplementação enzimática do coquetel comercial (Celluclast®) na hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar (bagaço) de forma a avaliar o impacto da mutação K99E em períodos longos de incubação e temperaturas altas de bioprocesso.

4 - Realizar novas simulações de TK-SA para cálculo de ΔG_{qq} global e por resíduo nas condições ótimas obtidas experimentalmente.

5 - Relacionar os resultados experimentais aos dados *in silico*, de forma a avaliar a abordagem de OEI como uma metodologia factível para o melhoramento de endo-xilanases GH11.

4 MÉTODOS

4.1 A obtenção e a estratégia para o estudo das endo-xilanases GH11 mutantes

Simulações empregando a abordagem de EIO realizadas previamente no Departamento de Física da UNESP/São José do Rio Preto apontaram três resíduos críticos (K99, R122 and K154) para o aumento da termoestabilidade da XBS através da substituição de cargas. Nesse trabalho avaliamos o impacto da mutação K99E na termoestabilidade da XBS selvagem (XBS^{WT}) e de uma variante dessa enzima obtida através de evolução dirigida por Ruller *et al.,*, 2008 e Ruller *et al.,*, 2014 contendo seis mutações (Q7H, S22P, T44A, I51V, I107L e S179C), a qual denominamos de XBS^{M6}. Sendo assim, ao todo, quatro enzimas foram avaliadas: XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6}, $XBS^{M6+K99E}$ (Figuras 11 e 12).

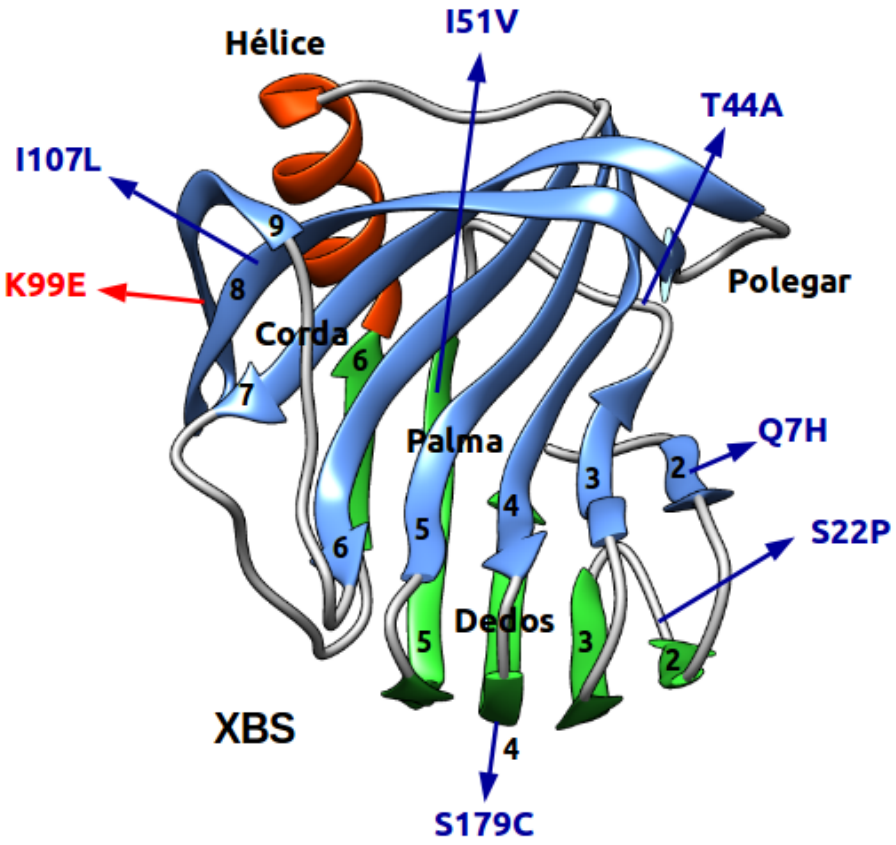


Figura 11. Estrutura da endo-xilanases GH11 de *B. subtilis* (XBS) e substituições avaliadas no trabalho. As setas indicam as posições das substituições presentes nas enzimas mutantes que foram avaliadas nesse estudo, provenientes de estudos de evolução dirigida (azul) e a substituição K99E (vermelho), proveniente de simulações de OIE. A estrutura cristalográfica da XBS foi determinada por Murakami *et al.,*, 2005 (Murakami *et al*., 2005) (PDB: 1XXN), a enzima possui o dobremento típico de outras GH11 mas não possui as cadeias β A1 e B1.

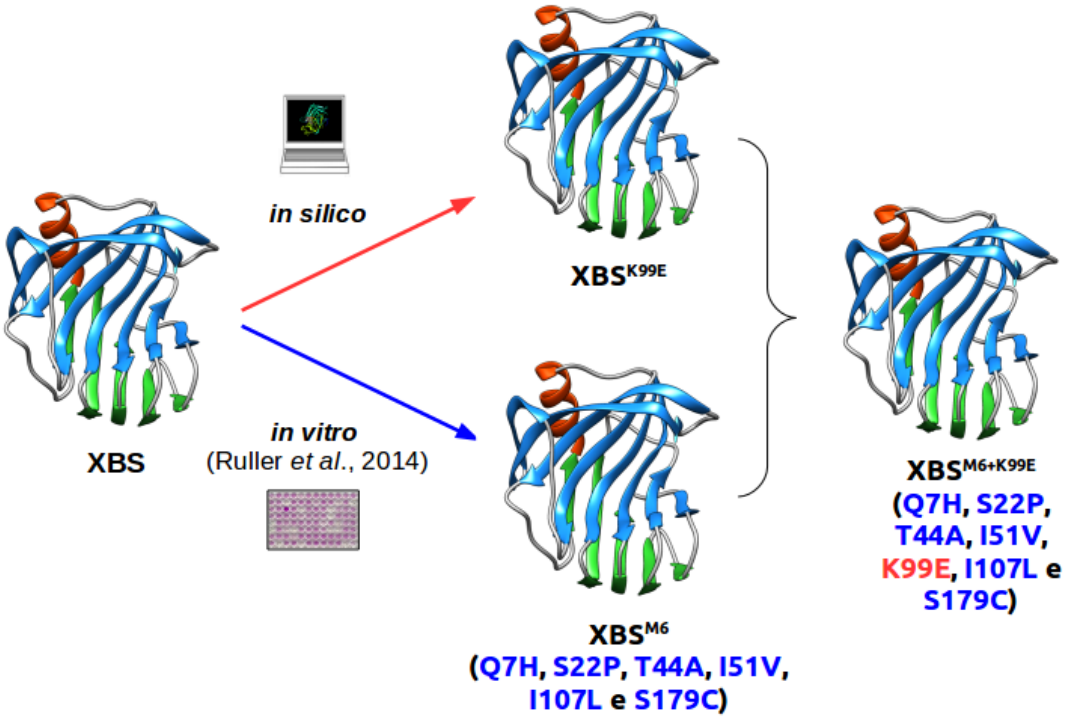


Figura 12. Fluxograma representando as GH11s de *B. subtilis* avaliadas através desse trabalho. Em vermelho estão indicadas as mutações planejadas *in silico* e em azul as mutações obtidas em estudos *in vitro* envolvendo mutagênese aleatória e triagem funcional (evolução dirigida) (Ruller *et al.,* 2008; Ruller *et al.,* 2014).

4.2 Fluxograma experimental

O fluxograma da Figura 13, abaixo, oferece uma visão geral das etapas que serão desempenhadas nesse estudo.

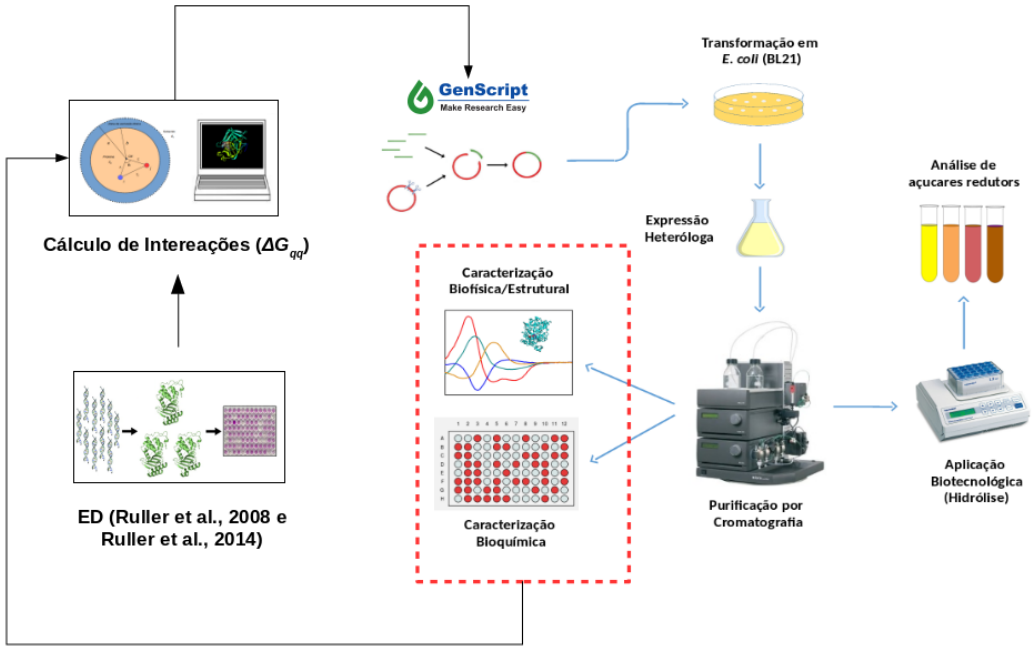


Figura 13. Fluxograma ilustrando as etapas do trabalho. Simulações de TK-SA mostraram que enzimas melhoradas através de evolução dirigida (ED) por Ruller *et al.*,, 2008 e Ruller *et al.*,, 2014 possuem energias de interação eletrostática reduzidas, resolvemos então melhorar enzimas através da substituição de cargas. Uma vez determinada a mutação a ser avaliada (K99E), realizamos a síntese e clonagem dos genes através de um serviço terceirizado (GenScript®). As enzimas XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$ foram expressas, purificadas, e caracterizadas bioquímica e biofisicamente. Após isso, realizamos testes de suplementação enzimática no processo de hidrólise da biomassa, seguindo-se das análises de açucares redutores.

4.3 Expressão em *Escherichia coli* das endo-xilanases recombinantes

Os genes das enzimas foram sintetizados e ligadas ao vetor de expressão pET28a(+) (serviço terceirizado GenScript, EUA). Tais vetores foram utilizados para transformar linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2. Após o cultivo em meio sólido, as colônias transformadas foram

inoculadas em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido contendo 10 µL dos antibióticos canamicina (30 mg/mL) e cloranfenicol (40 mg/mL), e então incubadas *overnight* sob agitação de 250 rpm a 37° C (pré-inóculo). Em seguida, o pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio LB líquido contendo 500 µL de canamicina (30 mg/mL) e incubado sob agitação de 250 rpm a 37° C. A densidade ótica (DO) do meio foi acompanhada periodicamente até atingir entre 0,6 e 0,8, quando assume-se que as células estão em fase exponencial de crescimento. Após atingirem a fase exponencial, as células foram induzidas a produzir as enzimas recombinantes através da adição de 250 µL de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1 M. Após a quarta hora de indução, as células foram centrifugadas a 6500 G por 30 min a 4° C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado (*pellet*) ressuspendido em 10 mL de tampão imidazol A (imidazol 20 mM, NaCl 300 mM, fosfato monobásico 25 mM e fosfato dibásico 25 mM pH 7,4) e armazenado a -20 °C.

4.3.1 Análise de expressão das endo-xilanases

Para a avaliação da expressão ao longo do tempo (*timecourse*), foram coletadas alíquotas de 1 mL de meio de cultura logo antes da indução (0 h), e nos tempos 2 h e 4 h após a indução para análise via eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (Schägger & von Jagow 1987).

4.4 Extração das enzimas recombinantes

Para extração das enzimas, cada 10 mL de *pellet* ressuspendido foram tratados com 400 µL de lisozima (20 mg/mL) e 100 µL de inibidor de protease PMSF (100 mM) sob agitação de 20 rpm por 20 min a temperatura ambiente. A sonicação das células foi realizada utilizando-se 30 % da capacidade do aparelho (Sonics®), foram empregados 18 ciclos de sonicação no gelo com pulsos de 10 s e intervalos de 10 s entre cada pulso. O lisado celular obtido a partir da sonicação foi centrifugado a

10.000 g por 30 min a 4° C e o sobrenadante extraído.

4.5 Purificação por cromatografia

A purificação das enzimas a partir do sobrenadante obtido na etapa anterior foi realizada através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) em coluna de níquel-sefarose, utilizando-se purificador AKTA FPLC (GE Healthcare®) a 0,3 MPa de pressão e 0,5 mL/min de fluxo. A eluição foi feita por meio de um gradiente de imidazol a 1,0 mL/min, por meio do aumento gradual da concentração (v/v) de tampão imidazol B (imidazol 500 mM, NaCl 300 mM, fosfato monobásico 25 mM e fosfato dibásico 25 mM pH 7,4) na fase móvel. As amostras da cromatografia de afinidade consideradas puras por verificação em SDS-PAGE foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em filtros Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter (Millipore) com poros de 10 kDa até o volume ser reduzido a cerca de 2 mL. As amostras de proteínas purificadas foram quantificadas empregando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).

4.6 Caracterização bioquímica

4.6.1 Valores ótimos de pH e temperatura

Para a determinação do pH ótimo das enzimas, empregamos os sistemas de tampões: ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M (pH 4,0 – 6,5), fosfato monobásico/fosfato dibásico 0,1 M (pH 7,0 – 8,0), tris/HCl 0,1 M (pH 8,5) e glicina/NaOH 0,1 M (pH 9 e 9,5). A temperatura escolhida para os ensaios de pH foi 50 °C. O perfil de atividade enzimática em diferentes temperaturas foi obtida em no melhor pH de cada uma das enzimas, entre 20 e 80 °C. Como substrato utilizamos xilana comercial obtida de madeira de faia (Sigma-Aldrich®). Os ensaios enzimáticos foram feitos em

triplicata e a atividade de endo-xilanase quantificada empregando-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). O volume final de microreação empregado foi de 100 µL, sendo 50 µL de substrato (xilana 1%), 45 µL de tampão e 5 µL de solução enzimática. A concentração de enzima final empregada foi de 0,019 µM para XBS^{WT} e XBS^{K99E}, e 0,037 µM para XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$. O tempo de reação empregado foi de 10 min, após o qual se deu a adição de 100 µL de DNS e fervura a 99 °C por 5 min, seguindo-se do resfriamento e leitura da absorbância a 540 nm. Os ensaio foram feitos em microplaca de 96 poços incubadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems®).

4.6.2 Avaliação da termotolerância bioquímica

Avaliamos também o decaimento da atividade enzimática ao longo do tempo nas condições industriais de hidrólise da biomassa. Para isso, cada uma delas foi incubada na concentração de 0,1 mg/mL em banho térmico durante 48 horas a 50 °C, em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 4,8). Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 1, 4, 8, 36 e 24 h, as quais foram empregadas para avaliação da atividade em xilana (1%), nas mesmas condições de incubação. Finalmente, estimamos o valor do tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$) ajustando os dados de atividade à um modelo de decaimento exponencial, segundo a equação:

$$A(t) = A_o e^{(-ct)} \quad (2)$$

onde $A(t)$ é a atividade relativa expressa em porcentagem em um determinado tempo t, A_o é a atividade inicial (100 %) e c a constante que determina a velocidade do decaimento.

A partir de tal modelo, $\tau_{1/2}$ pode ser obtido através da seguinte relação:

$$\tau_{1/2} = (\ln 2)/c \quad (3)$$

A obtenção de $\tau_{1/2}$ e todos os outros parâmetros experimentais (bioquímicos ou biofísicos) determinados nesse trabalho foi feita empregando o método dos mínimos quadrados (MMQ) (Marquardt 1963), implementado através da biblioteca Matplotlib da linguagem de programação Python 2.7 em sistema operacional Linux Ubuntu 16.04.

4.6.3 Determinação de parâmetros cinéticos das endo-xilanases

A caracterização bioquímica das enzimas foi realizada também por meio do cálculo de parâmetros de cinética enzimática. Os ensaios foram realizados nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima, os volumes de substrato, tampão e solução enzimática empregados foram os mesmo descritos na seção anterior. Para obtenção dos valores das constantes foram utilizadas 12 concentrações diferentes de substrato (0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 3,13; 5,00; 6,25; 10,00; 12,50; 20,00 e 25,00 mg/mL), o tempo de reação foi de 10 min.

Os parâmetros cinéticos foram determinados pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo hiperbólico de Michaelis-Menten:

$$V_o = \frac{V_{máx} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

onde V_o é a velocidade inicial de reação, $V_{máx}$ a velocidade máxima, [S] a concentração de substrato e K_m a constante de Michaelis-Menten.

A constante catalítica de cada enzima (k_{cat}) pôde então ser obtida pela seguinte relação:

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E]_T} \quad (5)$$

onde $[E]_T$ é a concentração de enzima em cada reação.

4.6.4 Efeito da adição de cátions e EDTA sobre a atividade enzimática

O efeito da adição de cátions mono e bivalentes sobre a atividade enzimática, foi avaliado na presença de $MgCl_2$, $CuCl_2$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, $NiCl_2$, KCl, NaCl, $MnCl_2$, LiCl, $CoCl_2$, bem como de EDTA. Após incubação prévia da enzima com cada composto, o substrato foi adicionado à mistura de reação. O tempo de reação empregado foi de 10 min, a reação se deu nas condições ótimas de cada enzima, o volume final foi de 100 µL, sendo 50 µL de substrato (xilana 1%), 35 µL de tampão, 10 µL de solução iônica e 5 µL de solução enzimática. A concentração final dos íons foi de 10 mM, a concentração final de enzima empregada foi de 0,019 (XBS^{WT} e XBS^{K99E}) e 0,037 µM (XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$), os demais procedimentos foram realizados tal como descritos anteriormente, na determinação das condições ótimas de pH e temperatura. Os resultado foram expressos na forma de atividade relatia (%), considerando como 100% a atividade da enzima nas condições ótimas sem adição de íons ou EDTA.

4.7 Caracterização biofísica

Os experimentos de CD foram realizados utilizando-se o espectropolarímetro Jasco® acoplado a um sistema de controle de temperatura *peltier*, em cubetas de 1 mm de caminho ótico, com a concentração da enzima variando de 0,2 a 0,3 mg/mL. Os espectros

foram obtidos através da média de 20 acumulações no intervalo de 195 a 260 nm, com velocidade de escaneamento de 100 nm/min, largura de banda de 2 nm. Para o cálculo da temperatura de desnaturação térmica (T_m), foi feito o monitoramento da elipticidade residual molar a 220 nm ao longo de um gradiente aumentado de temperatura, no intervalo de 20 a 90 °C, empregando uma taxa de aquecimento de 1 °C min^{-1}. As análises de CD foram realizadas tanto nas condições de purificação (20 °C, em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,4) como nas condições industriais de hidrólise enzimática (50 °C, citrato de sódio 20 mM, pH 4,8), nas concentrações de proteína de 0,2 e 0,3 mg/mL, respectivamente. Para a conversão de elipticidade para elipticidade residual molar [θ], utilizamos a seguinte equação:

$$[\theta] = \frac{0{,}1 \times CD}{\left(\left(\frac{c}{MM}\right) \times (n_r - 1) \times l\right)} \qquad (6)$$

onde $[\theta]_\lambda$ é a elipticidade residual molar em um dado comprimento de onda λ, *CD* é o sinal de dicroísmo circular em miligraus, *c* é a concentração da proteínas em g/L, *MM* é a massa molar em Da (g/mol), n_r é o número de resíduos da molécula e *l* o caminho óptico da cubeta (1 mm).

Para estimar T_m, ajustamos os valores de [θ] obtidos ao longo do gradiente de temperatura a uma função sigmoide, dada por:

$$[\theta]_T = \left([\theta]_u - [\theta]_f\right) / \left(1 + e^{\left(-k\left(T - T_m\right)\right)}\right) + [\theta]_f \qquad (7)$$

onde $[\theta]_T$ é a elipticidade residual molar a uma data temperatura *T*, onde $[\theta]_u$ é o valor médio de $[\theta]_t$ no estado nativo da enzima, $[\theta]_f$ é o valor médio de $[\theta]_t$ no estado desnaturado e *k* é a constante que indica o quão bruscamente a transição de estado ocorre.

Expressamos também os resultado na forma de fração desnaturada (F_d), empregando a equação:

$$F_d = ([\theta]_f - [\theta]_T)/([\theta]_f - [\theta]_u) \quad (8)$$

Finalmente, com posse dos valores de k e T_m, podemos ajustar os valores de F_d a seguinte equação simóide:

$$F_d = 1/(1 + e^{(-k(T - T_m))}) \quad (9)$$

4.7.1 Termotolerância biofísica

Realizamos também experimentos de termotolerância biofísica, com o objetivo de acompanhar o perfil de estrutura secundária das enzimas ao longo do tempo. Para isso obtemos espectros entre 200 e 260 nm nas condições de hidrólise enzimática (50 °C, citrato de sódio 20 mM, pH 4,8) ao longo de aproximadamente 120 horas. Além dos perfis, acompanhamos também o valor mínimo de elipticidade residual molar (a 220 nm) ao longo do tempo ($[\theta]_t$) e calculamos o valor da diferença entre o seu valor final e inicial ($\Delta[\theta]_t$), enzimas com menor $\Delta[\theta]_t$ foram consideradas mais termotolerantes.

4.8 Ensaios de suplementação da hidrólise enzimática (sacarificação enzimática)

Visando a aplicação biotecnológica das endo-xilanases termoestáveis, bem como a comprovação da eficiência e vantagens da mutação K99E para o processo de hidrólise enzimática, foi realizado a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado a 130 ºC durante

30 min com 15 % NaOH m/v. Este pré-tratamento (realizado em colaboração) originou um bagaço com composição de 58,6 % de celulose; 22,1 % de hemicelulose; 8,8 % de lignina, 10 % de cinzas e com umidade de 8,27%. Os ensaios foram realizados com 5% de sólidos totais em tubos de 2 mL na presença de tampão citrato 50 mM pH 4,8.

4.8.1 Determinação da concentração enzimática para suplementação

Para o teste de dose-resposta de cada enzima (XBS^{WT} , XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{K99E+M6}$) foram avaliadas as concentrações: 1µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 200 µg/mL. Para isso, adicionamos 0,01 FPU (*Filter Paper Unit*) do coquetel comercial (Celluclast®) em 50 mg de bagaço, totalizando uma dosagem enzimática de 0,2 FPU por grama de bagaço pré-tratado. As amostras foram incubadas em termomisturador (Epperdorf®) com agitação de 1000 rpm a 50 ºC por 24 h. Por fim, empregamos o método de DNS (MILLER 1959) para estimar a quantidade de açucares redutores totais (ART) liberados.

4.8.2 Ensaio de suplementação do coquetel comercial Celluclast®

Com a finalidade de determinar qual enzima possui maior interação com o coquetel comercial auxiliando no aumento da liberação de açúcares, realizamos uma suplementação de 0,01 FPU do coquetel comercial com 200 µg/mL das enzimas recombinantes (XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{K99E+M6}$), de forma individual. Para isso, adicionou-se 200 mg/mL de enzima e uma dosagem de 0,2 FPU de coquetel comercial por g de bagaço pré-tratado (0,2 FPU/g). Em seguida, as reações foram incubadas por 24 h em termomisturador (Epperdorf®) com agitação de 1000 rpm a 50 ºC por 24 h. A detecção de açucares redutores torais (ART) foi feita também através do método de DNS. Como controle, foram realizados ensaios de hidrólise contendo apenas 0,2 FPU/g de coquetel

industrial e também individualmente com cada enzima recombinante a 200 µg/mL.

4.9 Novas simulações de TK-SA

As primeiras análises de TK-SA foram realizadas em pH 6,0 e 300 K (~ 25 ºC) uma vez que não se tinha conhecimento das condições ótimas das enzimas. Sendo assim, terminada a fase experimental do trabalho, realizamos novas simulações nas condições de hidrólise (pH 4,8 e 50 ºC) e também nas condições de máxima atividade obtidas. Para isso geramos estruturas de homologia através do programa Modeller v9.18 empregando como estrutura molde a XBS^{WT} (PDB: 1XXN). Posteriormente, calculou-se os valores de ΔG_{qq} por resíduo e global através do servidor TKSAMC, disponível em http://tksamc.df.ibilce.unesp.br/.

5 RESULTADOS E DISCUSSÂO

5.1 Expressão heteróloga das endo-xilanases GH11

Após a síntese (GeneScript-USA) das enzimas GH11 geradas por evolução *in silico*, foram realizados em nosso laboratório a transformação, multiplicação e sequenciamento para confirmação das sequencias. As expressões recombinantes da enzima XBS^{WT} e mutantes (XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$) foram feitas em células de *E. coli* BL21 (4 horas, a 37 °C e 250 rpm). As análises em gel SDS-PAGE revelaram que a indução por IPTG foi bem sucedida, como mostrado na Figura 14.

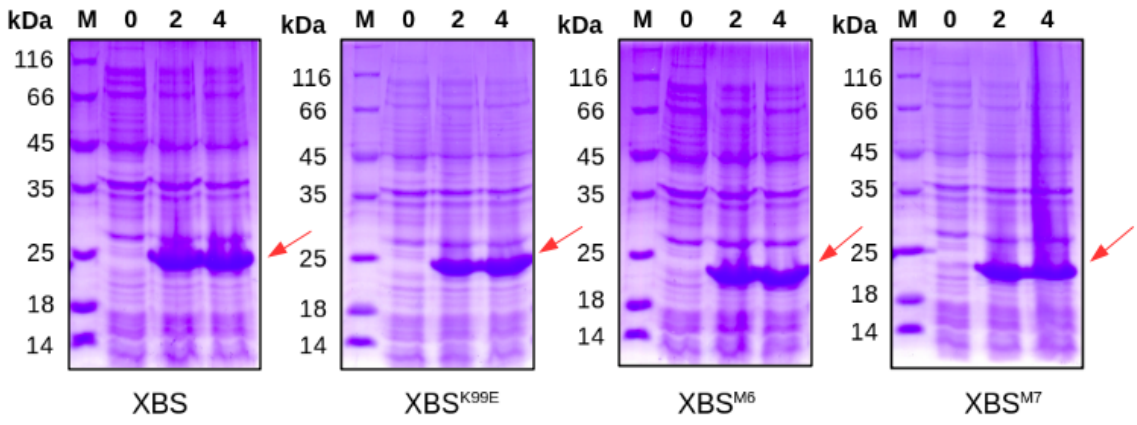


Figura 14. Expressão de XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$. Na figura, 0, 2 e 4 indicam zero, duas e quatro horas após indução, respectivamente. A banda deferente às enzimas recombinantes pode ser vista logo abaixo de 25 kDa, indicadas pelas setas vermelhas.

Após quatro horas de indução, as enzimas selvagens e mutantes foram superexpressas nas condições testadas, como por ser visto na Figura 14. Ao menos com base na análise de SDS-PAGE, não houve diferença perceptível no nível de produção das enzimas.

5.2 Purificação das endo-xilanases por cromatografia de afinidade IMAC

O protocolo de purificação empregado permitiu obter uma expressiva quantidade das enzimas na forma solúvel, o que foi o suficiente para a caracterização das mesmas. A análise de SDS-PAGE das frações purificadas (Figuras 15 e 16) indicou que as amostras correspondentes às enzimas recombinantes apresentaram um grau de pureza adequado para os ensaios bioquímicos e biofísicos.

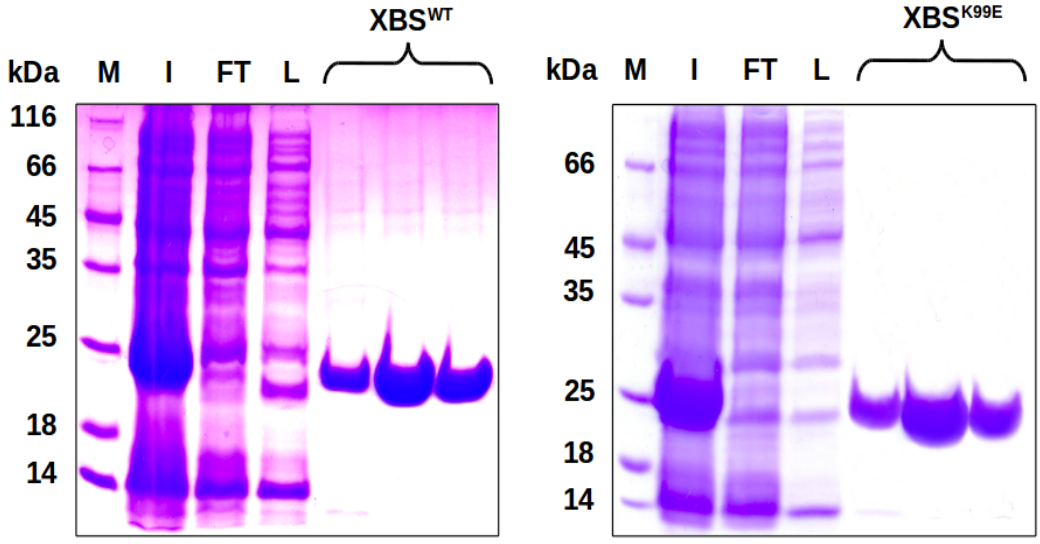


Figura 15. Purificação por cromatografia de afinidade de XBS^{WT} e XBS^{K99E}. Na figura, M, I, FT e L indicam, respectivamente: o marcador de peso molecular, a mostra injetada na coluna de purificação, a fração não retida pela coluna ou *flow through* e a fração desligada da coluna após lavagem. A três últimas frações representam as enzimas XBS^{WT} (esquerda) e XBS^{K99E} (direita) purificadas.

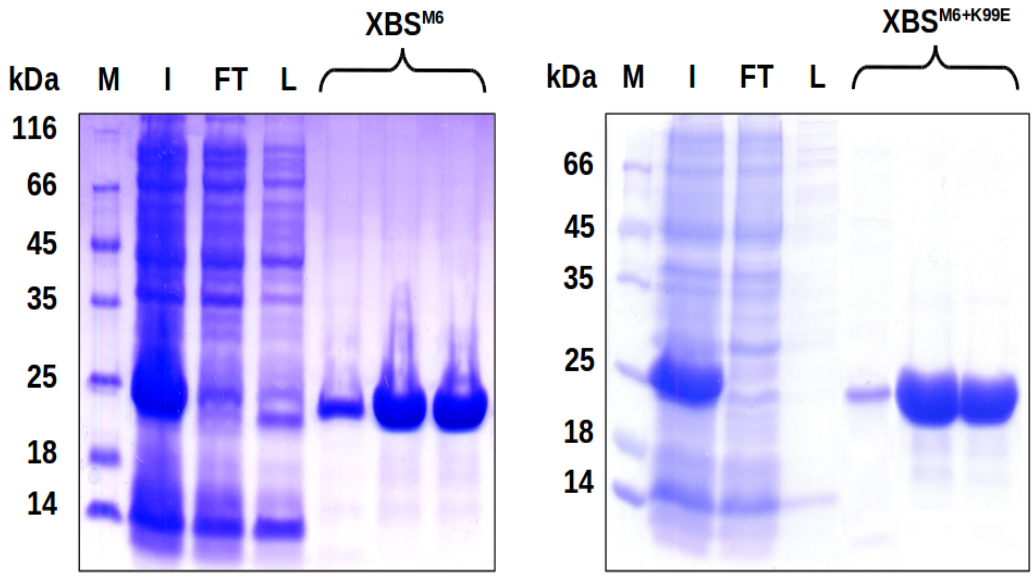


Figura 16. Purificação por cromatografia de afinidade de XBS^{M6} e XBS$^{M6+K99E}$. Na figura, M, I, FT e L indicam, respectivamente: o marcador de peso molecular, a mostra injetada na coluna de purificação, a fração não retida pela coluna ou *flow through* e a fração desligada da coluna após lavagem. A três últimas frações representam as enzimas XBS^{M6} (esquerda) e XBS$^{M6+K99E}$ (direita) purificadas.

Com base nos géis de purificação é possível notar que a cromatografia de afinidade em coluna de níquel foi eficiente na recuperação de enzimas a partir do lisado bruto de células provenientes dos ensaios de expressão. É possível notar que a fração não retida pela coluna (FT) possui apenas traços das proteínas de interesse, em todos os casos. Sendo assim, os protocolos de expressão e purificação empregados mostraram ser extremamente eficientes, permitindo obter grande quantidade de proteína na forma solúvel, o que foi suficiente para as etapas de caracterização e aplicação biotecnológica.

Após a purificação, se deu a concentração das enzimas através de ultrafiltração em 4 ºC e 10000 g. Após essa etapa, as enzimas foram novamente submetidas à análise de SDS-PAGE para verificação qualitativa do grau de pureza final das amostras (Figura 17).

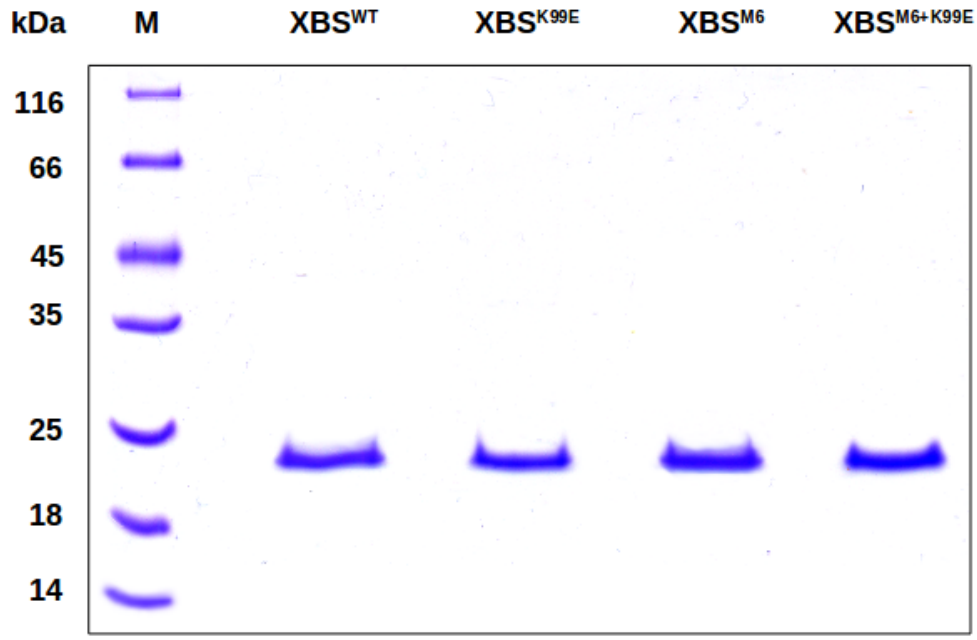


Figura 17. Análise de SDS-PAGE das enzimas após reunião das frações de purificação. Para esta análise, as frações purificadas foram reunidas e concentradas através de ultrafiltração até o volume de aproximadamente 2 mL. Após isso, as amostras foram diluídas para a concentração de 0,3 mg/mL e então analisadas.

Como é possível observar (Figura 17), as enzimas recombinantes produzidas neste protocolo, mostraram um grau de pureza adequado para os ensaios de bioquímica e biofísica e, sendo assim, deu-se prosseguimento à fase de caracterização das endo-xilanases.

5.3 Caracterização bioquímica das endo-xilanases GH11

5.3.1 Condições ótimas de pH e temperatura

Ensaios de pH e temperatura ótimos foram realizados no intuito de avaliar qual o impacto da mutação K99E nessas propriedades. Como ilustrado na Figura 18, notamos que a mutação K99E não foi capaz de induzir nenhuma mudança significativa nas condições ótimas de pH e temperatura das enzimas avaliadas. Todas as enzimas apresentaram pH ótimo em aproximadamente 6,0. A temperatura ótima de XBS^{WT} e XBS^{K99E} foi de 50 °C, enquanto que XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$ apresentaram máxima

atividade em 60 °C. Esse deslocamento é devido à termoestabilidade da XBS^{M6} que, tal como já descrito, foi otimizada previamente através de técnicas experimentais (Ruller *et al.,* 2008 e Ruller *et al.,* 2014) (Figura 18).

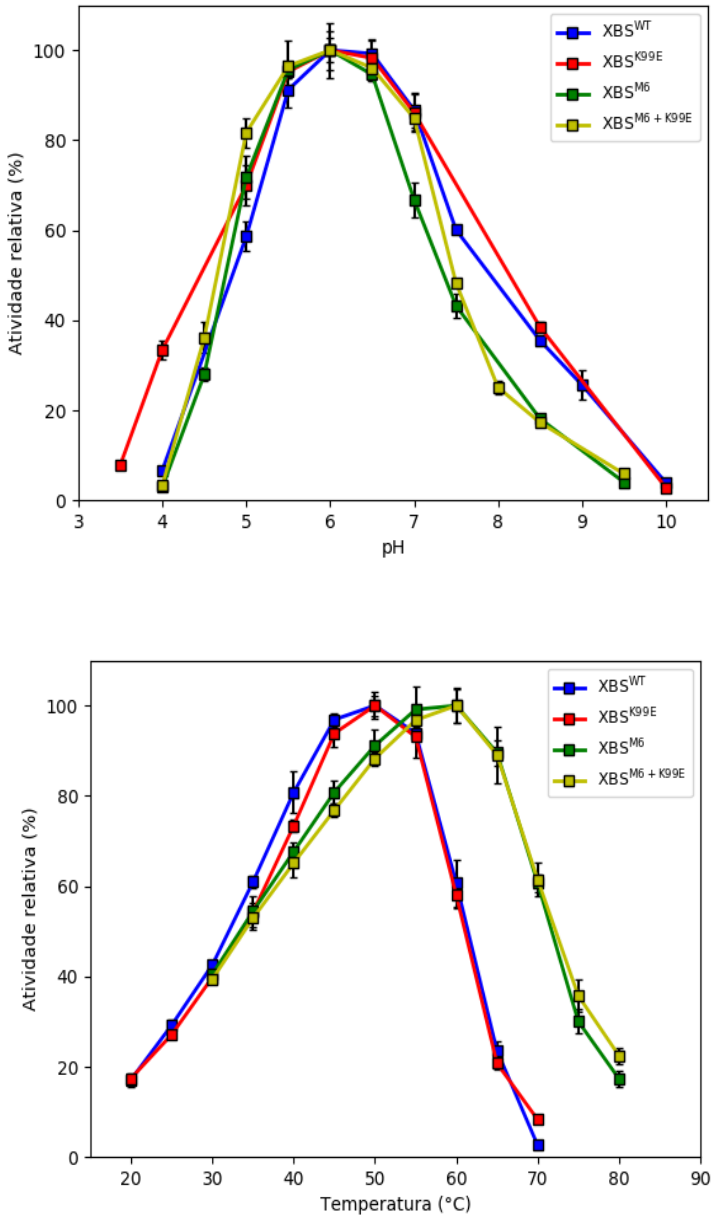


Figura 18. Caracterização das condições ótimas de pH e temperatura. As mutantes XBS^{K99E} e $XBS^{M6+K99E}$ apresentaram as mesmas condições ótimas de pH e temperatura de XBS^{WT} (pH 6,0 e 50 °C) e XBS^{M6} (pH 6,0 e 60 °C), respectivamente. Os ensaios de pH foram realizados em 50 °C (condições de hidrólise) e os ensaios de temperatura em pH 6,0 (pH ótimo das enzimas).

O fato do pH ótimo não ter sido alterado já era esperado, uma vez que a mutação feita está posicionada na superfície da proteína e não envolve o microambiente do sítio catalítico. Entretanto, esperava-se visualizar algum deslocamento para mais no valor de temperatura ótima de XBS^{K99E} em relação à XBS^{WT} e de $XBS^{M6+K99E}$ em relação a XBS^{M6}.

5.3.2 Termotolerância bioquímica

Uma vez verificado que a mutação K99E não induz aumento perceptível na temperatura de máxima atividade das enzimas XBS^{WT} e XBS^{M6}, resolvemos avaliar o seu impacto na estabilidade catalítica ao longo do tempo (termotolerância bioquímica). Como condições escolhemos 50 °C e pH 4,8, que são as condições ótimas do coquetéis comerciais empregados em bioprocessos. Os resultados podem ser visualizados na Figura 19.

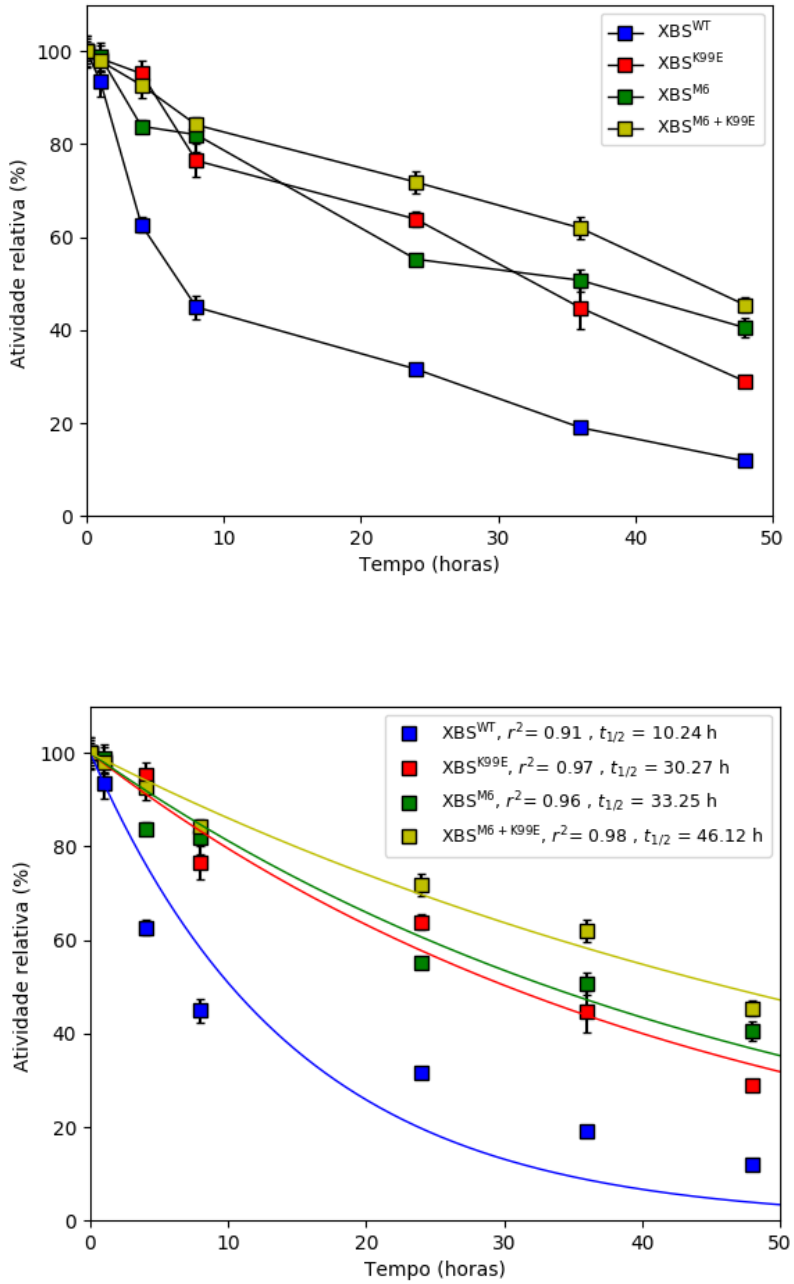


Figura 19. Termotolerância bioquímica. As enzimas com a mutação K99E se mostraram mais estáveis cataliticamente ao longo do tempo. A incubação se deu a 50 °C e pH 4,8, em tampão citrato de sódio 0,1 M, empregando a concentração de proteína de 0,1 mg/mL. Na figura pode-se ver tanto o perfil de atividade (superior) quanto o ajuste dos dados ao modelo de decaimento (inferior), os valores de $\tau_{1/2}$ são também apresentados, bem como os respectivos valores de r^2.

Na Figura 19, pode-se notar que, embora a mutação K99E não foi capaz de influenciar na temperatura ótima de catálise, houve um ganho significativo na termoestabilidade dos mutantes ao longo do tempo a 50 °C. Enquanto a enzima nativa após 24 h apresentou cerca de 35 % da atividade, o mutante K99E mostrou-se mais estável, com aproximadamente 65% de performance. Esta mesma mutação também afetou positivamente a enzima XBS^{M6}, tornando-a mais termotolerante. Isto é, após 14 horas de incubação, o mutante $XBS^{M6+K99E}$ apresentou cerca de 80 % de atividade enquanto que a XBS^{M6} mostrou 60%. Para efeito de comparação, também estimamos o valor de $\tau_{1/2}$, a partir do decaimento exponencial para cada uma das enzimas.

Os resultados revelaram que o $\tau_{1/2}$ estimado para XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6}, e $XBS^{M6+K99E}$, foi de 10,24, 30,27, 33,25 e 46,12 h, respectivamente, confirmando que a mutação K99E aumentou significativamente a termotolerância de XBS^{WT}, tornando-a quase tão termoestável quando XBS^{M6}. O mutante $XBS^{M6+K99E}$ se mostrou mais termotolerânte dentre todas as enzimas. Esse é um importante resultado, uma vez que, os processos industriais ocorrem em tempos longos (acima de 24 h). Portanto, as enzimas que compões os coquetéis enzimáticos precisam tolerar tempos maiores em condições adversas.

5.3.3 Determinação de parâmetros cinéticos das endo-xilanases GH11

Avaliou-se também a influência da substituição K99E sobre os parâmetros de cinética enzimática (K_m e k_{cat}), esperando-se obter, além do aumento da termoestolerância/termoestabilidade, melhorias funcionais que implicassem no aprimoramento do processo de hidrólise da biomassa. Os resultados são mostrados na Tabela 1 e Figura 20.

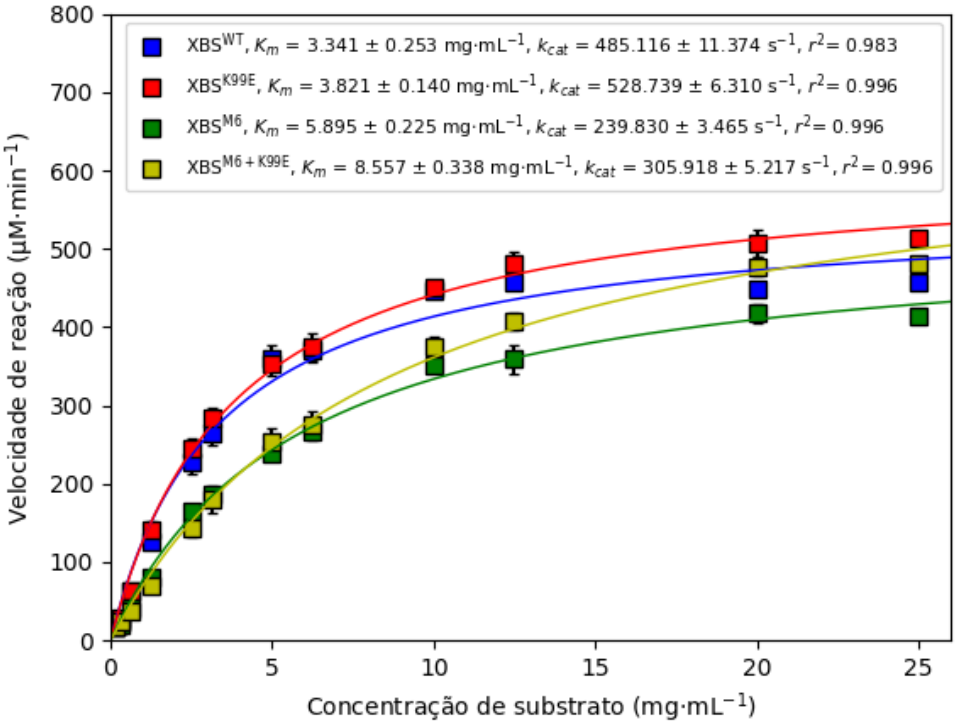


Figura 20. Curvas de cinética enzimática. As curvas foram obtidas nas condições ótimas de cada enzima, os dados foram ajustados ao modelo hiperbólico de Michaelis-Menten para a obtenção dos parâmetros. Na legenda são mostrados os valores de K_m, k_{cat} e os respectivos valores de r^2 para cada ajuste.

Tabela 1. Parâmetros de cinética enzimática. São apresentados os parâmetros cinéticos das enzimas, obtidos segundo o modelo de Michaelis-Menten.

	$V_{máx}$	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	µM·min^{-1}	mg·mL^{-1}	s^{-1}	mL·mg^{-1}·s^{-1}
XBS^{WT}	551,678 ± 12,935	3,341 ± 0,253	485,116 ± 11,374	145,188 ± 15,557
XBS^{K99E}	609,904 ± 7,278	3,821 ± 0,140	528,739 ± 6,310	138,371 ± 6,987
XBS^{M6}	530,443 ± 7,663	5,895 ± 0,225	239,830 ± 3,465	40,687 ± 2,224
XBS$^{M6+K99E}$	670,419 ± 11,434	8,557 ± 0,338	305,918 ± 5,217	35,751 ± 2,104

A enzima XBS^{K99E} apresentou o valor de k_{cat} mais elevado (528,739 ± 6,310 s^{-1}), indicando que a mutação K99E aumentou o valor da

constante catalítica tanto para XBS^{WT} como para XBS^{M6}. A afinidade ao substrato, no entanto, foi prejudicada, pois a mutação provocou o aumento do valor de K_m em ambas as enzimas.

Portanto, a mutação K99E induziu tanto aumento de termoestabilidade como de k_{cat}. O aumento de k_{cat} e da termoestabilidade parecem estar relacionados no caso de algumas enzimas hidrolíticas, Duan *et al.,* 2013 realizaram o melhoramento de pululanases através de mutagênese sítio-específica e verificaram que todas as enzimas com aumento de termotolerância apresentaram melhora no valor de k_{cat}, enquanto que o valor de K_m diminuiu. Para endo-xilanases, no entanto, essa co-dependência não parece ser uma regra, uma vez que estudos buscando enzimas termoestáveis não resultaram na melhora de k_{cat} (Dumon *et al*., 2008), e estudos voltados para o aumento de k_{cat} não resultaram no aumento de temperatura ótima ou termotolerância (Wang *et al*., 2013).

O aumento de k_{cat} é muito importante para o processo de hidrólise enzimática, uma vez que nesse tipo de processo utiliza-se substratos altamente complexos e em concentrações saturadas. Alguns trabalhos apontam que o impacto de k_{cat} sobre a conversão de biomassa é maior até do que o de K_m. Song *et al.,*, 2012 realizaram a hidrólise de palha de trigo intacta empregando enzimas endo-xilanases GH11 obtidas por evolução dirigida (ED). Os autores perceberam que a mutante com maior valor de constante catalítica (Y111T, k_{cat} = 905,2 ± 17,2 s^{-1}) obteve maior performance na liberação de açúcar, tanto isoladamente como em suplementação do coquetel Accellerase® (Song *et al*., 2012). Sendo assim, a mutação K99E além de conferir termoestabilidade foi capaz de melhorar as propriedades cinéticas das enzimas, o que foi impactante na fase de aplicação biotecnológica.

5.3.4 Efeito da adição de cátions e EDTA sobre a atividade enzimática

Como parte da caracterização bioquímica das enzimas avaliadas, estudamos o efeito da adição de cátions mono e bivalentes na atividade de endo-xilanase das enzimas, bem como de EDTA (agente quelante). Os resultados desses experimentos estão representados na Figura 21.

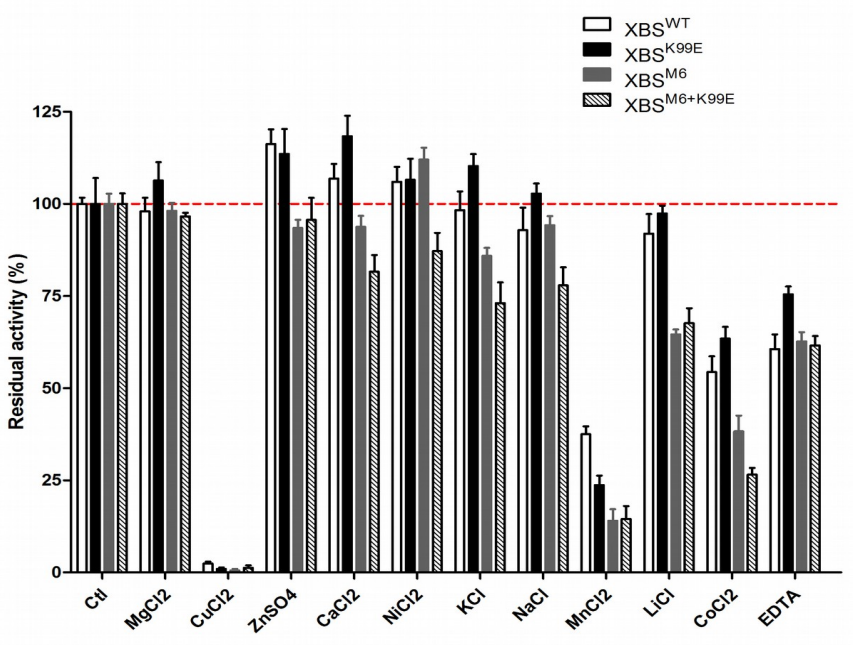


Figura 21. Efeito da adição de cátions mono e bivalentes na atividade enzimática. Na figura, Ctl representa a reação controle para cada enzima, onde não há presença de íons e a atividade é considerada 100 %.

De maneira geral, as enzimas foram fortemente inibidas por Cu^{2+}, Co^{2+}e Mn^{2+}, bem como EDTA. XBS^{WT} e XBS^{K99E} foram ativadas por Zn^{4+}, Ca^{2+} e Ni^{2+}, Na^{+} e K^{+} também mostraram ativar XBS^{K99E}. XBS^{M6} foi ativada somente por Ni^{2+} e $XBS^{M6+K99E}$ não sofreu ativação por nenhum dos íons. A ativação por Zn^{4+}, Ca^{2+} e Ni^{2+}, bem como a inativação por Cu^{2+} e Co^{2+}, foi também reportada por Qu & Shao, 2011, que realizaram a caracterização bioquímica de uma endo-xilanase GH11 recombinante obtida de *Bacillus pumilus*.

5.4 Caracterização biofísica das enzimas

5.4.1 Estudo do perfil da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)

A caracterização biofísica das enzimas foi feita através da técnica de dicroísmo circular (CD). Buscamos aqui determinar o perfil de estrutura secundária das enzimas com base nos espectros obtidos. Os resultados estão ilustrados na Figuras 22.

Todas as enzimas apresentaram perfil característico de proteínas com alto teor de cadeias β, como é o caso das GH11. A mutação K99E não mostrou alterar a estrutura secundária das enzimas de forma impactante. Uma alteração sutil é possível ser percebida na mudança do tampão fosfato de sódio (pH 7,4) para o citrato de sódio (pH 4,8) a 20 °C. Como é característico de proteínas com predominância em folhas- β, os perfis de CD mostraram um mínimo em 220 nm mais acentuado para todas as enzimas estudadas.

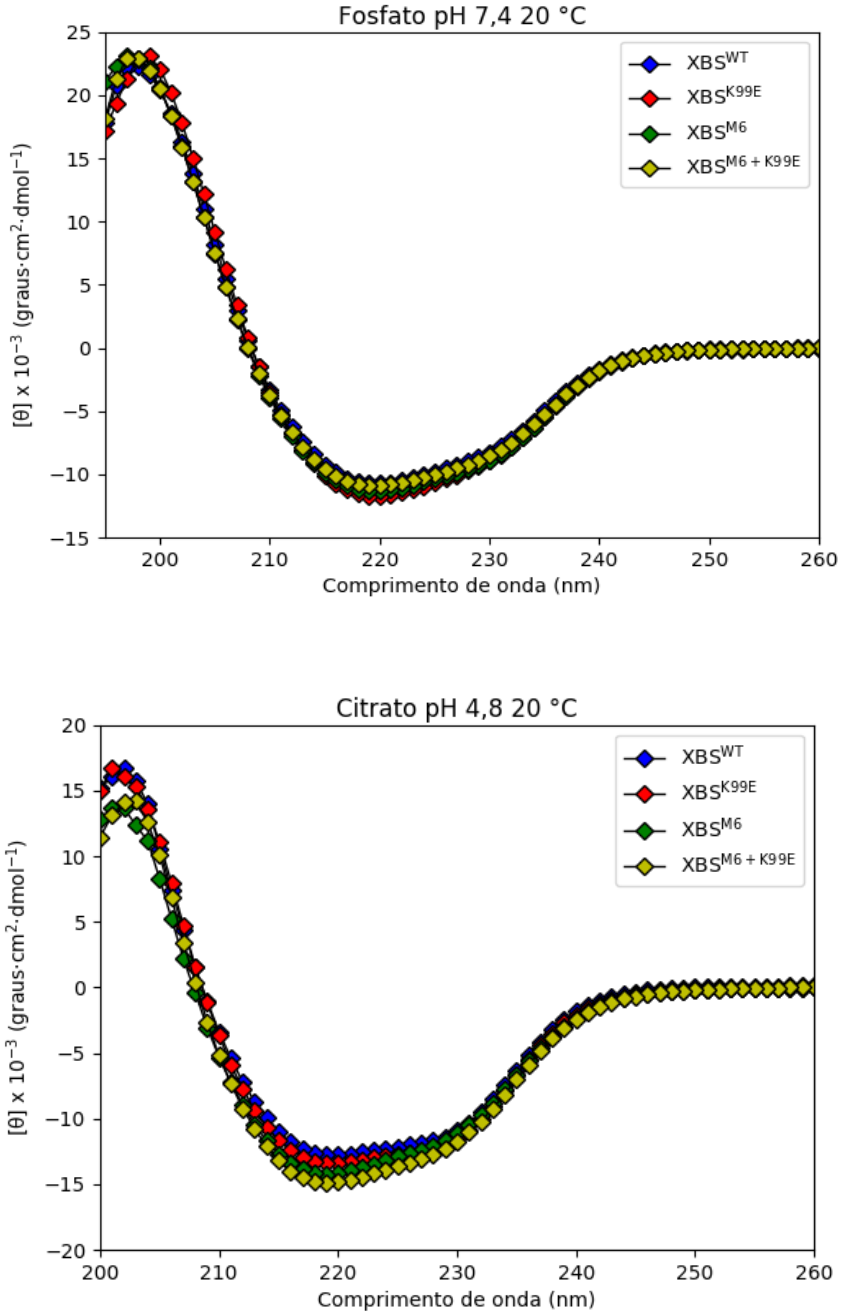


Figura 22. Perfis de dicroísmo circular (CD). Espectros de CD das enzimas a 20 °C em fosfato de sódio 25 mM pH 7,4 e citrato de sódio 20 mM pH 4,8, as leituras foram feitas entre 195 e 260 nm. As amostras de proteína foram padronizadas para 0,2 mg/mL.

5.4.2 Desnaturação térmica das endo-xilanases GH11

Após as análises de perfil de estrutura secundária, realizamos experimentos de desnaturação términa acompanhando o sinal de $[\theta]_\lambda$ a 220 nm ao longo do gradiente de temperatura (20 a 90 °C). Os experimentos foram realizados tanto em fosfato de sódio (pH 7,4) como em citrato de sódio (pH 4,8) (Figura 23).

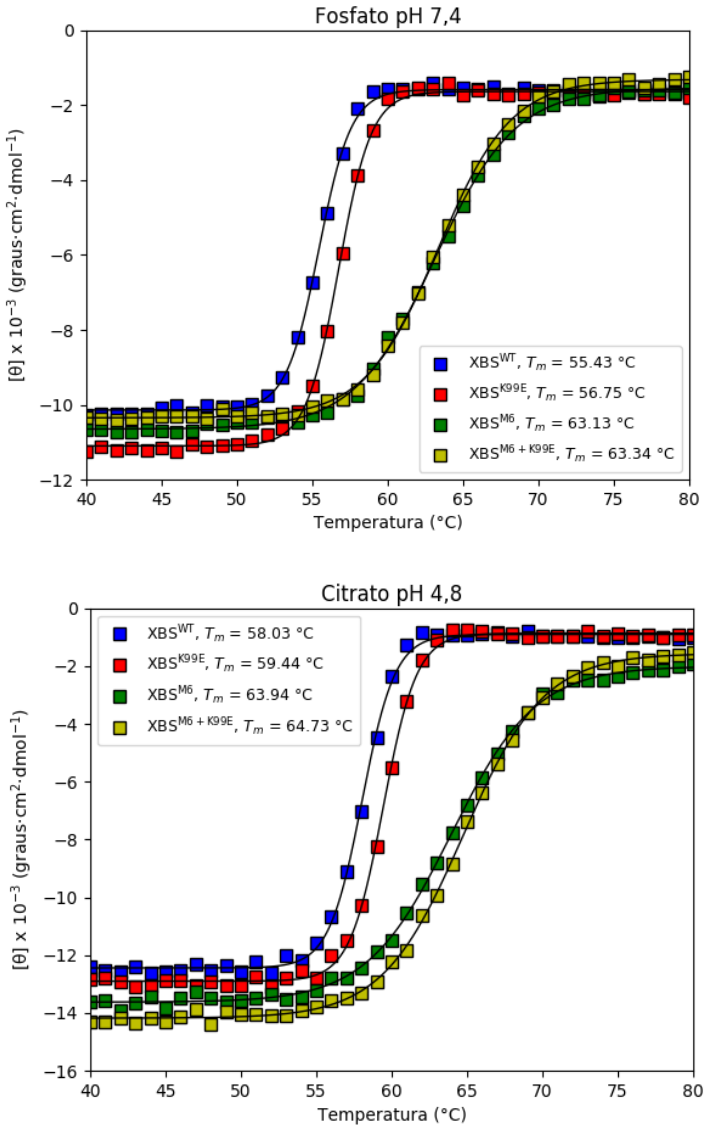


Figura 23. Perfis de desnaturação térmica das enzimas. Desnaturação térmica em fosfato de sódio 25 mM pH 7,4 e citrato de sódio 20 mM pH 4,8. As amostras de proteína foram padronizadas para 0,2 mg/mL e 0,3 mg/mL, nos experimentos em pH 7,4 e pH 4,8, respectivamente.

Os dados de desnaturação foram expressos também em termos de fração desnaturada (F_d) e estão evidenciados na Figura 24. A mutação K99E foi capaz de induzir o aumento de aproximadamente 1 °C no valor de T_m, quando comparada com a forma nativa (XBS^{WT}), em ambos os pHs testados (pH 4,8 e 7,4). No entanto, esse mesmo resultado não foi observado para o mutante $XBS^{M6+K99E}$.

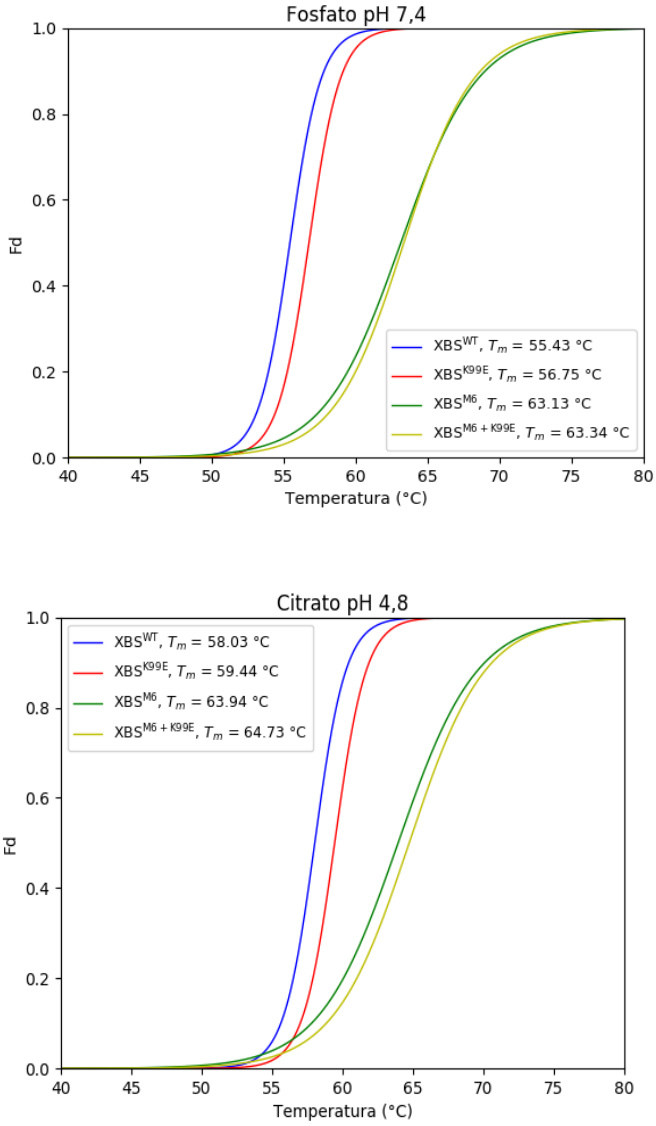


Figura 24. Perfis de desnaturação térmica expressos em termos de fração desnaturada (F_d). Desnaturação térmica em fosfato de sódio 25 mM pH 7,4 e citrato de sódio 20 mM pH 4,8. São mostradas as curvas sigmóides obtidas com o ajuste dos dados experimentais expressos em termos de fração desnaturada.

Portanto, nas condições de citrato pH 4,8, obtivemos a seguinte ordem de termoestabilidade: XBS^{WT} < XBS^{K99E} < XBS^{M6} < $XBS^{M6+K99E}$, o que corrobora com os resultados de termotolerância já apresentados.

5.4.3 Avaliação da termoestabilidade estrutural por CD nas condições de hidrólise

Como feito nos experimentos de termotolerância bioquímica, incubamos as enzimas nas condições ótimas do coquetel Celluclast® (pH 4,8 e 50 °C) e avaliamos a sua estabilidade por aproximadamente 120 h. Nesse caso, no entanto, avaliamos a estabilidade estrutural, monitorando o perfil de estrutura secundária ao longo de tempo. Os resultado são mostrados a seguir, na Figura 25.

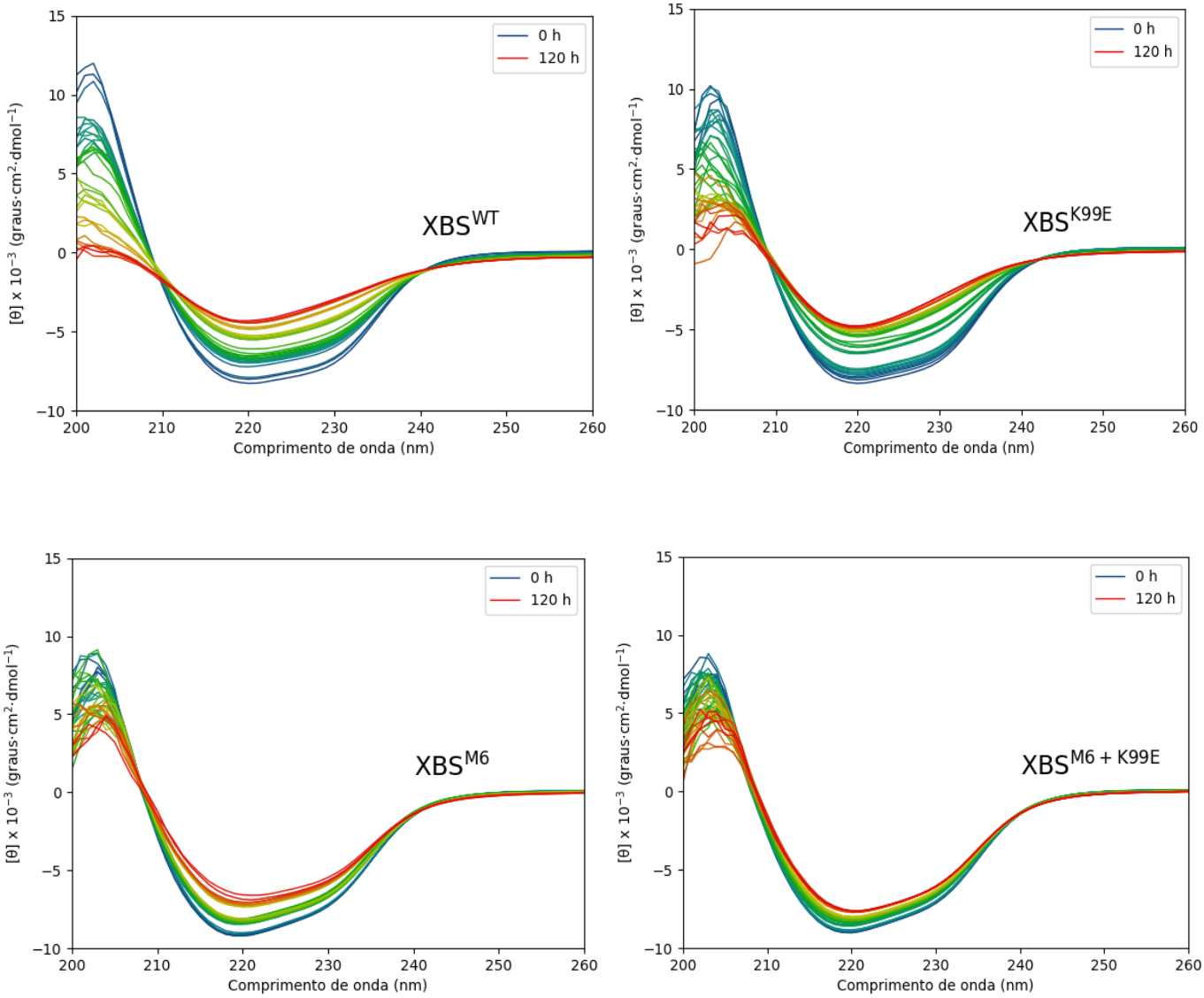


Figura 25. Termotolerância biofísica. A figura mostra os perfis de CD de XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6}, e $XBS^{M6+K99E}$ ao longo do tempo, durante aproximadamente 120 h. Os experimentos foram realizados em citrato de sódio 20 mM pH 4,8 a 50 °C, as amostras de proteína foram padronizadas para 0,3 mg/mL.

A Figura 25 mostra que a mutação K99E agiu conferindo estabilidade e preservando a estrutura secundária de XBS^{K99E} e $XBS^{M6+K99E}$. No caso de $XBS^{M6+K99E}$, após 120 h é possível ver que os dois mínimos dos espectro (em 220 e 230 nm) ainda podem ser distinguidos com clareza, o que não ocorre para as outras enzimas. A partir dos

espectros da Figura 25, podemos obter os valores de $[\theta]_{\lambda}$ a 220 nm ($[\theta]_{\lambda = 220nm}$) no tempo inicial ($[\theta]_{t = 0\ h}$) e após 120 h ($[\theta]_{t = 120\ h}$), bem como calcular a diferença enter eles ($\Delta[\theta]_t = [\theta]_{t = 120\ h} - [\theta]_{t = 0\ h}$), além de expressar o valor de porcentagem de estrutura secundária preservada. A Tabela 2 indica os valores de $\Delta[\theta]_t$ para cada enzima:

Tabela 2. Valores de $\Delta[\theta]_t$ após 120 horas de incubação. A partir dos espectros coletados, obtemos os valores de $\Delta[\theta]_t$ tendo como base as leituras a 220 nm.

	$[\theta]_{t = 0\ h}$	$[\theta]_{t = 120\ h}$	$\Delta[\theta]_t$	
	graus×cm^2×dmol^{-1}	graus×cm^2×dmol^{-1}	graus×cm^2×dmol^{-1}	estrutura retida (%)
XBS^{WT}	-22,485	-11,719	10,766	52,11
XBS^{K99E}	-22,712	-13,060	9,653	57,50
XBS^{M6}	-25,017	-15,525	9,492	62,05
XBS$^{M6+K99E}$	-24,498	-19,920	4,577	81,31

Como pode ser visto, a mutação K99E permitiu que as enzimas tolerassem por mais tempo as condições adversas de hidrólise (pH 4,8 e 50 °C). De acordo com os dados obtidos por dicroísmo circular, após 120 horas o mutante XBS^{K99E} perdeu cerca 40% de estrutura secundária, e o mutante XBS$^{M6+K99E}$ apenas 20%. Para ter ideia da taxa na qual ocorre a perda de estrutura secundária, expressamos $[\theta]_{\lambda = 220nm}$ em função do tempo ($[\theta]_t$), tal como apresentado na Figura 26.

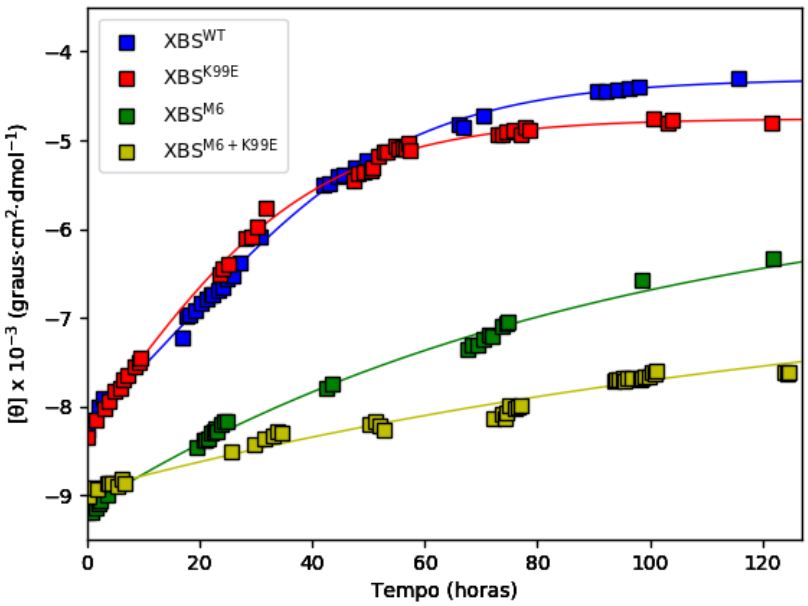


Figura 26. Termotolerância biofísica, valores de $[\theta]_{\lambda = 220nm}$ em função do tempo ($[\theta]_t$). Os experimentos foram realizados em citrato de sódio 20 mM pH 4,8 a 50 °C, incubando as amostras por aproximadamente 120 h. As amostras de proteína foram padronizadas para 0,3 mg/mL.

A Figura 26 mostra que para as enzimas XBS^{WT} e XBS^{K99E}, a diminuição na intensidade de $[\theta]_t$ estabiliza após aproximadamente 60 horas. Até 120 horas, XBS^{M6} e $XBS^{M6+K99E}$ não mostram indícios de estabilidade na intensidade de $[\theta]_t$, mas o desarranjo da estrutura secundária ocorre a uma taxa mais lenta em relação a XBS^{WT} e XBS^{K99E}.

5.5 Hidrólise enzimática

5.5.1 Determinação da concentração de endo-xilanase para suplementação

O teste de dose resposta foi executado utilizando uma dosagem baixa de Celluclast (0,2 FPU/g), nos ensaios em tudo de denominados de (estágio 1, que utiliza 5% de sólidos totais). Este ensaio é sempre feito para estimar a dosagem de carga enzimática de proteína recombinante que deve ser adicionada, obtendo-se uma resposta positiva e incremental de aumento da liberação de açucares totais durante 24h de hidrólise em condições padrão. Esta etapa inicial é uma estimativa de carga importante para avaliar a sinergismo com o coquetel e estimar custos de produção enzimático posteriormente. Esta avaliação de dose resposta pode variar de 0 a 200 µg/mL de recombinante e servirá como ponto central para testes subsequentes de maiores escalas de carga e de sólidos totais (estágio 2 a 10% e estágio 3 a 20%). Assim, com o teste de dose-resposta foi possível observar que o aumento da carga enzimática resulta em maior liberação de açúcar, tal como é mostrado na Figura 27, abaixo.

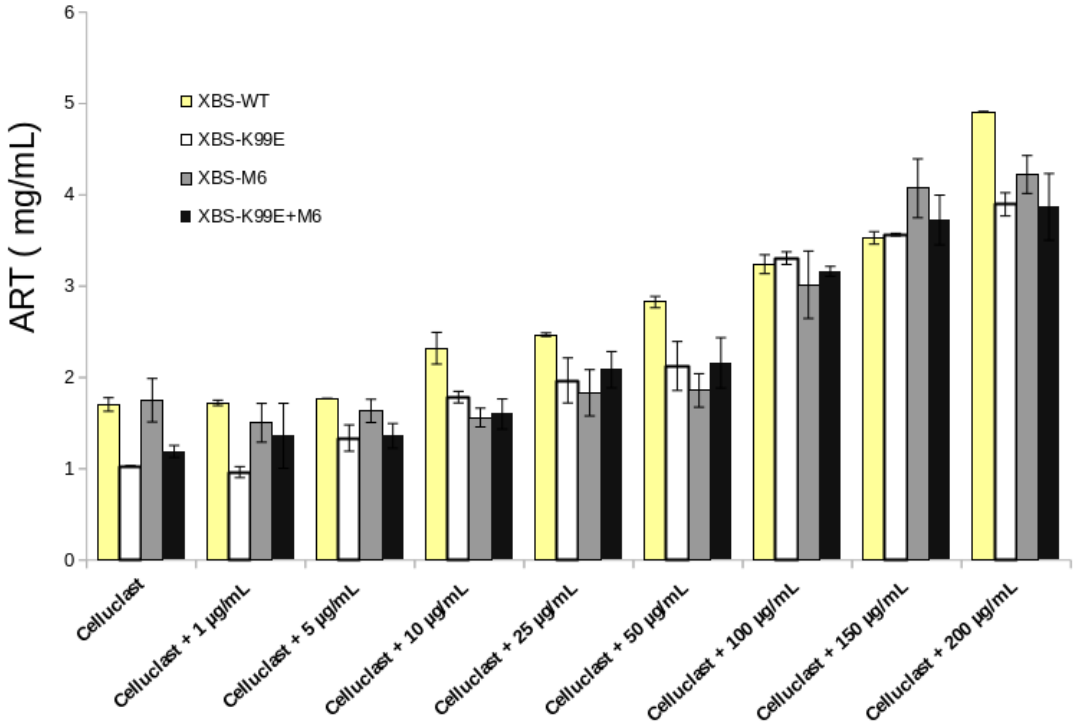


Figura 27. Análise de dose-resposta para avaliação da concentração ótima de enzima nos ensaios de suplementação. Hidrólise de 50 mg de bagaço de cana-de-açúcar resultante de pré-tratamento alcalino com 0,2 FPU/g do coquetel comercial Celluclast® e suplementado com variadas concentrações (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 200 µg/mL) das enzimas XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{K99E+M6}$.

5.5.2 Ensaios de suplementação do coquetel comercial

Em seguida (Figura 28), empregou-se a concentração de 200 µg/mL de enzima para a realização dos testes de suplementação, com o objetivo de determinar o sinergismo entre cada endo-xilanase e o coquetel. Assim, foi possível observar que a suplementação do Celluclast® com a mutante XBS^{M6} apresentou menor liberação de açúcares em relação às outras enzimas. Já o mutante $XBS^{M6+K99E}$ apresentou o maior sinergismo com o coquetel comercial aumentando 3 vezes a liberação de açúcar, de 1,76 mg/mL para 5,4 mg/mL, em comparação ao controle com apenas Celluclast®. Realizamos também a hidrólise com apenas as

enzimas, sem adição de coquetel comercial, também na concentração de 200 µg/mL de cada uma delas.

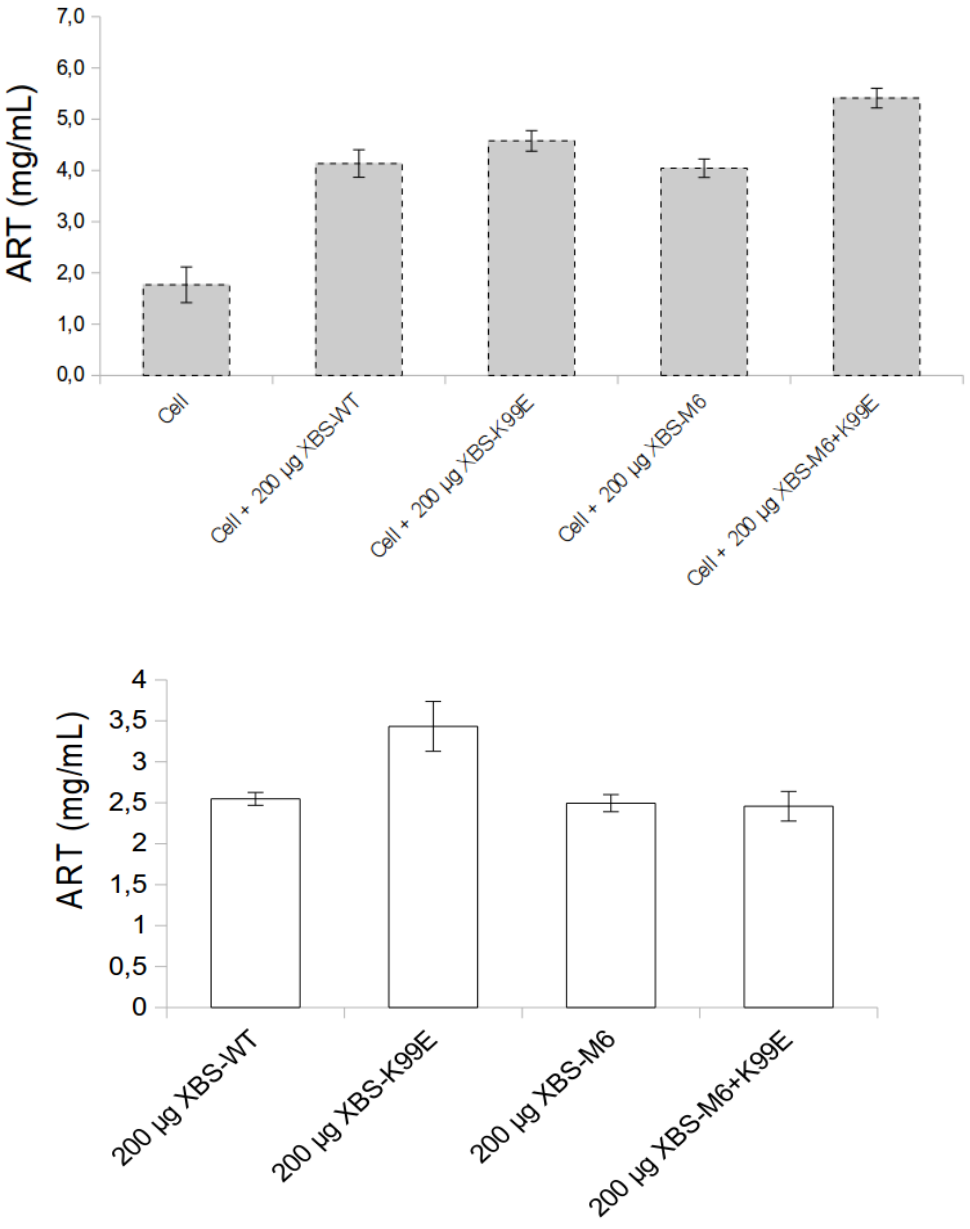


Figura 28. **Hidrólise de 50 mg de bagaço de cana-de-açúcar resultante de pré-tratamento alcalino (24 h).** Na parte superior, 0,2 FPU/g do coquetel comercial Celluclast® (liberou 1,76 mg/mL de ART), suplementado com 200 µg das enzimas XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{K99E+M6}$. Na parte inferior, são apresentados os resultados de hidrólise com somente as enzimas (200 µg), sem coquetel comercial.

Os resultados mostraram que a mutante XBSK99E induziu maior liberação de açúcar dentre as outras enzimas, chegando a aproximadamente 3,5 mg/mL, enquanto que XBSWT, XBSM6 e XBSK99E+M6, induziram apenas 2,5 mg/mL em média (Figura 28).

A enzima obtida experimentalmente por evolução dirigida (XBSM6), apesar de mais termotolerante que XBS^{WT}, mostrou liberar menos açúcares redutores nos testes de hidrólise, tanto isoladamente quanto em conjunto com o coquetel (Figura 28). Isso se deve possivelmente ao fato de que a temperatura ótima de XBS^{M6} (60 °C) não é a mesma do coquetel estudado (50 °C) e, além disso, XBS^{M6} possui comparativamente um baixo valor de k_{cat} (239,830 ± 3,465 s^{-1}, o menor valor dentre as quatro enzimas).

Por outro lado, uma única mutação (K99E), permitiu aumentar significativamente a termotolerância de XBS^{WT} sem alterar suas condições ótimas e, além disso, aumentar sua constante catalítica de 485,116 ± 11,374 para 528,739 ± 6,310 s^{-1}. Tais alterações foram impactantes para o processo de hidrólise, XBS^{K99E} mostrou maior poder de hidrólise sobre o bagaço de cana-de-açúcar quando empregada isoladamente e, em combinação com Celluclast®, a enzima foi mais atuante que XBS^{WT} e XBS^{M6} na liberação de açúcares redutores.

A enzima $XBS^{M6+K99E}$, por sua vez, obteve melhor performance na suplementação do coquetel, o que pode ser explicado talvez pela termotolerâcia extremamente aumentada, apesar do valor de k_{cat} não muito elevado (305,918 ± 5,217 s^{-1}) e de sua máxima atividade em 60 °C (fora das condições ótimas do coquetel). Sabe-se que endo-xilanases GH11 podem atuar em sinergia com outras enzimas fúngicas na liberação de xilose a partir da biomassa vegetal (Yang *et al*., 2014). Sendo assim, é provável que $XBS^{M6+K99E}$ agiu em sinergia com outras enzimas do Celluclast® e, nesse caso, a termotolerância passou a ser mais determinante para a liberação açucares redutores totais do que o valor de k_{cat}. Isso explicaria a vantagem de $XBS^{M6+K99E}$ sobre XBS^{K99E} nos ensaios de suplementação.

5.6 Novas simulações de TK-SA

Como as primeiras simulações de TK-SA não foram realizadas nas condições ótimas das enzimas, realizamos aqui novos cálculos de ΔG_{qq} por resíduo e global para verificar se tais valores sofreriam influência com a mudança de condições de pH e temperatura na qual os experimentos foram feitos. Os resultados estão expostos nas Figuras 29, 30, 31, bem como na Tabela 3.

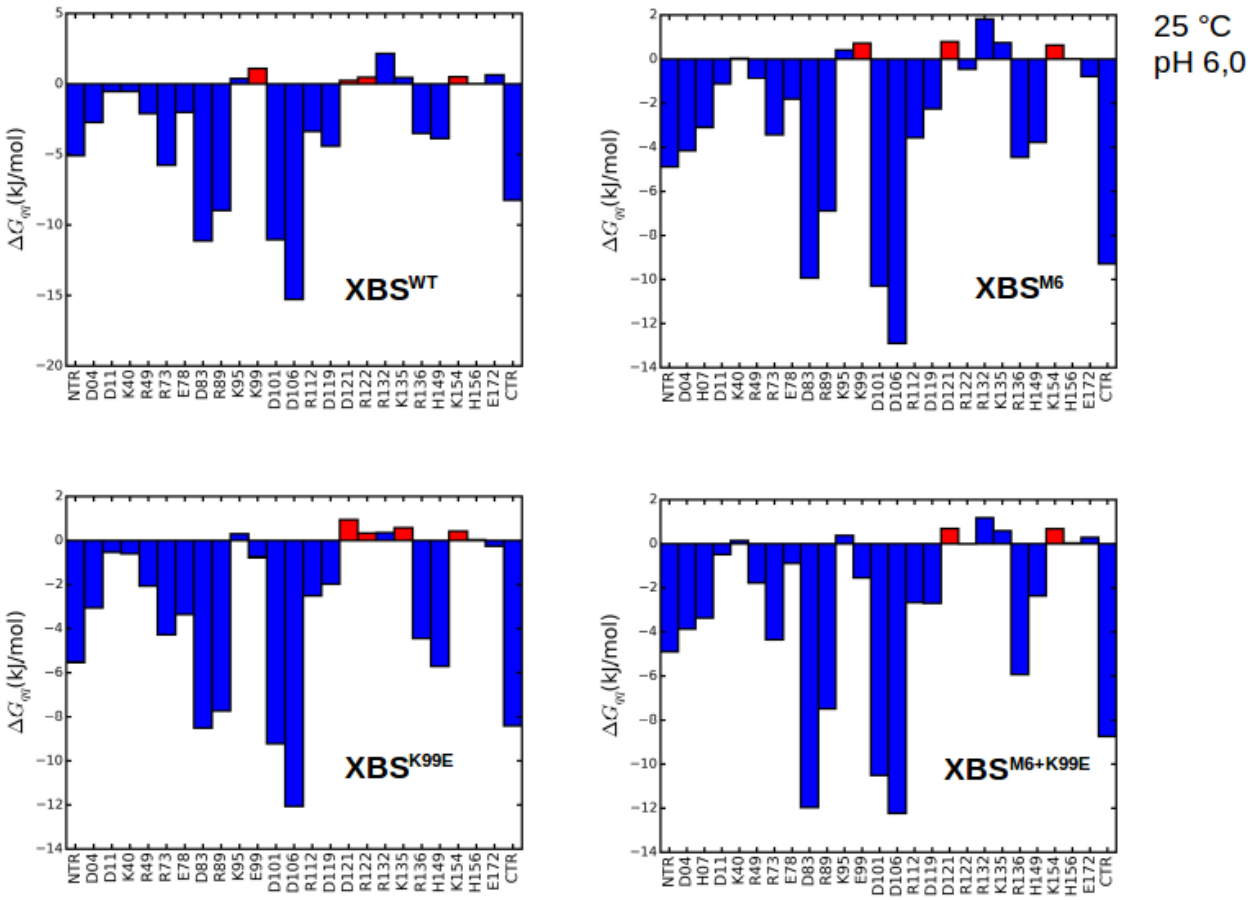


Figura 29. Valores de ΔG_{qq} por resíduo em 25 °C e pH 6,0. Em vermelho estão representados os valores de energia positiva de resíduos com mais de 50 % de área acessível ao solvente, as demais energias são representadas em azul.

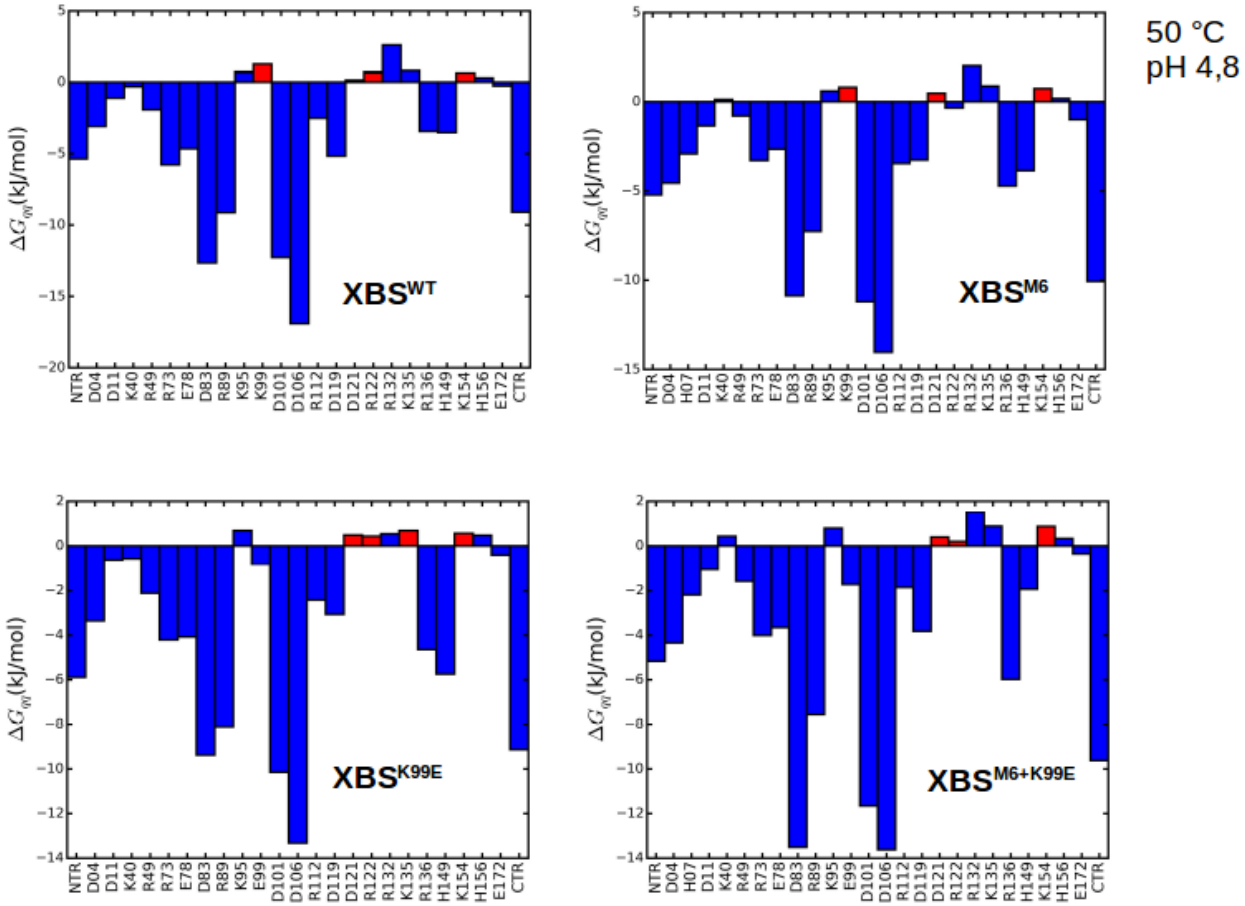


Figura 30. Valores de ΔG_{qq} por resíduo em 50 °C e pH 4,8. Em vermelho estão representados os valores de energia positiva de resíduos com mais de 50 % de área acessível ao solvente, as demais energias são representadas em azul.

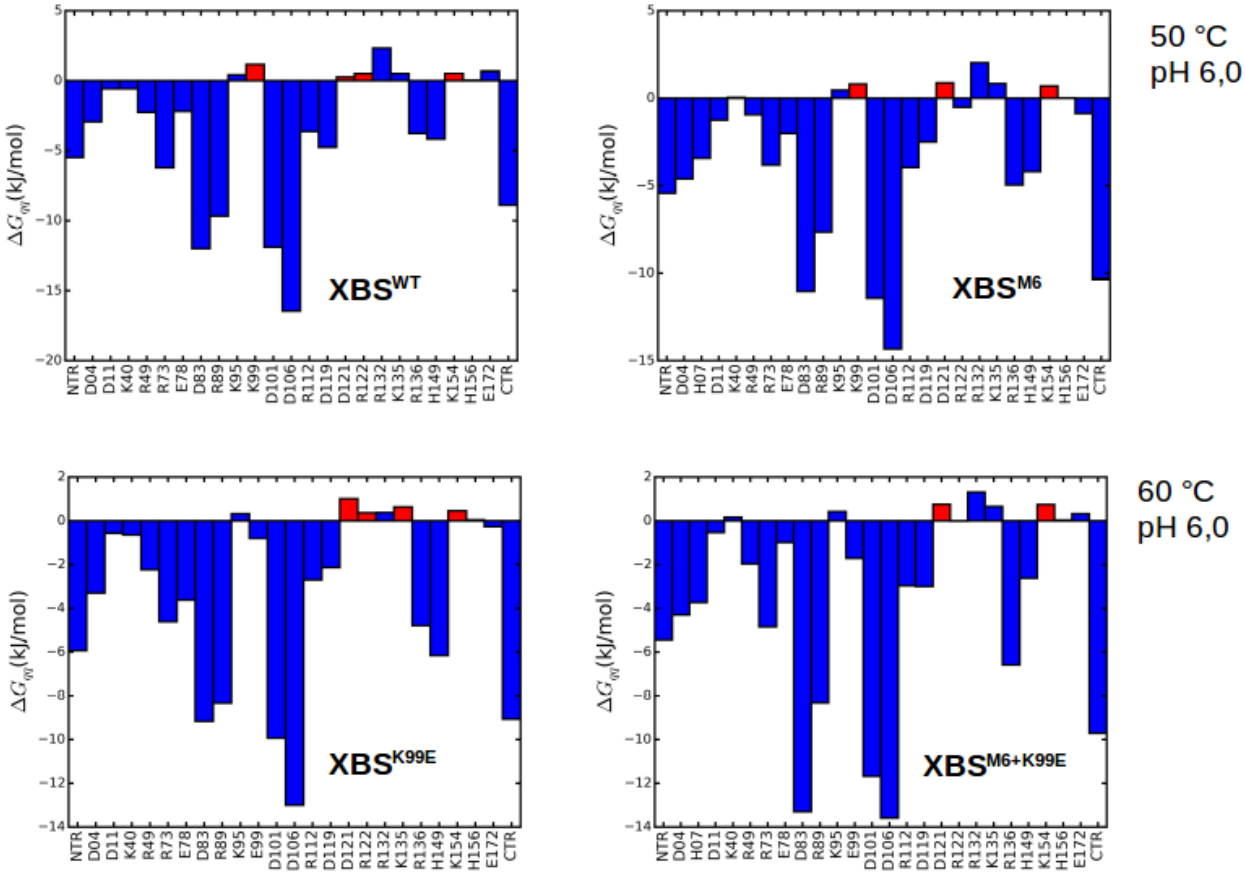


Figura 31. Valores de ΔG_{qq} por resíduo em nas condições ótimas de cada enzima. Em vermelho estão representados os valores de energia positiva de resíduos com mais de 50 % de área acessível ao solvente, as demais energias são representadas em azul.

Verificamos que o perfil de ΔG_{qq} por resíduo não foi alterado significativamente, comparando as diferentes condições avaliadas. Isso mostra que os resultados obtidos para 25 °C e pH 6,0 podem ser aplicadas às condições ótimas e de hidrólise. Nos gráficos referentes à XBS^{WT}, percebemos que os resíduos K99, R122 e K154 são apontados em vermelho, pois possuem ΔG_{qq} positivo e área acessível ao solvente maior que 50 %, nos gráficos de XBS^{M6} os resíduos promissores foram K99, D121 e K154. Todos esses resíduos podem ser alterados por cadeias laterais de cargas oposta com o objetivo de melhorar a

estabilidade de ambas as enzimas XBS^{WT} e XBS^{M6}.

A partir da Tabela 3, podemos verificar que os valores de ΔG_{qq} global das enzimas nas temperaturas de máxima atividade são menores que em outras temperaturas, mas o mesmo não ocorre para o pH. Percebemos também que a mutação K99E diminui os valores de energia apenas de XBS^{M6} para $XBS^{M6+K99E}$, mas não de XBS^{WT} para XBS^{K99E}. Isso se deve provavelmente ao valor de ΔG_{qq} por resíduo de D83, que apresenta uma diminuição mais acentuada em $XBS^{M6+K99E}$ do que em XBS^{K99E}.

Tabela 3. Valores de ΔG_{qq} global obtidos com as simulações de TK-SA. As simulações foram realizadas nas condições iniciais (antes da caracterização experimental), nas condições de hidrólise enzimática e nas condições ótimas de cada enzima.

	25 °C	50 °C		60 °C
	pH 6,0	pH 4,8	pH 6,0	pH 6,0
XBS^{WT}	-82,650 kJ·mol^{-1}	-89,969 kJ·mol^{-1}	-89,033 kJ·mol^{-1}	-
XBS^{K99E}	-78,036 kJ·mol^{-1}	-84,176 kJ·mol^{-1}	-84,057 kJ·mol^{-1}	-
XBS^{M6}	-78,800 kJ·mol^{-1}	-85,053 kJ·mol^{-1}	-	-87,506 kJ·mol^{-1}
$XBS^{M6+K99E}$	-81,848 kJ·mol^{-1}	-88,142 kJ·mol^{-1}	-	-90,895 kJ·mol^{-1}

É possível que K99E impacte a estrutura de $XBS^{M6+K99E}$ de uma maneira mais global que em XBS^{K99E}, o que poderia explicar o fato de $XBS^{M6+K99E}$ ser mais termotolerante que XBS^{K99E}.

Quando analisamos o entorno dos resíduos K99 e E99 nas enzimas XBS^{WT}, XBS^{K99E}, XBS^{M6} e $XBS^{K99E+M6}$ (Figura 32), verificamos que, seja qual for o mecanismo estabilizante induzido por K99E, ele provavelmente não envolve a formação de ligações de hidrogênio. Na verdade, a troca de uma lisina (K) por um glutamato (E) na posição 99 acaba desfazendo uma provável ligação hidrogênio entre K99 e T104 tanto em XBS^{WT} quanto em XBS^{M6}. K99E parece mesmo provocar a reestruturação da rede de interações eletrostáticas de longo alcance, o que torna difícil a busca por explicações estruturais para o fenômeno.

Outros tipos de simulações moleculares, tal como simulações de dinâmica molecular poderiam ser empregadas na tentativa de elucidar tal mecanismo estabilizante induzido por K99E.

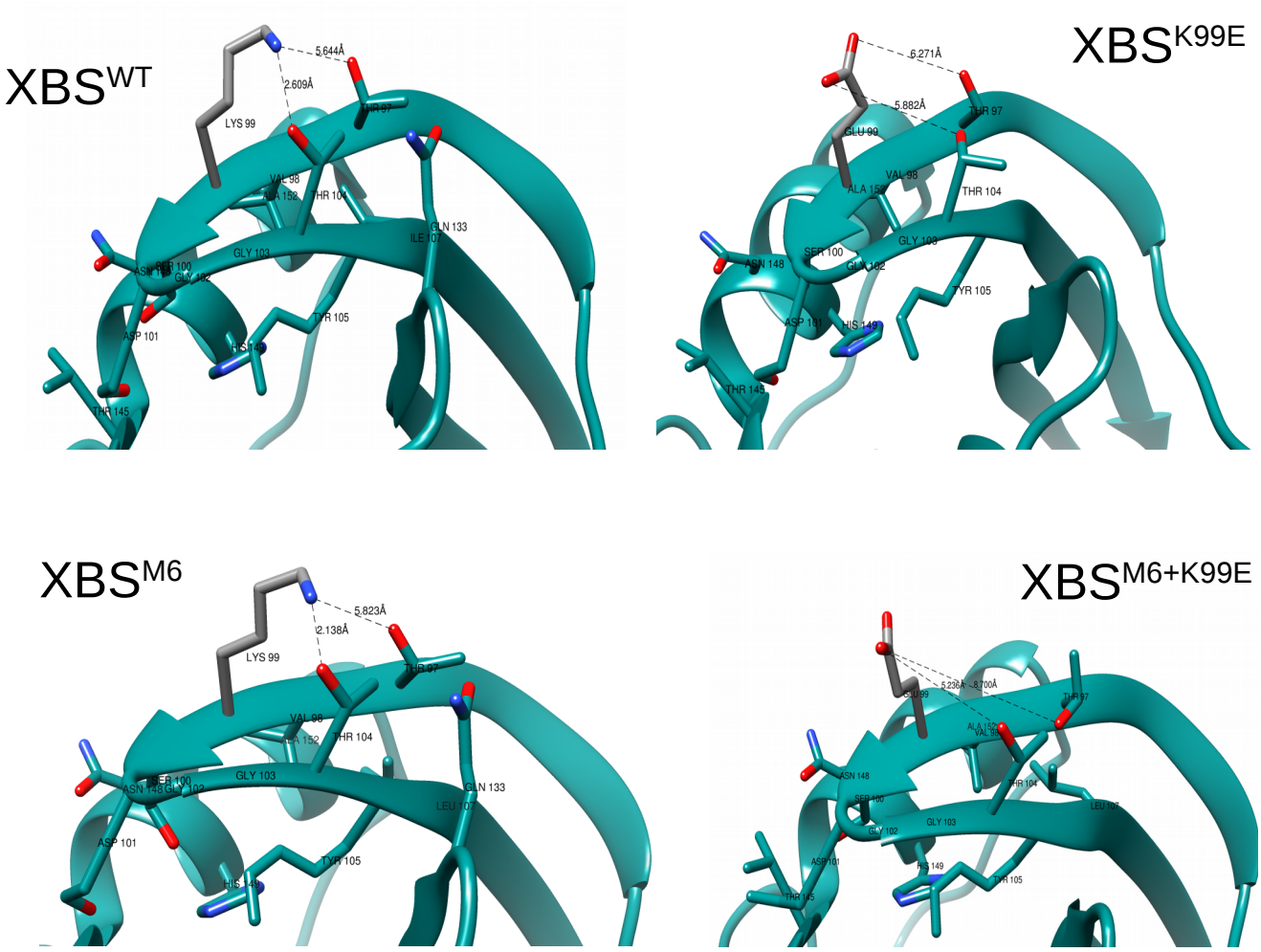


Figura 32. Estrutura cristalográfica da enzima XBS^{WT} (PDB: 1XXN (Murakami *et al.*, 2005)) e modelos de homologia de XBS^{K99E}, XBS^{M6} e XBS$^{M6+K99E}$, mostrando o entrono dos resíduos K99 e E99.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho buscou averiguar a possibilidade de se melhorar enzimas computacionalmente (*in silico*) de maneira racional e preditiva, através da otimização de interações eletrostáticas (OIE) da molécula de proteína. O modelo empregado foi o TK-SA, já empregado anteriormente na otimização de outras proteínas não GHs. Essa foi a primeira iniciativa de se empregar tais métodos *in silico* na otimização de enzimas com potencial de aplicação biotecnológica na produção de E2G e derivados. Nesse conjunto de experimentos *in silico* e *in vitro*, procuramos tanto validar o método de otimização, como também produzir novas enzimas capazes de serem empregadas industrialmente. Somado a isso, foi possível avaliar como a mutação concebida teoricamente (K99E) pôde impactar de forma significativa a termoestabilidade tanto da XBS^{WT} quando das XBSs mutantes, incluindo a mutante XBS^{M6} obtida experimentalmente através de evolução dirigida (ED), favorecendo a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

A caracterização bioquímica das enzimas mostrou que a mutação K99E não alterou significativamente as condições ótimas de pH e temperatura das enzimas, o que no final se mostrou interessante para o processo de hidrólise, uma vez que se XBS^{K99E} tivesse temperatura ótima aumentada, não estaria nas condições ótimas de hidrólise do coquetel Celluclast®. No entanto, percebemos um aumento significativo da termotolerância nas condições de interesse (pH 4,8 e 50 °C), o que foi confirmado através de métodos bioquímicos e biofísicos. O nosso objetivo de gerar novas enzimas termoestáveis para aplicação biotecnológica foi, portanto, atingido. Conseguimos isso a partir de uma enzima híbrida, concebida parte experimentalmente e parte computacionalmente ($XBS^{M6+K99E}$), que agora pode ser empregada em uma diversidade de processos.

Mostramos também que. apesar da relevância da k_{cat} para o processo de hidrólise da biomassa, a termoestabilidade teve maior contribuição para o aumento da sacarificação, uma vez que $XBS^{M6+K99E}$, a mutante mais termotolerante, não possui o maior valor de k_{cat} dentre as enzimas avaliadas mas foi a mais atuante na suplementação do coquetel comercial.

Portanto, melhorando a termoestabilidade com metodologias racionais (OIE ou mutagênese sítio dirigida), corremos o risco de melhorar ou piorar outras propriedades enzimáticas importantes do ponto de vista biotecnológico (tal como a k_{cat}), mas mesmo assim poderemos ainda beneficiar de forma significativa o processo de hidrólise.

Finalmente, os resultados aqui obtidos reforçam a importância de se entender os princípios que levam à termoestabilidade enzimática e também a relevância que os métodos computacionais podem ter para o melhoramento de enzimas. Os estudos *in silico*, em conjunto com as abordagens experimentais podem assim favorecer enormemente o planejamento de enzimas termoestáveis, beneficiando vários setores da indústria biotecnológica.

7 REFERÊNCIAS

Almeida, J.R. *et al*.,, 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82, p.340–349.

Axelsson, L. *et al*.,, 2012. Will second-generation ethanol be able to compete with first-generation ethanol? Opportunities for cost reduction. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(2), p.246–256.

Azevedo, M.S. de, Santos, R.V. de O. & Magalhães, T.V., 2012. Produção de Etanol no Brasil. *Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense*, 2(1), p.151–154.

Brethauer, S. & Studer, M.H., 2015. Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals – A Review. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 69(10), p.572–581.

Brodeur, G. *et al*.,, 2011. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*, 2011, p.1–17.

Buckeridge, M.S. *et al*.,, 2004. Mixed Linkage (1→3),(1→4)-β-D-Glucans of Grasses. *Cereal Chemistry*, 81(1), p.115–127.

Carpita, N.C., 1996. Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), p.445–476.

Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 3(1), p.1–30.

CAZy, 2016. Carbohydrate-Active enZYmes Database.

Chen, J. *et al*.,, 1995. Biodegradation of cell wall components of maize stover colonized by white-rot fungi and resulting impact on in-vitro digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68(1), p.91–98.

Cheng, Y.S. *et al*.,, 2015. Improving the catalytic performance of a GH11 xylanase by rational protein engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), p.9503–9510.

Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), p.1412–1421.

Chundawat, S.P.S. *et al*.,, 2011. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(1), p.121–145.

Coelho, S.T. & Guardabassi, P., 2014. Brazil: Ethanol. In B. D. Solomon &

R. Bailis, orgs. *Sustainable Development of Biofuels in Latin America and the Caribbean*. New York: Springer, p. 71–101.

Collins, T., Gerday, C. & Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), p.3–23.

Damborsky, J. & Brezovsky, J., 2014. Computational tools for designing and engineering enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19(1), p.8–16.

Daniel, R.M., Dines, M. & Petach, H.H., 1996. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *The Biochemical Journal*, 317, p.1–11.

Dashtban, M. *et al*.,, 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), p.36–50.

Dias, M.O.S. *et al*.,, 2011. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? *Bioresource Technology*, 102(19), p.8964–8971.

Duan, X., Chen, J. & Wu, J., 2013. Improving the thermostability and catalytic efficiency of Bacillus deramificans pullulanase by site-directed mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), p.4072–4077.

Dumon, C. *et al*.,, 2008. Engineering hyperthermostability into a GH11 xylanase is mediated by subtle changes to protein structure. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33), p.22557–22564.

Eklöf, J., 2011. *Plant and microbial xyloglucanases: Function, Structure and Phylogeny*.

Fengel, D. & Wegener, G., 1985. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*, Berlin: Walter de Gruyter.

FIESP, 2013. Outlook Fiesp 2023: Projeções para o agronegócio brasileiro. , p.112.

De Giuseppe, P.O. *et al*.,, 2014. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β-glucosidases. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(6), p.1631–1639.

Gomes, E. *et al*.,, 2007. Enzimas Termoestáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial. *Química Nova*, 30(1), p.136–145.

Gribenko, A. V *et al*.,, 2009. Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), p.2601–2606.

Guimarães, J.L. *et al*.,, 2009. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. *Industrial Crops and Products*, 30(3), p.407–415.

Haghighi Mood, S. *et al*.,, 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, p.77–93.

Harun, M.Y. *et al*.,, 2011. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (Eichhornia crassipes). *Bioresource Technology*, 102(8), p.5193–5199.

Hendriks, A.T.W.M. & Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), p.10–18.

Ibarra-Molero, B. *et al*.,, 1999. Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of the contributions from charge-charge interactions to protein stability. *Biochemistry*, 38(25), p.8138–8149.

Illanes, A. *et al*.,, 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, p.48–57.

Ilmberger, N. *et al*.,, 2012. Metagenomic cellulases highly tolerant towards the presence of ionic liquids - Linking thermostability and halotolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), p.135–146.

Kumar, S., Tsai, C.J. & Nussinov, R., 2000. Factors enhancing protein thermostability. *Protein engineering*, 13(3), p.179–191.

Kwa, L.G. *et al*.,, 2008. Mutation of a single residue, β-glutamate-20, alters protein-lipid interactions of light harvesting complex II. *Molecular Microbiology*, 67(1), p.63–77.

Li, M. *et al*.,, 2010. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops & Products*, 32(3), p.551–559.

Li, X., Kim, T.H. & Nghiem, N.P., 2010. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresource Technology*, 101(15), p.5910–5916.

Limayem, A. & Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), p.449–467.

Liszka, M.J. *et al*.,, 2012. Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 3(1), p.77–102.

Loladze, V. V & Makhatadze, G.I., 2002. Removal of surface charge-charge interactions from ubiquitin leaves the protein folded and very stable. *Protein science*, 11(1), p.174–177.

Lombard, V. *et al*.,, 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), p.490–495.

Macedo, I.C., Seabra, J.E.A. & Silva, J.E.A.R., 2008. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*, 32(7), p.582–595.

Macedo, I.D.C., Leal, M.R.L.V. & Silva, J.E.A.R., 2004. Balanço das emissões de gases do efeito estufa na produção e no uso do etanol no Brasil. *Secretaria do Meio Ambiente, Governo de São Paulo*, p.37.

Makhatadze, G.I. *et al*.,, 2003. Contribution of surface salt bridges to protein stability: Guidelines for protein engineering. *Journal of Molecular Biology*, 327(5), p.1135–1148.

Makhatadze, G.I. *et al*.,, 2004. Mechanism of Thermostabilization in a Designed Cold Shock Protein with Optimized Surface Electrostatic Interactions. *Journal of Molecular Biology*, 336(4), p.929–942.

Martínez, Á.T. *et al*.,, 2005. Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8(3), p.195–204.

Masarin, F. *et al*.,, 2011. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), p.55.

Miller, G.L., 1959. Protein Determination of Large Numbers of Samples. *Analytical Chemistry*, 31(5), p.964–964.

MILLER, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), p.426–428.

Morgenstern, I., Powlowski, J. & Tsang, A., 2014. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: Fromdysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. *Briefings in Functional Genomics*, 13(6), p.471–481.

Mosier, N. *et al*.,, 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), p.673–686.

Motono, C., Gromiha, M.M. & Kumar, S., 2008. Thermodynamic and kinetic determinants of Thermotoga maritima cold shock protein stability: a structural and dynamic analysis. *Proteins*, 71(2), p.655–669.

Marquardt, D.W., 1963. An Algorithm For Least-Squares Estimation Of Nonlinear Parameters. *J. Soc. Indust. Appi. Math.*, 11(2), p.431–441.

Murakami, M.T. *et al*.,, 2005. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase a from Bacillus subtilis strain 168 (1A1). *FEBS Letters*, 579(28), p.6505–6510.

Nigam, P.S. & Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), p.52–68.

Paës, G., Berrin, J. & Beaugrand, J., 2012. GH11 xylanases : Structure / function / properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*, 30(3), p.564–592.

Pauly, M. & Keegstra, K., 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal*, 54(4), p.559–568.

Pedersen, M., Viksø-Nielsen, A. & Meyer, A.S., 2010. Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to catalyst type and pH during mild thermal pretreatment. *Process Biochemistry*, 45(7), p.1181–1186.

Permyakov, S.E. *et al*.,, 2005. How to improve nature: Study of the electrostatic properties of the surface of α-lactalbumin. *Protein Engineering, Design and Selection*, 18(9), p.425–433.

Pettersen, E.F. *et al*.,, 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), p.1605–1612.

Polizzi, K.M. *et al*.,, 2007. Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), p.220–225.

Qu, W. & Shao, W., 2011. Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from Bacillus pumilus ARA. *Biotechnology letters*, 33(7), p.1407–16.

Radestock, S. & Gohlke, H., 2011. Protein rigidity and thermophilic adaptation. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(4), p.1089–1108.

Rezende, C.A. *et al*.,, 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), p.54.

Ruller, R., Alponti, J., Deliberto, L.A., Machado, C.B., *et al*.,, 2014. Concommitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant/thermophilic enzyme. *Protein Engineering, Design & Selection*, 27(8), p.255–262.

Ruller, R., Alponti, J., Deliberto, L.A., Zanphorlin, L.M., *et al*.,, 2014. Concommitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant/thermophilic enzyme. *Protein Engineering, Design and Selection*, 27(8), p.255–262.

Ruller, R. *et al*.,, 2006. Efficient constitutive expression of Bacillus subtilis xylanase A in Escherichia coli DH5alpha under the control of the Bacillus BsXA promoter. *Biotechnology and applied biochemistry*, 43(1), p.9–15.

Ruller, R. *et al*.,, 2008. Thermostable variants of the recombinant xylanase

A from Bacillus subtilis produced by directed evolution show reduced heat capacity changes. *Proteins*, 70(4), p.1280–1293.

Sanchez, S. & Demain, A.L., 2011. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research and Development*, 15(1), p.224–230.

Schägger, H. & von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), p.368–379.

Scheller, H.V. & Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, p.263–289.

Schweiker, K.L. & Makhatadze, G.I., 2009. A Computational Approach for the Rational Design of Stable Proteins and Enzymes: Optimization of Surface Charge-Charge Interactions. *Methods in Enzymology*, 454(C), p.175–211.

Silveira, R.L. *et al*.,, 2012. Enzyme microheterogeneous hydration and stabilization in supercritical carbon dioxide. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(19), p.5671–5678.

Song, L. *et al*.,, 2012. Engineering better biomass-degrading ability into a GH11 xylanase using a directed evolution strategy. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), p.3.

Souza, A.P. *et al*.,, 2013. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Research*, 6(2), p.564–579.

Stepankova, V. *et al*.,, 2013. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *ACS Catalysis*, 3(12), p.2823–2836.

Sterpone, F. & Melchionna, S., 2012. Thermophilic proteins: insight and perspective from in silico experiments. *Chemical Society Reviews*, 41(5), p.1665–1676.

Strickler, S.S. *et al*.,, 2006. Protein stability and surface electrostatics: A charged relationship. *Biochemistry*, 45(9), p.2761–2766.

Sun, Y. & Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), p.1–11.

Szilágyi, A. & Závodszky, P., 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: Results of a comprehensive survey. *Structure*, 8(5), p.493–504.

Tanford, C. *et al*.,, 1957. Theory of Protein Titration Curves. I. General Equations for Impenetrable Spheres. *J. Am. Chem. Soc.*, 79(3), p.5333–5339.

Thomas, L., Ushasree, M. V. & Pandey, A., 2014. An alkali-thermostable xylanase from Bacillus pumilus functionally expressed in Kluyveromyces

lactis and evaluation of its deinking efficiency. *Bioresource Technology*, 165(C), p.309–313.

Vázquez, M.. *et al*.,, 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), p.387–393.

Vieille, C., Zeikus, G.J. & Vieille, C., 2001. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), p.1–43.

Viikari, L. *et al*.,, 2007. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In L. Olsson, org. *Biofuels*. Berlin e Heidelberg: Springer, p. 121–145.

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

Wunderlich, M., Martin, A. & Schmid, F.X., 2005. Stabilization of the cold shock protein CspB from Bacillus subtilis by evolutionary optimization of coulombic interactions. *Journal of Molecular Biology*, 347(5), p.1063–1076.

Wunderlich, M. & Schmid, F.X., 2006. In Vitro Evolution of a Hyperstable Gβ1 Variant. *Journal of Molecular Biology*, 363(2), p.545–557.

Wyman, C.E. *et al*.,, 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96(18 SPEC. ISS.), p.1959–1966.

Yang, B. *et al*.,, 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), p.421–450.

Yang, X. *et al*.,, 2014. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β-xylosidase/β- arabinosidases and one GH11 xylanase from Humicola insolens and their synergy in the degradation of xylan. *Food Chemistry*, 148, p.381–387.

Yeoman, C.J. *et al*.,, 2010. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. In A. I. Laskin, S. Sariaslani, & G. M. Gadd, orgs. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, p. 1–55.

Yu, H. & Huang, H., 2014. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. *Biotechnology Advances*, 32(2), p.308–315.

Zhou, X. *et al*.,, 2011. Expression of heparan sulfate sulfotransferases in Kluyveromyces lactis and preparation of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *Glycobiology*, 21(6), p.771–780.

8 ANEXOS

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


XBS-WT          ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAP
XBS-K99E        ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAP
XBS-M6          ASTDYWHNWTDGGGIVNAVNGPGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTAGSPFRTVNYNAGVWAP
XBS-M6+K99E     ASTDYWHNWTDGGGIVNAVNGPGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTAGSPFRTVNYNAGVWAP
                ******:************** ********************:******:*********

XBS-WT          NGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDG
XBS-K99E        NGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVESDGGTYDIYTTTRYNAPSIDG
XBS-M6          NGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDLYTTTRYNAPSIDG
XBS-M6+K99E     NGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVESDGGTYDLYTTTRYNAPSIDG
                ************************************:*******:*************

XBS-WT          DRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSS
XBS-K99E        DRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSS
XBS-M6          DRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGCS
XBS-M6+K99E     DRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGCS
                ************************************************************.*

XBS-WT          NVTVW
XBS-K99E        NVTVW
XBS-M6          NVTVW
XBS-M6+K99E     NVTVW
                *****
```

Anexo I. Alinhamento múltiplo das enzimas avaliadas realizado no programa CLUSTAL. Disponível em: **http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/**