



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE AMILASES PUTATIVAS DE BACTÉRIAS
TERMÓFILAS**

Mario Pereira da Silva Neto

Brasília

2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE AMILASES PUTATIVAS DE BACTÉRIAS
TERMÓFILAS**

Mario Pereira da Silva Neto

Orientadora: Dra. Eliane Ferreira Noronha

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília

2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE AMILASES PUTATIVAS DE BACTÉRIAS
TERMÓFILAS**

Mario Pereira da Silva Neto

Orientadora: Dra. Eliane Ferreira Noronha

BANCA EXAMINADORA:

- ✓ Dra. Pérola Magalhães – Membro Externo
- ✓ Dra. Sônia Freitas – Membro Interno
- ✓ Dr. Tatsuya Nagata – Suplente

Brasília

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, ao Grande Mestre Jesus e a toda Espiritualidade por me concederem a oportunidade de mais essa conquista. Pela saúde, pela força, pelo ânimo e por todas as tão agradáveis condições que me possibilitam sempre caminhar na direção dos meus sonhos.

Agradeço a toda a minha família, aos meus queridos irmãos, com quem tenho a feliz oportunidade de conviver todos os dias: Lucas Mattos e Juliana de Mattos. Agradeço às minhas avós, tios (as), primos (as), cunhadas, sogros. Agradeço em especial aos meus pais, Mario Filho e Janaina de Mattos, por todo o incentivo. Por todo o apoio. Por todos os ensinamentos e valores que sempre me foram transmitidos. Por realizarem o possível e o impossível para me proporcionarem as melhores condições para alcançar meus objetivos. Por todo o amor. Por todo o cuidado. Por todo o aprendizado. Por serem grandes exemplos e inspirações em minha vida.

Agradeço à minha namorada Gabriela Santana, por estar sempre ao meu lado, me ouvindo, me apoiando e me fazendo imensamente feliz. Compartilhar minha vida com ela é uma grande alegria e torna tudo mais doce e leve.

Agradeço aos meus amigos, do CVA, do VillaPark, do colégio do Ensino Médio, dos pagodes, e a todos que, direta ou indiretamente, seja com um conselho, uma orientação, uma conversa ou um simples sorriso, me auxiliaram no cumprimento desta etapa.

Agradeço imensamente à minha orientadora Prof. Dra. Eliane Noronha, com quem convivo desde o início da minha jornada na Universidade. Por todo o carinho, pela atenção, pelas oportunidades e por ser como uma mãe dentro do ambiente acadêmico.

Agradeço também a todos os amigos da Enzimologia, pesquisadores, alunos, funcionários, professores e, em especial, ao grupo orientado pela Prof. Dra. Eliane Noronha: Pedro, Alonso, Jéssica, Débora, Brenda, entre tantos outros. Por estarem sempre dispostos a me ajudar e aconselhar. Por todas as risadas. Por todos os cafés “Pilão” na copa. Guardarei com muito carinho as lembranças desses momentos.

Agradeço muito também ao Prof. Tatsuya Nagata, pelo enorme auxílio fornecido nos experimentos envolvendo técnicas de Biologia Molecular desde os primeiros projetos de Iniciação Científica; e à Prof. Janice Marco pela enorme contribuição nos experimentos de purificação proteica. Suas contribuições foram de suma importância para este trabalho.

RESUMO

Amilases estão entre as hidrolases mais utilizadas em processos biotecnológicos, podendo ser aplicadas em indústrias têxteis, alimentícias, de detergentes, de produção de papel e de biocombustíveis. O fato de as amilases apresentarem uma grande relevância no mercado mundial de enzimas e de os microorganismos termófilos produzirem enzimas mais resistentes a processos industriais faz com que haja um crescente interesse em termoamilases. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos a clonagem e expressão de genes putativos de amilases das bactérias termófilas *Clostridium thermocellum* (Cthe_0795 e Cthe_2191) e *Paenibacillus barengoltzii* (Amy1), e a caracterização das proteínas heterólogas para avaliar seu potencial de aplicação industrial. Análises de bioinformática para todos os genes foram realizadas, incluindo mapeamento de domínios conservados, predição de peptídeo sinal, alinhamentos de sequências e montagem de árvore filogenética com diferentes amilases já caracterizadas provenientes de procariotos. Os três genes Cthe_0795, Cthe_2191 e Amy1 contêm o domínio GH13 das glicosil hidrolases, com identidade de 84,52% com “pululanases” (*Best hit: Hungateiclostridium mesophilum*), 92,40% com “glycogen branching enzymes” (*Best hit: Hungateiclostridium straminisolvens*), e 91,93% com “alfa amilases” (*Best hit: Paenibacillus rubinfantis*). Cthe_0795, Cthe_2191 e Amy1 foram clonados em *Escherichia coli* BL-21 DE3 utilizando pET 21a; pGEM T e pET21a; e pET21a, respectivamente. A proteína recombinante codificada por Cthe_2191, GIB, foi parcialmente purificada e apresentou atividade enzimática sobre amilose. A proteína recombinante codificada por amy1, AMYPb, foi purificada e caracterizada bioquimicamente, apresentando maior atividade na temperatura de 60°C e pH nas faixas 7 e 8. A enzima manteve 40% da sua atividade após 3 horas de incubação a 50°C, e em torno de 80% quando incubada a 50°C por 2 horas em pH 7, 8 e 9. Os íons CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, KCl, NaCl, CuCl₂, NiCl₂ e EDTA, nas concentrações de 1mM e 10mM não alteraram a sua atividade, sendo completamente inibida por FeCl₃ a 10mM. Tais propriedades bioquímicas fornecem uma boa perspectiva inicial para a aplicação de AMYPb em processos biotecnológicos carreados em condições de temperaturas elevadas e pHs alcalinos baseados na hidrólise do amido, por exemplo.

Palavras-chave: amilases, biologia molecular, enzimologia, expressão heteróloga

ABSTRACT

Amylases are among the most frequently used hydrolases in biotechnological processes and can be applied in textile, food, detergents, papermaking and biofuel industries. Amylases shows a remarkable relevance in enzymes' world market and thermophilic microorganisms produce more resistant enzymes for industrial processes. Thus, there is a crescent interest in thermoamylases. In this context, the present work aimed the cloning and expression of thermophilic bacteria amylase putative genes from *Clostridium thermocellum* (Cthe_2191; Cthe_0795) and *Paenibacillus barengoltzii* (Amy1), and the biochemical characterization of heterologous protein to evaluate their industrial application potential. Bioinformatics analysis for the 3 genes were made, including identification of conserved domains, signal peptide prediction, sequence alignments and construction of phylogenetic tree with different characterized amylases from prokaryotic microorganisms. The three genes Cthe_0795, Cthe_2191 and Amy1 contain the glycoside hydrolases GH13 domain, with 84.52% of identity with "alpha-glycosidases" (Best hit: *Hungateiclostridium mesophilum*), 92.40% with "glycogen branching enzymes" (Best hit: *Hungateiclostridium straminisolvens*), and 91.93% with "alpha-amylases" (Best hit: *Paenibacillus rubinfantis*). Cthe_0795, Cthe_2191 and Amy1 were cloned into *Escherichia coli* BL-21 DE3 using pET 21a; pGEM T and pET21a; and pET21a, respectively. The recombinant protein codified by Cthe_2191, GIB, was partially purified and showed enzymatic activity under amylose. The recombinant protein codified by Amy1, AMYPb, was purified and biochemically characterized, showing higher activity at 60°C and pH 7 and 8. The enzyme retained 40% of activity after 3 hours of incubation at 50°C and retained about 80% when incubated for 2h at 50°C at pHs 7, 8 and 9. The ions CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, KCl, NaCl, CuCl₂, NiCl₂ and EDTA, at concentrations of 1mM and 10mM, had no effect on Amy1 activity, being completely inhibited by FeCl₃ at 10mM. This biochemical properties give a initial good perspective about the potential of application of AMYPb in biotechnological processes that are made on elevated temperature and alkaline pH conditions based on starch's hydrolysis, for example.

Keywords: amylases, molecular biology, enzymology, heterologous expression

APOIO FINANCEIRO

Este projeto teve o apoio financeiro das seguintes instituições de fomento: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento); FAP-DF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal) e com a concessão de bolsa de estudos fornecida pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da (A) amilose e (B) amilopectina. Extraído e adaptado de Tester, R.F.; Karkalas (2002). 17
- Figura 2.** Diferentes enzimas envolvidas na degradação do amido. Anéis sem preenchimento representam a extremidade redutora de um polímero de glicose. Extraído e adaptado de Van der Maarel *et al.* (2002). 19
- Figura 3.** Estrutura tridimensional de uma α -amilase de *Bacillus licheniformis* (PDB: 1BL1). Destacam-se os três domínios conservados dentre as alfa-amilases: A (em vermelho, com a presença do *TIM-Barrel* em amarelo), B (em verde) e C (em azul). Extraído de Pinto, Dorn e Feltes (2020). 21
- Figura 4.** Esquema de parte de um sistema de biorrefinaria de amido e os processos envolvidos na etapa de conversão enzimática. Extraído e adaptado de Läufer (2017). 24
- Figura 5.** Tecnologia do DNA recombinante para a produção de amilases. As etapas envolvem a seleção de um gene eficiente de amilase, inserção do gene no vetor apropriado e transformação em um sistema de expressão eficiente para produção de grandes quantidades do mRNA e proteína recombinantes. Extraído e adaptado de Gopinath *et al.* (2017). 28
- Figura 6.** Esquema de desenho experimental adotado para a execução do projeto. 31
- Figura 7.** Domínios conservados da sequência predita de aminoácidos de AGase obtido por comparação com sequências depositadas aonde utilizando a ferramenta “*Conserved domains*”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). 45
- Figura 8.** Árvore filogenética com sequências de aminoácidos de microorganismos procariotos da plataforma CAZy das 42 subfamílias inclusas na família GH13. Os microorganismos da subfamília 20 das glicosil hidrolases estão indicados por seus *Acession Numbers* seguidos de seu nome científico. Os microorganismos das outras subfamílias foram colabados a fim de diminuir o tamanho da árvore. A análise mostra que a proteína AGase (destacada com um círculo em negrito) se agrupa na subfamília 20 das glicosil hidrolases. 47

Figura 9. Domínios conservados da sequência predita de aminoácidos de GIB obtido por comparação com sequências depositadas aonde utilizando a ferramenta “*Conserved domains*”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)..... 48

Figura 10. Domínios conservados da sequência predita de aminoácidos de AMYPb obtido por comparação com sequências depositadas aonde utilizando a ferramenta “*Conserved domains*”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)..... 50

Figura 11. Análise em gel de agarose 0,8% (m/v) da amplificação dos genes de interesse. (A) Cthe_0795. M: marcador; 1: Fragmento de DNA amplificado de acordo com o tamanho esperado, de aproximadamente 1,7Kb. (B) Cthe_2191. M: marcador; 1: Fragmento de DNA amplificado de acordo com o tamanho esperado, de aproximadamente 2,2Kb. 52

Figura 12. Análise da restrição dos clones 1, 2, 3 e 4 (A) e AG1, AG2 e AG3 (B) com *BamHI* em gel de agarose 0,8% (m/v), com a presença de fragmento esperado de 7,1 Kb indicada pelas setas. (A): 2, 4, 6 e 8) DNA plasmidial dos clones 1, 2, 3 e 4 digeridos. 1, 3, 5 e 7) DNA plasmidial dos clones 1, 2, 3 e 4 não digeridos. 9) DNA plasmidial do clone controle sem inserto digerido. (B): 3, 5 e 7) DNA plasmidial dos clones AG1, AG2 e AG3 digeridos. 2, 4 e 6) DNA plasmidial dos clones AG1, AG2 e AG3 não digeridos. 8) DNA plasmidial do clone controle sem inserto digerido. 53

Figura 13. Análise da expressão dos clones AG1 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em SDS-PAGE 12% (m/v) corado com nitrato de prata de perfil de indução utilizando IPTG 0,5mM a 37°C sob agitação de 200rpm. Presença da proteína AGase indicada pelas setas em branco. M: marcador; 1(1): clone AG1 não induzido; 1(2) clone AG1 induzido por 2,5h; 1(3) clone AG1 induzido por 5h; CT(1): clone negativo não induzido; CT(2): clone negativo induzido por 2,5h; CT(3) clone negativo induzido por 5h. (A): Perfil da fração insolúvel do lisado dos clones em questão. (B): Perfil do sobrenadante (fração solúvel) do lisado dos clones em questão. 54

Figura 14. Análise da restrição dos clones positivos em *E. coli* DH10β (A), *E. coli* XL-10 Gold (B) e *E. coli* BL-21 (C) digeridos com *NdeI* e *XhoI* em gel de agarose 0,8% (m/v), com a presença de fragmentos esperados de 2,2 Kb indicada pelas setas em branco. (A): 1) DNA

plasmidial do clone 1 digerido. (B) 1) DNA plasmidial do clone 1 digerido. (C) 1 e 2) DNA plasmidial dos clones GL1 e GL2 digeridos. 3) DNA plasmidial do clone controle sem inserto digerido.55

Figura 15. Análise da expressão dos clones GL1 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em SDS-PAGE 12% (m/v) corado com nitrato de prata de perfil de indução utilizando IPTG 0,75mM a 37°C sob agitação de 200rpm por 4,5 horas. Presença da proteína GIB indicada pelas setas em branco. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific). 1): clone CT não induzido. 2) clone CT induzido. 3) clone GL1 não induzido. 4) clone 2 induzido. (A): Perfil da fração insolúvel do lisado dos clones em questão. (B): Perfil do sobrenadante (fração solúvel) do lisado dos clones em questão.56

Figura 16. Quantificação da atividade de amilase (ERG) utilizando fração solúvel do lisado do clone 10 induzido e não induzido e clone controle (plasmídeo sem inserto). CT N.I.) clone controle não induzido. CT IND) clone controle induzido. 10 N.I.) clone 10 não induzido; 10IND.) clone 10 induzido. a-b p<0,05; b-c p<0,05.57

Figura 17. Análise em SDS-PAGE 12% (m/v) da purificação parcial de GIB. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific); 150: Amostra eluída com 150mM de Imidazol; 300: Amostra eluída com 300mM de Imidazol; 500(1): Amostra eluída durante a primeira lavagem com 500mM de Imidazol; 500(2): Amostra eluída durante a segunda lavagem com 500mM de Imidazol contendo GIB parcialmente purificada.58

Figura 18. Análise da restrição dos clones 2, 3, 4 e 5 com *BamHI* em gel de agarose 0,8% (m/v), com a presença de fragmento esperado de 7,4 Kb indicada pelas setas. 1) Marcador *GeneRuler 1Kb Dna Ladder*. 2, 3, 4 e 5) DNA plasmidial dos clones 2, 3, 4 e 5 digeridos. 6) DNA plasmidial do clone controle (sem inserto) digerido.59

Figura 19. Análise da expressão dos clones 2 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em SDS-PAGE 12% (m/v) corado com nitrato de prata de perfil de indução utilizando IPTG 0,75mM a 37°C sob agitação de 200rpm por 4,5 horas. Presença da proteína AMYPb indicada pelas setas em branco. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific). 1): clone CT não induzido. 2) clone CT induzido. 3) clone 2 não induzido. 4) clone 2 induzido.

(A): Perfil da fração insolúvel do lisado dos clones em questão. (B): Perfil do sobrenadante (frações solúvel) do lisado dos clones em questão. 60

Figura 20. Quantificação da atividade de α -amilase utilizando fração solúvel do lisado do clone 2 induzido e não induzido e clone controle (plasmídeo sem inserto). CT N.I.) clone controle não induzido. CT IND) clone controle induzido. 2 N.I.) clone 2 não induzido; 2IND.) clone 2 induzido. a-b $p < 0,05$ 61

Figura 21. Análise do perfil de expressão e atividade de α -amilase da fração solúvel dos clones 2 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em Zimograma. Presença da proteína AMYPb indicada pelas setas em branco. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific). 1): clone CT não induzido. 2) clone CT induzido. 3) clone 2 não induzido. 4) clone 2 induzido. 62

Figura 22. Perfil cromatográfico da Cromatografia de Exclusão Molecular feita para a amostra de Extrato Bruto Solúvel (concentrado 10x) contendo as proteínas heterólogas (AMYPb). Foi utilizada a coluna Superdex 26/60 200pg no aparelho AKTA *Purifier* (GE), com fluxo de 1 mL/min e num volume de fase móvel de 500mL. 63

Figura 23. Perfil cromatográfico da Cromatografia de Troca Aniônica feita para as frações escolhidas que passaram na 1ª etapa cromatográfica e que foram misturadas devido ao seu maior grau de pureza. Foi utilizada a coluna QFF Sepharose *Fast Flow* no aparelho AKTA *Purifier* (GE), com fluxo de 1 mL/min e num volume de fase móvel de 1mL, com gradiente de NaCl de 0-1M. 64

Figura 24. Análise em SDS-PAGE 12% (m/v) das etapas de purificação de AMYPb. (A) Frações cromatográficas com atividade sob amido da etapa de Exclusão Molecular. M: marcador; 62 a 74: frações com atividade; 69 a 74: frações reunidas para serem aplicadas na etapa seguinte; EB: Extrato Bruto; (B) Frações cromatográficas da etapa de Troca Iônica. M: marcador; 2 e 3: AMYPb purificada. 65

Figura 25. Caracterização bioquímica da proteína AMYPb purificada. (A) Efeito da temperatura na sua atividade enzimática utilizando as temperaturas de 20 a 80°C. (B) Efeito do pH na sua atividade enzimática utilizando pHs de 3 a 10. (C) Ensaio de termoestabilidade,

na ausência de substrato, utilizando as temperaturas de 50, 60 e 70°C em intervalos de tempos até 3 horas. (D) Ensaio de estabilidade em pH utilizando pHs de 6 a 9 em intervalos de tempo até 2 horas.....67

Figura 26. Análise do efeito de íons na atividade enzimática da proteína AMYPb purificada.
.....68

Figura 27. Mapa do vetor pET21a utilizado.....78

Figura 28. Mapa do vetor pGEM-T *Easy* utilizado.....78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultado da análise na ferramenta “blastp”, do banco de dados NCB (*National Center for Biotechnology Information*), indicando os 10 primeiros resultados em ordem decrescente do grau de identidade da proteína AGase com outras enzimas de outros microorganismos.46
- Tabela 2.** Resultado da análise na ferramenta “blastp”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), indicando os 10 primeiros resultados em ordem decrescente do grau de identidade da proteína GIB com outras enzimas de outros microorganismos.49
- Tabela 3.** Resultado da análise na ferramenta “blastp”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), indicando os 10 primeiros resultados em ordem decrescente do grau de identidade da proteína AMYPb com outras enzimas de outros microorganismos.51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Amy1: Gene codificador de amilase de <i>P. barengoltzii</i>	IPTG: <i>Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside</i> / isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido
AGase: Alfa glicosidase codificada por Cthe_0795	Kcat: <i>Turnover number</i> / Número de “turnover”
AMYPb: Alfa amilase codificada por Amy1	Km: Constante de Michaelis-Menten
APS: <i>Ammonium persulfate</i> / Persulfato de Amônio	LB: Luria Bertani
BSA: <i>Bovine serum albumin</i> / Albumina sérica bovina	NCBI: <i>National Center for Biotechnology Information</i> / Centro Nacional de Informações em Biotecnologia
CAZy: <i>Carbohydrate Active Enzymes</i> / Enzimas Ativas em Carboidratos	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia da Polimerase
CBM: <i>Carbohydrate Binding Module</i> / Módulo de Ligação a Carboidratos	PDB: <i>Protein Data Bank</i> / Banco de Dados de Proteínas
Cthe_0795: Gene codificador de amilase de <i>C. thermocellum</i>	pH: Potencial de hidrogênio
Cthe_2191: Gene codificador de amilase de <i>C. thermocellum</i>	PI: Ponto isoelétrico
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PMSF: <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> / Fluor fenilmetilsulfonil
DNS: <i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i> / Ácido 3,5-dinitrosalicílico	QFF: <i>Q Sepharose Fast Flow</i> / “Q Sepharose” Fluxo Rápido
dNTP's: Desoxirribonucleotídeos fosfatados	SDS: <i>Sodium dodecyl sulfate</i> / Dodecil sulfato de sódio
EDTA: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / Ácido etilenodiamino tetra-acético	SDS-PAGE: <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> / Eletroforese em gel de poliacrilamida
ERG: Enzima Ramificadora de Amido	TCA: <i>Trichloroacetic acid</i> / Ácido tricloroacético
ExPASy: <i>Expert Protein Analysis System</i> / Sistema Especialista de Análises Proteicas	TEMED: Tetrametiletlenodiamina
GH: Glicosil Hidrolases	V_{máx}: Velocidade máxima
GIB: <i>Glycogen Branching Enzyme</i> codificada por Cthe_2191	X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	16
1.1 O AMIDO: Mercado, Constituição e Estrutura.....	16
1.2 AMILASES: Classificações.....	18
1.3 AMILASES: Aplicações.....	21
1.4 TECNOLOGIA ENZIMÁTICA E BIOCATALÍSE.....	25
1.5 MICROORGANISMOS TERMÓFILOS COMO FONTE DE ENZIMAS PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA.....	26
1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS.....	27
2) JUSTIFICATIVA	29
3) OBJETIVO	30
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4) MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
4.2 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	31
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES Cthe_0795 E Cthe_2191.....	32
4.4 CLONAGEM E EXPRESSÃO.....	33
4.4.1 Vetores.....	33
4.4.2 Linhagens de bactérias.....	33
4.4.3 Preparo de células competentes.....	33
4.4.4 Precipitação de amostras proteicas por TCA 75% (v/v) (Ácido Tricloroacético).....	34
4.4.5 Gel SDS-PAGE 12% (m/v) de Poliacrilamida e Zimograma.....	35
4.4.6 Cthe_0795.....	35
4.4.7 Cthe_2191.....	37
4.4.8 Amy1.....	40
4.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS (AMYPb e GlB).....	41
4.6 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA AMYPb.....	43
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6) CONCLUSÕES	69
7) PERSPECTIVAS	70
8) REFERÊNCIAS	71
9) MATERIAL SUPLEMENTAR	78

1) INTRODUÇÃO

1.1 O AMIDO: Mercado, Constituição e Estrutura

O amido é um polissacarídeo de reserva presente em abundância na natureza. É encontrado em muitas culturas de grande importância econômica em todo o mundo, como trigo, arroz, milho, mandioca e batata, podendo ser extraído de raízes, tubérculos e sementes. (Gadhawe, Mahanwar e Gaddekar, 2017; Maarel, Van Der *et al.*, 2002). É um importante constituinte da dieta humana e animal, além de ser uma potencial fonte de energia renovável e biodegradável, fato que culminou no desenvolvimento da indústria de seu processamento de maneira significativa desde o último século (Karakı *et al.*, 2016; Maarel, Van Der *et al.*, 2002).

Amidos nativos e modificados são utilizados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis e de papel, podendo ser aplicados na modificação da textura de alimentos, como agente gelatinizante e retentor de água (Souza, de e Magalhães, 2010).

Determinadas aplicações industriais têm como alvo os produtos de hidrólise deste substrato ou a própria molécula modificada. Por exemplo: amidos modificados, hidrolisados de amido, xaropes de glicose, frutose, derivados de maltodextrina ou ciclodextrinas e outros subprodutos de alto valor agregado como o bioetanol (pelo processo de fermentação), sendo este último o que é produzido em maior escala a partir da biomassa amilácea. (Gadhawe, Mahanwar e Gaddekar, 2017; Karakı *et al.*, 2016; Läufer, 2017; Maarel, Van Der *et al.*, 2002; Souza, de e e Magalhães, 2010; Tomasik e Horton, 2012). A indústria do amido juntamente com a indústria dos seus produtos derivados movimentaram cerca de 72,51 bilhões de dólares no ano de 2016 e estima-se que tal valor chegue a 106,64 bilhões até 2022, com uma taxa anual de crescimento de 6,64% durante esse período (Läufer, 2017; Market Research Report, 2016).

O amido é encontrado em dois tipos principais de polímeros: amilose e amilopectina. A amilose consiste em uma longa cadeia linear de monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (Figura 1A). Já a amilopectina consiste em cadeias lineares de monômeros de D-glicose unidos por ligações do tipo α -1,4 com a presença de pontos de ramificação em ligações do tipo α -1,6 (Figura 1B). O grau de polimerização, a quantidade de unidades de glicose em cada um dos dois tipos de polímero e percentual de pontos de ramificação da amilopectina, no entanto, variam dependendo da origem do amido (Gadhawe,

Mahanwar e Gadekar, 2017; Maarel, Van Der *et al.*, 2002; Tester, Richard F., Karkalas e Qi, 2004).

A amilose é a grande responsável pela gelatinização (ou retrogradação) do amido, ocasionada após o aquecimento em altas temperaturas seguida de seu resfriamento. Neste processo, com a elevação da temperatura, as moléculas de amilose presentes no grão de amido são liberadas e, uma vez em solução, se reassociam entre si, formando um gel. (Gadhve, Mahanwar e Gadekar, 2017).

A amilopectina, considerando sua estrutura total, ou seja, tanto as cadeias lineares como as ramificações, é uma molécula bem maior que a amilose (Maarel, Van Der *et al.*, 2002). Ocorre normalmente em estruturas clusterizadas segundo o modelo proposto por Robin, *et al.* (1974) e Myers, *et al.* (2000), e tem influência direta sobre a formação regular e morfologia do grânulo de amido (Wang e Copeland, 2015).

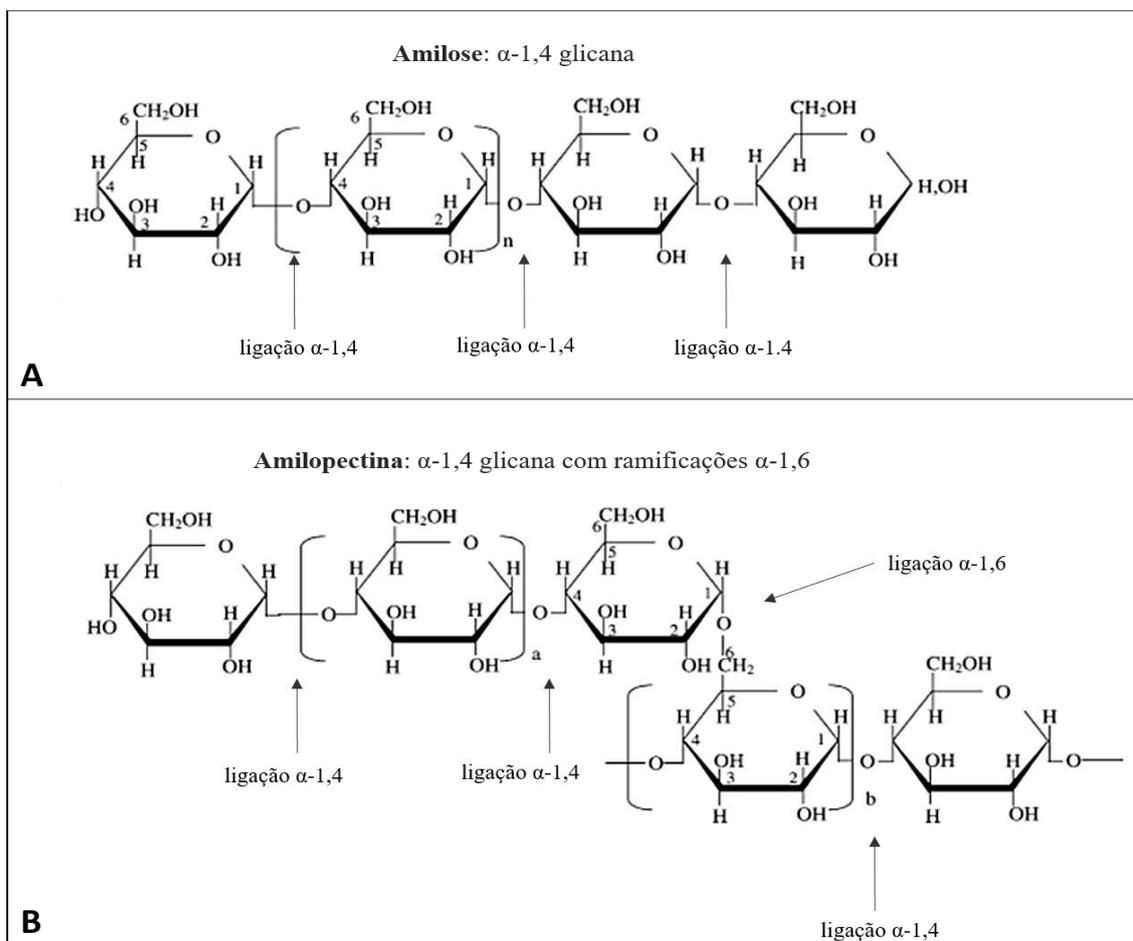


Figura 1. Estrutura da (A) amilose e (B) amilopectina. Extraído e adaptado de Tester, R.F.; Karkalas (2002).

Em menores quantidades, outros compostos como lipídeos, proteínas e minerais também podem fazer parte da composição amilácea. Lipídeos podem corresponder a 2% de sua composição; proteínas podem compor menos que 0,6% de amidos purificados; e minerais como cálcio, magnésio, sódio, potássio e fósforo podem compor menos que 0,4%. (Gadhawe, Mahanwar e Gadekar, 2017; Tester, Richard F, Karkalas e Qi, 2004).

O percentual de amilose e amilopectina na composição de moléculas de amido também pode variar tanto de acordo com a fonte de qual foi isolado como com as condições ambientais de cultivo às quais essa fonte estava submetida (Wang e Copeland, 2015). Já foram descritos, por exemplo, amidos de uma mesma fonte (batata-doce), com diferentes percentuais, de 15 e 30% de amilose (Otani *et al.*, 2007; Zhou, W. *et al.*, 2015). De uma forma geral, a amilose representa cerca de 20 a 25% e a amilopectina 75 a 80% da composição total deste polissacarídeo. No entanto, existem amidos considerados “cerosos”, em que a taxa de amilose é inferior a 15%, e os considerados “ricos” em amilose, em que tal taxa é superior a 40% (Maarel, Van Der *et al.*, 2002). Estes percentuais estão diretamente relacionados com as características fisiológicas do amido, como solubilidade em água, turbidez, viscosidade, resistência da molécula, grau de gelatinização, e com a qualidade dos produtos a serem gerados. (Nisha e Satyanarayana, 2016).

1.2 AMILASES: Classificações

Conforme o sistema de classificação proposto por Henrissat (1991) e implementado no banco de dados CAZy (“CAZy - *Carbohydrate-Active Enzymes Database*”, [s.d.]), as amilases, de maneira geral, pertencem a uma superfamília de enzimas (denominada superfamília das α -amilases) que inclui glicosídeo hidrolases sobretudo da família 13. Atualmente já foram incluídas, também, das famílias 70 e 77. (Janeček, Svensson e MacGregor, 2014; Turner, Mamo e Karlsson, 2007a). Estas famílias abrangem uma diversidade de enzimas que atuam sob amido e que possuem algumas características em comum baseadas tanto no mecanismo de ação como estrutura e sequência proteicas, que implicam em diferentes formas de classificação.

Quanto ao mecanismo de ação, as amilases têm capacidade de hidrolisar ligações α -glicosídicas, produzindo mono ou oligossacarídeos; e/ou capacidade de formar ligações α -1,4 ou α -1,6 (transglicosilação). Baseando-se, dessa forma, no tipo de reação que catalisam, se

subdividem de maneira mais ampla em 4 subclasses: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases. As endoamilases hidrolisam ligações do tipo α -1,4 na parte interna da cadeia do amido (por exemplo: α -amilase); as exoamilases hidrolisam ligações do tipo α -1,4 e/ou α -1,6 nas partes externas da cadeia do amido (por exemplo: β -amilases; glicoamilase; e α -glicosidase); as enzimas desramificadoras ou *debranching enzymes* hidrolisam ligações do tipo α -1,6 presentes no amido, desfazendo as ramificações (por exemplo: isoamilase e pululanase); e as transferases formam novas ligações α -1,4 e/ou α -1,6, incorporando novos monômeros numa cadeia linear ou na forma de ramificações na cadeia amilácea (por exemplo: ramificação 1,4- α -glicana, também conhecida como enzima ramificadora de glicogênio ou *glycogen branching enzyme*; amilomaltase; e ciclodextrina glicosiltransferase) (Figura 2). Tais mecanismos podem ocorrer tanto de forma individual como de forma concomitante. Dessa forma, uma amilase pode ter atividade apenas de endoamilase, ou de endo e exoamilase, ou de transferase e enzima desramificadora, entre outras combinações (Maarel, Van Der *et al.*, 2002) e, muitas vezes, tais especificidades são requeridas para que se tenha uma melhor hidrólise da molécula amilácea. Por isso, usualmente, o processamento amiláceo envolve a utilização de um “consórcio” de diferentes subtipos de amilases (Agirre *et al.*, 2019).

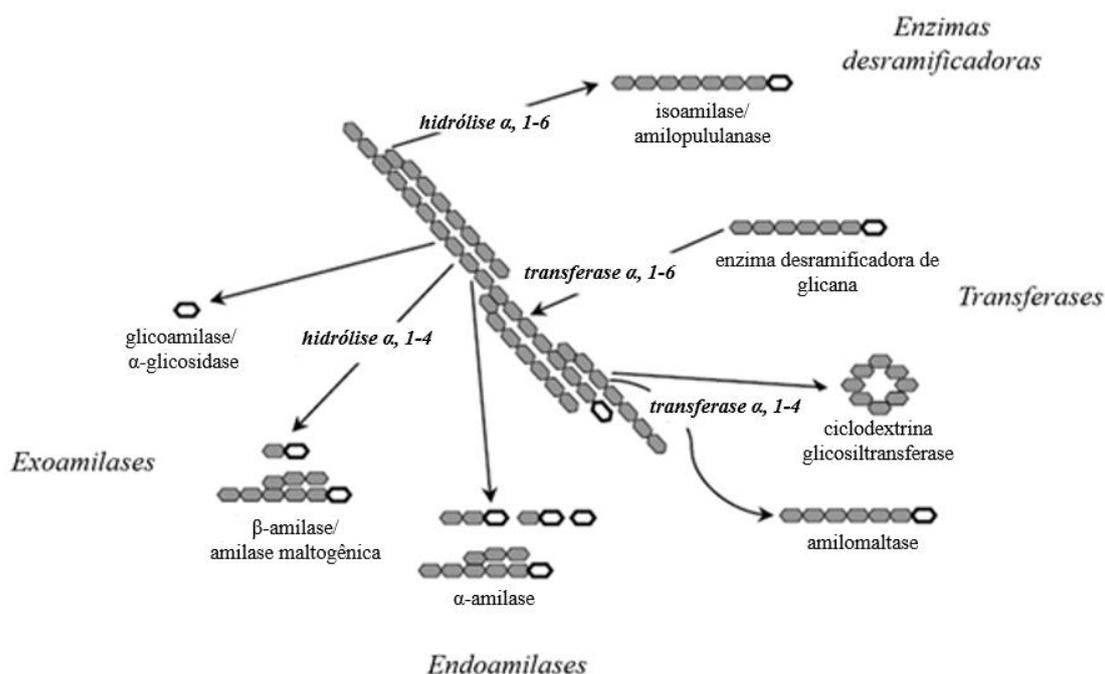


Figura 2. Diferentes enzimas envolvidas na degradação do amido. Anéis sem preenchimento representam a extremidade redutora de um polímero de glicose. Extraído e adaptado de Van der Maarel *et al.* (2002).

Quanto à estrutura e sequência proteicas, são observados, dentre todas as amilases mencionadas, alguns aspectos semelhantes que são utilizados como critérios para agrupá-las na superfamília das α -amilases. Dentre eles estão a presença de 3 domínios característicos, A, B e C, que se conectam entre si, com destaque para a presença um arranjo simétrico contendo 8 folhas- β paralelas num arranjo de barril envolto por 8 α -hélices contendo os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico no domínio B (Figura 3). Também chamado de “*TIM-Barrel*” ou $(\beta/\alpha)_8$; e a presença de 4 a 7 regiões altamente conservadas na sequência primária da proteína (CSR- *Conserved Sequence Regions*) que conterão os aminoácidos que irão estabilizar a estrutura $(\beta/\alpha)_8$, bem como os que irão compor o sítio catalítico (chamado de tríade catalítica) da enzima. Tal sítio catalítico, além dos aspectos mencionados, também apresenta uma composição de aminoácidos bem conservada dentre as amilases. São eles: ácido aspártico (Asp) na posição 206, responsável pela catálise nucleofílica; ácido glutâmico (Glu) na posição 230, que atua como doador de prótons; e ácido aspártico (Asp) na posição 297, responsável por estabilizar o estado de transição durante a catálise (Janeček, Svensson e MacGregor, 2014; Matsuura *et al.*, 1984; Pinto, Dorn e Feltes, 2020).

Apesar da similaridade entre as regiões citadas e à homogeneidade quanto a presença do “*TIM-Barrel*”, os demais domínios das sequências das amilases são bem variáveis, o que explica a ampla variedade dos substratos sobre os quais atuam e dos modos de ação (Turner, Mammo e Karlsson, 2007a).

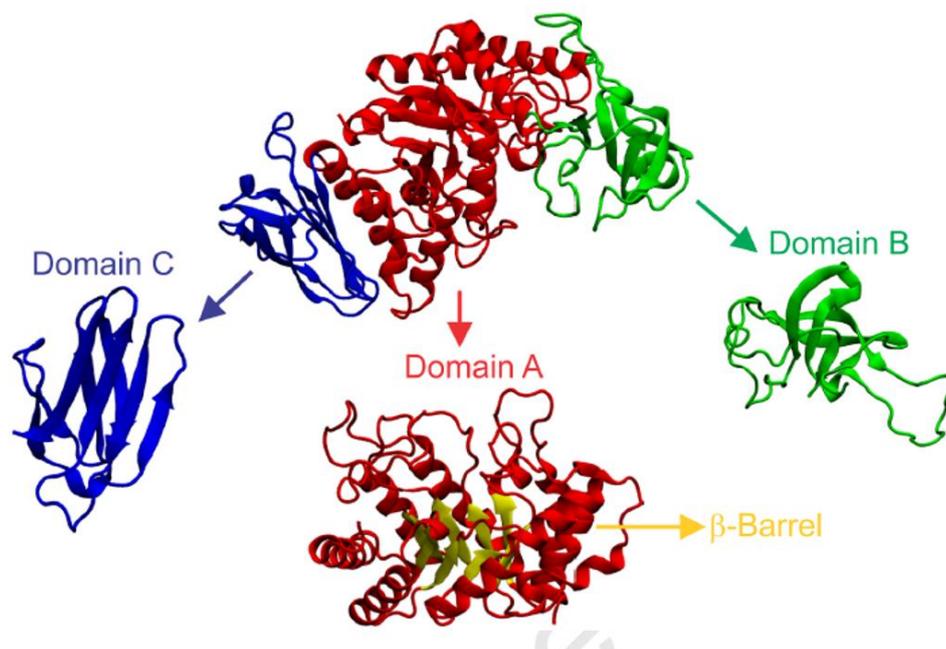


Figura 3. Estrutura tridimensional de uma α -amilase de *Bacillus licheniformis* (PDB: 1BL1). Destacam-se os três domínios conservados dentre as alfa-amilases: A (em vermelho, com a presença do *TIM-Barrel* em amarelo), B (em verde) e C (em azul). Extraído de Pinto, Dorn e Feltes (2020).

1.3 AMILASES: Aplicações

As amilases estão entre as hidrolases mais utilizadas em processos biotecnológicos, representando, atualmente, cerca de 65% das vendas do mercado mundial de enzimas (Simair *et al.*, 2017). Sua capacidade de atuar sobre o amido, modificando sua estrutura e gerando produtos refinados de alto valor agregado, faz com que desempenhem um papel fundamental em uma grande quantidade de processos industriais diferentes, tais como: têxteis, alimentícios, de detergentes, de produção de papel, de produção de biocombustíveis, de biorremediação, e farmacêuticos (Läufer, 2017; Ozdemir *et al.*, 2018; Pinto, Dorn e Feltes, 2020; Tang *et al.*, 2020).

Na produção de biocombustíveis, amilases, principalmente α -amilases e glicoamilases, podem ser utilizadas no processo de hidrólise do amido presente na batata, mandioca, bagaço, cascas e outros resíduos agroindustriais, para obtenção de monossacarídeos e oligossacarídeos que posteriormente serão fermentados por leveduras levando à produção de bioetanol (Souza, de e Magalhães, 2010). Tendo em vista a importância deste processo para o contexto atual de

procura por fontes alternativas aos combustíveis fósseis e sustentáveis, grande parte da aplicação industrial e estudos de amilases têm como perspectivas a sua aplicação na produção de biocombustíveis visando otimizá-la. Como por exemplo, estudos de caracterização de amilases que possam ser utilizadas em processo industrial realizando a hidrólise (liquefação/sacarificação) e fermentação de forma simultânea, visando diminuir o custo, tempo e o gasto de energia quando estas são realizadas separadamente. (Celińska, Borkowska e Białas, 2016; Xian *et al.*, 2015).

Na produção têxtil e de papel elas podem ser utilizadas no amaciamento, modificação, limpeza e no processo de desengomagem de fibras têxteis e das folhas. (Singh *et al.*, 2016). A goma (produto a base de amido) é adicionada a esses materiais para fornecer uma maior resistência e integridade às suas superfícies. Porém, a aplicação do amido nativo torna tais superfícies muito viscosas, e, por essa razão, as amilases, mais precisamente as α -amilases, atuam hidrolisando as ligações α -1,4 presentes no amido da goma, melhorando, assim, a qualidade do tecido e dos papéis produzidos. (Souza, de e e Magalhães, 2010). Nestes processos, atualmente, utilizam-se amilases de espécies do gênero *Bacillus*, incluindo *Bacillus sp.* e *Bacillus licheniformis* (Singh *et al.*, 2016).

Na indústria de detergentes, as amilases representam o segundo tipo de enzima mais utilizada nas formulações de detergentes enzimáticos, estando presentes em uma elevada parcela dos detergentes líquidos produzidos (Hashim, 2019). Elas atuam fornecendo uma maior capacidade de limpeza e remoção de manchas através da degradação de certos resíduos alimentícios que contêm amido (Mukherjee, Borah e Rai, 2009). Um dos requisitos para a aplicação neste setor é a atividade e estabilidade enzimática em ambientes oxidativos e faixas de pH alcalinas, justificados pelos outros compostos presentes na formulação destes produtos (Souza, de e e Magalhães, 2010; Zhou, G. *et al.*, 2015). São utilizadas, atualmente, neste processo, amilases de *Aspergillus sp.* e *Bacillus subtilis* (Singh *et al.*, 2016), e novas amilases vêm sendo descritas como potenciais ferramentas a serem utilizadas neste setor, tendo em vista a adequação aos critérios requeridos, como a descrita por Simair *et al.* (2017).

Na indústria alimentícia, sobretudo na indústria panificadora, as amilases atuam modificando ou hidrolisando o amido presente na massa para fornecer açúcares que posteriormente serão fermentados. Tal processo implica no aumento o volume do pão e no aumento da quantidade de açúcar presente nessa massa, influenciando na textura, sabor, viscosidade e em outras características de interesse deste produto (Hashim, 2019). Além disso,

também previne a sua degradação, aumentando, assim, o seu tempo de validade ou “tempo de prateleira” por alterar propriedades estruturais amiláceas (Gupta *et al.*, 2003; Hoon *et al.*, 2017).

Em outros ramos como a indústria de sucos e cerveja, elas atuam também no processo pré-fermentativo para a geração de mono e oligossacarídeos que serão fermentados e no processo de clarificação das bebidas. Também estão presentes na produção de diversos ingredientes alimentícios a base de amido. (Hoon *et al.*, 2017; Souza, de e e Magalhães, 2010).

As aplicações industriais das amilases mencionadas estão sendo incorporadas, nos dias atuais, junto aos sistemas de de biorrefinaria. As biorrefinarias são consideradas importantes ferramentas para o desenvolvimento de processos e obtenção de produtos de maneira sustentável e eficiente. Seu conceito está direcionado a um sistema integrado de produção que implementa diversas tecnologias para a interconversão entre matérias-primas renováveis, intermediários industriais e produtos finais, de maneira a aproveitar os resíduos diretamente como novas matérias-primas para bioprocessamento ou como substratos para processos fermentativos visando a extração de novos produtos. (Turner, Mamo e Karlsson, 2007a).

As biorrefinarias de amido envolvem, normalmente, as aplicações já descritas no item 1.2, porém, em um sistema conjunto e integrado utilizando amido de diferentes fontes e uma variedade de enzimas para a obtenção de diversos produtos de valor agregado, sendo o bioetanol, glicose, maltose e os “HFCS” (Xarope rico em frutose de milho) os produtos mais obtidos (Läuffer, 2017). Novas tendências como, por exemplo, o aproveitamento da biomassa amilácea proveniente de resíduos alimentícios descartados para a produção destes diferentes produtos estão surgindo nesse novo conceito das biorrefinarias (Carmona-Cabello *et al.*, 2020).

O processamento do amido nesses sistemas por meio da conversão enzimática, para a maioria das suas aplicações, usualmente envolve 2 processos principais: liquefação e sacarificação. Na liquefação, o amido é aquecido a temperaturas entre 70 e 90°C (Figura 4). O amido presente no grão é solubilizado e, pela adição de α -amilases, convertido em pequenas cadeias de dextrinas. Após isso, o material é resfriado para que o processo de sacarificação ocorra. Têm-se então o processo de retrogradação amilácea, em que as cadeias de amilose (principalmente) interagem por ligações de hidrogênio, formando um gel. As glicoamilases ou β -amilases são, então, adicionadas para a obtenção de diferentes produtos, dependendo do tipo de biorrefinaria, como glicose ou maltose. O amido obtido a partir da liquefação, na forma de gel, também pode ser modificado pela ação de amilomaltases, que irão tornar o amido

“*amylose-free*”, produto que possui diversas aplicações na indústria alimentícia (Turner, Mamo e Karlsson, 2007a).

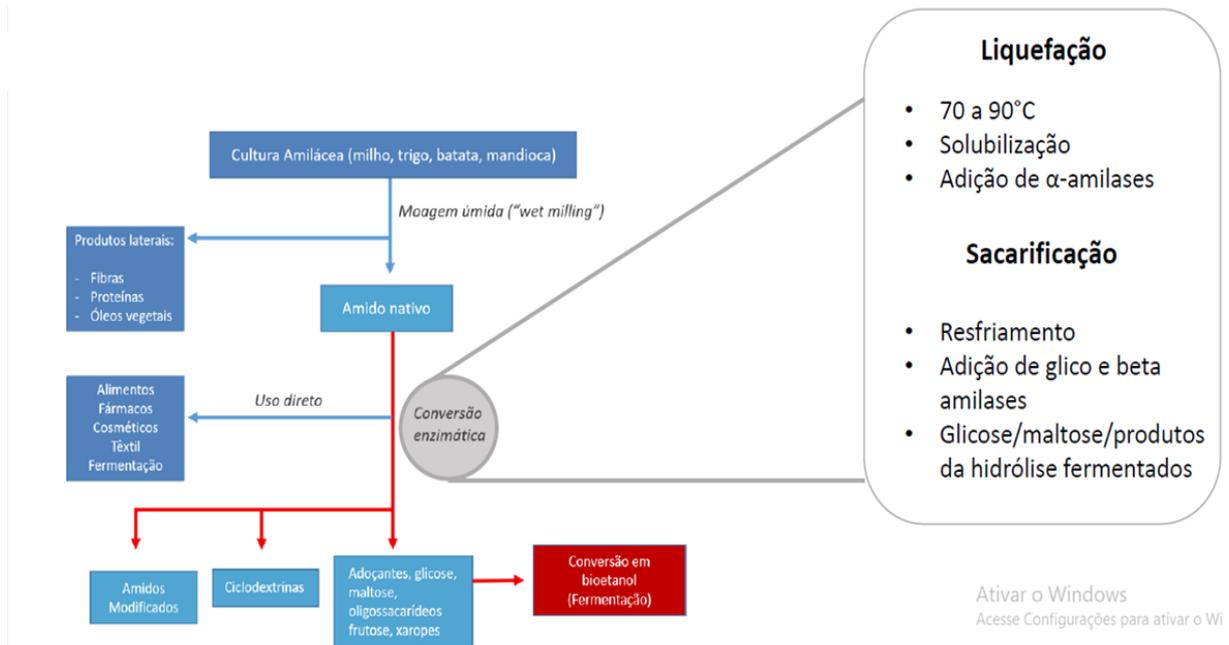


Figura 4. Esquema de parte de um sistema de biorrefinaria de amido e os processos envolvidos na etapa de conversão enzimática. Extraído e adaptado de Läufer (2017).

Em sua maioria as hidrolases para aplicação industrial são de origem microbiana, principalmente bactérias e fungos, que se caracterizam por sua facilidade de manipulação e grande capacidade produtiva; além disso, suas enzimas possuem propriedades cinéticas como atividade/estabilidade em diferentes pHs e termoestabilidade que chamam a atenção dos mais diversos campos industriais (Singh *et al.*, 2016; Souza, de e e Magalhães, 2010; Tang *et al.*, 2020). Tais microorganismos são utilizados como ferramentas para a produção industrial em larga escala dessas enzimas, com destaque para a produção de amilases por bactérias, que se mostra um processo mais barato e mais rápido em relação a produção por outros microorganismos. Nesse quesito cabe ressaltar a facilidade e os custos baixos para se obter reagentes utilizados nas técnicas de expressão neste sistema de expressão, bem como a relativa simplicidade e rapidez dos protocolos e experimentos e a ampla difusão do conhecimento sobre as metodologias envolvidas. Estudos relacionados à engenharia genética também são fáceis de serem realizados, tornando-as fortes candidatas para a expressão heteróloga de proteínas, uma das estratégias adotadas hoje para a obtenção dessas amilases (Gopinath *et al.*, 2017).

1.4 TECNOLOGIA ENZIMÁTICA E BIOCATÁLISE

A biocatálise, que é a catálise envolvendo enzimas ou microorganismos, têm importância significativa nos sistemas de biorrefinaria. Ela representa uma alternativa mais vantajosa a outros tipos de catálise existentes em determinados processos industriais, como a catálise química, que pode produzir intermediários tóxicos e produtos não desejados, afetando negativamente, por exemplo, produtos voltados para o consumo humano e animal. (Turner, Mamo e Karlsson, 2007b). Nas etapas de sacarificação das indústrias de processamento amiláceo, claramente presentes na produção do bioetanol a partir de amido e na produção de açúcares, xaropes e cervejas, a catálise química foi completamente substituída pela biocatálise. (Simair *et al.*, 2017).

A expansão da biocatálise é particularmente relevante para o Brasil, pois o país precisa se inserir de forma representativa como usuário de tecnologia enzimática, que concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matéria prima renovável e a preservação ambiental. O uso de enzimas como catalisadores em processos industriais no Brasil é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade e de maior valor agregado, de maneira eficiente, por custos baixos e sem ocasionar a geração de resíduos poluentes tóxicos para os ecossistemas (em comparação a outros processos convencionais, como a catálise química), através de tecnologias limpas que norteiam os processos produtivos internacionais. Assim como, é importante reverter o quadro de dependência pela importação destes insumos. Por isso, para alcançar tais objetivos e para que as necessidades dos processos industriais envolvendo a biocatálise sejam atendidas com as características mencionadas, há, atualmente, a busca por enzimas robustas com características desejáveis (por exemplo: termoestabilidade) que possam atuar individualmente ou, ainda, em conjunto, nos chamados “coquetéis enzimáticos”, representando potenciais ferramentas a serem utilizadas nesses processos.

1.5 MICROORGANISMOS TERMÓFILOS COMO FONTE DE ENZIMAS PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Microorganismos, assim como todos os seres vivos, são capazes de se adaptarem às condições em que vivem. Baseado nisso, microorganismos denominados termófilos, que vivem e crescem em altas temperaturas, são conhecidos por produzir proteínas mais termoestáveis e resistentes a processos como a desnaturação e proteólise (Haki e Rakshit, 2003).

Atualmente há uma crescente demanda por novos biotacalisadores que sejam mais estáveis e eficientes, e vê-se nas enzimas provenientes de microorganismos termófilos uma excelente e potencial alternativa em relação a aquelas já utilizadas nos mais diversos processos industriais, de origem mesófila, que apresentam uma série de limitações. Muitos desses processos existentes hoje são carreados em condições facilmente consideradas desnaturantes para enzimas de mesófilos, incluindo temperaturas e pressões mais elevadas e a presença de solventes (Akram *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2019). Além disso, a temperaturas elevada, por exemplo, oferece uma série de vantagens a estes processos, incluindo aumento da solubilidade dos substratos e produtos, redução do tempo de hidrólise e diminuição dos riscos de contaminação. Enzimas termófilas são robustas e são usualmente capazes de atuar de maneira eficiente em tais condições e, dessa maneira, tais características as tornam potenciais ferramentas a serem utilizadas em tais aplicações (Atalah *et al.*, 2019).

A bactéria *Clostridium thermocellum* é uma bactéria anaeróbia termófila conhecida por produzir enzimas de interesse biotecnológico como enzimas da família das Glicosil hidrolases e por possuir capacidade de gerar etanol a partir de glicose (Zverlov *et al.*, 2005). O genoma desta bactéria já foi sequenciado e anotado, e neste foram identificados dois genes contendo domínios de α -amilases ainda não caracterizados, o que poderia representar mais uma enzima para aplicação industrial com características desejáveis em eficiência e termoestabilidade (Akinosho *et al.*, 2014). Além disso, esta bactéria tem sido muito estudada como fonte de holocelulases e pouco se sabe das características cinéticas e estruturais de outras glicosidases, como as amilases.

A bactéria anaeróbia termófila *Paenibacillus barengoltzii* também é uma promissora fonte de enzimas termófilas. As espécies do gênero em questão apresentam características morfológicas e fisiológicas semelhantes às espécies do gênero *Bacillus*, ao qual pertenceram até o ano de 1993 (Fergus G. Priest e Ash C., Priest FG., 1993) e que abrange uma série de

microrganismos envolvidos em muitas aplicações industriais já bem consolidadas e estabelecidas, seja como fonte de enzimas ou sistemas de expressão heteróloga, como, por exemplo, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Läufer, 2017). As espécies do gênero *Paenibacillus* são conhecidas por produzir uma variedade de hidrolases com potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos (Grady *et al.*, 2016), e, recentemente, foram descritas pululanases, β -galactosidases e β -glicanases de *P. barengoltzii* com características bioquímicas interessantes do ponto de vista industrial, como atividade enzimática em altas temperaturas e em faixas amplas de pH (Liu *et al.*, 2016, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Trabalhos anteriores também identificaram moléculas secretadas por esse microorganismo com atividade amilolítica em temperaturas em torno de 50°C (Ticona, 2019) e, apesar do grande potencial, pouco se sabe ainda sobre as enzimas, sobretudo amilases, produzidas por ele.

1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

Um dos mecanismos que possibilitam a obtenção de enzimas de interesse de microorganismos para a sua utilização em ramos biotecnológicos é a expressão heteróloga, onde organismos modelos são utilizados para expressar tal proteína de interesse (Figura 5) (Bullok *et al.*, 2009). Isso porque tal processo, em conjunto com a engenharia genética, pode determinar a estabilidade, atividade e especificidade de determinada enzima, fazendo uso de múltiplas cópias de genes, fortes promotores e eficientes peptídeos sinais. Quando executado em organismos de fácil cultivo, aumenta a produtividade em um período menor de tempo e reduz os custos de produção (Piscitelli *et al.*, 2010). A expressão heteróloga tem participação fundamental na descoberta e caracterização de novas enzimas, como foi demonstrada, por exemplo, na amilase obtida a partir de *Bacillus Alcalofillus* expressa em *Bacillus subtilis* (Yang *et al.*, 2011).

Atualmente vários sistemas são utilizados para a expressão heteróloga de proteínas, tanto eucarióticos (leveduras, fungos, células de mamíferos, células de inseto ou de plantas) como procarióticos (bactérias). A bactéria *Escherichia coli*, por mais de duas décadas, é o sistema mais popular utilizado para a produção de proteínas recombinantes, dentre todos os outros descritos. Fatores como: a capacidade de ser cultivada em meios baratos e condições laboratoriais bem definidas; rapidez no tempo de crescimento; facilidade na seleção de mutantes

e na manipulação genética; e eficiência na incorporação de DNA exógeno a tornam um dos sistemas mais atrativos para esse processo (Gopal e Kumar, 2013; Kaur, Kumar e Kaur, 2017).

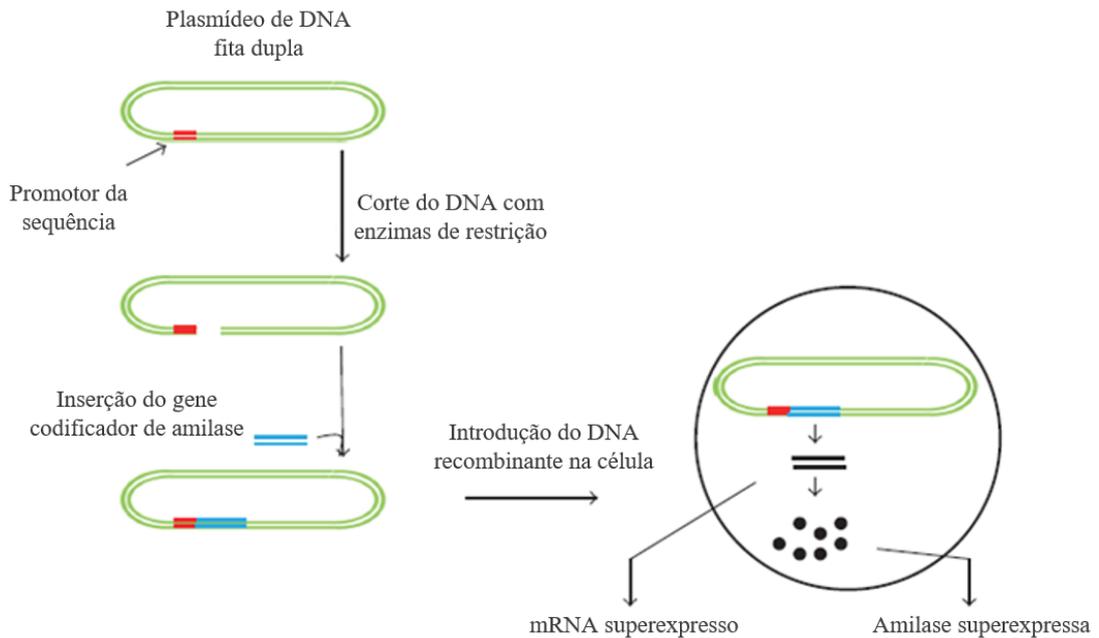


Figura 5. Tecnologia do DNA recombinante para a produção de amilases. As etapas envolvem a seleção de um gene eficiente de amilase, inserção do gene no vetor apropriado e transformação em um sistema de expressão eficiente para produção de grandes quantidades do mRNA e proteína recombinantes. Extraído e adaptado de Gopinath *et al.* (2017).

2) JUSTIFICATIVA

O amido, depois da celulose, é o polissacarídeo mais abundante na natureza. (Gadhawe, Mahanwar e Gadekar, 2017). Amplamente encontrado em plantas, incluindo culturas economicamente importantes, ele é uma importante fonte de carbono destinada à nutrição humana e animal que também pode ser aproveitado para a produção de energia, bietanol e outros produtos de valor agregado a partir da sua degradação por meio de enzimas hidrolíticas. Tais enzimas, pertencentes à família das amilases, estão entre as enzimas amplamente utilizadas em processos biotecnológicos, e muitos destes são realizados sob elevadas temperaturas, faixas de pH mais ácidas ou básicas, presença de íons, e outras condições não usuais. Portanto, atualmente há uma crescente busca por novas enzimas que atuem nesses processos de maneira mais robusta, sendo capazes de realizar suas funções nessas condições. O uso das enzimas na indústria é algo que pode contribuir para com a eficácia dos processos e com o desenvolvimento econômico e tecnológico sustentável atrelado à preservação ambiental, possibilitando a geração de produtos de alto valor agregado sem a geração de resíduos tóxicos nos ecossistemas. Por isso, estudos acerca de sua aplicação nas mais diversas áreas, incluindo a dos biocombustíveis, tendo em vista o contexto atual da busca por novas fontes de energia renováveis e sustentáveis, são de suma importância.

O presente trabalho visa realizar a expressão heteróloga de 3 genes codificadores de amilases putativos das bactérias termófilas *Clostridium thermocellum* (Cthe_2191 e Cthe_0795) e *Paenibacillus barengoltzii* (Amy1) em *Escherichia coli* BL-21 DE3. Além disso, realizar a purificação e caracterização das proteínas heterólogas com relação aos seus parâmetros bioquímicos e cinéticos para, assim, poder validá-las funcionalmente e avaliá-las quanto ao potencial de aplicação industrial em diferentes processos biotecnológicos, contribuindo também para a ampliação do conhecimento acerca das amilases (e das enzimas de maneira geral) provenientes desses microorganismos.

3) OBJETIVO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar a expressão heteróloga dos genes Cthe_2191; Cthe_0795; e Amy1 (atuais CTHE_RS11395, CTHE_RS04120 e B9N83_RS02665, respectivamente, segundo os códigos do *GeneBank*) em *E.coli* e realizar a purificação e caracterização bioquímica e cinética das enzimas heterólogas visando avaliar o seu potencial de aplicação industrial em processos como a produção de biocombustíveis, de detergentes e a produção têxtil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar os genes putativos em *E. coli* por ferramentas de biologia molecular
- Expressar as proteínas heterólogas
- Realizar a purificação das proteínas heterólogas
- Detectar atividade enzimática e validá-las funcionalmente
- Caracterizá-las quanto à parâmetros cinéticos e bioquímicos
- Realizar experimentos relacionados à sua aplicação em processos industriais biotecnológicos

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

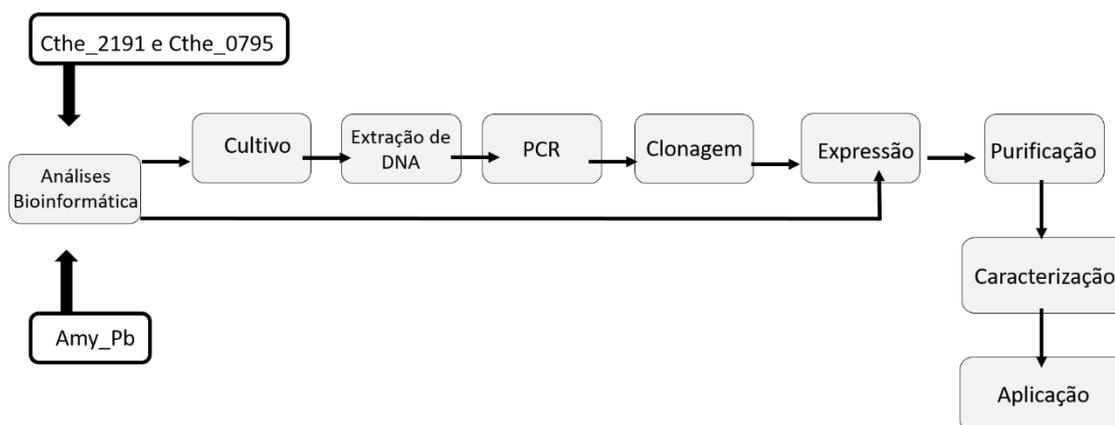


Figura 6. Esquema de desenho experimental adotado para a execução do projeto.

4.2 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As sequências dos genes de *C. thermocellum* linhagem ATCC 27045 (Cthe_0795 e Cthe_2191) e de *P. barengoltzii* linhagem J12 (Amy1) foram obtidos nos genomas destes organismos depositados plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os dados da sequência destes genes e de suas proteínas preditas foram obtidos a partir das ferramentas “blastx”, “blastn”, “blastp” e “*Conserved domains*”, encontradas na plataforma do NCBI, com o objetivo de avaliar similaridades, comparar sequências e fornecer base para outras análises de bioinformática. A massa molecular e ponto isoelétrico preditos das proteínas codificadas foram determinados utilizando a ferramenta “Compute pI/Mw”, plataforma ExPASy. A presença de peptídeo sinal foi analisada utilizando a ferramenta “SignalP”, plataforma ExPASy. A árvore filogenética para a proteína predita AGase (codificada pelo gene Cthe_0795) foi feita utilizando sequências proteicas de microorganismos procariotos do banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes Database*) já caracterizadas e pertencentes às diferentes subfamílias inclusas na família GH13 das glicosil hidrolases. O software utilizado

foi o “*FastTree*” seguindo os parâmetros de máximo verossimilhança, 1.000 de *bootstrap* e utilizando, para o alinhamento das sequências de aminoácidos, o software MAFFT v7.215 (parâmetros *default*). O alinhamento foi editado no software Mega7.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *Cthe_0795* E *Cthe_2191*

A linhagem de *C. thermocellum* (B8) utilizada como modelo neste trabalho foi isolada de amostra sólida de rúmen de um caprino da raça Moxotó, conforme descrito em Hamann *et al.* (2015). A partir de uma cultura estabelecida de *C. thermocellum* B8 foi retirada uma alíquota que foi transferida para um frasco selado contendo meio líquido redutor, preparado conforme descrito em Freier *et al.*, 1988, sob atmosfera anaeróbica suplementado com 1% (m/v) de celulose cristalina como fonte de carbono. O inóculo foi incubado a 65°C por 24 horas.

Com o intuito de obter uma cultura com o maior grau de isolamento possível, foram realizadas sucessivas diluições seriadas na proporção de 1:10 a partir do inóculo inicial e, após o tempo de crescimento, as células da cultura referente à 6ª diluição sucessiva foram coletadas por centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos para a extração de DNA.

O DNA cromossomal de *C. thermocellum* B8 foi extraído utilizando o kit Wizard® SV *Genomic DNA Purification System* (Promega) de acordo com instruções do fabricante, e posteriormente utilizado como molde para amplificação dos genes de interesse. Os *primers* para amplificação dos genes de interesse foram desenhados com base na sequência completa dos genes identificados no genoma de *C. thermocellum* *Cthe_0795* e *Cthe_2191* (*Bam*HI *Forward* 5'-AAAAGGATCCATGAACTTGAGGCAATATATC-3' e *Sall* *Reverse* 5'-AAAACCATGGATGAACTTGAGGCAATATATC-3'; e *Nde*I *Forward* 5'-CCTTCATATGAACACAACAGCAAATATTGA-3' e *Xho*I *Reverse* 5'-CCTTCTCGAGATCCTTCCTGTCAAACCTTG-3'; respectivamente) e com base nos vetores que foram utilizados e seus respectivos sítios de clonagem (pGEM-T Easy e pET21a), de forma que as sequências de cada par possuíssem T_m 's próximas uns dos outros (diferença de no máximo 5°C).

A reação de amplificação para *Cthe_0795* foi realizada utilizando: 10 ng de DNA molde, dNTP's 2,5mM, 1U de Platinum *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 10x *High Fidelity Buffer*, 50mM MgSO₄ e 10µM de primer 5' e 3' *forward* e *reverse* em um volume final de 50 µL. O ciclo foi realizado na seguinte condição: 95°C/1min (desnaturação); 95°C/0,5min,

52,7°C/1min, 68°C/2min (anelamento e extensão), por 34 ciclos; 68°C/7min, 12°C/∞ (extensão final).

A reação de amplificação para o segundo gene foi realizada utilizando: 10 ng de DNA molde, dNTPs 2,5 mM, 1U de LongAmp Taq *DNA polymerase* GoTaq (Promega), 5M LongAmp *Taq Reaction Buffer* e 10 mM de primer 5' e 3' *forward* e *reverse* em um volume final de 25 µL. O ciclo foi realizado na seguinte condição: 95°C/1min (desnaturação); 94°C/0,5min, 51°C/1min, 65°C/2min (anelamento e extensão), por 5 ciclos; 94°C/0,5min, 56°C/0,5min, 65°C/2min (anelamento e extensão), por 30 ciclos; 65°C/7min, 12°C/∞ (extensão final).

As reações de amplificação foram analisadas em gel de agarose a 0,8% (m/v) utilizando o marcador *GeneRuler 1kB DNA Ladder* (Thermo Fischer Scientific). Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare Life Sciences), quantificados por NanoDrop (Thermo scientific) e posteriormente utilizados na reação de ligação com os vetores de clonagem em *E. coli*.

4.4 CLONAGEM E EXPRESSÃO

4.4.1 Vetores

- pGEM-T Easy Vector (Promega)
- pET21a

4.4.2 Linhagens de bactérias

- *E. coli* BL-21 (DE3)
- *E. coli* DH10β
- *E. coli* XL-10 Gold

4.4.3 Preparo de células competentes

O preparo das linhagens de *E. coli* (DH10 β , XL-10 Gold e BL-21 DE3) competentes para transformação seguiu conforme o protocolo descrito em Green e Rogers (2013), com algumas adaptações. Foi realizado a partir de um pré-inóculo crescido *overnight* a 37°C em 10mL de meio LB proveniente de culturas puras de 2mL estocadas à -80°C. De cada uma das linhagens de *E. coli*, foi inoculado 1mL deste pré-inóculo em frascos cônicos contendo 100mL de meio SOB (Bactotripton 10g/L, Extrato de Levedura 5g/L, NaCl 5g/L) e estes foram incubados a 37°C sob agitação a 200rpm até as culturas atingirem densidade ótica de 0,3, determinada por espectrofotometria a 600nm. Posteriormente, 50mL de cada uma das culturas foram transferidos para tubos cônicos, os tubos foram mantidos no gelo por 10min, centrifugados por 10min a 4°C a 4000rpm, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 30mL de Tampão A (80mM MgCl₂, 20mM CaCl₂) e incubadas no gelo por mais 15min. Foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2mL de Tampão B (100mM CaCl₂), e acrescidas de glicerol na concentração final de 20%. As suspensões de células foram alíquotadas em volume de 200 μ L e armazenadas à -80°C até a sua utilização nas etapas de clonagem.

4.4.4 Precipitação de amostras proteicas por TCA 75% (v/v) (Ácido Tricloroacético)

A precipitação de proteínas foi realizada seguindo a seguinte proporção: para cada 1mL de amostra, adicionou-se 133 μ L de TCA 75% (v/v). Os volumes que foram precipitados variaram de 100 a 500 μ L, dependendo da concentração do material. Após a adição do TCA, incubou-se a solução a 4°C por 1h e, então, a amostra foi centrifugada a 10.000rpm a 4°C por 20min. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 1mL de acetona e em seguida a amostra foi centrifugada nas mesmas condições anteriores. Tal etapa foi repetida mais uma vez, totalizando 2 lavagens com acetona. A amostra permaneceu em temperatura ambiente por 5min para secar e foi ressuspensa em 20 μ L de água MilliQ ultrapura e 5 μ L de tampão de amostra 5x (125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2,0% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (m/v), glicerol 20% (v/v) e β -mercaptoetanol 5,0% (v/v)). Após esse procedimento foi incubada em água fervente por 10min e aplicada em gel SDS-PAGE 12% (m/v), conforme item abaixo.

4.4.5 Gel SDS-PAGE 12% (m/v) de Poliacrilamida e Zimograma

SDS-PAGE

As amostras a serem analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE foram concentradas utilizando precipitação com ácido tricloroacético (TCA), conforme anteriormente descrito no item 4.4.4. Ao final os precipitados foram ressuspensos em 20 μ L de água MilliQ ultrapura e 5 μ L de tampão de amostra 5x (125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2,0% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (m/v), glicerol 20% (v/v) e β -mercaptoetanol 5,0% (v/v), fervidas e em seguida aplicadas no gel SDS-PAGE 12% (m/v), que foi preparado conforme procedimento descrito por Laemmli (1970).

A corrente elétrica utilizada foi constante, de 25mA para cada gel, durante 65 minutos. Os géis resultados foram corados com *Comassie-Blue*, conforme Arndt *et al.* (2018) ou com Nitrato de Prata, seguiu-se a metodologia descrita por Blum, Beier e Gross (1987).

Zimograma

O zimograma foi realizado da mesma maneira que o SDS-PAGE até o final da corrida eletroforética, exceto pela adição de 500 μ L de amido 1% (m/v) na preparação da malha do gel. Após a corrida, cortou-se a banda referente ao marcador e esta foi corada com *Comassie-Blue* (Arndt *et al.*, 2018), enquanto que o restante do gel foi submetido, primeiramente, a uma lavagem com Triton 2,5% (v/v) por 30 minutos e, posteriormente, com Tampão Fosfato de Sódio 100mM pH 7 por mais 30 minutos. Após esse período, adicionou-se mais 100mL de Tampão Fosfato de Sódio 100mM pH 7 e o gel foi incubado a 60°C por 1h. A atividade amilolítica foi detectada pela adição do Reagente de Fuwa, descrito em Fuwa (1954), a partir da presença de halos de degradação em bandas específicas.

4.4.6 Cthe_0795

4.4.6.1 Clonagem em pET21a

O produto de PCR do gene *Cthe_0795* foi utilizado em uma reação de ligação com o vetor pET21a. Para tal, estes foram previamente submetidos a reação de digestão com as seguintes enzimas de restrição: *BamHI* e *Sall*; e *BamHI* e *XhoI*, respectivamente. As proporções de volume a ser aplicado na ligação entre o gene e vetor foram definidas com base no manual do pET21a (Invitrogen). 5,5µL da amostra do gene digerido foram misturados a 10µL da amostra do plasmídeo digerido, a 2µL de 10x *DNA Ligase Buffer* (New England Biolabs), a 1µL de *DNA Ligase* (New England Biolabs) e a 1,5µL de dH₂O, num volume final de 20µL. A reação foi incubada a 4°C *overnight* e, ao final, a 65°C por 10 minutos para inativação da *DNA Ligase*. Posteriormente, foi então utilizada na transformação de células de *E. coli* DH10β competente por choque térmico (Green e Rogers, 2013), assim como a amostra do pET21a vazio (controle). Para tanto, 5µL da reação de ligação foram misturados ao tubo plástico contendo as células competentes descongeladas. O tubo então foi incubado no gelo por 30min, em seguida a 42°C por 90 segundos e, logo após, no gelo novamente por mais 5min. Após o choque térmico, foram adicionados 800µL de meio SOC (Bactotripton 20g/L; Extrato de Levedura 5g/L; NaCl 0,5g/L; KCl 50mM e Glicose 20mM) e a cultura foi incubada a 37°C por 1h sob agitação a 200rpm para indução do crescimento bacteriano. Foram utilizados 50µL da amostra transformada para plaqueamento em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração final de 100µg/mL. A placa então foi colocada em estufa a 37°C por 16-18h e depois foram coletadas as colônias que cresceram no meio seletivo.

Cerca de 4 colônias foram coletadas e cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/mL, a uma agitação de 200rpm e por 16-18h para posterior extração de DNA plasmidial e confirmação da clonagem por meio de análise de restrição com a enzima *BamHI*. 8µL de DNA plasmidial foram misturados a 1µL de tampão CutSmart e a 1µL de *BamHI*, e a reação foi incubada a 37°C *overnight*. A reação de digestão foi analisada em gel de agarose 0,8% (m/v) após corrida em eletroforese sob corrente de 80V por 40 minutos.

Em seguida um dos 4 clones positivos supracitados foi cultivado nas mesmas condições anteriores para a posterior extração de DNA plasmidial.

Tal amostra de DNA plasmidial foi, então, transformada pelo mesmo método descrito acima em *E. coli* BL-21 para a expressão da proteína heteróloga. Após a obtenção e cultivo de 3 colônias desta linhagem selecionadas em meio LB sólido seletivo, realizou-se extração de DNA plasmidial e, posteriormente, a confirmação da clonagem pelo mesmo método descrito

acima. As etapas de restrição e análise das reações também ocorreram conforme foram detalhadas anteriormente.

Os clones denominados AG1; AG2; e AG3 foram, então, cultivados em meio LB líquido contendo ampicilina a uma concentração final de 100 µg/mL, a uma agitação de 200 rpm e por 16-18h e alíquotas foram retiradas para armazenamento a -80°C na presença de glicerol a uma concentração final de 20%. Os clones foram utilizados posteriormente nos experimentos de indução para a obtenção da proteína recombinante (AGdase).

4.4.6.2 Análise da expressão da proteína recombinante (AGdase)

O clone AG1 selecionado como descrito acima foi cultivado em meio LB líquido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL e IPTG na concentração de 0,5mM a 37°C e agitação de 180rpm. Nos tempos de cultivo de 0h; 2,5h e 5h uma alíquota de 10mL de cada uma das culturas foi retirada, centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em solução de lise (Tampão Fosfato 20mM pH 7,4, NaCl 500mM). A lise foi realizada por sonicação em amplitude de 35%, “pulse on” 15 “pulse off” 15, por 3 minutos, em seguida foi adicionado PMSF 1mM aos lisados, que foram centrifugados por 30 minutos a 4°C e 13.000 rpm. O sobrenadante e o precipitado, correspondente à fração insolúvel, foram coletados e utilizados como fonte de proteínas na análise por SDS-PAGE 12% (m/v) conforme item 4.4.5 e detecção de atividade amilolítica por (Fuwa, 1954).

4.4.7 Cthe_2191

4.4.7.1 Clonagem em pGEM-T Easy

O produto da PCR do gene Cthe_2191 foi utilizado em reação de ligação com o vetor pGEM®-T *Easy Vector* (Promega), com o objetivo de obtenção de maior concentração deste. As proporções de volume aplicado na ligação entre o gene e vetor foram definidas com base no manual do vetor (Promega). 1,5µL do produto de PCR foram misturados a 0,5µL da amostra do vetor, a 2,5µL de 2x *DNA Ligase Buffer* (Promega) e a 0,5µL de *DNA Ligase* (Promega), num volume final de 5µL. A reação foi incubada a 16°C *overnight*. Posteriormente, foi então utilizada na transformação de células de *E.coli* DH10β competente por eletroporação segundo

Lessard (2013), assim como a amostra do pGEM-T vazio (controle). Para tanto, 2 μ L da reação de ligação foram misturados ao tubo plástico contendo as células competentes descongeladas. A mistura foi, então, colocada em cubeta de eletroporação e o pulso de 1,8 kV com 25 μ F e 200 Ω foi aplicado em intervalos de 4 milisegundos, utilizando o equipamento *MicroPulser* (Bio-rad). Após o choque, foram adicionados 800 μ L de meio SOC (Bactotripton 20g/L; Extrato de Levedura 5g/L; NaCl 0,5g/L; KCl 50mM e Glicose 20mM) e a cultura foi incubada a 37°C por 1h sob agitação a 200rpm para indução do crescimento bacteriano. Foram utilizados 50 μ L da amostra transformada para plaqueamento em meio LB sólido contendo ampicilina/X-GAL/IPTG nas concentrações finais de 100 μ g/mL, 40g/mL e 1mM, respectivamente. A placa então foi colocada em estufa a 37°C por 12h e depois foram coletadas as colônias que cresceram no meio seletivo para a seleção azul-branco.

Cerca de 2 colônias brancas (clones positivos) foram coletadas e cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina na concentração final de 100 μ g/mL, a uma agitação de 200rpm e por 16-18h para posterior extração de DNA plasmidial e confirmação da clonagem por meio de análise de restrição com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. 3 μ L de uma das amostras de DNA plasmidial foram misturados a 2 μ L de tampão D (Promega), a 1,5 μ L de *NdeI*, a 1,5 μ L de *XhoI* e a 2 μ L de dH₂O, num volume final de 10 μ L. A reação foi incubada a 37°C *overnight* e a 65°C por 15 minutos, para a inativação das enzimas. A reação de digestão foi analisada em gel de agarose 0,8% (m/v) após corrida em eletroforese sob corrente de 80V por 40 minutos.

Em seguida foram realizadas mais 6 reações de digestão iguais à descrita acima para, após a aplicação em gel de agarose 0,8% (m/v) e corrida nas mesmas condições mencionadas, extrair e purificar as bandas do tamanho de 2,2 Kb deste, referentes ao gene *Cthe_2191* digerido com as enzimas de restrição supracitadas. A extração de bandas do gel e purificação dos fragmentos foi realizada utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Paralelamente, o vetor pET21a também foi utilizado em reação de digestão nas mesmas condições daquelas realizadas para a amostra de DNA plasmidial descrita acima.

4.4.7.2 Clonagem em pET21a

A amostra extraída do gel e o vetor digerido foram utilizados em reação de ligação. As proporções de volume entre o inserto e o vetor, bem como as condições da reação ocorreram

conforme descrito no item 4.4.7.1. Posteriormente, foi então utilizada na transformação de células de *E. coli* XL-10 Gold competentes por choque térmico (Green e Rogers, 2013), conforme o item 4.4.6.1.

As etapas sequenciais seguintes de coleta e cultivo das colônias crescidas, extração de DNA plasmidial, confirmação da clonagem por análise de restrição e análise das reações seguiram exatamente como descrito para o item 4.4.7.1.

Um dos clones positivos supracitados foi, então, cultivado em meio LB líquido contendo ampicilina a uma concentração final de 100 µg/mL, a uma agitação de 200 rpm e por 16-18h para a posterior extração de DNA plasmidial e foi transformada pelo mesmo método de choque térmico descrito em 4.4.6.1 em *E. coli* BL-21 para a expressão da proteína heteróloga. Novamente, as etapas de coleta e cultivo das colônias, extração de DNA plasmidial, confirmação da clonagem e análise das reações seguiram conforme item 4.4.7.1.

Os clones positivos denominados GL1 e GL2 foram, então, cultivados nas mesmas condições anteriores e alíquotas foram retiradas para armazenamento a -80°C na presença de glicerol a uma concentração final de 20%. Os clones foram utilizados posteriormente nos experimentos de indução para a obtenção da proteína recombinante (GIB).

4.4.7.3 Análise da expressão da proteína recombinante (GIB)

O clone GL1 selecionado como descrito acima foi cultivado em 10mL de meio LB líquido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL e IPTG na concentração de 0,75mM a 37°C e agitação de 200rpm por 4,5h. Ao final deste período, as etapas de centrifugação, lise e coleta das amostras foram iguais às descritas para os outros genes no item 4.4.6.2. A detecção da atividade de ERG (Enzima Ramificadora de Amido) foi realizada conforme procedimento descrito abaixo.

4.4.7.4 Detecção de Atividade Enzimática do Extrato Bruto

A atividade enzimática de ERG nas amostras de Fração Solúvel do lisado celular foi determinada utilizando o método *Iodine Stain Assay*, conforme Mohtar, Basyaruddin e Rahman (2016). Foram utilizados 100µL da solução do extrato proteico bruto contendo a enzima (fração solúvel do lisado) concentrado 5x, 50µL de Tampão Fosfato de Sódio 50mM pH 7 e 50µL de

amilose 0,1% (m/v), dissolvida da seguinte forma: dissolveu-se 0,1g de amilose tipo II (Sigma) em 1mL de etanol. Adicionou-se 10mL de água destilada e 2mL de NaOH 10%. A solução foi aquecida até dissolver todos os componentes, e, após o resfriamento a temperatura ambiente, completou-se o volume para 100mL com água destilada. A mistura foi incubada a 55°C por 40 minutos. A reação foi terminada pela adição de 1mL de “*Iodine Reagent*”, preparado conforme descrito em Mohtar, Basyaruddin e Rahman (2016) e foram realizadas as leituras de absorvância a 660nm em espectrofotômetro. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como o decréscimo de 1% da absorvância a 660nm por minuto, que representa a formação do complexo Amilose-Iodina (Shinohara, 2001). Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas.

4.4.8 Amy1

4.4.8.1 Obtenção do gene

A partir da sequência completa do gene Amy1 no genoma de *P. barengoltzii* J12 (depositada no banco de dados do NCBI), foi realizada a síntese química do gene adicionado dos sítios de restrição *NdeI* e *EcoRI* nas extremidades 5' e 3'. A síntese do gene foi realizada pela empresa *Genone Biotechnologies* (Brasil), com a subclonagem em pET21a.

A construção sintetizada já no vetor de expressão pET21a foi transformada em *E. coli* BL-21 DE3 pelo mesmo método de choque térmico descrito anteriormente (vide item 4.4.6.1). Os 4 clones transformantes obtidos foram cultivados em meio LB líquido contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/mL, a uma agitação de 200 rpm e por 16-18h para extração de DNA plasmidial. Tais amostras foram, então, submetidas a análise de restrição com a enzima *XhoI* para a confirmação da clonagem. 8µL de DNA plasmidial foram misturados a 1µL de tampão CutSmart e a 1µL de *XhoI*, e a reação foi incubada a 37°C *overnight*. A reação de digestão foi analisada em gel de agarose 0,8% (m/v) após corrida em eletroforese sob corrente de 80V por 40 minutos.

Os clones 2, 3, 4 e 5 foram, então, cultivados nas mesmas condições anteriores e alíquotados para estoque a -80°C na presença de glicerol na concentração final de 20% e utilizados posteriormente nos experimentos de indução para a obtenção da proteína recombinante (AMYpB).

4.4.8.2 Análise da expressão da proteína recombinante (AMY Pb)

O clone 2 selecionado como descrito acima foi cultivado em 10mL de meio LB líquido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL e IPTG na concentração de 0,75mM a 37°C e agitação de 200rpm por 4,5h. Ao final deste período, as etapas de centrifugação, lise e coleta das amostras foram iguais às descritas para os outros genes nos itens 4.4.6.2. A detecção da atividade amilolítica foi realizada conforme procedimento descrito abaixo e, para este caso, as frações solúveis também foram submetidas a análises de Zimograma, como descrito no item 4.4.5.

4.4.8.3 Detecção de atividade enzimática do Extrato Bruto

A atividade amilolítica da enzima codificada por Amy1 foi determinada seguindo o método de Fuwa (1954), com algumas modificações. Foram utilizados 100 µL da solução do extrato proteico bruto contendo a enzima (fração solúvel do lisado), diluído 500x, 50µL de Tampão Fosfato de Sódio 50mM pH 7 e 50µL de amido 0,5% (m/v), dissolvido em água fervente por 2 minutos. A mistura foi incubada a 60°C por 15 minutos. A reação foi terminada pela adição de 200µL de Ácido Acético 1M e foi adicionado 0,2mL do reagente de Fuwa para, então, se fazer a leitura de absorvância a 660nm em espectrofotômetro. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que irá ocasionar o decréscimo de 10% da absorvância a 660nm, nas condições mencionadas acima (Fuwa, 1954).

4.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS (AMY Pb e GIB)

As frações solúveis dos lisados contendo as proteínas GIB e AMY Pb foram concentradas por ultrafiltração utilizando membrana de 50 kDa e sistema de ultrafiltração MilliporeSigma™ Amicon™ (MilliporeSigma), sob pressão constante de 1,5 kgf/cm². As amostras foram concentradas 10 vezes, o ultrafiltrado e o concentrado foram coletados para as análises de eletroforese em gel SDS-PAGE a 12% (m/v) conforme item 4.4.5 e este utilizado nas etapas de purificação.

10 mL da amostra concentrada contendo GIB foram submetidos à cromatografia de afinidade His-Trap HP em coluna de bancada utilizando a resina Ni Sepharose HP *Fast Flow* (GE Healthcare), com volume de coluna aproximado de 2 mL, fluxo de 1 mL/min e volume coletado das frações de 5 mL. A eluição da maior parte das proteínas não ligantes se deu com a lavagem da coluna com 25mL do tampão A (Tampão fosfato de sódio 50mM pH 7 e Imidazol 10mM). Foram realizadas também lavagens em sequência com 5mL dos tampões B, C e D (Tampões fosfato de sódio 50mM pH 7 e 150, 300 e 500mM de Imidazol, respectivamente) em sistema de gradiente de Imidazol. As frações eluídas foram coletadas e seu grau de pureza analisado em gel SDS-PAGE a 12% (m/v), conforme item 4.4.5 e a concentração de proteínas nas amostras foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Experimentos para a purificação total ainda estão em andamento.

1 mL da amostra concentrada contendo AMYPB foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 26/60 200pg, utilizando o aparelho AKTA *Purifier* (GE), com fluxo de 1 mL/min, volume de fase móvel de 500 mL e volume coletado das frações de 1 mL. As proteínas foram eluídas utilizando o Tampão fosfato de sódio 50mM pH 7 contendo 150mM de NaCl como fase móvel. As frações foram então utilizadas no ensaio enzimático para quantificação da atividade de α -amilase utilizando o método de Fuwa (1954). As frações que apresentaram atividade foram coletadas e seus graus de pureza analisados em SDS-PAGE a 12% (m/v), conforme procedimento descrito em 4.4.5.

As frações que apresentaram melhora significativa no grau de pureza em relação ao extrato bruto foram reunidas, concentradas 5x em aparelho *SpeedVac* (GE), filtradas em membrana PES (Polietersulfona) 0,22 μ m (Kasvi) e então submetidas à cromatografia de troca iônica. Foi aplicado 1mL da amostra concentrada em coluna de troca aniônica Q FF (GE Healthcare) de 1mL. A corrida foi realizada utilizando o aparelho AKTA *purifier* (GE), com fluxo de 1mL/min e volume coletado das frações de 1mL. Os tampões utilizados nessa segunda etapa cromatográfica foram o tampão A (fosfato de sódio 50mM pH 7) e tampão B (fosfato de sódio 50mM pH 7 e NaCl 1M), também filtrados em membrana de 0,22 μ m (Millipore) e deaerados por 15 minutos antes do uso. As frações correspondentes aos picos de absorbância a 280nm foram coletadas individualmente e utilizadas no ensaio enzimático para quantificação da atividade de α -amilase utilizando o método de Fuwa (1954). Em seguida, as frações com atividade amilolítica escolhidas foram precipitadas utilizando TCA 75% (v/v) (Ácido

tricloroacético) conforme descrito no item 4.4.4 e seus graus de pureza analisados em SDS-PAGE a 12% (m/v) conforme item 4.4.5.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA AMYPb

Efeito da temperatura na atividade de AMYPb

A atividade de AMYPb purificada foi determinada utilizando o método dextrinizante como descrito no item 4.4.8.3, porém com a enzima diluída 10x e adicionando, ao final do ensaio, após o Reagente de Fuwa, 1,2mL de água destilada. Variou-se a temperatura de reação de 20°C a 80°C.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e as atividades foram determinadas em U/mL.

Efeito do pH da atividade de AMYPb

A atividade de AMYPb purificada foi determinada utilizando o método dextrinizante como descrito no item 4.4.8.3, porém com a enzima diluída 10x e adicionando, ao final do ensaio, após o Reagente de Fuwa, 1,2mL de água destilada. Variou-se os tampões utilizados nas reações, que foram: citrato de sódio 100mM (pH 3 a 5); fosfato de sódio 100mM (pH 6 e 7); Tris-HCl 100mM (pH 8 e 9); bicarbonato de sódio 100mM (pH 10).

Os ensaios foram realizados em triplicatas e as atividades foram determinadas em U/mL.

Estabilidade Térmica

A atividade de AMYPb purificada foi determinada utilizando o método dextrinizante como descrito no item 4.4.8.3, porém com a enzima diluída 10x e adicionando, ao final do ensaio, após o Reagente de Fuwa, 1,2mL de água destilada. Variou-se as temperaturas e os intervalos de tempo de pré-incubação realizada em pH 7 (50, 60 e 70°C; e 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 60, 120 e 180 minutos; respectivamente).

Os ensaios foram realizados em triplicatas e as atividades foram determinadas em Atividade Enzimática Relativa (%), considerando como 100% a atividade enzimática decorrente da enzima purificada que não foi pré-incubada (armazenada a 4°C).

Estabilidade em pH

A atividade de AMYPb purificada foi determinada utilizando o método dextrinizante como descrito no item 4.4.8.3, porém com a enzima diluída 10x e adicionando, ao final do ensaio, após o Reagente de Fuwa, 1,2mL de água destilada. Variou-se os tampões e os intervalos de tempo de pré-incubação realizada a temperatura ambiente (Fosfato de Sódio 100mM - pH 6 e 7 e Tris-HCl 100mM - pH 8 e 9; e 0, 15, 30, 60 e 120minutos; respectivamente).

Os ensaios foram realizados em triplicatas e as atividades foram determinadas em Atividade Enzimática Relativa (%), considerando como 100% a atividade enzimática decorrente da enzima purificada que não foi pré-incubada nas diferentes faixas de pH.

Efeito de Íons na Atividade Enzimática

A atividade de AMYPb purificada foi determinada utilizando o método dextrinizante como descrito no item 4.4.8.3, porém com a enzima diluída 10x e adicionando, ao final do ensaio, após o Reagente de Fuwa, 1,2mL de água destilada. Variou-se os íons e as suas concentrações na pré-incubação com a enzima (CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, KCl, NaCl, FeCl₃, CuCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ e EDTA, nas concentrações de 1mM e 10mM).

Os ensaios foram realizados em triplicatas e as atividades foram determinadas em Atividade Enzimática Relativa (%), considerando como 100% a atividade enzimática decorrente da enzima purificada que não foi pré-incubada com os íons e EDTA.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software “*Past*”. Os dados foram submetidos ao teste “*One-Way ANOVA*” seguido de teste Tukey para verificar o grau de significância estatística entre as variáveis amostrais.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína predita AGase, a partir da sequência do gene Cthe_0795, apresentou os domínios conservados “Alpha-amylase_N” e “AmyAc_CMD” encontrados em enzimas pertencentes às superfamílias “Alpha-amylase_N” e “AmyAc”, respectivamente (Figura 7). A primeira superfamília inclui enzimas classificadas como alfa-amilases com região conservada na porção N-terminal da sequência proteica primária. Esta abrange a alfa amilase já caracterizada de *Thermoactinomyces vulgaris* R-47, que possui atividade hidrolítica sobre, além de amido, pululana e ciclomaltodextrina (Kamitori *et al.*, 1999). Já segunda superfamília inclui pululanases, amilases maltogências e ciclomaltodextrinases, que hidrolisam ligações α -1,4 presentes em pululana, amido e ciclomaltodextrinas, gerando panose e maltose, respectivamente; e que realizam, também, transglicosilação de oligossacarídeos para grupos aceptores C3, C4 ou C6. A proteína predita apresentou massa molecular estimada de 68 kDa e ponto isoelétrico de 5,8. Não foi detectada a presença de peptídeo sinal.

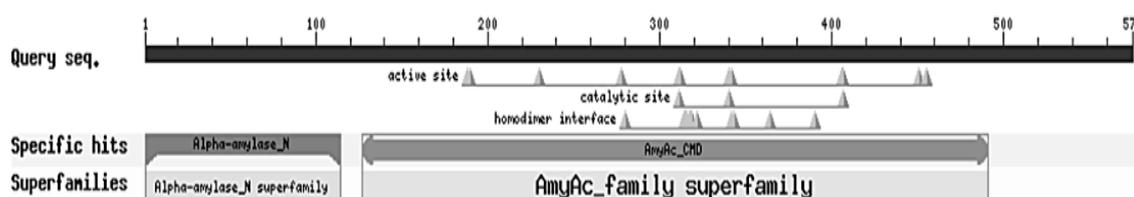


Figura 7. Domínios conservados da sequência predita de aminoácidos de AGase obtido por comparação com sequências depositadas aonde utilizando a ferramenta “*Conserved domains*”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A sequência predita de AGase apresentou identidade, seja em maior ou menor grau, sobretudo com as sequências proteicas de enzimas do tipo alfa-glicosidases (Tabela 1), ainda não caracterizadas. Tais enzimas catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 em uma série de substratos polissacarídicos, incluindo amido, pululana e ciclomaltodextrina. Os *best hits*, listados como os 5 primeiros, incluem outras alfa-glicosidases de *Hungateiclostridium thermocellum* (99,83% e 99,65% de identidade) e de outras espécies do gênero *Hungateiclostridium* (84,52% e 56,14% de identidade). Estas espécies, denominadas *Hungateiclostridium mesophilum* e *Hungateiclostridium clavifarum*, apresentam características em comum com espécie de referência estudada neste trabalho: são gram-positivas, anaeróbias,

crecem em temperaturas próximas (entre 45°C e 60°C) e são conhecidas por produzir uma série de enzimas hidrolíticas envolvidas, sobretudo, na degradação de lignocelulose. (Rettenmaier *et al.*, 2019; Shiratori *et al.*, 2009). Apesar disso, assim como para *H. thermocellum*, possuem uma grande quantidade de genes putativos de enzimas ainda não caracterizadas, dentre elas as amilases.

Tabela 1. Resultado da análise na ferramenta “blastp”, do banco de dados NCB (*National Center for Biotechnology Information*), indicando os 10 primeiros resultados em ordem decrescente do grau de identidade da proteína AGase com outras enzimas de outros microorganismos.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Identity	Acession
alpha-glycosidase [<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>]	1185	1185	100%	0.0	100%	WP_011837902.1
alpha-glycosidase [<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>]	1184	1184	100%	0.0	99,83%	WP_004463363.1
alpha-glycosidase [<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>]	1181	1181	100%	0.0	99,65%	WP_003516388.1
alpha-glycosidase [<i>Hungateiclostridium mesophilum</i>]	1034	1034	100%	0.0	84,52%	WP_128706214.1
alpha-glycosidase [<i>Hungateiclostridium clavifarum</i>]	682	682	99%	0.0	56,14%	WP_014255199.1
alpha-glycosidase [<i>Firmicutes bacterium</i>]	482	482	92%	8e-162	43,41%	HBG01994.1
alpha-glycosidase [<i>Caldicoprobacter oshimai</i>]	482	482	90%	2e-161	45,32%	PZN11116.1
alpha-glycosidase [<i>Paenibacillus elgii</i>]	481	481	99%	4e-161	41,10%	WP_063181505.1
glycoside hydrolase family 13 protein [<i>Planifilum fulgidum</i>]	481	481	99%	8e-161	39,86%	WP_092035520.1

Na árvore filogenética (Figura 8), AGase se agrupou no clado das enzimas pertencentes à subfamília 20 da família GH13 das glicosil hidrolases, com níveis e parâmetros adequados de validação estatística feita pelo software (vide item 4.2). A maior proximidade se deu com o

acesso BAA02473.1, de *Thermoactinomyces vulgaris* R-47, referente a uma enzima já caracterizada como uma alfa amilase do tipo Neopululanase e já citada acima.

Os resultados destas análises fornecem indícios de que, provavelmente, dada a presença de domínios específicos, dada a proximidade com outras enzimas hidrolíticas já caracterizadas e dado o grau de identidade com outras sequências proteicas, a atividade enzimática de AGase não se restringe a hidrólise unicamente de amido.

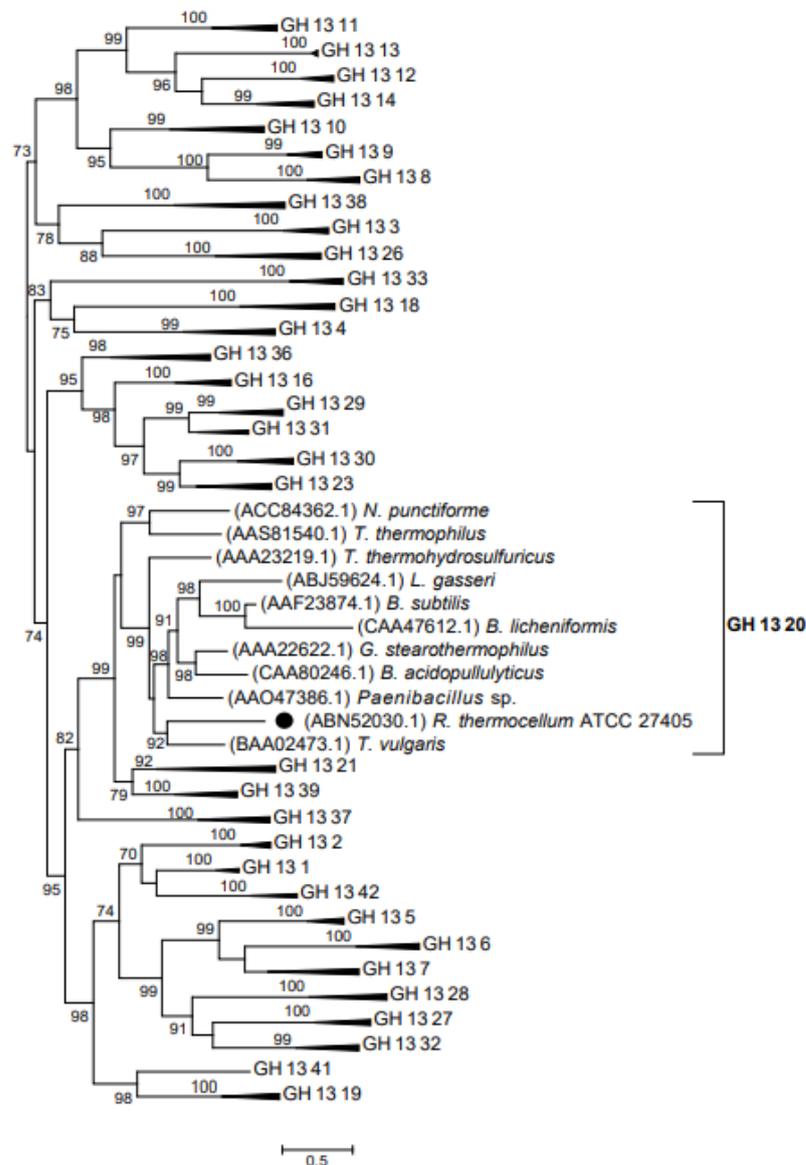


Figura 8. Árvore filogenética com sequências de aminoácidos de microorganismos procaríotos da plataforma CAZy das 42 subfamílias incluídas na família GH13. Os microorganismos da subfamília 20 das glicosil hidrolases

estão indicados por seus *Acession Numbers* seguidos de seu nome científico. Os microorganismos das outras subfamílias foram colabados a fim de diminuir o tamanho da árvore. A análise mostra que a proteína AGase (destacada com um círculo em negrito) se agrupa na subfamília 20 das glicosil hidrolases.

A proteína predita GIB, a partir da sequência do gene *Cthe_2191*, apresentou um único domínio conservado provisório “PRK05402” encontrado em enzimas pertencentes à superfamília “GlgB” (Figura 9). Tal superfamília inclui as chamadas ERG (enzimas ramificadoras de glicogênio ou “*glycogen branching enzymes*”), que atuam catalisando reações de transglicosilação de ligações glicosídicas α -1,4 em α -1,6, normalmente envolvidas no processo metabólico de síntese de glicogênio em procariotos e eucariotos (Suzuki e Suzuki, 2016). A proteína predita apresentou massa molecular estimada de 87 kDa, ponto isoelétrico de 5,6 e não foi detectada a presença de sequência de peptídio sinal, característica comumente observada nesse tipo de enzima, visto que está relacionada ao metabolismo intracelular.

A ausência de peptídeo sinal está de acordo com Burton (2010), que mostrou que esta proteína se localiza na membrana celular de *H. thermocellum* quando cultivada em meio contendo celobiose como fonte de carbono, indicando que, dessa forma, trata-se de um gene que codifica uma proteína que não é secretada para o meio extracelular.

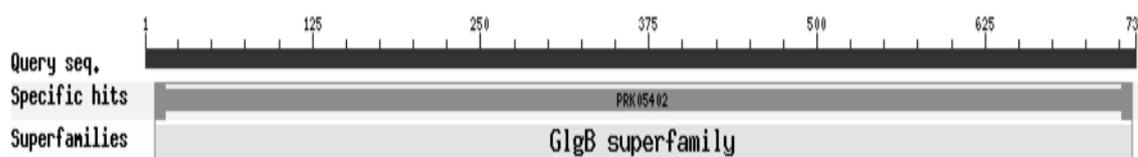


Figura 9. Domínios conservados da sequência predita de aminoácidos de GIB obtido por comparação com sequências depositadas aonde utilizando a ferramenta “*Conserved domains*”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A sequência predita de GIB apresentou identidade, seja em maior ou menor grau, sobretudo com sequências proteicas de um único tipo de enzima: proteína ramificadora 1,4-alfa-glicana (as chamadas ERG’s ou “*Glycogen branching enzymes*”) (Tabela 2), cujo mecanismo de ação já foi descrito acima. De todos os hits apresentados, nenhum está depositado no banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*) e nem está caracterizado. Os *best hits*, listados como os 5 primeiros, incluem outra ERG de *H. thermocellum*; bem como de outras

espécies do gênero *Hungateiclostridium*: *H. mesophilum*, que já foi descrita acima e de *Hungateiclostridium straminisolvens*, bactéria também anaeróbia, termófila, celulolítica (Kato *et al.*, 2004) e ainda não estudada quanto à produção de amilases.

Tabela 2. Resultado da análise na ferramenta “blastp”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), indicando os 10 primeiros resultados em ordem decrescente do grau de identidade da proteína GIB com outras enzimas de outros microorganismos.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Identity	Acession
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>]	1538	1538	100%	0.0	100%	WP_003513674.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>]	1536	1536	100%	0.0	99,86%	WP_023062682.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Hungateiclostridium straminisolvens</i>]	1446	1446	100%	0.0	92,40%	WP_038290146.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Hungateiclostridium mesophilum</i>]	1405	1405	100%	0.0	89,01%	WP_128705956.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Unclassified Clostridium</i>]	1404	1404	100%	0.0	88,87%	WP_069196975.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Petroclostridium saccincola</i>]	1305	1305	99%	0.0	81,90%	WP_101298635.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Hungateiclostridium alkalicellulosi</i>]	1298	1298	99%	0.0	81,58%	WP_101298635.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Hungateiclostridium cellulolyticum</i>]	1259	1259	99%	0.0	79,13%	WP_026073800.1
1,4-alpha-glucan branching protein GIB [<i>Hungateiclostridium cellulosolvens</i>]	1117	1117	99%	0.0	69,02%	WP_050753435.1

A proteína predita AMPb, a partir da sequência do gene Amy1, apresentou os domínios conservados “Amy_C”, “IPT_CGTD”, “AmyAc_AmyMalt_CGTase_like” e “CBM20”, encontrados em enzimas pertencentes às superfamílias “Malt_amylase_C”, “IPT”, “AmyAc_family” e “CBM20”, respectivamente (Figura 10). A primeira superfamília inclui enzimas classificadas como amilases maltogênicas com região conservada na porção C-terminal da sequência proteica primária, sendo responsáveis pela hidrólise de ligações α -1,4 do

amido para a formação de maltose. A segunda inclui proteínas caracterizadas como fatores de transcrição, receptores de membrana celular e certas enzimas pertencentes à família GH13 como as ciclomaltodextrinas, que hidrolisam ligações α -1,4 presentes em ciclomaltodextrinas. A terceira inclui as enzimas cujos domínios catalíticos são conservados na família das α -amilases (GH13). Esta abrange, de maneira geral, as que atuam sobre amido, sobre glicogênio, sobre pululana e outros polissacarídeos relacionados: α -amilases (em sua maioria), amilases maltogênica, neopululanase, isoamilase, ciclomaltodextrinase, amilomaltase, entre outras. A última superfamília inclui as enzimas que apresentam sítios de ligação ao amido em regiões específicas em sua sequência primária proteica, por meio do qual irão catalisar as reações. Em sua grande maioria, encontram-se as enzimas degradadoras de amido (α -amilases, β -amilases, glicoamilases, etc). A α -amilase predita apresentou uma massa molecular estimada de 78,5 kDa e um ponto isoelétrico de 5,3. Foi detectada a presença de peptídeo sinal entre os aminoácidos 1-34 da sua sequência primária, indicando que possivelmente trata-se de uma enzima que é secretada para o meio extracelular.

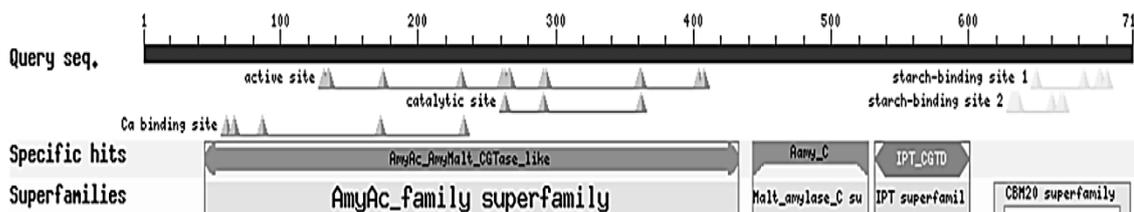


Figura 10. Domínios conservados da sequência predita de aminoácidos de AMYPb obtido por comparação com sequências depositadas aonde utilizando a ferramenta “*Conserved domains*”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A sequência predita de AMYPb apresentou identidade, em mais de 90% das sequências comparadas, sobretudo com sequências proteicas de α -amilases (Tabela 3), conhecidas por hidrolisar as ligações α -1,4 presentes no amido gerando oligossacarídeos menores, ainda não caracterizadas. Os 10 primeiros *hits* listados incluem α -amilases de espécies pertencentes ao gênero *Paenibacillus*, ao qual pertence, também, a proteína estudada. O gênero é conhecido por abranger espécies produtoras de enzimas de significativa relevância do ponto de vista de aplicação industrial, tais como celulases, amilases, pectinases, hemicelulases, lipases, oxigenases, desidrogenases, entre outras (Grady *et al.*, 2016). Dentre as amilases, já foram

descritas e caracterizadas as do tipo pululanases, neopululanases, ciclomaltodextrinases e α – amilases. (Kaulpiboon, Rimphanitchayakit e Pongsawasdi, 2004; Liu *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018; Yebra, Blasco e Sanz, 1999).

Tabela 3. Resultado da análise na ferramenta “blastp”, do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), indicando os 10 primeiros resultados em ordem decrescente do grau de identidade da proteína AMYPb com outras enzimas de outros microorganismos.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Identity	Acession
alpha-amylase [<i>Paenibacillus barengoltzii</i>]	1477	1477	100%	0.0	100%	WP_085278261.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus barengoltzii</i>]	1466	1466	100%	0.0	99,30%	WP_127575511.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus sp. J14</i>]	1465	1465	100%	0.0	99,17%	WP_028537742.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus sp. J6</i>]	1458	1458	100%	0.0	98,75%	WP_085170304.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus sp. oral taxon 786</i>]	1386	1386	100%	0.0	94,58%	WP_009226007.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus rubinfantis</i>]	1356	1356	100%	0.0	91.93%	WP_059043089.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus phocaensis</i>]	1356	1356	100%	0.0	90,13%	WP_068785488.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus lutimineralis</i>]	1280	1280	100%	0.0	84,42%	WP_127002184.1
alpha-amylase [<i>Paenibacillus bouchesdurhonensis</i>]	1263	1263	100%	0.0	83,87%	WP_110931773.1

Os genes Cthe_0795 e Cthe_2191 foram amplificados a partir do DNA de *C. thermocellum* B8, apresentando os tamanhos esperados de 1,7Kb e 2,2Kb, respectivamente (Figura 11).

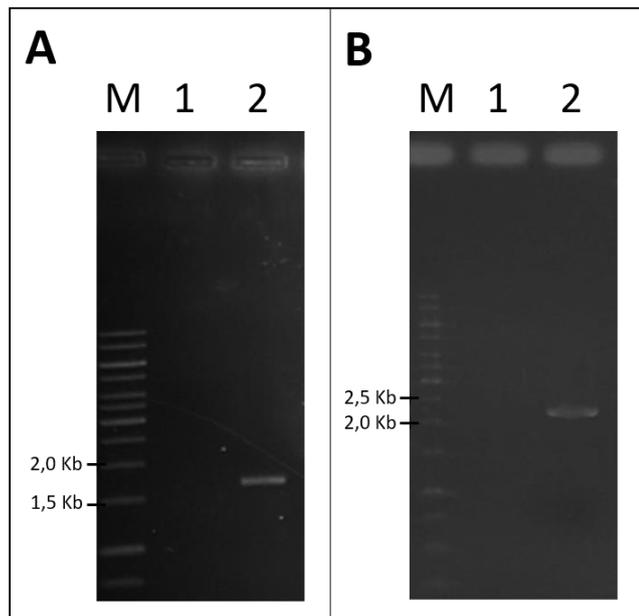


Figura 11. Análise em gel de agarose 0,8% (m/v) da amplificação dos genes de interesse. (A) Cthe_0795. M: marcador; 1: Fragmento de DNA amplificado de acordo com o tamanho esperado, de aproximadamente 1,7Kb. (B) Cthe_2191. M: marcador; 1: Fragmento de DNA amplificado de acordo com o tamanho esperado, de aproximadamente 2,2Kb.

Os clones 1 a 4, bem como os clones AG1, AG2 e AG3, referentes aos clones transformantes selecionados de *E.coli* DH10 β e *E.coli* BL-21, apresentaram um fragmento de restrição do tamanho esperado de 7,1 Kb para o gene Cthe_0795, confirmando, assim, a sua clonagem nestas 2 linhagens (Figura 12).

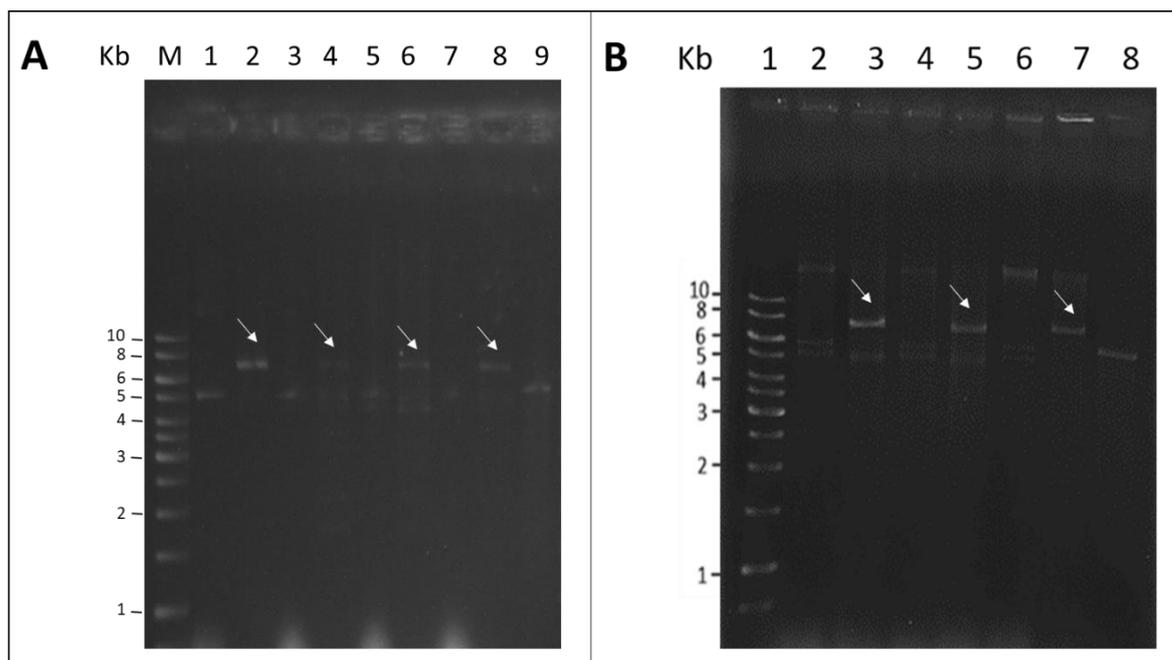


Figura 12. Análise da restrição dos clones 1, 2, 3 e 4 (A) e AG1, AG2 e AG3 (B) com *Bam*HI em gel de agarose 0,8% (m/v), com a presença de fragmento esperado de 7,1 Kb indicada pelas setas. (A): 2, 4, 6 e 8) DNA plasmidial dos clones 1, 2, 3 e 4 digeridos. 1, 3, 5 e 7) DNA plasmidial dos clones 1, 2, 3 e 4 não digeridos. 9) DNA plasmidial do clone controle sem inserto digerido. (B): 3, 5 e 7) DNA plasmidial dos clones AG1, AG2 e AG3 digeridos. 2, 4 e 6) DNA plasmidial dos clones AG1, AG2 e AG3 não digeridos. 8) DNA plasmidial do clone controle sem inserto digerido.

Na fração insolúvel da indução para o clone AG1 foi observada uma banda proteica com massa molecular entre 25 e 35KDa nas preparações 1(2) e 1(3), não observada nas demais preparações 1(1); CT(1); CT(2); CT(3) (Figura 13A). Não foi observada presença desta banda proteica para as análises com a fração solúvel (Figura 13B). Mesmo apresentando uma banca proteica diferencialmente expressa para o clone AG1, não foi detectada atividade α -amilase pelo método de Fuwa (1954).

Sabe-se, com base na literatura, que a expressão heteróloga em *E. coli* é comumente direcionada para acumulação das proteínas recombinantes em agregados insolúveis intracelulares, os corpos de inclusão. Estes são identificados no lisado celular como a fração insolúvel, enquanto que a fração solúvel abrange as proteínas não acumuladas nestes agregados, incluindo o menor percentual das proteínas recombinantes. As proteínas das frações insolúveis usualmente encontram-se desnaturadas por perderem a sua estrutura secundária, e, por esse motivo, não possuem atividade enzimática nessas condições, tendo, dessa forma, que ser solubilizadas e renaturadas (Kaur, Kumar e Kaur, 2017).

A banda proteica na preparação do clone AG1 apresentou massa molecular inferior ao tamanho esperado de 68kDa. Tal fato pode estar associado à presença de códons raros na sequência proteica primária de AGase para a sua codificação no sistema de expressão em questão, implicando em problemas traducionais como a terminação prematura (Kaur, Kumar e Kaur, 2017). Além disso, a ausência de atividade enzimática pode estar associada ao fato de estar desnaturada por encontrar-se agregada a outras proteínas, e, ainda, por ter sido sintetizada pelo sistema de expressão em um padrão de dobramento, também chamado de *folding*, diferente do seu padrão nativo.

Desta forma, sugere-se que a expressão da proteína AGase foi totalmente desviada para a formação de corpos de inclusão e que esta foi expressa de maneira truncada, já que a massa molecular esperada da proteína era de 68 kDa. As amostras das frações solúveis dos clones AG1 induzidos também foram submetidas à ensaios enzimáticos de Fuwa (1954), mas não foram detectadas atividades enzimáticas sob amido.

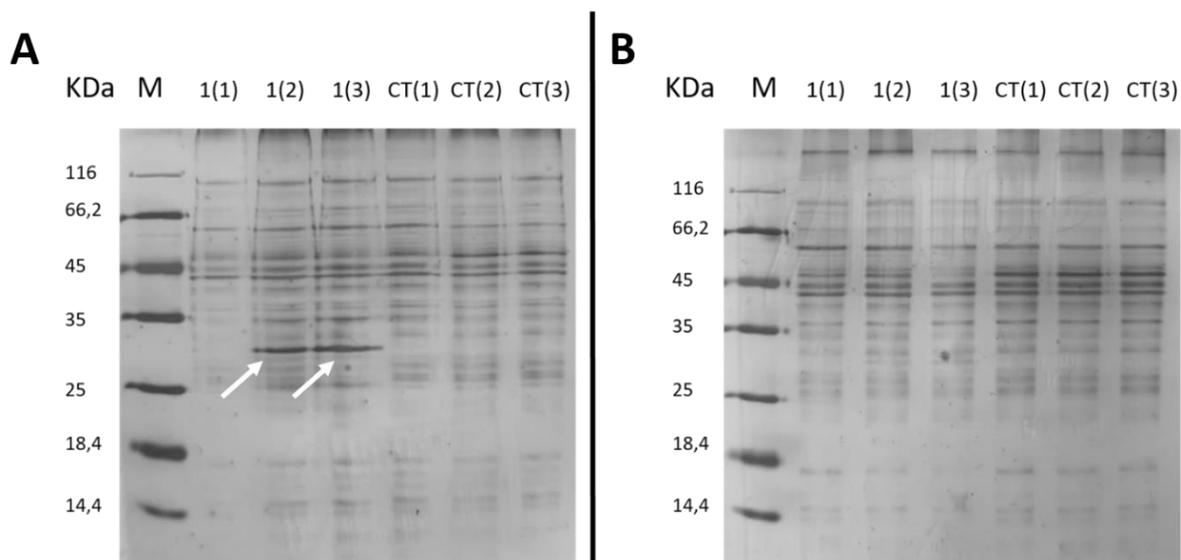


Figura 13. Análise da expressão dos clones AG1 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em SDS-PAGE 12% (m/v) corado com nitrato de prata de perfil de indução utilizando IPTG 0,5mM a 37°C sob agitação de 200rpm. Presença da proteína AGase indicada pelas setas em branco. M: marcador; 1(1): clone AG1 não induzido; 1(2) clone AG1 induzido por 2,5h; 1(3) clone AG1 induzido por 5h; CT(1): clone negativo não induzido; CT(2): clone negativo induzido por 2,5h; CT(3) clone negativo induzido por 5h. (A): Perfil da fração insolúvel do lisado dos clones em questão. (B): Perfil do sobrenadante (fração solúvel) do lisado dos clones em questão.

Os clones referentes aos clones transformantes selecionados de *E. coli* DH10 β , *E. coli* XL-10 Gold e *E. coli* BL-21 apresentaram, em cada etapa, dois fragmentos de restrição de tamanhos esperados (de 3 e 2,2 Kb; de 5,4 e 2,2 Kb; e de 5,4 e 2,2 Kb, respectivamente), confirmando, assim, a clonagem do gene *Cthe_2191* nestas 3 linhagens (Figura 14).

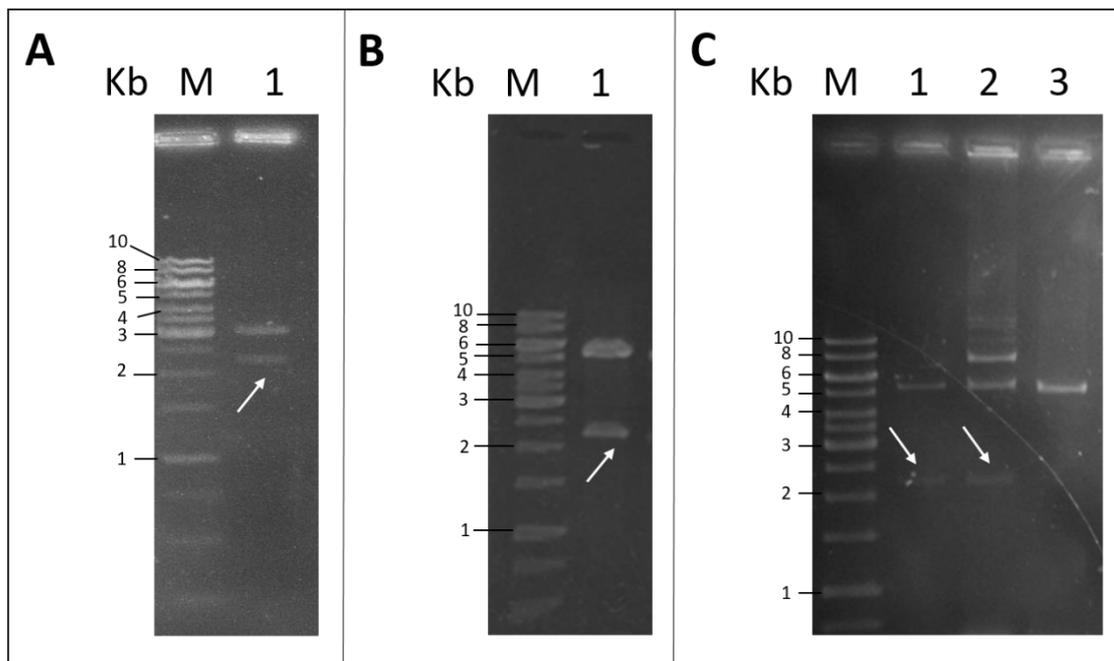


Figura 14. Análise da restrição dos clones positivos em *E. coli* DH10 β (A), *E. coli* XL-10 Gold (B) e *E. coli* BL-21 (C) digeridos com *NdeI* e *XhoI* em gel de agarose 0,8% (m/v), com a presença de fragmentos esperados de 2,2 Kb indicada pelas setas em branco. (A): 1) DNA plasmidial do clone 1 digerido. (B) 1) DNA plasmidial do clone 1 digerido. (C) 1 e 2) DNA plasmidial dos clones GL1 e GL2 digeridos. 3) DNA plasmidial do clone controle sem inserto digerido.

Na fração insolúvel da indução para o clone GL1, foi observada uma banda proteica com massa molecular próxima ao marcador de 66,2 kDa na preparação 4, não observada nas demais preparações 1, 2 e 3 (Figura 15A). Mesmo apresentando esta banda diferencialmente expressa para este clone, não foi detectada atividade de α -amilase pelo método de Fuwa (1954) em tal preparação.

Na fração solúvel da indução para este mesmo clone 2, foi observada também uma banda proteica semelhante àquela observada e descrita na fração insolúvel na preparação 4, não identificada nas preparações 1 e 2 (Figura 15B). No entanto, esta apresentou-se em uma

intensidade muito menor e, apesar disso, após concentrada, apresentou atividade significativa de ERG (Enzima ramificadora de amido) pelo método descrito no item 4.4.7.4.

A ausência de atividade enzimática para a preparação 4 da fração insolúvel pode ser explicada pelo mesmo fato descrito para a proteína AGase: proteínas recombinantes sendo expressas na forma de agregados insolúveis, denominados corpos inclusão, e perdendo sua estrutura secundária, desnaturando-se após a síntese proteica intracelular. Além disso, o menor grau de intensidade da expressão diferencial da banda proteica referente a preparação 4 na fração solúvel em relação à da fração solúvel pode estar associada a outro fato também mencionado anteriormente: no sistema de expressão utilizado, a maior parte da expressão heteróloga é desviada para a formação destes agregados intracelulares insolúveis (Kaur, Kumar e Kaur, 2017).

Desta forma, sugere-se que a proteína GIB foi expressa na fração solúvel adotando um *folding* proteico que permitiu a ocorrência e manutenção de sua atividade enzimática sobre amido, porém numa concentração baixa.

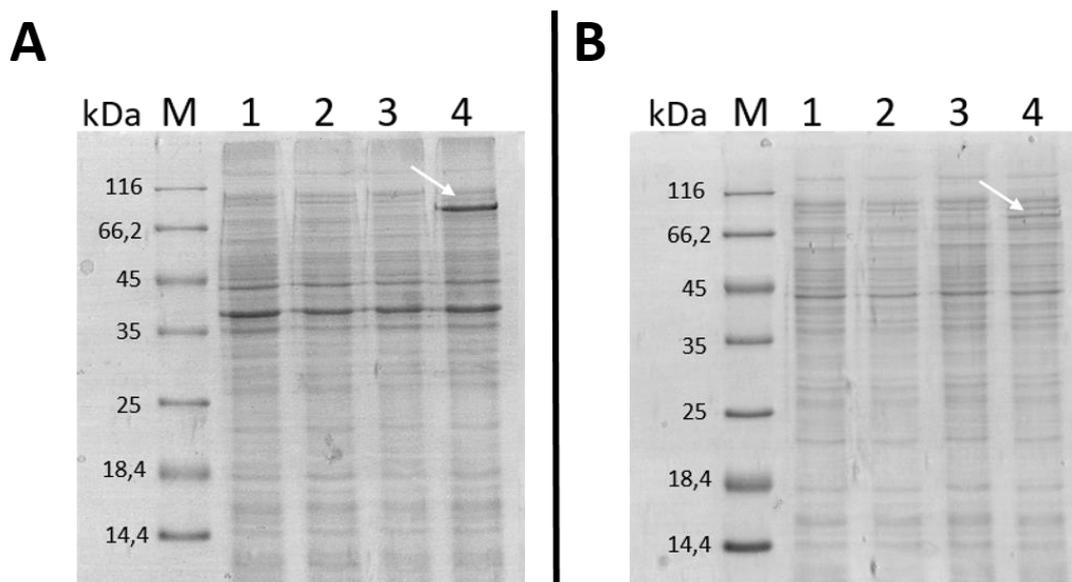


Figura 15. Análise da expressão dos clones GL1 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em SDS-PAGE 12% (m/v) corado com nitrato de prata de perfil de indução utilizando IPTG 0,75mM a 37°C sob agitação de 200rpm por 4,5 horas. Presença da proteína GIB indicada pelas setas em branco. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific). 1): clone CT não induzido. 2) clone CT induzido. 3) clone GL1 não induzido. 4) clone 2 induzido. (A): Perfil da fração insolúvel do lisado dos clones em questão. (B): Perfil do sobrenadante (fração solúvel) do lisado dos clones em questão.

A fração solúvel do lisado do clone GL1 (clone 10) apresentou valor de atividade de ERG (Enzima ramificadora de amido) cerca de 10 vezes superior aos clones controle (Figura 16). Também foi detectada atividade para o clone GL1 (10) não induzido, com significância estatística.

O fato de tal clone ter apresentado atividade de ERG mesmo sem ter sido induzido pode estar associado ao metabolismo basal de amido de *E. coli* BL-21, cuja taxa total aumenta proporcionalmente à quantidade de células presentes no cultivo; e pode ser explicado também pela presença de resquícios de lactose (molécula que atua como agente indutor natural para o gene em questão) no reagente “Peptona” utilizado para preparar o meio LB em que os clones foram crescidos.

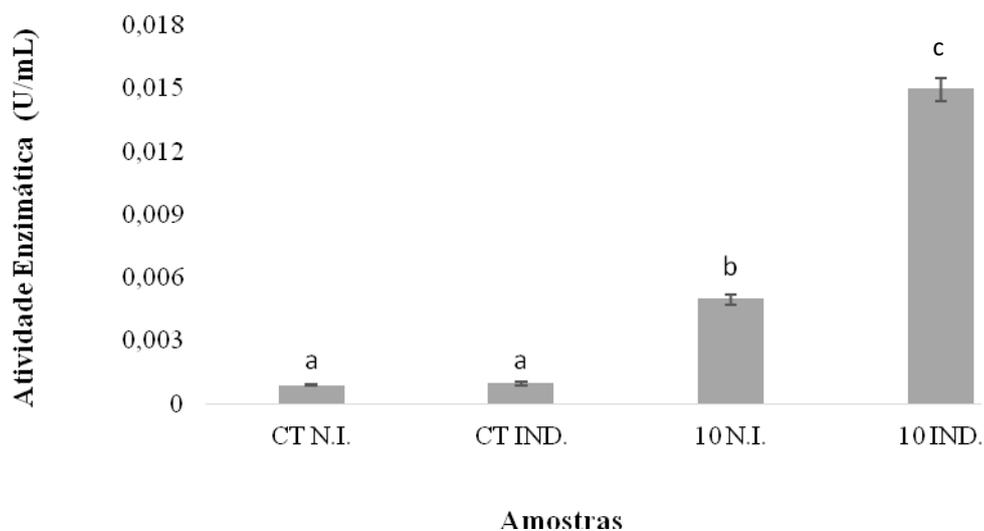


Figura 16. Quantificação da atividade de amilase (ERG) utilizando fração solúvel do lisado do clone 10 induzido e não induzido e clone controle (plasmídeo sem inserto). CT N.I.) clone controle não induzido. CT IND.) clone controle induzido. 10 N.I.) clone 10 não induzido; 10IND.) clone 10 induzido. a-b $p < 0,05$; b-c $p < 0,05$.

A purificação parcial de GIB se deu em cromatografia de bancada de afinidade. A proteína heteróloga foi eluída na presença de tampão contendo 500mM de Imidazol. Destacam-se também a sua eluição durante a segunda lavagem com este tampão e a grande quantidade de

interações inespecíficas decorrentes da presença de outras proteínas na amostra com a resina. (Figura 17).

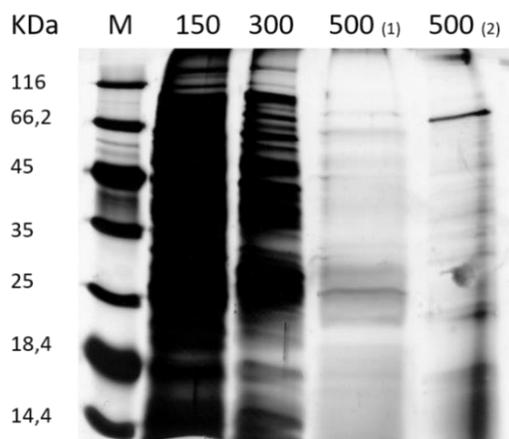


Figura 17. Análise em SDS-PAGE 12% (m/v) da purificação parcial de GIB. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific); 150: Amostra eluída com 150mM de Imidazol; 300: Amostra eluída com 300mM de Imidazol; 500(1): Amostra eluída durante a primeira lavagem com 500mM de Imidazol; 500(2): Amostra eluída durante a segunda lavagem com 500mM de Imidazol contendo GIB parcialmente purificada.

Os clones 2, 3 4 e 5 , referentes aos clones transformantes selecionados de *E. coli* BL-21, apresentaram um fragmento de restrição do tamanho esperado de 7,4 Kb para o gene *Amy1*, confirmando, assim, a sua clonagem nesta linhagem (Figura 18).

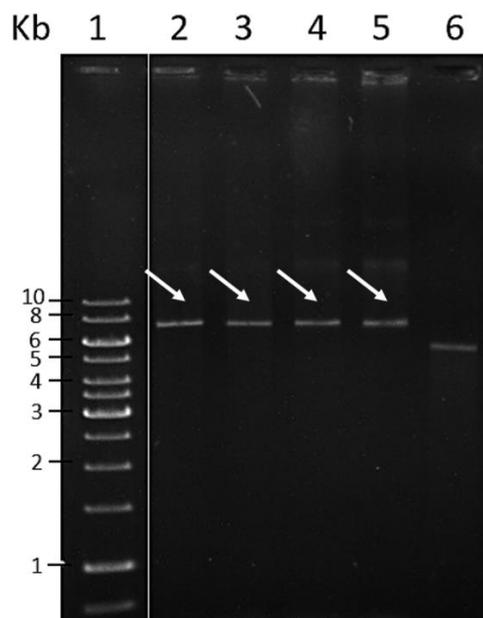


Figura 18. Análise da restrição dos clones 2, 3, 4 e 5 com *Bam*HI em gel de agarose 0,8% (m/v), com a presença de fragmento esperado de 7,4 Kb indicada pelas setas. 1) Marcador *GeneRuler* 1Kb *Dna Ladder*. 2, 3, 4 e 5) DNA plasmidial dos clones 2, 3, 4 e 5 digeridos. 6) DNA plasmidial do clone controle (sem inserto) digerido.

Na fração insolúvel da indução para o clone 2 foi observada uma banda proteica com massa molecular próxima ao marcador de 66,2 kDa na preparação 4, não observada nas demais preparações 1, 2 e 3 (Figura 19A). Mesmo apresentando esta banda diferencialmente expressa para o clone 2, não foi detectada atividade de α -amilase pelo método de Fuwa (1954) em tal preparação.

Na fração solúvel da indução para este mesmo clone 2, foi observada também uma banda proteica semelhante àquela observada e descrita na fração insolúvel na preparação 4, não identificada nas preparações 1 e 2. No entanto, esta apresentou-se em uma intensidade muito menor e, apesar disso, apresentou atividade significativa de α -amilase pelo método de Fuwa (1954) (Figura 19B). Na preparação 3, foi observada também uma banda diferencialmente expressa em relação a 1 e 2, porém menos intensa que a 4, e tal preparação apresentou, também, atividade enzimática de α -amilase pelo mesmo método.

A presença da banda proteica expressa diferencialmente na preparação 3 em relação a 1 e 2 e a detecção de atividade enzimática nessa preparação podem estar associadas ao mesmo fato já descrito anteriormente: metabolismo e expressão basal da construção transformada, e, em decorrência do aumento da quantidade de células presentes na amostra, ocorreu, conseqüentemente, um aumento da quantidade de enzimas com tal atividade.

A ausência de atividade enzimática para a preparação 4 da fração insolúvel; bem como o menor grau de intensidade da expressão diferencial da banda proteica referente a preparação 4 na fração solúvel em relação à da fração solúvel podem ser explicados, também, pelo mesmo fato descrito anteriormente para a expressão das outras proteínas recombinantes: desvios para a formação de agregados (corpos de inclusão) insolúveis (Kaur, Kumar e Kaur, 2017).

Desta forma, sugere-se que a proteína AMYPb foi expressa na fração solúvel adotando um *folding* proteico que permitiu a ocorrência e manutenção de sua atividade enzimática sobre amid. Além disso, por se tratar da enzima heteróloga que obteve um maior rendimento de expressão e maior atividade enzimática, AMYPb foi escolhida para continuar as análises de caracterização após sua purificação.

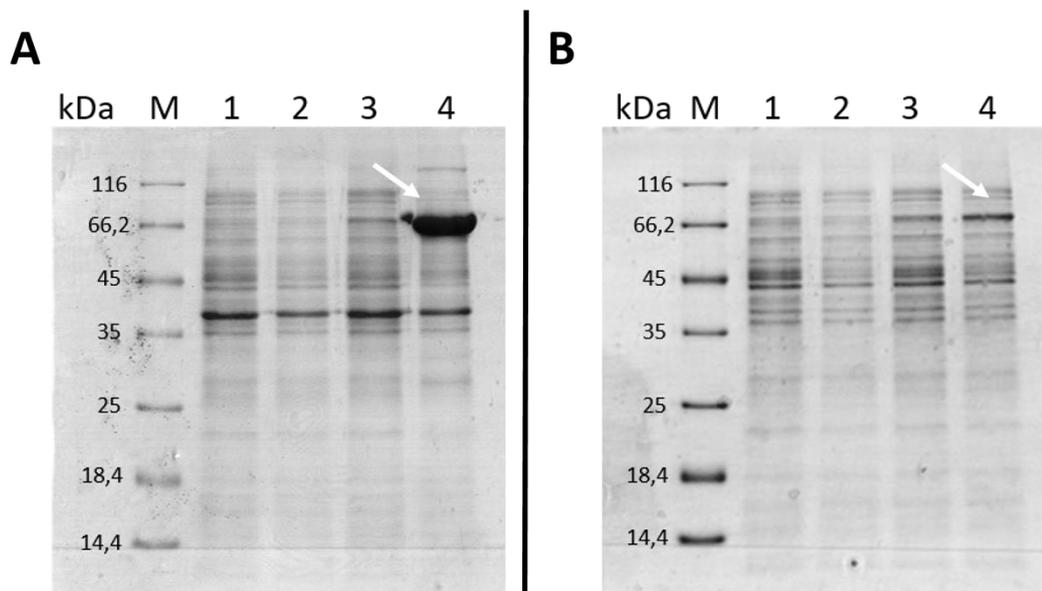


Figura 19. Análise da expressão dos clones 2 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em SDS-PAGE 12% (m/v) corado com nitrato de prata de perfil de indução utilizando IPTG 0,75mM a 37°C sob agitação de 200rpm por 4,5 horas. Presença da proteína AMYPb indicada pelas setas em branco. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific). 1): clone CT não induzido. 2) clone CT induzido. 3) clone 2 não induzido. 4) clone 2 induzido. (A): Perfil da fração insolúvel do lisado dos clones em questão. (B): Perfil do sobrenadante (fração solúvel) do lisado dos clones em questão.

A fração solúvel do lisado do clone 2 apresentou valor de atividade de α -amilase cerca de quase 40 vezes superior aos clones controle (Figura 20). Também foi detectada atividade para o clone 2 não induzido, com significância estatística.

O fato de o clone 2 ter apresentado atividade de α -amilase mesmo sem ter sido induzido pode estar associado ao mesmo fato descrito no resultado de expressão para a proteína GIB.

Tais clones (clone 2 não induzido e clone 2 induzido) da fração solúvel também apresentaram atividade amilolítica no Zimograma realizado (Figura 21). As bandas com atividade referentes à proteína AMYPb estão de acordo com o tamanho das bandas diferencialmente expressas identificadas nos géis de expressão apresentados na Figura 19B.

Portanto, sugere-se que a proteína responsável pela atividade amilolítica detectada ensaio de atividade enzimática de α -amilase mostrado na Figura 20 é a proteína heteróloga solúvel AMYPb. Esta está de acordo, também, com a banda com atividade amilolítica encontrada no sobrenadante secretado para o meio extracelular no cultivo de *P. barengoltzii* (Ticona, 2019).

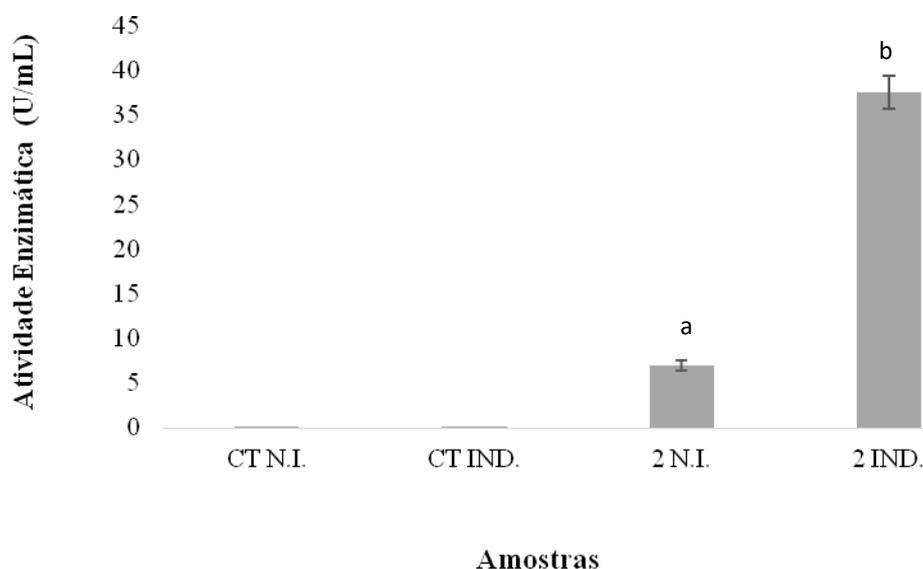


Figura 20. Quantificação da atividade de α -amilase utilizando fração solúvel do lisado do clone 2 induzido e não induzido e clone controle (plasmídeo sem inserto). CT N.I.) clone controle não induzido. CT IND.) clone controle induzido. 2 N.I.) clone 2 não induzido; 2IND.) clone 2 induzido. a-b $p < 0,05$.

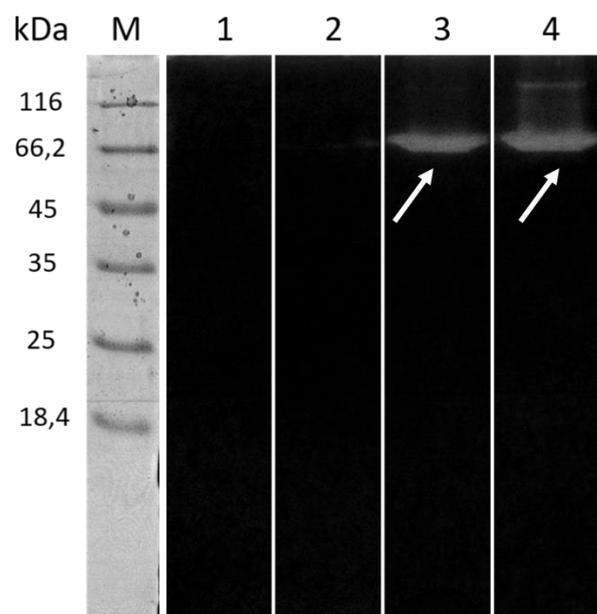


Figura 21. Análise do perfil de expressão e atividade de α -amilase da fração solúvel dos clones 2 e CT (controle negativo contendo plasmídeo sem o inserto) em Zimograma. Presença da proteína AMYPb indicada pelas setas em branco. M: Marcador *Unstained Protein Marker* (ThermoScientific). 1): clone CT não induzido. 2) clone CT induzido. 3) clone 2 não induzido. 4) clone 2 induzido.

AMYPB foi purificada em dois passos cromatográficos, exclusão molecular em coluna SuperDex HiLoad 16/60 200pg (Figura 22), seguida de troca aniônica em coluna QFF HiTrap. (Figura 23).

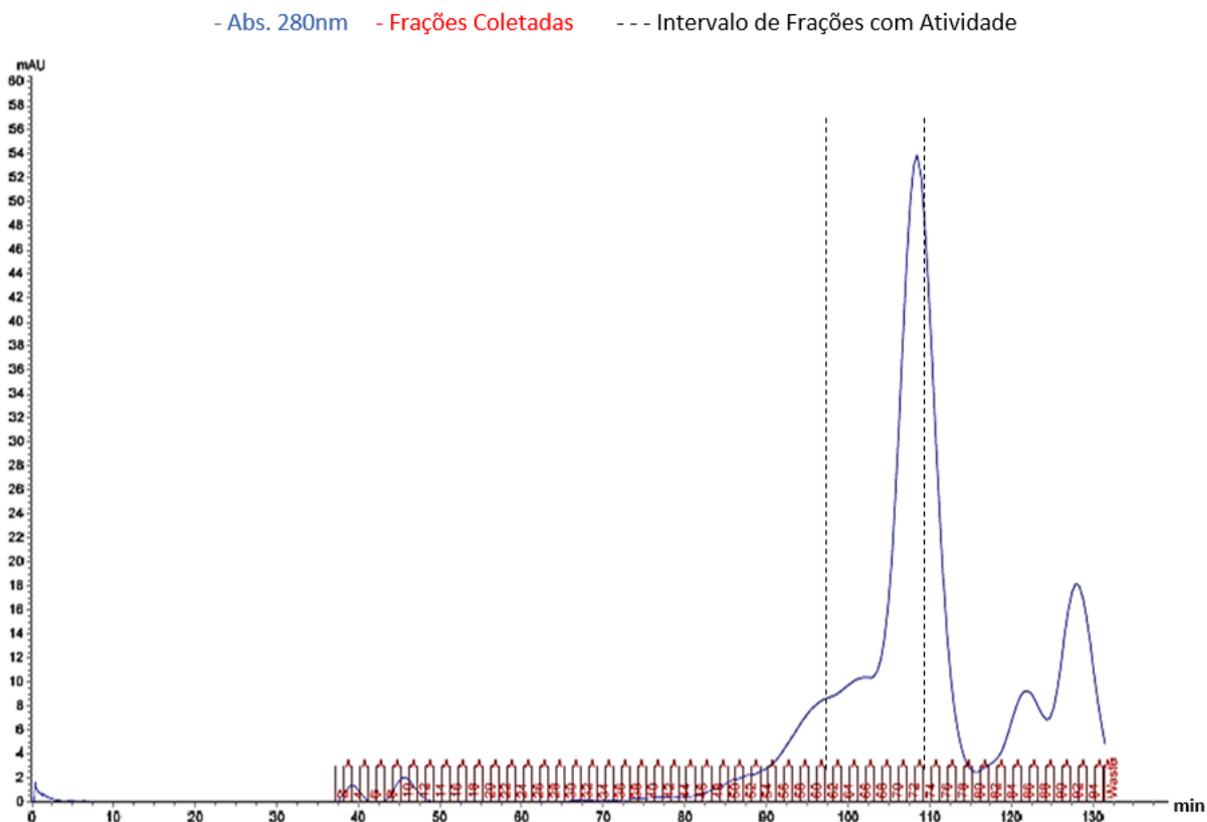


Figura 22. Perfil cromatográfico da Cromatografia de Exclusão Molecular feita para a amostra de Extrato Bruto Solúvel (concentrado 10x) contendo as proteínas heterólogas (AMY Pb). Foi utilizada a coluna Superdex 26/60 200pg no aparelho AKTA Purifier (GE), com fluxo de 1 mL/min e num volume de fase móvel de 500mL.

- Abs. 280nm - Frações Coletadas - Gradiente de NaCl (0-1M) --- Intervalo de Frações com atividade

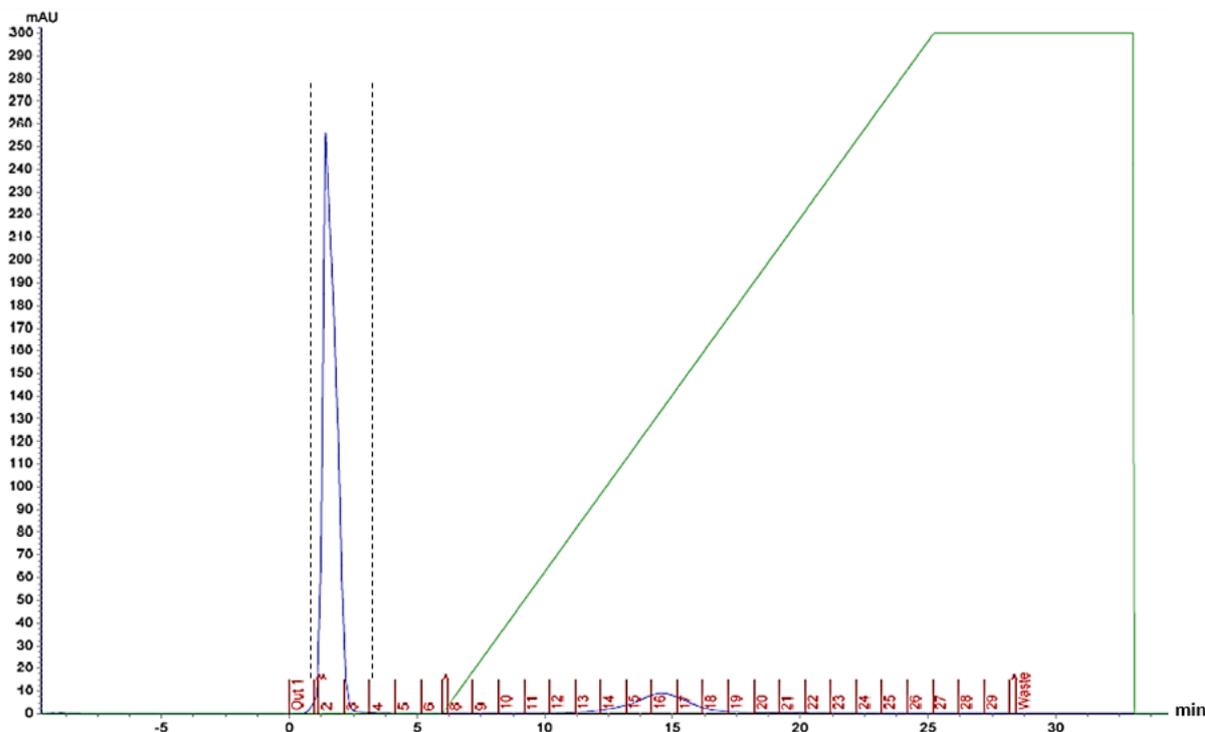


Figura 23. Perfil cromatográfico da Cromatografia de Troca Aniônica feita para as frações escolhidas que passaram na 1ª etapa cromatográfica e que foram misturadas devido ao seu maior grau de pureza. Foi utilizada a coluna QFF Sepharose *Fast Flow* no aparelho *AKTA Purifier* (GE), com fluxo de 1 mL/min e num volume de fase móvel de 1mL, com gradiente de NaCl de 0-1M.

Na Exclusão Molecular, observou-se a presença, na leitura de absorbância a 280nm, de 2 picos principais: um da fração 50 até a 78 e outro da fração 82 até a 94 (Figura 22). A proteína AMYPb foi eluída nas frações 62 a 74, ou seja, em um intervalo correspondente a parte ascendente do primeiro pico de proteínas, sendo que as frações 69 a 74 apresentaram um grau de pureza significativamente maior do que o extrato bruto proteico (Figura 24A).

Na coluna de troca aniônica, observou-se, também, na leitura de absorbância a 280nm, a presença de 2 picos principais: um maior no início da corrida, entre frações 1 e 3, e outro menor entre as frações 14 a 18 (Figura 23). A proteína AMYPb foi eluída e purificada nas frações 2, 3 e 4, ou seja, no pico maior de proteínas (Figura 24B).

AMYPb foi eluída e purificada antes de se iniciar o gradiente salino, e, portanto, conclui-se que ela não chegou a interagir com a matriz carregada positivamente, ao contrário das outras proteínas presentes na amostra. Por estar em solução com pH 7 (valor maior que o de seu ponto isoelétrico), em teoria esperava-se que ela adotasse uma carga predominantemente negativa, e,

assim, se ligasse à matriz. Porém, o fato de tal solução também conter 150mM de NaCl (presente no tampão proveniente da 1ª etapa cromatográfica) provavelmente alterou as cargas da proteína, influenciando na sua interação com a resina e no resultado observado.

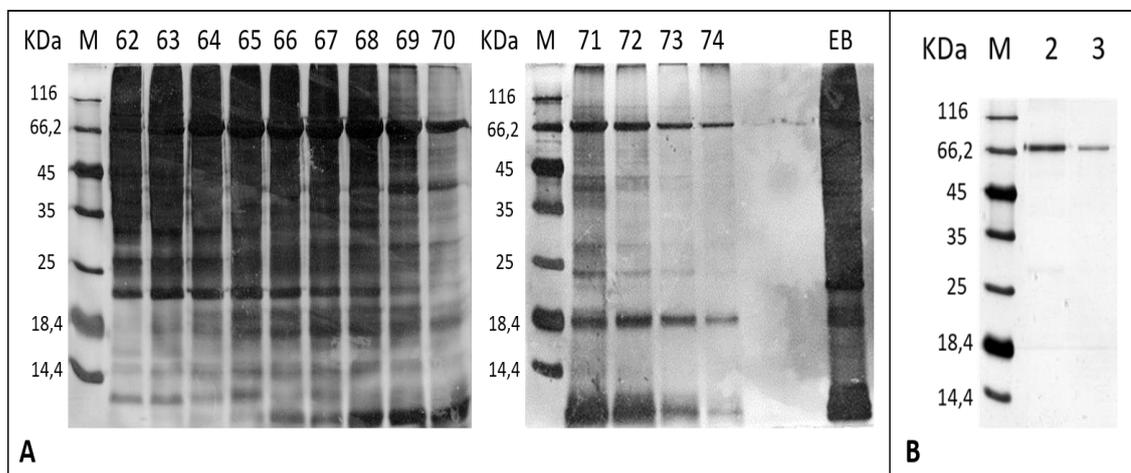


Figura 24. Análise em SDS-PAGE 12% (m/v) das etapas de purificação de AMYPb. (A) Frações cromatográficas com atividade sob amido da etapa de Exclusão Molecular. M: marcador; 62 a 74: frações com atividade; 69 a 74: frações reunidas para serem aplicadas na etapa seguinte; EB: Extrato Bruto; (B) Frações cromatográficas da etapa de Troca Iônica. M: marcador; 2 e 3: AMYPb purificada.

A enzima AMYPb apresentou maiores valores de atividade em temperatura de 50 a 70°C, com maior valor a 60°C (Figura 25A). AMYPb manteve 100% da sua atividade enzimática por 2h a 50°C, decrescendo a partir deste tempo. Apesar de ter apresentado maior valor de atividade a 60°C, perdeu 50% de sua atividade após pré-incubação por 10min nessa temperatura (Figura 25C). A enzima heteróloga não foi avaliada quanto à termoestabilidade em nas temperaturas abaixo de 50°C, para estudar o potencial de aplicação em processos de hidrólise a frio, com fermentação e sacarificação simultâneas, por exemplo.

AMYPb apresentou maiores valores de atividade em pH de 6 a 9, com maior valor a 7 e 8 (Figura 25B). A enzima heteróloga manteve 100% da sua atividade enzimática relativa em pH 8 por pelo menos 2h. Em pH 7 e 9, tal atividade foi reduzida em apenas 20% e, em pH 6, para as condições acima, foi reduzida em 80% (Figura 25D). Os resultados demonstraram que AMYPb tem maior atividade e estabilidade em pHs mais alcalinos.

Os dados apresentados de efeito da temperatura e efeito de pH estão de acordo com a caracterização de α -amilase do sobrenadante secretado no meio extracelular no cultivo de *P.*

barengoltzii, demonstrada na tese de Ticona (2019), com as α -amilases de *Paenibacillus sp.* descrita por Rajesh *et al.* (2013) e de *Bacillus amyloliquefaciens* descrita por Du *et al.* (2018).

AMY Pb apresentou maior valor de atividade em temperatura maior do que as descritas para outras enzimas de *P. barengoltzii*: Liu *et al.* (2016) descreveu uma pululanase que apresentou maior atividade a 50°C, apresentando apenas 20% da atividade enzimática máxima a 60°C; Zhang *et al.* (2017) descreveu uma β -glicanase que apresentou maior atividade a 55°C, apresentando menos de 20% da atividade enzimática máxima a 65°C. AMY Pb também apresentou maior valor de atividade em temperatura maior do que a descrita para a α -amilase de *Paenibacillus sp.* SSG-1 no trabalho de Xu *et al.* (2018), que foi de 40°C.

Dados referentes à termoestabilidade divergem do que foi encontrado para alguns dos estudos mencionados acima. Ticona (2019), por exemplo, demonstrou que o sobrenadante de *P. barengoltzii* manteve 90% de sua atividade enzimática amilolítica relativa a 50°C por 6 horas, e, por 24 horas, tal atividade foi mantida em 40% nessa temperatura e em 83% a 50°C. Du *et al.* (2018) demonstrou que a α -amilase descrita em seu trabalho manteve mais de 80% de atividade relativa a 65°C por 42 horas. Ambas apresentaram, portanto, termoestabilidade maior que AMY Pb. Vale ressaltar que a sua termoestabilidade não foi avaliada em relação ao efeito de íons, e pode ser que a interação com alguns compostos iônicos altere tal propriedade, podendo contribuir para um aumento desse parâmetro estudado.

Já foi descrita na literatura uma forte correlação entre a presença de pontes dissulfeto nas proteínas e a manutenção da estabilidade térmica (Rigoldi *et al.*, 2018). O sistema de expressão adotado (*E. coli* BL-21) é incapaz de formar tais pontes no citoplasma celular (Kaur, Kumar e Kaur, 2017), conseqüentemente, as proteínas intracelulares são sintetizadas sem elas. Além disso, a termoestabilidade foi avaliada na ausência de substrato, e pode ser que a interação entre ele e a enzima tornem complexo enzima-substrato mais estável. Tais fatos podem explicar as características acerca da termoestabilidade de AMY Pb relatadas.

AMY Pb apresentou maiores valores de atividade em pHs mais alcalinos do que os descritos para outras enzimas de *P. barengoltzii*: a pululanase descrita por Liu *et al.* (2016) apresentou maior atividade em pH 5,5 e a β -glicanase descrita por Zhang *et al.* (2017) em pH 6. Também os apresentou em pHs mais alcalinos do que os descritos para as α -amilases do gênero *Bacillus* (que abrange espécies produtoras de enzimas utilizadas em processos industriais consolidados) como a descrita para *Bacillus mojavensis* (Ozdemir *et al.*, 2018) e *Bacillus licheniformis* (Liu *et al.*, 2014).

As α -amilases que possuem diferentes características em relação a temperatura e pH possuem diferentes aplicações (Xian *et al.*, 2015). Por apresentar atividade enzimática e estabilidade em faixas de pHs mais alcalinas, AMYPb cumpre um dos requisitos para a aplicação na indústria de detergentes (Souza, de e Magalhães, 2010).

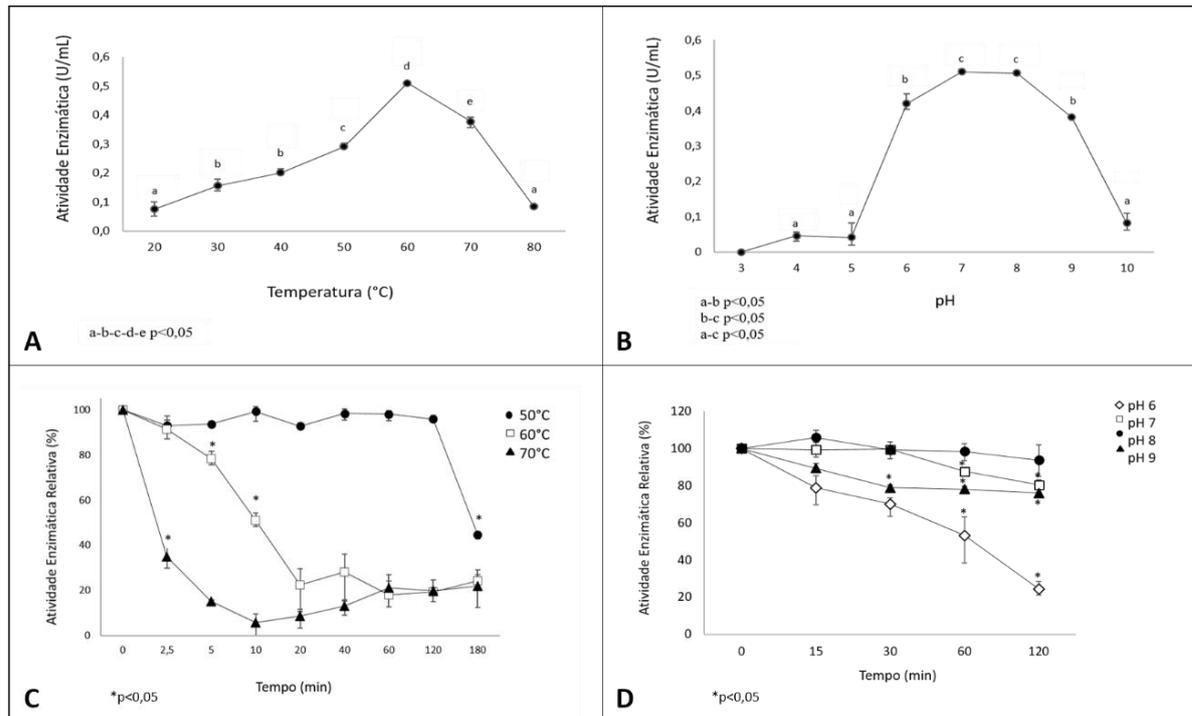


Figura 25. Caracterização bioquímica da proteína AMYPb purificada. (A) Efeito da temperatura na sua atividade enzimática utilizando as temperaturas de 20 a 80°C. (B) Efeito do pH na sua atividade enzimática utilizando pHs de 3 a 10. (C) Ensaio de termoestabilidade, na ausência de substrato, utilizando as temperaturas de 50, 60 e 70°C em intervalos de tempos até 3 horas. (D) Ensaio de estabilidade em pH utilizando pHs de 6 a 9 em intervalos de tempo até 2 horas.

A atividade enzimática de AMYPb não foi alterada na presença dos seguintes íons: CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, NaCl, KCl, tanto na concentração de 1mM como na de 10mM, com exceção dos íons NiCl₂ e CuCl₂, que, na concentração de 10mM, levaram à redução da atividade em 20 pontos percentuais. O composto EDTA também inibiu a atividade relativa da enzima em 20%, em ambas as concentrações. O íon FeCl₃, inibiu 100% da atividade de AMYPb na concentração de 10mM (Figura 26).

Observa-se que, de maneira geral, as α -amilases, em sua maioria, são dependentes do íon Ca^{2+} (Salem *et al.*, 2020). Ao contrário de AMYPb, já foram descritas muitas que têm um aumento significativo na sua atividade enzimática e na termoestabilidade na presença deste íon, como as de *Paenibacillus sp.* SSG-1, *Bacillus mojavensis* SO-10, *Bacillus amyloliquefaciens* Z3, *Anoxybacillus sp.* GSX-BL e *Bacillus stearothermophilus* STB04 (Liao *et al.*, 2019; Ozdemir *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018). Por esse motivo, em determinados processos industriais em que tais enzimas são utilizadas, a adição de cálcio se faz necessária para a maior eficiência na obtenção dos produtos. Tal adição implica em mais etapas no processo e no aumento de custos de produção. Como consequência, há uma crescente procura por α -amilases independentes deste íon (Läuffer, 2017). Exemplos de enzimas que cumpriram tal requisito e estiveram de acordo com os dados encontrados para AMYPb foram as descritas por Salem *et al.* (2020), de *Bacillus subtilis* e por Du *et al.* (2018), de *Bacillus amyloliquefaciens* BH072.

AMYPb, por não apresentar dependência dos íons testados, sofreu uma inibição menor do que 30% na atividade enzimática na presença do composto quelante de metais EDTA, assim como as mencionadas acima (Du *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2020).

Assim como a grande maioria das α -amilases descritas neste tópico por Du *et al.* (2018); Salem *et al.* (2020); Tang *et al.* (2020); Xu *et al.* (2018); Zhou, G. *et al.* (2015), AMYPb teve sua atividade enzimática inibida pelos íons Fe, Cu e Ni. Além disso, a enzima descrita por Pan *et al.* (2019) também sofreu, assim como AMYPb, inibição da atividade enzimática em mais de 90% na presença do íon Fe^{3+} .

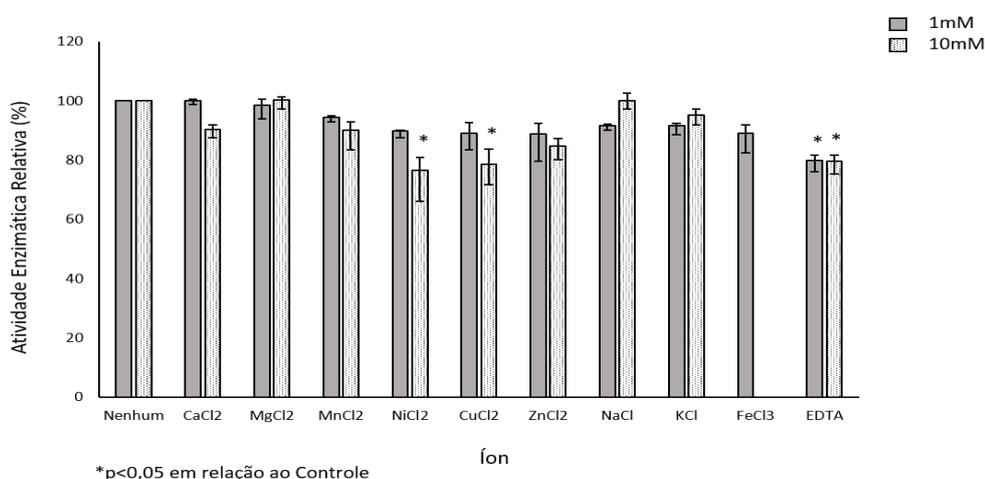


Figura 26. Análise do efeito de íons na atividade enzimática da proteína AMYPb purificada.

6) CONCLUSÕES

- Os genes Amy1 e Cthe_2191 foram expressos com sucesso na bactéria *E. coli* BL-21, gerando enzimas funcionais produzidas intracelularmente. Concluiu-se, dessa forma, que ela se mostrou uma hospedeira viável para a expressão heteróloga de proteínas de bactérias termófilas.
- O gene Cthe_0795 foi expresso em sua forma truncada, não tendo sido validado funcionalmente.
- A “*glycogen branching enzyme*” GIB foi parcialmente purificada em um passo cromatográfico (Cromatografia por Afinidade), apresentando atividade enzimática sob amilose.
- A α -amilase AMYPb foi purificada em dois passos cromatográficos (Exclusão Molecular e Troca Iônica) e caracterizada, apresentando atividade enzimática sob amido.
- AMYPb, por apresentar atividade enzimática entre 50°C e 70°C, pode ser uma potencial ferramenta a ser utilizada em processos industriais realizados sob elevadas temperaturas.
- AMYPb, ao contrário de muitas α -amilases bacterianas descritas na literatura, é mais ativa em pH mais básico, o que pode representar uma possível aplicação em processos que utilizam pHs alcalinos, como a indústria de detergentes.
- AMYPb se mostrou ser uma α -amilase que possui atividade enzimática independente do íon Ca^{2+} , característica considerada positiva do ponto de vista de aplicação industrial, e de outros íons como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , nas condições testadas.

7) PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito de íons na termoestabilidade de AMYPb.
- Realizar a caracterização de AMYPb em relação aos parâmetros cinéticos (K_{cat} , $V_{máx}$ e K_m).
- Comparar as taxas de hidrólise de AMYPb avaliando diferentes substratos amiláceos.
- Testar rendimentos de produção de bioetanol a partir de hidrolisados de AMYPb utilizando leveduras capazes de fermentar pequenos oligossacarídeos.
- Realizar análises estruturais de AMYPb visando associar elementos estruturais às propriedades apresentadas.
- Testar AMYPb em relação a aplicações no ramo da indústria têxtil para processos de desengomagem de fibras.
- Estabelecer novos métodos de obtenção das enzimas visando obter maiores rendimentos no processo.

8) REFERÊNCIAS

AGIRRE, J.; MOROZ, O.; MEIER, S.; BRASK, J.; MUNCH, A.; HOFF, T.; ANDERSEN, C.; WILSON, K. S.; DAVIES, G. J. The structure of the AliC GH13 α -amylase from Alicyclobacillus sp. reveals the accommodation of starch branching points in the α -amylase family. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 75, n. 1, p. 1–7, 2019.

AKINOSHO, H.; YEE, K.; CLOSE, D.; RAGAUSKAS, A. The emergence of Clostridium thermocellum as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. AUG, p. 1–18, 2014.

AKRAM, F.; HAQ, I. UL; IMRAN, W.; MUKHTAR, H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. **Renewable Energy**, v. 122, p. 225–238, 2018.

ARNDT, C.; KORISTKA, S.; FELDMANN, A.; BERGMANN, R.; BACHMANN, M. Coomassie Brilliant Blue Staining of Polyacrylamide Gels. In: **BT - Protein Electrophoresis: Methods and Protocols**. [s.l.: s.n.]. v. 1853p. 27–30.

ATALAH, J.; CÁCERES-MORENO, P.; ESPINA, G.; BLAMEY, J. M. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, v. 280, n. November 2018, p. 478–488, 2019.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BURTON, E. **Proteomic Analysis of Cellulose Metabolism in Clostridium thermocellum**. [s.l.] Concordia University, Montreal, 2010.

CARMONA-CABELLO, M.; GARCÍA, I. L.; SÁEZ-BASTANTE, J.; PINZI, S.; KOUTINAS, A. A.; DORADO, M. P. Food waste from restaurant sector – Characterization for biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122779, 2020.

CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes Database. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. CELIŃSKA, E.; BORKOWSKA, M.; BIAŁAS, W. Evaluation of a recombinant insect-derived amylase performance in simultaneous saccharification and fermentation process with industrial yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2693–2707, 2016.

DU, R.; SONG, Q.; ZHANG, Q.; ZHAO, F.; KIM, R. C.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α -amylase produced by Bacillus amyloliquefaciens BH072. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, n. 2017, p. 1151–1156, 2018.

FERGUS G. PRIEST, M. D. C. C. A.; ASH C., PRIEST FG., C. M. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 64, p. 253–260, 1993.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954.

GADHAVE, R. V.; MAHANWAR, P. A.; GADEKAR, P. T. Starch-Based Adhesives for Wood/Wood Composite Bonding: Review. **Open Journal of Polymer Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 19–32, 2017.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli. **Protein Journal**, v. 32, n. 6, p. 419–425, 2013.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; ARSHAD, M. K.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASHIM, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. v. 2017, 2017.

GRADY, E. N.; MACDONALD, J.; LIU, L.; RICHMAN, A.; YUAN, Z. C. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.

GREEN, R.; ROGERS, E. J. **Transformation of chemically competent E. coli**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 529

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, 2003.

HAMANN, P. R. V.; SERPA, D. L.; SOUZA, A.; CAMARGO, B. R. DE; OFUJI, K.; VALLE, M.; SOUSA, D.; FELIX, C. R.; MILLER, R. N. G.; NORONHA, E. F. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by Clostridium thermocellum B8 in the presence of raw agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 97–105, 2015.

HAN, H.; LING, Z.; KHAN, A.; VIRK, A. K.; KULSHRESTHA, S.; LI, X. Improvements of thermophilic enzymes: From genetic modifications to applications. **Bioresource Technology**, v. 279, n. November 2018, p. 350–361, 2019.

HASHIM, S. O. Starch-Modifying Enzymes. *In: Advances in biochemical engineering/biotechnology*. [s.l: s.n.]. v. 123p. 127–141.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, n. 2, p. 309–316, 1991.

HOON, S.; YERIM, P.; JUNGWOO, N.; SHIN, K.; KANG, D. Properties and applications of starch modifying enzymes for use in the baking industry. **Food Science and Biotechnology**, 2017.

JANEČEK, Š.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A. α -Amylase: An enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1149–1170, 2014.

KAMITORI, S.; KONDO, S.; OKUYAMA, K.; YOKOTA, T.; SHIMURA, Y.; TONOZUKA, T.; SAKANO, Y. Crystal structure of thermoactinomyces vulgaris R-47 α -Amylase II (TVaII) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 287, n. 5, p. 907–921, 1999.

KARAKI, N.; ALJAWISH, A.; HUMEAU, C.; MUNIGLIA, L.; JASNIEWSKI, J. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, Properties, And potential applications: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 1–18, 2016.

KATO, S.; HARUTA, S.; CUI, Z. J.; ISHII, M.; YOKOTA, A.; IGARASHI, Y. Clostridium straminisolvens sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2043–2047, 2004.

KAULPIBOON, J.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; PONGSAWASDI, P. Identification of an alkaline-tolerant cyclodextrin-metabolizing bacterium and characterization of its cyclodextrinase gene. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 374–382, 2004.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2017.

LAEMMLI. Laemmli Buffer. **Nature**, p. 5–6, 1970.

LÄUFER, A. Starch Biorefinery Enzymes. *In: Advances in biochemical engineering/biotechnology*. [s.l: s.n.]. v. 123p. 137–152.

LESSARD, J. C. **Transformation of E. coli via electroporation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 529

LIAO, S.-M.; LIANG, G.; ZHU, J.; LU, B.; PENG, L.-X.; WANG, Q.-Y.; WEI, Y.-T.; ZHOU, G.-P.; HUANG, R.-B. Influence of Calcium Ions on the Thermal Characteristics of α -amylase from Thermophilic Anoxybacillus sp. GXs-BL. **Protein & Peptide Letters**, v. 26, n. 2, p. 148–157, 2019.

LIU, J.; LIU, Y.; YAN, F.; JIANG, Z.; YANG, S.; YAN, Q. Gene cloning , functional expression and characterisation of a novel type I pullulanase from Paenibacillus barengoltzii and its application in resistant starch production. **Protein Expression and Purification**, v. 121, p. 22–30, 2016.

LIU, Y.; CHEN, Z.; JIANG, Z.; YAN, Q.; YANG, S. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1055–1063, 2017.

LIU, Y.; FAN, S.; LIU, X.; ZHANG, Z.; WANG, J.; WANG, Z.; LU, F. A highly active alpha amylase from *Bacillus licheniformis*: Directed evolution, enzyme characterization and structural analysis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 898–904, 2014.

MAAREL, M. J. E. C. VAN DER; VEEN, B. VAN DER; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137–155, 2002.

MARKET RESEARCH REPORT. **Industrial Starch Market by Type (Native, Starch Derivatives & Sweeteners), Source (Corn, Wheat, Cassava, Potato), Application (Food, Feed, Paper Making & Corrugation, Pharmaceutical), Form (Dry, Liquid), and Region - Global Forecast to 2022.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-starch-market-104251261.html>>.

MATSUURA, Y.; KUSUNOKI, M.; HARADA, W.; KAKUDO, M. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. **Journal of Biochemistry**, v. 95, n. 3, p. 697–702, 1984.

MOHTAR, N. S.; BASYARUDDIN, M.; RAHMAN, A. Expression and characterization of thermostable glycogen branching enzyme from *Geobacillus mahadia* Geo-05. p. 1–12, 2016.

MUKHERJEE, A. K.; BORAH, M.; RAI, S. K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 149–156, 2009.

MYERS, A. M.; MORELL, M. K.; JAMES, M. G.; BALL, S. G. **Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal** *Plant Physiology*, 2000.

NISHA, M.; SATYANARAYANA, T. Characteristics, protein engineering and applications of microbial thermostable pullulanases and pullulan hydrolases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5661–5679, 2016.

OTANI, M.; HAMADA, T.; KATAYAMA, K.; KITAHARA, K.; KIM, S. H.; TAKAHATA, Y.; SUGANUMA, T.; SHIMADA, T. Inhibition of the gene expression for granule-bound starch synthase I by RNA interference in sweet potato plants. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 10, p. 1801–1807, 2007.

OZDEMIR, S.; FINCAN, S. A.; KARAKAYA, A.; ENEZ, B. A novel raw starch hydrolyzing thermostable α -amylase produced by newly isolated *Bacillus mojavensis* SO-10: Purification, characterization and usage in starch industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1–16, 2018.

PAN, S.; GU, Z.; DING, N.; ZHANG, Z.; CHEN, D.; LI, C.; HONG, Y.; CHENG, L.; LI, Z. Calcium and sodium ions synergistically enhance the thermostability of a maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus stearothermophilus* STB04. **Food Chemistry**, v. 283, n. November 2018, p. 170–176, 2019.

PINTO, É. S. M.; DORN, M.; FELTES, B. C. The tale of a versatile enzyme: Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. **Chemosphere**, v. 250, p. 126202, 2020.

PISCITELLI, A.; PEZZELLA, C.; GIARDINA, P.; FARACO, V.; SANNIA, G. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 4, p. 252–262, 2010.

RAJESH, T. *et al.* Identification and functional characterization of an α -amylase with broad temperature and pH stability from *paenibacillus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 2, p. 359–369, 2013.

RETTENMAIER, R.; GERBAULET, M.; LIEBL, W.; ZVERLOV, V. V. *Hungateiclostridium mesophilum* sp. Nov., a mesophilic, cellulolytic and spore-forming bacterium isolated from a biogas fermenter fed with maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 3567–3573, 2019.

RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 11501, 2018.

ROBIN, J. ET AL. Lint-nerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chem.**, v. 51, p. 389–406, 1974.

SALEM, K.; ELGHARBI, F.; HLIMA, H. BEN; PERDUCA, M.; SAYARI, A.; HMIDA-SAYARI, A. Biochemical characterization and structural insights into the high substrate affinity of a dimeric and Ca²⁺ independent *Bacillus subtilis* α -amylase. **Biotechnology Progress**, 2020.

SHIRATORI, H.; SASAYA, K.; OHIWA, H.; IKENO, H.; AYAME, S.; KATAOKA, N.; MIYA, A.; BEPPU, T.; UEDA, K. *Clostridium clariflavum* sp. nov. and *Clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 1764–1770, 2009.

SIMAIR, A. A.; QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; ALI, C. H.; LASHARI, S.; BHUTTO, M. A.; MANGRIO, G. S.; LU, C. Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

SONG, B.; YUE, Y.; XIE, T.; QIAN, S.; CHAO, Y. Mutation of tyrosine167histidine at remote substrate binding subsite -6 in α -cyclodextrin glycosyltransferase enhancing α -cyclodextrin specificity by directed evolution. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 232–239, 2014.

SOUZA, P. M. DE; E MAGALHÃES, P. DE O. Application of microbial α -amylase in industry - a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850–861, 2010.

SUZUKI, E.; SUZUKI, R. Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2016.

TANG, S.; XU, T.; PENG, J.; ZHOU, K.; ZHU, Y.; ZHOU, W.; CHENG, H.; ZHOU, H. Overexpression of an endogenous raw starch digesting mesophilic α -amylase gene in *Bacillus amyloliquefaciens* Z3 by in vitro methylation protocol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 932, p. jsfa.10332, 13 fev. 2020.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.

TICONA, A. R. P. Bioprospecção e caracterização de bactérias anaeróbicas como fonte de enzimas industriais Bioprospecção e caracterização de bactérias anaeróbicas como fonte de enzimas industriais. 2019.

TOMASIK, P.; HORTON, D. **Enzymatic conversions of starch**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 68

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 1–23, 2007a.

_____. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. v. 23, p. 1–23, 2007b.

WANG, S.; COPELAND, L. Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 1081–1097, 2015.

XIAN, L.; WANG, F.; LUO, X.; FENG, Y. L.; FENG, J. X. Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent α -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2015.

XU, Q.; CAO, Y.; LI, X.; LIU, L.; QIN, S.; WANG, Y.; CAO, Y.; XU, H.; QIAO, D. Purification and characterization of a novel intracellular α -amylase with a wide variety of substrates hydrolysis and transglycosylation activity from *Paenibacillus* sp. SSG-1. **Protein Expression and Purification**, v. 144, p. 62–70, 2018.

YANG, H.; LIU, L.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline α -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. **Microbial cell factories**, v. 10, p. 77, 2011.

YEBRA, M. J.; BLASCO, A.; SANZ, P. Expression and secretion of *Bacillus polymyxa* neopullulanase in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 41–

49, 1999.

ZHANG, B.; LIU, Y.; YANG, H.; YAN, Q.; YANG, S.; JIANG, Z.; LI, S. Biochemical properties and application of a novel β -1, 3-1, 4-glucanase from *Paenibacillus barengoltzii*. **Food Chemistry**, v. 234, p. 68–75, 2017.

ZHOU, G.; JIN, M.; CAI, Y.; ZENG, R. Characterization of a thermostable and alkali-stable alpha-amylase from deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 676–682, 2015.

ZHOU, W.; YANG, J.; HONG, Y.; LIU, G.; ZHENG, J.; GU, Z.; ZHANG, P. Impact of amylose content on starch physicochemical properties in transgenic sweet potato. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 417–427, 2015.

ZVERLOV, V. V.; SCHANTZ, N.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; SCHWARZ, W. H. Two new major subunits in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: Xyloglucanase Xgh74A and endoxylanase Xyn10D. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3395–3401, 2005.

9) MATERIAL SUPLEMENTAR

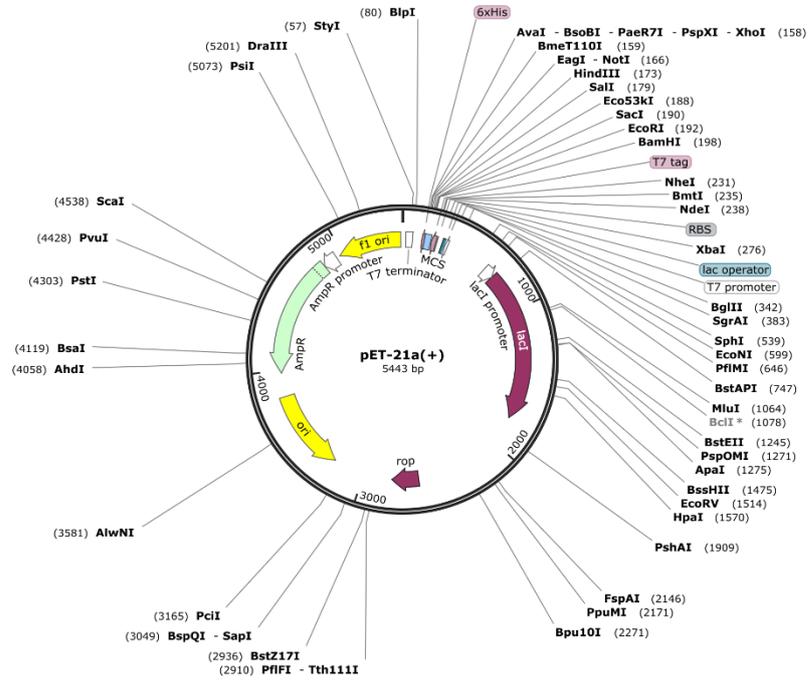


Figura 27. Mapa do vetor pET21a utilizado.

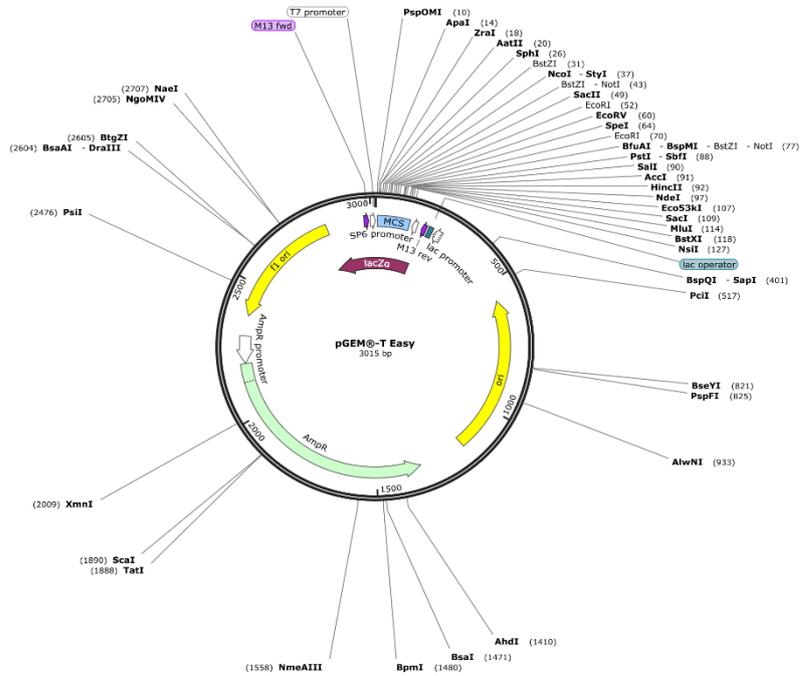


Figura 28. Mapa do vetor pGEM-T Easy utilizado.