



Laboratório Nacional de Ciência  
e Tecnologia do Bioetanol

## **Projeto de iniciação científica - PIBIC**

### **Diferenças funcionais, estruturais e de aplicação entre $\beta$ -glicosidases psicrofílica, mesofílica e termofílica**

Responsável: Dra. Leticia Maria Zanphorlin

Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE  
Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais - CNPEM

**Campinas**  
**Abril de 2017**

## RESUMO DO PROJETO

A produção de etanol de segunda geração (bioetanol) compreende uma série de etapas para o pré-tratamento da biomassa vegetal e hidrólise enzimática da hemicelulose e da celulose a açúcares fermentescíveis. Nos últimos anos, várias pesquisas estão sendo feitas para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos que realizem a hidrólise completa e eficiente de biomassas vegetais pré-tratadas, gerando com isso, principalmente, glicose e xilose como açúcar final. Estes coquetéis, produzidos a partir da manipulação de fungos, principalmente dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, atuam sobre a biomassa vegetal a cerca de 50 °C em pH 4,8 durante 24-48 horas. Subseqüentemente, o hidrolisado é fermentado a álcool por leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis*. Neste ponto destaca-se um importante gargalo do processo para sacarificação e fermentação simultâneas (SFS), pois durante o cultivo e fermentação alcoólica, o crescimento destas leveduras ocorre em temperaturas mais brandas (em torno de 32 °C), sendo necessário o resfriamento do hidrolisado antes da fermentação.

Dessa forma, a sacarificação e a fermentação são realizadas separadamente e em temperaturas diferentes, o que gera custos às indústrias que poderiam ser reduzidos caso fosse possível reunir essas duas etapas em uma única. Estudos destacam a importância da utilização de coquetéis enzimáticos que atuem em temperaturas mais brandas, possibilitando sua utilização em processos atuais de fermentação alcoólica eficiente com leveduras industriais (ex.: PE-2 e CAT1) ou outros micro-organismos geneticamente modificados para a fermentação alcoólica.

Nesse contexto, o presente projeto pretende investigar as diferenças funcionais, estruturais e de aplicação entre  $\beta$ -glicosidases psicrófila, mesófila e termófila.  $\beta$ -glicosidases são enzimas chaves e que apresentam grande importância na temática do bioetanol de segunda geração. Essas enzimas participam da última etapa de hidrólise da celulose atacando moléculas de celobiose e liberando os açúcares fermentescíveis de cadeia C6.

O potencial resultado deste trabalho atuará em duas frentes importantes de ciência e aplicação, pois possibilitará explorar um conjunto de enzimas chaves no processo de hidrólise da celulose que atue em baixas e altas temperaturas; e contribuirá com as etapas de desenvolvimento de uma plataforma tecnológica que poderá ser utilizada em um bioprocessos consolidado de suplementação de coquetéis fúngicos.

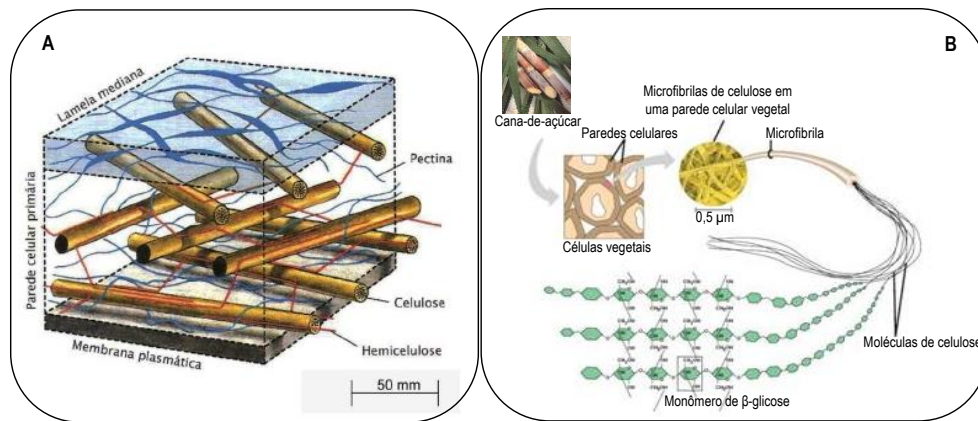
## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial como um dos maiores produtores de etanol de primeira geração (aproximadamente 20 bilhões de litros), produzido a partir da fermentação alcoólica da sacarose, usando como matéria-prima a cana-de-açúcar (Nass et al., 2007; Soccol et al., 2010; Dias et al., 2012). Ainda assim, existe a perspectiva de aumentar essa produtividade. Nesse contexto, sabe-se que dois terços da cana-de-açúcar correspondem à biomassa vegetal (material ligno-celulósico) que, apesar de ser constituída em grande parte por polissacarídeos como celulose e hemicelulose (formados principalmente por glicose C6 e xilose C5, respectivamente), não pode ser diretamente utilizada para a produção de bioetanol durante a primeira geração, sendo necessárias etapas de pré-tratamento e hidrólise para a liberação dos açúcares fermentescíveis.

### 1.1. A utilização da biomassa vegetal na produção de bioetanol

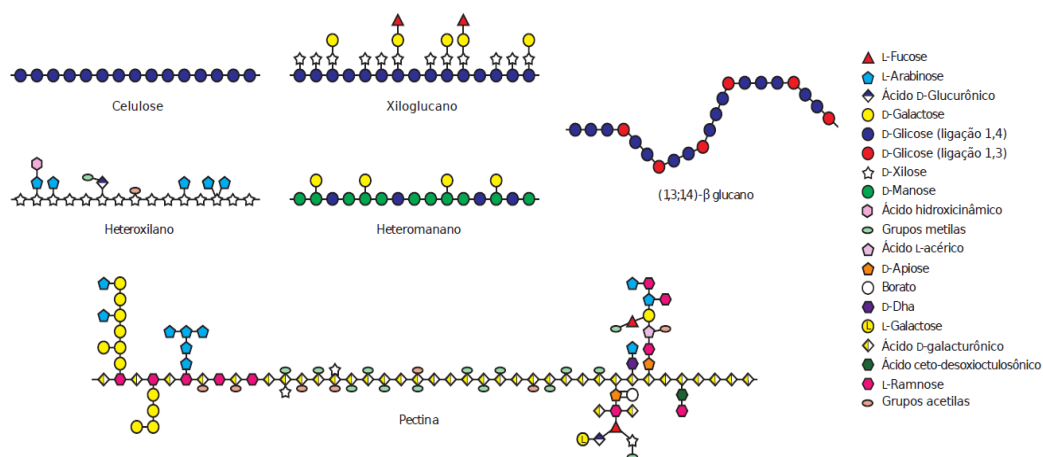
Muitos estudos têm sido feitos para o desenvolvimento da conversão eficiente da biomassa vegetal a um substrato que possa ser hidrolisado e fermentado, gerando uma maior quantidade de álcool (Leite e Cortez, 2008). Nesse contexto, denomina-se “etanol de segunda geração” (ligno-celulósico) aquele derivado da biomassa vegetal, sendo necessárias quatro principais etapas para a sua produção: (1) pré-tratamento, para promover a dissociação dos componentes da parede celular e possibilitar as etapas subsequentes de hidrólise dos mesmos; (2) hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose (sacarificação); (3) fermentação dos monômeros de açúcares gerados: hexoses (C6) e pentoses (C5); e (4) destilação e separação do etanol, com o intuito de atingir as especificações de combustíveis e derivados (Goldschmidt e Ackermann, 2008).

Os substratos para a produção do etanol de segunda geração são principalmente celulose e hemicelulose, que são, sobretudo polímeros de carboidratos e quando hidrolisados formam açúcares fermentescíveis (hexoses e pentoses). Estes polímeros são os principais constituintes da parede celular de plantas (Figura 1), correspondendo a aproximadamente 70 % de sua composição. Na cana-de-açúcar, a parede celular é composta por cerca de 40 -50% de celulose e cerca de 30 % de hemicelulose, além de possuir na sua composição lignina (~ 20 %) e pectina (~ 5-10 %) (Brienzo et al., 2009; Gírio et al., 2010; Chandel et al., 2011). A celulose é um polissacarídeo homogêneo composto principalmente por moléculas de D-glicose (cerca de 10 a 15 mil unidades) unidas por ligação  $\beta$ -(1,4)-glicosídica. Essas moléculas de glicose formam longas cadeias não ramificadas (Figuras 1 e 2) que se agrupam em arranjos cristalinos (e algumas porções amorfas) denominados microfibrilas, que são unidas por pontes de hidrogênio (Goldschmidt e Ackermann, 2008; Nelson e Cox, 2006).



**Figura 1. Distribuição dos principais componentes da parede celular vegetal.** Adaptado de Raven et al., 2001. **A**, desenho esquemático de uma parede celular vegetal ilustrando fibras de celulose envolvidas por hemicelulose e pectina. A hemicelulose se liga à superfície das microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio, formando um complexo que é circundado por pectinas. As pectinas também são abundantes na lamela mediana, que une as paredes celulares de células adjacentes. **B**, diagrama ilustrativo da disposição das microfibrilas e moléculas de celulose na parede celular vegetal, com representação dos monômeros de glicose que compõem a molécula de celulose.

A hemicelulose constitui um grupo de polímeros heterogêneos compostos por pentoses ( $\beta$ -D-xilose,  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose,  $\alpha$ -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e  $\alpha$ -D-galacturônico), podendo apresentar também, em menor quantidade, outros tipos de açúcares (Figura 2), como  $\alpha$ -L-ramnose e  $\alpha$ -L-fucose (Raven et al., 2001). Sua estrutura polissacarídica forma cadeias de açúcares de menor extensão do que as da celulose. As hemiceluloses encontram-se imersas na parede celular de plantas, algumas vezes ligadas à celulose juntamente com pectina, formando uma rede de fibras interligadas. Os grupos mais relevantes de hemicelulose para a produção de bioetanol são as xilanas.



**Figura 2.** Exemplos de polissacarídeos que podem ser encontrados na parede celular vegetal, ilustrando a heterogeneidade em sua estrutura. Ao lado direito da figura são listadas as unidades básicas que compõem tais polímeros, unidas por ligações (1,4)- $\beta$  no caso de celulose, xiloglucano, (1,3;1,4)- $\beta$ -glucano, heteroxilano e heteromanano, e ligações (1,4)- $\alpha$  no caso de resíduos de galacturonosil, formando galacturonanos, que são os principais constituintes dos polissacarídeos pécticos. Adaptado de Burton et al., 2010.

A pectina é um outro heteropolímero que confere elasticidade, porosidade, adesão e firmeza à parede celular, além de participar de vários processos celulares, inclusive relacionados à sinalização da célula vegetal. Porções de pectina entrelaçadas fazem sua estrutura apresentar um aspecto gelatinoso, formando uma rede cristalina tridimensional que aprisiona água e solutos. Tem natureza polissacarídica e geralmente contém cadeias principais de ácido D-galacturônico e ramnose (Figura 2), com muitas ramificações compostas principalmente por arabinose e galactose (Heldt, 2005; Pedrolli et al., 2009; Burton et al., 2010).

Um outro constituinte importante da biomassa vegetal é a lignina. Esta possui uma estrutura aromática complexa que é altamente recalcitrante, portanto não contribui como fonte de carbono fermentescível e dificulta etapas posteriores do processo. Assim, a lignina precisa ser removida da biomassa durante o pré-tratamento para que não ligue a celulose e a hemicelulose em matrizes complexas e recalcitrantes (refratárias), que dificultariam o processamento posterior de hidrólise enzimática da biomassa (Taylor et al., 2013). Em alguns casos, é adicionada uma etapa de delignificação alcalina durante o pré-tratamento que remove a maior parte da lignina (Rocha et al., 2012).

Os componentes da parede celular são fortemente ligados entre si; portanto, para que as enzimas utilizadas na sacarificação de celulose e hemicelulose possam ter acesso aos seus substratos, torna-se essencial a etapa de pré-tratamento da biomassa. Esta pode ser realizada por estratégias químicas (ex.: hidrólise ácida), físicas (ex.: explosão a vapor; tratamento hidrotérmico), biológicas (emprego de micro-organismos ou enzimas que usem os polissacarídeos da parede celular como substrato), ou uma combinação desses métodos, dependendo da fonte vegetal de onde é obtido o material ligno-celulósico e da infra-estrutura de cada biorefinaria (Soccol et al., 2010).

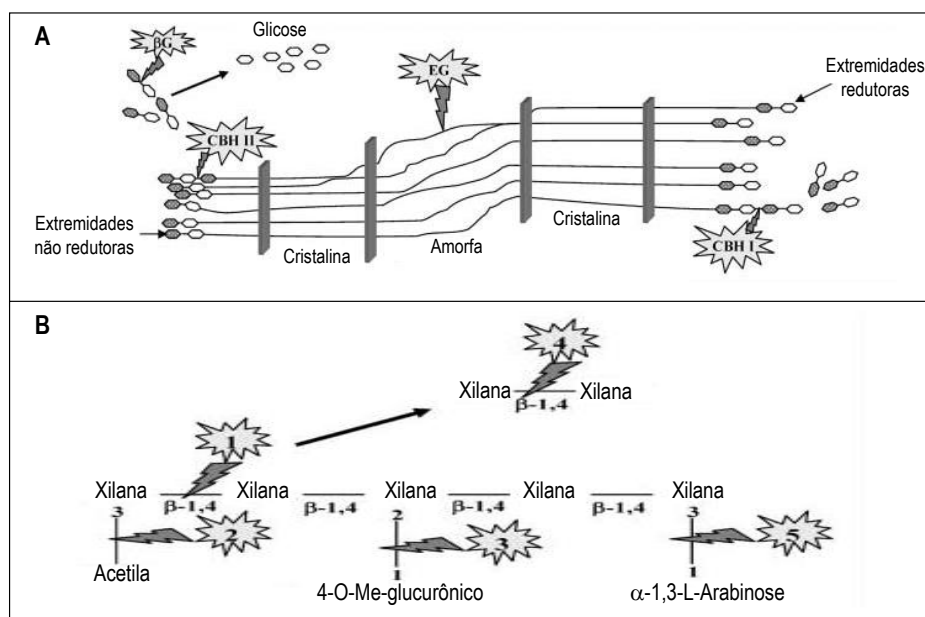
Uma corrente de tratamento muito utilizada, inclusive em nossos laboratórios de pesquisa, a qual apresenta resultados muito promissores, é o tratamento hidrotérmico (Rocha et al., 2012). Esse tipo de pré-tratamento da biomassa vegetal gera duas frações (correntes) principais: uma fração sólida, composta principalmente por celulose (C6), juntamente com uma pequena fração de hemicelulose (C5) e lignina; e uma fração líquida (licor rico em xilo-oligômeros), que contém uma grande porcentagem de xilo-oligossacarídeos originados a partir da hemicelulose (C5). Estas frações geradas podem então ser utilizadas para a hidrólise enzimática e posteriormente fermentadas a etanol por micro-organismos.

## **1.2. Hidrólise enzimática da biomassa vegetal**

Conforme discorrido anteriormente, o pré-tratamento da biomassa vegetal promove a dissociação dos componentes da parede celular, o que é especialmente importante para expor os polímeros de celulose e hemicelulose, deixando-os mais suscetíveis à ação da hidrólise enzimática (etapa de sacarificação). Nesta etapa é utilizada principalmente a ação sinérgica de celulasas e hemicelulasas.

O alvo de hidrólise das celulases são as pontes  $\beta$ -(1,4)-glicosídicas da molécula de celulose. Dependendo do tipo de celulase, a hidrólise de pontes glicosídicas ocorre em diferentes regiões da molécula (Figura 3-A). Assim, principalmente três enzimas merecem destaque, pois agem sinergicamente: as endo-glucanases, as celobiohidrolases (CBH I e II) e as  $\beta$ -glicosidasas. Inicialmente, as endo-glucanases hidrolisam aleatoriamente as ligações glicosídicas internas da celulose amorfa solúvel, gerando celulo-oligossacarídeos; em seguida, as celobiohidrolases atacam as extremidades desses subprodutos e a celulose cristalina, liberando resíduos de celobiose. As celobioses podem ser hidrolisadas no meio extracelular pela ação de  $\beta$ -glicosidasas (Horn et al., 2012; Taylor et al., 2013).

À medida que são gerados monômeros de glicose e sua concentração aumenta no meio, ocorre a problemática da inibição das  $\beta$ -glicosidasas pelo seu produto. Sabe-se que tanto as CBHs quanto as  $\beta$ -glicosidasas são fortemente inibidas pela glicose, o que acarreta o aumento de moléculas de celobiose com conseqüente inibição das celobiohidrolases e assim diminui a eficiência do processo (Decker et al.; 2000; Yun et al., 2001). Nesse sentido, os sistemas de SFS e CBP podem ser uma forma de resolver o problema de inibição das  $\beta$ -glicosidasas, uma vez que leveduras industriais (ou uma bactéria etanolgênica) poderiam consumir a glicose antes que esta se acumulasse em quantidade suficiente para inibir a ação das  $\beta$ -glicosidasas finais.



**Figura 3. Mecanismos de ação das principais hidrolases de interesse para a produção do etanol de segunda geração.** A, degradação enzimática de celulose a glicose. A **CBHI** (celobiohidrolase I) age nas extremidades redutoras, enquanto a **CBHII** (celobiohidrolase II) age nas extremidades não-redutoras; as **EG** (endo-glucanases) hidrolisam as pontes internas e a **BG** ( $\beta$ -glicosidase) cliva a celobiose (um dissacarídeo) a moléculas de glicose (monômero). B, Degradação enzimática de glucuronoxilanas. 1, endo-xilanase; 2, acetilxilana-esterase; 3,  $\alpha$ -glucuronidase; 4,  $\beta$ -xilosidase; 5,  $\alpha$ -arabinase (sendo esta necessária apenas para hidrolisar glucuronoxilanas de gimnospermas). Adaptado de Pérez et al., 2002.

As hemiceluloses são constituídas principalmente por xilana com ramificações de arabinose e manose, dependendo da origem vegetal. A parte do esqueleto hemicelulósico ligada à xilana é hidrolisada por uma combinação de enzimas (Figura 3-B), entre elas as endo-1,4- $\beta$ -xilanas e as  $\beta$ -xilosidases, que clivam as ligações glicosídicas no arcabouço de xilana e hidrolisam pequenos xilo-oligômeros e xilobiose, respectivamente (Subramaniyan e Prema, 2002; Sumardi et al., 2005; Gírio et al., 2010). A hidrólise das hemiceluloses gera açúcares fermentescíveis, incluindo pentoses (D-xilose e arabinose) principalmente, e hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose) em menor quantidade (Subramaniyan e Prema, 2002).

Além das celulasas e hemicelulasas, a degradação de pectina e lignina é de grande interesse para a indústria de biocombustíveis, por contribuírem para a exposição da celulose e hemicelulose às suas respectivas hidrolases por um possível e mais eficiente reaproveitamento dos açúcares liberados (Delabona et al., 2013). A degradação das pectinas da parede celular pode ser catalisada por hidrolases e liases, em reações de despolimerização, além de esterases, que provocam sua desesterificação (Pedrolli et al., 2009).

Apesar da alta recalcitrância da lignina, algumas enzimas com ação oxidativa conseguem promover a sua decomposição a radicais aromáticos. Exemplos dessas enzimas são as lacases, a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP), além de oxidases capazes de gerarem  $H_2O_2$  e desidrogenases. A LiP degrada unidades não-fenólicas da lignina, enquanto a MnP gera o íon  $Mn^{3+}$ , por sua vez oxida as unidades de lignina fenólicas e não-fenólicas (Martínez et al., 2005).

### **1.3. Micro-organismos extremofílicos e sua contribuição para a biotecnologia**

Como alternativa às enzimas e aos micro-organismos atualmente empregados nas pesquisas envolvendo etanol de segunda geração, ambientes que apresentam condições extremas à vida, como extremos de temperatura (temperaturas muito altas ou muito baixas), radiação, pH e salinidade, podem ser explorados como fontes de material para aplicação biotecnológica, especialmente no que diz respeito à ação de novas enzimas isoladas de micro-organismos extremofílicos.

Existe um grande interesse em se obter novas hidrolases que funcionem nas várias condições de reação utilizadas na indústria (principalmente xilanases e celulasas, devido à sua vasta aplicação biotecnológica, além de se destacarem como gargalo do bioprocessamento do bioetanol— resultados não publicados). Uma grande parte das pesquisas tem sido direcionada para a descoberta de enzimas termotolerantes (termozimas), pois nos bioprocessos industriais, temperaturas mais elevadas de reação são atraentes por favorecerem um ambiente estéril, a solubilidade da reação e a acessibilidade do substrato (Ribeiro et al., 2012; Taylor et al., 2013). Já no caso das hidrolases psicrófilas (ativas em baixas temperaturas), em especial hemicelulasas e celulasas, há muito menos trabalhos, apesar da grande contribuição que estas também podem oferecer, por exemplo, tornando possível a realização de SFS e CBP na produção de bioetanol de segunda geração. Para

funcionar em ambientes frios, enzimas psicrófilas precisam superar a redução das taxas de reações químicas induzidas por baixas temperaturas (Georlette et al., 2004). Isto pode ser alcançado através do aumento do número de turnover (kcat), diminuindo a afinidade pelo substrato (km) ou alterando ambos os parâmetros (Smalas et al., 2000). Como resultado, as enzimas adaptadas ao frio são mais eficientes a temperaturas entre 0 e 30 °C comparadas aquelas mesófilas (Gerday et al., 2000). Essa característica torna esses biocatalisadores atraentes para muitas aplicações, uma vez que podem contribuir, por exemplo, para poupar energia em processos de grande escala (dispensando o caro aquecimento dos reatores); para transformar produtos sensíveis ao calor na indústria alimentar; e bio-remediar solos e águas contaminadas em regiões frias (Feller, G. e Gerday, 2000).

A adaptação ao frio envolve tipicamente um aumento na flexibilidade conformacional do sítio ativo ou da superfície da proteína, à custa de uma diminuição da estabilidade (Isaksen et al., 2014). Várias alterações estruturais - dentro ou fora do centro catalítico - podem contribuir para melhorar a flexibilidade de uma macromolécula, incluindo maior acessibilidade ao sítio ativo, menor teor de resíduos de prolina e arginina, menor hidrofobia, menor número de interações fracas (eletrostática, aromática, ligação de hidrogênio e dipolo), menor conteúdo de solvente exposto e uma maior proporção de grupos não polares expostos ao solvente (Georlette et al., 2004; Gerday et al., 2000; Feller & Gerday, 2000). Cada família de proteínas parece ter estabelecido a sua estratégia de adaptação ao frio, usando um ou uma combinação dos aspectos mencionados acima como modificação estrutural.

Em alguns casos, os micro-organismos encontrados em ambientes extremos são resistentes a mais de um tipo de condição adversa (poli-extremófilos). Um exemplo são as bactérias do gênero *Exiguobacterium*, classificadas dentro do filo Firmicutes, com representantes isolados de uma grande variedade de ambientes (com temperatura de -12 a 55 °C), inclusive do ambiente antártico (Carneiro et al., 2012), o que evidencia o seu potencial biotecnológico.

### **1.5 A suplementação do coquetel enzimático celulolítico com atividades enzimáticas acessórias**

Um aspecto fundamental no que diz respeito à hidrólise do bagaço da cana de açúcar é a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. A literatura tem demonstrado que o coquetel enzimático celulolítico produzido pelos fungos filamentosos se beneficiam em termos de seu potencial hidrolítico quando suplementados com as denominadas “atividades acessórias” melhorando a hidrólise da biomassa lignocelulósica, tanto em termos da velocidade (massa açúcar liberado/volume de reação \*tempo) quanto do rendimento de hidrólise (massa de açúcar liberado/massa de celulose e hemicelulose presente na biomassa).

Benko e co-autores analisaram a hidrólise de diferentes substratos celulósicos e demonstraram que a suplementação com atividade xilanolítica foi capaz de aumentar o



rendimento de hidrólise de um coquetel enzimático sintético constituído de enzimas purificadas de *T. reesei* celobiohidrolase I e II e endoglucanase II (Benko et al., 2008). Dados reportados na literatura demonstraram que a suplementação de coquetel celulolítico comercial (Accelerase 1500, Genencor) com endoxilanase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase provenientes de *Aspergillus sp* aumentaram o rendimento de hidrólise da palha de trigo (Alvira et al., 2011). Maeda e colaboradores também obtiveram resultados melhorados de hidrólises do bagaço de cana-de-acucar suplementando culturas dos sobrenadantes de *Penicillium funiculosum* e *T. harzianum* com xilanases (Maeda et al., 2011). Além da xilanase, a atividade pectinolítica também possui efeito benéfico no rendimento de hidrólise, provavelmente, pela remoção de polissacarídeos não-celulósicos que recobrem as fibras de celulose impedindo o acesso das celuloses àquele substrato (Berlin et al., 2006). A otimização da hidrólise de resíduo de milho foi estudada com o uso da preparação comercial celulolítica (Celucast 1.5L, Novozyme) associada à preparações comerciais com alta atividade pectinolítica (Multifect Pectinase, Genencor), xilanolítica (Multifect Xylanase, Genencor) e  $\beta$ -glicosidásica (Novozym 188, Novozyme) (Berlin et al., 2006). Com isso, pode-se notar que a suplementação com atividades acessórias possui uma correlação dependente com o tipo de pré-tratamento e biomassa, havendo, portanto, a necessidade de um estudo cuidadoso para cada um destes aspectos.

## 2. MOTIVAÇÃO PARA ESTE TRABALHO E RESULTADOS PRELIMINARES

Enzimas com atividades em temperaturas baixas (psicrofílicas) são de grande interesse biotecnológico, uma vez que alguns processos industriais exigem o uso de temperaturas mais brandas para evitar alterações e desnaturação do produto final bioprocessado. Dentre esses processos, o de SFS (sacarificação e fermentação simultâneos) utilizando leveduras industriais tem destaque por representar uma grande economia de energia, dispensando a etapa de resfriamento. Somados à isso, estudos direcionados à hidrolases psicrofílicas ainda são muito poucos explorados; em uma revisão recente (Paës et al., 2012), é relatado que apenas duas xilanases psicrofílicas já foram descritas, ambas isoladas da Antártica. Nesse sentido, o estudo de enzimas psicrofílicas e sua aplicação em temperatura similar de crescimento das leveduras representariam uma possibilidade de redução das etapas atualmente envolvidas nos ensaios na produção de etanol de segunda geração, possibilitando um processo de SFS. Em trabalhos anteriores (Crespim et al., 2016; Zanphorlin et al., 2016), uma  $\beta$ -glicosidase de *Exiguobacterium antarcticum* B7 foi investigada, sendo altamente expressa em cepas de *E.coli*, purificada e caracterizada bioquímica e estruturalmente. Interessantemente, a enzima apresentou estímulo e alta tolerância a quantidades significativas de glicose. Além disso, mostrou-se em um arranjo tetramérico em solução e no cristal de difração, diferentemente de outras GH1 que possuem estrutura monomérica. Essas características e também o fato do alto rendimento na obtenção dessa enzima, nos motivaram a dar continuidade ao estudo com outras  $\beta$ -glicosidases psicrofílica provenientes do filo Firmicutes, bactérias importantes na obtenção de hidrolases. Esse projeto também se estenderá no estudo de  $\beta$ -glicosidases mesofílica e termofílica. Há alguns anos o grupo vem se empenhando na obtenção e no entendimento de  $\beta$ -glicosidases que possam atuar em temperaturas por volta de 50°C (temperaturas em que os reatores industriais trabalham) e que apresentem alta tolerância a glicose. Essa é uma importante frente para o CTBE, uma vez que os principais coquetéis que estão em desenvolvimento em nosso laboratório apresentam baixa tolerância à glicose nas atividades de  $\beta$ -glicosidase (Delabona et al., 2013); e em alguns casos deficiência na secreção dessas enzimas. Nesse sentido, a busca por  $\beta$ -glicosidases que possam complementar a atividade desses coquetéis se destaca como um dos importantes objetivos do nosso centro, visando tornar nossos coquetéis enzimáticos viáveis para a comunidade e para o mercado do bioetanol de segunda geração.

Por fim, nesse projeto, esperamos ampliar nosso entendimento sobre os componentes essenciais para a especificidade, tolerância à inibidores, estabilidade e catálise dessa família de enzimas; além de permitir uma minuciosa comparação (em termos de funcionalidade, aspectos estruturais e de aplicação) entre  $\beta$ -glicosidases psicrofílicas, mesofílicas e termofílicas. A compreensão dos mecanismos pelos quais as enzimas psicrofílicas se mantêm estáveis em baixas temperaturas poderá direcionar estudos futuros de Engenharia Molecular e de Evolução Dirigida com enzimas atualmente utilizadas na pesquisa e aplicação industrial.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O presente projeto irá explorar as diferenças funcionais, estruturais e de aplicação de  $\beta$ -glicosidasases psicrófilas, mesófilas e termófilas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Expressão e purificação de  $\beta$ -glicosidasases psicrófilas, mesófilas e termófilas do filo Firmicutes
- Caracterização funcional (pH, temperatura, inibidores, ativadores, cinética enzimática, eletroforese capilar) e biofísica (dicroísmo circular e DLS) de  $\beta$ -glicosidasases psicrófilas, mesófilas e termófilas do filo Firmicutes
- Testes de suplementação em coquetéis fúngicos de  $\beta$ -glicosidasases mesófilas e termófilas

### 4. PLANO DE TRABALHO

#### 4.1 Cronograma do bolsista de Iniciação Científica

ATIVIDADES	TRIMESTRE			
Expressão de $\beta$ -glicosidasases	■			
Técnicas em purificação (afinidade e exclusão molecular)	■	■		
Caracterização funcional com substratos sintéticos (pH, temperatura, inibidores, ativadores e capilar)		■	■	
Cinética enzimática de $\beta$ -glicosidasases (pNPG e celobiose)		■	■	
Caracterização biofísica (dicroísmo circular e DLS)			■	
Suplementação de $\beta$ -glicosidasases em coquetéis fúngicos			■	■
Escrita de relatório				■

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Obtenção dos genes

Os genes sintéticos otimizados para expressão em *E.coli* já foram obtidos comercialmente da GenScript.

### 5.2. Testes de expressão heteróloga das enzimas em linhagens de *E. coli* BL21

As enzimas serão produzidas individualmente, utilizando o vetor pET28a seguindo o protocolo descrito por Sambrook et al. (2001) e por metodologia bem estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (Giuseppe et al., 2014; Santos, et al. 2014; Diogo et al., 2015; Crespim et al., 2016;) Para a expressão das proteínas recombinantes, após transformação de células de *E.coli* competentes, o crescimento individual dos clones será feito em placas com meio líquido LB seletivo (canamicina 50 µg/mL) durante 16 horas a 37°C. O pré-inóculo será cultivado posteriormente em 500 mL de meio líquido seletivo LB. O crescimento bacteriano será acompanhado pela medida da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro (D.O.<sub>600nm</sub>) até 0,8 e será induzida a expressão com 0,5 mM de IPTG. Serão coletadas amostras a cada hora para análise de “time course” (entre 4-5 horas de expressão), sendo avaliados níveis de expressão e solubilidade mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Após as 5 horas de expressão, as culturas serão centrifugadas individualmente (20 minutos a 7000 x g). O sobrenadante será descartado e as células sedimentadas serão ressuspendidas em 20 mL de tampão de lise (50 mM de fosfato de sódio pH 7,4; PMSF 1 mM; NaCl 0,5 M e lisozima 0,3 mg/mL). Será incubado em temperatura ambiente por 30 minutos e a lise celular será provocada por 6 ciclos de sonicação (Sonics®) com 50 % de amplitude por 10 segundos, intercalados com 1 minuto de intervalo. O lisado será então centrifugado (24.000 x g por 25 minutos) e o sobrenadante contendo as proteínas será submetido a análise eletroforética (SDS-PAGE) e testes de atividade contra substratos comerciais.

### 5.3. Purificação das enzimas recombinantes e análise em gel desnaturante SDS-PAGE

O sistema de expressão utilizando os vetores pET28a possibilita um alto nível de expressão intra-celular do gene clonado, devido ao forte promotor do bacteriófago T7. As construções em pET28a, quando utilizadas em linhagens de BL21, possibilitam a expressão de enzimas recombinantes fusionadas a 6 histidinas na porção N terminal da proteína recombinante, o que facilita as etapas subsequentes de purificação por afinidade utilizando resinas imobilizadas com níquel. A otimização da expressão descrita acima, as proteínas serão purificadas individualmente por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose (IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography em ÄKTA FPLC, GE Healthcare®), a 0,3 MPa de pressão e 1,0 mL/min de fluxo. Um gradiente de imidazol (0-500 mM) contribuirá para a eluição e a pureza das amostras será verificada por SDS-PAGE. As amostras consideradas puras e com atividade serão permeadas e

concentradas por ultrafiltração (Amicon® Ultra-4 CentrifugalFilter, Millipore). O concentrado será submetido a cromatografia de exclusão molecular (ÄKTA FPLC, GE Healthcare®) usando coluna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare®). Para confirmação da pureza, alíquotas das enzimas purificadas serão submetidas a eletroforese em gel desnaturante SDS PAGE.

#### **5.4. Ensaio de atividade das enzimas recombinantes sobre diferentes substratos**

A atividade das  $\beta$ -glicosidases purificadas serão aferidas utilizando substratos comerciais pNPGlu ( $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopiranoside-Sigma-Aldrich) entre outros pNPs; e também substrato natural celobiose, utilizando o kit de glicose oxidada. Basicamente, a reação enzimática será conduzida com 40  $\mu$ L de tampão acetato 50 mM (pH 5,5), 50  $\mu$ L do substrato pNPG a 4 mM e 10  $\mu$ L de enzima, em um volume final de 100  $\mu$ L. A mistura será incubada nas temperaturas desejáveis durante 10 minutos e a reação será inativada com a adição de 100  $\mu$ L de carbonato de sódio (1M), com leitura da absorbância em 405 nm. Para a determinação da concentração, será construída uma curva padrão utilizando-se pNP ( $\rho$ -nitrophenol). Assim, uma unidade (U) de atividade enzimática será definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu$ mol de pNP por minuto, sob as condições de ensaio acima descritas. Toda a etapa de caracterização enzimática será feita em colaboração com o Dr. Roberto Ruller.

#### **5.5 Eletroforese capilar para análise da digestão de carboidratos**

A eletroforese capilar é uma técnica que se baseia na separação de espécies no interior de um pequeno capilar, de acordo com a razão tamanho/carga e apresenta altíssima sensibilidade (picomol). Para isso os carboidratos necessitam ser derivatizados com um fluoróforo. Além disso, os experimentos podem ser realizados de duas formas: 1) marcação do substrato, seguida de hidrólise pela enzima, e análise dos produtos por eletroforese capilar; ou 2) hidrólise de substrato pela enzima, seguida de marcação dos produtos e análise por eletroforese capilar. Em nosso caso, a marcação será realizada usando 9-aminopireno-1,4,6-trissulfonato (APTS) (Chen & Evangelista, 1995), o sacarídeo marcado será acompanhado pela emissão de fluorescência em 520 nm, após excitação a 488 nm. O tamanho do sacarídeo pode ser estimado comparando-se o tempo de eluição com aquele obtido para padrões de peso molecular conhecido. Essa técnica tem sido usada para determinar o modo de operação (endo/exo) e também o número de subsítios que formam o sítio ativo de hidrolases glicosídicas. O equipamento que será utilizado para essas análises é o P/ACE MDQ da Beckman Coulter Inc (Brea, CA, Estados Unidos), que foi recentemente adquirido através do processo FAPESP nº 2014/07135-1 e está operante no LNBio como equipamento multiusuário.

#### **5.6. Efeitos de pH e temperatura**

O pH ideal para a atividade enzimática será determinado por incubação por 10 minutos em diferentes tampões na concentração de 50mM citrato-fosfato-glicina (tampão universal), nos

seguintes valores de pHs 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; e 10,0. Após a incubação, a atividade hidrolásica será medida como descrito no item 5.6.

Após a determinação da melhor faixa de atuação de pH, a temperatura ótima e a estabilidade térmica das enzimas isoladas serão determinadas por teste de atividade com incubação em tampão universal (citrato-fosfato-glicina 50 mM, no valor de pH que for ideal para cada enzima, individualmente). Neste contexto, será avaliada uma ampla faixa de temperaturas (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80°C) por períodos que irão variar de 10 a 120 minutos (10, 25, 40, 55, 70, 85, 100 e 120); e a atividade será dosada como previamente descrito no item 5.6. Todas análises serão feitas no mínimo em triplicata para avaliação.

### **5.7. Parâmetros cinéticos**

Devido aos problemas de baixa solubilidade e recalcitrância do bagaço de cana-de-açúcar, serão utilizados os substratos comerciais e celobiose para a determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas recombinantes. Uma vez determinada as condições ótimas de temperatura e pH de cada enzima individualmente, os parâmetros cinéticos serão determinados utilizando cerca de 10 diferentes concentrações do substrato (1-10mg/mL). Os valores de  $K_{cat}$  e  $K_m$  serão determinados de acordo com as constantes cinéticas de Michaelis-Menten em gráficos Lineweaver-Burk, seguindo protocolos já descritos na literatura (Segato et al., 2012; Textor et al., 2013), os quais estão bem estabelecidos no nosso laboratório. Todas análises serão feitas no mínimo em triplicata para avaliação.

### **5.8. Efeitos de íons metálicos, agentes redutores e sais na atividade enzimática**

A atividade enzimática será avaliada com a adição de 2, 5 e 10 mM dos seguintes íons ao tampão de reação: KCl, LiCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, e ZnCl<sub>2</sub>. As atividades também serão avaliadas com a adição de 0,6 a 15 % de NaCl (p/v) ao tampão fosfato de sódio 20 mM. O ensaio enzimático seguirá o protocolo já descrito no item 5.6.

### **5.9. Estudos de estrutura secundária utilizando dicroísmo circular (CD)**

Uma vez as proteínas purificadas e quantificadas, serão realizados experimentos de dicroísmo circular (CD) para a investigação de suas estruturas secundárias. Os espectros de CD serão medidos utilizando-se um espectropolarímetro J-715 (JASCO) em cuíbs de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os experimentos de CD serão realizados no Laboratório de Análises de Macromoléculas do CTBE - LAM (instalação aberta à usuários). Os resultados serão gerados a partir da média de no mínimo 10 espectros de 200-260 nm medidos a 100 nm/min, 0,4 nm de resposta. A temperatura da cela será controlada constante através de um sistema interno de controle (Peltier TypeControl System PFD 425S- Jasco). O programa utilizado para o tratamento de dados será o Origin (OriginLAB Corporation). Os experimentos serão conduzidos com as hidrolases

recombinantes identificadas durante etapas anteriores desenvolvidas neste projeto. Os valores obtidos na leitura de CD (mDeg) foram convertidos para elipticidade molar residual  $[\Theta]_{EMR}$ , de acordo com a equação:

$$[\Theta]_{EMR} = (\theta \cdot 100 \cdot MM) / (C \cdot l \cdot n)$$

Onde “ $\theta$ ” é a elipticidade em graus (Deg), “MM” é a massa molecular da proteína (g/mol), “C” é a concentração da proteína (mg/ml), “l” é o comprimento do caminho ótico (cm) e “n” é o número de resíduos de aminoácidos da respectiva proteína (Correa e Ramos, 2009). O programa CDNN (Versão 2 – <http://Bioinformatik.biochemtech.uni-halle.dee/cdnn>) será utilizado para a deconvolução dos dados e obtenção da porcentagem de hélice- $\alpha$ , folha- $\beta$  e estrutura randômica de cada proteína.

### 5.10 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Todos os experimentos de DLS serão realizados no Laboratório de Análises de Macromoléculas – LAM (instalação aberta à usuários). O DLS mede o movimento browniano e relaciona isso com o tamanho das partículas. O método consiste em medir a função de auto-correlação da intensidade da luz espalhada pela partícula. Para uma espécie monodispersa, essa função decai exponencialmente com o tempo e, para espécies polidispersas, a função é uma soma de exponenciais. A velocidade do movimento browniano é definida pelo coeficiente de difusão translacional (D), que é obtido pelo ajuste exponencial da curva de auto-correlação. A partir do coeficiente de difusão é possível obter, através da equação de Stokes-Einstein, o raio hidrodinâmico médio ( $R_h$ ) ou raio de Stokes ( $R_s$ ) (Gast e Fieldler, 2012).

$$D = KT / 6\pi\eta R_h$$

Onde, “D” é o coeficiente de difusão, “K”, a constante de Boltzman, “T”, a temperatura, “ $\eta$ ”, a viscosidade e  $R_h$ , o raio hidrodinâmico. Para as medidas de DLS, as amostras protéicas serão centrifugadas à 10.000 x g a 4°C para eliminar possíveis agregados. Todas as análises serão realizadas em equipamentos Malvern da linha Zetasizer com comprimento de onda fixo em 633 nm e cuvetas de poliestireno com 1 cm de caminho ótico.

### 5.11 Suplementação em coquetéis fúngicos

Estudos de suplementação de coquetéis fúngicos com proteínas específicas são muito importantes e podem contribuir significativamente para o aumento da performance enzimática durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos, diminuindo tempo, carga enzimática total e efeitos de inibição do processo de obtenção de açúcares fermentescíveis. Nesse trabalho pretendemos avaliar as diferentes  $\beta$ -glicosidases recombinantes, na suplementação de coquetéis enzimáticos comerciais e também aqueles produzidos pelo CTBE/CNPEM. Para isso, será

utilizado como substrato a cana-de-açúcar proveniente de diferentes processos de pré-tratamento (explodido e/ou hidrotérmico na ausência e presença de ácido) produzidos pelo CTBE/CNPEM (dados ainda não publicados). Inicialmente, será obtida uma curva dose-resposta para cada enzima recombinante em escala laboratorial. Diferentes concentrações de enzima serão misturadas à 50 mg de bagaço pré-tratado (5 % de sólido) em tubos de 2,0 mL e 0,02 FPU do coquetel base em tampão 50 mM citrato de sódio (pH 5,0) em volume final de 1 mL. A reação será incubada em termo-mixer à 50 °C por 48 horas. A cada 24 horas será retirada uma alíquota de 100 µL e adicionado 100 µL do reagente DNS (durante 5 minutos e 99°C) para dosagem do açúcar redutor liberado (Delabona et al., 2013). Posteriormente, os resultados também serão confirmados por metodologia de HPLC. Após análise da curva dose-resposta, a melhor concentração encontrada para cada enzima será repetida em experimentos de maior escala (10 % de sólido em frascos de 125 mL).



## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALVIRA, P. M.J. NEGRO, M.J., M. BALLESTEROS. Effect of endoxylanase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw **Bioresource Technology** 102: 4552–4558, 2011.
- ABRAHAM, R. E.; VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; PURI, M. Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.
- ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKOCZI, G.; CHEN, V. B.; DAVIS, I. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J. J.; HUNG, L. W.; KAPRAL, G. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R.; READ, R. J.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S.; TERWILLIGER, T. C.; ZWART, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 213–21, 2010.
- ARMISÉN, P.; MATEO, C.; CORTÉS, E.; BARREDO, J. L.; SALTO, F.; DIEZ, B.; RODÉS, L.; GARCÍA, J. L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. **Journal of Chromatography. A**, v. 848, n. 1–2, p. 61–70, 1999.
- BENASSI, V. M.; SILVA, T. M. DA; PESSELA, B. C.; GUISAN, J. M.; MATEO, C.; LIMA, M. S.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. D. L. T. M. Immobilization and biochemical properties of a  $\beta$ -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 93–101, 2013.
- BERLIN, A., GILKES, N., DOUGLAS K., BURRA, R. MARKOV, A. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes **Enzyme and Microbial Technology** 37 (2005) 175–184.
- BORGES, J. C. & RAMOS, C. H. Analysis of molecular targets of Mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. **Current medicinal chemistry** 18, 1276–1285, 2011.
- BRENDA, B.; BATISTA-VIRRA, F. Immobilization of enzymes. In: GUISAN, J. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. [s.l.] New Jersey (NJ): Humana Press Inc., 2006. v. 22p. 123–124.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A.F.; MILAGRES, A.M.F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199–204, 2009.
- CARNEIRO, A.R.; RAMOS, R.T.J.; DALL'AGNOL, H.; PINTO, A.C.; SOARES, S.C.; SANTOS, A.R.; GUIMARÃES, L.C.; ALMEIDA, S.S.; BARAÚNA, R.A.; GRAÇAS, D.A.; FRANCO, L.C.; ALI, A.; HASSAN, S.S.; NUNES, C.I.P.; BARBOSA, M.S.; FIAUX, K.K.; ABURJAILE, F.F.; BARBOSA, E.G.V.; BAKHTIAR, S. M.; VILELA, D.; NÓBREGA, F.; SANTOS, A.L.; CAREPO, M.S.P.; AZEVEDO, V.; SCHNEIDER, M.P.C.; PELLIZARI, V.H.; SILVA, A. Genome Sequence of Exiguobacterium antarcticum B7, Isolated from a Biofilm in Ginger Lake, King George Island, Antarctica. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6689–6690, 2012.
- CHANDEL, A.K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 1, p. 8–20, 2011.
- CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, p. 164–173, 2009.
- CRESPIM, E.; ZANPHORLIN, L.M.; DE SOUZA, F.H.M.; DIOGO, J.A.; GAZOLLA, A.C.; MACHADO, C.B.; FIGUEIREDO, F.; SOUSA, A.S.; NÓBREGA, F.; PELLIZARI, V.H.; MURAKAMI, M.T.; RULLER, R. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase from Exiguobacterium antarcticum B7. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 375–380, 2016.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, p. 1–9, 2013.
- DELABONA, P.D.S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z.B.; PAIXÃO, D.A.A.; FARINAS, C.S.; CAIRO, J.P.L.F.; LIMA, D.J.; SQUINA, F.M.; RULLER, R.; PRADELLA, J.G.D.C. Understanding the cellulolytic system of Trichoderma reesei P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500–507, 2013.
- DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M.P.; JESUS, C.D.F.; ROSSELL, C.E.V.; MACIELFILHO, R.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 152–161, 2012.
- DIOGO, JOSÉ A. ; HOFFMAM, ZAIRA B. ; ZANPHORLIN, LETÍCIA M. ; COTA, JUNIO ; MACHADO, CARLA B. ; WOLF, LÚCIA D. ; SQUINA, FABIO ; DAMÁSIO, ANDRÉ R.L. ; MURAKAMI, MARIO T. ; RULLER, ROBERTO . Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 31–37, 2015.
- DRISS, D.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAARI, F.; KALLEL, F.; GHAZALA, I.; BOUAZIZ, F.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corncobs using immobilized *Penicillium occitanis* xylanase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 146–153, 2014.
- DONG, A.; XU, X.; EDWARDS, A. M.; CHANG, C.; CHRUSZCZ, M.; CUFF, M.; CYMBOROWSKI, M.; DI LEO, R.; EGOROVA, O.; EVDOKIMOVA, E.; FILIPPOVA, E.; GU, J.; GUTHRIE, J.; IGNATCHENKO, A.; JOACHIMIAK, A.; KLOSTERMANN, N.; KIM, Y.; KORNIYENKO, Y.; MINOR, W.; QUE, Q.;

- SAVCHENKO, A.; SKARINA, T.; TAN, K.; YAKUNIN, A.; YEE, A.; YIM, V.; ZHANG, R.; ZHENG, H.; AKUTSU, M.; ARROWSMITH, C.; AVVAKUMOV, G. V.; BOCHKAREV, A.; DAHLGREN, L. G.; DHE-PAGANON, S.; DIMOV, S.; DOMBROVSKI, L.; FINERTY, P., JR.; FLODIN, S.; FLORES, A.; GRASLUND, S.; HAMMERSTROM, M.; HERMAN, M. D.; HONG, B. S.; HUI, R.; JOHANSSON, I.; LIU, Y.; NILSSON, M.; NEDYALKOVA, L.; NORDLUND, P.; NYMAN, T.; MIN, J.; OUYANG, H.; PARK, H. W.; QI, C.; RABEH, W.; SHEN, L.; SHEN, Y.; SUKUMARD, D.; TEMPEL, W.; TONG, Y.; TRESAGUES, L.; VEDADI, M.; WALKER, J. R.; WEIGELT, J.; WELIN, M.; WU, H.; XIAO, T.; ZENG, H.; ZHU, H. In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. **Nat Methods**, v. 4, n. 12, p. 1019-21, 2007.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, 2004.
- FEIGIN, L. A. S., D. I. . Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. 1987. 335 ISBN 0-306-42629-3.
- FELLER, G. & GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature reviews. Microbiology** 1, 200-208, doi:10.1038/nrmicro773, 2003.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; ORTIZ, C.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 9, p. 2610-2615, 2006.
- GAST, K.; FIEDLER, C. Dynamic and static light scattering of intrinsically disordered proteins. **Methods Mol Biol**, v. 896, p. 137-61, 2012.
- GEORLETTE, D. et al. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS microbiology reviews** 28, 25-42, doi:10.1016/j.femsre.2003.07.003 (2004).
- GERDAY, C. et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trends in biotechnology** 18, 103-107, 2000.
- GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.
- GIUSEPPE, P.O.; SOUZA, T.A.C.B.; SOUZA, F.H.M.; ZANPHORLIN, L.M.; MACHADO, C.B.; WARD, R.J.; JORGE, J.A.; FURRIEL, P.M.; MURAKAMI, M.T. Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 70, p. 1631, 2014.
- GLATTER, O. K. Small angle x-ray scattering. 1982. ISBN 0122862805.
- GOLDSCHMIDT, F.; ACKERMANN, M. From Cellulose to Ethanol: Engineering Microorganisms to Produce Biofuel. **Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics**, p. 1-17, 2008.
- GUIMARÃES, B. G.; SANFELICI, L.; NEUENSCHWANDER, R. T.; RODRIGUES, F.; GRIZOLLI, W. C.; RAULIK, M. A.; PITON, J. R.; MEYER, B. C.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **J Synchrotron Radiat**, v. 16, n. Pt 1, p. 69-75, 2009.
- GUISÁN, J. M.; ÁLVARO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GARCIA, J. L.; TAGLIANI, A. Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 4, p. 455-464, 1993.
- ISAKSEN, G. V., AQVIST, J. & BRANDSDAL, B. O. Protein surface softness is the origin of enzyme cold-adaptation of trypsin. **PLoS computational biology** 10, e1003813, doi:10.1371/journal.pcbi.1003813, 2014.
- JIA, F.; NARASIMHAN, B.; MALLAPRAGADA, S. Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 209-222, 2014.
- KEEGAN, R. M.; WINN, M. D. Automated search-model discovery and preparation for structure solution by molecular replacement. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 63, n. Pt 4, p. 447-57, 2007.
- KISSINGER, C. R.; GEHLHAAR, D. K.; FOGEL, D. B. Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 55, n. Pt 2, p. 484-91, 1999.
- LEITE, R.C.C.; CORTEZ, L.A.B. O etanol combustível no Brasil. Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas, Ministério das Relações Exteriores, 2008.
- LONG, F.; VAGIN, A. A.; YOUNG, P.; MURSHUDOV, G. N. BALBES: a molecular-replacement pipeline. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 64, n. Pt 1, p. 125-32, 2008.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, n. 2, p. 205-220, 2015.
- MULLENBACH, J.P.; LAGODA, L.; WELTER, C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 391, 1989.
- MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 53, n. Pt 3, p. 240-55, 1997.
- NASS, L.L.; PEREIRA, P.A.A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: An Overview. **Crop Science**, v.97, p. 2228-2237, 2007.

- NAVAZA, J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica Section A*, v. 50, n. 2, p. 157-163, 1994.
- NELSON, D. L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: CHARLES W. CARTER, J. (Ed.). *Methods in Enzymology*: Academic Press, v. Volume 276, 1997. p.307-326. ISBN 0076-6879.
- PAËS, G.; BERRIN, J.-G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 564–592, 2012.
- PRIVALOV, P.L.;POTEKHIN, S.A. Scanningmicrocalorimetry in studying temperature- induced changes in proteins. *Methods in Enzymology*, v. 131, p. 4- 51, 1986.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 6. ed. Guanabara Koogan S. A., 2001. 906 p.
- SINGH, R. K.; ZHANG, Y.-W.; NGUYEN, N.-P.-T.; JEYA, M.; LEE, J.-K. Covalent immobilization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, n. 2, p. 337–344, 2011.
- RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Terceira Edição: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- SANTOS, C. R. ; HOFFMAM, Z. B. ; MARTINS, V. P. D. M. ; ZANPHORLIN, L. M. ; ASSIS, L. H. D. P. ; HONORATO, R. V. ; OLIVEIRA, P. S. L. D. ; RULLER, R. ; MURAKAMI, M. T. . Molecular mechanisms associated with xylan degradation by Xanthomonas plant pathogens. *The Journal of Biological Chemistry (Print)*, v. 289, p. 32186-200, 2014.
- SANTOS, C.A.; ZANPHORLIN, L.M.; CRUCELLO, A.; TONOLI, C.C.C; RULLER, R.; HORTA, M.A.C.; MURAKAMI, M.T.; SOUZA, A.P. Crvstal Structure and Biochemical Characterization of a GH1  $\beta$ -glucosidase Overexpressed in *Trichoderma harzianum* Under Biomass Degradation Conditions. *Biotechnology for Biofuels*. Aceito. 2016.
- SCHNEIDER, T. R.; SHELDRIK, G. M. Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, v. 58, n. Pt 10 Pt 2, p. 1772-9, 2002.
- SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J*, v. 76, n. 6, p. 2879-86, 1999.
- SEGATO, F.; DAMASIO, A.R.L.; GONÇALVES, T.A.; MURAKAMI, M.T.; SQUINA, F.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; MORT, A.J.; PRADE, R.A. Two structurally discrete GH7-cellobiohydrolases compete for the same cellulosic substrate fiber. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, p. 21, 2012.
- SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, n. Pt 6, p. 1583–1587, 2007.
- SHELDRIK, G. M. Macromolecular phasing with SHELXE. *Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials*, v. 217, n. 12-2002, p. 644-650, 2002.
- SILVA, T. M. DA; PESSELA, B. C.; SILVA, J. C. R. DA; LIMA, M. S.; JORGE, J. A.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. D. L. T. M. Immobilization and high stability of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 104, p. 95–100, 2014.
- SMALAS, A. O., LEIROS, H. K., Os, V. & Willassen, N. P. Cold adapted enzymes. *Biotechnology annual review* 6, 1-57, 2000.
- SOCCOL, C.R.; VANDERBERGHE, L.P.D.S.; MADEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; SILVA BON, E.P.D.; MORAES, L.M.P.D.; ARAÚJO, J.D.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.
- SPAHN, C.; MINTEER, S. D. Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent Patents on Engineering*, v. 2, n. 3, p. 195–200, 2008
- TEXTOR, L.C.; COLUSSI, F.; SILVEIRA, R.L.; SERPA, V.; MELLO, B.L.; MUNIZ, J.R.C.; SQUINA, F.M.; PEREIRA JR, N.; SKAF, M.S.; POLIKARPOV, I. Joint X-ray crystallographic and molecular dynamics study of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum*: deciphering the structural features of cellobiohydrolase catalytic activity. *FEBS Journal*, v. 280, p. 56–69, 2013.
- VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, v. 66, n. Pt 1, p. 22-5, 2010.
- WERNIMONT, A.; EDWARDS, A. In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update. *PLoS One*, v. 4, n. 4, p. e5094, 2009.
- ZANPHORLIN LM, DE GIUSEPPE PO, HONORATO RV, TONOLI CC, FATTORI J, CRESPIE E, DE OLIVEIRA PS, RULLER R, MURAKAMI MT. Oligomerization as a strategy for cold adaptation: Structure and dynamics of the GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *Sci Rep*. v. 31;6:23776, 2016.

