



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE UMA β -
GLICOSIDASE OBTIDA DO METAGENOMA DE INTESTINO DE
*Syntermes wheeleri***

RAUL ALCÂNTARA TEIXEIRA LIMA

BRASÍLIA-DF

2019

RAUL ALCÂNTARA TEIXEIRA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE UMA β -
GLICOSIDASE OBTIDA DO METAGENOMA DE INTESTINO DE
*Syntermes wheeleri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger

BRASÍLIA-DF

2019

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me deu a força espiritual para vencer o dia a dia. Que toda a honra e glória sejam dadas a Ele, por intermédio do seu filho Jesus Cristo. Em segundo lugar gostaria de dedicar a minha mãe e irmã, Marta Dias Teixeira e Erica Mônica Teixeira Moreira, respectivamente, por sempre acreditarem em mim e me incentivar a seguir meus sonhos. E por último dedico àqueles que de uma forma ou outra sempre estão ao meu lado também me incentivando e dando força a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger primeiramente por ter me aceitado como orientando no Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana. Sou grato por nesses dois anos ter me mostrado como deve ser um grande Professor Pesquisador, tanto em laboratório quanto em sala de aula. Por me incentivar a sempre estar evoluindo enquanto aluno e pesquisador. Pelo incentivo a sempre estar participando de eventos científicos relacionados ao meu trabalho. E por sempre fazer o possível e impossível para oferecer aos seus alunos as melhores condições de trabalho.

Agradeço a todos os professores da minha grade curricular de mestrado, por meio dos quais aprendi das mais diversas áreas. E em especial às Professoras Janice De Marco e Eliane Noronha, das quais aprendi muito sobre Enzimologia, que fez parte do meu trabalho de mestrado.

Aos técnicos que nos proporcionaram o total apoio desde a preparação de soluções até o aprendizado de um equipamento necessário na realização de um experimento. Sem eles provavelmente não conseguiria ter feito um bom trabalho.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de cursar um Mestrado e, além disso, poder usufruir das mais diversas instalações.

Agradeço imensamente aos meus amigos de laboratório, que me acolheram tão bem desde o início e me ensinaram muitas das atividades aprendidas. Em especial Samuel Dias, Juliana Peixoto, Carla Vizzotto, Thais Freitas, Paula Istvan, Fabyano Lopes, Jéssica Pinheiro, Alonso, Jovane Dantas, Gabrielle Rosa, Leonardo Luz, Helena Ipê, Otávio e Thiago Bruce.

Agradeço em especial Gideane Mendes, Amanda Souza e Aisel Garay, alunos do Prof. João Alexandre e Sônia Freitas, do departamento de Biofísica, os quais foram fundamentais nos resultados deste trabalho.

Agradeço imensamente a Deus e a minha família, que foram o melhor consolo nesses dois anos de graduação. Aguentaram dúvidas e reclamações como ninguém. Sem vocês nada disso seria possível. Muito obrigado por tudo.

“Dando sempre graças por tudo a nosso
Deus e Pai, em nome de nosso Senhor
Jesus Cristo”.

Efésios 5:20 – Bíblia Sagrada Almeida Revista e Corrigida.

RESUMO

LIMA, RAT. “Caracterização bioquímica e biofísica de uma β -glicosidase obtida do metagenoma de intestino de *Syntermes wheeleri*”. 84f. Dissertação de mestrado – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

As celulasas são enzimas da família Glicosil hidrolases (GHs) que estão envolvidas na degradação da celulose e participam em diversas aplicações biotecnológicas. Neste estudo foram selecionadas sequências metagenômicas do intestino de *Syntermes wheeleri*, um cupim endêmico do Cerrado brasileiro, para seleção, purificação e caracterização de uma celulase. Entre as sequências selecionadas e produzidas em *Escherichia coli* (DE3) foi escolhida apenas uma para o trabalho, uma β -glicosidase GH3 (β -G 72-26) que apresentou melhor produção em relação às outras (β -1,4-endoglucanase e exoglucanase). A β -G 72-26 foi purificada por cromatografia de exclusão molecular, apresentando tamanho aproximado de 89,7 KDa em gel SDS-PAGE 12%. A enzima foi caracterizada quanto ao pH e temperatura ótimo, quando pode-se observar duas faixas de pH ótimo, pH 7,0 e 10,0, e uma temperatura ótima de 40 °C. Por meio dos parâmetros cinéticos pode-se constatar melhor atividade enzimática em pH básico, contudo melhor afinidade (K_m) pelo substrato pNPG em pH neutro. Além disso, em pH neutro a β -G 72-26 apresentou melhor eficiência catalítica (K_{cat}/K_m). Os resultados de dicróismo circular mostraram que a estrutura secundária da enzima é dependente de pH, com porcentagens diferentes de estruturas alfa hélice e folhas beta, apresentando-se mais estruturada em pH 10,0. Já nos resultados de termoestabilidade pode-se observar a desnaturação da β -G 72-26 em ambos os pHs, menos em pH ácido (4,0). Ainda como análise estrutural, a β -glicosidase em estudo foi alinhada com sequências estruturadas do PDB (*Protein Data Bank*) para análises de domínios e sítios catalíticos conservados, quando constatou-se a presença de 3 domínios: (1) $(\alpha/\beta)_8$ -barril (TIM barril), (2) $(\alpha/\beta)_6$ folha (β -sanduíche) e (3) Fibronectina iii, com função ainda desconhecida. Os sítios catalíticos conservados foram os Asp233 e Glu417. Por meio dos resultados obtidos a β -G 72-26 mostra-se uma candidata a ensaios de aplicação industrial, além de contribuir para a caracterização de uma nova β -glicosidase GH3, a qual pertence a um cupim endêmico no Cerrado brasileiro.

Palavras Chaves: β -glicosidase, metagenoma, cupim, *Syntermes wheeleri*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica da distribuição global de biomassa por táxons.....	14
Figura 2. Visão geral dos métodos utilizados para a descoberta de novos genes por metagenoma.....	15
Figura 3. Esquema ilustrativo representando o intestino dos cupins e as enzimas celulasas agindo na lignocelulose.....	17
Figure 4. Os operários do cupim neotropical <i>Syntermes wheeleri</i>	18
Figura 5. Estrutura da parede celular vegetal.....	19
Figura 6. Estrutura da celulose.....	20
Figura 7. Ilustração esquemática dos tipos de hemicelulose encontrados nas paredes celulares dos vegetais.....	21
Figura 8. Tipos propostos de ligações covalentes entre lignina e carboidratos.....	22
Figura 9. Estrutura da Lignina.....	22
Figura 10. Esquema ilustrativo da atuação das enzimas celulasas.....	24
Figura 11. Quantidade de sequências celulasas antes e depois das edições.....	39
Figura 12. DNA plasmidial de cepas EPI300 e BL21 (DE3) transformadas.....	40
Figura 13. Gel SDS-PAGE de proteínas celulasas produzidas por indução com IPTG.....	41
Figura 14. Teste de solubilidade da β -G 72-26.....	42
Figura 15. Otimização da produção da β -G 72-26.....	42
Figura 16. Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (<i>HisTag</i>).....	43
Figura 17. Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (<i>HisTag</i>) em condições desnaturantes.....	44

Figura 18. Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes.....	45
Figura 19. Coeficiente de extinção molar experimental da β -G 72-26.....	46
Figura 20. Curva padrão de <i>p-Nitrophenyl</i> (pNP).....	47
Figura 21. Efeito da concentração da enzima β -G 72-26 na reação enzimática.....	48
Figura 22. Efeito do pH na atividade da β -G 72-26.....	49
Figura 23. Efeito da temperatura na atividade da β -G 72-26.....	49
Figura 24. Curva de Michaelis-Menten da β -G 72-26 em pH 7.....	50
Figura 25. Curva de Michaelis-Menten da β -G 72-26 em pH 10.....	51
Figura 26. Análise da estrutura secundária da β -G 72-26.....	52
Figura 27. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da β -G 72-26.....	53
Figura 28. Alinhamento múltiplo do domínio 1 da β -G 72-26 com sequências do PDB e não-redundantes.....	54
Figura 29. Alinhamento múltiplo do domínio 2 da β -G 72-26 com sequências do PDB e não-redundantes.....	55
Figura 30. Árvore filogenética com sequências da Família GH5.....	71
Figura 31. Árvore filogenética com sequências da Família GH9.....	72
Figura 32. Árvore filogenética com sequências da Família GH3.....	73
Figura 33. Plasmídeo pET24a (+) com o gene da β -1,4-endoglucanase (P12_assembly_scaffold_51_20).....	82
Figura 34. Plasmídeo pET24a (+) com o gene da exoglucanase (WG1_assembly_scaffold_8574_2).....	83
Figura 35. Plasmídeo pET24a (+) com o gene da β -glicosidase (P33_assembly_scaffold_72_26).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Famílias GH anotadas para as três enzimas celulases.....	39
Tabela 2. Sequências escolhidas para serem inseridas no plasmídeo pET24a (+).....	40
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da β -G 72-26 em pH 7 e 10.....	51
Tabela 4. Perfil de estrutura secundária da enzima β -G 72-26 em diferentes pHs obtido por deconvolução dos espectros dicróicos no servidor CDNN.....	52
Tabela 5. Sequências de endoglucanases após edições no GENEIOUS.....	74
Tabela 6. Sequência de exoglucanase após edições no GENEIOUS.....	75
Tabela 7. Sequências de β -glucosidases após edições no GENEIOUS.....	76/77
Tabela 8: Preparação de um tampão de amostra 2X.....	80
Tabela 9: Preparação de gel SDS-PAGE.....	80
Tabela 10: Preparação de tampão de corrida 5X para gel de SDS-PAGE.....	10
Tabela 11: Preparação de solução corante para gel de SDS-PAGE.....	81
Tabela 12: Preparação de solução descorante para gel de SDS-PAGE.....	81

LISTA DE SIGLAS

µg: micrograma

µL: microlitros

µM: micromolar

cm – centímetro

DNA: ácido desoxirribonucleico

EC: *Enzyme Commission*

GH: Glicosil hidrolase

Gt C - Gigatoneladas de carbono

IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

kDa: kiloDalton

LB: *Meio Luria-Bertani*

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

nM: nanomolar

°C: graus Celsius

pNP - *p-Nitrophenyl*

pNPG - *p-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside*

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

x g: força da gravidade

SUMÁRIO

1.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Bioprospecção de microrganismos e a metagenômica.....	14
1.1.1 Bioprospecção de cupins para enzimas celulases	16
1.1.2 Cupim <i>Syntermes wheeleri</i>	18
1.2 Biomassa lignocelulósica – fonte de alimento dos cupins.....	19
1.2.1 Celulose.....	20
1.2.2 Hemiceluloses	21
1.2.3 Lignina	22
1.3 Enzimas capazes de degradar carboidratos (<i>CAZymes</i>).....	23
1.3.1 Classificação das celulases como Glicosil hidrolases (GHs).....	23
1.3.2 Enzimas celulases	24
1.4 β -glicosidases	25
1.4.1 Aplicações das β -glicosidases	25
2.0 JUSTIFICATIVA	27
3.0 OBJETIVOS	28
4.0 METODOLOGIA	29
4.1 Seleção de enzimas celulases a partir de sequências metagenômicas de Intestino de <i>Syntermes wheeleri</i>	29
4.2 Alinhamentos, anotação de famílias e construção de árvores filogenéticas	29
4.3 Seleção de sequências a serem sintetizadas	30
4.4 Transformações de cepas <i>Escherichia coli</i> EPI300 e BL21(DE3) e extração de DNA plasmidial	30
4.5 Indução por IPTG para verificação de síntese proteica	31
4.6 Produção, purificação e caracterização da β -glicosidase 72-26 em sistema de expressão heteróloga <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	32
4.6.1 Produção da β -glicosidase 72-26 (β -G 72-26) e teste de solubilidade	32
4.6.2 Análise da expressão e solubilidade por SDS-PAGE	32
4.6.3 Otimização da produção da β -G 72-26.....	33
4.6.4 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (<i>HisTag</i>)	33
4.6.5 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (<i>HisTag</i>) em condições desnaturantes	34

4.6.6	Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes	34
4.7	Caracterização físico-química da β -G 72-26	35
4.7.1	Determinação do Coeficiente de extinção molar	35
4.8	Caracterização enzimática da β -G 72-26	35
4.8.1	Curva padrão de <i>p</i> -Nitrophenyl (pNP)	35
4.8.2	Efeito da concentração da enzima β -G 72-26 na reação enzimática	36
4.8.3	Efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima β -G 72-26	36
4.8.4	Efeito da temperatura na atividade da enzima β -G 72-26	37
4.8.5	Determinação dos parâmetros cinéticos da β -G 72-26 a partir da curva de Michaelis-Menten	37
4.9	Caracterização biofísica da β -G 72-26	37
4.9.1	Análise de estrutura secundária e estabilidade estrutural por Dicroísmo Circular da β -G 72-26	37
4.9.2	Alinhamento da β -G 72-26 com sequências estruturadas e análise de domínios	38
5.0	RESULTADOS	39
5.1	Seleção de enzimas celulasas a partir de sequências metagenômicas de Intestino de <i>Syntermes wheeleri</i>	39
5.2	Transformações de cepas <i>Escherichia coli</i> EPI300 e BL21(DE3) e extração de DNA plasmidial	40
5.3	Indução por IPTG para verificação de síntese proteica	41
5.4	Produção, purificação e caracterização da β -glicosidase 72 26 em sistema de expressão heteróloga <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	41
5.4.1	Análise da expressão e solubilidade por SDS-PAGE	41
5.4.2	Otimização da produção da β -G 72-26	42
5.4.3	Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (<i>HisTag</i>)	43
5.4.4	Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (<i>HisTag</i>) em condições desnaturantes	43
5.4.5	Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes	44
5.5	Caracterização físico-química da β -G 72-26	46
5.5.1	Determinação do Coeficiente de extinção molar	46
5.6	Caracterização enzimática da β -G 72-26	47

5.6.1 Curva padrão de <i>p</i> -Nitrophenyl (pNP).....	47
5.6.2 Efeito da concentração da enzima β -G 72-26 na reação enzimática.....	47
5.6.3 Efeito do potencial Hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima β -G 72-26	48
5.6.4 Efeito da temperatura na atividade da enzima β -G 72-26	49
5.6.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da β -G 72-26 – curva Michelis- Menten.....	50
5.7 Caracterização biofísica da β -G 72-26.....	51
5.7.2 Análise de estrutura secundária e estabilidade estrutural por Dicroísmo Circular	51
5.7.1 Alinhamento da β -G 72-26 com sequências estruturadas e análise de domínios	53
.....	55
6.0 DISCUSSÃO	56
7.0 CONCLUSÃO	64
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9.0 APÊNDICE	71
10.0 ANEXOS – Metodologia	78
11.0 ANEXOS – Participações em Eventos Científicos.....	84

1.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Bioprospecção de microrganismos e a metagenômica

A bioprospecção é definida como a exploração da biodiversidade para recursos bioquímicos e genéticos comercialmente valiosos para alcançar objetivos econômicos e de conservação. Para atender a esses propósitos, a diversidade existente de microrganismos pode atuar como um reservatório de recursos a partir do qual espécies individuais com características especiais podem ser exploradas (DIONISI; LOZADA; OLIVERA, 2012).

Um dos esforços mais fundamentais da biologia tem sido descrever a composição do mundo vivo. Séculos de pesquisa produziram uma imagem cada vez mais detalhada das espécies que habitam nosso planeta e seus respectivos papéis nos ecossistemas globais. Os microrganismos concentram a segunda maior biomassa mundial ficando atrás somente das plantas, sendo que as bactérias, os fungos e as Archaeas são os maiores representantes com um total de 70, 12 e 7 Gigatoneladas de carbono (Gt C), respectivamente (Figura 1) (BAR-ON et al., 2018).

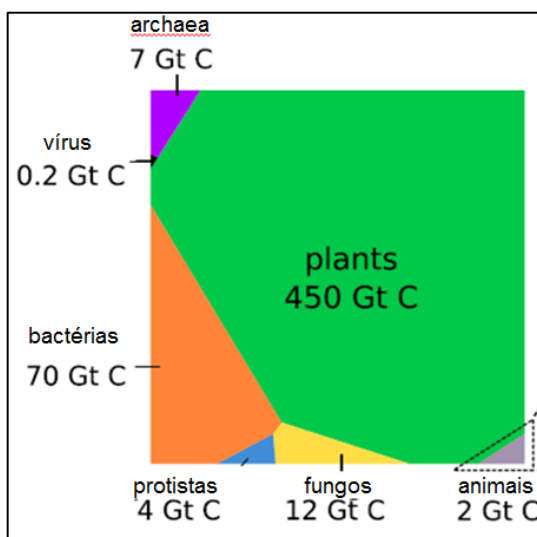


Figura 1. Representação gráfica da distribuição global de biomassa por táxons. Biomassas absolutas de diferentes táxons são representadas usando um diagrama de Voronoi, com a área de cada célula sendo proporcional à taxa global de biomassa (a forma específica de cada polígono não tem significado). Gt C (gigatoneladas de carbono). Adaptado de (BAR-ON et al., 2018).

O estudo dos microrganismos geralmente é realizado por técnicas de cultivo em laboratório, contudo, apenas 0,01 a 1% pode ser considerado cultivável sobre

estas condições. Com o passar dos anos muitas técnicas surgiram a fim de aperfeiçoar as análises sobre seres “não cultiváveis”, ou melhor dizendo, aqueles de difícil cultivo. A metagenômica, que estuda o DNA total de uma comunidade microbiana, tem sido amplamente utilizada na bioprospecção a fim de alcançar o potencial de milhares de espécies que residem no ecossistema natural (RAVIN et al., 2015). Essa abordagem tem possibilitado a descoberta de novos genes originários de microrganismos “não cultiváveis” que codificam enzimas com características bioquímicas e biofísicas que justificam a utilização destas moléculas na indústria (COWAN et al., 2005).

As análises metagenômicas são realizadas com base em sequências gênicas ou função biológica (ou uma combinação de ambos) para estudar uma comunidade microbiana complexa (Figura 2) (CULLIGAN *et al.*, 2016).

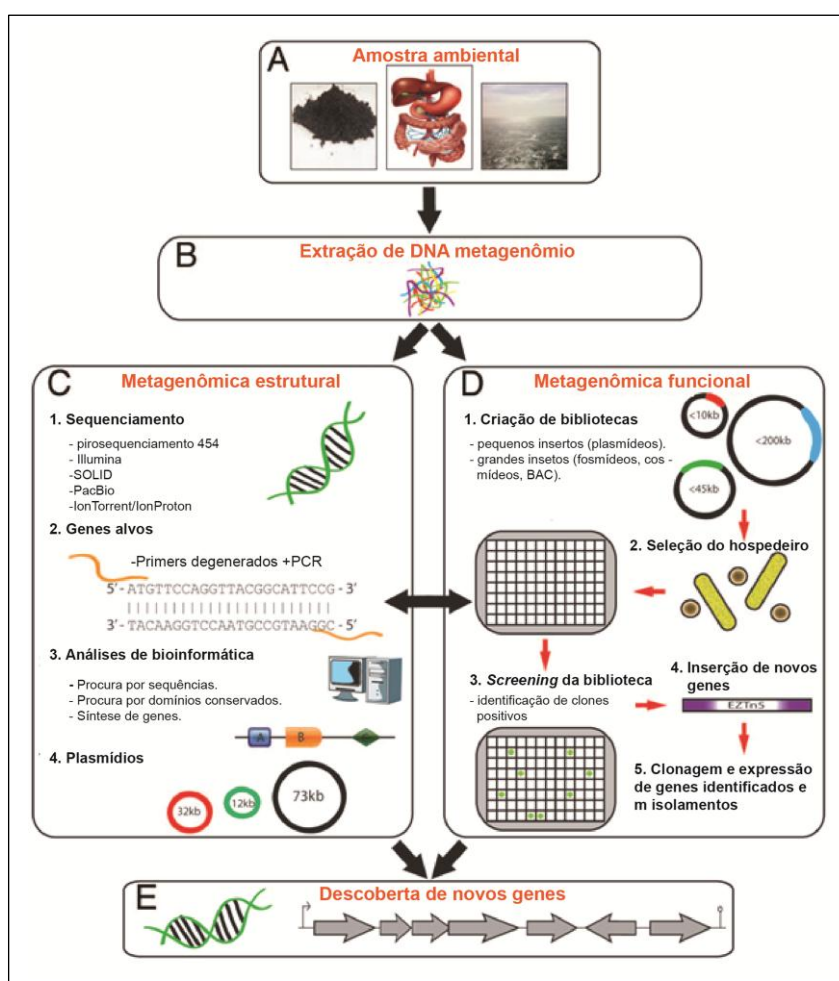


Figura 2. Visão geral dos métodos utilizados para a descoberta de novos genes por metagenoma. (A) Coleta da amostra (solo, intestino, água, por exemplo), **(B)** Isolamento do DNA metagenômico, **(C)** Metagenômica baseada no sequenciamento do DNA metagenômico seguido por análises de bioinformática e síntese de genes para expressão **(D)** Metagenômica funcional e a criação de bibliotecas utilizando vetores específicos (plasmídeos, fosmídeos, cosmídeos ou cromossomo artificial bacteriano [BAC], por exemplo) seguido por seleção de atividade, clonagem e expressão **(E)** Descoberta de novos genes. Adaptado de (CULLIGAN *et al.*, 2016).

A metagenômica estrutural é de caráter mais descritivo da amostra coletada, como estrutura da comunidade, a diversidade microbiana e abundância. Além disso, o sequenciamento de metagenômica usando tecnologias NGS (*Next-Generation Sequencing*) seguidas de anotação, pesquisas de homologia e agrupamento filogenético possibilitam descobrir genes que são mais divergentes e mais interessantes do que os genes consensos com sequências conhecidas usadas para sintetizar sondas ou iniciadores para estudos iniciais focados em genes (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

A metagenômica funcional envolve o isolamento de DNA de comunidades microbianas para estudar as funções de proteínas codificadas. Neste processo, fragmentos de DNA, são clonados e genes expressos em um hospedeiro substituto, seguido da triagem de atividades enzimáticas. O uso dessa abordagem baseada na função permite a descoberta de novas enzimas cujas funções não seriam previstas com base apenas na sequência do DNA. As informações de análises baseadas em função podem então ser usadas para anotar genomas e metagenomas derivados somente de análises baseadas em sequências (LAM et al., 2015).

1.1.1 Bioprospecção de cupins para enzimas celulases

Os cupins são encontrados em todos os continentes, exceto na Antártida, sendo mais abundantes nos trópicos e subtropicais. Eles são pequenos insetos, mas a combinação de sociabilidade com capacidade de digerir eficientemente a lignocelulose levou-os a um grande sucesso evolutivo (BRUNE, 2014). Os cupins consomem de 3 a 7 bilhões de toneladas de materiais lignocelulósicos por ano e, portanto, representam um dos mais prolíficos e eficientes decompositores de lignocelulose da Terra (Figura 3) (TOKUDA et al., 2014). Embora essa capacidade de digerir a lignocelulose os torne uma praga notória de estruturas de madeira, eles também são reconhecidos como eficientes “biorreatores” e uma fonte potencial de enzimas de processamento de biomassa para a produção de biocombustíveis e biomateriais a partir de biomassa vegetal (SCHARF; BOUCIAS, 2010).

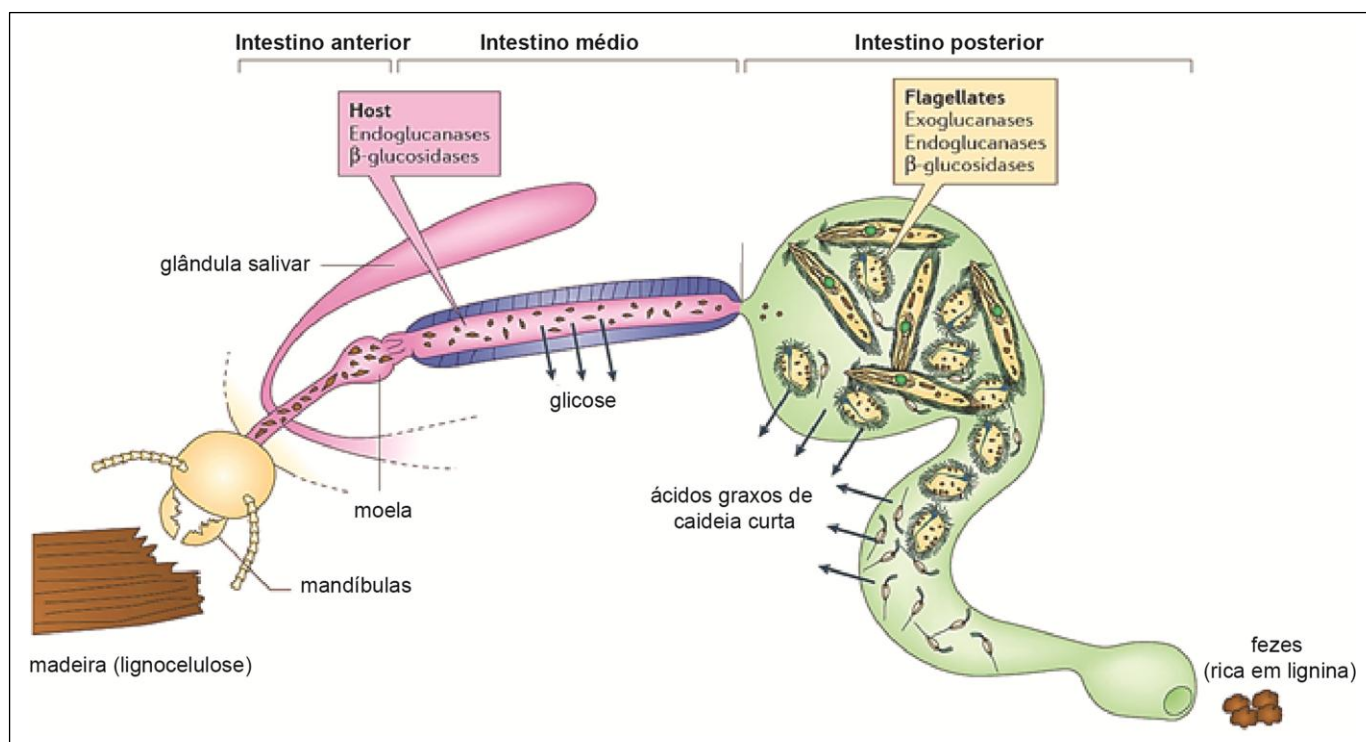


Figura 3. Esquema ilustrativo representando o intestino dos cupins e as enzimas celulases agindo na lignocelulose. Os cupins são divididos da boca ao ânus em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. A glicose liberada no intestino médio é absorvida ali mesmo pelo epitélio, enquanto a madeira pré-digerida segue para o intestino posterior, onde nos cupins inferiores receberá a ação enzimática de protozoários flagelados e nos superiores de bactérias. Adaptado de (BRUNE, 2014).

A digestão de polissacarídeos da parede celular por cupins é um processo altamente coordenado alcançado pelo hospedeiro dos cupins e seus simbiontes microbianos residentes no intestino. Nos chamados cupins inferiores que abrigam protistas flagelados em seus intestinos, a degradação da celulose é efetivamente alcançada com a ajuda de uma variedade de enzimas celulolíticas fornecidas pelos protistas do intestino posterior, enquanto nos chamados cupins superiores sem protistas intestinais, diversos simbiontes intestinais procarióticos bem como os ocasionais fungos ectossimbióticos, realizam um processo celulolítico eficiente (BRUNE, 2014).

Muitos genes que codificam enzimas que degradam a lignocelulose foram caracterizados a partir de microrganismos de cupins, contudo a maioria deles foram isolados de microrganismos de cultura. O perfil de filogenia 16S rRNA de amostras de intestino de cupins superiores revelou famílias altamente diversas de bactérias, incluindo várias espécies consideradas não cultiváveis. Com isso, as bactérias não cultiváveis em intestino de cupim tornam-se uma fonte potencial para a descoberta

de novos genes que codificam enzimas que hidrolisem a lignocelulose (NIMCHUA et al., 2012).

1.1.2 Cupim *Syntermes wheeleri*

O *Syntermes wheeleri* é uma espécie neotropical de cupim que faz parte da família dos Termitidae (Syntermitinae), os quais se alimentam de serapilheira (folhas secas) e se destacam pelo seu tamanho, com o soldado de *S. wheeleri* medindo aproximadamente 2 cm, enquanto o soldado da maioria das espécies mede de 0,3 a 1 cm. Os operários da espécie são divididos em dois instares: o terceiro cujos operários possuem cabeça clara e o quarto cujos operários possuem cabeça escura, como pode ser visto na Figura 4 (CONSTANTINO, 1995).

Os operários são os responsáveis pela digestão e alimentação dos outros componentes da colônia. Os membros do quarto instar forrageiam, principalmente à noite, coletando folhas mortas que são armazenadas dentro do cupinzeiro e servem para alimentação de ambos os instares. O intestino dessa espécie é dividido em faringe, esôfago, papo, moela, mesêntero, segmento misto, primeiro proctodeo (P1), válvula entérica (P2), terceiro proctodeo (P3), cólon (P4) e reto (P5). No Brasil, a distribuição de *S. wheeleri* concentra-se no Cerrado (CONSTANTINO, 1995).

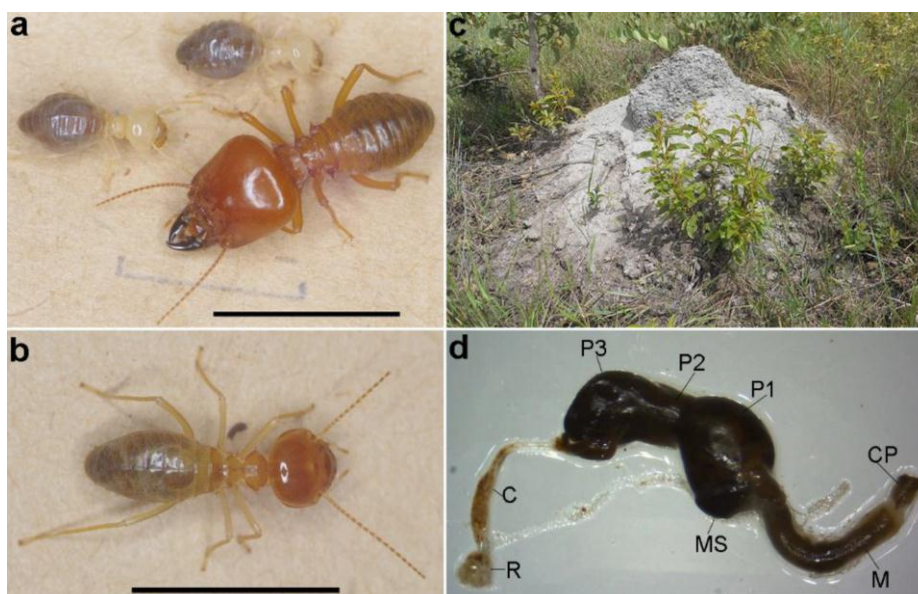


Figure 4. Os operários do cupim neotropical *Syntermes wheeleri*: (a) soldado e trabalhador de terceiro instar com cabeça branca, (b) trabalhador de quarto instar de cabeça vermelha, (c) o cupinzeiro e (d) compartimentos intestinais; papo (CP); intestino médio (M); segmento misto (MS); primeiro segmento proctodeal (P1); valva entérica (P2); terceiro segmento proctodeal (pança-P3); cólon (C); reto (R). Barras de escala, 1,0 cm em a, b e c; e 0,3 cm em d. (SANTANA et al., 2015) .

1.2 Biomassa lignocelulósica – fonte de alimento dos cupins

A biomassa lignocelulósica (BL) é o composto orgânico mais abundante na Terra e representa a maior parte da produção anual de biomassa renovável, chegando a uma produção mundial de 150 bilhões de toneladas por ano. Os carboidratos são o componente mais onipresente na BL e, portanto, são muitas vezes a matéria-prima preferida para a economia de base biológica (TAYLOR et al., 2006).

As fontes de carboidratos incluem silvicultura convencional, subprodutos do processamento de madeira (por exemplo, lascas de madeira, serragem, casca e resíduos industriais de celulose e papel, como o licor negro), culturas agrícolas e excedentes (por exemplo, palha de trigo e arroz), as chamadas culturas com potencial energético (por exemplo, *switchgrass*, *Miscanthus* e salgueiro) cultivadas em solos degradados, e a biomassa aquática, como algas e macroalgas. A matéria vegetal lignocelulósica está disponível em grandes quantidades e é relativamente barata, enquanto a biomassa aquática vem apresentando grande potencial para o futuro (JONG; GOSELINK, 2014).

Além dos carboidratos que constituem de 60 a 80%, a lignocelulose é composta de lignina (20 a 25%) e proteínas, estas principalmente em material vegetal fresco (verde). Os carboidratos presentes na biomassa vegetal são poli / oligossacarídeos, como celulose, hemiceluloses, e pectinas, os quais se encontram entrelaçados juntamente com a lignina, formando a estrutura da lignocelulose (Figura 5) (JONG; GOSELINK, 2014).

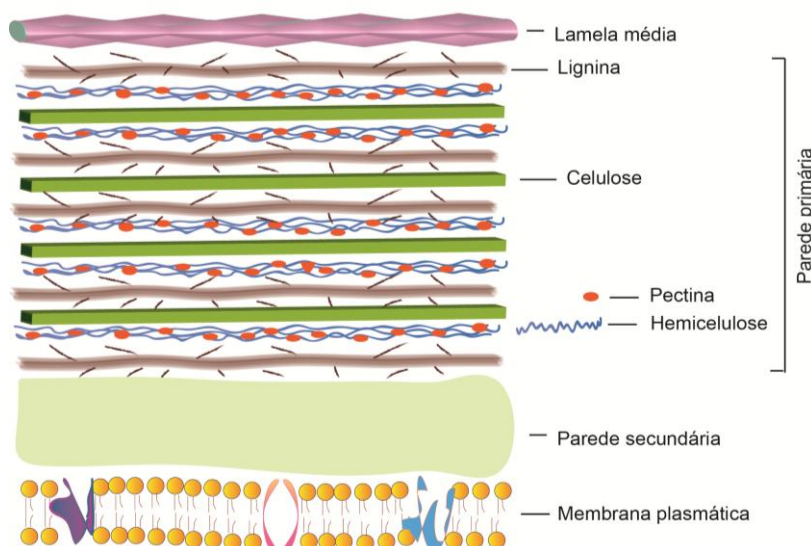


Figura 5. Estrutura da parede celular vegetal. A lignocelulose é composta de carboidratos (celulose, hemicelulose, pectina) e lignina, formando a parede primária de vegetais. Figura autoral.

1.2.1 Celulose

A celulose é o componente estrutural básico das paredes celulares das plantas e compreende cerca de um terço de todos os materiais vegetais. A celulose é um polissacarídeo complexo, consistindo em 3000 ou mais unidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 (Figura 6). Geralmente está presente na madeira em quantidades entre 40 e 50% com base na matéria seca. É o mais abundante de todos os compostos orgânicos que ocorrem naturalmente, compreendendo mais de 50% de todo o carbono na vegetação. (SINHA et al., 2011).

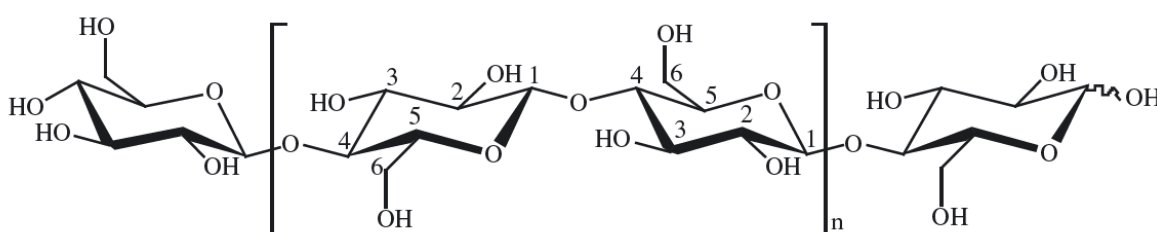


Figura 6. Estrutura da celulose. A celulose é formada por unidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β -1,4. A unidade inicial de D-glicose é composta por um carbono 4 - OH (extremidade não redutora) e a unidade final por um carbono 1 - OH (extremidade redutora) (KLEMM et al., 2005).

O grande número de grupos hidroxila na cadeia de celulose forma ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, resultando na estrutura cristalina da mesma. A celulose nativa em plantas é um composto formado por três alomorfos cristalinos: celulose I α , celulose I β e celulose para-cristalina; e ainda por duas formas não cristalinas: celulose amorfa acessível e inacessível em superfícies de fibrilas (PU et al., 2008).

A celulose I α , formada por uma unidade celular triclinica (ou seja, todos os eixos cristalográficos com ângulos diferentes de 90°) de cadeia única, é a forma dominante na celulose de bactérias e de algas, enquanto a celulose I β , uma unidade celular monoclinica (ou seja, dois eixos cristalográficos com ângulos de 90° e um diferente de 90°) de duas cadeias, é a forma dominante em plantas superiores, como a madeira. A celulose para-cristalina é uma forma menos ordenada do que a celulose I α e a celulose I β , porém mais ordenada do que a celulose amorfa (PU et al., 2008). As cadeias podem empilhar juntas para formar microfibrilas maiores, que tornam a celulose altamente insolúvel em água. Microfibrilas de celulose também podem se associar com água e polissacarídeos de

matriz, como os (1,3, 1,4)- β -D-glicanos, heteroxilanos arabinoxilanos e glicomananos. (SINHA et al., 2011).

1.2.2 Hemiceluloses

A hemicelulose é o segundo biopolímero renovável mais abundante após a celulose em materiais lignocelulósicos. Representam uma classe heterogênea de polímeros, em geral, 15 a 35% da biomassa vegetal e que podem conter pentoses (β -D-xilose e α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose e α -D-galactose) e / ou ácidos urônicos (α -D-glicurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-ácido galacturônico), como exemplificado na Figura 7. Outros açúcares como α -L-ramnose e α -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxila dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetila (PENG et al., 2012).

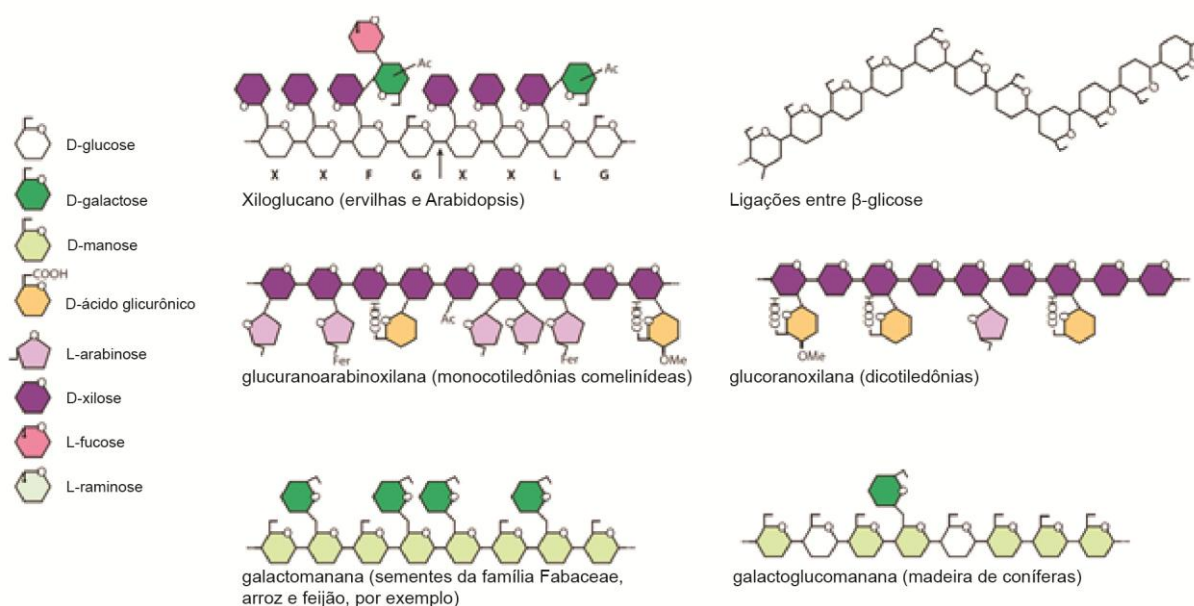


Figura 7. Ilustração esquemática dos tipos de hemicelulose encontrados nas paredes celulares dos vegetais. A hemicelulose é formada unidades de pentoses, hexoses e/ou ácidos urônicos. Adaptado de (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Além disso, a maioria dos componentes de açúcares podem participar na formação de complexos de lignina-carboidrato (LC) por ligações covalentes entre as mesmas. As ligações LC mais frequentemente sugeridas na madeira nativa são o éster benzílico, o éter benzílico e ligações glicosídicas (Figura 8) (LAWOKO; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2006).

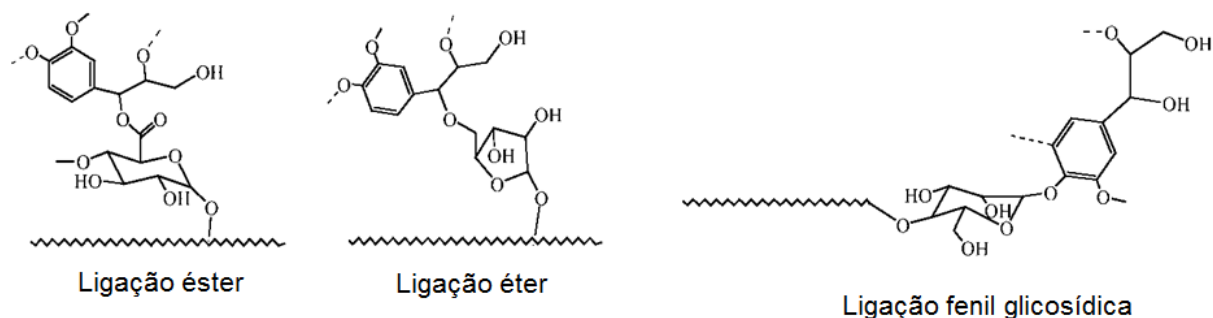


Figura 8. Tipos propostos de ligações covalentes entre lignina e carboidratos. As ligações podem ser do tipo éster, éter e fenil glicosídica. Adaptado de (LAWOKO; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2006)

1.2.3 Lignina

Depois dos carboidratos, o principal componente da biomassa lignocelulósica é a lignina. As ligninas são importantes componentes estruturais de plantas superiores e conferem à biomassa lenhosa sua estrutura mecânica e resistência ao estresse ambiental e à degradação microbiana. A lignina, cujo nome deriva da palavra latina para “madeira”, representa 15 a 30% em peso da biomassa lenhosa e também está disponível em resíduos agrícolas como palha, grama e bagaço (JONG; GOSSELINK, 2014).

As ligninas são construídas em plantas a partir de três monolignóis básicos via reações de acoplamento fenólico oxidativo para gerar o polímero de lignina (RALPH et al., 2007). A heterogeneidade dos polímeros de lignina existe na composição molecular e nos tipos de ligação entre os monômeros de fenilpropano, unidades p-hidroxifenil, guaiacil e siringil. Estes são derivados dos álcoois monolignóis sinaptil, coniferil, e coumaril, respectivamente (Figura 9). A composição da lignina é diferente não apenas entre espécies, mas também entre diferentes tecidos de uma planta individual (JONG; GOSSELINK, 2014).

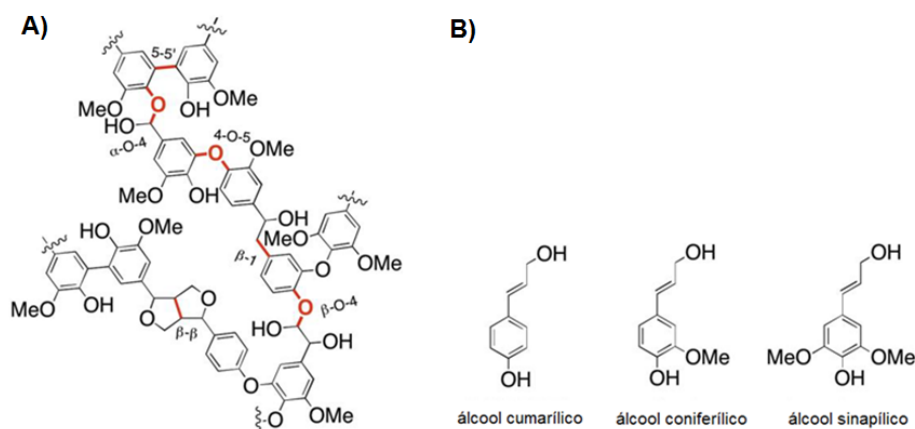


Figura 9. Estrutura da Lignina. (A) Possível estrutura da lignina com várias ligações; (B) três estruturas primárias de álcool na lignina. Adaptado de (DAI; PATTI; SAITO, 2016).

1.3 Enzimas capazes de degradar carboidratos (CAZymes)

Apesar da composição química similar, os carboidratos podem formar um grande número de combinações por meio da variedade estereoquímica dos grupos hidroxila que carregam, por meio das diferentes possibilidades de montar monossacarídeos entre si e por meio da riqueza de substituintes não-carboidratos que podem compor os oligo e polissacarídeos resultantes. Os carboidratos complexos são amplamente distribuídos na natureza, quando desempenham uma infinidade de funções biológicas, desde reserva de carbono até a composição de moléculas estruturais, ou como mediadores do reconhecimento intra e intercelular dentro de um organismo ou entre organismos (HUANG et al., 2018).

A diversidade de carboidratos complexos é controlada por um conjunto de enzimas envolvidas na sua montagem (Glicosil transferases - GTs), na quebra (glicosil hidrolases - GHs, polissacarídeos liases – PLs e carboidratos esterases - CEs), e também fazem parte as enzimas para as atividades auxiliares - AAs e para reconhecimento de carboidratos (módulo de ligação a carboidratos – CBM), coletivamente designadas por enzimas Carboidrato-Ativas (CAZymes). As CAZymes vem sendo classificadas em famílias baseado em sequências por mais de 22 anos e essa classificação se tornou o padrão de análise (HUANG et al., 2018).

1.3.1 Classificação das celulasas como Glicosil hidrolases (GHs)

As celulasas pertencem a um grupo amplo de enzimas chamadas glicosil hidrolases, que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre uma porção carboidrato e não-carboidrato. A classificação atual das glicosil hidrolases é baseada na similaridade de aminoácidos (HENRISSAT; BAIROCH, 1996). Uma versão atualizada desta classificação é mantida no servidor do CAZy (<http://www.cazy.org>), que é um banco de dados com informações sobre enzimas que atuam em carboidratos (CANTAREL et al., 2009).

Atualmente, as GHs estão agrupadas em 153 famílias, das quais 19 famílias (1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 26, 30, 39, 44, 45, 48, 51, 74, 116, 124 e não classificadas) contêm celulasas (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Este esquema de classificação reflete as características estruturais da enzima e é, portanto, mais informativo do que a especificidade do substrato isoladamente, uma vez que a gama

completa de substratos para enzimas individuais é somente algumas vezes determinada (GUPTA, 2016).

1.3.2 Enzimas celulasas

As celulasas são enzimas capazes de degradar a celulose pela hidrólise de ligações β -1-4 glicosídicas do polímero de celulose. A hidrólise completa da celulose em glicose requer a ação sinérgica de pelo menos três enzimas, as endoglucanases (β -1,4-endoglucanase, EC 3.2.1.4), que preferencialmente atuam em regiões amorfas e clivam aleatoriamente as ligações internas da cadeia de glicano, proporcionando assim extremidades reductoras ou não reductoras de oligossacarídeos celulares para a ação das celobiohidrolases (exoglucanase, β -1,4-celobiohidrolase, EC 3.2.1.91). Estas hidrolisam as extremidades da cadeia de glicano, produzindo celbiose como o produto principal. Por fim, as β -glicosidases (celbiase, EC 3.2.1.21) hidrolisam a celbiose (duas moléculas de glicose) em glicose e também liberam glicose das extremidades não reductoras de celo-oligossacarídeos solúveis (Figura 10) (BEHERA et al., 2016).

A hidrólise eficiente e extensiva da celulose requer a cooperação ou interações sinérgicas de sistemas enzimáticos de degradação de celulose. Segundo Coughlan et al. (1993), a sinergia é observada quando a quantidade de produtos formados por duas ou mais enzimas agindo juntas excede a soma aritmética dos produtos formados pela ação de cada enzima individual. Basicamente, a completa clivagem da celulose requer a ação conjunta entre celobiohidrolases (atuando nas extremidades reductora e não-reductora); entre endo e exoglucanases; entre endoglucanases; e entre as três (DYK; PLETSCHE, 2012).

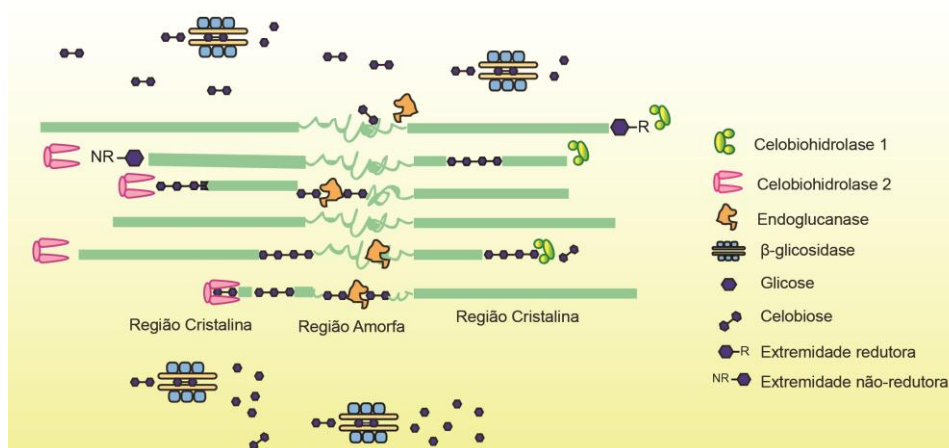


Figura 10. Esquema ilustrativo da atuação das enzimas celulasas. Representação das enzimas celulolíticas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases hidrolisando a celulose amorfa e cristalina. Figura autoral.

1.4 β -glicosidases

As β -Glicosidases clivam ligações β -D-glicosídicas de uma variedade de compostos que liberam glicose como o produto final. Assim, diferindo muito em sua especificidade de substrato particularmente no que diz respeito à porção aglicona, tornando a sua classificação um desafio (BHATIA et al., 2002). Os dois métodos amplamente aceitos para sua classificação são: 1) classificação baseada na especificidade do substrato e 2) classificação baseada na identidade das sequências nucleotídicas e na análise de agrupamento hidrofóbico (KRISCH et al., 2010.)

Com base na especificidade de substratos, as β -glicosidases são categorizadas em três classes: 1) aril- β -glicosidases hidrolisando somente ligação aril- β -glicosídicas, 2) celobiose hidrolisando apenas celobiose e 3) β -glicosidase de ampla especificidade de substratos, hidrolisando ampla gama de substratos com diferentes ligações como β (1 \rightarrow 4), β (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 6), α (1 \rightarrow 4), α (1 \rightarrow 3), e α (1 \rightarrow 6) ligação. A maioria das β -glicosidases microbianas relatadas apresentam uma ampla especificidade de substrato (RANI et al., 2013).

Com base na identidade de sequência e na análise de agrupamento hidrofóbico, as β -glicosidases são colocadas na família 1 das Glicosil Hidrolases (GHs) e na família 3 como depositado na base de dados de enzimas ativas por Carboidrato "CaZy" As β -Glicosidases pertencentes à família GH 1 são relatadas a partir de arqueobactérias, plantas e animais, enquanto as β -glicosidases pertencentes à família GH 3 são de bactérias, fungos e leveduras, embora β -glicosidase também possam ser encontrada na família 5, 9, 30 e 116 (AHMED et al., 2017).

1.4.1 Aplicações das β -glicosidases

As β -glicosidases (BGL) têm atraído atenção considerável nos últimos anos devido a seus papéis importantes em vários processos biotecnológicos, como a hidrólise de isoflavonóides glicosídeos, a produção de etanol combustível a partir de resíduos agrícolas, a liberação de compostos aromáticos de precursores insípidos, etc. As BGL são amplamente distribuídas no ecossistema e elas desempenham papéis fundamentais em vários processos biológicos. Os papéis fisiológicos associados a essa enzima são diversos e dependem da localização da enzima e do

sistema biológico em que ela ocorre. Nos microrganismos celulolíticos, a beta-glicosidase está envolvida na indução da celulase (devido às suas atividades de transglicosilação) e na hidrólise da celulose (BHATIA et al., 2002).

A hidrólise de glicosídeos de isoflavonas de soja é uma importante aplicação da BGL nas indústrias. As isoflavonas são conhecidas por prevenir certos tipos de câncer, reduzir os riscos de doenças cardiovasculares e melhorar a saúde do osso, mas foi revelado que os efeitos biológicos são devidos principalmente à forma aglicona de isoflavona em vez da sua forma glicosilada, porque o intestino absorve formas aglicona mais rápido (IZUMI et al., 2000). Devido aos seus amplos e variados papéis na natureza, essas enzimas versáteis podem ser úteis em várias reações sintéticas, conforme revisado por (RANI et al., 2013).

2.0 JUSTIFICATIVA

A celulose é o biopolímero orgânico mais abundante na biosfera e o principal constituinte de material lignocelulósico, perfazendo 35 a 50% da biomassa vegetal. A hemicelulose e a lignina são os outros dois constituintes que compõem 20-35% e 10-15%, respectivamente. Esta biomassa é conhecida por ser renovável com uma produção anual de aproximadamente 1×10^{10} toneladas, e ser fonte de energia sustentável e barata (AMEDH et al., 2017).

As celulasas são as enzimas responsáveis pela degradação da celulose, sendo divididas em β -1,4-endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidases, as quais atuam em sinergismo. Essas enzimas têm sido utilizadas mundialmente nas indústrias para as mais diversas aplicações, como indústria de algodão e papel, detergentes, extração de sucos, aditivos para ração animal, extração de compostos químicos como flavonoides, produção de etanol de segunda geração entre outras, garantindo um grande mercado financeiro para essas enzimas (GUPTA, 2016).

Além disso, a ocorrência de grande quantidade de material celulósico que é produzido todos os anos, a procura por novas enzimas celulasas que possam apresentar características novas, como termoestabilidade e pH extremos, por exemplo, torna-se de grande interesse na pesquisa. Para isso, neste trabalho nós utilizamos o metagenoma da microbiota intestinal de cupim, mais especificamente de *Syntermes wheeleri*, para a bioprospecção de enzimas celulasas, uma vez que os cupins são um dos maiores responsáveis mundialmente por fazerem a degradação da biomassa lignocelulósica (TOKUDA, 2014). O isolamento e caracterização bioquímica e biofísica dessas enzimas e a comparação com outras já caracterizadas, são os objetivos deste trabalho, além de verificar possibilidade de aplicações biotecnológicas destas enzimas.

3.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Identificar, isolar e caracterizar uma enzima celulolítica bacteriana a partir do metagenoma de intestino de *Syntermes wheeleri*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar as sequências de enzimas celulases (β -1,4-endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidases) do metagenoma de *Syntermes wheeleri*;
- b) Fazer análises de bioinformática com essas sequências e selecionar uma β -1,4-endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidases para síntese em plasmídeo de expressão pET24a (+);
- c) Expressar os genes dessas enzimas em *Escherichia coli* (DE3) utilizando IPTG;
- d) Selecionar a enzima que apresentar melhor produção;
- e) Purificar a enzima selecionada;
- f) Caracterizar a enzima quanto ao pH e temperatura ótimos;
- g) Caracterizar a enzima quanto a cinética enzimática;
- h) Analisar o efeito da temperatura e pHs na estrutura secundária da enzima, por Dicroísmo Circular (CD);
- i) Analisar a termoestabilidade da enzima em diferentes pHs por Dicroísmo Circular (CD);
- j) Anotar domínios e sítios catalíticos conservados da enzima.

4.0 METODOLOGIA

4.1 Seleção de enzimas celulases a partir de sequências metagenômicas de Intestino de *Syntermes wheeleri*

A seleção de sequências metagenômicas com função de enzimas celulases foi a etapa inicial para a elaboração do projeto. A extração do metagenoma da microbiota do intestino de cupim foi obtida a partir de um trabalho anterior (SANTANA, 2015), quando o DNA total do intestino de *Syntermes wheeleri* foi extraído e sequenciado. Esses dados gerados foram tratados em uma plataforma, denominada de *ggKbase* (<https://ggkbase.berkeley.edu/>), pertencente à Universidade de Berkeley nos Estados Unidos.

Nesse programa foram desenvolvidas montagens de genomas a partir das sequências de metagenoma, foram anotados dados de taxonomia e foram feitas identificação de função gênica, por exemplo. A seleção das sequências de interesse, ou seja, aquelas capazes de produzir enzimas celulases, foi conduzida utilizando o número EC de cada enzima: β -1,4-endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), sendo todas as sequências selecionadas para o organismo bactéria. Essas foram extraídas no modelo de arquivo FASTA *protein* e então transferidas para uma plataforma de análises de bioinformática, GENEIOUS (<https://www.geneious.com/>).

4.2 Alinhamentos, anotação de famílias e construção de árvores filogenéticas

As sequências de proteínas importadas para o GENEIOUS foram agrupadas em pastas distintas e nomeadas conforme o nome referente a cada enzima. Após isso, essas sequências foram submetidas a um alinhamento múltiplo utilizando o *MAFFT alignment*.

A partir dos resultados obtidos foram realizadas edições para eliminar algumas sequências, como aquelas que possuíam menos de 200 aminoácidos (aa), não apresentavam códons de iniciação e terminação e ainda foram eliminadas aquelas que prejudicavam a cobertura do alinhamento, apresentando, por exemplo, muitos *gaps*. A cada deleção de sequências estas foram submetidas a um novo

alinhamento, de forma a sempre obter um novo perfil para comparações e análises de qualidade.

Posteriormente, cada grupo de sequências proteicas foi submetido a uma análise no *BLAST protein-protein NCBI* pelo próprio GENIOUS a fim de identificar as famílias. Após isso, conhecendo as famílias foi feita uma pesquisa por sequências em bancos curados como o CAZy e o UniProt e também em artigos científicos com o propósito de alinhá-las com as sequências metagenômicas. Esse alinhamento foi realizado utilizando o *MAAFT alignment* e, por conseguinte as árvores filogenéticas utilizando o *FastTree*, também no GENIOUS.

4.3 Seleção de sequências a serem sintetizadas

A seleção das sequências a serem sintetizadas foi realizada por meio da construção de tabelas referentes a cada enzima, as quais possuem informações como, famílias, filos, organismos, identidade, integridade do genoma e metatranscriptoma. A partir desse quadro foram selecionadas três sequências, uma endoglucanase, uma exoglucanase e uma β -glicosidase. Os resultados de metatranscriptoma foram os fatores determinantes na escolha final das sequências enviadas à empresa *GenOne Soluções em Biotecnologia* para serem sintetizadas (<http://www.genone.com.br/>).

A empresa fez a otimização de códons para expressão em *Escherichia coli* e também a remoção de sítios de restrição indesejados no meio da sequência. Os genes foram sintetizados em plasmídeos pET24a (+) e liofilizados para entrega.

4.4 Transformações de cepas *Escherichia coli* EPI300 e BL21(DE3) e extração de DNA plasmidial

A transformação das cepas bacterianas EPI300, utilizada para estocagem de DNA plasmidial, e BL21 (DE3), utilizada para produção de proteínas, com o plasmídeo pET24a (+) foi realizado pela técnica de eletroporação segundo Protocolo Operacional Padrão estabelecido pela EMBRAPA Agroenergia (ver anexos a e b). Como as cepas transformadas adquirem resistência ao antibiótico Kanamicina, as colônias foram selecionadas em meio sólido Luria-Bertani (*LB Broth*, L3022, *Sigma-*

Aldrich) contendo antibiótico Kanamicina 100 µg/mL (*Kanamycin sulfate*, 60615, *Sigma-Aldrich*).

Depois da transformação, três cepas de *E.coli* EPI300 e BL21(DE3) foram selecionadas e o DNA plasmidial foi extraído a fim de se confirmar a inserção do vetor pET24a (+). Para essa metodologia foi utilizado um kit comercial de extração plasmidial (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, QIAGEN). Após o procedimento, os DNAs plasmidiais foram postos em corrida eletroforética (*PowerPac™ Basic Power Supply*, *BIO-RAD*) junto com um marcador de massa molecular (1 Kb *Plus DNA Ladder*, *Invitrogen*) utilizando gel de agarose 1% (*Agarose*, A9539, *Sigma-Aldrich*) e então foi corado com brometo de etídio (*Ethidium bromide*, E8751, *Sigma-Aldrich*). O DNA plasmidial foi revelado em um transiluminador de luz UV (*InGenius3*, *Syngene*).

4.5 Indução por IPTG para verificação de síntese proteica

A fim de verificar a produção de proteínas pelas cepas BL21(DE3) transformadas com os plasmídeos, estas foram submetidas à indução por 1 mM de IPTG -*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG, I6758, *Sigma-Aldrich*). Na elaboração desse experimento foram preparados três pré-inóculos, um para cada enzima, os quais continham: 5 mL de meio líquido LB com Canamicina 100 µg/mL + colônias das cepas transformadas. Os pré-inóculos foram mantidos sob agitação de 200 rpm, *overnight* (durante a noite) a 37°C. Na etapa posterior foram preparados os inóculos para realizar a indução com IPTG, os quais apresentavam: 5 mL de meio líquido LB com Canamicina 100 µg/mL + 250 µL de pré-inóculo. Foram colocados sob agitação de 200 rpm, 37°C até que se atingisse uma OD₆₀₀ entre 0.6 e 0.8.

Quando a OD₆₀₀ foi atingida, alíquotas de 100 µL de cada um dos três inóculos foram coletadas e armazenadas em tubos *ependorfs* na geladeira 4°C, para posterior análise em gel SDS-PAGE. Os outros 4900 µL foram induzidos com IPTG 1 mM por 3 h a 37°C. Alíquotas de 100 µL também foram retiradas para análise em gel SDS-PAGE. As amostras alíquotadas foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 20 µL de tampão de amostra 2X (ver anexo c) e fervidos a 95°C por 5 min.

O gel de SDS-PAGE foi feito sob as concentrações de 12% para o gel separador e 5% para o gel concentrador (ver anexo d) (LAEMMLI, 1970). A

aplicação foi utilizada com o marcador de massa molecular de proteína (*Thermo Scientific*[™] 26610; 14.4 a 116 kDa) e pelas três proteínas produzidas, alternando as variáveis inóculo e induzido para ambas. Esse primeiro teste de indução foi feito para verificar se as proteínas estavam sendo produzidas. A proteína que apresentou a melhor produção, ou seja, uma banda maior no gel, foi objeto de estudo do presente trabalho.

4.6 Produção, purificação e caracterização da β -glicosidase 72-26 em sistema de expressão heteróloga *Escherichia coli* BL21 (DE3)

4.6.1 Produção da β -glicosidase 72-26 (β -G 72-26) e teste de solubilidade

A produção da β -G 72-26 foi realizada semelhantemente à sua produção anterior, descrita no item 4.5, alterando apenas o volume de meio LB que foi utilizado na indução passando de 5 mL para 25 mL e a quantidade de pré-inóculo aplicada que foi de 1,25 mL. Para a realização do teste de solubilidade, etapa que antecede os processos de purificação, foram coletados inicialmente 1 mL de pré-inóculo e 1 mL da indução, e então estocados em geladeira a 4°C.

Após a indução, 24 mL de cultivo foram centrifugados por 30 min, 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 3,5 mL de Tampão A (Tris-HCl 30 mM e NaCl 300 mM). Em seguida, foi sonificado utilizando o sonicador *Branson Ultrasonics*[™] *Sonifier S-250A* sobre os seguintes parâmetros: 15 min, *duty cycle* (30%) e *output control* (4). O lisado foi centrifugado por 30 min, 12000 rpm a 4°C e, o *pellet* foi ressuscitado em 3,5 mL de Tampão A, sendo 1 mL desse e do sobrenadante estocados a 4°C.

4.6.2 Análise da expressão e solubilidade por SDS-PAGE

A partir das amostras estocadas em geladeira a 4°C, conforme mostrado no item 4.6.1, foram coletados 10 μ L. Estes volumes foram misturados cada um com 10 μ L de Tampão de amostra 2X (ver anexo c) e fervidos a 95°C por 5 min e, após isso, foram aplicados em gel SDS-PAGE (ver anexo d). A corrida eletroforética foi realizada com Tampão de corrida (ver anexo e) em uma cuba de eletroforese (*Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell*, *BIO-RAD*) sob uma corrente de 20

mA. Depois da corrida o gel foi corado com uma Solução de Coomassie R-250 (ver anexo f) por 1 h e descorado com uma Solução descorante (ver anexo g) por 3 h, trocando esta a cada 1 h.

4.6.3 Otimização da produção da β -G 72-26

Posteriormente ao teste de solubilidade realizado com a temperatura a 37°C e uma concentração de IPTG de 1 mM, foi realizado uma nova produção da β -G 72-26 em uma temperatura de 28°C e uma concentração de IPTG de 0,1 mM, a fim de se aumentar a concentração de proteínas solúveis produzidas. Em seguida, essa otimização foi visualizada em gel de SDS-PAGE como exemplificado no item 4.6.2.

4.6.4 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*)

A primeira técnica de purificação aplicada foi por cromatografia de afinidade, mais especificamente por calda de histidina (*HisTag*). As enzimas para essa etapa foram produzidas sobre temperatura de 28°C e IPTG 0,1 mM, em um volume de 500 mL de meio LB. O *pellet* resultante dessa indução foi ressuspenso em 40 mL de Tampão A (Tris-HCl 30mM e NaCl 300mM, pH 8,0) e sonificado sobre as mesmas configurações, comentada no item 4.6.1. Após centrifugação do lisado obtido da sonificação, o sobrenadante e o *pellet* foram estocados em geladeira 4°C.

A partir desse sobrenadante foram realizados os processos de purificação por afinidade, utilizando a coluna HisTrap™ HP 1mL em um ÄKTA *purifier*. A coluna foi previamente equilibrada com Tampão A antes de se aplicar o sobrenadante, e este foi injetado em um fluxo de 1 mL/min. Após isso, a proteína foi eluída em *Steps*, ou seja, em diferentes concentrações (2%-10 mM, 10%-50 mM, 20%-100 mM, 50%-250 mM e 100% - 500 mM) de Tampão B (Tris-HCl 30 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 500 mM, pH 8,0). As frações foram coletadas e analisadas por gel de SDS-PAGE, com o marcador molecular *BLUeye Prestained Protein Ladder*.

4.6.5 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*) em condições desnaturantes

A purificação por Cromatografia de afinidade (*HisTag*) da enzima também foi realizada a partir do sedimento, este estocado conforme item 4.6.4. O sedimento foi ressuscitado em 40 mL de Tampão C (Tris-HCl 30 mM, NaCl 300 mM e Ureia 1 M, pH 8) e deixado toda a noite sob agitação de 100 rpm e 25°C. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado por 30 min, 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi colhido e 20 mL foram concentrados em AmiconTM para 15 mL. Para eliminar a presença de ureia, foi realizada uma etapa de exclusão molecular com uma coluna de *desalting* (*HiTrap GE Desalting*) previamente equilibrada com Tampão A. As amostras foram injetadas em volumes de 1 mL, eluídas com Tampão A, e as frações coletadas analisadas por SDS-PAGE 12%.

Após a detecção das frações que apresentavam a proteína, foi realizado o ensaio enzimático, adicionando-se 25 μ L de 4 mM *p*-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside -pNPG (*Sigma-Aldrich*); 25 μ L de 100 mM acetato de sódio pH 5,0 + 25 μ L da enzima β -G 72-26 (WOOD e BHAT, 1988). O branco foi o mesmo sem a adição de enzimas. Este ensaio foi realizado em placa de 96 poços em um SpectraMax[®] M3, com as configurações de temperatura a 45 °C e tempo de 30 min. Após o fim da reação foi adicionado 150 μ L de 1M carbonato de sódio a fim de parar a reação, e a absorbância foi medida a 405 nm.

4.6.6 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes

Para a purificação por Cromatografia de exclusão molecular foi utilizado o mesmo sobrenadante do tópico 4.6.5, e nessa etapa a Ureia foi retirada por técnica de *desalting* (*HiTrap GE Desalting*) e concentrado em AmiconTM antes de ser aplicada na coluna (*Superdex S200, GE*). Em seguida, foram injetados 2 mL, com um fluxo de 1,6 mL/min na coluna pré-equilibrada com Tampão A. A proteína foi coletada a partir de um volume de coluna esperado (~72 mL), uma vez que a calibração da coluna *Superdex S200* já havia sido realizada com outras proteínas de tamanho conhecido. Os picos de proteína foram coletados e analisados em gel de SDS-PAGE e, além disso, as frações do pico da proteína β -G 72-26 foram

analisados separadamente e corados com nitrato de prata (OAKLEY *et al.*,1980) para uma análise mais precisa da purificação. Juntamente a isso, foi feito um teste de atividade para cada uma das frações deste pico. Os gráficos foram construídos no *OrigenPro 8*.

4.7 Caracterização físico-química da β -G 72-26

4.7.1 Determinação do Coeficiente de extinção molar

O coeficiente de extinção molar (ou absorvidade molar) experimental da proteína β -G 72-26 ($\epsilon^{280\text{nm}}_{\text{mg/mL}}$) foi determinado observando-se a absorbância a 280 nm em relação à concentração da proteína (mg/mL) determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). O método Lowry foi calibrado usando a proteína Albumina de Soro Bovino (ASB) de concentração conhecida. Esta proteína foi preparada em cinco concentrações diferentes em um volume de 120 μL : 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL.

Em triplicata, foi misturado os 120 μL da amostra de proteína com 80 μL de 1M NaOH, 800 μL do Reativo A (ver anexo h), 100 μL da Solução de Folin-Ciocalteu (ver anexo h), homogeneizadas com vórtex, incubadas de 20-30 min a temperatura ambiente (no escuro) e foram realizadas as leituras da absorbância a 650 nm. A partir do gráfico linear das absorbâncias a 280 nm medidas nas soluções da proteína β -G 72-26 e suas respectivas concentrações proteicas determinadas pelo método de Lowry, a inclinação angular foi obtida como medida do coeficiente de extinção.

4.8 Caracterização enzimática da β -G 72-26

4.8.1 Curva padrão de *p*-Nitrophenyl (pNP)

A construção da curva padrão de pNP, utilizada para os cálculos de atividade enzimática, foi construída utilizando-se seis concentrações diferentes desse produto a um volume de 75 μL , sendo elas 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1,0; e 1,5 mM obtidas por diluição em água bidestilada (MilliQ[®]). As soluções foram aquecidas a 45°C por 30 min no espectrofotômetro de placa SpectraMax M3 e, em seguida, foi adicionado 150 μL de carbonato de sódio 1M. As amostras foram lidas no espectrofotômetro de

placa SpectraMax M3 a 405 nm e os valores foram exportados e analisados no *OrigenPro 8*.

4.8.2 Efeito da concentração da enzima β -G 72-26 na reação enzimática

A determinação do efeito da concentração de enzima β -G 72-26 na reação enzimática de hidrólise do pNPG foi realizado em placas de 96 poços, em triplicata. As concentrações analisadas foram de 200; 150; 100; 75; 50 e 31 nM. A reação enzimática foi realizada como já mostrado no tópico 4.6.5, contudo, os volumes de enzima e tampão foram alternando de forma a obter as concentrações desejadas em 50 μ L da mistura, e 25 μ L fixo de substrato.

O ensaio enzimático descontínuo foi realizado com 12 medições de absorbância, sendo que o tempo 0s e os intervalos aproximados das 8 leituras seguintes foram feitos a cada 40 s, e as últimas 3 leituras nos tempos de 7 min, 15 min e 30 min. A reação foi interrompida nesses tempos com a adição de solução de parada carbonato de sódio 1 M, de forma a obter-se a velocidade inicial (V_0) das reações. Posteriormente, os dados foram exportados para o *OrigenPro 8* e analisados e interpretados por gráficos.

4.8.3 Efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima β -G 72-26

O experimento de influência do pH na atividade enzimática da β -G 72-26 foi realizado em placas de 96 poços, utilizando diferentes pHs nas reações enzimáticas. Foram preparados tampões, com concentração de 100 mM, nos valores de 3, 4 e 5 (Tampão ácido cítrico/citrato de sódio), 6 e 7 (Tampão fosfato de sódio monobásico/ fosfato de sódio dibásico), 8 e 9 (Tampão Tris base/ácido clorídrico), 10 (Tampão glicina/hidróxido de sódio), 11 (Tampão bicarbonato de sódio/ hidróxido de sódio) e 12 (Tampão cloreto de sódio/ hidróxido de sódio). As reações enzimáticas foram realizadas com a concentração de enzima selecionadas no tópico 4.8.2, e foram realizadas leituras no espectrofotômetro de placa SpectraMax M3, em intervalos similares os descritos no tópico 4.8.2, de forma a obter a velocidade inicial da reação. Os dados foram analisados no *OrigenPro 8*.

4.8.4 Efeito da temperatura na atividade da enzima β -G 72-26

O experimento de influência da temperatura na atividade enzimática da β -G 72-26 foi realizado em tubos *ependorfs* de 200 μ L em termociclador (*T100 thermal cycler, BIO-RAD*) com temperaturas de 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C, e tempo de 30 min. Os ensaios foram realizados com tampão a pH ótimo da enzima determinados acordo com tópico 4.8.3. Nesse experimento além do branco, controle negativo (c-), foi feito o controle positivo (c+), que constituiu-se do produto pNP ao invés do substrato pNPG. Os valores do c+ foram tidos como sendo 100%, e dessa forma o gráfico foi construído em função da atividade relativa. Para as leituras utilizou-se um espectrofotômetro de placa SpectraMax M3.

4.8.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da β -G 72-26 a partir da curva de Michaelis-Menten

A determinação dos parâmetros cinéticos, K_m , $V_{m\acute{a}x}$, K_{cat} e K_{cat}/K_m da enzima β -G 72-26 foram obtidos por meio da curva Michaelis-Menten, a qual foi construída nas concentrações de substrato pNPG de 100; 200; 300; 400; 600; 800; 1000; 1200 e 1400 μ M e mantendo a concentração de enzima fixa determinada no tópico 4.8.2. Nesse experimento os ensaios foram realizados com uso de pH e temperatura ótimos. As leituras de atividade foram feitas por ensaio enzimático descontínuo a 405 nm, e os dados foram analisados no *OrigenPro 8*.

4.9 Caracterização biofísica da β -G 72-26

4.9.1 Análise de estrutura secundária e estabilidade estrutural por Dicroísmo Circular da β -G 72-26

O perfil da estrutura secundária da proteína β -G 72-26 foi caracterizado por Dicroísmo Circular (DC) utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporação, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura *Peltier* (Instrumentos analíticos, Japão). Os espectros dicroicos foram obtidos em cubeta de quartzo de 0,1 cm a 25°C. Os ensaios de dependência de pH foram realizados com a concentração da proteína em 0,066 mg/ml. Os tampões utilizados nos ensaios foram acetato de sódio 5 mM, pH 4,0; Tris-HCl 5 mM, pH 7,0 e pH 8,5 e tampão glicina/hidróxido de sódio 5 mM, pH 10,0. Cinco espectros

dicroicos foram obtidos em comprimentos de onda distantes da luz UV (190- 260 nm) com intervalos de 0,2 nm, e uma taxa de escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 4 segundos e largura da banda de 1.0, e a média corrigida com subtração da contribuição dos tampões.

As elipticidades (mdg) obtidas foram convertidas em elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) baseado na massa calculada por resíduo de 115 Da (PACE et al., 1989). A dependência do pH na estrutura secundária foi estimada a partir dos espectros ajustados utilizando o programa *CD Spectra Deconvolution Vs 2.1 CDNN* (BÖHM, 1997).

As curvas de termoestabilidade foram obtidas para os pHs 4,0; 7,0 e 10,0 em 208 nm; com a temperatura variando de 25 a 95°C, a cada 0.2°C/min. Em paralelo foram registrados espectros dicroicos na região distante do UV (190-260 nm), com intervalos de 10°C. As curvas de desnaturação térmica foram obtidas considerando os valores de elipticidade molar ($[\theta]$) versus temperatura (PACE et al., 1989).

4.9.2 Alinhamento da β -G 72-26 com sequências estruturadas e análise de domínios

A procura por sequências homólogas à β -G 72-26 foi realizada utilizando o BLASTp contra o banco de dados de sequências não-redundantes e do PDB como opção (ALTSCHUL et al., 1997; BERMAN et al., 2000). Em seguida, foi feito o alinhamento por meio do *software T-COFFEE Multiple Sequence Alignment Server*, e visualizado com o *software* ESPrint 3.0, o qual permite ver o alinhamento junto com a representação da estrutura secundária. Nestes foram anotados os sítios ativos e os domínios da sequência (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000; NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000).

5.0 RESULTADOS

5.1 Seleção de enzimas celulases a partir de sequências metagenômicas de Intestino de *Syntermes wheeleri*

As sequências metagenômicas com função de celulases importadas do ggKbase para o Geneious somaram um total de 378 sequências, sendo 150 β -1,4-endoglucanases, 6 exoglucanases e 222 β -glicosidases. Após as edições aplicadas nas sequências, como explicado no tópico 4.2, as sequências resultaram em um total de 104, sendo 47 β -1,4-endoglucanases, 4 exoglucanases e 51 β -glicosidases (Figura 11).

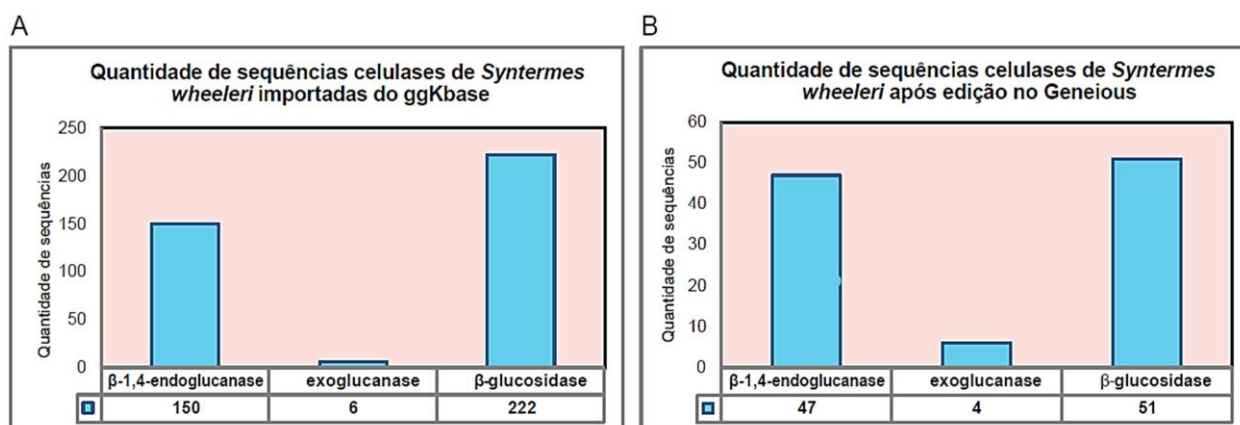


Figura 11. Quantidade de sequências celulases antes e depois das edições. (A) Quantidade total importada do ggKbase; **(B)** Quantidade após edições no Geneious.

As sequências finais foram agrupadas dentro das famílias das GHs, com as β -1,4-endoglucanases classificadas dentro das GH5 e GH9, as exoglucanases dentro das GH9 e as β -glicosidases dentro das GH3 (Tabela 1). Foram encontradas outras anotações entre as sequências finais, como M42 Peptidase e Camada S, contudo, somente as GHs foram selecionadas para estudo. As árvores filogenéticas de cada família GH estão apresentadas nos apêndices a, b e c.

Tabela 1. Famílias GH anotadas para as três enzimas celulases.

Enzimas	Famílias GHs
β -1,4-endoglucanases	GH5 e GH9
exoglucanases	GH9
β -glicosidases	GH3

As sequências de cada enzima celulase foram organizadas em tabelas (ver apêndice f, g e h), e os resultados de metatranscriptoma foram o principal fator analisado para a escolha das sequências a serem sintetizadas, sendo aquelas de maior valor os de maior interesse. As sequências escolhidas estão listadas na Tabela 2. Estas foram, como demonstrado no tópico 4.3, inseridas em plasmídeos pET24a (+) para a produção de proteínas. As montagens dos plasmídeos podem ser vistas nos anexos i, j e k.

Tabela 2. Sequências escolhidas para serem inseridas no plasmídeo pET24a (+).

Enzimas	Nome das enzimas	Família
β -1,4-endoglucanase	P12_assembly_scaffold_51_20	GH5
Exoglucanase	WG1_assembly_scaffold_8574_2	GH9
β -glicosidase	P33_assembly_scaffold_72_26	GH3

5.2 Transformações de cepas *Escherichia coli* EPI300 e BL21(DE3) e extração de DNA plasmidial

A transformação das cepas de *E. coli* EPI300 e BL21(DE3) foi confirmada em gel de agarose (Figura 12). A sequência plasmidial da P12_assembly_scaffold_51_20 apresenta tamanho de 7152 pares de base (bp), a WG1_assembly_scaffold_8574_2 de 6269 bp e a P33_assembly_scaffold_72_26 de 7649 bp. Pela Figura 12 é possível observar que os plasmídeo estão próximos ao seu tamanho quando comparado ao marcador, garantindo a inserção dos mesmos nas cepas transformadas.

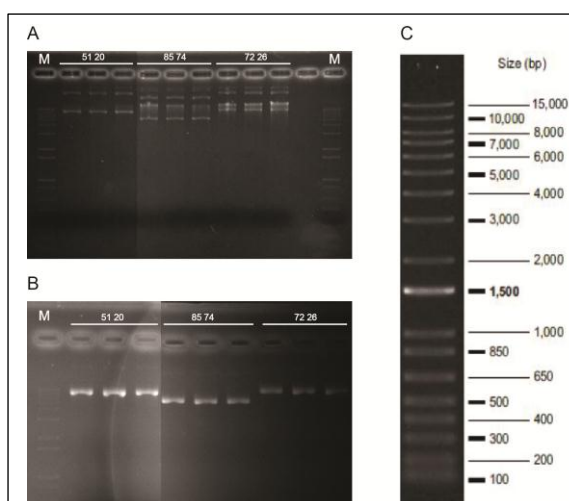


Figura 12. DNA plasmidial de cepas EPI300 e BL21 (DE3) transformadas. (A) Plasmídeos das cepas BL21 (DE3) transformadas com os genes de P12_assembly_scaffold_51_20, WG1_assembly_scaffold_8574_2 e P33_assembly_scaffold_72_26; **(B)** Plasmídeos das cepas EPI300 com os mesmos genes, respectivamente; **(C)** Marcador de peso molecular.

5.3 Indução por IPTG para verificação de síntese proteica

A partir da indução com IPTG pode-se verificar a produção das proteínas, como apresentado na Figura 13. As enzimas β -1,4-endoglucanase (51_20), exoglucanase (85_74) e β -glicosidase (72_26) apresentaram os tamanhos aproximados estimados por bioinformática, sendo de 71.631 Da, 27.284 Da e 89.771 KDa, respectivamente. Aquela que apresentou melhor produção foi a β -glicosidase (72_26). Com isso, essa foi a proteína escolhida para a realização dos experimentos seguintes de caracterização bioquímica e biofísica neste trabalho.

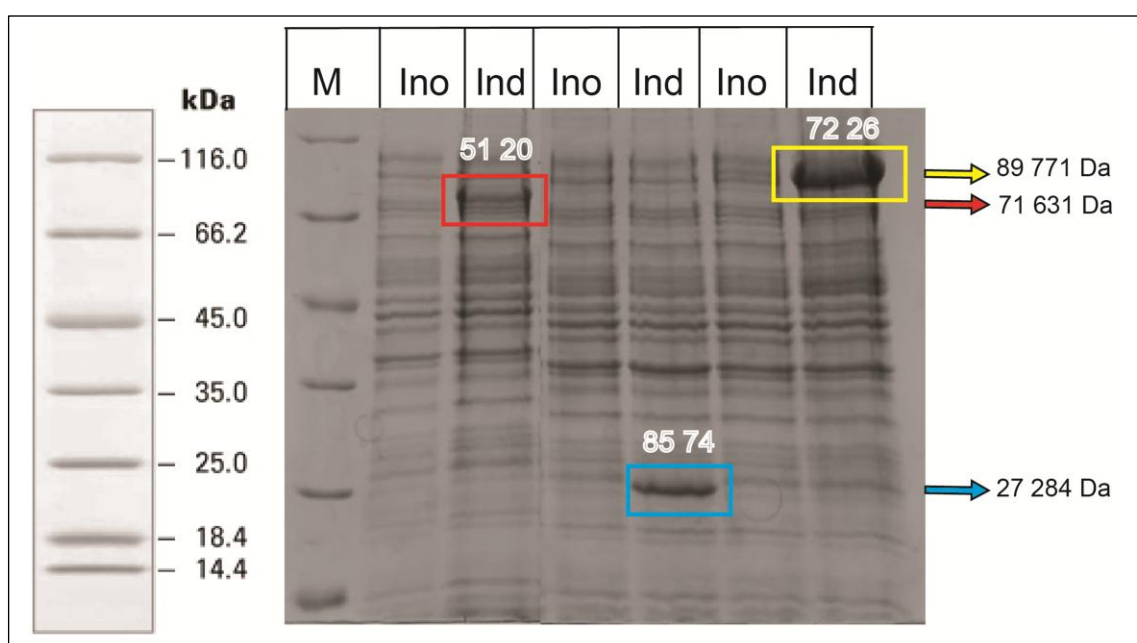


Figura 13. Gel SDS-PAGE de proteínas celulares produzidas por indução com IPTG. Os genes de β -1,4-endoglucanase (51_20), exoglucanase (85_74) e β -glicosidase (72_26) foram induzidos com IPTG e observou-se sua produção por gel SDS-PAGE. Os tamanhos aproximados dessas proteínas são 71.631 Da, 27.284 Da e 89.771 Da, respectivamente. A melhor produção foi da β -glicosidase (72_26). **M:** marcador, **Ino:** inóculo e **Ind:** indução

5.4 Produção, purificação e caracterização da β -glicosidase 72_26 em sistema de expressão heteróloga *Escherichia coli* BL21 (DE3)

5.4.1 Análise da expressão e solubilidade por SDS-PAGE

O teste de solubilidade foi realizado a fim de detectar se a proteína estava sendo produzida de forma solúvel ou insolúvel. Pela Figura 14, pode-se concluir que a proteína de ≈ 89.8 KDa aparece quase exclusivamente no sedimento (*pellet*), ou seja, na forma insolúvel provavelmente na forma de corpos de inclusão.

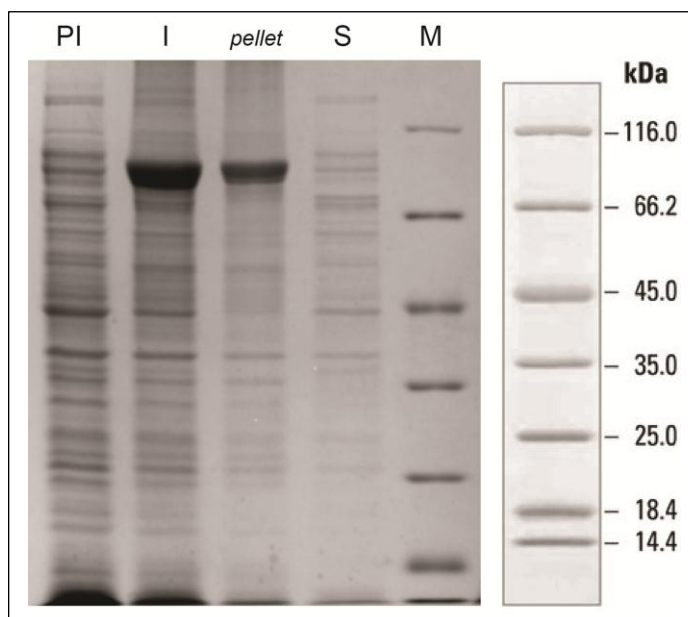


Figura 14. Teste de solubilidade da β -G 72-26. O teste de solubilidade da β -G 72-26 mostrou que a proteína estava sendo produzida de forma insolúvel, ou seja, na forma de corpos de inclusão. **PI** (pré-inóculo), **I** (indução), *pellet* (parte insolúvel), **S** (sobrenadante-parte solúvel) e **M** (marcador de massa molecular de proteína).

5.4.2 Otimização da produção da β -G 72-26

A otimização realizada com a β -G 72-26 foi conduzida a fim de se conseguir produzir mais proteínas em sua forma solúvel. Contudo, como pode-se observar na Figura 15, a proteína de ≈ 89.8 KDa foi produzida em sua maioria na forma insolúvel (*pellet*).

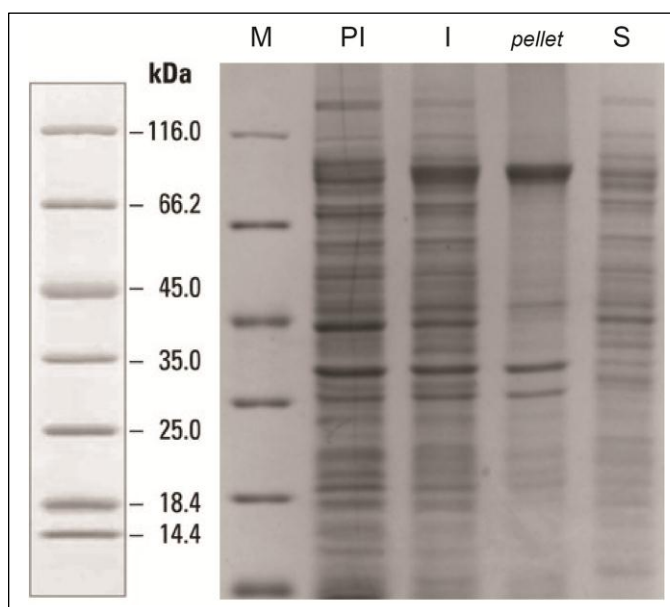


Figura 15. Otimização da produção da β -G 72-26. A otimização da β -G 72-26 mostrou que a proteína continuava sendo produzida em maioria em sua forma insolúvel, ou seja, por meio de corpos de inclusão. **M** (marcador de peso molecular de proteína), **PI** (pré-inóculo), **I** (indução), *pellet* (parte insolúvel) e **S** (sobrenadante-parte solúvel).

5.4.3 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*)

A purificação da β -G 72-26 por cromatografia de afinidade por quelatos de metálicos (*His-tag*) foi a primeira técnica aplicada a fim de purificá-la (Figura 16A). Para isso utilizou-se a parte solúvel da produção, o sobrenadante, como explicado no item 4.6.4. De acordo com a intensidade das bandas eletroforéticas, a proteína β -G 72-26 foi eluída em maior quantidade na concentração de 50 mM de imidazol (10%), contudo, ela eluiu com outras proteínas contaminantes (Figura 16B). Logo, essa metodologia não foi eficiente para purificação da β -G 72-26.

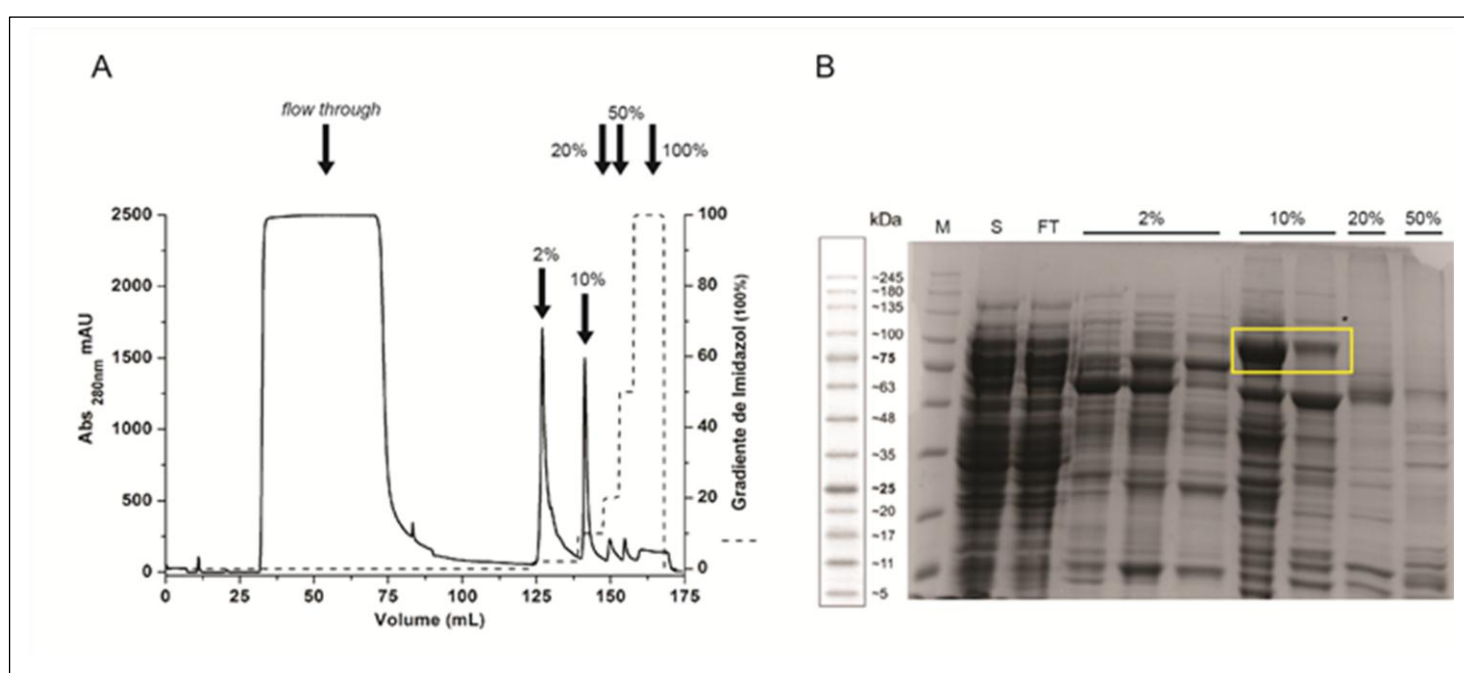


Figura 16. Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*). (A) Perfil cromatográfico de purificação da β -G 72-26 por cromatografia de afinidade (*HisTag*), utilizando a coluna HisTrap™ HP 1mL. As diferentes porcentagens indicam distintas concentrações de imidazol, 2%-10 mM, 10%-50 mM, 20%-100 mM, 50%-250 mM e 100% - 500 mM. (B) Gel SDS-PAGE 12% mostrando a eluição de todos os picos da purificação, com destaque em amarelo para a eluição em 10%, quando a proteína estava em maior quantidade. A eluição em 100% não foi visualizada, visto que nessa concentração o Cromatograma já havia se estabilizado não apresentando mais absorvância a 280 nm. **M** (marcador de massa molecular de proteína), **S** (sobrenadante), **FT** (*flow through*), **2%**, **10%**, **20%** e **50%** as diferentes concentrações de

5.4.4 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*) em condições desnaturantes

Após a tentativa de purificar a β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*) utilizando a parte solúvel produzida na indução, foi utilizada também a parte insolúvel da mesma, ou seja, o *pellet*, aplicando a mesma técnica de purificação. O *pellet* ressuspensionado em UREA 1M apresentou uma grande quantidade de proteínas

como pode ser visto no sobrenadante na Figura 17. Contudo, a proteína não se ligou de forma eficiente na coluna sendo eluída quase que por completo no *flow through*. Com isso, concluiu-se que a calda de histidina não estava sendo eficiente na sua ligação com a coluna HisTrap™ HP. Apesar disso, a β -G 72-26 apresentou atividade enzimática nessas condições desnaturantes. Esses resultados não estão apresentados, pois foram apenas qualitativos para a ocasião, visando apenas uma detecção rápida de atividade ou não.

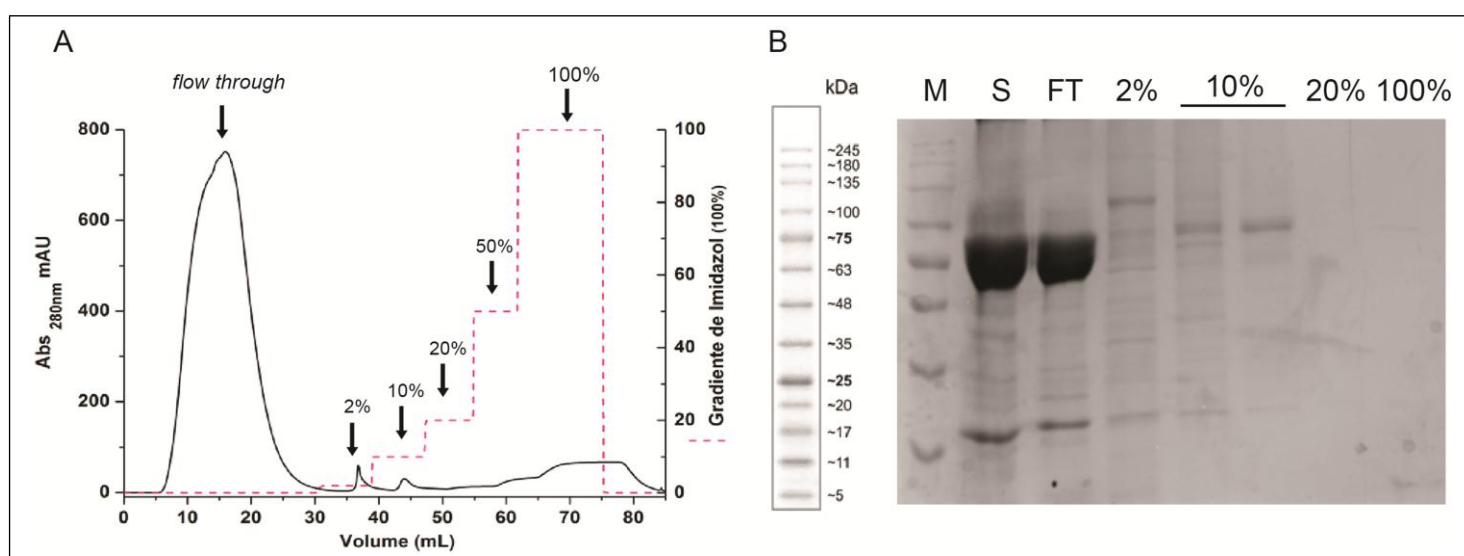


Figura 17. Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*) em condições desnaturantes. (A) Perfil cromatográfico de purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de afinidade (*HisTag*) em condições desnaturantes, utilizando a coluna HisTrap™ HP 1mL. As diferentes porcentagens indicam distintas concentrações de imidazol, 2%-10 mM, 10%-50 mM, 20%-100 mM, 50%-250 mM e 100% - 500 mM. **(B)** Gel SDS-PAGE mostrando a eluição dos picos 2%, 10%, 20% e 100%. **M** (marcador de massa molecular de proteína), **S** (sobrenadante), **FT** (*flow through*).

5.4.5 Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes

A purificação utilizando a técnica de exclusão molecular foi realizada em condições desnaturantes. Contudo, utilizando esse método, diferente da cromatografia de afinidade, houve êxito na separação das proteínas, como pode-se observar na Figura 18. A confirmação da purificação da proteína β -G 72-26 foi realizada com a coloração por nitrato de prata das frações do pico 3 (P3), quando observou-se a total purificação da enzima e sua atividade enzimática também.

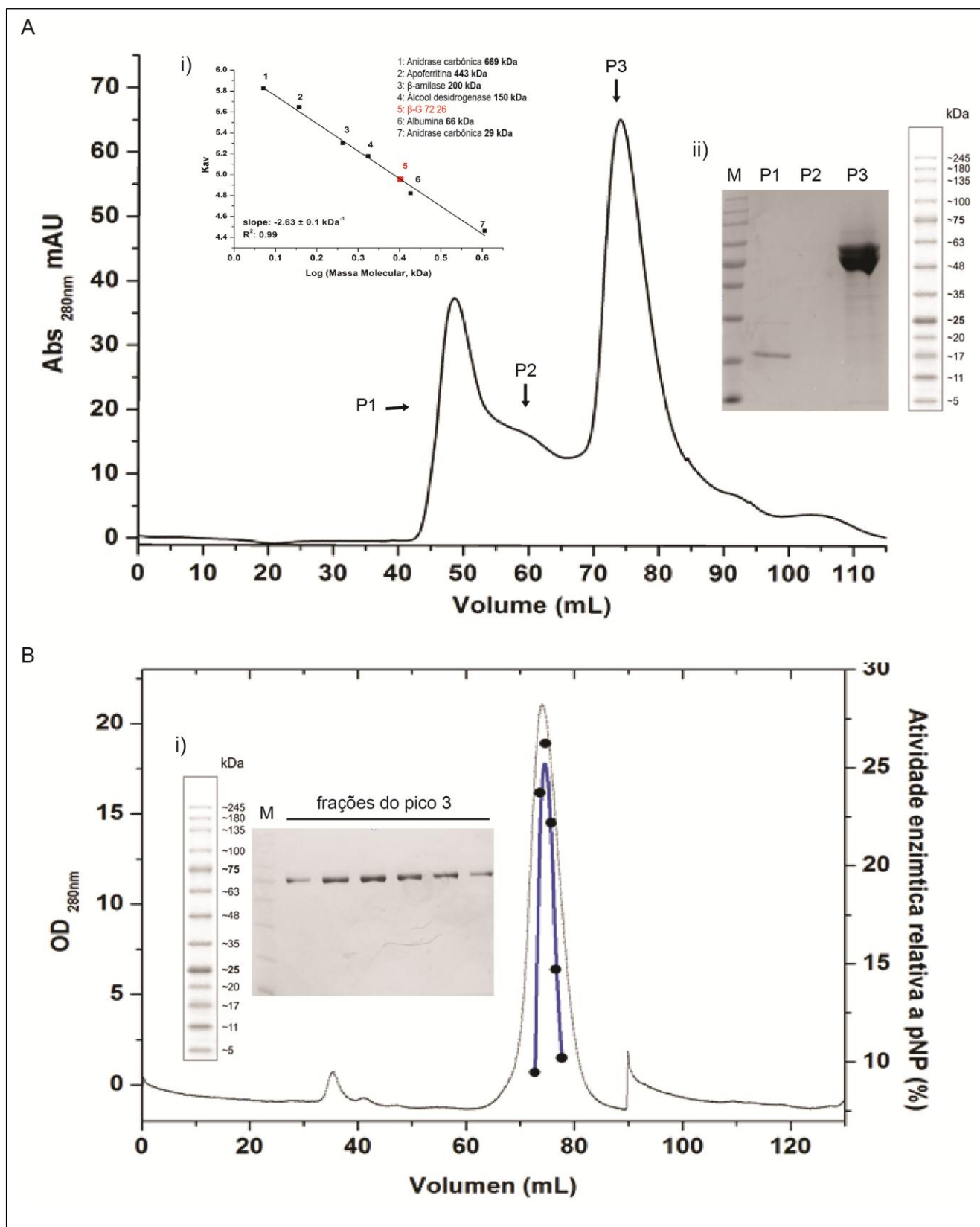


Figura 18. Purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes. (A) Perfil cromatográfico de purificação da β -G 72-26 por Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes, utilizando a coluna *Superdex S200*. A proteína saiu no volume esperado (72 mL); i) curva de calibração da *Superdex S200*; ii) gel SDS-PAGE dos picos da cromatografia, sendo P3 a β -G 72-26. (B) Cromatograma das frações do Pico 3 e a atividade enzimática relativa de cada uma; i) gel SDS-PAGE das frações do Pico 3 corado com nitrato de prata. **M (marcador de peso molecular de proteína), **S** (sobrenadante), **P1** (pico 1), **P2** (pico 2) e **P3** (pico 3 - β -G 72-26).**

5.5 Caracterização físico-química da β -G 72-26

5.5.1 Determinação do Coeficiente de extinção molar

O coeficiente de extinção molar experimental ($\epsilon^{280\text{nm}}_{\text{mg/mL}}$) da proteína β -G 72-26 foi determinado pela combinação da leitura de absorvância a 280nm e o método de Lowry. Na Figura 19A pode-se observar os espectros de absorção da proteína β -G 72-26 em soluções de diferentes concentrações (mg/mL) determinadas pelo método de Lowry usando BSA como proteína padrão (Figura 19A i). O coeficiente de extinção da proteína foi determinado a partir da relação linear da absorvância a 280 nm e da concentração da proteína (Figura 19A ii), sendo de $\epsilon^{280\text{nm}}_{\text{mg/mL}}$ 1,36 $\text{ml.cm}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

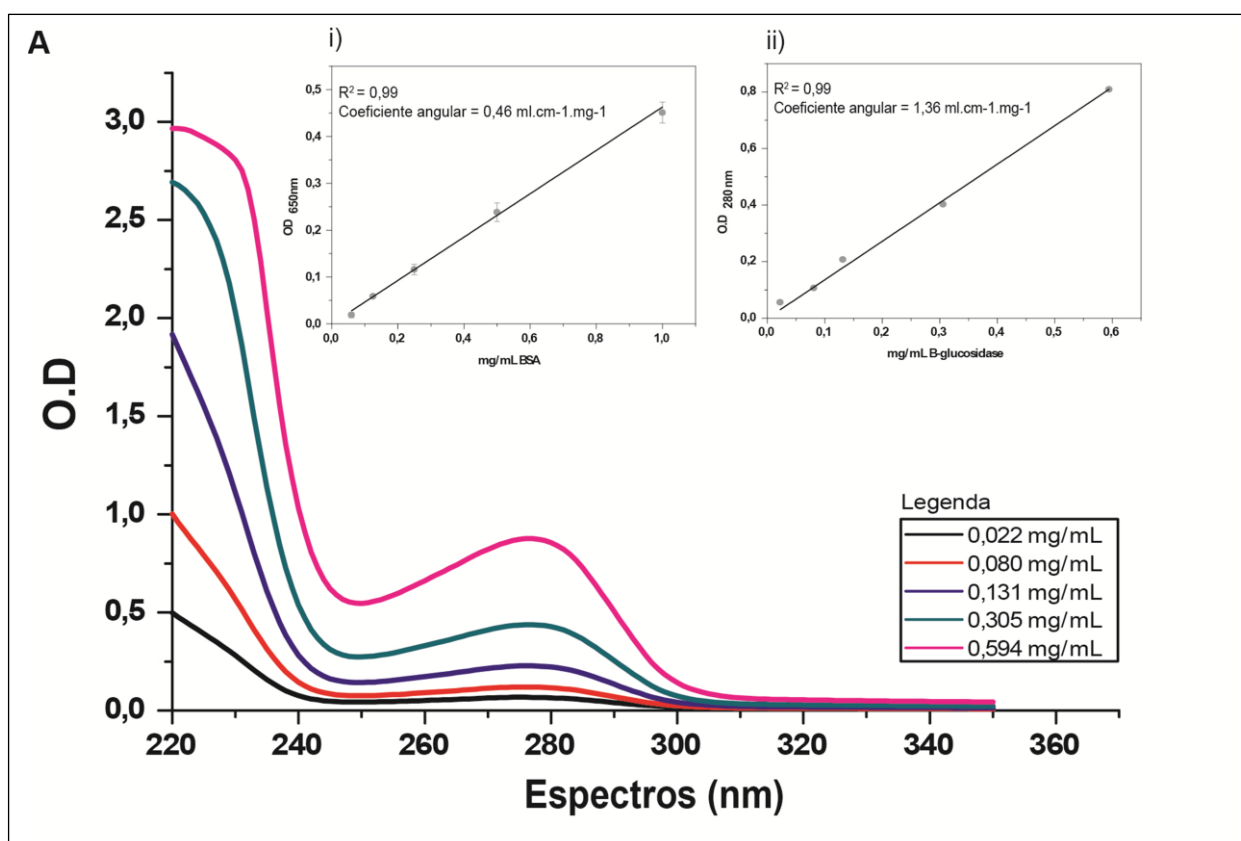


Figura 19. Coeficiente de extinção molar experimental da β -G 72-26. O coeficiente de extinção molar da β -G 72-26 foi de 1,36 $\text{ml.cm}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. **i)** gráfico e equação da reta da BSA, relacionando O.D 650 nm x mg/mL; **ii)** gráfico e equação da reta da β -G 72-26, relacionando O.D 280 nm x mg/mL.

5.6 Caracterização enzimática da β -G 72-26

5.6.1 Curva padrão de *p*-Nitrophenyl (pNP)

A curva padrão de pNP foi construída a fim de determinar a quantidade do mesmo liberado durante a hidrólise do pNPG pela ação da β -G 72-26 e assim realizar os cálculos de atividade enzimática. Na figura 20 pode-se observar o gráfico que estabelece a correlação linear entre a O.D 405 nm e a concentração em Molar (M) de pNP ate os 0,6 mM de pNPG apresentando um coeficiente angular da reta de $5642,19 \text{ M}^{-1}$.

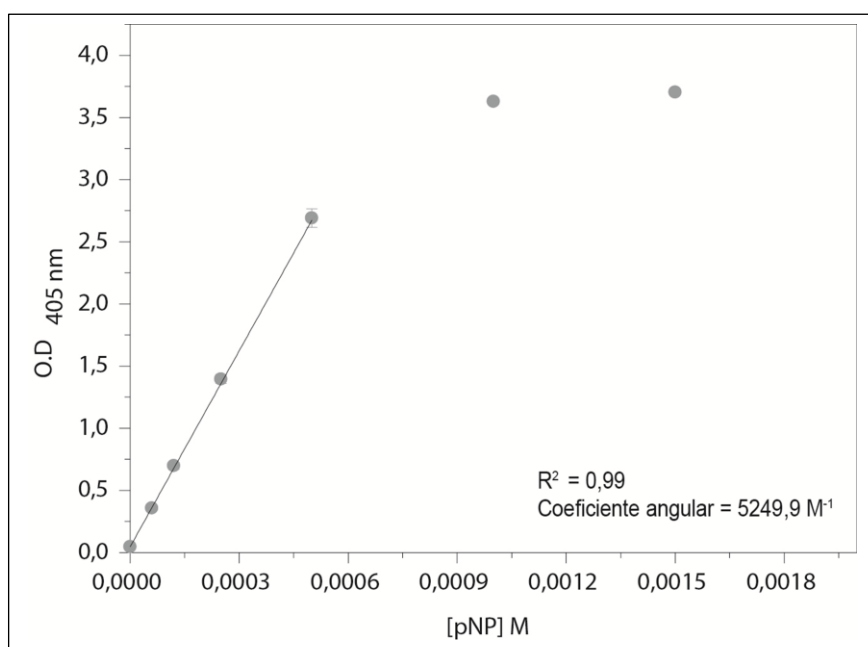


Figura 20. Curva padrão de *p*-Nitrophenyl (pNP). A curva padrão de pNP foi determinada a fim de determinar a concentração de pNP liberado na hidrólise do pNPG pela enzima β -G 72-26. No gráfico é mostrado a relação entre a a O.D 405 nm e a concentração de pNP em molaridade.

5.6.2 Efeito da concentração da enzima β -G 72-26 na reação enzimática

Nesse experimento pode-se observar a variação da velocidade inicial (V_0) de acordo com as diferentes concentrações de enzima utilizada, em uma concentração fixa de substrato (1,3 mM). Na Figura 21A foi possível constatar o aumento da O.D 405 nm conforme a concentração de enzimas aumenta, e conseqüentemente uma maior V_0 de reação.

Na Figura 21B, pode-se constatar uma linearidade entre o aumento da V_0 em $\mu\text{mol}/\text{min}$ (determinado a partir da calibração do produto no tópico 5.6.1) pelo aumento da concentração de enzima em mg e, resultante disso, a atividade específica de $7785,65 \pm 590,82 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ ($7785,65$ unidades/ mg de enzima) (Figura 21B). A concentração escolhida para os ensaios enzimáticos seguintes foi de 100 nM ou $0,1 \mu\text{M}$. As concentrações mais baixas não foram escolhidas, pois o sinal e a sensibilidade do leitor de placas era muito baixo e as concentrações mais altas não foram escolhidos porque requerem um maior gasto de enzima purificada e substrato.

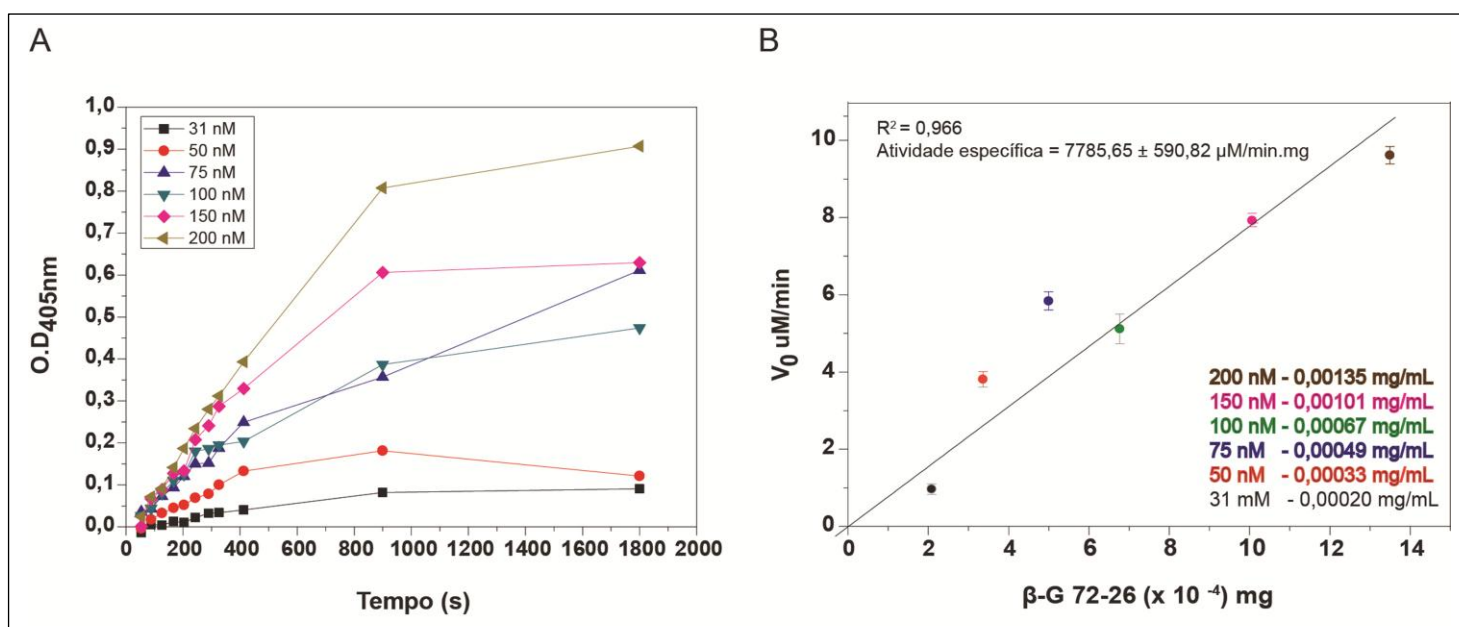


Figura 21. Efeito da concentração da enzima $\beta\text{-G 72-26}$ na reação enzimática. (A) gráfico da O.D 405 nm pelo tempo em diferentes concentrações de enzimas. Nota-se o aumento da O.D 405 nm conforme aumenta a concentração de enzimas. (B) gráfico da V_0 em $\mu\text{mol}/\text{min}$ pela concentração de enzima em mg . Todas as concentrações ficaram em uma linha reta. A concentração escolhida para os ensaios enzimáticos foi de 100 nM ou $0,1 \mu\text{M}$.

5.6.3 Efeito do potencial Hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima $\beta\text{-G 72-26}$

A partir das variações das velocidades iniciais (V_0) de acordo com os diferentes valores de pH (Figura 22A), em uma concentração fixa de substrato ($1,3 \text{ mM}$) e 100 nM de enzima, foi possível construir o gráfico da atividade enzimática com relação ao pH (Figura 22B). O pH como apresentado na Figura 22B apresentou duas faixas de pH ótimo para a atividade da $\beta\text{-G 72-26}$, sendo eles pH 7 (neutro) com atividade de $258,85 \pm 4,5 \text{ nM pNP/s}$ e pH 10 (básico) $321,75 \pm 4,8 \text{ nM pNP/s}$. O pH 10 mostrou 1,24 vezes uma melhor atividade em comparação ao pH 7.

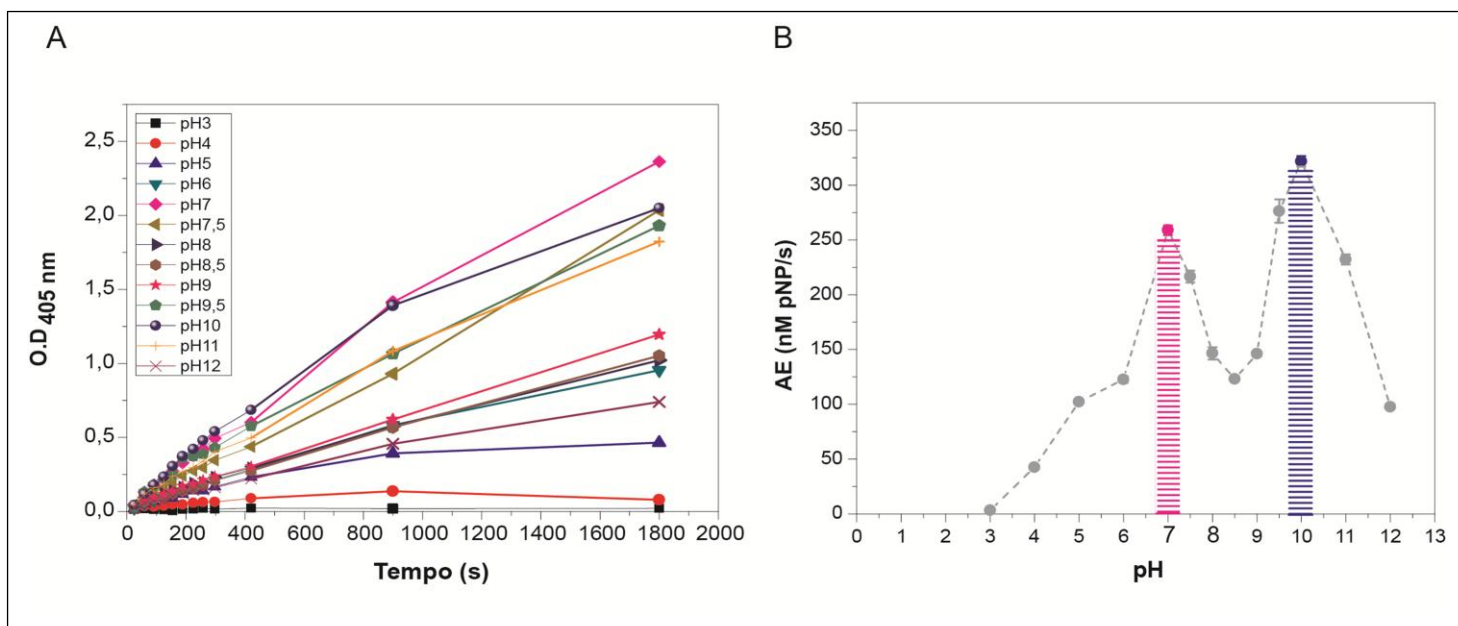


Figura 22. Efeito do pH na atividade da β -G 72-26. (A) gráfico da O.D 405 nm pelo tempo em diferentes concentrações de enzimas. Nota-se o aumento da O.D 405 nm conforme aumenta a concentração de enzimas. (B) gráfico da V_0 em $\mu\text{mol}/\text{min}$ pela concentração de enzima em mg. Todas as concentrações ficaram em uma linha reta. A concentração escolhida para os ensaios enzimáticos foi de 100 nM.

5.6.4 Efeito da temperatura na atividade da enzima β -G 72-26

Com uma concentração fixa de substrato (1,3 mM), 100nM de enzima, e em cada um dos pH ótimos (pH7 e pH10), foi possível construir o gráfico da atividade enzimática com relação a temperatura (Figura 23). A temperatura como apresentado na Figura 23 mostrou uma melhor atividade enzimática da β -G 72-26, em 40°C para ambos os pHs. Como esse experimento não pode ser feito de forma descontínua, não pode-se construir o gráfico de O.D X Tempo.

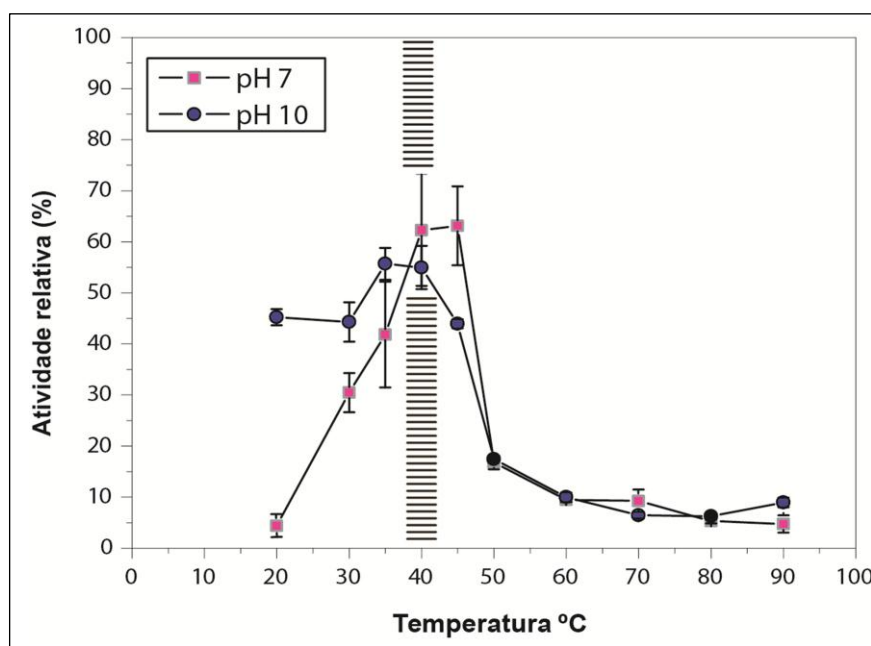


Figura 23. Efeito da temperatura na atividade da β -G 72-26. A temperatura de 40°C foi a que contribuiu para a melhor atividade da enzima em ambos os pHs, 7 e 10.

5.6.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da β -G 72-26 – curva Michaelis-Menten

A partir das variações das velocidades iniciais (V_0) de acordo com os diferentes valores de concentração de substrato, em uma concentração de 100nM de enzima, 40°C de temperatura, e em cada um dos pH ótimos (pH7, Figura 24A e pH10 Figura 25A), foi possível construir o gráfico de Michaelis-Menten da atividade enzimática com variação da concentração do substrato (pH7, Figura 24B e pH10 Figura 25B). Os parâmetros cinéticos da β -G 72-26 foram determinados (tabela 3) por meio da construção da curva de Michaelis-Menten, utilizando os parâmetros de temperatura e pHs, considerados ideais para uma melhor atividade da enzima. Comparando os dois pHs, tem-se que a $V_{m\acute{a}x}$ em pH 10 foi 1,13 vezes maior do que em pH 7 sugerindo maior atividade enzimática a pH básico. No entanto, a afinidade pelo substrato usado foi 9,4 vezes maior em pH7 como indicam os valores de K_m . O K_{cat} em pH 10 para o substrato usado foi maior do que em pH 7 e o K_{cat}/K_m foi maior em pH 7 do que em pH 10 indicando que a especificidade da enzima para esse substrato é maior em pH7.

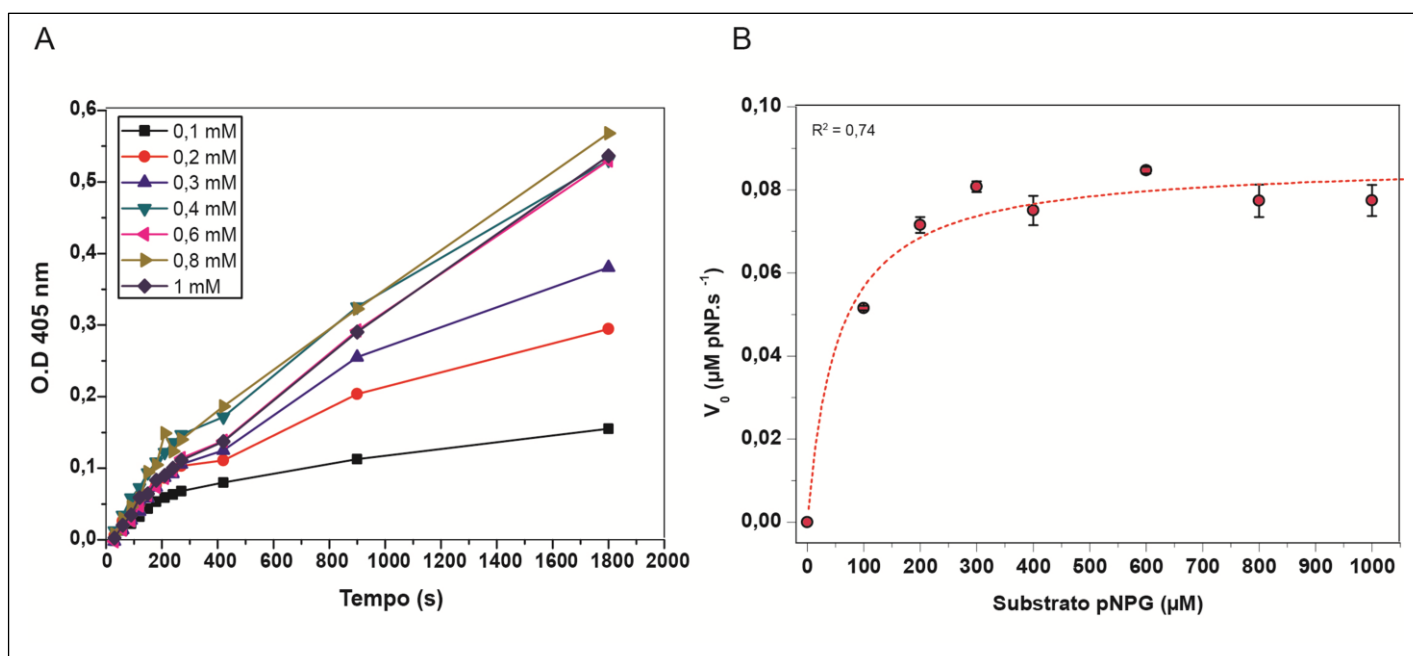


Figura 24. Curva de Michaelis-Menten da β -G 72-26 em pH 7 . **(A)** gráfico da O.D 405 nm pelo tempo em diferentes concentrações de substrato. **(B)** Curva de Michaelis-Menten, mostrando a relação entre velocidade inicial e concentração de substrato em pH 7.

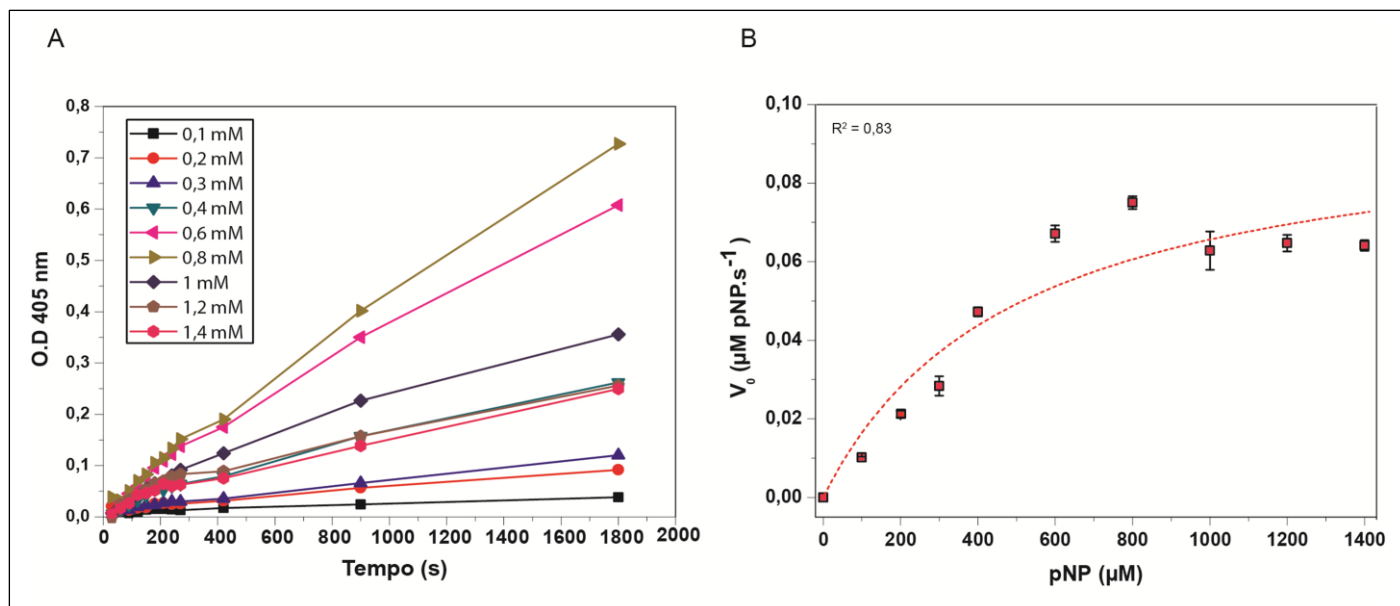


Figura 25. Curva de Michaelis-Menten da β -G 72-26 em pH 10 . (A) gráfico da O.D 405 nm pelo tempo em diferentes concentrações de substrato. (B) Curva de Michaelis-Menten, mostrando a relação entre velocidade inicial e concentração de substrato em pH 10.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos da β -G 72-26 em pH 7 e pH 10.

Enzima	pH	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
β -G 72-26	7,0	$0,087 \pm 0,004$	$53,11 \pm 17,8$	$0,87 \pm 0,004$	0,016
β -G 72-26	10,0	$0,098 \pm 0,02$	$498,93 \pm 238,3$	$0,98 \pm 0,02$	0,001

5.7 Caracterização biofísica da β -G 72-26

5.7.2 Análise de estrutura secundária e estabilidade estrutural por Dicroísmo Circular

Os resultados obtidos nos ensaios de DC para β -G 72-26 mostraram que (Figura 26 e na Tabela 4) a proteína possui estrutura secundária dependente de pH, com espectro dicróico de proteína estruturada para todos os pHs testados. Os espectros da proteína apresentam uma banda negativa pronunciada correspondente a estrutura de alfa hélice (208 nm e 222 nm) e de folha beta (218 nm) . Este resultado foi observado em todos os pHs testados, entretanto, no pH 10,0 o percentual de estrutura secundária é maior para alfa hélice (27%), em contrapartida, houve redução no conteúdo de folha beta paralela e antiparalela (15%), quando relacionado ao pH ácido .Esses resultados mostram que β -G 72-26 apresenta-se mais estruturada no pH 10,0.

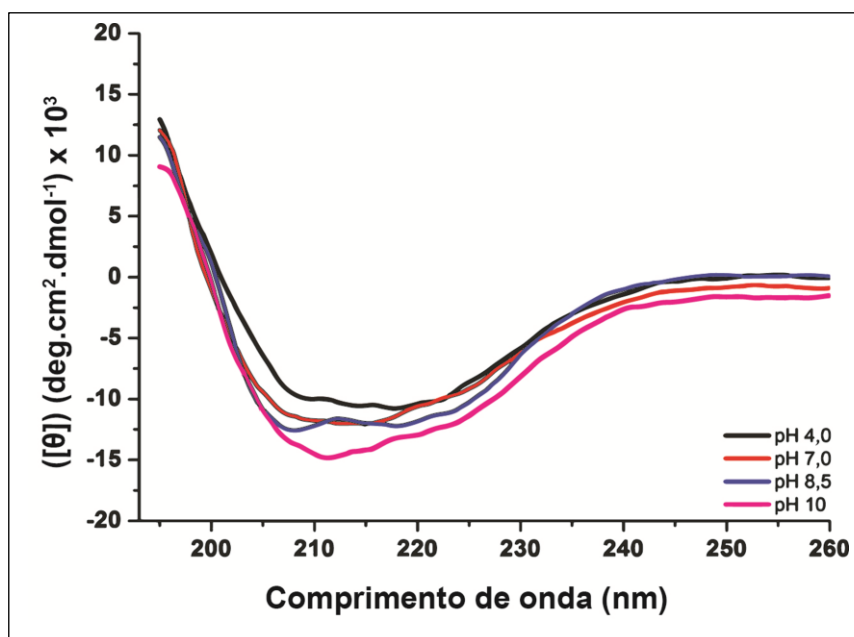


Figura 26. Análise da estrutura secundária da β -G 72-26. Espectros dicróicos da β -G 72-26 obtidos por dicróismo circular em diferentes pHs a 25°C.

Tabela 4. Perfil de estrutura secundária da enzima β -G 72-26 em diferentes pHs obtido por deconvolução dos espectros dicróicos no utilizando o programa CDNN. (em vermelho os considerados ótimos sobre a atividade enzimática)

Estrutura secundária (%)	pH 4,0	pH 7,0	pH 8,5	pH 10,0
Alfa hélice	25,5	24,0	25,9	27,3
β-antiparalela	14,0	14,9	11,4	10,1
β-paralela	6,2	5,8	5,7	5,4
Volta-β	16,8	17,5	16,6	19,4
Desordenada	35,4	32,2	32,9	34,8

Os resultados obtidos nos ensaios de termoestabilidade mostram que em pH ácido (4,0), a proteína não desnaturou mesmo em altas temperaturas, apresentando somente pequena alteração do sinal dicróico (Figura 27A). Em pH 7,0, a proteína apresentou uma gradual redução do sinal, atingindo o estado desenovelado a medida que a temperatura aumentou, reduzindo o sinal até zero, conforme observado nos espectros dicróicos e na curva de desnaturação térmica obtidos. Para este pH a proteína β -G 72-26 não apresentou capacidade de reenovelamento,

e além da desnaturação foi visualizado um padrão de agregação da proteína em 95°C. No pH 10,0, foi observado redução do sinal dicróico das bandas negativas em 208, 218 e 222 nm, com deslocamento para a região de 200 nm, que é característico de estrutura desordenada (Figura 27B-D). Os resultados de termoestabilidade mostram que β -G 72-26 é mais estável na faixa ácida.

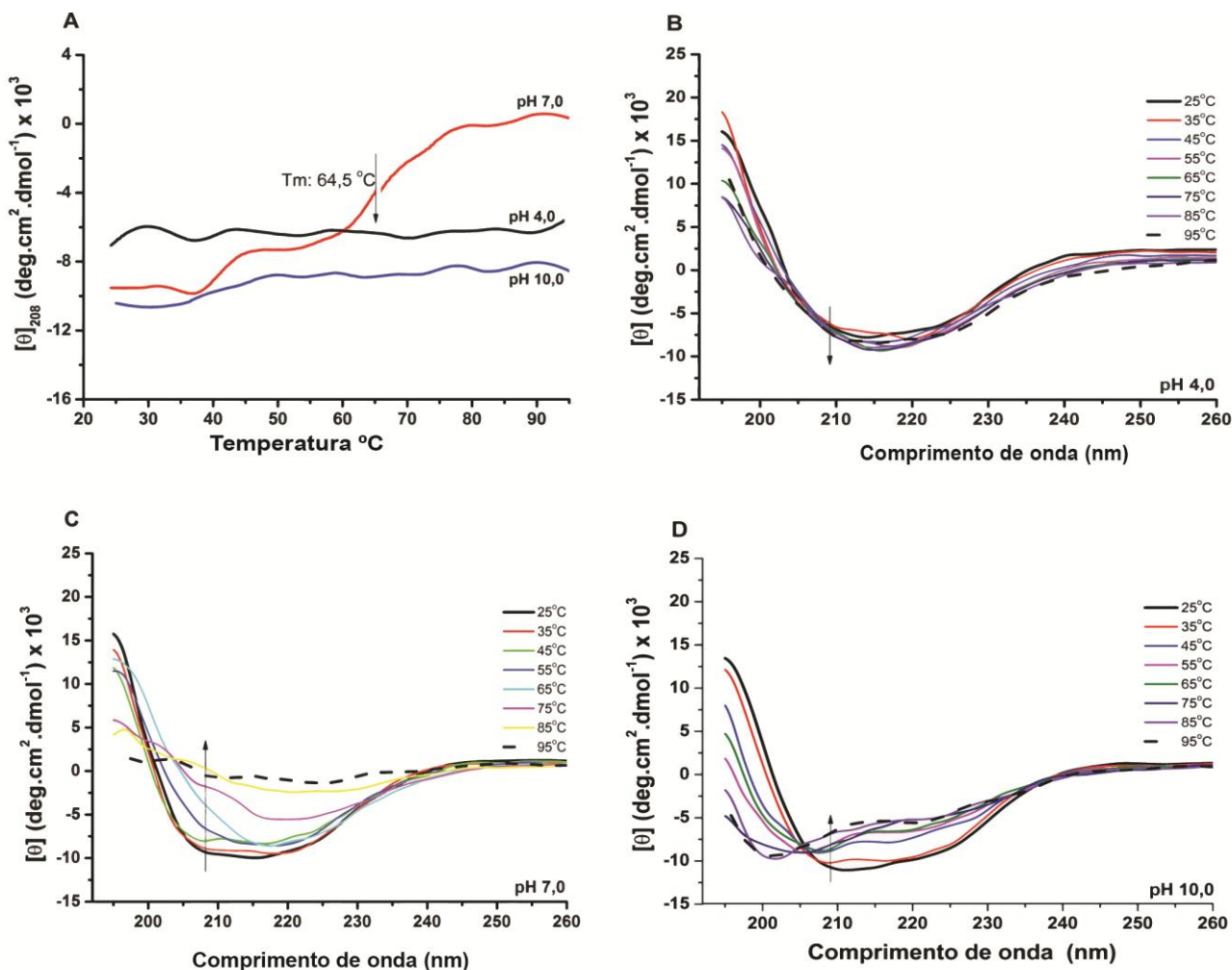


Figura 27. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da β -G 72-26. (A) Curvas de desnaturação térmica da β -G 72-26 monitoradas em 208 nm para os pH 4,0, 7,0 e 10,0 com temperaturas variando entre 25 a 95 °C. (B, C e D) Espectros dicróicos da β -G 72-26 coletados entre 25 a 95 °C em pHs 4,0, 7,0 e 10,0. T_m ($T_{melting}$) para proteína em pH 7,0 está indicado em seta.

5.7.1 Alinhamento da β -G 72-26 com sequências estruturadas e análise de domínios

A β -G 72-26 pertencente à família das GH3 é composta de 804 resíduos de aminoácidos dispostos em três domínios conectados por dois *linkers*, sendo que o domínio 1 abrange o resíduo 1 até o 290 (Figura 28), o domínio 2 do resíduo 301 ao 486 (Figura 29) e o domínio 3 do resíduo 548 até o 667. O sítio catalítico está

localizado na interface entre os dois primeiros domínios, sendo composto pelo resíduo D233 e E417. Além disso, outros sete resíduos conservados no sítio ativo fazem interação com o substrato: D46, R121, K154, H155, R165 e Y201 (Figura 28). O alinhamento do domínio três não foi apresentado, pois ele não possui função conhecida.

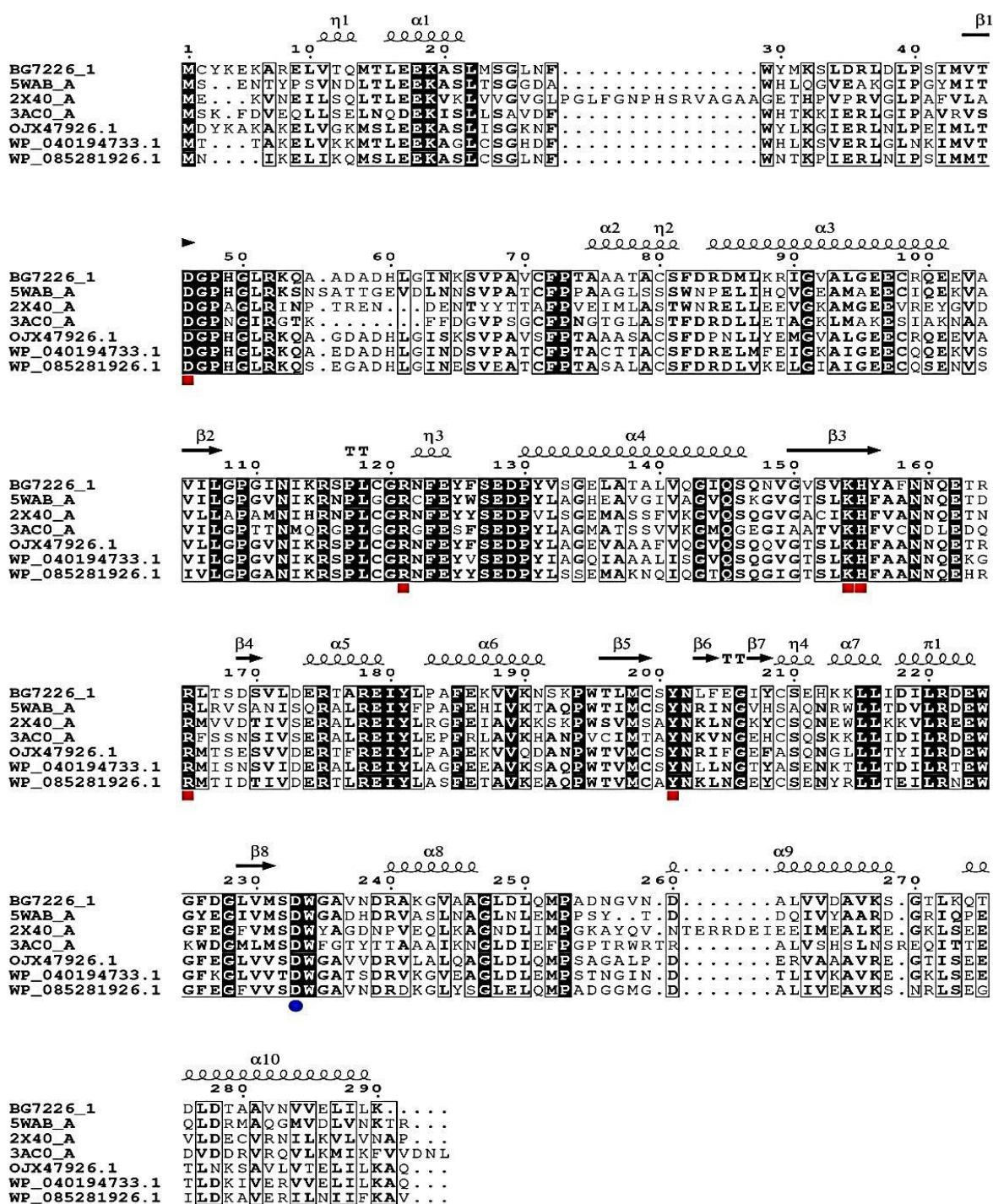


Figura 28. Alinhamento múltiplo do domínio 1 da β -G 72-26 com seqüências do PDB e não-redundantes. Realce preto: resíduos conservados. α : α -hélice, β : folha- β , e T: *turn*- β , ●: resíduo do sítio ativo (D233), ■: resíduos de afinidade ao substrato (D46, R121, K154, H155, R165 e Y201).

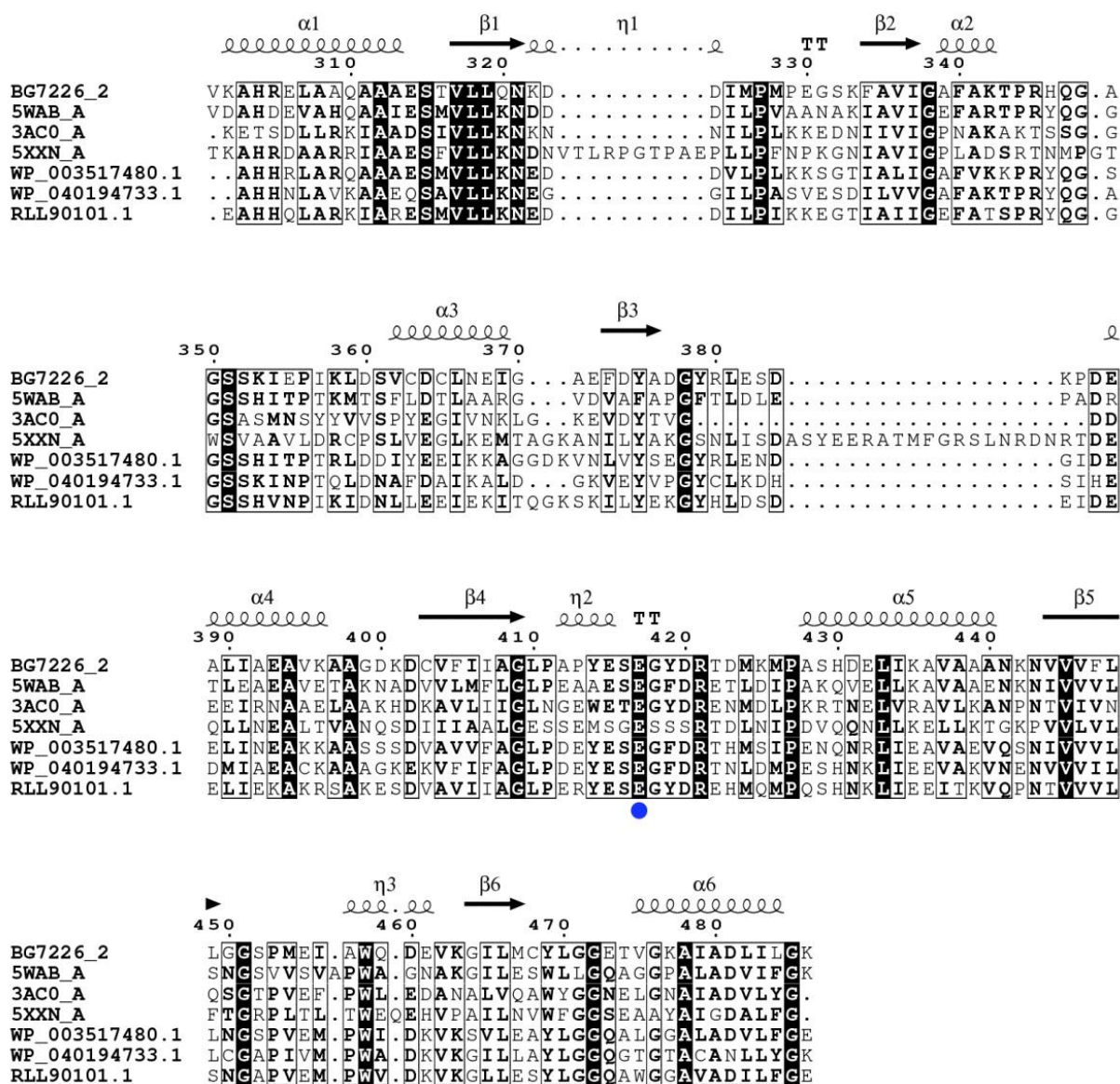


Figura 29. Alinhamento múltiplo do domínio 2 da β -G 72-26 com seqüências do PDB e não-redundantes. Realce preto: resíduos conservados. α : α -hélice, β : folha- β , e T: *turn*- β , ●: resíduo do sítio ativo (E417).

6.0 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado a partir de um estudo pioneiro que descreveu a comunidade microbiana de um cupim endêmico do Cerrado brasileiro, o *Syntermes wheeleri*, o qual foi realizado por extração de DNA metagenômico e análises de bioinformática, por meio dos quais pode-se avaliar a comunidade de bactéria, fungos e arqueias no intestino dos operários de terceiro e quarto instares (SANTANA et al., 2015).

Os cupins são considerados um dos principais degradadores de material lignocelulósico do ecossistema, e eles desempenham um papel crucial na formação de ecossistemas terrestres. Os cupins dependem de uma comunidade de microrganismos em seu trato digestivo para obter alguns produtos essenciais para sua sobrevivência, como açúcares, hidrogênio e acetato, que são posteriormente metabolizados por esses microrganismos simbióticos como fontes de energia e nutrição (ZHOU, et al., 2018). Visto essa capacidade em degradar materiais lignocelulósicos pelos cupins, o *S. wheeleri* foi tido como uma fonte promissora para encontrar enzimas celulasas com potencial para aplicação industrial.

As sequências de enzimas celulasas: β -1,4-endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases de *S. wheeleri* importadas para o software GENIOUS, foram classificadas quanto a família Glicosil hidrolase (GH). As β -1,4-endoglucanases foram classificadas dentro das famílias enzimáticas GH5 e GH9, sendo as exoglucanases como GH9 e as β -glicosidases como GH3. As GH5 são consideradas uma das maiores famílias das GHs e são conhecidas como “celulasas da família A”, uma vez que foram a primeira família de enzimas celulasas descritas. Além disso, estas celulasas são encontradas em trabalhos de metagenômica envolvendo diferentes nichos ecológicos, como rúmen de vaca e águas do Oceano Atlântico (DUAN et al., 2009; ELIFANTZ et al., 2008; HESS et al., 2011). No cupim, *Coptotermes formosanus*, enzimas celulasas GH5 foram encontradas no intestino posterior, desempenhando um papel sinérgico com as enzimas endógenas do cupim hospedeiro para a degradação da biomassa (GENG et al., 2018).

As GH9 são compostas principalmente por celulasas e eram denominadas como “celulasas da família E”, representando o segundo maior grupo da família das celulasas (GILKES et al., 1991). Sabe-se que o tecido hospedeiro de todos os

cupins que se alimentam de madeira é fonte de celulases, tais como uma GH9 de domínio único que é secretada e ativa no intestino anterior (WARNECKE et al., 2007). Os genes codificadores de GH9 são difundidos entre os microrganismos celulolíticos (exceto fungos aeróbios) e plantas, mas os genes que codificam esta família de enzimas são particularmente abundantes em bactérias anaeróbicas produtoras de celulosomas. Estes são complexos extracelulares grandes e heterogêneos que degradam eficientemente a celulose e os polissacarídeos relacionados à parede celular da planta (RAVACHOL et al., 2014).

A família GH3 é uma das famílias mais abundantes de enzimas ativas por carboidratos e inclui membros que possuem atividades enzimáticas distintas, incluindo as atividades β -D-glicosidase, β -D-xilosidase, β -L-arabinofuranosidase e N-acetil- β -D-glucosaminidase (DODD et al., 2010). As enzimas GH3 desempenham um papel fundamental nas funções de manutenção dos organismos, bem como em suas interações com o ambiente, incluindo as interações patógeno-hospedeiro. Inicialmente, elas foram descritas como β -glicosidases bacterianas e fúngicas envolvidas na biodegradação da celulose vegetal (COURNOYERA e FAURE, 2003). As funções das GH3s foram então estendidas para: (1) a biodegradação e a assimilação de uma ampla variedade de carboidratos e glicoconjugados por bactérias e fungos. (2) a modificação da atividade biológica de vários glicoconjugados, tais como antibióticos bacterianos e moléculas antifúngicas derivadas de plantas. (3) o *turnover* de componentes de arquitetura celular, como polímeros de parede celular, em bactérias, fungos e plantas (COURNOYERA e FAURE, 2003). Em cupins, Warnecke et al., (2007) perceberam por análises dos dados metagenômicos que as GH3 estavam relacionadas com o metabolismo final dos oligossacarídeos em açúcares simples.

Em ambas as famílias GHs (GH5, GH3 e GH9) das sequências celulases metagenômicas deste trabalho, os filos mais predominantes foram Firmicutes e Spirochaetes. Su et al., (2016) observaram que em quatro espécies de cupins, duas inferiores e duas superiores, ambos os filos encontram-se em grandes quantidades, podendo variar a porcentagem de um ou outro a depender da filogenia e dieta a que estes cupins se submetem. De acordo com Santana et al., (2015) o cupim *Syntermes wheeleri* apresenta uma maior porcentagem de Firmicutes (76.65%) seguido de Spirochaetes (4.97%), Bacteroidetes (3.67%), Acidobacteria (2.56%), e

Proteobacteria (2.28%), quando apesar de as Spirochaetes serem o segundo filo mais abundante entre as bactérias classificadas no intestino de *S. wheeleri*, a abundância foi baixa nesta espécie em comparação com outros cupins superiores, o que pode ser explicado pelo hábito alimentar desta espécie, que não se alimenta de madeira, mas sim da serapilheira.

A enzima β -glicosidase 72 26 (P33_assembly_scaffold_72_26) selecionada para caracterização bioquímica e biofísica neste trabalho, é classificada segundo análises de bioinformática no filo das Spirochaetes apresentando identidade de 53.0% com a espécie *Treponema azotonnutricium*, a qual teve a espécie descrita pela primeira vez em cupim, sendo associada ao processo de fixação de nitrogênio e produção de H_2 , o qual é produto da fermentação de polissacarídeos da lignocelulose (GRABER et al., 2004; ROSENTHAL et al., 2011). Contudo, até o presente momento nenhum trabalho foi realizado caracterizando uma β -glicosidase GH3 advinda da microbiota intestinal de *S. wheeleri*, e nem relacionado à bactéria *Treponema azotonnutricium*. De acordo com Arthornthurasuk et al., (2018) todas as β -glicosidase de cupins reportadas até o momento são GH1, logo a caracterização da β -G 72-26 GH3 é de fundamental contribuição para o meio científico e também para o ambiente industrial.

O gene da β -G 72-26, inserido no plasmídio de expressão pET24a(+) foi induzido com IPTG em concentrações e temperaturas diferentes a fim de melhorar a solubilidade das enzimas produzidas, evitando formação de corpos de inclusão, sendo induzidas com 1 mM de IPTG a 37°C e 0,1 mM de IPTG a 28°C. Múltiplos fatores podem contribuir para a formação de agregados proteicos como corpos de inclusão, sendo a alta concentração do indutor e a temperatura, alguns deles (SINGH et al., 2015). Geralmente os corpos de inclusão são acumulados no citoplasma, mas proteínas com peptídeos sinais também já foram reportados formando agregados no espaço periplasmático (ARIEL et al., 2006; COQUEL et al., 2013). Visto isso, foram utilizados temperatura e indutor em níveis mais baixos, apesar de experimentalmente isso não ter aumentado o número de proteínas solúveis.

Após a produção de β -G 72-26 esta foi submetida ao primeiro processo de purificação utilizando a Cromatografia de afinidade de quelatos de metais por calda de histidina (*His-tag*), contudo, esta não foi capaz de se ligar a coluna HisTrap™ HP

mesmo em condições desnaturantes. A estratégia de incluir um segmento de seis histidinas (*His-tag*) quando comparada a outras tem vantagens como a menor influência na estrutura e função da proteína expressa, mas às vezes pode interferir na solubilidade da proteína e sua capacidade de se ligar a resinas *His-Tag* (TERPE, 2003). Com isso, pode-se notar que nem sempre a *His-tag* será eficiente nos processos de purificação, como foi o caso da β -G 72-26.

Como a purificação por *His-tag* não funcionou, tanto na forma nativa quanto desnaturante da β -G 72-26, foi utilizada a cromatografia de exclusão molecular a fim de se separar a proteína pelo tamanho. Para isso a proteína foi solubilizada com 1 M de ureia, uma concentração inferior aquelas normalmente utilizadas de 6-8 M, uma vez que a intenção era apenas solubilizar a proteína, sem causar grandes mudanças estruturais. Geralmente, os corpos de inclusão são solubilizados utilizando altas concentrações de desnaturantes como ureia ou cloridrato de guanidina, e as proteínas são em seguida reestruturadas pela eliminação gradual de agente desnaturante na presença de um agente oxidante (SINGH; PANDA, 2005).

Apesar da expressão de proteínas em forma de corpos de inclusão serem considerados indesejáveis, eles podem apresentar várias vantagens para os processos de purificação, como: (1) concentrarem uma grande quantidade de proteínas; mais de 30% da quantidade total de proteínas na célula, em alguns casos, (2) apresentar diferença de tamanho em relação aos outros componentes celulares, o que ajuda na separação (iii) apresentar baixa degradação das proteínas produzidas, (iv) resistência ao ataque proteolítico causado pela célula e (v) homogeneidade de proteínas produzidas (menos contaminantes) que ajuda nas etapas de purificação (SINGH; PANDA, 2005).

Após a purificação, a β -G 72-26 foi caracterizada quanto ao pH e a temperatura ótima, sendo estes dois fatores fundamentais que interferem na atividade da enzima e que são analisados na caracterização enzimática (TALLEY ; ALEXOV, 2010; SOMERO, 1995). O pH da β -G 72-26 apresentou duas faixas de pH ótimo, um neutro (pH=7) e um básico (pH=10) o que está de acordo com o pH encontrado no intestino dos cupins superiores, os quais apresentam pHs nas faixas entre 6.0 e 10.5 (THONGARAM et al., 2005). Este resultado pode sugerir que, durante o processo de renaturação-purificação da enzima, pelo menos duas populações de enzimas com um centro ativo conformal e cataliticamente diferente

poderia ser obtidas. No entanto, já foi caracterizada outras enzimas com dois valores de pH ótimos tais como, por exemplo: Feng et al., (2015), encontraram dois valores de pH ótimo, (pH=5 e pH=8), para duas β -glicosidases de cupim superior, o *Coptotermes formosanus*, coincidindo com os resultados de pH neutro-alkalino encontrado para a β -G 72-26. E de uma forma geral, as β -glicosidases apresentam um pH ótimo entre 4 e 7.5, o que confirma o pH neutro encontrado na β -G 72-26 (CAIRNS; ESEN, 2010).

O estudo de influência do pH na estrutura secundária da enzima β -G 72-26 foi realizado por dicroísmo circular na região distante da UV (190-260 nm). Os pHs testados 4,0; 7,0; 8,5; e 10,0 mostraram que a proteína se apresenta estruturada em todos os pHs, entretanto com diferentes percentuais de estruturas do tipo alfa hélice e folhas betas, o que caracteriza a estrutura secundária desta proteína como dependente de pH. Os pHs ótimos obtidos nos ensaios bioquímicos para a β -G 72-26 foram pH 7,0 e pH 10,0 e, apresentaram um percentual de alfa hélice em 24,0% e 27,3% e folhas betas em 20,7% e 15,5%, respectivamente. Este resultado indica que apenas há uma variação de 5% dessas estruturas nestes dois pHs, e que no pH 10,0 a proteína se apresenta mais estruturada em alfa hélice, portanto a β -G 72-26 transita em duas conformações em pH 7,0 e pH 10,0.

O percentual de estrutura secundária obtido para β -G 72-26 está em conformidade com outras β -glicosidase GH3 encontradas na literatura. Algumas foram depositadas no PDB (*Protein Data Bank*) 5WAB, 3AC0, 5K6O, as quais apresentaram porcentagem de alfas hélices em 27%, 33% e 25%, enquanto o conteúdo de folhas beta foi de 18%, 26% e 19%, respectivamente (FLORINDO et al., 2018; YOSHIDA et al., 2010; RAMIREZ-ESCUDETO et al., 2016). Portanto, a estrutura secundária de β -G 72-26 obtida por DC nos pHs 7,0 e 10,0 é muito semelhante as descritas na literatura. Segundo GUPTA et al., (2016) as estruturas desordenadas fazem parte da estrutura de β -glicosidases mesófilas, podendo variar de 37,7% a 48,4%, este dado mostra que a proteína em estudo também apresenta percentual de estruturas desordenadas muito próxima ao valor descrito neste trabalho, tal como, 32,2% para o pH 7,0 e 34,8% para o pH 10,0.

A β -G 72-26 apresentou variações estruturais diferentes em distintas temperaturas, variando sua termoestabilidade em diferentes pHs. No pH ácido (pH 4,0) não foi observado desnaturação proteica, indicado pela curva de desnaturação

constante e os espectros dicróicos com pequena alteração do sinal, apresentando termoestabilidade alta nessa faixa de pH. No pH neutro (pH 7,0) houve uma redução gradual do sinal dicróico tendendo a zero, formando uma curva de desnaturação de dois estados com ponto de inflexão ($T_{melting}$) de 64,5°C. Para este pH foi observado a formação de agregados de proteínas a 95°C, o que impossibilitou o cálculo dos parâmetros termodinâmicos. Já no pH básico (pH 10,0) houve uma diminuição gradual do sinal dicróico variando de -10.000 deg.cm²/dmol até -7.500 deg.cm²/dmol, com espectros apresentando deslocamento da banda dicróica para região de estrutura desordenada (200 nm), aumento assim o percentual dessas estruturas em alta temperatura. Os resultados obtidos para os pHs 7,0 e 10,0, mostram que β -G 72-26 é mais estável na faixa básica, quando comparada com a faixa neutra. Segundo Wang (2005), a agregação de proteínas pode ser influenciada tanto pelo aumento da temperatura, que aumenta o número de interações hidrofóbicas e colisões entre moléculas de proteínas, e pela variação do pH, que altera o tipo e distribuição de cargas em proteínas.

A influência da temperatura na atividade enzimática, nos dois pHs ótimos determinados, foi avaliada e o resultado obtido mostrou que em ambos os pHs, o melhor efeito da temperatura na atividade enzimática da β -G 72-26 acontece aproximadamente a 40 °C. As β -glicosidases mesófilas, como é o caso da β -G 72-26, podem apresentar alta atividade nas temperaturas entre 30-65°C, mas são geralmente inativadas acima de 55 °C, como pode-se observar (CAIRNS; ESEN, 2010). No caso da enzima β -G 72-26, a atividade enzimática diminuiu drasticamente a partir de \approx 40 °C para o pH10,0; e a partir de \approx 45 °C para o pH7,0 como resultado da desnaturação da proteína (Figura 23). A 50 °C, a enzima praticamente só mostra 15% de atividade em ambos os pH. Quando comparada a uma β -glicosidase também da família GH3, obtida de uma bactéria probiótica, *Bifidobacterium adolescentes*, e a uma GH1 de bactéria de rúmen de vaca, *Cellulosilyticum ruminicola*, elas apresentaram temperaturas de atividade ótima semelhante de 40 °C (FLORINDO et al., 2018; SUWAN et al., 2017). Da mesma forma, quando comparada a uma β -glicosidase de cupim superior, *Neotermes koshunensis* e *Coptotermes formosanus*, também observou-se semelhanças nas temperaturas de atividade ótima, de 40 °C (UCHIMA et al., 2010 ; FENG et al., 2015).

Os parâmetros cinéticos foram analisados por meio da construção da curva de Michaelis-Menten, que analisa a atividade enzimática de acordo com o aumento da concentração de substrato, mantendo a concentração de enzimas fixa. Os resultados de K_m para os pHs 7,0 e 10,0 foram de 0,053 mM e 0,49 mM, respectivamente. Este resultado indica que a enzima tem 9 vezes mais afinidade pelo substrato pNPG a pH neutro que pH básico. Quando comparado ao K_m de outras β -glicosidases de outros cupins, que apresentaram K_m de 1,7 mM, 2,2 mM, 1,47 mM, e 0,77 mM, constatou-se uma melhor afinidade da β -G 72-26 pelo substrato pNPG em ambos os pHs (UCHIMA et al., 2010; FENG et al., 2015; ARTHORNTHURASUK et al., 2018). Contudo, quando comparado com uma β -glicosidase de bactéria probiótica e uma de rúmen de vaca, com K_m de 0,32 mM e 0,552 mM, respectivamente, as afinidades pelo substrato pNPG foram semelhantes ao da β -G 72-26 no pH 10,0; mas com pH 7,0 ainda apresentando uma afinidade \approx 6 vezes maior (FLORINDO et al., 2018; SUWAN et al., 2017).

Os valores de K_{cat} encontrados foram de $0,87 \text{ s}^{-1}$ (pH 7,0) e $0,98 \text{ s}^{-1}$ (pH 10,0) o que indica que a enzima a pH 10,0 é cataliticamente mais rápida com substrato pNPG em relação ao pH 7,0. Quando comparado a literatura pode-se observar que para outras enzimas β -glicosidase também de cupins superiores, que apresentaram valores de K_{cat} de $3,7 \text{ s}^{-1}$ e $8,98 \text{ s}^{-1}$, a velocidade de catálises da β -G 72-26 foi menor. E quando comparada a β -glicosidase de uma bactéria probiótica e uma de rúmen de vaca, com valores de 88 s^{-1} e $88,5 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, mostrou uma velocidade catalítica ainda muito menor. Já quanto a constante que analisa a especificidade ou eficiência cinética da enzima (K_{cat}/K_m), os resultados para β -G 72-26 foram de $0,016 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ (pH 7,0) e $0,001 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ (pH 10,0), apresentando valores semelhantes a outras β -glicosidases também de cupins superiores, as quais obtiveram valores de $0,002$ e $0,006 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, foram obtidos, mostrando que a enzima a pH 7 é dez vezes mais específica e eficiente cataliticamente ao substrato pNPG do que em pH 10,0. Quando comparada a β -glicosidase de uma bactéria probiótica e uma de rúmen de vaca, com valores de $0,2$ e $0,16 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, respectivamente, a especificidade da β -G 72-26 foi menor (FENG et al., 2015; ARTHORNTHURASUK et al., 2018; FLORINDO et al., 2018; SUWAN et al., 2017).

A β -G 72-26 foi alinhada com sequências estruturadas do PDB a fim de analisar a conservação de domínios e sítios ativos na sequência. Foram

encontrados três domínios para a β -G 72-26, domínio 1, 2 e 3, sendo o 1 e 2 com função apresentando os resíduos catalíticos D233 e E417, respectivamente, e o domínio 1 ainda apresenta outros resíduos relacionados a ligação ao carboidrato. A presença de aminoácidos catalíticos do tipo ácido no sitio ativo da enzima β -G 72-26, explica a maior velocidade e eficiência catalítica da enzima a pH básico (pH 10,0) com o substrato pNPG, uma vez que garante a ionização dos grupos carboxilo e com isso as cargas negativas necessárias para a catálise. Varghese et al., (1999) foram os primeiros a detectar os domínios das β -glicosidases GH3 e ele anotaram dois domínios: $(\alpha/\beta)_8$ -barril (TIM barril) e uma $(\alpha/\beta)_6$ folha (β -sanduíche). Atualmente outros trabalhos descrevem esses mesmos domínios e mais um terceiro que é anotado como Fibronectina III, mas não apresenta função catalítica conhecida, corroborando com os resultados de alinhamento (GUDMUNDSSON et al., 2016; FLORINDO et al., 2018).

7.0 CONCLUSÃO

A produção de uma β -glicosidase (β -G 72-26) a partir do metagenoma do cupim de *S. wheeleri* mostrou-se eficiente, visto que foi possível produzi-la em quantidades consideráveis em sistema de expressão heteróloga. Além disso, os resultados de caracterização bioquímica e estrutural, como atividade ótima em pH 10,0, que a tornam interessantes para aplicações biotecnológicas que necessitem de condições extremas. A caracterização de uma enzima celulase advinda de um dos principais degradadores de lignocelulose mundial e da espécie endêmica do Cerrado brasileiro, é fundamental para a descoberta de novas enzimas que possam ser utilizadas em auxílio ou substituindo aquelas que já estão no mercado.

Além disso, a caracterização de uma nova enzima β -glicosidase GH3, a partir da microbiota de intestino de cupim, contribui para uma maior qualificação em bancos de dados de β -glicosidasas da família GH3, já que a maioria das depositadas, e advindas de cupim, pertencem à família das GH1. Por isso, os estudos de metagenoma são importantes para esse tipo de trabalho, pois possibilitam acessar microrganismos que não são cultiváveis e dessa forma poder bioprospectar novas enzimas que podem ser caracterizadas e utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. et al. Microbial β -Glucosidase : Sources , Production and Applications. v. 5, n. 1, p. 31–46, 2017.

ARIÉ, J. et al. Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. v. 62, n. September, p. 427–437, 2006.

ARTHORNTHURASUK, S.; JENKHETKAN, W. Molecular Characterization and Potential Synthetic Applications of GH1 β -Glucosidase from Higher Termite *Microcerotermes annandalei*. 2018.

BAR-ON, Y. M.; PHILLIPS, R.; MILO, R. The biomass distribution on Earth. 2018.

BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2016.

BHATIA, Y. et al. Microbial β -Glucosidases : Cloning , Properties , and Applications
Microbial β -Glucosidases : Cloning , Properties ,. v. 8551, n. November, 2016.

BÖHM, G. **CDNN: CD spectra deconvolution software version 2.1**, University of Halle-Wittenberg: Halle, 1997.

BRUNE, A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 3, p. 168–180, 2014.

CANTAREL, B. I. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 233–238, 2009.

CONSTANTINO, R. Revision of the Neotropical Termite Genus *Syntermes* Holmgren (Isoptera: Termitidae). **The University of Kansas Science Bulletin**, v. 55, n. 13, p. 455-518, 1995.

COQUEL, A. et al. Localization of Protein Aggregation in *Escherichia coli* Is Governed by Diffusion and Nucleoid Macromolecular Crowding Effect. v. 9, n. 4, 2013.

COUGHLAN, M. P; TUOHY, M. G; FILHO, E. X. F; PULS, J; CLAYESSENS, M; VRSANSKÁ, M; HUGHES, M. M. **Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems**. In: Coughlan MP & Hazlewood

GP (Editors), *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press, London, p. 53-84, 1993.

COURNOYER B, F. D. Radiation and Functional Specialization of the Family-3 Glycoside Hydrolases. **J Mol Microbiol Biotechnol.**, p. 190–198, 2003.

COWAN, D. et al. Metagenomic gene discovery: Past, present and future. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 321–329, 2005.

CULLIGAN, E. P. et al. Metagenomics and novel gene discovery Metagenomics and novel gene discovery Promise and potential for novel therapeutics. v. 5594, n. April, p. 399–412, 2016.

DAI, J.; PATTI, A. F.; SAITO, K. Recent developments in chemical degradation of lignin: catalytic oxidation and ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 45, p. 4945–4951, 2016.

DIONISI, H. M.; LOZADA, M.; OLIVERA, N. L. Bioprospection of marine microorganisms : biotechnological applications and methods. p. 49–60, 2012.

DODD, D. et al. Functional Diversity of Four Glycoside Hydrolase Family 3 Enzymes from the Rumen Bacterium *Prevotella bryantii* B 1 4 □ †. v. 192, n. 9, p. 2335–2345, 2010.

DUAN, C. et al. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. v. 107, p. 245–256, 2009.

DYK, J. S. VAN; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — Factors affecting enzymes , conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

ELIFANTZ, H. et al. Diversity and abundance of glycosyl hydrolase family 5 in the North Atlantic Ocean. v. 63, p. 316–327, 2008.

FENG, T.; LIU, H.; XU, Q. Identification and Characterization of Two Endogenous β - Glucosidases from the Termite *Coptotermes formosanus*. 2015.

FLORINDO, R. N. et al. Structural and biochemical characterization of a GH3 B-glucosidase from the probiotic bacteria *Bifidobacterium adolescentis*. **Biochimie**, 2018.

GENG, A. et al. Biotechnology for Biofuels Transcriptome analysis of the digestive system of a wood - feeding termite (*Coptotermes formosanus*) revealed a unique mechanism for effective biomass degradation. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–14, 2018.

GILKES NR, HENRISSAT B, KILBURN DG, MILLER RC JR, AND W. R. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiol Rev**, v. 55, n. 2, p. 303–315, 1991.

GRABER, J. R.; LEADBETTER, J. R.; BREZNAK, J. A. *primitia* sp . nov ., the First Spirochetes Isolated from Termite Guts. v. 70, n. 3, p. 1315–1320, 2004.

GUDMUNDSSON, M. et al. Structural and functional studies of the glycoside hydrolase family 3 b -glucosidase Cel3A from the moderately thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* research papers. p. 860–870, 2016.

GUPTA, V. K. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications**. Galway: Elsevier, 2016.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, n. 2, p. 695–696, 1996.

HUANG, L. et al. dbCAN-seq : a database of carbohydrate-active enzyme (CAZyme) sequence and annotation. v. 46, n. October 2017, p. 516–521, 2018.

IZUMI, T. et al. Human Nutrition and Metabolism Soy Isoflavone Aglycones Are Absorbed Faster and in Higher Amounts than Their Glucosides in Humans. n. December 1999, p. 1695–1699, 2018.

JONG, E. DE; GOSSELINK, R. J. A. **Chapter 17 – Lignocellulose-Based Chemical Products**. [s.l.] Elsevier, 2014.

KETUDAT, J. R.; ASIM, C. b -Glucosidases. p. 3389–3405, 2010.

KLEMM, D. et al. Polymer Science Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material *Angewandte*. p. 3358–3393, 2005.

KRISCH, J. et al. Characteristics and potential use of β -glucosidases from *Zygomycetes*. p. 891–896, 2010.

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of

Bacteriophage T4. **Nature**, 1970.

LAM, K. N. et al. Current and future resources for functional metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–8, 2015.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. **Holzforschung**, v. 60, n. 2, p. 156–161, 2006.

NIMCHUA, T. et al. Metagenomic analysis of novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite guts inhabiting microbes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 462–469, 2012.

OAKLEY, B. R.; KIRSCH, R.; MORRIS, N. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. v. 363, p. 361–363, 1980.

PACE, C. N.; SHIRLEY, B. A.; THOMPSON, J. A. Measuring conformational stability of a protein. In: **Protein structure: A practical approach**. [s.l: s.n.], 1989.

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. v. 30, p. 879–903, 2012.

PU, Y. et al. The new forestry biofuels sector. p. 58–73, 2008.

RALPH, J. Lignins. p. 1–10, 2007.

RAMÍREZ-ESCUADERO, M. et al. Structural and Functional Characterization of a Ruminal α -Glycosidase Defines a Novel Subfamily of Glycoside Hydrolase Family 3 with Permuted Domain Topology * Edited by Gerald Hart. v. 291, n. 46, p. 24200–24214, 2016.

RANI, R. et al. Bioresource Technology Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

RAVACHOL, J. et al. Characterization of All Family-9 Glycoside Hydrolases Synthesized by the Cellulosome-producing Bacterium. v. 289, n. 11, p. 7335–7348, 2014.

RAVIN, N. V; MARDANOV, A. V; SKRYABIN, K. G. Metagenomics as a Tool for the Investigation. v. 51, n. 5, p. 431–439, 2015.

RODRIGUES, R. S. PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES DO FUNGO DA PODRIDÃO-BRANCA *Pycnoporus sanguineus* PF-2. p. 146, 2014.

ROSENTHAL, A. Z. et al. RNA-seq reveals cooperative metabolic interactions between two termite-gut spirochete species in co-culture. **The ISME Journal**, v. 5, n. 7, p. 1133–1142, 2011.

SANTANA, R. H. et al. The Gut Microbiota of Workers of the Litter-Feeding Termite *Syntermes wheeleri* (Termitidae : Syntermitinae): Archaeal , Bacterial , and Fungal Communities. 2015.

SCHARF, M. E.; BOUCIAS, D. G. Potential of termite-based biomass pre-treatment strategies for use in bioethanol production. **Insect Science**, v. 17, n. 3, p. 166–174, 2010.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303–310, 2003.

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

SINHA, A. K. et al. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1409–1426, 2020.

SOMERA, G. N. Proteins and temperature. 1995.

SU, L. et al. Comparative Gut Microbiomes of Four Species Representing the Higher and the Lower Termites. v. 16, n. 1, 2016.

SUWAN, E.; ARTHORNTHURASUK, S.; KONGSAEREE, P. T. Conference paper A metagenomic approach to discover a novel β -glucosidase from bovine rumens. 2017.

TALLEY, K.; ALEXOV, E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. v. 78, n. 12, p. 2699–2706, 2011.

TAYLOR, P.; BALAT, M.; AYAR, G. Biomass Energy in the World , Use of Biomass and Potential Trends Biomass Energy in the World , Use of Biomass and. n. May 2015, p. 37–41, 2006.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. p. 523–533, 2003.

THONGARAM, T.; HONGO, H. Y.; KOSONO, S. Comparison of bacterial communities in the alkaline gut segment among various species of higher termites. p. 229–238, 2005.

TOKUDA, G. et al. Metabolomic profiling of ¹³C-labelled cellulose digestion in a lower termite: insights into gut symbiont function. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1789, p. 20140990–20140990, 2014.

UCHIMA, C. A.; TOKUDA, G. Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated β -glucosidase from the termite *Neotermes koshunensis* in *Aspergillus oryzae*. p. 1761–1771, 2011.

VARGHESE, J. N.; HRMOVA, M.; FINCHER, G. B. Three-dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. n. 3, p. 179–190, [s.d.].

WANG, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. v. 289, p. 1–30, 2005.

WARNECKE, F. et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 560–565, 2007.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87–112, 1988.

YOSHIDA, E. et al. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. v. 49, p. 39–49, 2010.

ZHOU, J. et al. Diversity, Roles, and Biotechnological Applications of Symbiotic Microorganisms in the Gut of Termite. **Current Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.

9.0 APÊNDICE

a) Árvore filogenética da Família GH5.

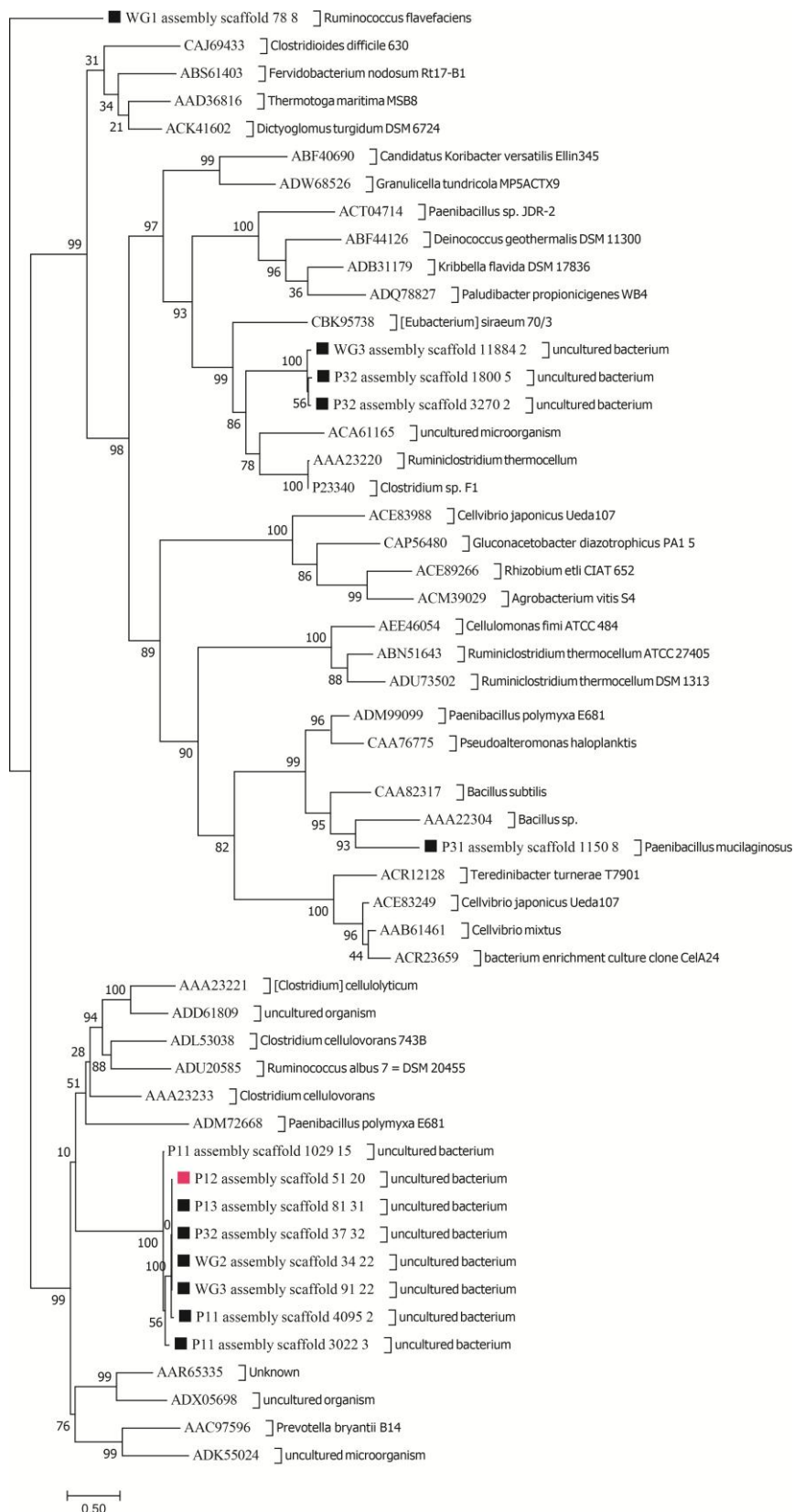


Figura 30. Árvore filogenética com sequências da Família GH5. As endoglucanases se classificaram dentro da Família das GHs 5. Em rosa a sequência de endoglucanase sintetizada. ■ sequências metagenômicas de intestino de cupim.

b) Árvore filogenética da Família GH9.

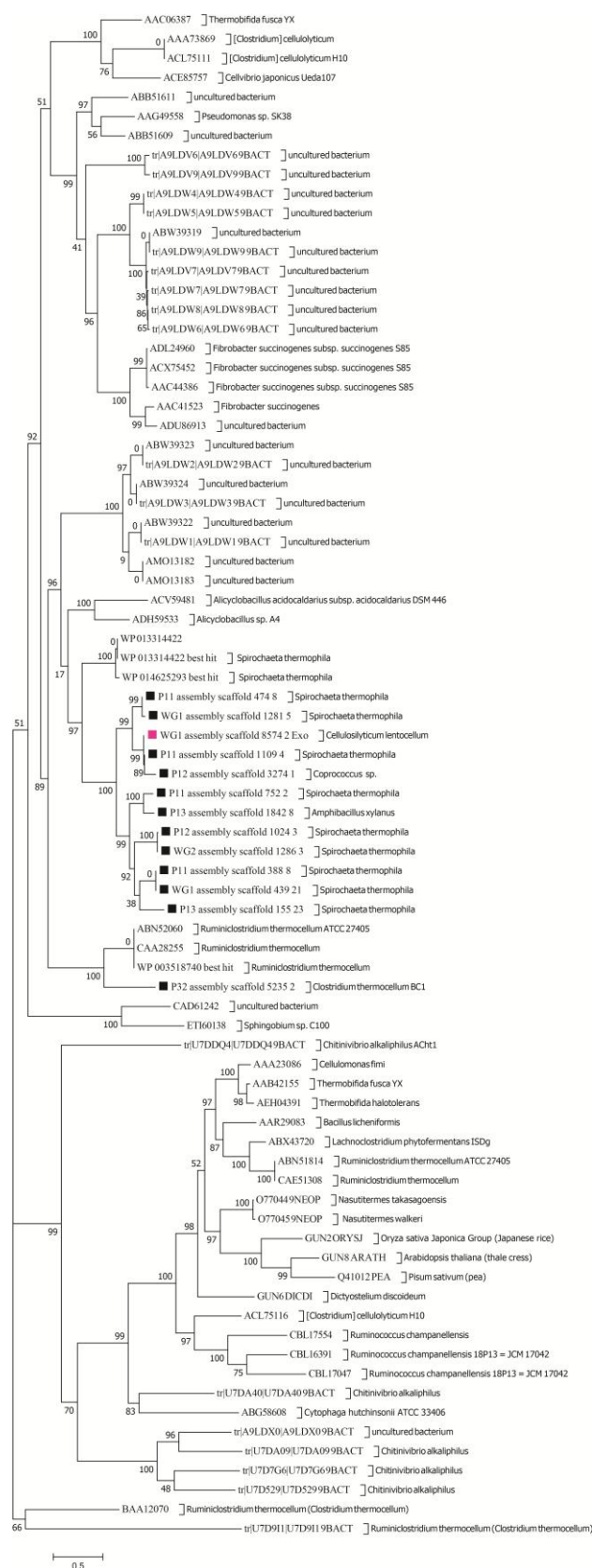


Figura 31. Árvore filogenética com sequências da Família GH9. As endoglucanases e as exoglucanases se classificaram dentro da Família das GHs 9. Em rosa a sequência de exoglucanase sintetizada. ■ sequências metagenômicas de intestino de cupim.

c) Árvore filogenética da Família GH3.

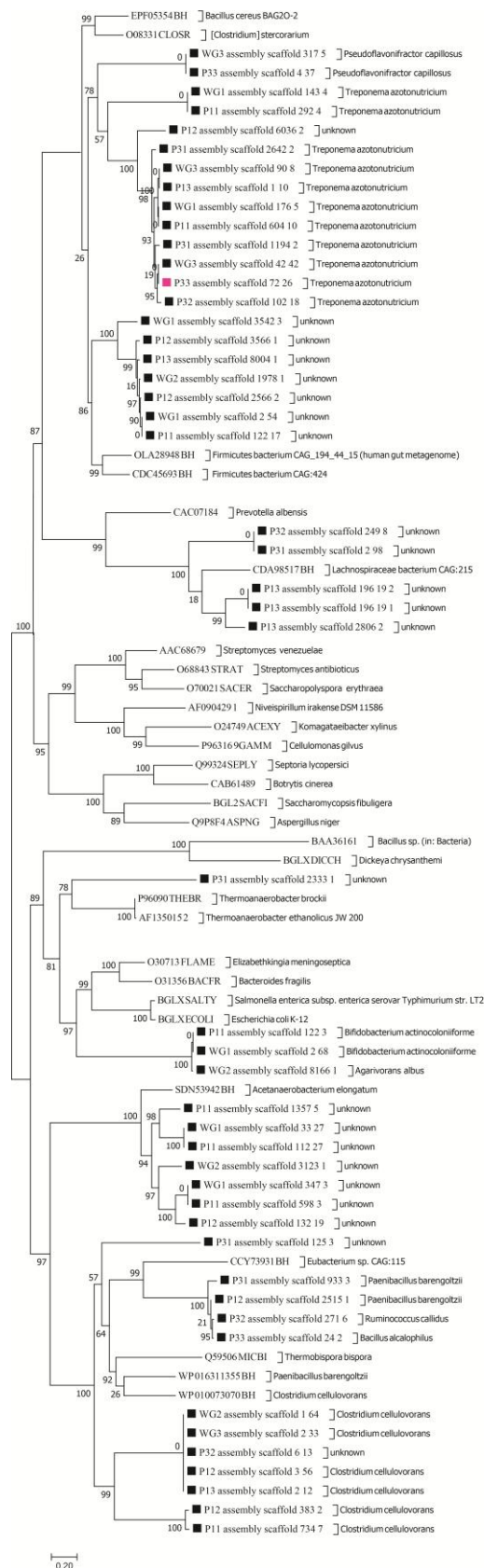


Figura 32. Árvore filogenética com sequências da Família GH3. As β -glicosidases se classificaram dentro da Família das GHs 3. Em rosa a sequência de β -glicosidase sintetizada. ■ sequências metagenômicas de intestino de cupim.

d) Tabela com as sequências de endoglucanases selecionadas após edição de bioinformática.

Na Tabela 5 abaixo a sequência em vermelho representa a sequência selecionada para síntese em plasmídeo pET24a (+). Esta sequência foi escolhida por apresentar o maior valor de metatranscriptoma.

Tabela 5. Sequências de endoglucanases após edições no GENEIOUS.

Nome da sequência	Família	Filo	Organismo	Identidade %	Integridade do genoma	Cobertura por milhões de reads
P11_assembly_scaffold_1029_15	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	36.8	megabin	0,0679
P11_assembly_scaffold_1109_4	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	45.2	near complete	0,0106
P11_assembly_scaffold_3022_3	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	35.0	megabin	0,0418
P11_assembly_scaffold_388_8	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	46.8	megabin	0,0937
P11_assembly_scaffold_4095_2	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	39.5	megabin	0,0115
P11_assembly_scaffold_474_8	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	47.1	partial	0,0143
P11_assembly_scaffold_752_2	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	46.8	partial	0,042
P12_assembly_scaffold_1024_3	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	45.3	megabin	0,0285
P12_assembly_scaffold_3274_1	GH9	Firmicutes	<i>Coprococcus sp. CAG:782</i>	38.3	partial	0,0196
P12_assembly_scaffold_51_20	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	35.6	near complete	0,1428
P13_assembly_scaffold_155_23	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	48.1	megabin	0,0115
P13_assembly_scaffold_1842_8	GH9	Firmicutes	<i>Amphibacillus xylanus</i>	39.6	megabin	0,0106
P13_assembly_scaffold_81_31	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	35.6	near complete	0,0353
P32_assembly_scaffold_1800_5	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	47.4	megabin	x
P32_assembly_scaffold_3270_2	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	48.1	megabin	x
P32_assembly_scaffold_37_32	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	35.6	near complete	x
P32_assembly_scaffold_5235_2	GH9	Firmicutes	<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>	47.4	megabin	x
P32_assembly_scaffold_8334_2	GH51	?	<i>uncultured bacterium</i>	63.7	megabin	x
WG1_assembly_scaffold_1281_5	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	47.6	near complete	0,0047
WG1_assembly_scaffold_439_21	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	46.8	megabin	0,0342
WG1_assembly_scaffold_78_8	GH5	Firmicutes	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	31.1	megabin	0,0535
WG2_assembly_scaffold_1286_3	GH9	Spirochaetes	<i>Spirochaeta thermophila</i>	45.5	megabin	0,0114
WG2_assembly_scaffold_34_22	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	35.6	megabin	0,1176
WG3_assembly_scaffold_11884_2	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	47.7	partial	0,003
WG3_assembly_scaffold_91_22	GH5	?	<i>uncultured bacterium</i>	35.6	partial	0,0776

e) Tabela com as sequências de exoglucanases selecionadas após edição de bioinformática.

Na tabela 6 abaixo a sequência representa a sequência selecionada para síntese em plasmídeo pET24a (+). Esta sequência foi escolhida por ser a única restante após as edições que fosse uma GH. As outras 2 sequências eram estrutural da Camada S.

Tabela 6. Sequência de exoglucanase após edições no GENEIOUS.

Nome da sequência	Família	Filo	Organismo	Identidade %	Integridade do genoma	Cobertura por milhões de reads
WG1_assembly_scaffold_8574_2	GH9	Firmicutes	<i>Cellulosilyticum lentocellum</i>	47.3	megabin	0,005107706

f) Tabela com as sequências de β -glicosidases selecionadas após edição de bioinformática - Metodologia

Na Tabela 7 abaixo a sequência em vermelho representa a sequência selecionada para síntese em plasmídeo pET24a (+). Esta sequência foi escolhida por apresentar o maior valor de metatranscriptoma.

Tabela 7. Sequências de β -glucosidases após edições no GENEIOUS.

Nome da sequência	Família	Filo	Organismo	Identidade %	Integridad e do genoma	Cobertura por milhões de reads
P11_assembly_scaffold_112_27	GH3	?	<i>unclassified sequences</i>	63.3	near	x
P11_assembly_scaffold_122_17	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:424</i>	57.3	complete	0,04423
P11_assembly_scaffold_122_3	GH3	Actinobacteri a	<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	40.1	partial	0,04643
P11_assembly_scaffold_1357_5	GH3	?	<i>unclassified sequences</i>	66.4	megabin	x
P11_assembly_scaffold_292_4	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	47.5	megabin	0,01183
P11_assembly_scaffold_598_3	GH3	?	<i>unclassified sequences</i>	66.0	megabin	x
P11_assembly_scaffold_604_10	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	52.8	partial	0,0303
P11_assembly_scaffold_734_7	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	40.6	megabin	0,01996
P12_assembly_scaffold_132_19	GH3	?	<i>unclassified sequences</i>	66.5	partial	x
P12_assembly_scaffold_2515_1	GH3	Firmicutes	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	39.5	megabin	0,001
P12_assembly_scaffold_2566_2	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:424</i>	57.3	megabin	0,01238
P12_assembly_scaffold_3_56	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	42.5	near	0,06657
P12_assembly_scaffold_3566_1	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:424</i>	56.9	complete	0,00279
P12_assembly_scaffold_383_2	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	40.9	megabin	0,01194
P12_assembly_scaffold_6036_2	GH3	Firmicutes	<i>BJP_IG2157_Clostridiales_52_13</i>	45.9	megabin	0,00367
P13_assembly_scaffold_1_10	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	53.0	megabin	0,01506
P13_assembly_scaffold_196_19	GH3	Firmicutes	<i>Lachnospiraceae bacterium CAG:215</i>	50.2	megabin	0,00272
P13_assembly_scaffold_2_12	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	42.5	megabin	0,01484
P13_assembly_scaffold_2806_2	GH3	Firmicutes	<i>Dorea longicatena CAG:42</i>	44.8	megabin	x
P13_assembly_scaffold_8004_1	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:424</i>	57.6	megabin	0,01129
P31_assembly_scaffold_1194_2	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	53.0	megabin	x
P31_assembly_scaffold_125_3	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	40.3	megabin	x
P31_assembly_scaffold_2_98	GH3	Firmicutes	<i>Lachnospiraceae bacterium CAG:215</i>	45.0	near	x
P31_assembly_scaffold_2333_1	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:24</i>	49.4	complete	x
P31_assembly_scaffold_2642_2	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	52.7	megabin	x
P31_assembly_scaffold_933_3	GH3	Firmicutes	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	38.7	megabin	x
P32_assembly_scaffold_102_18	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	52.5	megabin	x
P32_assembly_scaffold_249_8	GH3	Firmicutes	<i>Lachnospiraceae bacterium CAG:215</i>	45.0	megabin	x
P32_assembly_scaffold_271_6	GH3	Firmicutes	<i>Ruminococcus callidus</i>	39.8	megabin	x
P32_assembly_scaffold_6_13	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	42.5	megabin	x
P33_assembly_scaffold_24_2	GH3	Firmicutes	<i>Bacillus alcalophilus</i>	37.6	megabin	0,05312
P33_assembly_scaffold_4_37	GH3	Firmicutes	<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	60.8	near	0,01916
P33_assembly_scaffold_72_26	GH3	Spirochaete s	<i>Treponema azotonutricium</i>	53.0	partial	0,6117
WG1_assembly_scaffold_143_4	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	47.5	megabin	x
WG1_assembly_scaffold_176_5	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	52.8	megabin	0,01662
WG1_assembly_scaffold_2_54	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:424</i>	57.3	megabin	0,00263
WG1_assembly_scaffold_2_68	GH3	Actinobacteri a	<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	40.1	megabin	0,02836
WG1_assembly_scaffold_33_27	GH3	?	<i>unclassified sequences</i>	64.3	megabin	x
WG1_assembly_scaffold_347_3	GH3	?	<i>unclassified sequences</i>	66.0	megabin	x
WG1_assembly_scaffold_3542_3	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:194</i>	54.7	megabin	x

WG2_assembly_scaffold_1_64	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	42.5	near complete	0,03097
WG2_assembly_scaffold_1978_1	GH3	Firmicutes	<i>Firmicutes bacterium CAG:424</i>	57.5	megabin	0,00724
WG2_assembly_scaffold_3123_1	GH3	?	<i>unclassified sequences</i>	71.4	megabin	x
WG2_assembly_scaffold_8166_1	GH3	Proteobacteria	<i>Agarivorans albus</i>	43.1	megabin	x
WG3_assembly_scaffold_2_33	GH3	Firmicutes	<i>Clostridium cellulovorans</i>	42.5	megabin	0,02589
WG3_assembly_scaffold_317_5	GH3	Firmicutes	<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	60.8	megabin	0,00336
WG3_assembly_scaffold_42_42	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	53.0	megabin	0,04235
WG3_assembly_scaffold_90_8	GH3	Spirochaetes	<i>Treponema azotonutricium</i>	53.0	megabin	0,01706

10.0 ANEXOS - Metodologia

a) Preparo de células competentes

- 1- Riscar uma placa de Petri contendo meio LB sem antibiótico a partir do estoque da linhagem de interesse e incubar à 37°C *overnight* (toda a noite);
- 2- Inocular uma colônia isolada em 5 mL de meio LB ou SOB em tubo falcon de 50 mL. Incubar a cultura *overnight* à 37°C e 200 rpm;
- 3- Inocular 1 mL da cultura em 500 mL de meio LB em frasco Erlenmeyer de 1 L;
- 4- Acompanhar o crescimento da cultura por meio da leitura em espectrofotômetro utilizando OD₆₀₀. Deixar a cultura atingir a OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5 (o tempo de crescimento depende da linhagem escolhida, geralmente o tempo é de 5 horas);
- 5- Transferir a cultura para um banho de gelo e incubar por 30 min;
- 6- Baixar as células, usando tubos de 50mL ou 250 mL em centrífuga à 2000 x g por 20 minutos à 4°C;
- 7- Remover o meio e secar o tubo invertendo-o em papel toalha;
- 8- Ressuspender o pellet gentilmente em 250 mL de glicerol 10% (0-4°C) – realizar esse procedimento em banho com gelo para evitar aquecimento das células;
- 9- Baixar as células em centrífuga à 2000g por 20 minutos à 4°C;
- 10-Remover o meio e secar o tubo invertendo-o em papel toalha;
- 11-Ressuspender o pellet gentilmente em 50 mL de glicerol 10% (0-4°C) – realizar esse procedimento em banho com gelo para evitar aquecimento das células;
- 12-Baixar as células em centrífuga à 2000g por 20 minutos à 4°C;
- 13-Ressuspender o pellet gentilmente em 1 mL de meio GYT (0-4°C) – realizar esse procedimento em banho com gelo para evitar aquecimento das células;
- 14-Fazer uma diluição de 1:100 e realizar uma leitura da OD₆₀₀. As células competentes devem ficar em uma diluição entre 2x10¹⁰ e 3x10¹⁰ células/mL (OD₆₀₀ = 1,0 = aproximadamente 2,5x10⁸ células/mL), fazer o ajuste da diluição usando o meio GYT;

- 15- Estocar em alíquotas de 50 μL e congelar imediatamente em Nitrogênio líquido ou gelo seco com álcool; (OBS.: Deixar no gelo os tubos e ir alíquotando);
- 16- Estocar a -80°C (Ultrafreezer).

b) Eletroporação

- 1- Retirar uma alíquota e descongelá-la em banho de gelo.
- 2- Separar a quantidade necessária de cuvetas para a eletroporação das bactérias e deixá-las no gelo. Nesse caso foram utilizadas cuvetas de 1mm.
- 3- Adicionar aos tubos contendo 50 μL de bactéria competente de 10pg à 25ng de DNA em um volume de 1-2 μL em cada tubo.
- 4- Incubar o tubo no gelo por 1 minuto.
- 5- Ajustar o eletroporador (Gene Pulser Xcell™ System, BIO-RAD) para as condições de transformação das bactérias (SET - VOLTS: 1,8 kV, Capacitância: 25 mF e Resistência: 200 Ω .);
- 6- Pipetar as células misturadas com o DNA na cuveta de eletroporação armazenadas no gelo. Secar e limpar a parte de fora da cuveta, antes de dar o pulso elétrico;
- 7- O *time constant* (valor que o aparelho fornece após o pulso) deve ser entre 3 e 4 milisegundos;
- 8- Após o pulso, adicionar 1 mL de meio SOC (não ultrapassar os 20 s), transferir para um tubo de 1,5 mL e incubar por 1 hora com baixa agitação à 37°C ;
- 9- Plaquear diferentes volumes (50 μL , 100 μL e 200 μL) da transformação em meio LBágar contendo o antibiótico apropriado, que nesse caso foi Canamicina [] final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
- 10- Esperar o líquido plaqueado secar, tampar as placas, vedar com plástico filme de PVC,
- 11- Incubar a 37°C *overnight*. (As colônias devem aparecer com tempo de incubação entre 12 e 16 horas).

c) Tampão de amostra 2X Tris-HCl 200 mM; pH 6,8

Tabela 8: Preparação de um tampão de amostra 2X.

Reagentes	Porcentagem (%)
SDS	4% (v/v)
β -mercaptoetanol	4% (v/v)
Glicerol	20% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

Preparar alíquotas de cerca de 1,0 mL e estocar a temperatura ambiente.

d) Gel de SDS-PAGE

Tabela 9: Preparação de gel SDS-PAGE.

Reagentes para o SDS-PAGE	Gel Separador 12% (3 géis)	Gel concentrador 5% (3 géis)
30% Bis/Acrilamida	6 mL	1,24 mL
Água	5,10 mL	5,25 mL
Tampão Tris-HCl, pH 8,8	3,75 mL	-
Tampão Tris-HCl, pH 6,8	-	1,02 mL
SDS 10%	150 μ L	40,8 μ L
APS 10%	150 μ L	75 μ L
TEMED	9 μ L	9 μ L

e) Tampão de corrida (5X) para gel de SDS-PAGE**Tabela 10:** Preparação de tampão de corrida 5X para gel de SDS-PAGE.

Reagentes	Concentração
Tris base	125 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,5% (p/v)

f) Solução corante para gel de SDS-PAGE**Tabela 11:** Preparação de solução corante para gel de SDS-PAGE.

Reagentes	Concentração
Azul brilhante de Coomassie R-250	0,25% (p/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)
Metanol	30% (v/v)

g) Solução descorante para gel de SDS-PAGE**Tabela 12:** Preparação de solução descorante para gel de SDS-PAGE.

Reagentes	Concentração
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

h) Soluções para o protocolo de Lowry

1. Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1%
2. Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 2%
3. Carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2%
4. Hidróxido de sódio (NaOH) 1M
5. Folin-Ciocalteu diluído na proporção de $\frac{1}{2}$ em água bidestilada (MilliQ®).

Reagente A: 200 μL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% + 200 μL $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2% + completar para 20 mL com Na_2CO_3 2%

i) Plasmídeo da sequência P12_assembly_scaffold_51_20 (β -1,4-endoglucanase)

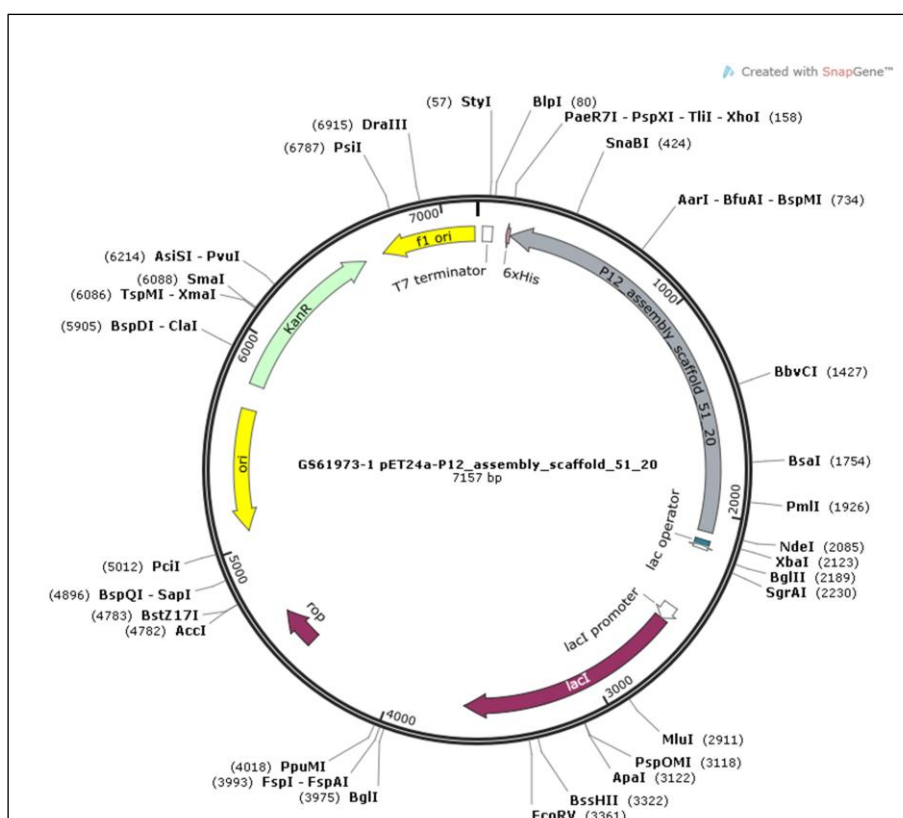


Figura 33. Plasmídeo pET24a (+) com o gene da β -1,4-endoglucanase (P12_assembly_scaffold_51_20).

j) Plasmídeo da sequência WG1_assembly_scaffold_8574_2 (exoglucanase)

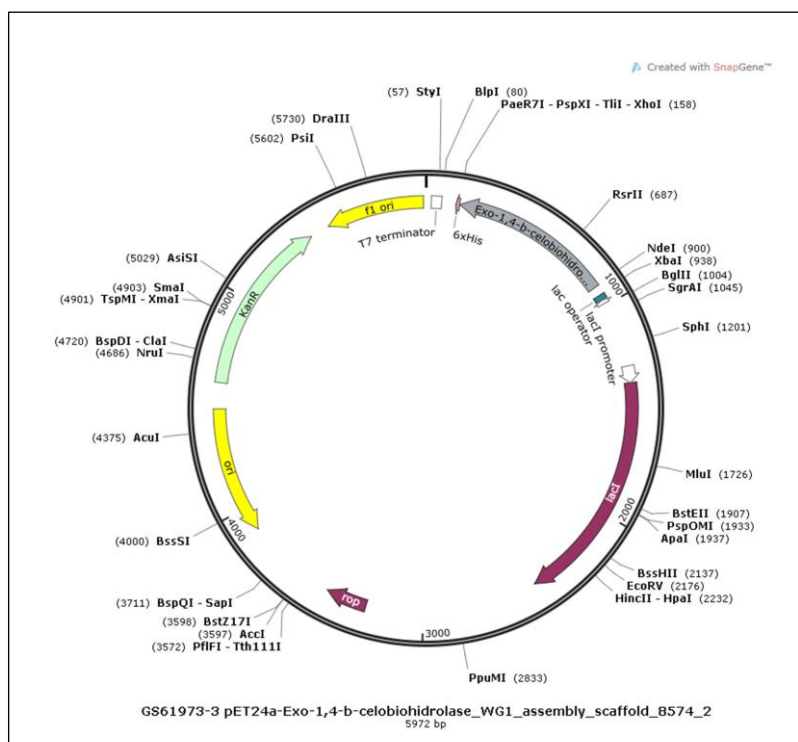


Figura 34. Plasmídeo pET24a (+) com o gene da exoglucanase (WG1_assembly_scaffold_8574_2).

k) Plasmídeo da sequência P33_assembly_scaffold_72_26 (β -glicosidase)

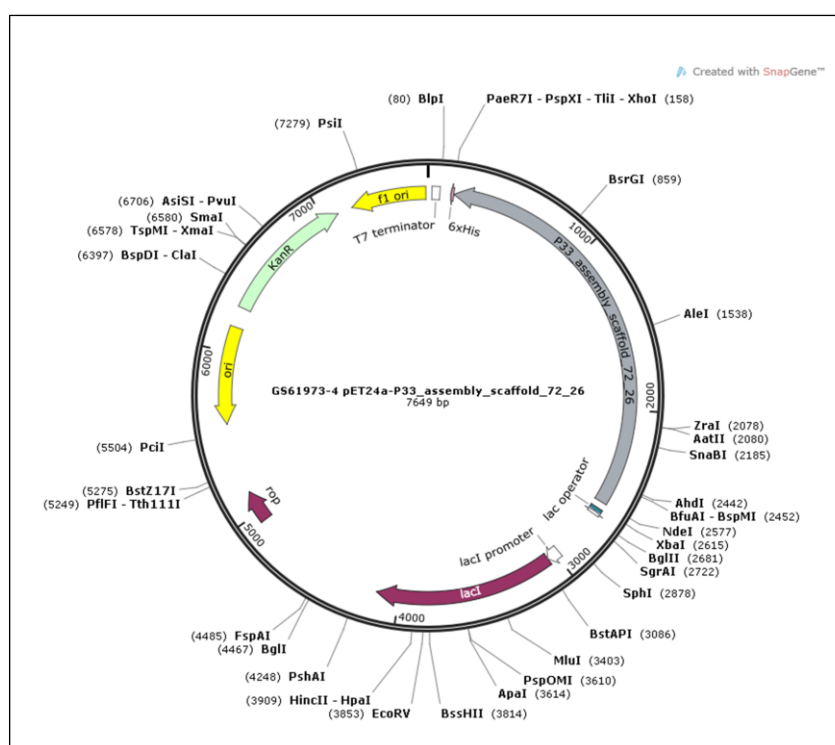


Figura 35. Plasmídeo pET24a (+) com o gene da β -glicosidase (P33_assembly_scaffold_72_26).

11.0 ANEXOS – Participações em Eventos Científicos

