



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

**Expressão heteróloga de proteínas de *C. thermocellum* e
montagem de celulosomas “in vitro” visando aplicação
biotecnológica**

Jéssica Pinheiro Silva

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Brasília, DF

Março de 2018

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana
Laboratório de Enzimologia

**Expressão heteróloga de proteínas de *C. thermocellum* e
montagem de celulosomas “in vitro” visando aplicação
biotecnológica**

Jéssica Pinheiro Silva

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Dissertação apresentada à Universidade
de Brasília como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Biologia
Microbiana, para obtenção de título de Mestre

Brasília, DF

Março de 2018

Expressão heteróloga de proteínas de *C. thermocellum* e montagem de celulosomas “in vitro” visando aplicação biotecnológica

Jéssica Pinheiro Silva

Banca examinadora:

- ✓ **Prof. Dr. Cirano José Ulhoa – Membro Externo**
- ✓ **Prof. Dra. Janice Lisboa de Marco – Membro Interno**
- ✓ **Prof. Dr. Tatsuya Nagata – Suplente**

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Brasília, DF

Março de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado me protegendo e me confortando nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais e aos meus amados irmãos pelo apoio, incentivo e conselhos. Muito obrigada por tudo! Amo muito vocês.

À minha orientadora, Professora Eliane Ferreira Noronha, pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos valiosos e por ter me acolhido desde a iniciação científica. Obrigada por tudo!

À Brenda Camargo, por todos os ensinamentos e principalmente pela amizade e carinho.

À Hamile Mey, por ter sido uma grande amiga e por ter me ajuda nos momentos em que eu mais precisei.

Ao Daniel Gusmão, que estagiou comigo e me ajudou em vários experimentos, muito obrigada por tudo, trabalhar com você foi muito divertido.

Às amigas que fiz no laboratório, principalmente ao Alonso e ao Raul, que eu considero grandes amigos. Obrigada a todos da enzimologia pela companhia, amizade e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, por terem prontamente aceitado o convite;

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto foi realizado por meio do apoio financeiro das agências de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento), FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal) e com a concessão de bolsa de estudos fornecida pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar para atravessar o rio da vida. Ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem número, e pontes, e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio, mas isso te custaria a tua própria pessoa: tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Aonde leva? Não perguntes, siga-o!

– **Nietzsche**

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo clonar e expressar os genes da endo-xilanase xyn10D, endoglucanase celJ e mini-CipA (contendo dois módulos de coesinas), codificadores de proteínas celulosômicas de *Clostridium thermocellum* para montagem de celulosomas “in vitro”. Os genes endoglucanase celJ e da endo-xilanase xyn10D foram expressos em *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) da linhagem GS115 sob o controle do promotor induzível *AOX1*. O clone pPIC9-CelJ/A-1 apresentou atividade de CMCase nas primeiras 24 horas de crescimento, sendo os maiores níveis encontrados após 72 horas. A atividade xilanolítica do clone pPIC9-Xyn10D*-3 também foi detectada nas primeiras 24 horas de cultivo e o maior valor de atividade foi detectado após 96 horas. A endo-xilanase Xyn10D* foi parcialmente purificada após dois passos cromatográficos, troca iônica (QFF) e exclusão molecular (S200) e caracterizada. A Xyn10D* apresentou atividade máxima a 65°C, pH 6,0, e estabilidade térmica a 50°C, 60°C e 70°C. Dos compostos fenólicos avaliados, apenas o ácido tânico inibiu a atividade da enzima. Quanto ao experimento de sacarificação, a Xyn10D* parcialmente purificada, hidrolisou o bagaço de cana de açúcar pré-tratado, mostrando um aumento gradual na liberação de açúcar ao longo do tempo, e a maior quantidade de açúcar redutor foi detectada após 72 horas. O gene da proteína estrutural mini-CipA, foi expresso em *Escherichia coli* BL21(DE3). Esta proteína foi purificada após dois passos cromatográficos; cromatografia de afinidade e troca iônica (QFF). De acordo com a análise de montagem dos mini-celulosomas foi possível notar que em todas as proporções molares testadas de “ Δ CipA/Xyn10D*” houve associação entre estas proteínas e possivelmente a formação do complexo mini-CipA-Xyn10D*. No entanto, mais experimentos serão necessários para confirmar este resultado. Estudos adicionais sobre a atividade enzimática da Xyn10D* associada a proteína estrutural serão avaliados e comparados com os resultados obtidos com a proteína livre.

Palavras-chave: celulosomas, CipA, *Clostridium thermocellum*, coesina, doquerina, biomassa de lignocelulose.

ABSTRACT

This work aimed to clone and express the genes of endo-Xylanase xyn10D, endoglucanase celJ and mini-CipA (containing two coesins), encoding cellulosomal proteins of *Clostridium thermocellum* for assemble of cellulosomes “in vitro”. Endoglucanase celJ and endo-xylanase xyn10D genes were expressed in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) of the GS115 strain under the control of the inducible promoter *AOX1*. Clone pPIC9-CelJ/A-1 showed CMCase activity in the first 24 hours of cultivation, reaching the highest activity after 72 hours. The xylanolytic activity of clone pPIC9-Xyn10D*-3 was also detected during the first 24 hours of cultivation, where the highest levels occurred after 96 hours. The Xyn10D* endo-xylanase was partially purified after two chromatographic steps, ion exchange (QFF) and molecular exclusion (S200) and characterized. The Xyn10D* presented maximum activity at 65 ° C, pH 6.0, and thermostability at 50 ° C, 60 ° C and 70 ° C. Of the phenolic compounds evaluated, only tannic acid inhibited the activity of the enzyme. As for the saccharification experiment, the partially purified Xyn10D * hydrolyzed the pre-treated sugarcane bagasse, showing a gradual increase in sugar release over time, and the highest amount of reducing sugar was detected after 72 hours. The gene encoding the mini-CipA scaffolding protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). And this protein was purified after two chromatographic steps, affinity chromatography and ion exchange (QFF). According to analysis of cellulosome assembly, in all molar proportions of "ΔCipA / Xyn10D * tested there was an association between these proteins and possibly the formation of the mini-CipA-Xyn10D * complex. Although more experiments are needed to confirm this result. Additional studies on the enzymatic activity of Xyn10D* associated with structural protein will be evaluated and compared with the results obtained with the free protein.

Keywords: cellulosome, CipA, *Clostridium thermocellum*, cohesin, dockerin, lignocellulose biomass.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais componentes da parede celular vegetal. Adaptada de Murphy e McCathy, 2005. 20
- Figura 2.** Estrutura da celulose cristalina amorfa. Extremidades redutoras e não redutoras são mostradas. Extraído e adaptado de Castañedo e Mallol, 2013..... 21
- Figura 3.** Estrutura química dos componentes da hemicelulose (xilana e glicomanana). Extraído e adaptado de Lee, 2014. 22
- Figura 4.** Estrutura da homogalacturonana. Extraído e adaptado de Hosmer e Mohnen, 2009. 23
- Figura 5.** Representação esquemática dos componentes estruturais presentes na lignocelulose. Extraído e modificado de Pegler, 2003. 25
- Figura 6.** Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e microcristalina por sistemas de celulasas não complexadas. Os quadrados (fechados) contínuos representam extremidades redutoras, e os quadrados abertos representam extremidades não redutoras..... 27
- Figura 7.** Enzimas xilanolíticas envolvidas na hidrólise da xilana. Extraída de Santana (2013). 28
- Figura 8.** Principais enzimas envolvidas na hidrólise da Pectina. Extraído e modificado de Gonçalves e Filho, 2010. 29
- Figura 9.** Principais enzimas envolvidas na degradação da lignina..... 30
- Figura 10.** Representação esquemática dos modelos de celulosomas de *C. thermocellum*. A) Sistema celulosomal livre da célula. B) Sistema de celulosomas ligados à célula. Modificado e extraído de Xu, 2016)..... 32
- Figura 11.** Estratégia utilizada para a montagem no vetor de expressão induzida pPIC9. Estratégia utilizada para a montagem no vetor de expressão induzida pPIC9. O vetor pBSK contendo o gene de interesse foi digerido com as enzimas de restrição NotI e XhoI para liberar o fragmento correspondentes ao gene. Em seguida, o gene foi ligado ao vetor de expressão induzida pPIC9, que foi linearizado com as mesmas enzimas de restrição. 44
- Figura 12.** Análise do perfil de DNA gerado por digestão com as enzimas BamHI e BglIII dos vetores pPIC9-CelJ* e pPIC9-Xyn10D* por eletroforese em gel de agarose

0,8%. M) marcador. As setas em vermelho indicam o incerto correspondente ao gene.
..... 57

Figura 13. Análise da formação de halo de hidrolise em placa de Petri contendo meio MM-XIL-Ágar Tamponado de transformantes com vetor pPIC9-Xyn10D. As numerações (1,2,3) representam os clones transformantes selecionados e o controle negativo é representado como (C-). 59

Figura 14. Análise da formação de halo de hidrolise em placa de Petri contendo meio MM-CMC-Ágar Tamponado de transformantes com vetor pPIC9-CelJ. As numerações (1,2,3) representam os clones transformantes selecionados e o controle negativo é representado como (C-) 59

Figura 15. Cinética de produção da celulase heteróloga, CelJ/A-1, e de crescimento do clone CelJ/A-1. A) Cinética de produção, a atividade enzimática foi expressa em U.I/mL. B) Curva de crescimento do clone CelJ-1. (C-) representa o controle. $P < 0,05$ para a comparação dos valores de atividade enzimática obtidos para os clones CelJ/A-1 e controle. 60

Figura 16. Cinética de produção da xilanase heteróloga, Xyn10D*, e de crescimento do clone Xyn10D-3*. A) Cinética de produção, a atividade enzimática foi expressa em U.I/mL. B) Curva de crescimento do clone Xyn10D-3*. (C-) representa o controle, controle $P < 0,05$ $P < 0,05$ para a comparação dos valores de atividade enzimática obtidos para os clones CelJ/A-1 e controle 61

Figura 17. Análise dos sobrenadantes das culturas dos clones Xyn10D*-3 e controle por eletrofores em em gel SDS-PAGE (12%). 62

Figura 18. Cromatograma do sobrenadante da cultura de P.pastoris (clone Xyn10D*-3) aplicado em coluna Hi-trap Q FF. A linha laranja representa o gradiente salino. 63

Figura 19. Cromatograma das frações com atividade de xilanase obtidas a partir da coluna Hi-trap Q FF aplicadas em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 PG..... 63

Figura 20. Análise frações com atividade de xilanase eluídas após o gradiente salino pela cromatografia em coluna Hi-trap Q FF por eletrofores em em gel SDS-PAGE (12%). (A). Análise das frações com atividade de xilanase eluídas pela cromatografia em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 PG em SDS-PAGE e zimograma (B). As numerações 23, 24, 28 e 30 em (A) e 30 e 31 em (B) correspondem as numerações dos tubos que coletaram as frações com atividade xilanolítica. A seta em vermelho (A) e preto em (B) indicam a banda correspondente à xilanase Xyn10D*. Gel corado com Comassie blue..... 64

Figura 21. Efeito do pH sobre a atividade de xilanase Xyn10D* parcialmente purificada. As barras representam os desvios-padrão. 65

Figura 22. Efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase Xyn10D* parcialmente purificada. As barras representam os desvios-padrão.	66
Figura 23. Estabilidade térmica da Termoestabilidade da atividade da xilanase Xyn10D* a 50°C e 60°C (A), e a 70°C (B).....	68
Figura 24. Quantificação de açúcar redutor liberado durante a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pela xilanase Xyn10D*a 50°C, com agitação de 900 rpm durante 72 horas.	71
Figura 25. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (12%) das frações insolúvel (1) e solúvel (2) do extrato celular de E.coli BL21(2) expressando a mini-CipA. Gel corado com Comassie blue.....	72
Figura 26. Cromatograma do sobrenadante da fração solúvel do lisado de células de E.coli aplicado em coluna FF His-Trap (A) e da fração obtida a partir da coluna de FF His-Trap aplicadas em coluna Hi-trap QFF. (B). A linha laranja representa o gradiente e as setas em azul a fração com maior pico de proteínas após o gradiente.	72
Figura 27. Análise eletroforética por SDS-PAGE (12%) das frações com maior pico de proteínas eluídas após o gradiente de imidazol pela cromatografia em colna FF His-Trap. M) marcador molecular em (kDa). Os números 10, 11, 12 e 14 correspondem aos números dos tubos que coletam a fração de interesse. Os números 10,11, 12 e 14 corresponde, aos números dos tubos que coletaram a fração de interesse. A seta em vermelho indica a mni-CipA. Gel corado com Comassie blue.	73
Figura 38. Eletroforese SDS-PAGE (12%) (A) e Western blot (B) das frações correspondentes ao segundo pico de proteínas eluídos pela cromatografia Hi-trap Q FF. M) marcador (em kDa). Os números 39 e 40 correspondem aos dos tubos que coletaram as frações de interesse. C+) controle positivo (antígeno de Zica vírus fusionado a cauda de histidina com aproximadamente 19 kDa). C-) controle negativo (sobrenadante com proteínas sem cauda de histidinas provenientes da maceração <i>Nicotiana benthamiana</i>).	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Celulases e xilanase celulosomais purificadas e caracterizadas bioquimicamente. A lista apresenta o nome do gene, nome da enzima, domínios presentes e atividade..... 35
- Tabela 2,** Composição da biomassa antes e depois do pré-tratamento hidrotérmico. Os valores são apresentados em porcentagem. 53
- Tabela 3.** Efeito de compostos fenólicos na atividade da Xyn10D* parcialmente purificada. .. 70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA: *Bovine Serum albumini* /albumina sérica bovina

Cazy: *Carbohydrate-Active Enzymes*

CBM: *Carbohydrate Binding Module* / Módulos de Ligação ao Carboidrato

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

dNTP: deoxirribonucleotídeos trifosfatos

g: força gravitacional

GH: Glicosil Hidrolases

kDa: Quilodalton

MDa: Megadalton

MM: Marcador Molecular

mg: Miligramas

mL: Mililitros

nm: Nanômetros

OD₆₀₀: densidade óptica a 600 nm

pH: Potencial de hidrogênio

rpm: Rotação por Minuto

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*/ Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *SDS- polyacrylamide gel electrophoresis*/ eletroforese em gel de poliacrilamida

TCA: Ácido tricloroacético

YNB: *yeast nitrogen base*

UI: Unidade internacional

µg: Microgramas

µL: Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Composição da biomassa de lignocelulose	19
1.1.1. Celulose.....	20
1.1.2. Hemicelulose.....	21
1.1.3. Pectina.....	23
1.1.4. Lignina	24
1.2. Desconstrução da biomassa de lignocelulose.....	25
1.2.1. Glicosídeo Hidrolases	25
1.2.2. Desconstrução da biomassa de lignocelulose por <i>Clostridium thermocellum</i>	30
1.3. Celulases e Xilanases celulosomais de <i>Clostridium thermocellum</i>	33
1.4. Celulosomas sintéticos.....	36
1.5. Aplicações industriais de Celullases e Xilanases	37
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Linhagens de Bactérias.....	41
4.2. Linhagem de Levedura.....	41
4.3. Vetores	41
4.4. Genes.....	42
4.5. Montagem no vetor de expressão pPIC9.....	42
4.6. Preparação de células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) e XL10GOLD competentes.....	45
4.7. Transformação <i>E.coli</i> BL21 (DE3) e XL10GOLD por choque térmico	45

4.8.	Extração de DNA plasmidial (mini-prep)	46
4.9.	Transformação de <i>P.pastoris</i> GS115 competente	46
4.9.1.	Seleção de clones recombinantes	47
4.10.	Expressão dos genes em leveduras recombinantes	48
4.11.	Determinação da atividade enzimática de endoglucanase e endo-xilanase e quantificação de proteínas	49
4.12.	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	49
4.12.1.	Zimograma	50
4.13.	Purificação da endo-xilanase Xyn10D*	50
4.13.1.	Efeito do pH e da temperatura.....	51
4.13.3.	Efeito de compostos fenólicos.....	52
4.13.4.	Sacarificação de biomassa lignocelulósica.....	52
4.14.	Obtenção e purificação da mini-CipA.....	53
4.14.1.	Western blot	55
4.15.	Montagem dos mini-Celulossomas	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	Análise de restrição das construções pPIC9-CelJ/A e pPIC9-Xyn10D*	57
5.2.	Transformação de <i>P.pastoris</i> e análise da expressão das proteínas heterólogas	58
5.3.	Purificação parcial e caracterização da xilanase Xyn10D.....	63
5.3.1.	Efeito do pH e da Temperatura	65
5.3.2.	Efeito dos compostos fenólicos na atividade de xilanase	69
5.3.3.	Sacarificação de bagaço de cana de açúcar pré-tratado.....	70
5.4.	Purificação da proteína estrutural (mini-CipA).....	71
5.5.	Montagem dos Mini-celulossomas “in vitro”	74
6.	CONCLUSÕES.....	76
7.	PERSPECTIVAS	77
8.	BILIOGRAFIA	78
9.	ANEXOS.....	90 Erro!

Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia e matérias primas renováveis e sustentáveis capazes de substituir a dependência por fontes energéticas baseadas no petróleo, constitui um grande desafio para a sociedade atual. A biomassa lignocelulósica é um recurso bio-renovável e um dos mais abundantes da terra representando uma das alternativas mais promissoras não só para produção de biocombustíveis, mas também como fonte de moléculas para aplicações diversas, tais como emulsionantes alimentares, cosméticos, filmes e revestimentos, polieletrólitos e aditivos para alimentação animal. O desenvolvimento de técnicas para desconstrução dessa biomassa é uma etapa crítica, pois possibilitará a exploração de uma enorme diversidade de matérias primas para a produção de produtos com alto valor agregado (Lima *et al.*, 2013, Sheng *et al.*, 2016).

A biorrefinaria atua como uma plataforma de produção “verde” na qual, diferentes processos são integrados para converter biomassa em produtos como combustíveis, produtos químicos e energia. O conceito de biorrefinaria é análogo ao conceito atual de uma refinaria de petróleo, diferindo na matéria prima utilizada, no qual a primeira baseia-se na biomassa vegetal e a outra no petróleo (Albarelli *et al.*, 2016; krasznai *et al.*, 2017).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (30-50%), hemicelulose (15-35%) e lignina (10-30%) e a sua utilização em processos industriais requer a sua desconstrução. O pré-tratamento da lignocelulose é o primeiro passo necessário para separar a celulose da lignina, e em seguida os polímeros de carboidratos devem ser hidrolisados a monossacarídeos simples. A sacarificação da lignocelulose é tradicionalmente feita por meio de métodos químicos, físicos e biológicos. Os métodos químicos e físicos são eficientes na hidrólise da lignocelulose, no entanto, geram grandes quantidades de derivados tóxicos de aldeídos, antraceno e furfural, que são capazes de inibir o subsequente processo de fermentação. Em contrapartida, a sacarificação biológica pode ser realizada em condições mais brandas, sendo considerada ideal para a desconstrução desses materiais (Sheng *et al.*, 2016).

Após o pré-tratamento da biomassa, os materiais celulósicos e hemicelulósicos são decompostos enzimaticamente em açúcares simples que podem ser metabolizados por microorganismos e convertidos em produtos químicos desejados, como por exemplo, álcoois, ácidos graxos, ácidos orgânicos entre outros. (Hasunuma *et al.*, 2013; Krasznai *et al.*, 2017).

Na natureza a sacarificação biológica é realizada por microrganismos ou comunidades microbianas, englobando fungos e bactérias. Em termos de atividade celulolítica específica, a bactéria anaeróbica e termófila *Clostridium thermocellum* tem se destacado na degradação da celulose, sendo até mais eficiente do que os sistemas de enzimas fúngicas (Sheng *et al.*, 2016).

1.1. Composição da biomassa de lignocelulose

A parede celular de plantas é uma estrutura rígida e organizada. Constituída principalmente por celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas. Sua composição específica pode variar de tecido para tecido e com o estágio de desenvolvimento da planta (Figura 1) (Mendu *et al.*, 2011). Os biopolímeros constituintes encontram-se associados por ligações covalentes e interações fracas, como pontes salinas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Estas interações são de extrema importância para a manutenção da estrutura da parede celular (Ishii & Matsunaga, 2001).

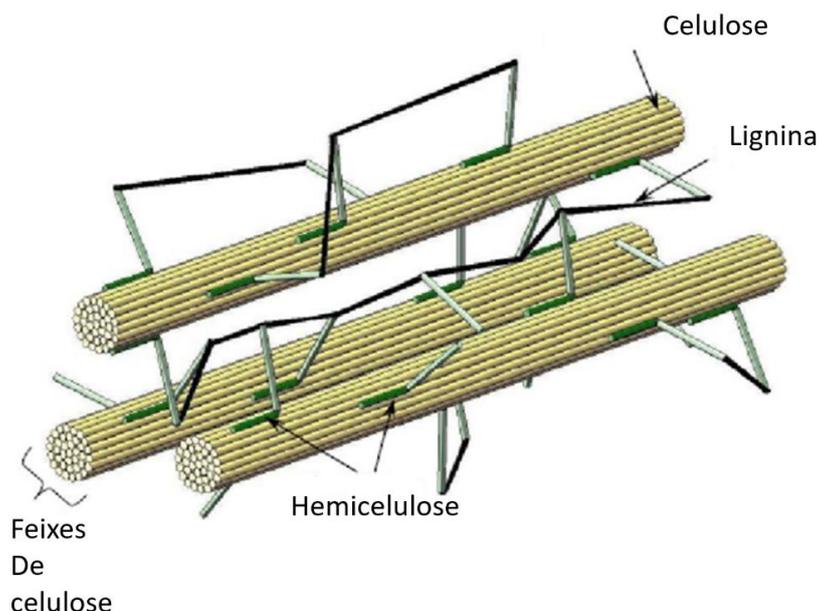


Figura 1. Principais componentes da parede celular vegetal. Adaptada de Murphy e McCarthy, 2005.

1.1.1. Celulose

A celulose é um polímero de cadeia linear composto por repetidas unidades de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 (Murphy e McCarthy, 2005). As cadeias individuais de celulose interagem umas com as outras através de ligações de hidrogênio, formando as microfibrilas de celulose (composta por cerca de 30 a 40 cadeias de glicano). A orientação das microfibrilas pode ser paralela ou antiparalela, formando a celulose do tipo I (mais abundante na natureza) ou tipo II, respectivamente. A união de aproximadamente 30 microfibrilas forma uma fibrila, que reunidas em unidades maiores formam as fibras de celulose (Isikgor *et al.*, 2015). Neste tipo de arranjo as moléculas componentes são envolvidas de forma ordenada e compacta, formando uma região cristalina que dificulta o acesso de enzimas e também de moléculas pequenas como água. As fibras de celulose também possuem uma região disposta de forma menos ordenada, frouxa, conhecida como região amorfa (Figura 2). Devido a sua estrutura, esta região é mais acessível ao ataque enzimático (Anwar *et al.*, 2014)

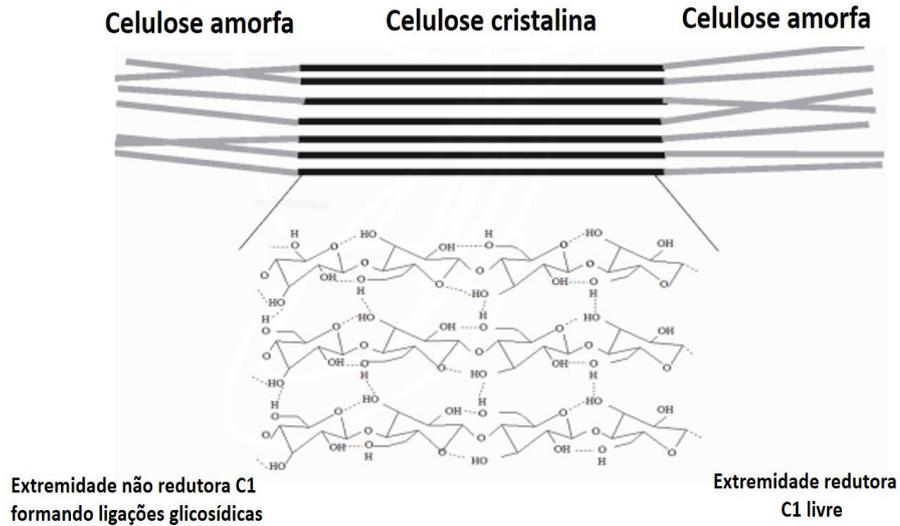
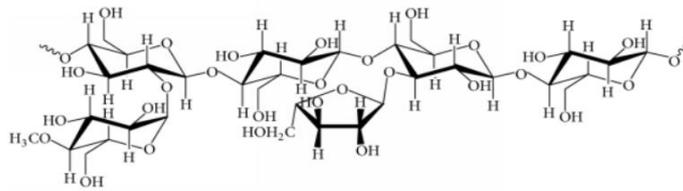


Figura 2. Estrutura da celulose cristalina amorfa. Extremidades redutoras e não redutoras são mostradas. Extraído e adaptado de Castañedo e Mallol, 2013.

1.1.2. Hemicelulose

Na parede celular vegetal a hemicelulose interage tanto com a celulose, através de ligações de hidrogênio, quanto com a lignina, por meio de ligações covalentes. Possui uma estrutura complexa constituída por polissacarídeos com polímeros de cadeias lineares ou ramificadas como xiloglucanos, xilanas, mananas e glicomananas e β - (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) –glucanos (Figura 3) (Davison *et al.*, 2004).

Xilana



Glicomanana

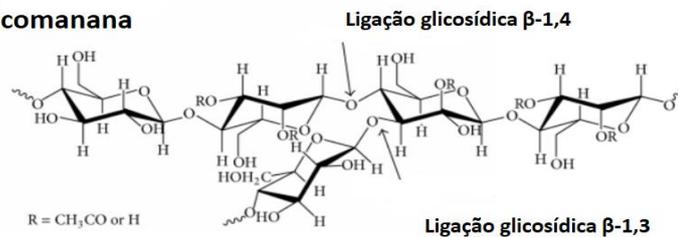


Figura 3. Estrutura química dos componentes da hemicelulose (xilana e glicomanana). Extraído e adaptado de Lee, 2014.

A xilana é a principal cadeia da hemicelulose e a mais abundante nos tecidos das angiospermas em comparação ao das gimnospermas. É formada por uma cadeia principal de unidades D-xilose com ligações do tipo β (1 \rightarrow 4). Além da xilose, as xilanas podem apresentar ramificações com ácido glicurônico, ácido 4-O-metilglicurônico, L-arabinose, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e D-galactose (Scheller e Ulvskov, 2010).

Os xiloglucanos possuem na sua cadeia principal resíduos de glicose associados por ligações β (1 \rightarrow 4), apresentando ramificações laterais tais como unidades de xilose, xilose-galactose ou xilogalactose-frutose. O xiloglucano se liga às microfibrilas de celulose por meio de ligações de hidrogênio, mantendo o espaçamento entre as mesmas e impedindo que estas se juntem e formem feixes muito espessos (Scheller e Ulvskov, 2010; Chen, 2014).

A manana pode ser dividida em quatro subfamílias: manana linear, glicomanas, galactomana e galactoglicomanana. A cadeia principal possui as unidades de manana (manana linear) que estão unidas entre si por ligações β (1 \rightarrow 4) ou uma combinação de resíduos de glicose e manose (glicomanana). As cadeias laterais também podem estar

associadas a resíduos de galactose (galactomanana/ galactoglucomanana). No esqueleto da cadeia principal as unidades de glicose e manose também podem ser acetiladas em C-2 ou C-3 (Moreira e Filho, 2008; Yamabhai, 2016).

1.1.3. Pectina

As pectinas são polissacarídeos constituídos principalmente pela molécula de α -D-galactopiranosilurônico, unidas por ligações α (1 \rightarrow 4), dando origem a cadeia de homogalacturonana (Figura 4). De acordo com as características estruturais, as pectinas são classificadas em homogalacturona, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II (Mohnen, 2008).

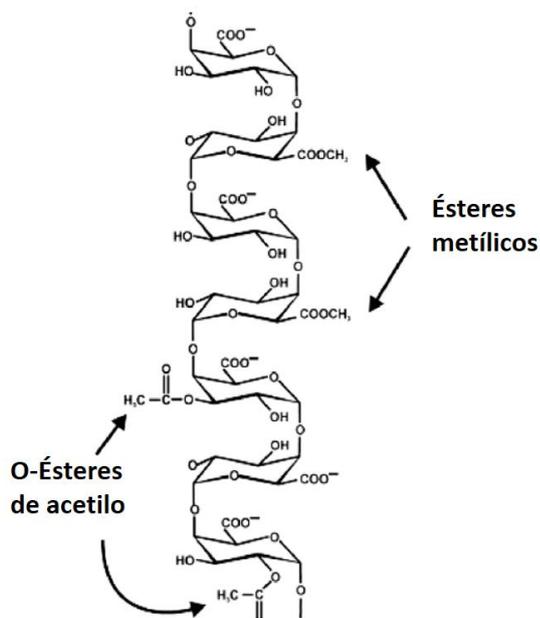


Figura 4. Estrutura da homogalacturonana. Extraído e adaptado de Hosmer e Mohnen, 2009.

Alguns dos resíduos galacturonosil presentes na homogalacturonana apresentam seus resíduos ácidos metil esterificados, assim como O-acetilações nos carbonos C-2 e/ou C-3. As cadeias de galacturonanas podem apresentar substituições laterais, tais

como xilogalacturanonas, que possuem resíduos β -D-xilosil associados ao carbono C-3 das moléculas de ácido galacturônico da cadeia principal.

Ramnogalacturonanas I possuem a cadeia principal constituída por repetições do dissacarídeo [$\rightarrow\alpha$ -D-GalpA-1,2- α -L-Rhap-1,4 \rightarrow]. Os resíduos de ácido galacturônico podem estar O-acetilados nos carbonos C-2 e/ou C-3. As ramnogalacturonanas II possuem cadeia de homogalacturonana com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos de galacturonato. As cadeias A e B são compostas por oito e nove unidades de açúcar, e se associam ao carbono C-2 de alguns resíduos de ácido galacturônico da cadeia principal. Já nas cadeias C e D, a associação ocorre através do carbono C-3 do ácido galacturônico (Hosmer e Mohnen, 2009).

1.1.4. Lignina

A lignina é o segundo componente mais abundante da natureza, sua estrutura é mais complexa do que a da celulose e da hemicelulose. Durante o desenvolvimento das plantas, a lignina é incorporada como último componente da parede celular, interpenetrando as fibras de celulose, acarretando no fortalecimento da parede celular vegetal. Fornece suporte estrutural para as plantas terrestres e atua como barreira mecânica na resistência contra pragas. É composta por três monômeros estruturais básicos: p-hidroxifenil (tipo H) derivados do álcool cumarílico, guaiacil (tipo G) derivados do álcool coniferílico e siringil (tipo S) derivado do álcool sinapílico (Figura 5). As proporções quantitativas dessas unidades variam muito em diferentes famílias de plantas. (Vanholme *et al.*, 2010; Dutta, 2015).

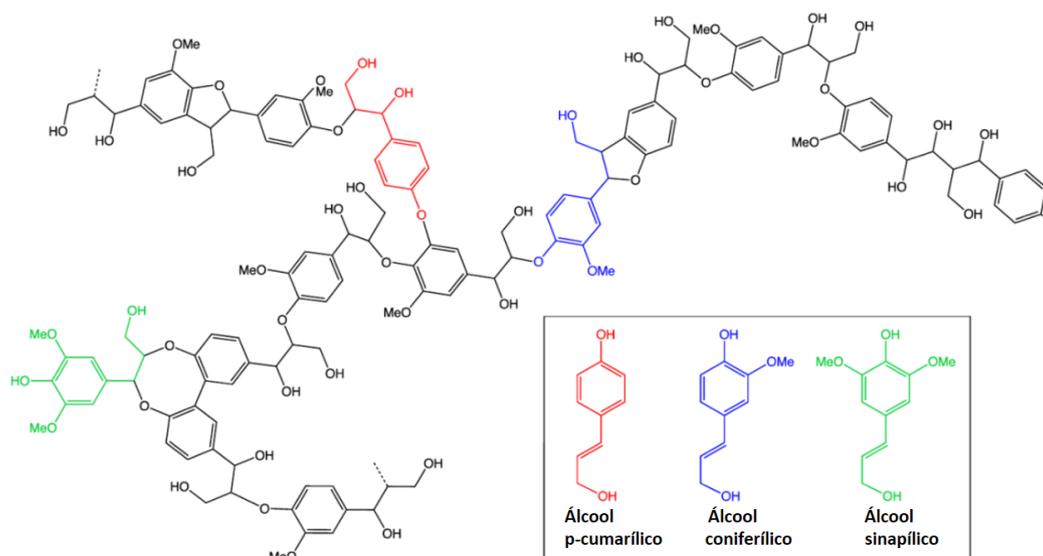


Figura 5. Representação esquemática dos componentes estruturais presentes na lignocelulose. Extraído e modificado de Pegler, 2003.

1.2. Desconstrução da biomassa de lignocelulose

Em virtude da sua composição complexa, a biomassa de lignocelulose exige um amplo espectro de atividades enzimáticas para a sua degradação. Os microrganismos que decompõe esses materiais utilizam um variado conjunto de atividades enzimáticas, que frequentemente envolvem misturas de celulases, hemicelulases e outras glicosídeo hidrolases relacionadas, que podem estar presentes na forma de enzimas livres ou reunidas em complexos enzimáticos. As misturas enzimáticas produzidas são adaptadas ao nicho ecológico e aos substratos presentes no seu habitat. (Heiss-Blanquet *et al.*, 2016).

1.2.1. Glicosídeo Hidrolases

Celulases e hemicelulases pertencem à família das glicosídeo hidrolases (GHs, EC 3.2.1.-) que constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre duas ou mais moléculas de carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção de não-carboidrato (Lombard *et al.*, 2014). As GHs são

classificadas dentro de famílias, com base na similaridade da sequência ou estrutura primária, uma vez que sequência e estrutura são relacionadas, muitas informações sobre estrutura, mecanismo e relações evolutivas podem ser deduzidas (St John *et al.*, 2016). Esta classificação é atualizada regularmente e está disponível no site do CAZY (Carbohydrate-Active enZymes data base web page : http://www.cazy.org/CAZY/fam/acc_GH.html) que atualmente conta com 149 famílias de GHs. Os avanços nas técnicas de sequenciamento de DNA na última década proporcionaram um aumento exponencial no número de sequências atribuídas a cada família. Assim, algumas famílias de GHs maiores e multifuncionais foram divididas em sub-famílias, incluindo GH 5, GH 13 e GH 30 e GH 43, baseados em análises filogenéticas e apoiados, sempre que possível, por estudos funcionais e estruturais de enzimas individuais (Aspeborg *et al.*, 2012; Mewis *et al.*, 2016; St John *et al.*, 2016). Os estudos citados acima, mostraram uma correlação muito mais forte entre designações de subfamílias e especificidade de substrato do que atribuições de nível familiar. As famílias de GHs também podem ser classificadas em grupos maiores, denominados "clãs". De acordo com a definição, um clã é um grupo de famílias que se provavelmente tem uma ascendência evolutiva comum e são reconhecidas por semelhanças significativas em sua estrutura terciária, juntamente com a conservação dos resíduos catalíticos e mecanismo catalítico. Assim, o conhecimento da estrutura tridimensional e a atribuição funcional de resíduos catalíticos são necessários para a classificação em clãs (Ezeilo *et al.*, 2017).

As GHs são caracterizadas pela presença do domínio catalítico que caracteriza a família e também domínios adicionais como módulo de ligação a carboidratos (CBM). Este módulo atua mediando a ligação das enzimas aos substratos, levando a uma catálise mais eficiente. Os CBMs são reunidos em 81 famílias diferentes, com base na similaridade da sequência de aminoácidos. Destas famílias, 54 foram classificadas como sendo dos tipos A, B e C. Os CBMs do tipo A, são os mais distintos entre os CBMs, uma vez que esta classe apenas se liga especificamente à superfície de polissacarídeos insolúveis altamente cristalinos, como celulose e/ou quitina. Os do tipo B identificam cadeias internas de glicanos (tipo endo) e interagem apenas com cadeias únicas de polissacarídeos, reconhecem cadeias mais longas. Já os CBMs do tipo C se ligam ao

terminal dos glicanos (tipo exo), ligam-se a mono, di ou tri-sacarídeos. Lectinas geralmente apresentam esse tipo de CBM (Himmel *et al.*, 2010).

➤ Celulases

As celulases catalisam a hidrólise ligações β -1,4- glicosídica entre os resíduos de glicose. Existem três tipos principais de atividades enzimáticas para a hidrólise da celulose: endoglicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases, incluindo celodextrinases (EC 3.2.1.74) e celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglicanases clivam randomicamente regiões internas da parte amorfa da celulose, produzindo oligossacarídeos de diversos tamanhos e novas extremidades de cadeia. Já as exoglicanases atuam de forma progressiva nas extremidades reductoras e não reductoras, podendo liberar tanto glicose como celobiose. As β -glicosidases degradam celodextrinas solúveis e celobiose gerando glicose (Figura 6) (Lee *et al.*, 2002).

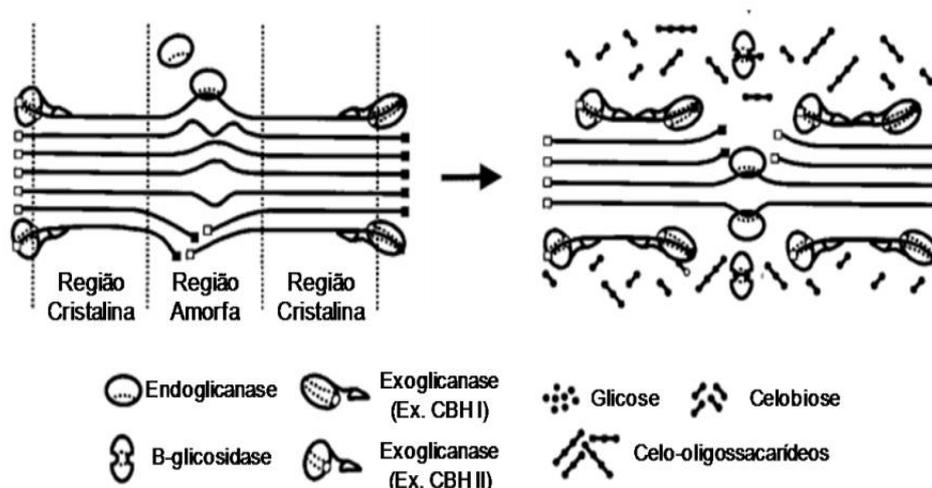


Figura 6. Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e microcristalina por sistemas de celulases não complexadas. Os quadrados (fechados) contínuos representam extremidades reductoras, e os quadrados abertos representam extremidades não reductoras.

➤ Hemicelulases

Por ser uma matriz complexa de polissacarídeos, a hemicelulose exige a ação de um grande número de enzimas que atuem de modo coordenado e sinérgico para a sua completa degradação (Figura 7). São as principais: endo-1,4- β -xilanases (E.C.3.2.1.8),

clivam aleatoriamente as regiões internas da xilana gerando duas novas extremidades e oligossacarídeos menores; β -xilosidases (E.C.3.2.1.37), atuam nas extremidades não redutoras dos xilooligômeros, degradando-os à xilose; acetil-xilana esterases (E.C.3.1.1.72), promovem a desacetilação de resíduos xilopiranosídicos da xilana e de outros xilooligossacarídeos; α -arabinofuranosidases (E.C.3.2.1.55) e α -D-glicuronidasas (E.C.3.2.1.139) correspondem às enzimas que atuam sobre as cadeias laterais da xilana, removendo os resíduos de arabinose e ácido glucurônico/ácido metilglucurônico, respectivamente e feruloil xilana esterases (E.C.3.1.1.73), que catalisam a hidrólise da ligação que une covalentemente ácidos hidroxicinâmicos da lignina com a xilana (Beg *et al.*, 2001; Motta e Santana, 2013; Kanti e Chakraborty, 2016).

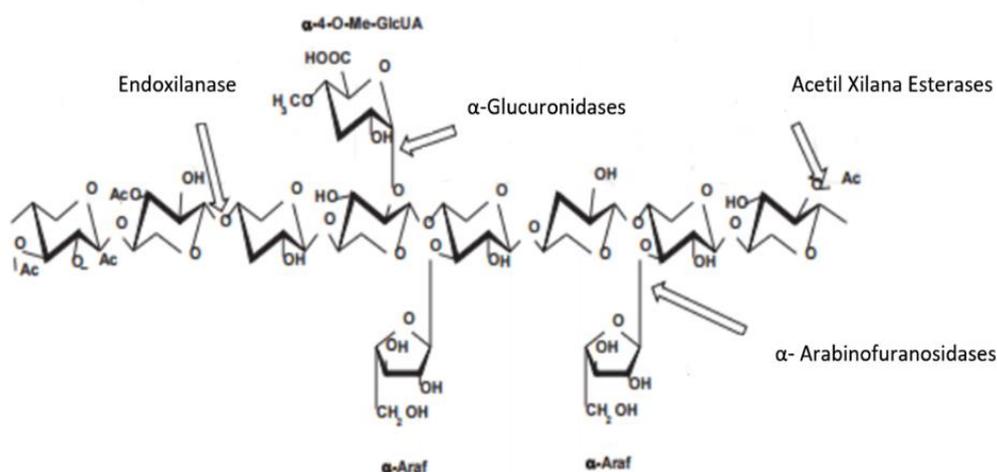


Figura 7. Enzimas xilanolíticas envolvidas na hidrólise da xilana. Extraída de Santana (2013).

➤ Pectinases

A despolimerização das pectinas também requer um conjunto de enzimas hidrolíticas para degradar completamente o polímero (Figura 8). Dentre as principais enzimas que atuam nesta estrutura encontram-se; as endopoligalactoturonases (EC 3.2.1.15), que catalisam a hidrólise de porções internas do polímero entre resíduos de ácido D-galacturônico, criando duas novas extremidades e oligossacarídeos menores; exo-poligalacturonase (E.C. 3.2.1.67), que catalisa a hidrólise de ligações do tipo α -1,4

liberando unidades de ácido D-galacturônico; ramnogalacturonase (E.C. 3.2.1.-), que atua de forma endo catalisando a hidrólise das ligações entre resíduos de ácido D-galacturônico e L-ramnose; exo-poligaracturonosidase (E.C. 3.2.1.82), catalisa a hidrólise de extremidades não redutoras da pectina liberando digalacturonato (Jayani *et al.*, 2005; Gonçalves e Filho, 2010).

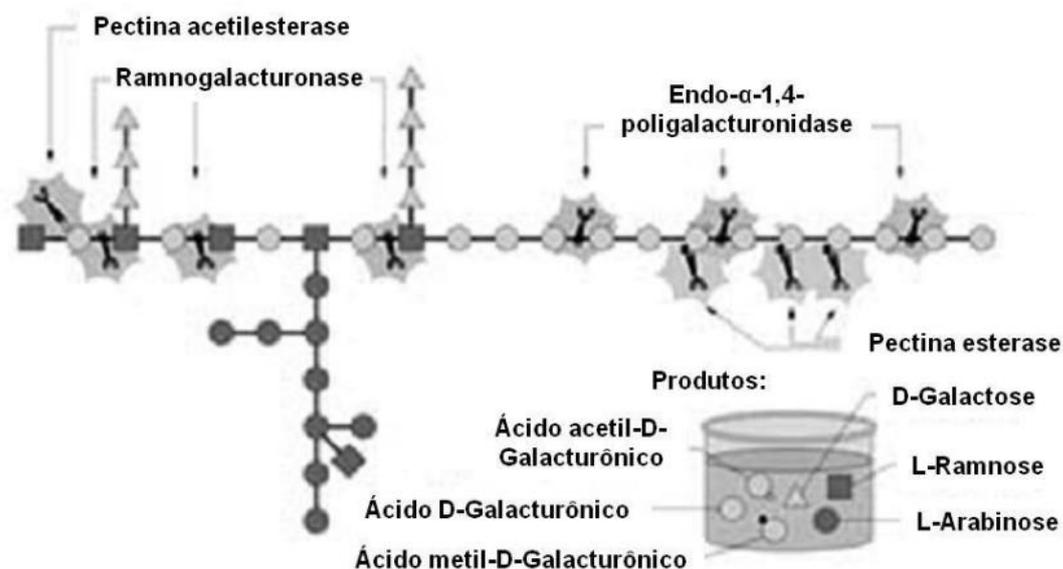


Figura 8. Principais enzimas envolvidas na hidrólise da Pectina. Extraído e modificado de Gonçalves e Filho, 2010.

➤ Enzimas Lignolíticas

Dos componentes da parede celular vegetal a lignina é quimicamente a mais difícil de ser desconstruída, devido a presença de grupos aromáticos e ao conjunto variado de unidades reticuladas C-C e C-O. Necessitando assim de um conjunto de famílias de enzimas para sua desconstrução (Figura 9). A lignina peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) catalisa a oxidação da lignina por transferência de elétrons, clivagens não catalíticas de várias ligações e abertura do anel aromático. A lacase (Lac) (EC 1.10.3.2) é uma oxiredutase que oxida unidades de fenóis presentes na lignina. A manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13) possui o manganês como cofator, e desempenha um papel importante durante os estágios iniciais da degradação da lignina. Em comparação com a lacase, a MnP causa maior degradação da lignina fenólica devido ao seu maior potencial redox (Xu *et al.*, 2014).

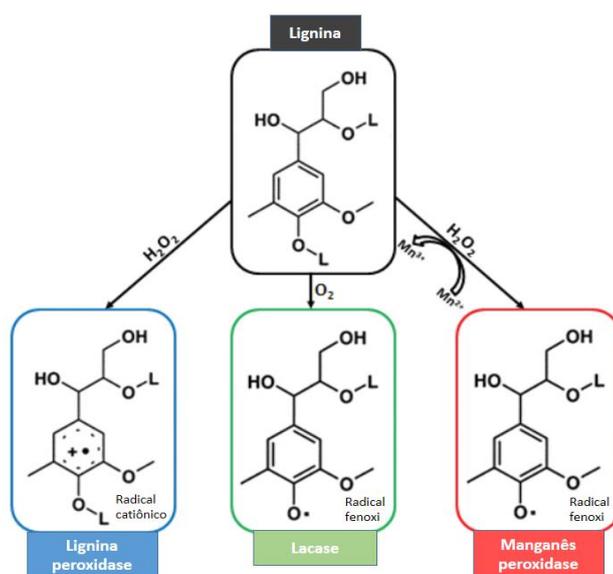


Figura 9. Enzimas envolvidas na degradação da lignina. Extraído e modificado de Pereira, 2017.

1.2.2. Desconstrução da biomassa de lignocelulose por *Clostridium thermocellum*

Clostridium thermocellum (recentemente reclassificada como *Ruminiclostridium thermocellum*) é uma bactéria anaeróbica, termofílica, celulolítica e etanogênica, que é capaz de degradar a biomassa de lignocelulose através de um complexo enzimático extracelular chamado de celulosoma. Essa maquinaria celulolítica é considerada uma das mais eficientes dentre os sistemas enzimáticos para a desconstrução da matéria vegetal, devido à organização de suas enzimas em proteínas estruturais que facilita o uso dos efeitos de sinergismo resultantes da interação entre as unidades catalíticas (Davidi *et al.*, 2016; Poudel *et al.*, 2017).

➤ **Complexos enzimáticos (Celulossomas)**

Este complexo é constituído por uma proteína estrutural que apresenta domínios específicos de ligação com glicosídeo hidrolases, subunidades catalíticas. O principal componente estrutural do celulossoma é a CipA, que é uma proteína de ancoragem que possui nove módulos de coesinas do tipo I, um módulo de doquerina do tipo II e módulo de ligação a carboidratos (CBM). As subunidades catalíticas deste complexo se caracterizam pela presença de doquerinas do tipo I que reconhecem especificamente e ligam por interações fracas às coesinas do tipo I, presentes na CipA, deste modo a proteína estrutural pode reunir várias atividades enzimáticas em um único celulossoma. (Bayer *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2016). Além dessa estrutura simples, baseada em uma única proteína estrutural primária (CipA), os celulossomas também formam estruturas mais complexas envolvendo proteínas estruturais secundárias, como OlpB, Orf2p e SdbA. Neste tipo de arranjo, as doquerinas do tipo II existente na CipA, reconhecem e se ligam especificamente à coesinas do tipo II presentes nas proteínas estruturais secundárias (Figura 10). A diferença entre essas proteínas estruturais secundárias, é o número de CipAs que podem ser ancoradas, OlpB possui o maior número de coesinas do tipo II, totalizando 7, o que constituirá um policelulossoma. SdbA e Orf2p são menores do que OlpB e ligam uma e duas moléculas CipA, respectivamente (Artzi *et al.*, 2016).

Os celulossomas podem ser encontrados na forma livre de células ou associados à superfície celular bacteriana. Os celulossomas livres não possuem um domínio ou motivo de ancoragem apropriado para ligação do complexo na superfície celular. Já nos celulossomas ancorados, as proteínas estruturais secundárias que medeiam a associação através de um domínio transmembrana, SLH, no C-terminal que as ancoram na superfície celular (Xu *et al.*, 2016).

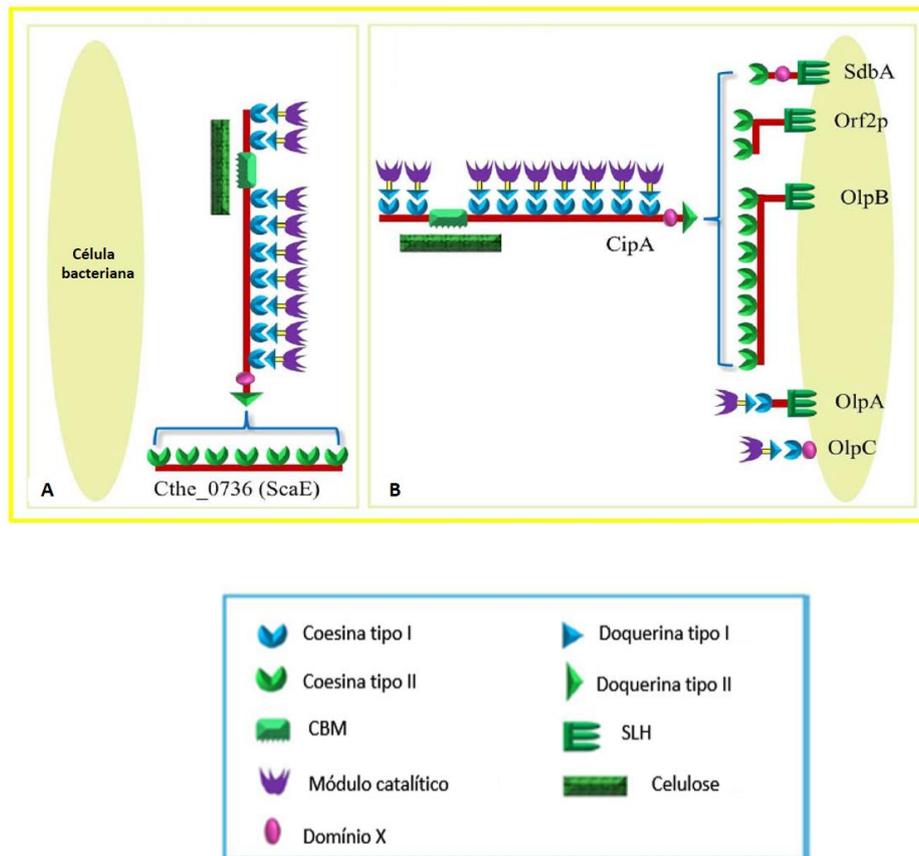


Figura10. Representação esquemática dos modelos de celulosomas de *C. thermocellum*. A) Sistema celulosomal livre da célula. B) Sistema de celulosomas ligados à célula. Modificado e extraído de Xu, 2016).

Em comparação com o sistema de enzimas livres, o celulosoma traz os módulos catalíticos em estreita associação física entre si, concentrando as enzimas com funções complementares em locais definidos no substrato lignocelulósico (Cameron *et al.*, 2015). No entanto, a proximidade enzimática dentro do complexo poderia teoricamente reduzir o sinergismo devido as restrições conformacionais impostas a intrincada estrutura quaternária do celulosoma. Porém, o celulosoma exibe uma estrutura quaternária flexível, no qual as seguintes propriedades contribuem para este efeito; As proteínas estruturais do celulosoma contém *linkers* intermodulares de vários comprimentos (geralmente longos); O *linker* entre o modo catalítico e a doquerina das enzimas fornece posicionamento ajustado do módulo catalítico no substrato; As doquerinas do tipo I das

enzimas do celulosoma de *C.thermocelum* podem ligar-se às coesinas correspondentes presentes na proteína estrutural em dois modos alternativos, gerando assim duas orientações opostas para o módulo catalítico associado na interface coesina-doquerina. Esse modo duplo de ligação proporciona uma plasticidade significativa, modulando ainda mais a orientação das subunidades catalíticas dentro da montagem do celulosoma, em relação ao substrato celulósico, à medida que o processo celulolítico prossegue (Brás *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2015)

1.3. Celulases e Xilanases celulosomais de *Clostridium thermocellum*

Clostridium thermocellum possui aproximadamente 74 proteínas pertencentes ao celulosoma catalogadas no banco de dados CAZy, dessas 47 possuem domínio GH, incluindo 23 celulases e 11 xilanases. (Wilson *et al.*, 2013; Zverlov *et al.*, 2017). Sendo que, 17 celulases (endo- β -glucanases, exoglucanases) e 5 xilanases (endo- β -xilanases) já foram purificadas e caracterizadas bioquimicamente (Tabela 1).

A maioria das celulases e xilanases são enzimas modulares, ou seja, são constituídas por módulos catalíticos e um ou mais domínios não-catalíticos, que consistem de módulos de ligação a carboidratos (CBM) e domínio (s) funcional adicional, incluindo um domínio doquerina. Cada módulo ou domínio compreende uma porção consecutiva da cadeia polipeptídica e forma uma unidade estrutural e funcionalmente distinta. Além dos módulos descritos na tabela 1 a celobiohidrolase (CbhA) possui domínios denominados como X1 e X2, que estão envolvidos na estabilização térmica da enzima, fazendo com que ela mantenha atividade significativa em temperaturas mais elevadas (80°C) (Brunecky *et al.*, 2012).

A massa molecular dessas enzimas é elevada por volta de 40 a 180 kDa, possuem uma ampla faixa de pH (4 a 9) com pH ótimos entre 5,6 e 7 e são capazes de atuar em temperaturas entre 40°C a 80°C. Devido a suas características, essas enzimas possuem um excelente potencial para aplicações industriais, embora nenhuma delas

tenha sido de fato utilizada. No entanto, muitas delas como CelK, CbhA, CelR, CelD, XynY, XynZ já se encontram disponíveis para usos comerciais (Hirano *et al.*, 2016).

Tabela 1. Celulasas e xilanase celulossomais purificadas e caracterizadas bioquimicamente. A tabela apresenta o nome do gene, nome da enzima, domínios presentes e atividade.

Gene	Nome	Massa molecular	Domínios	Atividade	Referência
cthe_0269	CelA	50,82	GH8 D1	endo- β -1,4- glucanase	Schwarz et al. 1986
cthe_0825	CelD	70,33	GH9 D1	endo- β -1,4- glucanase	Joliff e Aubert 1986
cthe_0543	CelE	89,22	GH5 CE2 D1 CBM2	endo- β -1,4- glucanase, endo- β -1,4 xilanase, β - mananase	Hall et al.,1988
cthe_2872	CelG	62,31	GH5 D1 CBM2 GH5 GH26 CBM11	endo- β -1,4- glucanase	Lemaire et al.1993
cthe_1472	CelH	101,28	D1	endo- β -1,4- glucanase	Yagüe et al.,1990
cthe_0412	CelK	99,24	GH9 CMB4 D1 GH9 GH44 CBM30	exo- β -1,4- glucanase endo- β -1,4- glucanase, endo- β -1,4 xilanase,	Kataeva et al.1999
cthe_0624	CelJ	176, 75	CBM44 1 D1	xiloglucanase	Ahsan et al.,1996
cthe_0043	CelN	79,59	GH9 CBM3 D1	endo- β -1,4- glucanase	Zverlov et al.,2003
cthe_2147	CelO	73,35	GH5 CBM3 D1	exo- β -1,4- glucanase	Zverlov et al.,2002
cthe_0578	CelR	80,96	GH9 CBM3 D1	endo- β -1,4- glucanase	Zverlov et al.,2005
cthe_2098	Cels	82,28	GH48 D1 GH9 CBM4 CBD3	exo- β -1,4- glucanase	Kruus et al.,1995
cthe_0413	CbhA	135,78	D1	exo- β -1,4- glucanase	Zverlov et al.,1998
cthe_0435	Cel124A	37,8	GH124 D1	endo- β -1,4- glucanase	Bras et al.,2011
cthe_0536	CelB	62,74	GH5 D1	endo- β -1,4- glucanase	Joliff et al.,1986
cthe_0625	CelQ	78,53	GH9 CBM3 D1	endo- β -1,4- glucanase	Arai et al.,2001
cthe_2812	CelT	66,5	GH9 D1	endo- β -1,4- glucanase	Kurokawa et al.,2001
cthe_1838	Xyn10C	67,76	GH10 CBM22 D1	endo- β -1,4- Xilanase	Hayashi et al.,1997
cthe_2590	Xyn10D	71,1	GH10 CBM22 D1	endo- β -1,4- Xilanase	Zverlov et al.,2005
cthe_2195	XynE		GH141 CBM6 D1	endo- β -1,4- Xilanase/feruloil esterase	Zverlov et al.,2017
cthe_1963	Xyn10Z	90,89	GH10 CBM6 D1 GH10 CE1CBM22	endo- β -1,4- Xilanase/feruloil esterase	Grépinet et al.,1988
cthe_0912	Xyn10Y	117,74	D1	endo- β -1,4- Xilanase/feruloil esterase	Fontes et al.,1995

1.4. Celulossomas sintéticos

A produção de celulossomas artificiais foi proposta pela primeira vez em 1994 e baseia-se nas interações específicas entre os módulos de coesina e doquerina, permitindo a automontagem de seus componentes. Para este fim, pode ser utilizado uma proteína estrutural quimérica que contém coesinas com especificidades divergentes juntamente com um conjunto de enzimas que contém os mesmos tipos correspondentes de doquerinas, permitindo assim o controle da localização das enzimas na proteína de ancoragem (Morais *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2016). No entanto, a maioria dos estudos realizados com celulossomas artificiais, as proteínas estruturais utilizadas imitam a arquitetura original da CipA *C.thermocellum*. Estes estudos propõem a montagem de celulossomas tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, e os resultados obtidos demonstram atividades aprimoradas na hidrólise de substratos recalcitrantes (Fierobe *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2011; Krauss *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Davidi *et al.*, 2013; Hirano *et al.*, 2016).

Enzimas não celulossomais também podem ser incorporadas aos celulossomas sintéticos, por meio da adição de sequências correspondentes a doquerinas em suas sequências nativas. Em estudos realizados por Caspi *et al.*, 2010 e Moraes *et al.* 2010, enzimas livres de *Thermobifida fusca* (endoglucanase Cel5A, exoglucanase Cel48A (Xyn10A e Xyn10B) foram incorporadas com sucesso em proteínas estruturais contendo coesinas com especificidades específicas para as doquerinas utilizadas, os complexos exibiram atividades sinérgicas aprimoradas na degradação da palha de trigo, em comparação com as suas equivalentes enzimas livres.

Para a produção de complexos “*in vivo*” muitos microrganismos são projetados para exibir celulossomas na superfície celular, estes organismos incluem *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum*. Na maioria dos casos, esses complexos proporcionaram uma degradação mais eficiente de substratos de parede celular vegetal. Além disso, é possível recuperar as enzimas por centrifugação das células e sua reciclagem como biocatalisadores, o que pode acarretar na diminuição de custos (Kim *et al.*, 2013; Artzi *et al.*, 2016).

1.5. Aplicações industriais de Celulases e Xilanases

As celulases e xilanases começaram a ser utilizadas industrialmente desde a década de 1980, atualmente tornaram-se um grupo de enzimas com diversas aplicações industriais, tais como, nas indústrias alimentícia, têxteis (processamento biológico de tecidos), papel e celulose, biocombustíveis e produtos químicos. O uso de enzimas ao invés de produtos químicos é vantajoso, pois permitem alta eficiência de conversão de produtos, ausência de perda de substratos devido às modificações químicas, e o uso de operações físico-químicas mais moderadas e não corrosivas, causando menos danos ao meio ambiente (Chakdar *et al.*, 2016).

Essas enzimas possuem um papel importante na indústria de alimentos. As xilanases são responsáveis pela redução do teor de hemicelulose da farinha de trigo, que resulta na redistribuição da água deixando a massa mais suave e mais fácil de processar. Na fabricação de biscoitos cream-crackers melhoram a textura, palatabilidade e uniformidade. Na produção de sucos o uso de celulases em conjunto com xilanases, amilases e pectinases são responsáveis por: melhorar a qualidade e quantidade por meio da liquefação das frutas e vegetais; estabilização da polpa das frutas; aumentar recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, corantes comestíveis e pigmentos. Além da redução da viscosidade, hidrólise de substâncias que impedem a limpeza físico química dos sucos ou que possam causar nebulosidade no concentrado (Harris e Ramalingan, 2010).

Na indústria de processamento biológico de tecidos o tratamento com xilanases pode remover significativamente as impurezas hemicelulósicas, aumentando assim as propriedades absorventes de água da fibra, sem afetar a resistência das fibras durante o processo de centrifugação. No final do processo a fibra torna-se mais macia e suave (Burlacu *et al.*, 2016).

O processo de branqueamento para aumentar o brilho do papel utilizado na indústria de papel e celulose é feito normalmente por processos químicos. O uso desses agentes causa sérios danos aos componentes da celulose e reduz o rendimento e viscosidade da polpa. As xilanases são utilizadas principalmente para reduzir o uso de produtos químicos e facilitar o branqueamento. É essencial que os extratos enzimáticos

utilizados neste processo sejam livres de celulases, para evitar o comprometimento das fibras de celulose constituintes do papel (Walia *et al.*, 2017).

Celulases, lacases e xilanases, em conjunto com outras enzimas hidrolíticas, podem ser utilizadas para a geração de biocombustíveis, como etanol, a partir da biomassa de lignocelulose. A produção de bioetanol requer deslignificação da lignocelulose para liberar a celulose e a hemicelulose. Os próximos passos incluem despolimerização dos polímeros de carboidratos para produzir açúcares livres e finalmente a fermentação (Kumar *et al.*, 2017).

1.6. *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) como sistema de expressão heteróloga

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, reclassificada como *Komagataella phaffii*, é amplamente utilizado como sistema de expressão de proteínas heterólogas. Foi introduzida há mais de 40 anos pela Phillips Petroleum para a produção comercial de *single-cell protein* (SCP) como aditivo alimentar animal, devido ao baixo custo da síntese de metanol a partir de gás natural metano. Mas devido à crise do petróleo em 1973, o preço do metanol aumentou drasticamente tornando a produção de SCP economicamente inviável. Na década de 1980, *P. pastoris* foi desenvolvida como um sistema de expressão de proteínas heterólogas. Esse sistema inicialmente patentado pela Phillips Petroleum, foi disponibilizado à comunidade científica para fins de pesquisa (Macauley-patrick *et al.*, 2005).

P. pastoris é capaz de utilizar o metanol como única fonte de carbono. A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa o primeiro passo na via de utilização do metanol, oxidando este álcool a formaldeído usando oxigênio molecular. Além do formaldeído, essa reação gera peróxido de hidrogênio. Para proteger a célula da toxicidade do peróxido de hidrogênio, o metabolismo ocorre dentro do peroxissomo. AOX é retida dentro desta organela junto com uma catalase, que transforma o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. (Cereghino e Cregg, 2000).

O promotor que regula a produção de álcool oxidase é o mesmo que é utilizado para conduzir a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*. Essa levedura possui

dois genes que codificam a álcool oxidase (*AOX1* e *AOX2*), sendo que o primeiro é responsável pela maioria da álcool oxidase expressa na célula. A afinidade de AOX pelo O₂ é baixa, o que é compensado com a síntese de grandes quantidades da enzima. A expressão do *AOX1* é controlada a nível transcricional, em células crescidas em metanol ~5% do RNA poliA+ provém da transcrição do gene *AOX1* enquanto que em células crescidas em outras fontes de carbono, o mensageiro *AOX1* é indetectável (Cregg *et al.*, 2002). A regulação do gene é controlada por dois mecanismos: um envolvendo repressão/desrepressão e outro, indução. O promotor *AOX1* é fortemente reprimido quando as células crescem em glicose e na maioria das outras fontes de carbono. A presença de metanol como única fonte de carbono é essencial para a indução de altos níveis de proteína, constituindo cerca de 35% do total de proteínas solúveis, porém em culturas crescidas em glicose, etanol ou glicerol sua expressão é indetectável. (Tschopp *et al.*, 1987) (Cregg e Cereghino, 2000; Krainer *et al.*, 2012).

As técnicas necessárias para fazer modificações no nível molecular são similares àquelas utilizadas em *Saccharomyces cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados. Uma outra habilidade desta levedura é crescer em altas densidades celulares e também é capaz de produzir altos níveis da proteína recombinante. Por último, tem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais como glicosilação, clivagem proteolítica e formação de ligações dissulfeto. Além de possuir o status GRAS (Generally Regarded As Safe) (Cereghino *et al.*, 2002; Krainer *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A biomassa de lignocelulose é um recurso alternativo potencial que poderia satisfazer futuras demandas de bicompostíveis, biopolímeros e produtos químicos com alto valor agregado. No entanto, a diversidade e complexidade da lignocelulose, tanto quimicamente quanto estruturalmente, contribuem significativamente para a sua recalcitrância na desconstrução. Os atuais esforços de pesquisa e desenvolvimento, concentram-se nas estratégias eficientes de degradação da biomassa de lignocelulose por bactérias anaeróbicas produtoras de celulosomas. A produção de celulosomas sintéticos, com composição de subunidades definidas tem se mostrado eficiente na degradação de substratos complexos. Neste contexto, pesquisas voltadas para o entendimento e desenvolvimento de celulosomas artificiais que possam ser utilizados como ferramentas que atuem na desconstrução da biomassa de lignocelulose de forma eficiente, podem contribuir para o desenvolvimento de bioprodutos a partir dessa biomassa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Clonar e expressar os genes da endo-xilanase xyn10, endoglucanase celJ em *P. pastoris* (GS115) e mini-CipA em *E.coli* (BL21) codificadores de proteínas celulosomais para montagem de celulosomas “in vitro”.

3.2. Objetivos específicos

- Obter as proteínas heterólogas (Xyn10D*, CelJ/A e mini-CipA);
- Caracterizar Xyn10D* heteróloga com relação aos seus parâmetros cinéticos;
- Montar celulosomas “in vitro” utilizando a xilanase Xyn10D*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens de Bactérias

- *Escherichia coli* BL21 (DE3) – (Promega): *F*⁻, *ompT*, *hsdSB* (*rB*⁻, *mB*⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3), *pLysS*, *Cmr* (Studier e Moffatt. 1986).
- *Escherichia coli* XL10 – GOLD (Stratagene): *Tetr* Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [*F'* *proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr*] (Greener e Jerpseth. 2006).

4.2. Linhagem de Levedura

- *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen EUA): *his4*.

4.3. Vetores

- **pBluescript II SK** - Vetor de clonagem. Possui origem de replicação do fago f1, promotor T7 e T3, parte do gene *lacZ α* que codifica o fragmento aminoterminal da enzima β -galactosidase, sítio múltiplo de clonagem, gene de resistência a ampicilina como marca de seleção e sítios para os primers T7, M13 e M13 reverso (Stratagene) (Anexo 1).
- **pET-24d**- Vetor bacteriano de expressão. Possui origem de replicação do fago f1, promotor T7, gene de resistência a canamicina, gene *lacI*, operador *lac*, Tag1: T7(Nterm), His (Cterm), sítio para o primer T7 e múltiplos sítios de clonagem (Novagen (EMD Millipore)) (Anexo 2).
- **pPIC9**- vetor de expressão de *P.pastoris*. Possui o promotor e a sequência terminadora do gene *AOX1*, origem de replicação do fago f1, mutiplo sítios de clonagem e gene codificando sinal de secreção de proteína N-terminal (fato α). O promotor é induzido por metanol. Contêm marca de seleção para bactérias (resistência a ampicilina) e para leveduras (*HIS4*) (Thermo Fisher (Invitrogen) (Anexo3).

4.4. Genes

Os genes codificadores da endo-xilanase (Xyn10D) e da endoglucanase (CelJ) de *C.thermocellum*, foram sintetizados quimicamente pela empresa GenOne Biotechnologies. Cada gene foi clonado dentro do sítio de restrição SmaI do plasmídeo pBluescript II SK (-). Foram adicionados os sítios de restrição XhoI na extremidade 5' e NotI, BglIII na extremidade 3'. Os códons das duas proteínas foram otimizados para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. As duas construções produzidas foram denominadas pBSK-CelJ/A (para a endoglucanase) e pBSK -Xyn10D* (para endo-xilanase). A escolha dos genes (*celJ* e *xyn10D*) foi baseada em dados transcriptoma de *C. thermocellum* B8 cultivada em bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar e celulose, obtidos pelo grupo de pesquisa, no qual é mostrado que esses genes são regulados positivamente em bagaço/palha em comparação com a celulose (Camargo. 2017).

Para iniciar a montagem dos mini-celulossomas, optou-se por uma proteína estrutural (mini-CipA) contendo dois módulos de coesinas (Coh1-Coh2) já obtida pelo grupo. A construção plasmídeo pET-24 d contendo o gene da mini-CipA foi denominada como pET-ΔCipA.

4.5. Montagem no vetor de expressão pPIC9

Os vetores pBluescript II SK contendo os genes da endo-xilanase (Xyn 10D) e da endoglucanase (CelJ) denominadas como; pBSK-CelJ/A e pBSK-Xin10D* foram digeridos com as enzimas de restrição NotI e XhoI (New England Biolabs) para liberar os fragmentos correspondentes aos genes da *celJ* e *xin10D*. As digestões foram feitas conforme especificado pelo fabricante, geralmente foram utilizados 10 U de enzima para cada 5µg de DNA, incubados a 37°C por 16 horas. O volume de enzima utilizado não ultrapassou 10% do volume final da reação. Após a digestão, os fragmentos de DNA foram analisados em gel agarose 0,8%, feitos de acordo com Sambrook *et al.* 2001. O fragmento correspondente ao gene de interesse foi excisado do gel e purificado utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), conforme especificações do

fabricante. O vetor de expressão induzida pPIC9 foi digerido nas mesmas condições e com as mesmas enzimas de restrição, e em seguida foi desfosforilado com enzima *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)* (New England Biolabs) (*CIP*) (New England Biolabs). A reação de desfosforilação foi realizada utilizando-se 0,5 U de CIP / μg de DNA, o sistema foi incubado a 37°C por 60 minutos e depois, para inativação da enzima, a 65°C por 5 minutos. Os fragmentos contendo os genes (incertos) foram ligados ao vetor pPIC9 na razão molar de 1:3. A ligação foi feita utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Promega) a 4°C durante 16 horas, a reação de ligação foi feita conforme indicado pelo fabricante. Os vetores de pPIC9 contendo os genes da endoxilanase e da endoglucanase CelJ foram nomeados como; pPIC9-Xyn10D* e pPIC9-CelJ/A respectivamente. Na figura 11 é mostrado a estratégia geral utilizada.

Para obtenção de material para os próximos experimentos, a bactéria de clonagem *E.coli* XL10GOLD competente foi transformada com os vetores pPIC9-Xyn10D* e pPIC9-CelJ/A, e o o DNA plasmidial foi extraído da bactéria conforme descrito nos itens 4.6, 4.7 e 4.8.

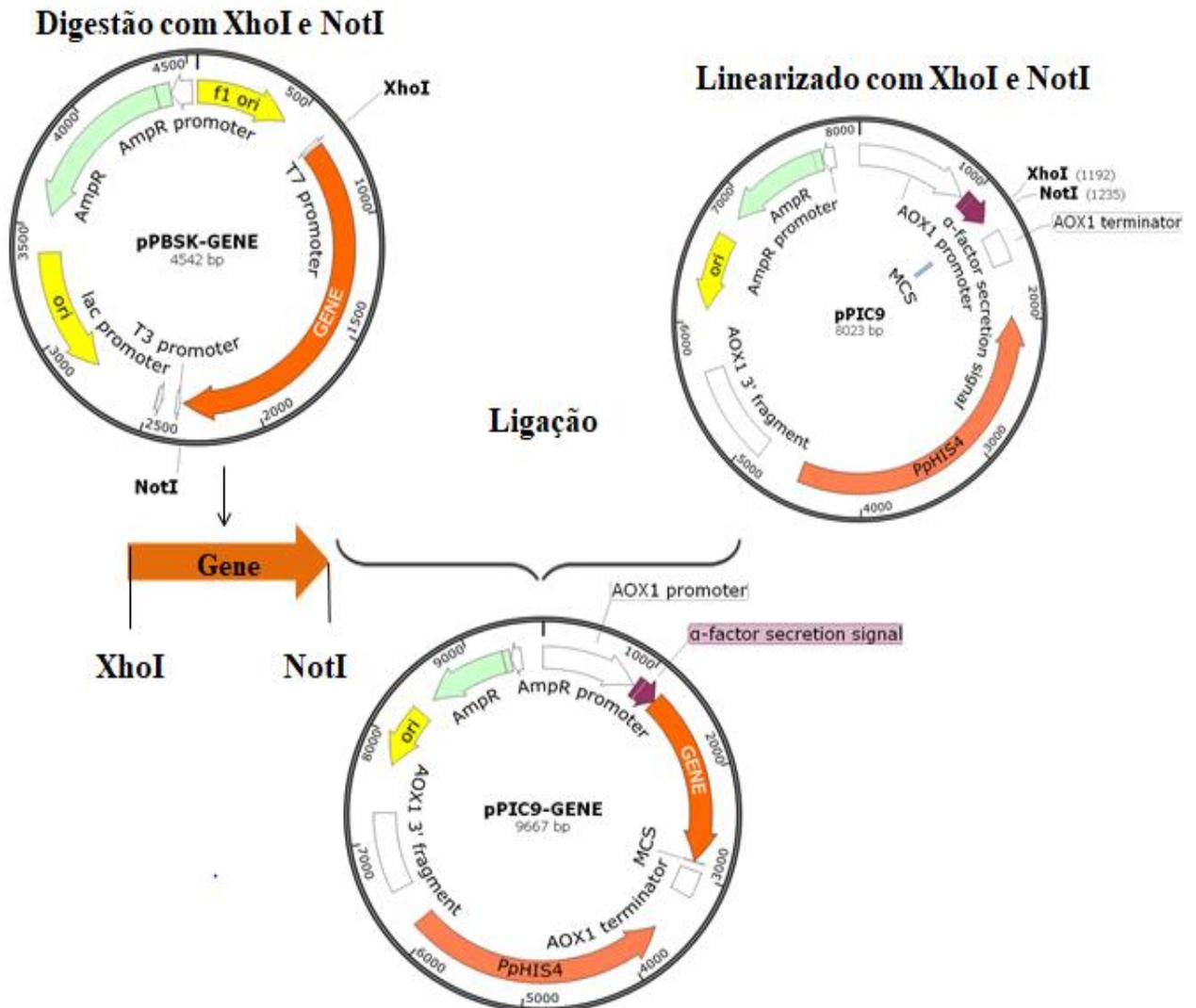


Figura11. Estratégia utilizada para a montagem no vetor de expressão induzida pPIC9. Estratégia utilizada para a montagem no vetor de expressão induzida pPIC9. O vetor pBSK contendo o gene de interesse foi digerido com as enzimas de restrição NotI e XhoI para liberar o fragmento correspondentes ao gene. Em seguida, o gene foi ligado ao vetor de expressão induzida pPIC9, que foi linearizado com as mesmas enzimas de restrição.

4.6. Preparação de células *E.coli* BL21 (DE3) e XL10GOLD competentes

As células da linhagem de *E. coli* foram crescidas em 3 mL de meio Luria-Bertani (LB); (peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 1% (p/v)) a 37 ° C durante 16 horas a 37° C sob agitação de 200 rpm. Após esse período, 1mL do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio SOB; (extrato de levedura 0,5% (p/v), peptona 2% (p/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, e 10 mM MgCl, (pH 7,0) e essa cultura foi incubada a 37 ° C sob agitação (250 rpm) até atingir OD₆₀₀ de 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g durante 10 minutos a 4° C e ressuspensas em 30ml da solução gelada MgCl₂ –CaCl₂ (80mM MgCl₂, 20Mm CaCl₂). As células foram submetidas a uma nova centrifugação sob as mesmas condições, logo em seguida e o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 4 mL da solução gelada de 0.1M de CaCl₂. Para a transformação as células foram aliqüotadas em tubos de 1,5 mL (200 µL/tubo).

4.7. Transformação *E.coli* BL21 (DE3) e XL10GOLD por choque térmico

Para a transformação bacteriana foram adicionados 5 µL do sistema de ligação a 200 µL de células competentes previamente aliqüotadas. As células foram incubadas por 30 minutos no gelo e em seguida foram submetidas ao choque térmico a 42°C, por 90 segundos. Depois desse período, foram adicionados 800 µL de meio SOC; (extrato de levedura 0,5% (p/v), peptona 2% (p/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ e 20 mM de glicose) e incubados a 37°C por 1 hora. As células foram plaqueadas em meio LB-ágar (meio LB acrescido de ágar bacteriológico 2% (p/v) com antibiótico (ampicilina ou canamicina (50 mg/L) e incubadas a 37°C durante a noite.

4.8. Extração de DNA plasmidial (mini-prep)

Uma colônia de bactéria transformada com o vetor de interesse foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado (ampicilina 50 mg/L ou canamicina 50 mg/L) a 37°C durante 16 horas sob agitação de 200 rpm. Estas células foram coletadas através de centrifugação a 2000 x g por 2 minutos a 4°C, e ressuspensas em 200 µL de Tampão Tris- EDTA acrescido de glicose; (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM e glicose 50 mM). E em seguida, foram adicionados 360 µL de solução de lise alcalina recém-preparada; (0,2M NaOH e SDS 1 % (p/v) a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente foram adicionados 300 µL de solução de Neutralização gelada; (acetato de sódio 3M e ácido acético 2M pH 5,0) a mistura foi homogeneizada e incubada no gelo por 5 min. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 µL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de Tampão Tris-HCl; (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Em seguida, foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e a mistura homogeneizada em vortex seguido de centrifugação a 10000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 µL de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 10000 x g por 5 min o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% seguido de uma nova centrifugação utilizando os mesmos parâmetros. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi removido por exposição das amostras a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspendido em 40 µL de água milliQ e RNase A (20 µg/mL). O DNA foi armazenado a -20 °C até seu uso.

4.9. Transformação de *P.pastoris* GS115 competente

Uma colônia de levedura foi crescida em 5 mL de meio extrato de levedura peptonada glicose (YPD); (extrato de levedura 1% (p/v), peptonada 2% (p/v), glicose 2% (p/v), durante 24 h de crescimento a 28°C sob agitação de 250 rpm. Cerca de 500 µL do

pré-inóculo foi adicionado a 100 mL do meio YPD. As células foram crescidas durante a noite, sob as mesmas condições, até uma OD₆₀₀ ~1,3-1,5. As células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 50 mL de água estéril gelada. Após a repetição deste último passo, as células foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1 M gelado centrifugando-se sob as mesmas condições. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 300 µL de sorbitol 1 M gelado e 80 µL dessas células competentes foram misturadas com 5-10 µg de DNA dos plasmídeos obtidos conforme descritos no item 4.5, e como controle foi utilizado o vetor pPIC9 sem o incerto (os plasmídeos foram previamente linearizados com a enzima de restrição Sall (*New England Biolabs*) conforme descrito no item 4.5). Foram adicionados 320 µL de sorbitol 1 M gelado e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad) e incubadas no gelo por 5 minutos antes de aplicar um pulso elétrico sob as seguintes condições: 1500 V, 400 Ω, e 25 µF. Logo após o pulso, 1 mL de sorbitol 1 M gelado foi adicionado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo coletor de 1,5 mL estéril e as células foram incubadas a 30°C sem agitação durante 2 horas. Após esse período, para a seleção dos transformantes as células foram semeadas em meio mínimo com glicose-Ágar (MD-Ágar) sem histidina; (YNB com sulfato de amônio 1,34% (p/v), biotina 4 x 10⁻⁵ % (p/v) (solução estoque de biotina 500X biotina 0,02% (p/v), glicose 2% (p/v), ágar bacteriológico 2 % (p/v)) e as placas foram incubadas em uma estufa a 30°C até o aparecimento de colônias recombinantes, em torno de 72 horas. Extraído de EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, EUA).

4.9.1. Seleção de clones recombinantes

Os clones transformantes com os vetores pPIC9-CelJ/A, pPIC9-Xyn10D* e pPIC9 sem o incerto foram crescidos por 72 horas a 30°C em placa de Meio Mínimo

com CMC-Ágar Tamponado (MM-CMC-Ágar Tamponado); (YNB com sulfato de amônio 1,34% (p/v), biotina 4×10^{-5} % (p/v), metanol 0,5% (v/v), carboximetilcelulose (CMC *low viscosity* - Sigma) 0,5% (p/v), ágar bacteriológico 2% e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0) para detecção de atividade de endoglucanase. E Meio Mínimo com Xilana-Ágar Tamponado (MM-Xilana-Ágar Tamponado); (YNB com sulfato de amônia 1,34% (p/v), biotina 4×10^{-5} % (p/v), metanol 0,5% (v/v), xilana (*Xylan oalt spelts* - Sigma) 0,5% (p/v), ágar bacteriológico 2% e de tampão fosfato de Potássio 100 mM pH 6,0 para detecção de atividade da endo-xilanase. A cada 24 horas foram adicionados 200 μ L de metanol 100% na parte interna da tampa da placa para indução do promotor *AOXI*. Após o período de crescimento, as placas foram coradas com solução de *Congo Red* 0,1% (p/v) durante 15 minutos e descoradas com solução NaCl 1 M por 15 minutos. Os clones transformantes foram detectados pela presença de halo de hidrólise na área de crescimento da colônia. Foi selecionado um clone de cada atividade e estes foram denominados como clone pPIC9-CelJ/A-1 e pPIC9-Xyn10D*-3.

4.10. Expressão dos genes em leveduras recombinantes

Os clones pPIC9-CelJ/A-1, pPIC9-Xyn10D*-3 e o clone controle (pPIC9-vazio) foram inoculadas em 25 mL de meio complexo tamponado com glicerol (BMGY); (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), YNB 1,34% (p/v), biotina 4×10^{-5} % (p/v), glicerol 1% (v/v), tampão fosfato 100 mM pH 6,0) e cultivadas em frascos de 250 mL a 28°C sob agitação de 200 rpm durante 24 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos e ressuspensas em 100 mL de meio complexo tamponado com metanol (BMMY); (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), YNB 1,34% (p/v), biotina 4×10^{-5} % (p/v), metanol 1% (v/v), tampão fosfato 100 mM pH 6,0, e então transferidas para frascos de 1L e retornadas ao crescimento sob as mesmas condições de temperatura e rotação. A cada 24 horas de crescimento foi adicionado 1mL de metanol 100% para uma concentração final de 1% ao meio BMMY. No intervalo de 0 a 96 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL a cada 24 horas, para determinação da atividade enzimática, análise do perfil proteico em gel SDS-PAGE e zimograma.

4.11. Determinação da atividade enzimática de endoglucanase e endoxilanase e quantificação de proteínas

Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando como substrato CMC- *low viscosity* e xilana *oat spelts* na concentração de 2% (m/v) e na proporção volumétrica de 1:2 de amostra enzimática e substrato. Para a atividade de endo-glucanase e endoxilanase foram utilizados os seguintes tampões; acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 respectivamente. Após 30 minutos de reação a 65°C, 300 µL do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados para interromper a reação em cada tubo de ensaio, estes foram fervidos durante 10 minutos para detecção dos açúcares redutores liberados segundo o método de Miller (1959) e a absorbância foi medida a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para obter um micromol de açúcar redutor por minuto de reação.

A concentração de proteínas nas amostras foi determinado utilizando o kit Quick Start Bradford (BioRad, EUA, 1976), tal como recomendado em suas instruções. A absorbância da mistura foi determinada a 595 nm e utilizando BSA (albumina de soro bovino) como padrão (Bradford, 1976).

4.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras (aproximadamente 25 µg) para análise em gel de poliacrilamida foram concentrados por precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v), conforme procedimento descrito em (Osiro et al. 2017). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As amostras foram ressuspendidas com 16 µL de água ultrapura Milli Q e 4 µL de tampão de amostra 5X; 125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2,0% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (m/v), glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v) e fervidas por 5 minutos. A corrida foi realizada em corrente elétrica fixa de 25 mA. Os marcadores moleculares utilizados foram: Thermo Unstained Protein MW Marker (14,4-116 kDa)

(Thermo Scientific) e ACTGene™ Prestained Protein Marker (11-180 kDa) (ACTGene-Life Science Product Manufacturer).

Após a corrida, o gel de SDS-PAGE foi deixado durante 1 hora, sob agitação, na solução corante preparada com *Coomassie brilliant blue* (PhastGel Blue R-250- GE Healthcare) (Coomassie brilliant blue G-250 0,25% (p/v), metanol 30% (v/v), ácido acético glacial 7% (v/v), seguida pela descoloração com a solução descorante; (metanol 40% (v/v) e ácido acético glacial 12% (v/v)). A coloração com prata foi feita conforme descrito em Blum (1987).

4.12.1. Zimograma

Para análise da atividade de celulase e xilanase em gel foi feito um gel de SDS-PAGE 12% contendo 0,1% de substrato específico para cada atividade; CMC para celulase e xilana *oalt spelts* para xilanase (Sun, 2008). Logo após a corrida o gel foi lavado duas vezes com Triton 2,5% (v/v), 20 min cada lavagem. Em seguida, foi incubado tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 para detecção da atividade a celulase e tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 para xilanase também durante 20 minutos, e foi incubado em uma estufa a 60° por 2 horas. O gel foi corado com Congo *Red* 0,1% (p/v) durante 15 minutos e descorado 1 M NaCl, até que as bandas ficassem aparentes.

Para iniciar a montagem dos complexos enzimáticos, foi utilizado apenas a endo-xilanase Xyn10D*, portanto os materiais e métodos descritos a seguir se referem apenas ao apenas o clone Xyn10D-3*.

4.13. Purificação da endo-xilanase Xyn10D*

Todos as cromatografias foram feitas utilizando o sistema de purificação, purificação Äkta *purifier* (GE, Uppsala, Sweden). O sobrenadante da cultura do clone

Xyn10D*-3 obtido conforme descrito no item 4.11, foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,0 em uma membrana (Dialysis sacks -Sigma-Aldrich) com *cut off* de 12 kDa, a 4°C durante 18 horas. Em seguida, a amostra dialisada foi aplicada em uma coluna Hi-trap QFF anion exchange de 5 mL (GE Healthcare), equilibrada com tampão; fosfato de sódio 20 mM pH 6,0. A corrida foi realizada em um fluxo de 5 ml/min. As proteínas ligantes foram eluídas com um gradiente de NaCl (0-0,5M). As frações contendo atividade de xilanase foram reunidas e submetidas a cromatografia de exclusão molecular usando a coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 PG (GE Healthcare), calibrada com a utilização da Tiroglobulina (669 kDa), Apoferritina (443 kDa), Beta amilase (200 kDa), Álcool desidrogenase (150 kDa), Albumina (66 kDa) e Anidrase Carbônica (29 kDa), o volume vazio foi calculado com a utilização de Blue Dextran (2 MDa). A eluição das proteínas foi realizada utilizando-se fluxo de 1 mL/min, tendo como fase móvel tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,0 contendo 150 mM de NaCl. As frações contendo atividade foram reunidas e caracterizadas quanto ao efeito do pH, temperatura, efeitos de íons e compostos fenólicos.

4.13.1. Efeito do pH e da temperatura

O efeito do pH na atividade endo-xilanase Xyn10D* foi avaliado conforme descrito no item 4.11, nos pHs 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 em dois tipos diferentes de tampão: McIlvaine (para os valores de pH 3, 4, 5,6,7 e 8) e Tris-HCl (para os valores de pH 7, 8 e 9) a 100 mM. O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da endo-xilanase foi avaliado utilizando os ensaios enzimáticos descritos no item 4.8., em temperaturas variando de 40°C a 80°C. A estabilidade térmica foi avaliada pela pré-incubação da amostra a 50°C e 60°C, com retiradas a cada 5 dias até o máximo de 20 dias, e a 70°C. Foram retiradas alíquotas a cada 24 horas até o máximo de 5 dias (120 horas). Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito no item 4.11. A atividade foi expressa em atividade relativa, considerando 100% a maior atividade detectada.

4.13.2. Efeito de compostos fenólicos

O efeito de compostos fenólicos na atividade da endo-xilanase Xyn10D* foi analisado na presença de vanilina, ácido tânico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido p-cumárico e ácido ácido-4-hidroxi-benzóico (sendo os dois primeiros diluídos em água e os demais em etanol) em uma concentração final de 1 mg/mL (Ximenes, 2010). As amostras foram pré-incubadas a temperatura ambiente tanto na presença quanto na ausência (controle) de cada composto fenólico durante 30 minutos, seguido do ensaio enzimático descrito no item 4.11. Dependendo da diluição de cada composto, ao controle foi adicionado água ou etanol. A atividade enzimática foi expressa em atividade relativa considerando 100% a atividade do controle de cada amostra.

4.13.3. Sacarificação de biomassa lignocelulósica

A sacarificação de bagaço de cana utilizando a endo-xilanase Xyn10D* foi executada a 50°C e a produção de açúcares redutores foi monitorada durante 72 horas. O substrato pré-tratado foi fornecido pelo laboratório do professor Edivaldo Ximenes. O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (fornecido pela usina Jalles Machado-município de Goianésia- GO) foi misturado com água destilada a uma concentração de 1 % (m/m) em cilindros de aço inoxidável vedáveis de volume interno de 260 mL (Swagelok, Ohio, EUA) e incubados em banho de areia fluidizada Tecam SBL-2 (Cole Parmer; Vernon Hills, IL, EUA) pré-aquecido a 170 °C por 30 minutos. Após a incubação da biomassa, os cilindros foram resfriados em água gelada. A biomassa pré-tratada foi separada do hidrolisado (licor) por filtração à vácuo utilizando funil de Büchner e papel de filtro. Os sólidos foram submetidos a uma etapa de lavagem com água destilada na concentração de 5 % (m/v), filtrado novamente e seco a 65°C. A composição da biomassa antes e depois do pré-tratamento é mostrada na tabela 2.

O experimento de sacarificação foi realizado em agitação constante a 900 rpm, cada ensaio continha 2 µg de proteína (endo-xilanase Xyn10D* obtida conforme descrito no item 4.15) para cada miligrama de substrato (0,5% wt/vol) equilibrada em

tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 com 5 mM de CaCl₂. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas, volume máximo total da coleta de apenas 10% do volume final, e estas utilizadas para determinação da concentração (mg/ml) de açúcar redutor liberado, utilizando o reagente DNS (Miller, 1959). O experimento foi realizado em triplicata e as alíquotas conservadas a -20°C.

Tabela 2, Composição da biomassa antes e depois do pré-tratamento hidrotérmico. Os valores são apresentados em porcentagem.

	Glucana	Xilana	Arabimana	Porcentagens (%)		Lignina ácido insolúvel	Lignina ácido solúvel	Lignina total
				Galactosana				
Bagaço de cana-de-açúcar in natura	43,46	22,43	2,55	0,68		18,79	5,62	24,41
Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado	51,41	17,55	0,87	0,22		18,09	4,02	22,11

4.13.4. Análises estatísticas

Diferenças estatísticas foram avaliadas por meio do teste t de Student com o objetivo de analisar as diferenças entre as atividades das amostras dos sobrenadantes dos clones pPIC9-CelJ/A /pPIC9-Xyn10D* e o clone controle pPIC9. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

4.14. Obtenção e purificação da mini-CipA

As células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o vetor pET-ΔCipA, conforme descrito no item 4.7. Da placa resultante da transformação, foi selecionado um clone denominado pET-CipA-4. Este clone foi crescido em meio sólido com antibiótico (canamicina 50 mg/mL) para a preparação de um pré-inoculo de 10 mL

de meio LB líquido suplementado com canamicina (50 mg/mL) o qual foi incubado a 37°C e 200 rpm durante 16 horas. Essa cultura inicial foi usada no preparo de um inóculo de 1L de meio LB, contendo 50 mg/L de canamicina, que foi incubado a 37 ° C sob agitação de 200 rpm, até que a cultura atingisse uma OD₆₀₀ de 0.4 a 0.8. Em seguida, adicionou-se 0,1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e as células foram incubadas durante 5h a 37° C. As células foram coletadas por centrifugação de 8000 x g durante 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4 contendo 500 mM de NaCl e 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich). As células foram lisadas por sonicação utilizado o ultrasonicador (Ultrasonic Processors VCX750-Sonics). Este tratamento foi realizado de acordo com os seguintes parâmetros: 30% de amperagem durante 2 minutos com pulsos de 15 em 15 segundos. Logo em seguida, a amostra foi centrifugada 16 000 x g durante 30 min a 4 ° C. O sobrenadante resultante (extrato livre de células) foi recolhido e armazenado a 4 ° C até a utilização posterior.

➤ **Purificação da mini-CipA**

Todos as cromatografias foram feitas utilizando o sistema de purificação, purificação Äkta *purifier* (GE, Uppsala, Sweden). Como a proteína de interesse possui calda de histidina, o extrato sem células foi inicialmente aplicado numa coluna FF His-Trap de 1mL (GE Healthcare) equilibrada com o Tampão fosfato de sódio (20 mM pH 7,4, contendo 500 mM de NaCl). As proteínas não ligadas foram eluídas com este mesmo tampão (com o fluxo de 1 mL/min) e as proteínas ligadas foram eluídas com o tampão Fosfato de sódio (20 mM pH 7,4, contendo 500 mM de NaCl e 300 mM de imidazol). As frações foram recolhidas e analisadas em SDS-PAGE. As frações cromatográficas que apresentaram um perfil correspondente a massa molecular esperada (32,7 kDa) foram reunidas e dessalinizadas usando a coluna Hi-trap Desalting de 5 mL (GE Healthcare) a um fluxo de 5 mL/min, equilibrada com o tampão (Tris-HCl 20 mM pH 7,6). A amostra desalinizada foi então submetida a um novo passo de purificação por cromatografia de troca iônica numa coluna Hi-trap Q FF anion exchange de 5 mL (GE Healthcare), equilibrada com tampão; (Tris-HCl 20 mM pH 7,6) a um fluxo de 5

mL/min, seguindo-se a um gradiente de NaCl (0-1M) sob o mesmo fluxo. A fração purificada foi avaliada por SDS-PAGE e Western blot.

4.14.1. Western blot

Cerca de 20 µg de proteína da amostra obtida conforme descrito no item anterior foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (12%), conforme descrito no item 4.12. Após a corrida, o gel foi removido e transferido para uma membrana de nitrocelulose sob corrente elétrica de 80V por 1 hora. Em seguida, gel foi corado com prata, de acordo com o item 4.12, e a membrana foi incubada em uma solução de bloqueio (PBS 1X (10 mM de Na₂HPO₄, 150 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 2 mM de K₂PO₄ pH 7,2; 2% leite em pó desnatado; 0,1% Tween® 20), por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Nessa mesma solução foi feita uma diluição 1:3000 do anticorpo primário anti-His (Anti-His Antibody- GE Healthcare) e a membrana foi incubada na solução com o anticorpo a 4°C *overnight*. Após esse período, a membrana foi lavada com a solução de bloqueio por três vezes, 10 minutos cada. A membrana foi então incubada na solução de bloqueio com o segundo anticorpo (anti-mouse IgG-Invitrogen) conjugado com fosfatase alcalina, com uma diluição 1:10.000 e incubado por 1 hora, sob agitação constante a temperatura ambiente. Posteriormente, foram feitas três lavagens, 15 minutos cada, em solução de bloqueio. Para revelação, a membrana foi incubada em uma solução reveladora (10 mL de tampão alcalino, 66 µL de nitroblue tetrazólio (NBT) (Thermo Fisher) e 33 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato BCIP (Thermo Fisher) sob agitação durante 20-30 minutos ao abrigo da luz. Logo após o aparecimento das bandas, a membrana foi lavada com água destilada para remoção da solução reveladora.

4.15. Montagem dos mini-Celulossomas

Para a montagem dos mini-celulossomas foi utilizado a endo-xilanase Xyn10D* e proteína estrutural mini-CipA (Δ CipA), obtidas conforme descrito nos passos 4.13 e 4.14, respectivamente. A proteína mini-CipA (Δ CipA) (utilizada a uma concentração fixa de $0,1\mu\text{M}$) foi misturada com proporções diferentes da endo-xilanase Xyn10D*, onde “ Δ CipA / Xyn10D* “ denota a relação molar da mini-CipA (Δ CipA) contendo dois módulos de coesina para a enzima Xyn10D* contendo um módulo de doquerina. As misturas foram feitas utilizando as proporções molares de “ Δ CipA: Xyn10D* “; 1:1, 1:2 e 1:4 (coesina: doquerina = 1:0,5, 1:1 e 1:2, respectivamente). As misturas foram incubadas a 40°C durante 30 minutos em tampão A (acetato de sódio 50 mM pH 5,5, CaCl_2 2 mM, ditiotretol 2 mM e BSA a 0,01%). A interação entre coesina-doquerina foi analisada em SDS-PAGE não desnaturante, conforme descrito em (Hirano et al. 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de restrição das construções pPIC9-CelJ/A e pPIC9-Xyn10D*

A digestão das construções pPIC9-CelJ/A e pPIC9-Xyn10D* com as enzimas de restrição BamHI e BglII liberou quatro fragmentos de DNA em ambas construções, um dos quais corresponde ao gene de interesse da *celJ* e da *xyn10D* com aproximadamente 5,0 kb e 1,9 kb, respectivamente, os demais são fragmentos do vetor (Figura 12).

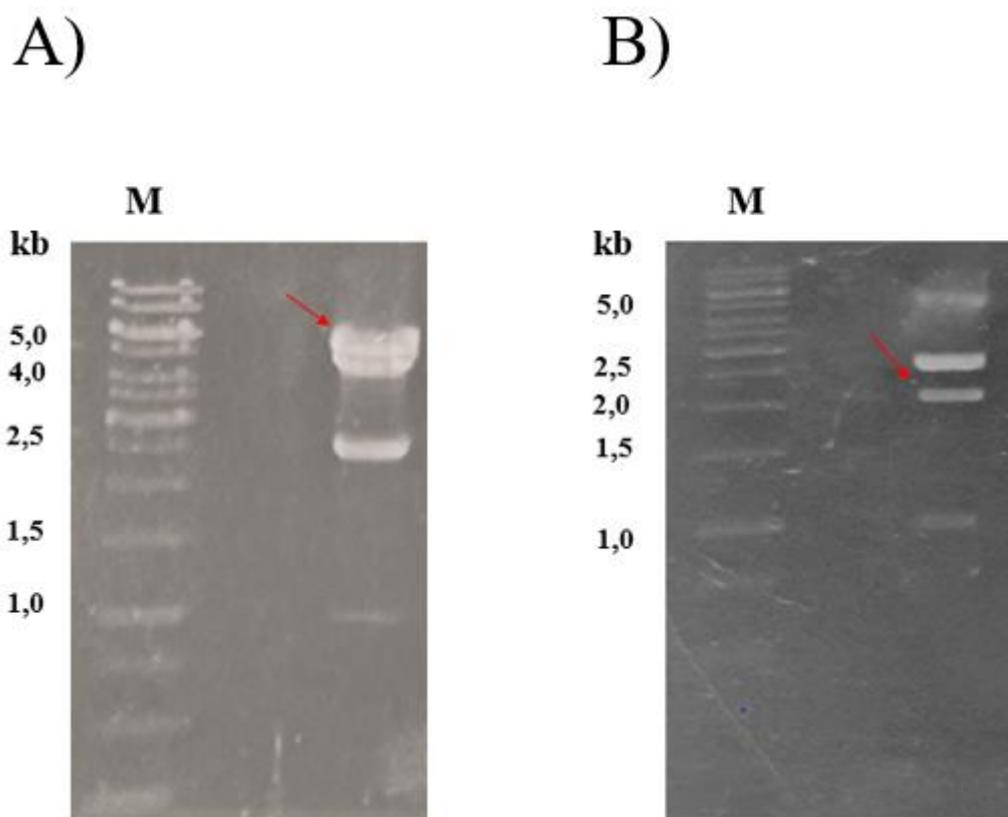


Figura12. Análise do perfil de DNA gerado por digestão com as enzimas BamHI e BglII dos vetores (A) pPIC9-CelJ* e (B) pPIC9-Xyn10D* por eletroforese em gel de agarose 0,8%. M) marcador. As setas em vermelho indicam o inserto correspondente ao gene.

5.2. Transformação de *P.pastoris* e análise da expressão das proteínas heterólogas

Aproximadamente 200 clones transformantes de *P.pastoris* foram obtidos da transformação com o vetor pPIC9-CelJ/A e ~300 clones para a transformação com pPIC9-Xyn10D*. Dos 20 clones selecionados, de cada transformação, para um *screening* inicial da atividade em meio líquido, foram selecionados os três clones com maior atividade (dados não mostrados) para detecção de atividade enzimática em meio sólido (Figuras 13 e 14).

Os três clones transformantes, denominados pPIC9-Xyn10D*-1, pPIC9-Xyn10D*-2 e pPIC9-Xyn10D*-3, com vetor pPIC9-Xyn10D* apresentaram halos de hidrólise. No controle negativo não foi possível observar formação de halo de hidrólise (Figura 13). Já para os clones transformantes com o vetor pPIC9-CelJ/A, denominados pPIC9-CelJ/A-1, pPIC9-CelJ/A-2 e pPIC9-CelJ/A-3 houve a formação de halos tanto nos clones quanto no controle negativo (Figura 14). No entanto, não é possível comparar diferença de tamanho entre os halos, pois os clones cresceram de maneira irregular devido a problemas na manipulação na placa. Apesar disso, não era esperado a formação de halo de hidrólise no controle negativo, uma vez que na notação do genoma desta levedura não há identificação de nenhum gene codificador de celulase. Este mesmo resultado já foi relatado em um estudo realizado por de Amorim Araújo et al. (2015) utilizando a mesma linhagem de levedura para expressão um endoglucanase (Cel5A) e uma celobiohidrolase (Cel6A) de *Trichoderma reesei*. Neste trabalho eles sugerem que esta levedura possui alguma atividade semelhante à celulase, no entanto não caracterizada como celulase. Podendo até mesmo está relacionada a alguma proteína presente na parede celular deste organismo. Isso explicaria a formação do halo de hidrólise presente no controle negativo.

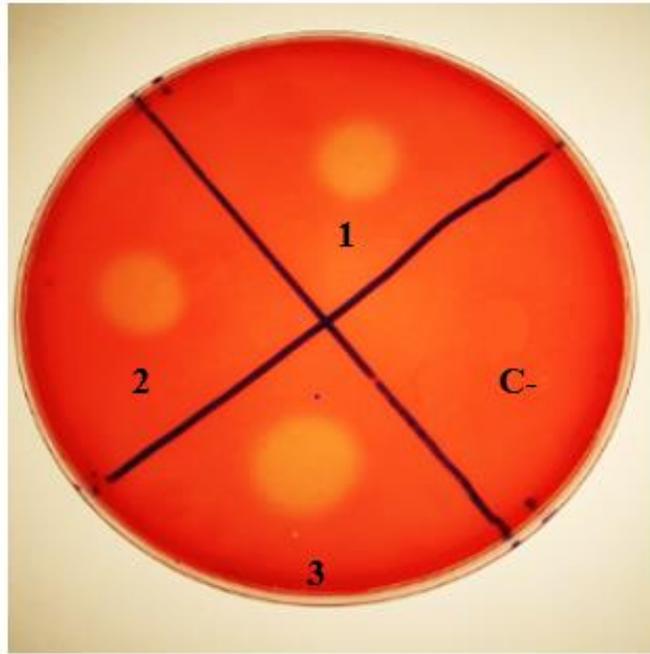


Figura13. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de Petri contendo meio MM-XIL-Ágar Tamponado de transformantes com vetor pPIC9-Xyn10D*. As numerações (1,2,3) representam os clones transformantes selecionados e o controle negativo é representado como (C-).

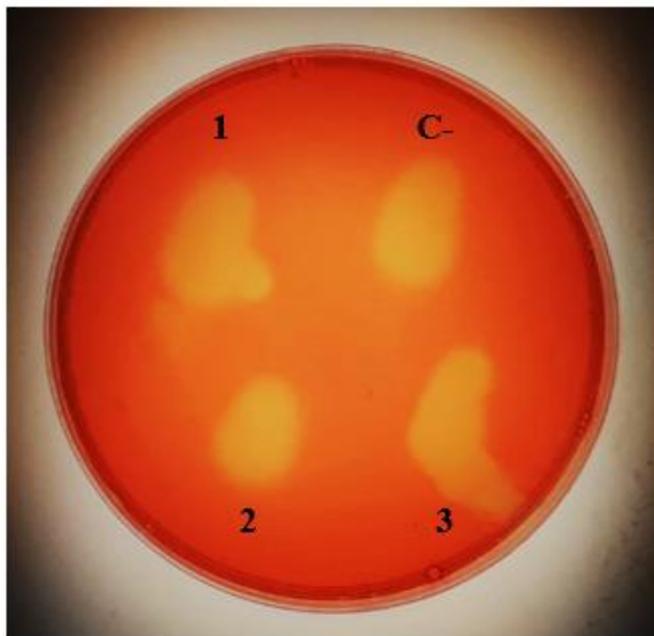


Figura 14. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de Petri contendo meio MM-CMC-Ágar Tamponado de transformantes com vetor pPIC9-CelJ/A. As numerações (1,2,3) representam os clones transformantes selecionados e o controle negativo é representado como (C-)

O clone CelJ/A-1, escolhido para a cinética de produção enzimática, apresentou um perfil de crescimento e densidade celular similares aos do controle negativo (Figura 15A). No tempo 0, como não houve indução, não foi detectado atividade enzimática superior ao controle negativo. Entretanto, com a troca da fonte de carbono, mudança do meio com glicerol para o meio com metanol, o promotor *AOX1* foi induzido e foi possível detectar atividade já nas primeiras 24 horas de crescimento do clone CelJ/A-1 (Figura 15B). Com o progresso da indução, houve um aumento gradual nos níveis de atividade, sendo que o pico máximo de atividade foi atingido em 72 horas, se mantendo estável até 96 horas. Já no controle negativo o pico máximo de atividade foi em 24 horas e se manteve praticamente igual durante toda a indução (Figura 16B). Portanto, é possível inferir que a atividade produzida pelo clone CelJ/A-1 é devida à expressão do gene heterólogo.

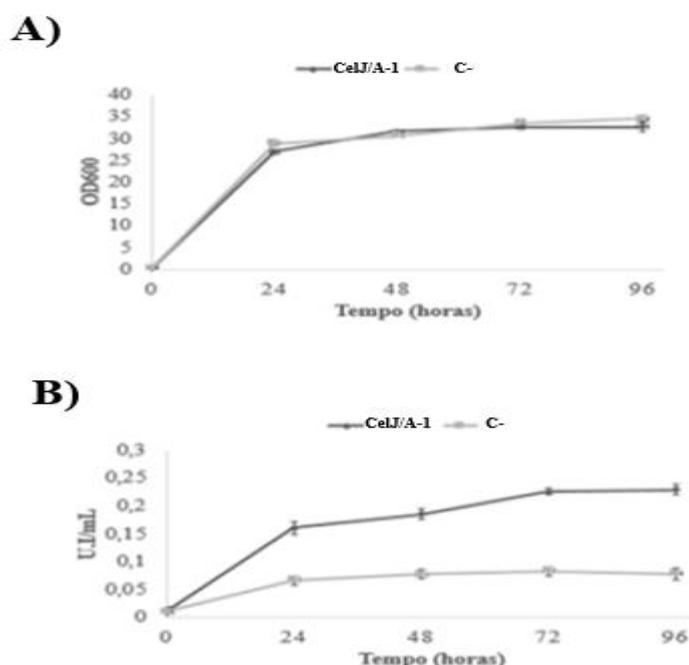


Figura15. Crescimento celular do clone CelJ/A-1, e cinética de produção da celulase heteróloga CelJ/A. A) Curva de crescimento do clone CelJ/A-1. B) Cinética de produção, a atividade enzimática foi expressa em U.I./mL. (C-) representa o controle. $P < 0,05$ para a comparação dos valores de atividade enzimática obtidos para os clones CelJ/A-1 e controle.

O clone pPIC9-Xyn10D*-3 visualmente apresentou o maior halo de hidrólise, e, portanto, foi escolhido para cinética de produção enzimática. O perfil de crescimento do clone Xyn10D*-3 foi semelhante ao observado no controle negativo (Figura 16A). A atividade xilanolítica foi detectada nas primeiras 24 horas de crescimento do clone Xyn10D*-3, e no controle negativo, neste mesmo tempo, a atividade enzimática foi praticamente zero (Figura 16B). Houve um aumento gradual nos valores de atividade xilanolítica ao longo do tempo de cultivo, sendo que o maior valor de atividade foi detectado após 96 horas de cultivo.

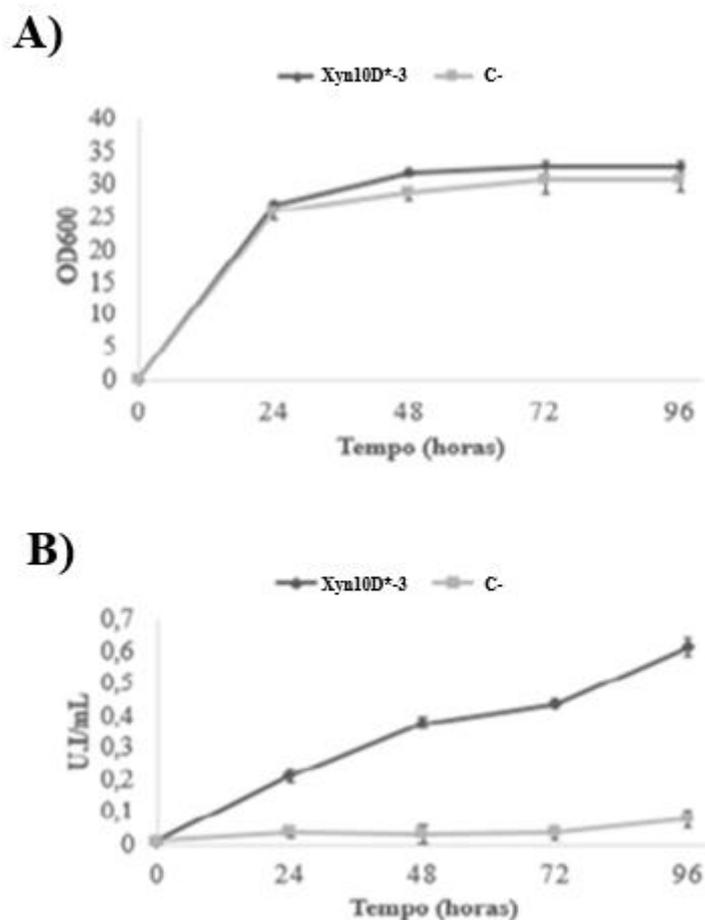


Figura16. Crescimento celular do clone Xyn10D*-3, e cinética de produção da xilanase heteróloga Xyn10D*. A) Curva de crescimento do clone Xyn10D-3*. B) Cinética de produção, a atividade enzimática foi expressa em U.I./mL. (C-) representa o controle, $P < 0,05$ para a comparação dos valores de atividade enzimática obtidos para os clones Xyn10D*-3 e controle.

A xilanase heteróloga, Xyn10D*, foi detectada no sobrenadante da cultura do clone Xyn10D* induzido com metanol nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas e não foi detectada no sobrenadante do clone controle nos mesmos tempos de indução (Figura 17A). Além disso, apresentou atividade e massa molecular correspondente à esperada, 63 KDa, de acordo com a sequência da proteína sintetizada (Figura 17B). No entanto, diferiu da massa predita por Zverlov et al. (2005) (~72 kDa) neste trabalho a endo-xilanase Xyn10D foi expressa em *E.coli*, purificada e caracterizada bioquimicamente.

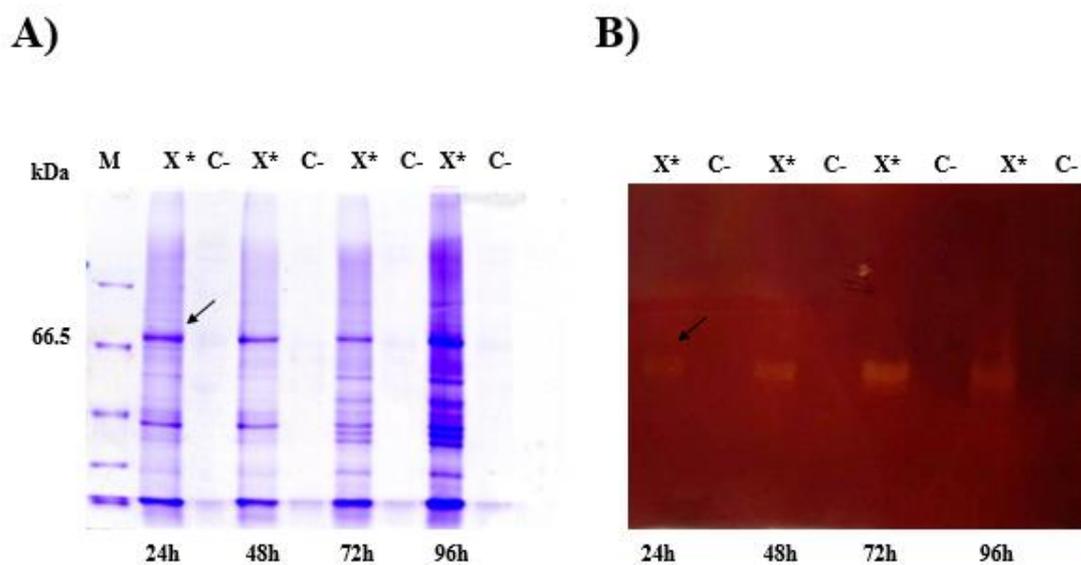


Figura17. Análise dos sobrenadantes das culturas dos clones Xyn10D*-3 e controle por eletrofores em gel SDS-PAGE (12%) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. (A) Gel corado com Coomassie blue para detecção de proteínas; (B) Zimograma. M) marcador molecular. X*) sobrenadante do clone Xyn10D*-3. C-) clone controle. A seta indica em preto indica a banda correspondente à xilanase heteróloga Xyn10D*, com aproximadamente 63 kDa.

5.3. Purificação parcial e caracterização da xilanase Xyn10D

A endo-xilanase Xyn10D* foi parcialmente purificada após dois passos cromatográficos, troca iônica na coluna Hi-trap QFF e exclusão molecular na coluna cromatográfica HiLoad 16/600 Superdex 200. Um único pico de atividade foi detectado nos perfis das duas cromatografias (Figuras 18 e 19).

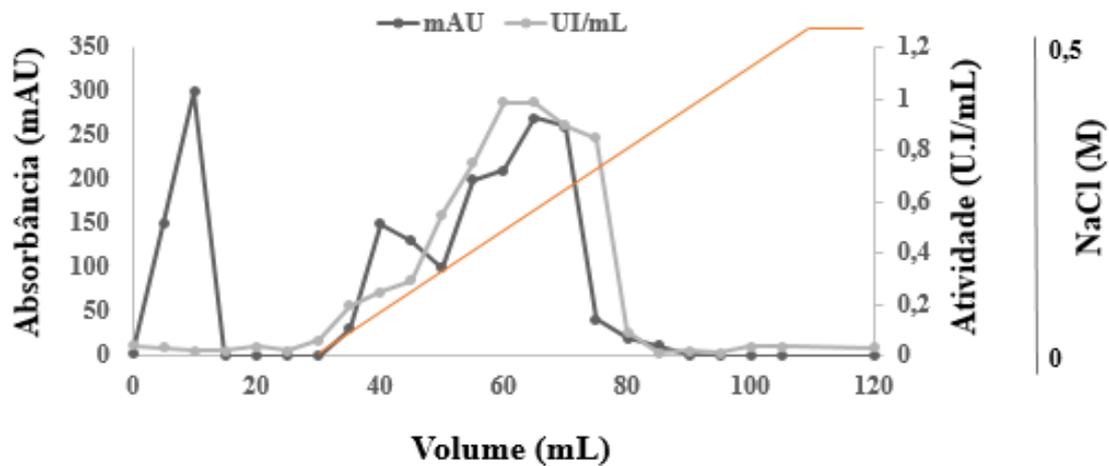


Figura18. Cromatograma do sobrenadante da cultura de *P.pastoris* (clone Xyn10D*-3) aplicado em coluna Hi-trap Q FF. A linha laranja representa o gradiente salino.

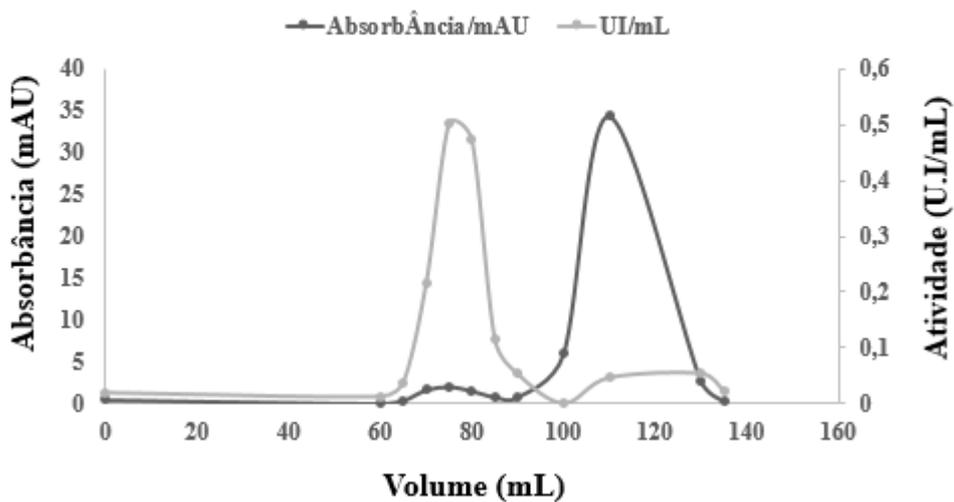


Figura19. Cromatograma das frações com atividade de xilanase obtidas a partir da coluna Hi-trap Q FF aplicadas em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 PG.

A análise das frações cromatográficas do segundo passo de purificação mostra a presença de dois picos de proteínas, sendo o primeiro correspondente a xilanase Xyn10D* (Figura 19). Conforme mostrado na figura 20B, foram detectadas duas bandas de proteínas com massa molecular estimada próximo ao esperado para a Xyn10D*, e uma de 45 kDa. No zimograma, no entanto, foi detectada atividade apenas para a banda de 63 kDa, correspondente à estimada para Xyn10D*. Desta forma, conclui-se que foi obtida a proteína heteróloga contendo todos os domínios estruturais presentes na enzima selvagem.

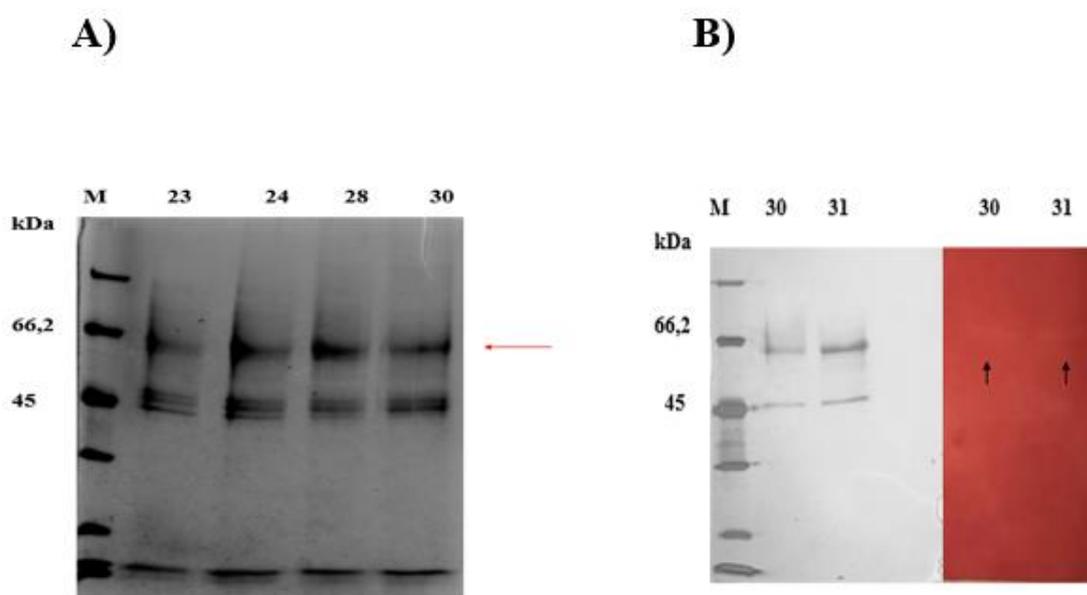


Figura 20. Análise frações com atividade de xilanase eluídas após o gradiente salino pela cromatografia em coluna Hi-trap Q FF por eletrofores em em gel SDS-PAGE (12%). (A). Análise das frações com atividade de xilanase eluídas pela cromatografia em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 PG em SDS-PAGE e zimograma (B). As numerações 23, 24, 28 e 30 em (A) e 30 e 31 em (B) correspondem as numerações dos tubos que coletaram o volume equivalente ao pico de atividade xilanolítica. A seta em vermelho (A) e preto em (B) indicam a banda correspondente à xilanase Xyn10D*. Gel corado com Comassie blue.

5.3.1. Efeito do pH e da Temperatura

Xyn10D* apresentou atividade na faixa de pH 5 a 9, obtendo o máximo de atividade no pH 6,0 e mantendo cerca de 90% da sua atividade em pH 7,0. Nos pHs 3 e 4 foram obtidos os menores valores de atividade, já nos pHs 8 e 9 a atividade ficou em torno de 50% (Figura 21). O pH ótimo da Xyn10* (pH entre 6 e 7) está de acordo com a descrição de Zverlov et al., 2005. As endo-xilanases celulossomais de *C. thermocellum*, geralmente apresentam maior atividade dentro da faixa de pH de 6 a 7,5 e atividades menores em pHs mais ácidos (como pH 3 e 4). Já sendo reportado perda total da atividade em pHs 3 e 4 (Morag *et al.*, 1990; Hayashi et al., 1997 e Heinze *et al.*, 2017).

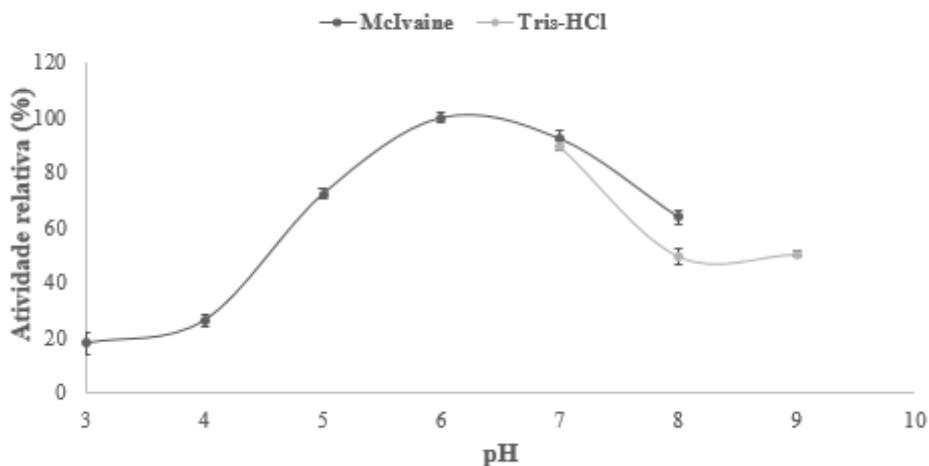


Figura 21. Efeito do pH sobre a atividade de xilanase Xyn10D* parcialmente purificada. As barras representam os desvios-padrão.

A endo-xilanase Xyn10D* apresentou atividade nas temperaturas entre 30°C e 80°C, com maiores valores nas temperaturas 60°C, 65°C e 70°C, atingindo valor máximo a 65°C e 10% de atividade a 80°C (figura 22). Esse resultado difere do encontrado por Zverlov et al., 2005 para esta mesma enzima, no qual é relatado que a maior atividade foi obtida a 80° C, e manteve sua atividade em 15% após 30 minutos de incubação a 90°C. A diferença na temperatura ótima de atuação pode estar relacionada com a diferença da massa molecular entre as duas enzimas, e também como sequência da Xyn10D* foi otimizada, pode ter ocorrido alguma alteração na sequência em função do códon *usage*. E como acredita-se que a composição dos aminoácidos possui um papel fundamental na manutenção da estabilidade das proteínas, modificações na estrutura primária podem alterar a sua termoestabilidade (Zhou *et al.*, 2008). As enzimas heterólogas podem apresentar características diferentes das nativas, em estudos com xilanases heterólogas de outros outros organismos, como *Sterptomyces sp.* SWU10 e *Aspergillus ficuum* expressas em *P. pastoris*, foi demonstrado que houve diferenças nos valores de pH temperatura ótima com relação às enzimas selvagens (Chung *et al.*, 2002, Deesukon *et al.*,2013 Bhalla *et al.*, 2013)

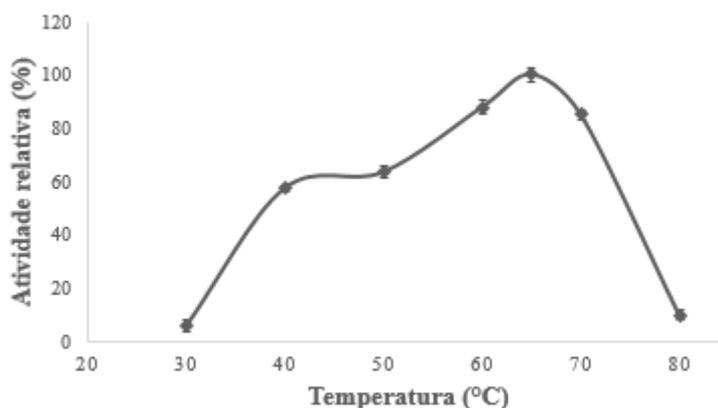


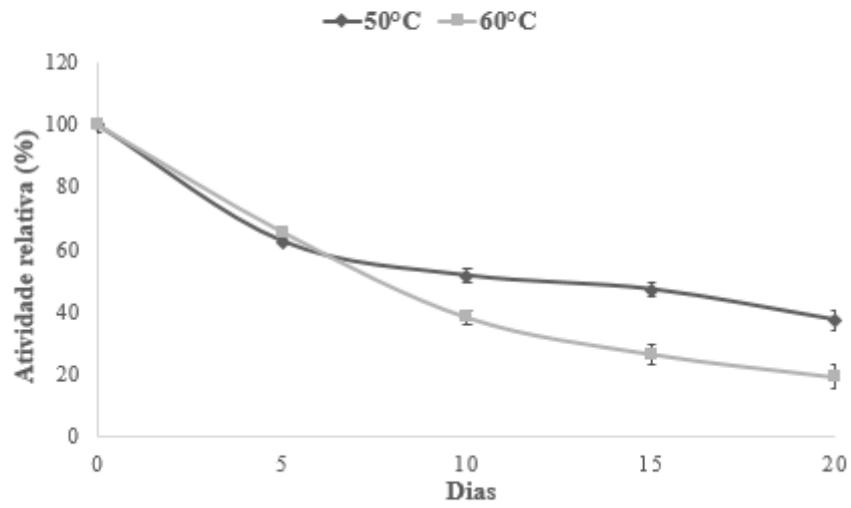
Figura 22. Efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase Xyn10D* parcialmente purificada. As barras representam os desvios-padrão.

A enzima Xyn10D* manteve cerca de 64% de sua atividade após 5 dias de incubação a 50°C e 60°C e 50% de atividade após 10 dias a 50°C, no entanto neste mesmo período a 60°C manteve apenas 38% da sua atividade. A 70°C, a meia vida foi de 48 horas (2 dias) de incubação (Figura 23). Outras xilanases de *C. thermocellum* apresentaram um perfil semelhante, (Grépinet *et al.*, 1988; MacKenzie *et al.*, 1989; Blum *et al.*, 2000).

A estabilidade térmica da enzima Xyn10D* foi maior a 50°C do que a 60°C, diferindo da temperatura que apresentou maior atividade. Este tipo de resultado já foi descrito para outras xilanases de *Humicola insolens* Y1, no qual foi demonstrado que a presença do substrato que atua como estabilizador da conformação da proteína nessas condições, influencia a atividade enzimática, e uma vez que este não se estava presente durante o experimento de termestabilidade, a atividade sofreu um decréscimo em sua temperatura de atividade máxima (Du *et al.*, 2013).

A estabilidade significativa da xilanase Xyn10D* em temperaturas de 50°C e 60°C juntamente com a capacidade de atuar em uma ampla faixa de pHs a tornam uma candidata potencial para aplicações em processos industriais. E por serem termoestáveis, possibilitam o armazenamento prolongado (à temperatura ambiente) e menor perda de atividade durante o processamento.

A)



B)

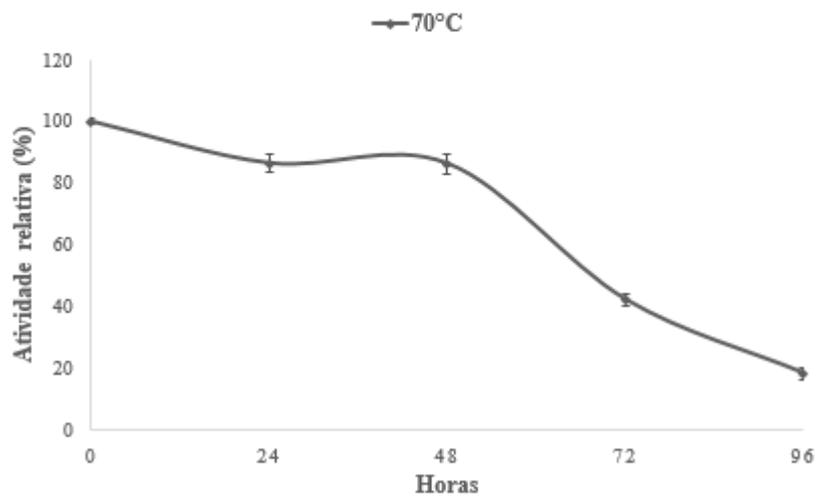


Figura 23. Estabilidade térmica da Termoestabilidade da atividade da xilanase Xyn10D* a 50°C e 60°C (A), e a 70°C (B).

5.3.2. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de xilanase

Dos compostos fenólicos avaliados, apenas o ácido tânico inibiu a atividade da Xyn10D* com redução de cerca de 40%. Foi detectado um aumento de em torno de 35% na presença da vanilina e 20% na presença do ácido ferúlico.

O efeito ativador da vanilina e do ácido ferúlico sobre a atividade de xilanase também já foi relatado em outros estudos (Moreira *et al.*, 2013; Monteclaro *et al.*, 2016; Osiro *et al.*, 2017). Como os efeitos inibitórios causados por alguns compostos fenólicos estão associados a alterações conformacionais de proteínas, o efeito de ativação encontrado, pode estar relacionado às mudanças conformacionais associadas aos resíduos de aminoácidos envolvidos na manutenção da integridade do sítio ativo ou na ligação e / ou hidrólise do substrato nas proximidades do sítio ativo (Boukari *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2015).

O efeito inibitório do ácido tânico observado sobre a atividade de xilanase já foi descrito na literatura (Moreira *et al.*, 2013; Bautista *et al.*, 2017). Em um estudo analisando o efeito dos compostos fenólicos com relação ao tempo na atividade de uma xilanase (X₂₂) de *Emericella nidulans*, foi demonstrado inibição de em torno de 56% no tempo zero de incubação, na presença desse ácido (Silva *et al.*, 2015). No entanto, o valor de inibição do ácido tânico sobre a atividade da endo-xilanase Xyn10D* foi menor, cerca de 40 % para o ácido tânico.

A xilanase Xyn10D pode ser uma candidata promissora para a aplicação em processos industriais que envolvam a degradação de biomassa de lignocelulose pré-tratada, uma vez que essa se mostrou resistente a compostos fenólicos importantes, como o ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e ácido p-cumérico, já identificados em suspensões de lignocelulose pré-tratada (Van der Pol *et al.* 2014).

Tabela 3. Efeito de compostos fenólicos na atividade da Xyn10D* parcialmente purificada.

Inibidor	Atividade (U.I/mL)	Atividade relativa (%)
Controle (água)	0,63±0,02	100
Controle (etanol 50%)	0,61±0,01	100
Ácido ferúlico	0,73±0,02	120,41
Ácido cinâmico	0,58±0,02	95,13
Ácido p-cumárico	0,63±0,01	104,71
Ácido 4-hidróxi-benzoico	0,64±0,01	105,77
Ácido tânico	0,37±0,02	59,76
Vanilina	0,86±0,03	135,61

5.3.3. Sacarificação de bagaço de cana de açúcar pré-tratado

Xyn10D* parcialmente purificada hidrolisou bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, mostrando um aumento gradual na liberação de açúcar ao longo do tempo no experimento de sacarificação, a maior quantidade de açúcar redutor foi detectada após 72 horas (Figura 24).

O pré-tratamento hidrotérmico é estudado como uma alternativa ao pré-tratamento com químicos, devido à sua alta eficiência e baixo custo, neste tipo de pré-tratamento a água é utilizada como único solvente a altas temperaturas sob condições pressurizadas. Nestas condições, os íons de hidrogênio são gerados *in situ* por ionização da água, levando a liberação de ácido acético a partir da hemicelulose presente na biomassa, que por sua vez auto-catalisa a solubilização da hemicelulose, resultando em maior acessibilidade às microfibras de celulose (Imman *et al.*, 2017). A endo-xilanase Xyn10D* pode ser uma possível candidata a ser utilizada na hidrólise de biomassa de lignocelulose utilizando este tipo de pré-tratamento, visando a produção bioprodutos de interesse industrial.

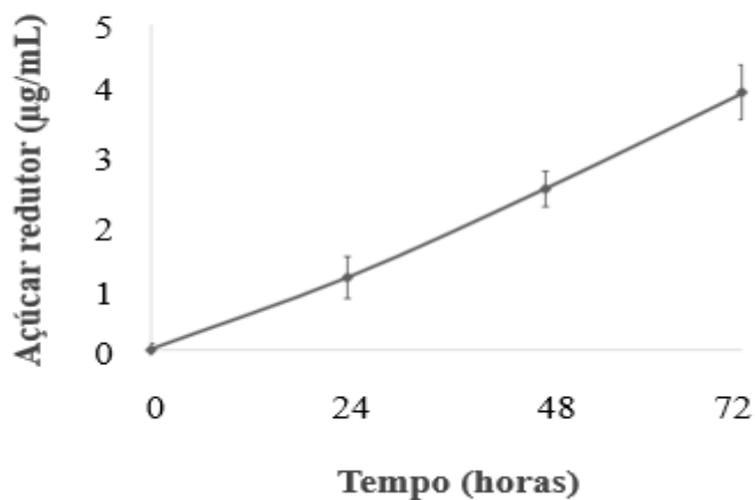


Figura 24. Quantificação de açúcar redutor liberado durante a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pela xilanase Xyn10D* a 50°C, com agitação de 900 rpm durante 72 horas.

5.4. Purificação da proteína estrutural (mini-CipA)

O gene da proteína estrutural (mini-CipA), contendo duas coesinas, foi expresso em *E. coli*, sendo observada uma banda proteica mais volumosa na fração solúvel do lisado do clone pET-CipA-4, após 5 horas de indução (Figura 25). A mini-CipA (~40 kDa) foi purificada após dois passos cromatográficos, cromatografia de afinidade na coluna FF His-Trap e troca iônica na coluna Hi-trap QFF. Um único pico correspondente a proteína de interesse foi detectada nas duas cromatografias (Figura 26).

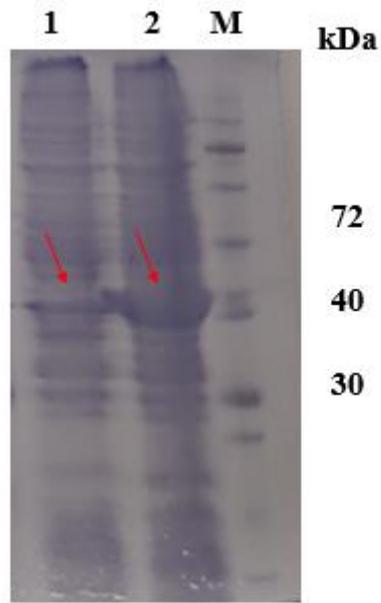


Figura 25. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (12%) das frações insolúvel (1) e solúvel (2) do extrato celular de *E.coli* BL21(2) expressando a mini-CipA. Gel corado com Comassie blue.

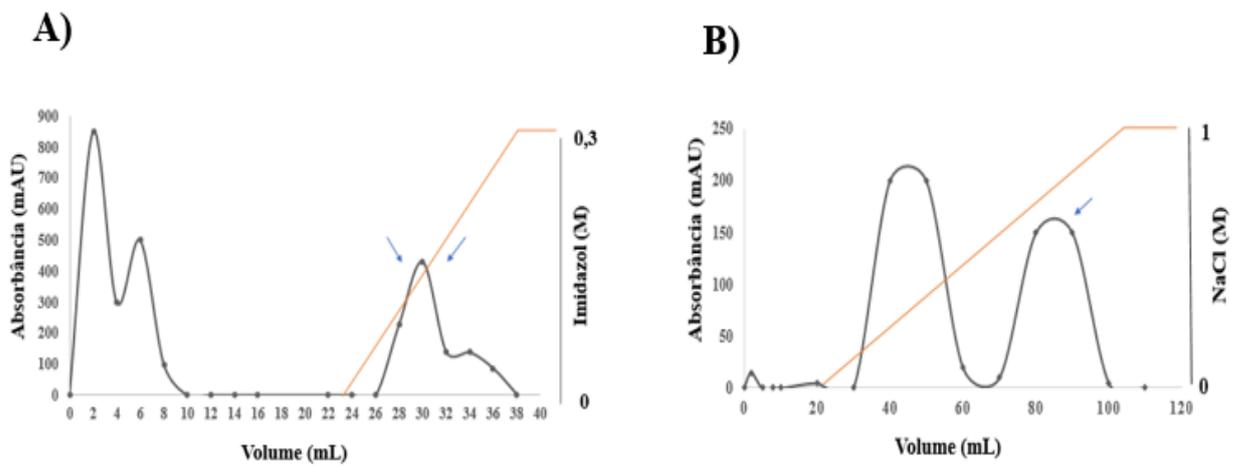


Figura 26. Cromatograma do sobrenadante da fração solúvel do lisado de células de *E.coli* aplicado em coluna FF His-Trap (A) e da fração obtida a partir da coluna de FF His-Trap aplicadas em coluna Hi-trap QFF. (B). A linha laranja representa o gradiente e as setas em azul o pico de proteínas correspondentes a mini-CipA.

A análise em SDS-PAGE do pico de proteínas eluídas após o gradiente com imidazol, obtidos após o primeiro passo cromatográfico é mostrado na figura 27. Após o segundo passo cromatográfico, foram detectados dois picos de proteína. Estes picos foram avaliados por eletroforese em SDS-PAGE (Figura 28A). A banda correspondente a mini-CipA foi detectada somente no segundo pico. Essas frações foram analisadas em SDS-PAGE e Western blot (Figura 28).

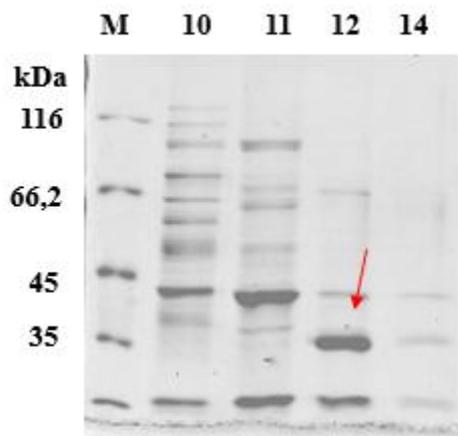


Figura 27. Análise eletroforética por SDS-PAGE (12%) das frações com maior pico de proteínas eluídas após o gradiente de imidazol pela cromatografia em colna FF His-Trap. M) marcador molecular em (kDa). Os números 10,11, 12 e 14 correspondem, aos números dos tubos que coletaram o volume da fração equivalente ao pico da proteína de interesse. A seta em vermelho indica a mini-CipA. Gel corado com Comassie blue.

Com o segundo passo cromatográfico foi possível purificar a mini-CipA, conforme mostrado na figura 28A, é possível observar a presença de uma única banda mais intensa. E com o ensaio de imunodeteccção (western blot) foi possível confirmar que esta proteína corresponde a mini-CipA (~40 kDa) (Figura 28B).

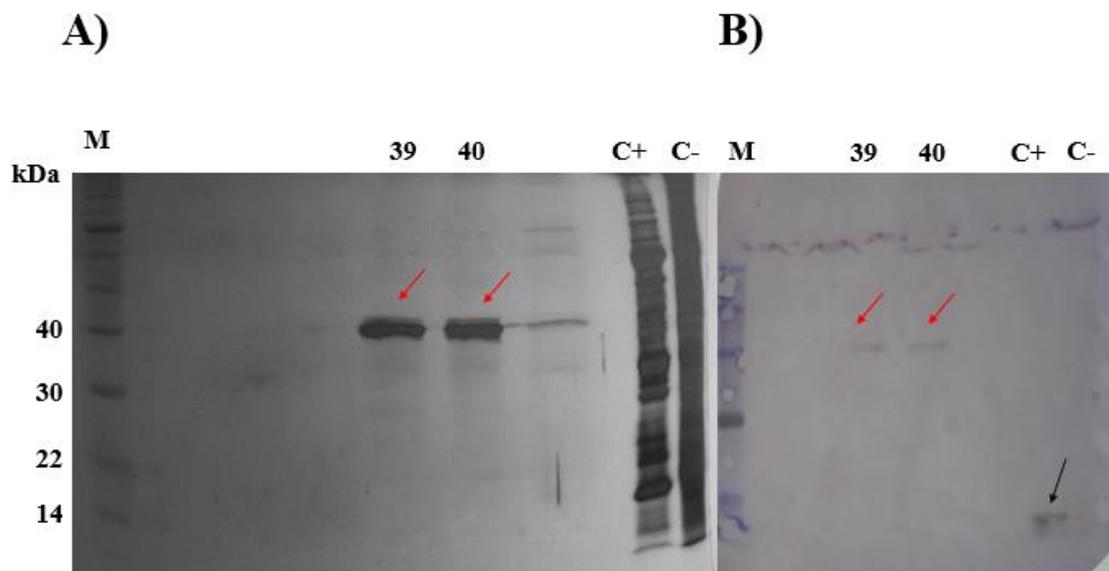


Figura 28. Eletroforese SDS-PAGE (12%) (A) e Western blot (B) das frações correspondentes ao segundo pico de proteínas eluídos pela cromatografia Hi-trap Q FF. M) marcador (em kDa). Os números 39 e 40 correspondem aos dos tubos que coletaram as frações de interesse. C+) controle positivo (antígeno de *Zica vírus* fusionado a cauda de histidina com aproximadamente 19 kDa). C-) controle negativo (sobrenadante com proteínas sem cauda de histidina provenientes da maceração *Nicotiana benthamiana*).

5.5. Montagem dos Mini-celulossomas “in vitro”

Conforme mostrado na figura 29, em todas as proporções testadas de “ Δ CipA/Xyn10D* observa-se duas bandas proteicas com massas moleculares acima de 45 kDa, indicando uma associação entre estas proteínas e possivelmente a formação do complexo mini-CipA-Xyn10D*. A banda de maior intensidade indica que os dois sítios de coesinas presentes na mini-CipA foram ocupados por duas endo-xilanases Xyn10D*, e a de menor massa apenas uma coesina foi ocupada pela enzima. Além disto, observa-se bandas de proteínas com massa molecular correspondente à da Xyn10D* e da mini-cipA livre, mostrando que não houve a associação completa entre as moléculas destas duas proteínas. Como é possível notar, banda da mini-CipA é muito mais intensa do que a banda da Xyn10D*, demonstrando que a quantidade de proteína correspondente Xyn10D* adicionada foi insuficiente. Ainda com relação ao padrão de bandas resultantes dos testes de associação, nota-se a presença de várias bandas ao contrário de uma única grande banda esperada, resultante da associação entre as proteínas.

O experimento de associação entre a mini-cipA e a Xyn10D*, foi apenas um teste inicial para analisar se haveria ligação entre os módulos de coesina e doquerina. Ainda é necessário adequar as quantidades de proteínas utilizadas nos testes, purificar os complexos formados, além de testar a atividade da endo-xilanase Xyn10D* associada ao complexo e comparar com a atividade da proteína livre. Além do mais, a maioria dos estudos de associação dos complexos enzimáticos “*in vitro*” utilizam proteínas puras, e provavelmente a purificação da endo-xilanase Xyn10D* seja necessária para aumentar a eficiência de ligação.

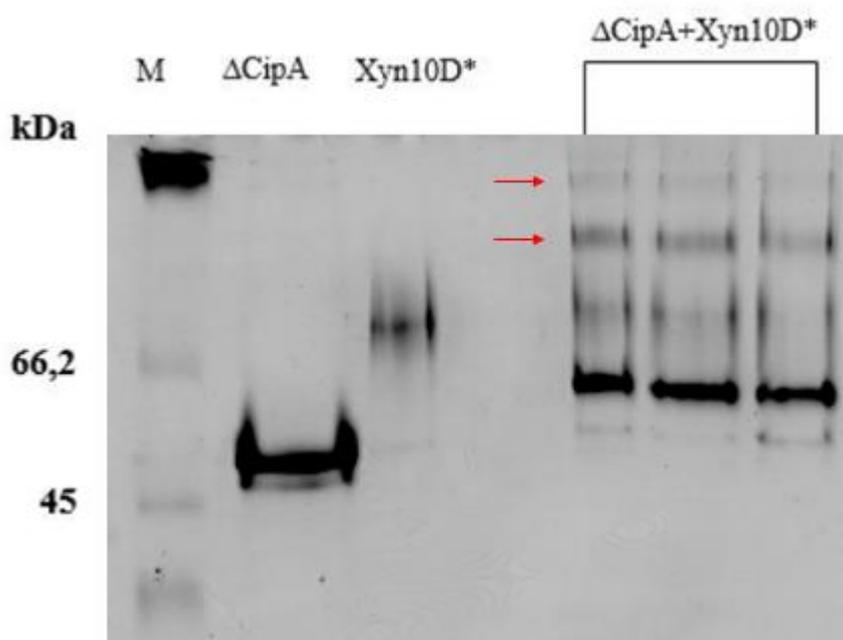


Figura 29. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, em condição não desnaturante da formação da associação entre a Xyn10D* parcialmente purificada e mini-CipA purificada. (M) Marcador molecular, (ΔCip) proteína estrutural mini-CipA (0,1 μM), (Xyn10D*) endo-xilanase Xyn10D* (0,1 μM) e (ΔCip+ Xyn10D*) corresponde ao experimento para associação e montagem dos complexos com as proporções molares de “ΔCip / Xyn10D* “: 1/1, 1/2 e 1/4 (“coesina / doquerina” = 1/0,5, 1/1 e 1/2) respectivamente. As setas em vermelho indicam as associações formadas após a montagem.

6. CONCLUSÕES

- Os genes da endo-glucanase celJ e da endo-xilanase xyn10D de *C. thermocellum* foram expressos com sucesso na levedura *P. pastoris* GS115 gerando enzimas funcionais no sobrenadante da cultura;
- A endo-xilanase Xyn10D* foi parcialmente purificada após dois passos cromatográficos, troca iônica (QFF) e exclusão molecular (S200) e caracterizada;
- A estabilidade significativa da Xyn10D* em temperaturas de 50°C e 60°C juntamente com a capacidade de atuar em uma ampla faixa de pHs a tornam uma candidata potencial para aplicações em processos industriais. E por ser termoestável, possibilita o armazenamento prolongado (à temperatura ambiente) e menor perda de atividade durante o processamento.
- A endo-xilanase Xyn10D* se mostrou resistente a compostos fenólicos importantes, como o ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido ferúlico e ácido p-cumérico, já identificados em suspensões de biomassa de lignocelulose pré-tratada.
- A Xyn10D* parcialmente purificada hidrolisou o bagaço de cana de açúcar pré-tratado, mostrando um aumento gradual na liberação de açúcar ao longo do tempo, e a maior quantidade de açúcar redutor foi detectada após 72 horas;
- O gene da proteína estrutural mini-CipA, foi expresso em *Escherichia coli* BL21(DE3);
- Mini-CipA foi purificada após dois passos cromatográficos; cromatografia de afinidade e troca iônica (QFF);
- De acordo com a análise de montagem dos mini-celussomas foi possível notar que, em todas as proporções molares testadas de “ Δ CipA/Xyn10D*” houve associação entre estas proteínas e possivelmente a formação do complexo mini-CipA-Xyn10D*. No entanto, mais experimentos serão necessários para confirmar estes resultados.

7. PERSPECTIVAS

- Purificar e caracterizar a endoglucanase CelJ/A;
- Purificar a endo-xilanase Xyn10D*;
- Montar complexos enzimáticos “*in vitro*” utilizando as proteínas CelJ/A, Xyn10D* e mini-CipA;
- Purificar os complexos enzimáticos;
- Clonar e purificar outras enzimas celulosomais para a montagem de complexos maiores, visando a sua aplicação biotecnológica.

8. BILIOGRAFIA

- Ahsan, M. M., Kimura, T., Karita, S., Sakka, K., & Ohmiya, K. (1996). Cloning, DNA sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium thermocellum* cellulase celJ, the largest catalytic component of the cellulosome. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5732–5740. <https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5732-5740.1996>.
- Akinosho, H., Yee, K., Close, D., & Ragauskas, A. (2014). The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Frontiers in Chemistry*, 2(August), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00066>.
- Albarelli, J., Santos, D., Cocero, M., & Meireles, M. (2016). Economic Analysis of an Integrated Annatto Seeds-Sugarcane Biorefinery Using Supercritical CO₂ Extraction as a First Step. *Materials*, 9(6), 494. <https://doi.org/10.3390/ma9060494>
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>.
- Arai, T., Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2001). Sequence of celQ and properties of CelQ, a component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5–6), 660–666. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0832-4>.
- Artzi, L., Bayer, E. A., & Morais, S. (2016). Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nature Reviews Microbiology*, 15(2), 83–95. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.164>.
- Aspeborg, H., Coutinho, P. M., Wang, Y., Brumer, H., & Henrissat, B. (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evolutionary Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-186>.
- Battan, B., Sharma, J., Dhiman, S. S., & Kuhad, R. C. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6–7), 733–739. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.006>.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>.
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable

- enzymes. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.145>
- Blum, D. L., Kataeva, I. A., Li, X. L., & Ljungdahl, L. G. (2000). Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. *Journal of Bacteriology*, *182*(5), 1346–1351. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1346-1351.2000>.
- Boukari, I., O'Donohue, M., Rémond, C., & Chabbert, B. (2011). Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *72*(3–4), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.010>.
- Brás, J. L. A., Alves, V. D., Carvalho, A. L., Najmudin, S., Prates, J. A. M., Ferreira, L. M. A., ... Fontes, C. M. G. A. (2012). Novel *Clostridium thermocellum* type I cohesin-dockerin complexes reveal a single binding mode. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(53), 44394–44405. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407700>.
- Bras, J. L. A., Cartmell, A., Carvalho, A. L. M., Verze, G., Bayer, E. A., Vazana, Y., Gilbert, H. J. (2011). Structural insights into a unique cellulase fold and mechanism of cellulose hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(13), 5237–5242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015006108>.
- Brunecky, R., Alahuhta, M., Bomble, Y. J., Xu, Q., Baker, J. O., Ding, S. Y., Lunin, V. V. (2012). Structure and function of the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase A X1-module repeat: Enhancement through stabilization of the CbhA complex. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *68*(3), 292–299. <https://doi.org/10.1107/S0907444912001680>.
- Burlacu, A., Cornea, C. P., & Israel-roming, F. (2016). MICROBIAL XYLANASE : A REVIEW, XX. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.005>.
- Cameron, K., Weinstein, J. Y., Zhivin, O., Bule, P., Fleishman, S. J., Alves, V. D., Najmudin, S. (2015). Combined crystal structure of a type I cohesin: Mutation and affinity binding studies reveal structural determinants of Cohesin-dockerin specificities. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(26), 16215–16225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.653303>.
- Camago, Brenda Rabello de. Genômica funcional de *Clostridium thermocellum* em diferentes condições de cultivo. 2017. 229 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) —Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- Capolupo, L., & Faraco, V. (2016). Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(22), 9451–9467. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7884-y>.
- Castañedo, R.E.Q., & Mallol, J.L.F. (2013). Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. In: Chandel, A.K. and da Silva, S.S., Eds., Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization, InTech, Rijeka, Croatia, 119-155.

<http://dx.doi.org/10.5772/53719>.

- Caspi, J., Barak, Y., Haimovitz, R., Gilary, H., Irwin, D. C., Lamed, R., Bayer, E. A. (2010). *Thermobifida fusca* exoglucanase Cel6B is incompatible with the cellulosomal mode in contrast to endoglucanase Cel6A. *Systems and Synthetic Biology*, 4(3), 193–201. <https://doi.org/10.1007/s11693-010-9056-1>.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66. [https://doi.org/S0168-6445\(99\)00029-7](https://doi.org/S0168-6445(99)00029-7) [pii].
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>.
- Chen, H. (2014). Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice* (pp. 1–511). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>.
- Chen, C. C., Huang, J. W., Zhao, P., Ko, T. P., Huang, C. H., Chan, H. C., ... Guo, R. T. (2015). Structural analyses and yeast production of the β -1,3-1,4-glucanase catalytic module encoded by the licB gene of *Clostridium thermocellum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.01.002>.
- Chung, H. J., Park, S. M., Kim, H. R., Yang, M. S., & Kim, D. H. (2002). Cloning the gene encoding acetyl xylan esterase from *Aspergillus ficuum* and its expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 384–391. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00122-9).
- Currie, D. H., Herring, C. D., Guss, A. M., Olson, D. G., Hogsett, D. A., & Lynd, L. R. (2013). Functional heterologous expression of an engineered full length CipA from *Clostridium thermocellum* in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-32>.
- Davidi, L., Moraïs, S., Artzi, L., Knop, D., Hadar, Y., Arfi, Y., & Bayer, E. A. (2016). Toward combined delignification and saccharification of wheat straw by a laccase-containing designer cellulosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), 10854–10859. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608012113>.
- De Souza Moreira, L. R., De Carvalho Campos, M., De Siqueira, P. H. V. M., Silva, L. P., Ricart, C. A. O., Martins, P. A., ... Filho, E. X. F. (2013). Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.006>.
- De Amorim Araújo, J., Ferreira, T. C., Rubini, M. R., Duran, A. G. G., De Marco, J. L., de Moraes, L. M. P., & Torres, F. A. G. (2015). Coexpression of cellulases in

Pichia pastoris as a self-processing protein fusion. *AMB Express*, 5(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s13568-015-0170-z>

- Deesukon, W., Nishimura, Y., Sakamoto, T., & Sukhumsirichart, W. (2013). Purification, characterization of GH11 Endo- β -1,4-xylanase from thermotolerant *streptomyces* sp. SWU10 and overexpression in *Pichia pastoris* KM71H. *Molecular Biotechnology*, 54(1), 37–46. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9541-8>.
- Du, Y., Shi, P., Huang, H., Zhang, X., Luo, H., Wang, Y., & Yao, B. (2013). Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. *Bioresource Technology*, 130, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.067>.
- Dutta, S. (2015). *Lignin Deconstruction. Sustainable Catalytic Processes*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59567-6.00005-4>.
- Erickson, H. P. (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>.
- Ezeilo, U. R., Zakaria, I. I., Huyop, F., & Abdul, R. (2017). Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass : the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monoxygenases, 2818(December). <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1330124>.
- Fabre, E., Nicaud, J. M., Lopez, M. C., & Gaillardin, C. (1991). Role of the proregion in the production and secretion of the *Yarrowia lipolytica* alkaline extracellular protease. *Journal of Biological Chemistry*, 266(6), 3782–3790.
- Fierobe, H. P., Mingardon, F., Mechaly, A., Bélaïch, A., Rincon, M. T., Pagès, S., ... Bayer, E. A. (2005). Action of designer cellulosomes on homogeneous Versus complex substrates: Controlled incorporation of three distinct enzymes into a defined trifunctional scaffoldin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16325–16334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414449200>.
- Fontes, C. M., Hazlewood, G. P., Morag, E., Hall, J., Hirst, B. H., & Gilbert, H. J. (1995). Evidence for a general role for non-catalytic thermostabilizing domains in xylanases from thermophilic bacteria. *The Biochemical Journal*, 307 (Pt 1), 151–158. <https://doi.org/10.1042/bj3070151>.
- Gonçalves, F. de S., & Filho, E. X. F. (2010). Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 7(June 2017), 54–60.
- González-Bautista, E., Santana-Morales, J. C., Ríos-Fránquez, F. J., Poggi-Varaldo, H. M., Ramos-Valdivia, A. C., Cristiani-Urbina, E., & Ponce-Noyola, T. (2017).

Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. *Fuel*, 196, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.01.080>.

Goyal, G., Tsai, S. L., Madan, B., DaSilva, N. A., & Chen, W. (2011). Simultaneous cell growth and ethanol production from cellulose by an engineered yeast consortium displaying a functional mini-cellulosome. *Microbial Cell Factories*, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-89>.

Grépinet, O., Chebrou, M. C., & Béguin, P. (1988). Purification of *Clostridium thermocellum* xylanase Z expressed in *Escherichia coli* and identification of the corresponding product in the culture medium of *C. thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, 170(10), 4576–4581. <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4576-4581.1988>.

Grépinet, O., Chebrou, M. C., & Béguin, P. (1988). Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (*xynZ*) of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, 170(10), 4582–4588. <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4582-4588.1988>.

Hall, J., Hazlewood, G. P., Barker, P. J., & Gilbert, H. J. (1988). Conserved reiterated domains in *Clostridium thermocellum* endoglucanases are not essential for catalytic activity. *Gene*, 69(1), 29–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90375-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90375-7).

Harris, A. D., & Ramalingam, C. (2010). Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. *Journal of Experimental Sciences*, 1(7), 1–11. Retrieved from www.jexpscience.com.

Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., & Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*, 135, 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.047>.

Hayashi, H., Takagi, K. I., Fukumura, M., Kimura, T., Karita, S., Sakka, K., & Ohmiya, K. (1997). Sequence of *xynC* and properties of XynC, a major component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4246–4253. <https://doi.org/10.1128/jb.179.13.4246-4253.1997>.

Hirano, K., Nihei, S., Hasegawa, H., Haruki, M., & Hirano, N. (2015). Stoichiometric assembly of the cellulosome generates maximum synergy for the degradation of crystalline cellulose, as revealed by in vitro reconstitution of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4756–4766. <https://doi.org/10.1128/AEM.00772-15>.

Huang, C. J., Damasceno, L. M., Anderson, K. A., Zhang, S., Old, L. J., & Batt, C. A. (2011). A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3118-5>.

- Hosmer, K., & Mohnen, D. (2009). The structure , function , and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>.
- Heinze, S., Mechelke, M., Kornberger, P., Liebl, W., Schwarz, W. H., & Zverlov, V. V. (2017). Identification of endoxylanase XynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11598-y>.
- Himmel, M. E., Xu, Q., Luo, Y., Ding, S.-Y., Lamed, R., & Bayer, E. A. (2010). Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels*, 1(2), 323–341. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.25>.
- Imman, S., Laosiripojana, N., & Champreda, V. (2017). Effects of Liquid Hot Water Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis and Physicochemical Changes of Corncobs. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2541-1>.
- Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, 6(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>.
- Ishii, T.; SHIMIZU, K. Chemistry of Cell Wall Polysaccharides. In: HON, D. N.-S.; SHIRAISHI, N. (Org.). *Wood and Cellulosic Chemistry*. 2a. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001. p. 175-215.
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>.
- Joliff, G., Béguin, P., & Aubert, J. P. (1986). Nucleotide sequence of the cellulase gene celD encoding endoglucanase D of *Clostridium thermocellum*. *Nucleic Acids Research*, 14(21), 8605–8612. <https://doi.org/10.1093/nar/14.21.8605>.
- Kataeva, I., Li, X. L., Chen, H., Choi, S. K., & Ljungdahl, L. G. (1999). Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination. *Journal of Bacteriology*, 181(17), 5288–95.
- Kim, S., Baek, S. H., Lee, K., & Hahn, J. S. (2013). Cellulosic ethanol production using a yeast consortium displaying a minicellulosome and β -glucosidase. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-14>.
- Krauss, J., Zverlov, V. V., & Schwarz, W. H. (2012). In vitro reconstitution of the complete *Clostridium thermocellum* cellulosome and synergistic activity on crystalline cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4301–4307. <https://doi.org/10.1128/AEM.07959-11>.
- Krainer, F. W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., & Glieder, A. (2012). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered

- methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-22>.
- Kruus, K., Wang, W. K., Ching, J., & Wu, J. H. D. (1995). Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, a major cellulosome component. *Journal of Bacteriology*, 177(6), 1641–1644. <https://doi.org/10.1128/jb.177.6.1641-1644.1995>.
- Kumar, C., Roorkee, T., Delhi, T., Stabilization, B., Leachate, L., Fuel, M., & View, C. (2017). Xylanases and their industrial applications: A review. *Microbial Cell Factories*, 133(1), 6478-17.
- Kurokawa, J., Hemjinda, E., Arai, T., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2002). *Clostridium thermocellum* cellulase CelT, a family 9 endoglucanase without an Ig-like domain or family 3c carbohydrate-binding module. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4–5), 455–461. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1048-y>.
- Ladeira Ázar, R. I. S., Morgan, T., dos Santos, A. C. F., de Aquino Ximenes, E., Ladisch, M. R., & Guimarães, V. M. (2018). Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, 109, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.09.007>.
- Lemaire, M., & Beguin, P. (1993). Nucleotide sequence of the celG gene of *Clostridium thermocellum* and characterization of its product, endoglucanase CelG. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3353–3360. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3353-3360.1993>.
- Lilly, M., Fierobe, H. P., Van Zyl, W. H., & Volschenk, H. (2009). Heterologous expression of a *Clostridium* minicellulosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1236–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00564.x>.
- Lima, M. A., Lavorente, G. B., Da Silva, H. K. P., Bragatto, J., Rezende, C. A., Bernardinelli, O. D., ... Polikarpov, I. (2013). Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: A potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production - Part 1. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-75>.
- Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., ... Lin-Cereghino, J. (2013). The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 519(2), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.062>.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 490–495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- Luo, Z., Gao, Q., Li, X., & Bao, J. (2014). Cloning of LicB from *Clostridium*

- thermocellum* and its efficient secretive expression of thermostable β -1,3-1,4-glucanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(2), 562–570. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0863-9>.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.1208>.
- MacKenzie, C. R., Yang, R. C., Patel, G. B., Bilous, D., & Narang, S. A. (1989). Identification of three distinct *Clostridium thermocellum* xylanase genes by molecular cloning. *Arch. Microbiol.*, 152(4), 377–381.
- Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., & Henrissat, B. (2016). Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: A motivation for detailed enzyme characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1686–1692. <https://doi.org/10.1128/AEM.03453-15>.
- Mohnen, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008. ISSN 1369-5266. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006> >.
- Monclaro, A.V., Aquino, E.N., Faria, R.F., Ricart, C.A.O., Freitas, S.M., Midorikawa, G.E.O., Miller, R.N.G., Michelin, M., Polizeli, M.L.T.M e Filho, E.X.F. (2016). Characterization of multiple xylanase forms from *Aspergillus tamarii* resistant to phenolic compounds. *Mycosphere.*, 122 (4), 311-325.
- Moreira, L. R. S., & Filho, E. X. F. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1423-4>
- Moraís, S., Stern, J., Kahn, A., Galanopoulou, A. P., Yoav, S., Shamshoum, M., Bayer, E. (2016). Enhancement of cellulosome-mediated deconstruction of cellulose by improving enzyme thermostability. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0577-z>.
- Moraís, S., Barak, Y., Caspi, J., Hadar, Y., Lamed, R., Shoham, Y., ... Bayer, E. A. (2010). Contribution of a xylan-binding module to the degradation of a complex cellulosic substrate by designer cellulosomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3787–3796. <https://doi.org/10.1128/AEM.00266-10>.
- Moraís, S., Barak, Y., Hadar, Y., Wilson, D. B., Shoham, Y., Lamed, R., & Bayer, E. A. (2011). Assembly of xylanases into designer cellulosomes promotes efficient hydrolysis of the xylan component of a natural recalcitrant cellulosic substrate. *mBio*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.00233-11>.
- Morag, E., Lapidot, A., Govorko, D., Lamed, R., Wilchek, M., Bayer, E. A., & Shoham, Y. (1995). Expression, purification, and characterization of the cellulose-binding

- domain of the scaffoldin subunit from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1980–1986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01576.x>.
- Murphy, J. D., & McCarthy, K. (2005). Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy*, 82(2), 148–166. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2004.10.004>.
- Naumoff, D. G. (2005). GH97 is a new family of glycoside hydrolases, which is related to the alpha-galactosidase superfamily. *BMC Genomics*, 6, 112. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-112>.
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom3030597>.
- Osiro, K. O., de Camargo, B. R., Satomi, R., Hamann, P. R. V., Silva, J. P., de Sousa, M. V., ... Noronha, E. F. (2017). Characterization of *Clostridium thermocellum* (B8) secretome and purified cellulosomes for lignocellulosic biomass degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.002>.
- Pegler, D. N. (2003). Useful fungi of the world: The Shiitake, Shimeji, Enoki-take, and Nameko mushrooms. *Mycologist*, 17(1), 3–5. <https://doi.org/10.1017/S0269915X03001071>.
- Raman, B., Pan, C., Hurst, G. B., Rodriguez, M., McKeown, C. K., Lankford, P. K., ... Mielenz, J. R. (2009). Impact of Pretreated Switchgrass and Biomass Carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 Cellulosome Composition: A Quantitative Proteomic Analysis. *PLoS ONE*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005271>.
- Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M., & Ranjbar, B. (2006). Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry*, 119(3), 256–270. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.09.018>.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheller, H. V.; Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, n. 1, p. 263-289, 2010. ISSN 1543-5008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315> >.
- Sheng, T., Zhao, L., Gao, L. F., Liu, W. Z., Cui, M. H., Guo, Z. C., ... Wang, A. J. (2016). Lignocellulosic saccharification by a newly isolated bacterium, *Ruminiclostridium thermocellum* M3 and cellular cellulase activities for high ratio of glucose to cellobiose. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0585-z>.

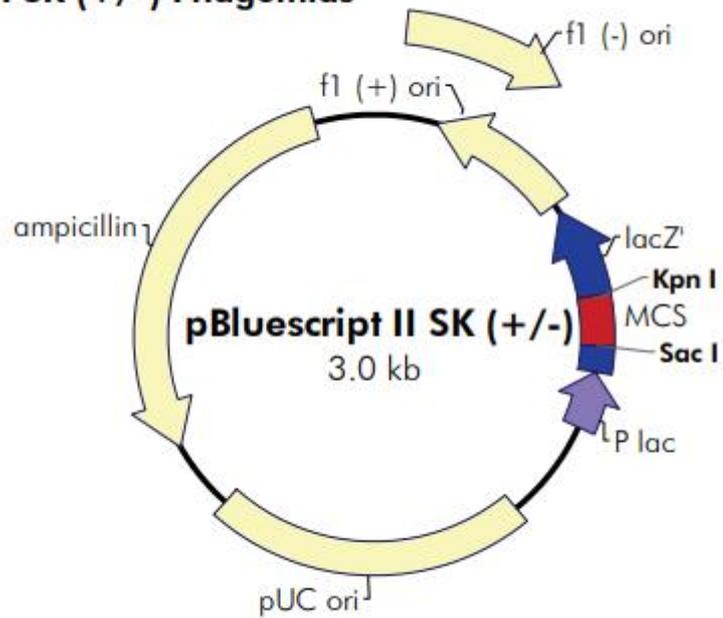
- Schwarz, W. H., Grabnitz, F., & Staudenbauer, W. L. (1986). Properties of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase produced in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Silva, C. de O. G., Aquino, E. N., Ricart, C. A. O., Midorikawa, G. E. O., Miller, R. N. G., & Filho, E. X. F. (2015). GH11 xylanase from *Emericella nidulans* with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. *FEMS Microbiology Letters*, 362(13). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv094>.
- Singh, N. K., Carlson, C., Sani, R. K., & Venkateswaran, K. (2017). Draft Genome Sequences of Thermophiles Isolated from Yates Shaft, a Deep-Subsurface Environment. *Genome Announcements*, 5(22), e00405-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00405-17>.
- Shin, S. K., Hyeon, J. E., Kim, Y. I., Kang, D. H., Kim, S. W., Park, C., & Han, S. O. (2015). Enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass: Bi-functional enzyme complexes expressed in *Pichia pastoris* improve bioethanol production from *Miscanthus sinensis*. *Biotechnology Journal*, 10(12), 1912–1919. <https://doi.org/10.1002/biot.201500081>.
- St John, F. J., Crooks, C., Dietrich, D., & Hurlbert, J. (2016). Xylanase 30 A from *Clostridium thermocellum* functions as a glucuronoxylan xylanohydrolase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.03.008>.
- Speciale, G., Thompson, A. J., Davies, G. J., & Williams, S. J. (2014). Dissecting conformational contributions to glycosidase catalysis and inhibition. *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.06.003>.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- van der Pol, E. C., Bakker, R. R., Baets, P., & Eggink, G. (2014). By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6158-9>.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>.
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., & Chauhan, A. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching : a review. *3 Biotech*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0584-6>.
- Wei, H.; Xu, Q.; TAYLOR II, L.E.; BAKER, J.O.; TUCKER, M.P. & DING, S. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, p. 330-338. 2009.

- Wilson, C. M., Rodriguez, M., Johnson, C. M., Martin, S. L., Chu, T. M., Wolfinger, R. D., Brown, S. D. (2013). Global transcriptome analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated Populus and switchgrass. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-179>.
- Xu, Q., Ding, S. Y., Brunecky, R., Bomble, Y. J., Himmel, M. E., & Baker, J. O. (2013). Improving activity of minicellulosomes by integration of intra- and intermolecular synergies. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-126>.
- Yagüe, E., Béguin, P., & Aubert, J. P. (1990). Nucleotide sequence and deletion analysis of the cellulase-encoding gene celH of *Clostridium thermocellum*. *Gene*, 89(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90206-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90206-7).
- Yamabhai, M., Sak-Ubol, S., Srila, W., & Haltrich, D. (2016). Mannan biotechnology: From biofuels to health. *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923372>.
- Yaron, S., Morag, E., Bayer, E. A., Lamed, R., & Shoham, Y. (1995). Expression, purification and subunit-binding properties of cohesins 2 and 3 of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *FEBS Letters*, 360(2), 121–124. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00074-J](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00074-J).
- Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. A., & Schwarz, W. H. (2003). Two new cellulosome components encoded downstream of cell in the genome of *Clostridium thermocellum*: The non-processive endoglucanase CelN and the possibly structural protein CseP. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25959-0>.
- Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. A., & Schwarz, W. H. (2002). A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*: Investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose. *Microbiology*, 148(1), 247–255. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-247>.
- Zverlov, V. V., Schantz, N., & Schwarz, W. H. (2005). A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo-beta-1,4-glucanase producing cellotetraose. *FEMS Microbiology Letters*, 249(2), 353–8. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.037>.
- Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. V., Schwarz, W. H., Bronnenmeier, K., Kellermann, J., & Staudenbauer, W. L. (1998). Multidomain structure and cellulosomal localization of the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA. *Journal of Bacteriology*, 180(12), 3091–3099.
- Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J., & Li, W. F. (2008). Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0589-x>.

9. ANEXOS

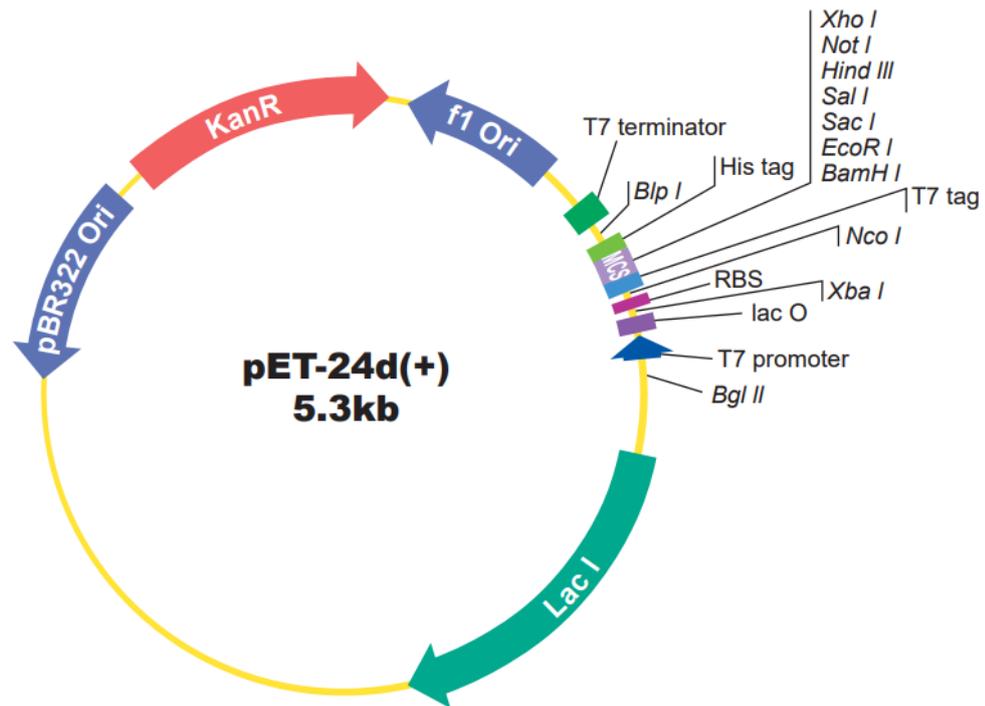
9.1. Representação esquemática do mapa do vetor pBluescript II KS

pBluescript II SK (+/-) Phagemids



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

9.2. Representação esquemática do mapa do vetor pET-24d (+)



9.3. Representação esquemática do vetor pPIC9

