

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

JULIANA MOÇO CORRÊA

**BETA-XILOSIDASES INDUZIDAS POR RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: ANÁLISE  
DA REGULAÇÃO GÊNICA EM *Caulobacter crescentus* E PRODUÇÃO  
ENZIMÁTICA POR *Thermomyces lanuginosus***

CASCAVEL – PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO 2014

**JULIANA MOÇO CORRÊA**

**BETA-XILOSIDASES INDUZIDAS POR RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: ANÁLISE  
DA REGULAÇÃO GÊNICA EM *Caulobacter crescentus* E PRODUÇÃO  
ENZIMÁTICA POR *Thermomyces lanuginosus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em  
cumprimento parcial aos requisitos para obtenção  
do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de  
concentração em Recursos Hídricos e Saneamento  
Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia G. Simão

Co-orientador: Prof. Dr. Divair Christ

**CASCADEL – PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO 2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C824b

Corrêa, Juliana Moço

Beta-xilosidases a partir de resíduos agroindustriais : análise da regulação gênica em *Caulobacter crescentus* e produção enzimática em *Thermomyces lanuginosus*./Juliana Moço Corrêa. Cascavel, 2014.

58p.

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cássia G. Simão

Co-orientador: Prof. Dr. Divair Christ

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola

1. Resíduos agroindustriais. 2. Planejamento experimental. 3. Sacarificação. 4.  $\beta$ -xilosidase. 5. *Thermomyces lanuginosus*. 6. Mata Atlântica. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

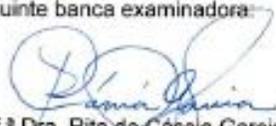
CDD 21.ed. 631

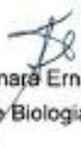
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9<sup>a</sup>/965

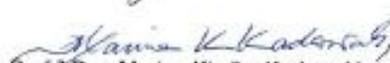
**JULIANA MOÇO CORRÉA**

"Beta-Xilosidases induzidas por resíduos agroindustriais: Análise da regulação gênica em *Caulobacter crescentus* e produção enzimática por *Thermomyces lanuginosus*"

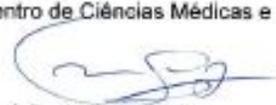
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, aprovada pela seguinte banca examinadora:

  
Orientadora: Prof.ª Dra. Rita de Cassia Garcia Simão  
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste

  
Prof.ª Dra. Samara Ernandes  
Coordenação de Biologia, UTFPR

  
Prof.ª Dra. Marina Kimiko Kadowaki  
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste

  
Prof.ª Dra. Luciane Sene  
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste

  
Prof. Dr. Ivan Schuster  
Setor de Biotecnologia, Coodetec

Cascavel, 27 de novembro 2014.

## BIOGRAFIA RESUMIDA

Juliana Moço Corrêa, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida no dia 30 de junho de 1984, formou-se com grau de licenciatura e bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Paranaense (UNIPAR) em 2007. Tornou-se especialista em Controle de Qualidade de Água e Alimentos em 2009 pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE (*Campus Cascavel/PR*). Obteve o grau de mestre em Engenharia Agrícola pelo programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola na UNIOESTE (*campus* de Cascavel, PR) em 2011 pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, na área de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental com pesquisa desenvolvida nas áreas de Bioquímica, Biotecnologia e Genética de microrganismos sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Rita C. G. Simão.

*A DEUS*

*“Tu te fizeste presente em todos os momentos firmes e trêmulos. E, passo a passo, pude sentir tua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir...*

*A tua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que, em meu gesto, existe o teu gesto e em minha voz a tua voz”*

*(Vinícius de Moraes)*

Dedico esta tese com todo meu amor e carinho para meu esposo Marcos e minha filha Maria Vitória, pelos momentos de ausência. Também aos meus pais, João e Maria, e sogros, José e Dirce, por todo o apoio e a compreensão dedicados.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por suas infinitas misericórdias e graças em minha vida, e por permitirem a conclusão de mais esta etapa tão importante da minha formação;

À Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão, pela orientação, o apoio e a confiança depositada;

Ao Prof. Dr. Divair Christ, pelos valiosos conhecimentos transmitidos acerca da área de estatística experimental;

À UNIOESTE, à CAPES, à Fundação Araucária e ao CNPq pelos recursos financeiros que permitiram a execução deste trabalho;

Ao corpo docente e servidores do PGEAGRI, pelo suporte teórico, técnico e administrativo que permitiram a conclusão deste trabalho;

Aos Professores do Laboratório de Bioquímica do *Campus* de Cascavel: Dra. Marina Kimiko Kadowaki e Dr. José Luis da Conceição e Silva, pelos ensinamentos, empréstimo de materiais e equipamentos, ao apoio durante a execução deste e sobretudo pela oportunidade de participação no Projeto Sis-Biota.

Aos docentes Dra. Sandra L. Balbo, Dra. Maria Lúcia Bonfleur e Dr. Rinaldo Ferreira Gandra, pelo compartilhamento de equipamentos de seus respectivos laboratórios.

Ao Dr. Eduardo Alexandre Loth, pela valiosa colaboração na produção do anti-soro policlonal anti- $\beta$ -Xilosidase II, e ao Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas (UEM), pelas análises computacionais do gene *xynB2* e estrutura protéica predita.

Ao Dr. Silvio C. Sampaio, pela contribuição no início do doutorado, durante o afastamento da Profa. Rita para pós-doutorado.

Aos que comigo compartilharam os momentos de bancada: Priscila, Adilson, Alessandra, Vanessa, Diandra, Sandra, Ariane, Moara e especialmente a Luciana, Elaine, Fabíola e Carla, pela amizade;

A todas as pessoas, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho de tese.

**BETA-XILOSIDASES INDUZIDAS POR RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: ANÁLISE DA REGULAÇÃO GÊNICA EM *Caulobacter crescentus* E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR *Thermomyces lanuginosus***

**RESUMO GERAL**

As *Beta-D-Xilosidases* (*1,4-β-D-xilano xilohidrolase*; EC 3.2.1.37) são glicosídeo hidrolases que tem papel crucial em catalizar a liberação de unidades de xilose a partir de xilo-oligossacarídeos derivados da degradação do xilano. A completa degradação do xilano é um passo chave do ciclo do carbono na natureza e é um processo também realizado por microrganismos. A bioconversão de materiais lignocelulósicos é vantajosa não somente do ponto de vista ambiental mais também econômico o que é recebido nos setores produtivos com um considerável interesse, pois esses materiais representam vasta fonte de carbono, que podem ser empregados no desenvolvimento de bioprocessos que resultam em produtos de alto valor agregado; entre os quais estão os açúcares fermentáveis, combustíveis, fármacos, enzimas e substâncias de interesse industrial, além de fazer uma gestão integrada do efluente que por não haver um desenvolvimento biotecnológico adequado é descartado e acumulado na natureza. Em face disso, o presente trabalho teve por objetivos estudar a regulação gênica do gene *xynB2* da bactéria *Caulobacter crescentus* que codifica para a Beta-xilosidase II através de abordagens moleculares e otimizar a produção enzimática de Beta-xilosidases de *Thermomyces lanuginosus* na presença de diferentes resíduos de biomassa vegetal por delineamento experimental. No primeiro artigo exploramos a bactéria aquática *Caulobacter crescentus* por possuir várias enzimas envolvidas na utilização de biomassas lignocelulósicas; contendo em seu genoma cinco genes que codificam *β-xilosidases*. A partir do gene *xynB2*, que codifica para enzima *β-xylosidase* II (CCNA\_02442), desenvolvemos duas linhagens mutantes denominadas O-*xynB2*, que super-expressa a enzima na presença de xilose e  $\Delta$ -*xynB2* que tem o gene *xynB2* interrompido, o que possibilitou avaliar que a ausência da enzima *β-xylosidase* II em células de *C. crescentus* regula positivamente os genes *xynB*, induzindo a atividade global de *β-xilosidases*, revelando um papel regulatório para a mesma. No segundo trabalho um fungo da linhagem *Thermomyces lanuginosus* isolado de bioma de Mata Atlântica foi identificado e analisado quanto à capacidade de produzir Beta-xilosidases na presença de diferentes resíduos vegetais; em decorrência disso foi otimizado a produção enzimática com delineamento experimental DCCR, o que permitiu alcançar altos níveis de atividade enzimática beta-xilosidásica na presença de palha de milho.

**Palavras-chaves:** regulação gênica, biomassa vegetal, otimização enzimática.

## RESUMOS DOS ARTIGOS

### **ARTIGO 1- A INTERRUPÇÃO DO GENE *xynB2* REGULA POSITIVAMENTE A EXPRESSÃO DE $\beta$ -XYLOSIDASES EM *C. crescentus*.**

---

*Caulobacter crescentus* é capaz de expressar várias enzimas envolvidas na utilização de biomassas lignocelulósicas. Cinco genes, *xynB1-5*, que codificam  $\beta$ -xilosidases estão presentes no genoma da bactéria. Neste estudo, o gene *xynB2*, que codifica para enzima  $\beta$ -xylosidase II (CCNA\_02442), foi clonado sob o controle do promotor PxyIX para gerar a linhagem O-*xynB2*, que super-expressa a enzima na presença de xilose. Em adição, um mutante nulo,  $\Delta$ -*xynB2*, foi criado por dois eventos de recombinação homóloga em que o gene cromossomal *xynB2* foi substituído por uma cópia interrompida por um cassete gênico de resistência à espectinomicina. Foi demonstrado que a ausência da enzima  $\beta$ -xylosidase II em células de *C. crescentus* regula positivamente os genes *xynB*, induzindo a atividade global de  $\beta$ -xilosidases. A análise transcricional do gene *xynB1* (análise por RT-PCR) e do gene *xynB2* (fusão de transcrição com *lacZ*) revelou indução da expressão deste no mutante  $\Delta$ -*xynB2* quando crescido na presença de diferentes resíduos agroindustriais e uma elevada atividade de  $\beta$ -xilosidase foi observada na cepa mutante nulo, uma propriedade que pode ser explorada e aplicada em processos biotecnológicos. Em contraste, a super-expressão do gene *xynB2* causou a regulação negativa da expressão e atividade de  $\beta$ -xilosidase. Por exemplo, a atividade de  $\beta$ -xilosidase que foi obtida na presença de bagaço de cana-de-açúcar foi de 7 vezes e 16 vezes mais elevada do que a atividade medida no *C. crescentus* parental e O-*xynB2*, respectivamente. Os resultados sugerem que  $\beta$ -xilosidase II pode ter um papel no controle da expressão dos genes *xynB1* e *xynB2* em *C. crescentus*.

**Palavras-chave:** *Caulobacter crescentus*,  $\beta$ -xilosidase, expressão gênica, xilose, células mutantes, agroindustrial de resíduos.

## ARTIGO 2- OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\beta$ -XILOSIDASE DE UMA NOVA CEPA DE *Thermomyces lanuginosus* ISOLADA DE BIOMA DE MATA ATLÂNTICA.

---

O sucesso na produção de enzimas para a desconstrução da biomassa vegetal depende não somente do isolamento e da identificação de novos microrganismos bons produtores de hemicelulases, mas também de implementar e melhorar estratégias experimentais que levem à máxima indução na produção de enzimas. Neste trabalho, uma nova cepa de *Thermomyces lanuginosus* (*T. lanuginosus*) foi isolada de Bioma da Mata Atlântica no Brasil e explorada quanto à atividade de  $\beta$ -Xilosidase a partir de resíduos agroindustriais. A indução da produção de  $\beta$ -Xilosidase foi avaliada e melhorada com resíduo de palha de milho como fonte de carbono utilizando ferramenta estatística como estratégia para otimização (DCCR), de modo que a condição otimizada no planejamento experimental permitiu alcançar uma alta atividade de  $\beta$ -Xilosidase de  $1003 \text{ U mL}^{-1}$  e atividade específica =  $1683 \text{ mg mL}^{-1}$  em face dos  $214 \text{ U mL}^{-1}$  obtidos antes da otimização. As condições ótimas de afinidade da enzima em extrato bruto foram pH 5,5 e temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , exibindo melhor termoestabilidade a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . A capacidade de sacarificação de  $\beta$ -Xilosidase na presença dos substratos hemicelulose de palha de milho e xilano de beechwood demonstrou uma conversão de xilo-oligossacarídeos a xilose de 80 e 50%, respectivamente, a  $50^\circ\text{C}$ . Estes dados sugerem que a  $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus* isolado da Mata Atlântica pode ser empregado na sacarificação da hemicelulos e derivada da palha de milho, um resíduo amplamente acumulado nos continentes Americanos, fornecendo assim uma alternativa interessante para produção de energia a partir da conversão da biomassa vegetal.

**Palavras-chave:** planejamento experimental, sacarificação,  $\beta$ -Xilosidase, *Thermomyces lanuginosus*, Mata Atlântica.

## ABSTRACT

### **PAPER 1– Depletion of the *xynB2* gene upregulates $\beta$ -Xylosidase expression in *C. crescentus*.**

---

*Caulobacter crescentus* is able to express several enzymes involved in the utilization of lignocellulosic biomasses. Five genes, *xynB1-5*, that encode  $\beta$ -xylosidases are present in the genome of this bacterium. In this study, the *xynB2* gene, which encodes  $\beta$ -xylosidase II (CCNA\_02442), was cloned under the control of the *PxyIX* promoter to generate the *O-xynB2* strain, which overexpresses the enzyme in the presence of xylose. In addition, a null mutant strain,  $\Delta$ -*xynB2*, was created by two homologous recombination events where the chromosomal *xynB2* gene was replaced by a copy that was disrupted by the spectinomycin-resistant cassette. It was demonstrated that *C. crescentus* cells lacking  $\beta$ -xylosidase II up-regulates the *xynB* genes inducing  $\beta$ -xylosidase activity. Transcriptional analysis revealed that *xynB1* (RT-PCR analysis) and *xynB2* (*lacZ* transcription fusion) gene expression was induced in the  $\Delta$ -*xynB2* cells, and high  $\beta$ -xylosidase activity was observed in the presence of different agro-industrial residues in the null mutant strain, a characteristic that can be explored and applied in biotechnological processes. In contrast, overexpression of the *xynB2* gene caused down-regulation of the expression and activity of the  $\beta$ -xylosidase. For example, the  $\beta$ -xylosidase activity that was obtained in the presence of sugar cane bagasse was 7-fold and 16-fold higher than the activity measured in the *C. crescentus* parental and *O-xynB2* cells, respectively. Our results suggest that  $\beta$ -xylosidase II may have a role in controlling the expression of the *xynB1* and *xynB2* genes in *C. crescentus*.

**Keywords:** *Caulobacter crescentus*,  $\beta$ -xylosidase, gene expression, xylose, mutant cells, agro-industrial residue

**PAPER 2 - OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION  $\beta$ -XYLOSIDASE: A NEW *Thermomyces lanuginosus* ISOLATED FROM ATLANTIC FOREST BIOME.**

---

The successful production of enzymes for the deconstruction of plant biomass depends not only on the isolation and identification of new microorganism producers of hemicellulases, but also on the implementation and improvement of experimental strategies that lead to maximal induction of enzymatic activities. In this work, a new strain of *Thermomyces lanuginosus* (*T. lanuginosus*) was isolated from the Atlantic Forest biome in Brazil, and its  $\beta$ -xylosidase activity in response to agro-industrial residues was tested. Using the (CCRD) statistical approach as a strategy for optimization, the induction of  $\beta$ -xylosidase activity was evaluated in residual corn straw, which was used as a carbon source, and improved so that the optimum condition achieved high  $\beta$ -xylosidase activity ( $1,003 \text{ U ml}^{-1}$ ; specific activity =  $1.683 \text{ U mg}^{-1}$ ) with  $214 \text{ U ml}^{-1}$ . The optimal conditions for the crude enzyme extract were pH 5.5 and  $60^\circ \text{ C}$  showing better thermostability at  $55^\circ \text{ C}$ . The saccharification ability of  $\beta$ -xylosidase in the presence of hemicellulose obtained from corn straw and xylan from beechwood substrates showed a xylo-oligosaccharide to xylose conversion yield of 80 and 50%, respectively, at  $50^\circ \text{ C}$ . These data suggest that  $\beta$ -xylosidase from *T. lanuginosus* isolated from the Atlantic Forest can be used for the saccharification of hemicellulose derived from corn straw, an abundant residue in the American continents, thus providing an interesting alternative for future tests for energy production that relies on the conversion of plant biomass.

**Keywords:** experimental design, saccharification,  $\beta$ -xylosidase, *Thermomyces lanuginosus*, Atlantic Forest.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	<b>XIII</b>

<b>ARTIGO 1</b>	<b>1</b>
-----------------	----------

A INTERRUPTÃO DO GENE *XYNB2* REGULA POSITIVAMENTE A EXPRESSÃO DE *B*-XYLOSIDASE EM *C. crescentus*

<b>ARTIGO 2</b>	<b>20</b>
-----------------	-----------

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -XYLOSIDASE DE UMA NOVA CEPA DE *Thermomyces lanuginosus* ISOLADA DE BIOMA DE MATA ATLÂNTICA

## LISTA DE FIGURAS

### FIGURAS DO ARTIGO 1

---

<b>FIGURA 1</b> Superexpressão do gene <i>xynB2</i> de <i>C. crescentus</i>	8
<b>FIGURA 2</b> Níveis de transcrição dos genes <i>xynB1</i> e <i>xynB2</i> de <i>C. Crescentus</i> em diferentes condições de cultivo	9
<b>FIGURA 3</b> Depleção do gene <i>xynB2</i> aumenta os níveis de atividade de $\beta$ -xilosidase em <i>C. crescentus</i>	10
<b>FIGURA 4</b> A transcrição dirigida pelo promotor do gene <i>xynB2</i> é induzida no mutante nulo $\Delta$ - <i>xynB2</i> e reprimida no mutante que superexpressa $\beta$ -xylosidase II	12
<b>FIGURA 5</b> O fenótipo do mutante nulo é revertido por complementação com a cópia intacta do gene <i>xynB2</i>	13
<b>FIGURA S1.</b> Modelos estruturais dos resíduos 19 a 134 da $\beta$ -xylosidase II de <i>C. crescentus</i>	16

### FIGURAS DO ARTIGO 2

---

<b>FIGURA 1</b> Produção enzimática de $\beta$ -xilosidase intracelular de <i>T. lanuginosus</i>	26
<b>FIGURA 2</b> Superfícies de resposta geradas pela análise de variância para a produção de $\beta$ -xilosidase	30
<b>FIGURA 3</b> Condições ótimas e desejáveis para a produção de $\beta$ -xilosidase	31
<b>FIGURA 4</b> Efeito do pH sobre a atividade $\beta$ -xilosidase intracelular de <i>T. lanuginosus</i>	33
<b>FIGURA 5</b> Perfil de estabilidade da atividade da $\beta$ -xilosidase intracelular de <i>T. lanuginosus</i>	34
<b>FIGURA 6</b> Comportamento da atividade de $\beta$ -xilosidase durante a sacarificação	37
<b>FIGURA 7</b> Análise da cromatografia de camada fina	38

## LISTA DE TABELAS

### TABELAS DO ARTIGO 1

---

<b>TABELA 1</b> Linhagens bacterianas e plasmídeos	3
<b>TABELA 2</b> Composição dos resíduos agroindustriais utilizados	4
<b>TABELA 3</b> Sequência de nucleotídeos usados nos oligonucleotídeos	6

### TABELAS DO ARTIGO 2

---

<b>TABELA 1</b> Níveis utilizados dos fatores aplicados no DCCR	23
<b>TABELA 2</b> Matriz do delineamento (DCCR)	28
<b>TABELA 3</b> Resumo da ANOVA	29
<b>TABELA 4</b> Produção de açúcares redutores na hidrólise enzimática	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Amp<sup>R</sup> - Resistente a ampicilina  
CB15 – Cepa de *Caulobacter crescentus*  
CCNA\_02442 – Número de acesso do gene *xynB2* na página do NCBI  
DH5 $\alpha$  - Cepa não patogênica de *Escherichia coli* usada para clonagem em laboratório  
DNA - Ácido desoxiribonucleico  
dNTPs - Desoxiribonucleotídeos  
D.O. - Densidade óptica  
EDTA - Ácido etilendiaminotetracético  
EtBr – Brometo de etídeo  
IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-Galactopiranosídeo  
kb – kilobase  
kDa - kiloDaltons  
LB- Meio de cultura Luria – Bertani (bacto-triptona, extrato de levedura e NaCl) *E. coli*  
M2 – Meio de mínimo (*C. crescentus*)  
NA1000 – mutante derivado da CB15 com capacidade conjugativa  
*O-xynB2* - mutante derivado da NA1000 que superexpressa o gene *xynB2*  
 $\Delta$ -*xynB2* - mutante derivado da NA1000 onde o gene *xynB2* está depletado  
NCBI – “National Center for Biotechnology Information”  
PCR – Reação em cadeia da Polimerase  
pH – Potencial hidrogênio  
pJET 1.2 blunt – Plasmídeo utilizado como vetor de clonagem  
Primer - Oligonucleotídeo  
pPROEX-HTA – Plasmídeo utilizado como vetor de expressão  
PYE – Meio de cultura completo contendo: Peptona e extrato de levedura  
r.p.m. – Rotações por minuto  
SDS-PAGE – “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”  
TA – Temperatura Ambiente  
TAE – Tris Ácido Acético e EDTA  
TBE – Tris Base Ácido Bórico e EDTA  
TE – Tris e EDTA  
TEMED- N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina  
tRNA – RNA transportador  
U/mg – Unidades por miligramas.  
*xynB2* – gene de *C. crescentus* que codifica para  $\beta$ -Xilosidase II  
 $\mu$ L – Micro litro  
 $\mu$ g/mL – Microgramas por mililitro  
 $\rho$ moles/ $\mu$ L – Picomoles por microlitro  
pNPX - *p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo*

## ARTIGO 1 – A INTERRUPÇÃO DO GENE *xynB2* REGULA POSITIVAMENTE A EXPRESSÃO DE $\beta$ -XYLOSIDASES EM *C. crescentus*

Versão adaptada do artigo publicado na revista  
*Applied Biochemistry and Biotechnology* (2014, 172: 1085–1097)

### Introdução

Microrganismos que degradam a parede celular da planta utilizam uma variedade de enzimas e abordagens fisiológicas diferentes para a degradação da biomassa vegetal. O xilano é o principal polissacarídeo que perfaz a hemicelulose encontrada em células da parede de plantas, e é uma rica fonte renovável para a produção de biocombustíveis e bioquímicos [1, 2]. A completa hidrólise do xilano requer um grupo de enzimas, incluindo as endo- $\beta$ -xilanases (E.C. 3.2.1.8),  $\beta$ -xylosidases (E.C. 3.2.1.37),  $\alpha$ -arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronosidases (E.C. 3.2.1.139) e as acetilxilanoesterases (E.C. 3.1.1.72). As xilanases clivam a cadeia principal do xilano, produzindo xilo oligossacarídeos que podem ser convertidos à xilose por  $\beta$ -xilosidases [3].

*C. crescentus* é uma bactéria gram-negativa que possui capacidade de colonizar uma ampla variedade de substratos, incluindo ambientes extremos, e pode utilizar várias fontes de carbono presentes nos habitats que contenham biomassas de plantas [4,5]. A análise do genoma sequenciado de *C. crescentus* revela que possui inúmeros genes que codificam para enzimas envolvidas no metabolismo de biomassa, incluindo celulasas, xilanases e cinco diferentes  $\beta$ -xilosidases [6, 7].

A caracterização dos genes envolvidos na utilização de carboidratos associada ao estudo de proteínas que regulam a sua expressão podem fornecer informações importantes sobre a interação e adaptação de bactérias com o seu ambiente.

Apesar de seu papel fisiológico importante, relativamente pouco se sabe sobre a organização e a regulação dos sistemas de enzimas responsáveis pela utilização da parede celular vegetal polissacarídica em *C. crescentus*. A  $\beta$ -xilosidase II expressa e purificada a partir de *E. coli* indicou a capacidade de hidrolisar substratos típicos de  $\beta$ -xilosidases, tais como pNPX, xilbiose, xilotriose, xilopentose [8] e oligossacarídeos derivados de xilano após pré hidrólise por uma xilanase purificada [9]. Paralelamente, a cristalografia e análise de difração por raio-X da  $\beta$ -xilosidase II de *C. crescentus* mostrou que esta é uma enzima interessante comparada aos outros tetrâmeros de xilosidases da família GH39 caracterizadas [10, 11], pois foi relatada como um monômero em solução sem a formação de tetrâmeros estáveis [8].

No presente trabalho, foram criadas duas cepas mutantes de *C. crescentus* para o gene *xynB2* que codifica para a  $\beta$ -xilosidase II da família 39 de glicosil hidrolases (GH39). Os mutantes e a cepa parental denominada NA1000 foram cultivados na

presença de glicose, xilose e diferentes resíduos, e todas as cepas foram caracterizadas por meio de RT-PCR, ensaios de atividade promotora e quanto a capacidade catalítica por dosagem da atividade de  $\beta$ -xilosidase.

## **Material e Métodos**

### *Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento*

A *Escherichia coli* DH10B (Gibco BRL) foi usada para propagação dos plasmídeos e S-17 [11] para transferência das construções por conjugação em *C. crescentus*. As células foram cultivadas em caldo Luria-Bertani a 37 °C [13]. As cepas utilizadas de *C. crescentus* incluem a NA1000, que é um derivado mutante da cepa CB15 [14],  $\Delta$ -*xynB2*, um mutante nulo para gene *xynB2* (veja abaixo), e a cepa O-*xynB2*, um mutante regulado pelo promotor PxyIX (veja abaixo). As cepas bacterianas e plasmídeos usados neste estudo estão listados na Tabela 1. As cepas de *C. crescentus* foram crescidas a 30 °C em meio PYE (Poindexter, 1964) ou meio mínimo de sais [15] suplementado com 0,2% de glicose (p/v) ou 0,2% de xilose (p/v), e suplementados em alguns ensaios individualmente com os resíduos: resíduo de soja a 1% (p/v), bagaço de cana-de-açúcar a 1% (p/v), palha de milho a 1% (p/v) e casca de laranja a 1% (p/v).

### *Preparação dos resíduos*

Os diferentes resíduos usados neste estudo (resíduo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e casca de laranja) foram obtidos de da região do Oeste do Paraná no Brasil e sua composição está relatada na Tabela 2. Todos os resíduos foram secos a 50 °C por 2 horas, triturados e peneirados na granulometria de 12 a 48 *mesh*. Os resíduos foram preparados na concentração de 2% em água ultrapura e posteriormente esterilizados. Os resíduos foram adicionados aos ensaios para concentração final de 1% [9].

Os ensaios foram conduzidos com duplicata biológica e triplicata de dosagem enzimática.

Tabela 1. Cepas e plasmídeos

Cepas/ Plasmídeos	Genótipo/descrição	Referência/Fonte
<b><i>E. coli</i></b>		
DH10B	genótipoSmR, F' [proAB+ lacZuM15]	Invitrogen
S17-1	RP4-2, Tc::Mu Km::Tn7	[12]
<b><i>C. crescentus</i></b>		
NA1000	selvagem, sincronizável, derivada da CB15.	[14]
$\Delta$ - <i>xynB2</i>	NA1000 <i>xynB2</i> :: $\Omega$ ( <i>xynB2</i> interrompido pelo cassete de resistência a espectinomicina)	Este estudo
O- <i>xynB2</i>	NA1000 contendo a construção pAS22- <i>xynB2</i>	Este estudo
$\Delta$ - <i>xynB2</i> -C	$\Delta$ - <i>xynB2</i> contendo a construção pAS22- <i>xynB2</i>	Este estudo
<b>Plasmídeos</b>		
pJET1.2 <i>Blunt</i>	Vetor de clonagem, Amp <sup>R</sup>	Fermentas
pUCBM21	Vetor de clonagem derivado de pUC19; Amp <sup>R</sup>	Boehringer-Mannheim
pPROEX	Vetor de expressão pPROEX-hta, Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pRKlac290	vetor baseado no RK2 que permite fusão de transcrição com o gene <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , Tet <sup>R</sup>	[25]
pHP45 $\Omega$	Derivado do pBR322, Ap <sup>r</sup> , cassete $\Omega$ (Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> ), 4.403 pb.	[16]
pNPTS138	replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km <sup>r</sup> ), <i>sacB</i> , 5361 pb.	M.R.K. Alley
pJET- <i>xynB2</i>	pJET1.2/ <i>Blunt</i> contendo gene <i>xynB2</i> clonado de <i>C. crescentus</i> .	[9]
pJET $\Delta$ -spec	Gene <i>xynB2</i> interrompido pelo cassete de resistência para espectinomicina no vetor pJet1.2/ <i>Blunt</i> .	Este estudo
pNPTS- <i>xynB2</i>	pNPTS138 contendo o gene <i>xynB2</i> interrompido por cassete de Spec <sup>R</sup> .	Este estudo
pPROEX- <i>xynB2</i>	pPROEX-hta contendo o gene <i>xynB2</i> subclonado de <i>C. crescentus</i> .	[9]
pRS- <i>xynB2</i>	fusão de transcrição, pRKlacZ290 contendo a região promotora do gene <i>xynB2</i> fusionada ao gene <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> .	Este estudo
pAS22	Derivados do Pbb1, Cm <sup>R</sup> , com o promotor do gene <i>xyIX</i> de <i>C. crescentus</i> à frente do múltiplo sítio de clonagem.	U. Jenal
pAS22- <i>xynB2</i>	pAS22 contendo o gene <i>xynB2</i> de <i>Caulobacter</i> sem a região promotora original, portanto regulado pelo promotor <i>PxyIX</i> . (ori T, Cm <sup>R</sup> ) induzido por xilose.	Este estudo

**Tabela 2.** Composição dos resíduos utilizados

Resíduo agroindustrial	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Resíduo de soja	46	24	2
Bagaço de cana-de-açúcar	47	28	23
Palha de milho	32	25	20
Casca de laranja	40	33	19

#### *Clonagem do gene xynB2 e construção das cepas mutantes xynB2*

A construção pPROEX-*xynB2* contendo o gene *xynB2* [9] foi digerido com *EcoRI/KpnI*, e o gene *xynB2* foi subclonado no vetor pAS22, controlado pelo promotor PxyIX. Esta construção, foi nomeada como pAS22-*xynB2*, foi transferido por conjugação para células de NA1000, gerando um O-*xynB2* que superexpressa o gene *xynB2* na presença de xilose em meio mínimo (M2).

Para criar uma cepa mutante nula de *xynB2*, a cópia cromossômica da cepa selvagem do gene *xynB2* foi substituída por uma cópia que foi interrompida pela cassete de resistência à espectinomicina, obtida do vetor pHP45Ω [16]. O cassete de resistência a espectinomicina (2,0 kb) foi removido do vetor pHP45Ω por digestão com *HindIII* seguido de tratamento para produzir extremidades não coesivas (*blunt ends*) e posteriormente clonado no único sítio de *SmaI* contido no gene, a construção inicial em vetor foi feita no vetor pJET-*xynB2* [9]. Em seguida, pJET-*xynB2* contendo o gene *xynB2* interrompido pelo cassete de resistência a espectinomicina foi nomeado como pJETΔ-Spec, que foi posteriormente digerido com *EcoRI* e *XhoI*, e o fragmento foi religado no vetor pNPTS138 que havia sido digerido com *EcoRI* e *SalI*, lembrando que digestões com *XhoI* e *SalI* geram extremidades de DNA compatíveis. O vetor pNPTS138 possui dois marcadores de seleção para as etapas de recombinação homóloga subsequentes, incluindo *nptI*, que confere resistência a canamicina, e *sacB*, que confere sensibilidade a sacarose. A construção resultante, pNPTS-*xynB2*, foi transferida para *C. crescentus* por conjugação, e o primeiro evento de recombinação homóloga foi verificado por análise de *Southern blot*. A seleção dos clones Δ-4 e Δ-10, que apresentaram resistência para canamicina e espectinomicina, recombinadas antes e após a cópia intacta do gene *xynB2*, respectivamente. Para o segundo evento de recombinação homóloga, os mutantes Δ-4 e Δ-10 foram crescidas em meio PYE, e alíquotas passaram por espalhamento de superfície em placas contendo 3% de

sacarose. As colônias resistentes à sacarose foram testadas quanto à resistência para o antibiótico canamicina, as colônias que se apresentaram sensíveis à canamicina e resistentes à espectinomicina foram analisadas quanto à ocorrência da correta recombinação por *Southern blot*. Uma das cepas mostrou o perfil de recombinação e foi nomeada como  $\Delta$ -*xynB2* e esta foi caracterizada nas etapas subseqüentes.

#### *Preparação dos extratos celulares e eletroforese*

As células de NA1000 abrigoando o vetor pAS22 vazio e a cepa *O-xynB2* foram cultivadas até à fase exponencial durante 8 h na presença de 0,2% de glicose (p/v) e 0,2% de xilose (p/v). Alíquotas (1,5 mL) foram recolhidas das culturas e centrifugadas por 12.000 xg por 3 minutos e o precipitado de células foi ressuspenso em tampão de amostra Laemmli. Quantidades iguais de proteína foram separadas em géis de poliacrilamida a 9% (SDS-PAGE) [17], e as proteínas totais da bactéria foram detectadas por ensaios de *Western blot*.

#### *Análise de Western blot*

Os ensaios de *Western blot* foram realizados conforme metodologia descrita por Towbin et al. [18], com modificações. Depois da eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e incubadas por 2 horas em tampão de bloqueio (10mM Tris-HCl, pH 7,5) contendo 150 mM NaCl, 5% (p/v) de leite em pó desnatado e 0,05% azida sódica (p/v). O anticorpo policlonal anti- $\beta$ -xilosidase II foi diluído 1:200 no tampão de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado e a membrana foi incubada por 16 h a 4 °C. A proteína na membrana foi lavada com TBS (10mM Tris-HCl [pH7,5] e 150mM NaCl) contendo 0,05% de Tween 20 (v/v), e em seguida foi procedida lavagem com TBS sozinho. A membrana foi incubada com anti-imunoglobulina G de coelho conjugada com fosfatase alcalina (Sigma). Para revelação dos substratos foram utilizados NBT (nitrobluetetrazolium; 0,15 mg/mL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-6-indolil fosfato; 0,3 mg/mL) na reação.

#### *Extração de RNA e análise de RT-PCR*

O RNA de *C. crescentus* foi extraído usando o método de Trizol descrito pelo fabricante (Invitrogen) e submetido à reação de PCR com Transcriptase Reversa (RT-PCR). As alíquotas de células de 1,5 mL das diferentes cepas NA1000, *O-xynB2* e  $\Delta$ -*xynB2* foram crescidas em M2 suplementado com 0,2% de glicose (p/v) e 0,2% de xilose (p/v) por 8 horas a 30 °C, e em seguida as células foram recuperadas e centrifugadas por 3 minutos a 6000 xg a 4 °C. O precipitado celular foi ressuspenso em

1mL de Trizol, e posteriormente foi extraído o RNA, a integridade deste foi verificada por eletroforese de gel de agarose. O RNA total extraído foi digerido com *DNase/RNase-free* para eliminação do DNA contaminante de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen), e a ausência de DNA foi confirmada por PCR. A quantificação do RNA foi determinada por absorvância a 260 nm, e a qualidade foi determinada por visualização em 1,5% de gel de agarose e a relação das leituras nas absorvâncias detectadas em 260 e 280nm foi considerada. Alíquotas de 100 ng de RNA foi usada na análise de RT-PCR. A análise de detecção de transcrição foram realizadas utilizando o *Kit SuperScriptOneStep* RT-PCR com Taq Platinum (Invitrogen). O fragmento correspondente a 1.500 pb da região do gene *xynB2* de *C. crescentus* foi amplificado usando os oligonucleotídeos RT-*xynB2*-F e RT-*xynB2*-R. Para amplificar o fragmento de cDNA de 1.645 pb correspondente ao gene *xynB1*, utilizou-se os oligonucleotídeos RT-*xynB1*-F e RT-*xynB1*-R (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequência de nucleotídeos usados nos oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'- 3')
RT- <i>xynB2</i> -F	atggcgaacgccggcccc
RT- <i>xynB2</i> -R	ctaggccagcggctcgag
RT- <i>xynB1</i> -F	atgagcaaagatctgac
RT- <i>xynB1</i> -R	tcaggcgggccactgcg
P <i>xynB2</i> -F	tat <b>gaattc</b> cgcccgggtgtccgccag
P <i>xynB2</i> -R	Tat <b>ctgcag</b> acaaccggcaggctcgca

Os locais de enzimas de restrição são exibidas em negrito

O inibidor de *RNase* (Invitrogen) foi adicionado em todas as reações de RT-PCR. As condições de RT-PCR foram: Síntese de cDNA a 55 °C por 30 min, desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e alongamento a 68 °C por 90 segundos, seguido de extensão final a 68 °C por 5 min. Para o controle negativo da reação foram usados Taq DNA Polimerase (Invitrogen) sem a *SuperScript-Transcriptase* Reversa para confirmar a não amplificação de DNA. Os produtos RT-PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% usando TBE 1X.

### *Ensaio de atividade de $\beta$ -xilosidase*

As células de NA1000  $\Delta$ -*xynB2* e O-*xynB2* foram crescidas por 12 h a 30 °C em M2 suplementado com 0,2% glicose (p/v), 0,2% xilose (p/v), 1% de resíduo de soja (p/v), 1% de bagaço de cana-de-açúcar (p/v), 1% de palha de milho (p/v) e 1% de casca de laranja (p/v). As células foram coletadas e centrifugadas a 12.000 xg a 4 °C por 15 min. O precipitado foi ressuspensão em 250  $\mu$ L tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5.4, para obter os extratos usados nos ensaios enzimáticos. A atividade de  $\beta$ -xilosidase foi determinada como descrito por Corrêa et al. [9].

### *Ensaio de atividade promotora*

Para obter a construção contendo a região promotora do gene *xynB2* fusionada ao gene *lacZ*, amplificamos a região 5' de *xynB2* não codificadora do gene por PCR com a Taq DNA polimerase usando os oligonucleotídeos P-*xynB2*-F e P-*xynB2*-R (Tabela 3). O fragmento obtido no PCR de 0,75 kb foi clonado em sítios *EcoRI/PstI* no vetor pUCBM21 (Invitrogen). A identidade da região promotora foi confirmada por sequenciamento de DNA e foi subclonada em vetor pRK/*lacZ*290, gerando uma fusão de transcrição denominada pRS-*xynB2*. As cepas de *C. crescentus* (NA1000) com as construções  $\Delta$ -*xynB2* e O-*xynB2* foram conjugadas para abrigar o plasmídeo pRS-*xynB2*, estas foram cultivadas até a fase log ( $OD_{\lambda 600nm} = 0,6-0,8$ ) a 30 °C no meio M2 com antibiótico tetraciclina e suplementado com 0.2% glicose (p/v), 0.2% xilose (p/v), 1% resíduo de soja (p/v), 1% bagaço de cana-de-açúcar (p/v), 1% palha de milho (p/v) e 1% casca de laranja (p/v) e a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi mensurada [19].

## **RESULTADOS**

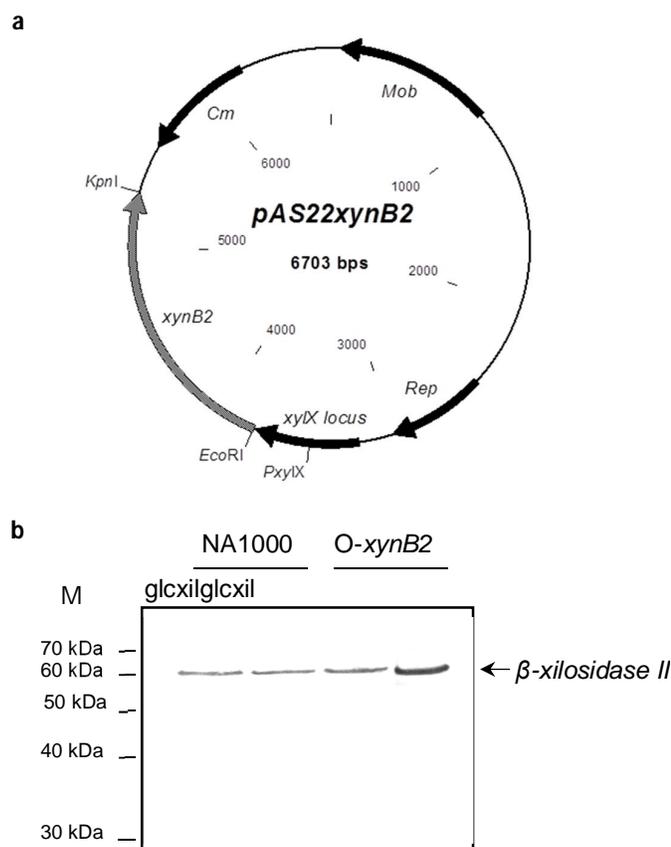
### *Análise de transcrição dos genes *xynB1* e *xynB2**

Para avaliar o papel do gene *xynB2* em *C. crescentus*, o gene foi clonado para criar duas cepas mutantes. Na primeira cepa O-*xynB2*, o gene *xynB2* foi clonado sob controle do promotor P<sub>*xylX*</sub> (Fig. 1a), assim,  $\beta$ -xilosidase II foi superexpressa em *C. crescentus* com a presença de xilose nos cultivos (Fig. 1b). Contudo, quando O-*xynB2* é crescido em ausência de xilose e presença de glicose, a quantidade de  $\beta$ -xilosidase produzida é semelhante à cepa selvagem, abrigando somente o plasmídeo (Fig. 1b).

O segundo mutante,  $\Delta$ -*xynB2*, onde gene *xynB2* foi interrompido por um cassete de resistência a espectinomomicina e o mutante O-*xynB2* foram caracterizados em

comparação com a cepa parental NA1000 por RT-PCR, para atividade enzimática de  $\beta$ -xilosidase como para a atividade promotora do gene repórter *lacZ* a partir da dosagem de  $\beta$ -galactosidase.

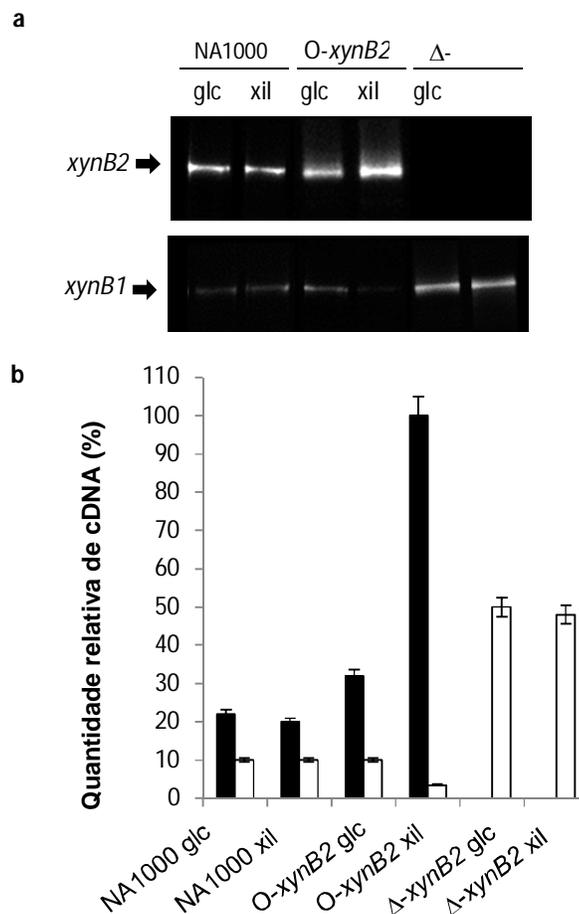
A transcrição do gene *xynB2* foi completamente desligada no mutante nulo ( $\Delta$ -*xynB2*) (Fig. 2a). Em contraste, a cepa *O-xynB2* mostrou expressão aumentada de 4 vezes para *xynB2* quando comparada a cepa parental NA1000, e valores semelhantes foram obtidos em condições repressivas (0,2% glicose) (p/v) (Fig. 2a-b). Curiosamente, a depleção do gene *xynB2* permite que as células de *C. crescentus* aumentem a expressão do gene *xynB1* que codifica para uma enzima bi-funcional ( $\beta$ -D-xilosidase I- $\alpha$ -L- arabinofuranosidase) [20].



**Fig. 1.** Superexpressão do gene *xynB2* de *C. crescentus*. (a) Mapa do plasmídeo pAS22 (U. Jenal), que foi usado na superexpressão. Este plasmídeo contém o gene induzido pelo promotor *PXylx*. Os sítios de restrição *EcoRI* e *KpnI* foram usados na clonagem (b) 10 kDa *Protein Ladder* (M). Células de NA1000 abrigando pAS22 vazio e *O-xynB2* com a construção pAS22-*xynB2* foram crescidas por 8 h em M2 com 0,2% (p/v) de glicose (glc) ou 0,2% (p/v) de xilose (xil), as bandas correspondem à detecção da enzima  $\beta$ -xilosidase II em ensaio de *Western blot* usando anticorpo policlonal específico da própria enzima.

A expressão de *xynB1* na cepa  $\Delta$ -*xynB2* foi 5 vezes maior do que os níveis observados na cepa parental NA1000 não só na presença de xilose mas também com a suplementação do meio M2 com glicose. Além disso, a superexpressão do gene *xynB2*

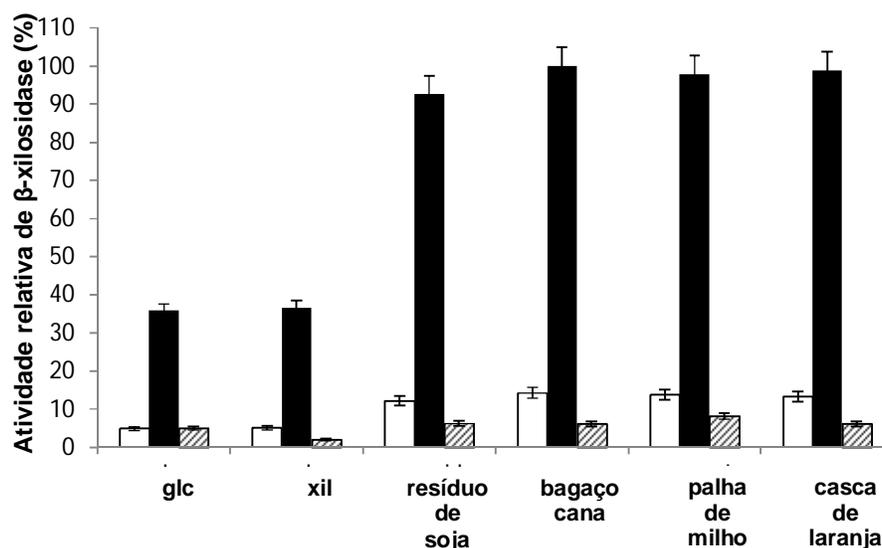
inibiu a capacidade das células de *C. crescentus* transcrever *xynB1*. Ocorre uma diminuição de 3 vezes na expressão de *xynB1* quando a cepa *O-xynB2* cresce na presença de xilose e glicose ou nas células parentais NA1000 em todas as condições testadas. A xilose parece não afetar a expressão de mRNA em *xynB1* e *xynB2* na NA1000 por apresentar os mesmos níveis em ambos os genes, quando crescidos em presença tanto de xilose quanto glicose.



**Fig. 2.** Níveis de transcrição dos genes *xynB1* e *xynB2* de *C. crescentus* em diferentes condições de cultivo. (a) *C. crescentus* NA1000, *O-xynB2* e  $\Delta$ -*xynB2* foram crescidas até fase exponencial a 30 °C na presença de glicose (glc) ou xilose (xil), e após 8 horas a 30 °C, o RNA foi extraído destas células. Os ensaios RT-PCR usaram quantidades iguais de RNA, conforme descrito em materiais e métodos. O controle negativo dos ensaios foi a feito com *Taq DNA polymerase* sozinha (dados não mostrados) (b) Densitometria das bandas obtidas em (A) com valores expressos em % relativa de cDNA obtido. As barras pretas e brancas representam os níveis de transcrição dos genes *xynB2* e *xynB1*, respectivamente. Os dados mostrados referem-se a dois ensaios biológicos independentes. O desvio padrão está mostrado através das barras de erros.

### Atividade enzimática

Para verificar porque o gene é regulado positivamente por *xynB1* no mutante nulo  $\Delta$ -*xynB2* e negativamente em *O-xynB2*, foram investigados os níveis de atividade detectados em ensaios enzimáticos para  $\beta$ -xilosidase em diferentes fontes de carbono (Fig. 3). Os resíduos são ricos em lignocelulose e xilano (Tabela 2) e isso relevou ser interessante para a aplicação de *C. crescentus*, para a degradação de biomassa e/ou processamento de resíduos. A atividade de  $\beta$ -xilosidase no mutante nulo foi drasticamente alta quando comparada à cepa parental nas diferentes fontes de carbono testadas. Entretanto, a atividade de  $\beta$ -xilosidase foi menor em *O-xynB2* comparado com a cepa NA1000. Por exemplo, a  $\beta$ -xilosidase obtida na presença de bagaço de cana foi 7 vezes maior do que a atividade detectada em NA1000 e 16 vezes maior em *O-xynB2* sob as mesmas condições. Este resultado sugere que a depleção do gene *xynB2* aumenta a atividade global de  $\beta$ -xilosidases em *C. crescentus*. Curiosamente nos ensaios em que foram considerados, a atividade de  $\beta$ -xilosidase na presença de xilose ou glicose e uma única fonte de carbono, foi revelado que a atividade enzimática foi aumentada em 7 vezes nas cepa mutante nula comparado com a cepa parental. Estes dados indicam que  $\beta$ -xilosidase II em *C. crescentus* pode ter um papel de controle na expressão do gene *xynB1* ou algum metabólito relacionado à ausência ou presença da proteína pode estar controlando a expressão deste.



**Fig. 3.** A interrupção do gene *xynB2* aumenta os níveis de atividade de  $\beta$ -xilosidase em *C. crescentus*. A atividade de  $\beta$ -xilosidase na cepa NA1000 parental são mostradas nas barras brancas,  $\Delta$ -*xynB2* (barras pretas) e *O-xynB2* (barras listradas), as quais foram cultivadas em M2 contendo glicose (0,2%) e xilose (0,2%) e diferentes resíduos (1%) em 12 horas de ensaio. Os valores são expressos em atividade relativa (%), considerando o maior valor como sendo 100%.

### *Ensaio de atividade promotora*

Para investigar se o aumento da expressão de  $\beta$ -xilosidase no mutante nulo de *xynB2* resulta na continuação da transcrição dos genes *xynB*, a fusão de transcrição contendo a região promotora do gene *xynB2* fusionada ao *lacZ* foi analisada na cepa mutante nulo para o gene *xynB2* e na cepa que superexpressa *xynB2*, em comparação com a cepa parental, a partir da dosagem da atividade de  $\beta$ -galactosidase (Fig. 4). A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi elevada nas células mutantes na presença de todos os resíduos testados. Ao contrário, a baixa atividade de  $\beta$ -galactosidase foi observada nas células que superexpressam *xynB2* na presença de carboidratos simples (glicose e xilose), mas também na presença dos resíduos.

Anteriormente, foi verificado por RT-PCR que a glicose e a xilose não induzem expressão de *xynB2* em cepas de NA1000 (Fig. 2a). No entanto, a transcrição deste gene foi altamente induzida por outros resíduos na cepa parental, particularmente a casca de laranja, que possui um nível elevado de hemicelulose (Tabela 2), causou 4 vezes mais indução do promotor na cepa parental e quase 6 vezes mais no mutante nulo em comparação com os valores obtidos para células de NA1000 na presença de glicose e xilose. Este resultado indica que a ausência da  $\beta$ -xilosidase II, de forma geral ativa alguns mecanismos em *C. crescentus*, causando aumento da expressão nos genes *xynB*. Isso foi observado que no gene *xynB1* (Fig. 2) além do aumento na atividade de  $\beta$ -xilosidases totais (Fig. 3).

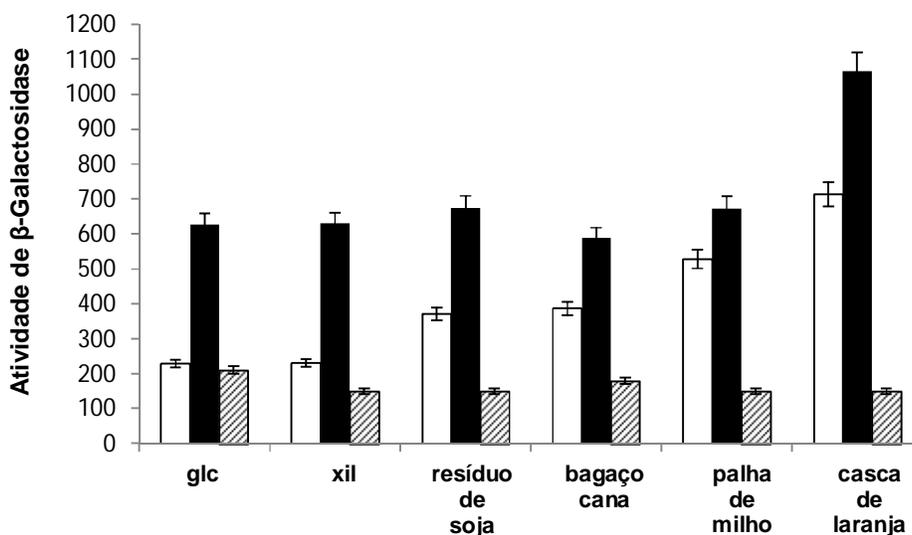
Curiosamente, a indução da transcrição do gene *xynB2* foi causada por palha de milho e casca de laranja na cepa parental (Fig. 4), mas não provocou aumento da atividade na presença destes resíduos quando comparados com os valores obtidos a partir de resíduos de soja e bagaço de cana-de-açúcar (Fig. 3). Estes dados sugerem que a completa ausência de  $\beta$ -xilosidase II é crucial para induzir a produção de outras enzimas ou  $\beta$ -xilosidase II tem um regulador para a expressão e atividade de  $\beta$ -xilosidases em *C. crescentus*.

### *Complementação do Mutante nulo de xynB2*

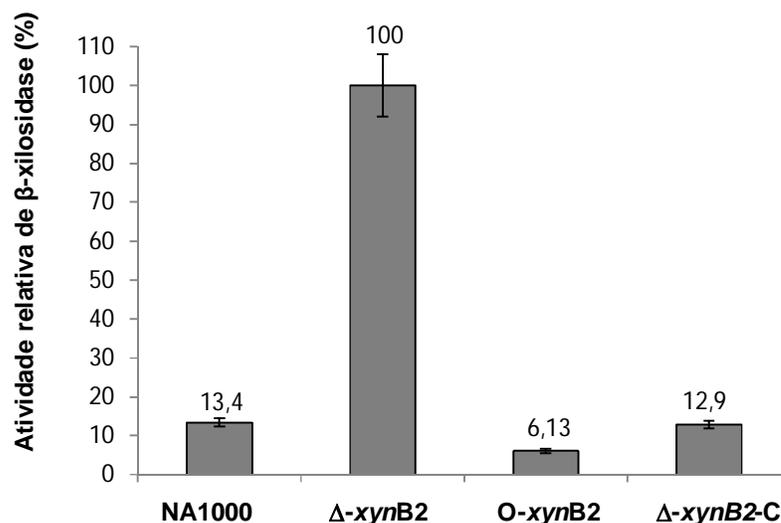
Investigou-se se o fenótipo do mutante nulo poderia ser revertido quando os níveis originais de  $\beta$ -xylosidase II fossem produzidos. Para investigar esta hipótese foi analisada a atividade de  $\beta$ -xylosidase nas cepas NA1000,  $\Delta$ -*xynB2*, O-*xynB2* e a  $\Delta$ -*xynB2*, complementada com uma cópia original do gene sob controle do promotor P<sub>xyIX</sub>. Neste estudo foi demonstrado que as cepas de NA1000 que abrigavam a construção de pAS-*xynB2* na presença de glicose pode expressar níveis similares de

mRNA encontrados nas células NA1000 parentais em presença de glicose e xilose (Fig. 2a).

Assim, no mutante nulo de *C. crescentus*, quando complementado com pAS-*xynB2* e crescido na presença de 0,2% de glicose, os níveis de atividade são semelhantes a cepa parental, conforme mostra Fig. 5. Esses dados sugerem que o produto do gene *xynB2* desempenha papel de controle da expressão em *C. crescentus* sobre as  $\beta$ -xylosidases I e II.



**Fig. 4.** A transcrição dirigida pelo promotor do gene *xynB2* é induzida no mutante nulo  $\Delta$ -*xynB2* e reprimida no mutante que superexpressa  $\beta$ -xylosidase II. As células de NA1000 (barras brancas),  $\Delta$ -*xynB2* (barras pretas) e *O*-*xynB2* (barras listradas), abrigando a fusão de transcrição do genexynB2 com *olacZ* em vetor pRS22 foram crescidas até fase logarítmica a 30 °C em M2 com glicose (0,2%), xilose (0,2%) e diferentes resíduos (1%) como fonte de carbono mostrados. A atividade do promotora do genexynB2 foi mensurada através dos níveis exibidos de  $\beta$ -galactosidase, os resultados são mostrados em unidade de Miller. Os dados representam três ensaios biológicos independentes. O desvio padrão está ilustrado através das barras de erros.



**Fig. 5.** O fenótipo do mutante nulo revertido complementa a cópia do gene *xynB2*. As células das cepas de *C. crescentus* NA1000, Δ-*xynB2* e O-*xynB2* foram crescidas até fase log a 30 °C em M2 suplementado com casca de laranja (1%), e Δ-*xynB2*-C cresceu em M2 com glicose (0,2%). As células foram recuperadas conforme indicado em material e métodos e o extrato celular foi utilizado para mensurar a atividade de β-xylosidase. Os dados representam três ensaios biológicos independentes. O desvio padrão está ilustrado através das barras de erros.

## Discussão

Neste trabalho foi demonstrado que os resíduos induzem a expressão e a atividade de β-xylosidase, e isso foi otimizado na ausência do gene *xynB2*. (Fig. 2 e 3). A obtenção do mutante nulo do gene *xynB2* que codifica para a β-xylosidase II em *C. crescentus* indica que o gene não é essencial para as condições normais na célula.

A principal conclusão do estudo foi a observação de que, nas células de *C. crescentus*, a ausência da expressão de β-xylosidase II regula positivamente a expressão dos genes *xynB1* e *xynB2* em nível de transcrição (Fig. 2 e Fig. 4), sugerindo que um mecanismo de regulação comum e ainda desconhecido é ativado na ausência de β-xylosidase II em *C. crescentus*. Além disso, a superexpressão do gene *xynB2* causou baixa expressão de β-xylosidases, sugerindo um efeito repressor para a β-xylosidase II quando está presente em elevadas concentrações. Os resultados sugerem que a β-xylosidase II pode controlar a expressão e atividade de outras β-xylosidases (Figuras 2-5). É importante ressaltar que este é o primeiro estudo relacionado ao controle de expressão dos genes *xynB* que codificam β-xylosidases em bactérias.

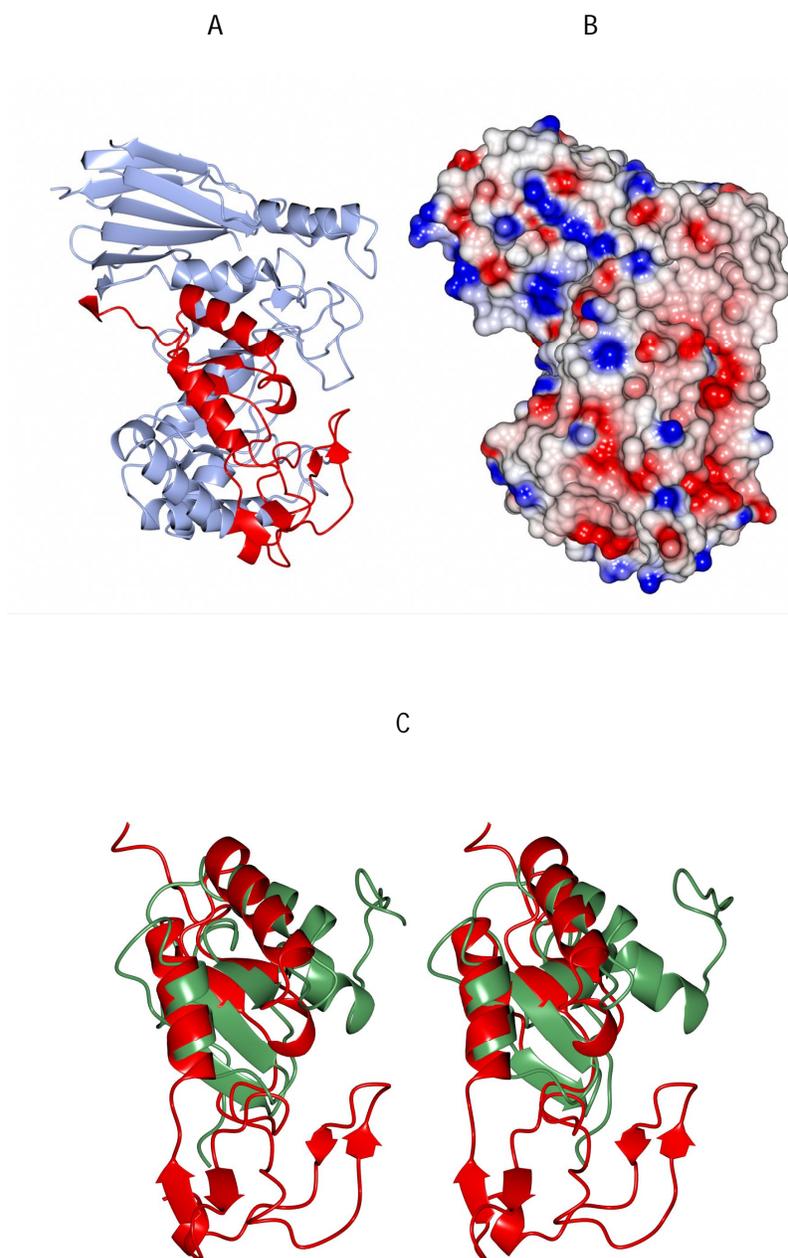
Como mencionado anteriormente, o gene *xynB1* que codifica para um  $\beta$ -xilosidase- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase [20] foi induzido no mutante  $\Delta$ -*xynB2*, e o mesmo não ocorreu na cepa parental (dados não mostrados). Adicionalmente a estas observações, recentemente foi demonstrado que o gene *xynB1* codifica majoritariamente para atividade de  $\beta$ -xylosidase mesmo esta sendo uma enzima bifuncional [20]. Desta forma, o aumento de atividade de  $\beta$ -xylosidase que foi verificado nas cepas do mutante nulo (Fig. 3) é provavelmente em parte correspondente a atividade da  $\beta$ -xylosidase I.

Contudo, além dos genes *xynB1* e *xynB2*, *C. crescentus* possui outros três genes que não foram investigados neste trabalho, incluindo o gene *xynB3* (CCNA\_00856) com função de  $\beta$ -xilosidase, o gene *xynB4* (CCNA\_02893) com função de  $\beta$ -xilosidase -Alfa-L-arabionofuranosidase e o gene *xynB5* (CCNA\_03149) com função de  $\beta$ -glicosidase- $\beta$ -xilosidase [6,7]. Apenas *xynB4* está organizado em operon no genoma de NA1000, e é provavelmente transcrito em conjunto com um gene receptor dependente do gene *TonBe*, um gene que codifica para uma xilanase [7]. Os outros genes codificam mRNA independentes e são provavelmente monocistronicos.

Os genes homólogos a *xynB4* e *xynB5* na cepa de *C. crescentus* CB15 foram induzidos em nível transcricional por xilose [21]. Uma provável razão para tal indução é a presença de um motivo conservado para indução por xilose, a sequência nucleotídica AGAAATGGTACCGGTCTCAT localizada a 114 nucleotídeos no início de tradução do gene *xynB5* na bactéria. Além disso, em análises de transcriptomas tem e mostrado que as células de CB15 crescidas em meio M2 com glicose e xilose, aumentam a expressão dos genes *xynB4* e *xynB5* em 3,78 e 7,11 vezes, respectivamente. As expressão dos genes homólogos de *xynB1* e *xynB2* (CC0989 e CC2357), não tiveram indução significativa quando suplementados com xilose em análises por chip de DNA [21]. Esses resultados são consistentes com os obtidos no RT-PCR apresentado aqui para os genes *xynB1* e *xynB2* (Fig. 2). Além disso, a análise da região não codificadora dos genes usando RSAT (Ferramenta de Análise de Sequência de regulação) [22], mostrou que o motivo da indução por xilose não está presente nestes genes. Em *C. crescentus*, o metabolismo de D-xilose, ocorre através de um processo iniciado pela enzima xilose desidrogenase (XDH) [24]. Nesta bactéria a xilose induz a expressão de mais que 50 genes incluindo o operon *xyl*, que expressa as enzimas do metabolismo da de D-xilose. De fato, a expressão do operon *xyl* é controlada pelo repressor *XylR*, um fator de transcrição sensível a xilose da família LacI. Um modelo sugere que na ausência de xilose, *XylR* liga-se a sítios no operador que se sobrepõem aos promotores gênicos induzíveis por xilose, impedindo o início do processo de transcrição. No entanto, na presença de xilose que se liga a *XylR*, ocorre uma conformação estável que desestabiliza o repressor e reduz a sua afinidade pelo DNA, liberando o promotor para interagir com o core da RNA polimerase [24].

Com o objetivo de entender melhor as relações que envolvem a regulação dos genes *xynB1* e *xynB2*, a sequência de aminoácidos da  $\beta$ -xylosidase II foi analisada para encontrar motivos estruturais usando o SMARTserver software [26]. Os resultados indicaram que os resíduos 19 a 134 também têm similaridade com motivos similares aos da família STE de fatores de transcrição (SMARTACC: SM000424). Esta família consiste de fatores de transcrição relacionados a STE e estão associados com algumas proteínas C2H2 dedos de zinco. Os termos no gene *ontology* encontrados para este motivo incluem uma sequência específica de ligação ao DNA com atividade de fator de transcrição (GO: 0003700) e reguladores de transcrição dependentes de DNA (GO: 0006355) (FigS1a, b). A análise do Blast-P para os resíduos da  $\beta$ -xylosidase II 19 a 134 do banco de dados UniProt indicaram 45% de identidade ( $e$ -value:  $1 \times 10^{-20}$ ) com reguladores transcricionais da família AraC de *Clostridium ultunense* (UniProt: M17L92) e baixa identidade com a mesma estrutura em outras espécies bacterianas. Os resíduos 19 a 134 da  $\beta$ -xylosidase II foram também submetidos ao pDomTHREADER server para promover o reconhecimento de domínios [27]. Apesar do principal domínio a ser reconhecido tenha sido para domínios de  $\beta$ -xylosidases, também foi identificado um domínio estrutural conhecido por ligar-se a ácidos nucléicos. A estrutura secundária deste domínio da  $\beta$ -xylosidase II se sobrepõem a domínios de Ribonucleases ligantes de RNA (PDB id: 1whv) foi identificado pelo pDomTHREADER e mostrou uma significativa correspondência estrutural (Fig. S1c). Todos estes achados, associados ao fato de que as  $\beta$ -xylosidases apresentam estruturas tetraméricas, enquanto que a  $\beta$ -xylosidase II de *C. crescentus* apresenta uma estrutura monomérica [8], sugerem que o produto do gene *xynB2* pode ter evoluído para uma função regulatória que envolve um mecanismo de ligação ao DNA, mas ainda retém uma elevada atividade de  $\beta$ -xylosidase. A confirmação deste mecanismo necessita de investigações posteriores como estudos in vitro da  $\beta$ -xylosidase II a segmentos específicos de DNA e simulações de *molecular docking*, a fim de identificar resíduos nesta interação entre DNA e a  $\beta$ -xylosidase II. Na ausência destes estudos, qualquer tentativa para explicar os mecanismos de interação ao longo dos genes *xynB1* e *xynB2* deste trabalho são meramente especulativos. Estudos adicionais estão sendo realizados em nosso laboratório para confirmar esta hipótese mencionada acima para o melhor entendimento dos mecanismos que controlam a expressão dos genes *xynB* em *C. crescentus*.

Finalmente, no presente trabalho foi construída uma cepa com uma elevada capacidade de produzir  $\beta$ -xylosidases na presença de diferentes resíduos agroindustriais, e esta propriedade pode ser usada em processos biotecnológicos que dependem da utilização de carboidratos de 5 carbonos, como, por exemplo, para a produção de combustíveis e químicos a partir da biomassa [2].

**MATERIAL SUPLEMENTAR**

**Figura S1.** Modelos estruturais dos resíduos 19 a 134 da  $\beta$ -xylosidase II de *C. crescentus*. (A) Modelo *Ribbon* da  $\beta$ -xylosidase II (pdbid: 4m29) mostrando os resíduos 19 a 134 em vermelho, os quais apresentam similaridade com motivos de ligação ao DNA. (B) Superfície molecular da proteína colorida mostrando a arquitetura tridimensional dos resíduos 19 a 134 os quais geram um ambiente positivamente carregado necessário para estabelecer prováveis ligações com os grupamentos fosfatos nas moléculas de ácidos nucleicos. (C) Visualização dos resíduos 19 a 134 da  $\beta$ -xylosidase II de *C. crescentus* em vermelho, sobrepostos à estrutura secundária do domínio e ligação a RNA de uma Ribonuclease (BAB23382) em verde, mostrando certa similaridade estrutural entre estes domínios [8].

## Referências

1. Lynch, J. M. (1987). Utilization of lignocellulosic wastes. *Journal of Applied Microbiology*, 63, 71–83.
2. Jordan, D. B., & Wagschal, K. (2010). Properties and applications of microbial  $\beta$ -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1647–1658.
3. Ahmed, S., Saba, R., & Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 19–35.
4. Poindexter, J. S. (1964). Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriological Reviews*, 28, 231–295.
5. Poindexter, J. S. (1981). The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiological Reviews*, 45, 123–179.
6. Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J., et al. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4136–4141.
7. Marks, M. E., Castro-Rojas, C. M., Teiling, C. D. U. L., Kapatral, V., Walunas, T. L., & Crosson, S. (2010). The genetics basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 192, 3678–3688.
8. Santos, C. R., Polo, C. C., Corrêa, J. M., Simão, R. C. G., Seixas, F. A. V., & Murakami, M. T. (2012). Accessory domain changes accessibility and molecular topography of the catalytic interface in monomeric GH39 Beta-xylosidases. *Acta Cryst D*, 68, 1339–1345.
9. Corrêa, J. M., Graciano, L., Abrahão, J., Loth, E. A., Gandra, R. F., Kadowaki, M. K., et al. (2012). Expression and characterization of a GH39  $\beta$ -xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 2218–2229.
10. Yang, J. K., Yoon, H.-J., Ahn, H. J., Lee, B. I., Pedelacq, J.-D., Liong, E. C., et al. (2004). Crystal structure of Beta-D-xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a family 39 glycoside hydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 335, 155–165.
11. Czjzek, M., David, A. B., Bravman, T., Shoham, G., Henrissat, B., & Shoham, Y. (2005). Enzyme-substrate complex structures of a GH39  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Molecular Biology*, 353, 838–846.
12. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

13. Evinger, M., & Agabian, N. (1977). Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *Journal of Bacteriology*, 132, 294–301.
14. Simon, R., Prieffer, U., & Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*, 1, 784–790.
15. Gober, J. W., & Shapiro, L. (1992). A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. *Molecular Biology of the Cell*, 3, 913–916.
16. Prentki, P., & Krisch, H. M. (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragments. *Gene*, 29, 303–313.
17. Ely, B. (1991). Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods in Enzymology*, 204, 372–384.
18. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 226, 680–685.
19. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA*, 76, 4350–4354.
20. Miller, J. H. (1972). Cold Spring Harbor (pp. 352–355). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
21. Graciano, L., Corrêa, J. M., Gandra, R. F., Seixas, F. A. V., Kadowaki, M. K., Sampaio, S. C., et al. (2012). The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus*  $\beta$ -xylosidase I. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2879–2888.
22. Hottes, A. K., Meewan, M., Yang, D., Arana, N., Romero, P., McAdams, H. H., et al. (2004). Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *Journal of Bacteriology*, 186, 1448–1461.
23. Turatsinze, J. V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M., & van Helden, J. (2008). Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nature Protocols*, 3, 1578–1588.
24. Stephens, C., Christen, B., Fuchs, T., Sundaram, V., Watanabe, K., & Jenal, U. (2007). Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 189, 2181–2185.
25. Stephens, C., Christen, B., Watanabe, K., Fuchs, T., & Jenal, U. (2007). Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor. *Journal of Bacteriology*, 189, 8828–8834.

26. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5857–5864.
27. Lobley, A., Sadowski, M. I., & Jones, D. T. (2009). pGenTHREADER and pDomTHREADER: new methods for improved protein fold recognition and superfamily discrimination. *Bioinformatics*, 25, 1761–1767.

## ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\beta$ -XILOSIDASE DE UMA NOVA CEPA DE *Thermomyceslanuginosus* ISOLADA DE BIOMA DE MATA ATLÂNTICA

Versão adaptada do artigo submetido para publicação na revista  
*Biomass and Bioenergy* (ISSN: 0961-9534)

### 1. Introdução

*Thermomyces lanuginosus*, anteriormente conhecido como *Humicola lanuginosa*, é um fungo termofílico amplamente distribuído e frequentemente isolado a partir de detritos orgânicos [1]. Algumas linhagens de *T. lanuginosus* tem demonstrado potencial produtor enzimático com diferentes aplicabilidades [2,3-11]. As enzimas microbianas, de uma forma geral, têm recebido merecido destaque por serem consideradas fontes de tecnologias limpas para produção de compostos comercial e industrialmente importantes a partir da biomassa residual.

A biomassa lignocelulósica presente em resíduos é constituída em parte pela hemicelulose e a despolimerização enzimática desta estrutura é comercialmente interessante, devido às suas condições suaves e a não formação de compostos tóxicos. A desconstrução completa da estrutura hemicelulósica requer a ação sinérgica de diversas enzimas, dentre elas destacam-se as Xilanases (EC 3.2.1.8) e as  $\beta$ -Xilosidases (EC 3.2.1.37); sendo as  $\beta$ -Xilosidases enzimas responsáveis por clivar os sítios  $\beta$ -1,4 de xilo-oligossacarídeos liberados pelas Xilanases formando xilose, um monossacarídeo que pode ser usado por diferentes microrganismos no processo de fermentação para produção de compostos de interesse biotecnológico [1].

Atualmente, análises de mercado indicam que a produção mundial do milho é muito expressiva, sendo os Estados Unidos o maior produtor desta cultura, seguido da Argentina e do Brasil, totalizando cerca de 53,2 milhões de toneladas por safra. O uso da cultura do milho é até então restrita majoritariamente para produção de ração animal e, em menor proporção, para produção de óleos, farinhas e flocos para cereais matinais. Assim, há de se considerar o uso da biomassa residual desta cultura, como as palhas e sabugos para a produção de energia e outros produtos de interesse biotecnológico [1,2].

Os índices brasileiros relacionados à cultura do milho mostram que somente 5% da produção destinam-se ao consumo humano. Os resíduos oriundos do processamento desta cultura perfazem 58% da biomassa produzida; tal parcela ainda é negligenciada, sendo que alternativamente poderiam contribuir como fonte renovável de matriz energética para gerar riquezas e auxiliando na diminuição do acúmulo de resíduos que podem ser prejudiciais ao meio ambiente [1,2].

No presente trabalho um isolado um fungo de bioma da Mata Atlântica brasileira foi otimizado para a produção de  $\beta$ -Xilosidase por delineamento experimental. O extrato

bruto otimizado da enzima foi usado para ensaios de sacarificação do xilano de beechwood e da hemicelulose obtida da palha do milho, ressaltando o papel biotecnológico da enzima.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Coleta, identificação e manutenção da cultura

O fungo denominado PC-7S-1-T foi isolado de amostra de solo obtida do bioma de Mata Atlântica do Refúgio Bela Vista (latitude 24° 55' 16" S e longitude 53° 54' 35"W) Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil (coleta autorizada pela Itaipu Binacional). O mesmo foi submetido à identificação morfológica por taxonomistas da Universidade Federal de Pernambuco (Brasil), seguido de identificação molecular por análise da sequência nucleotídica da região ITS do DNA correspondente ao rRNA do microrganismo. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Brasil) através da extração do DNA total do fungo, seguido de replicação do amplicon alvo usando oligonucleotídeos específicos. Os amplicons obtidos foram sequenciados pelo serviço de sequenciamento fornecido por HELIXXA (Serviço de Sequenciamento, Brasil) e as sequências obtidas foram analisadas com ferramentas de alinhamento de sequências (Blast-x) de acesso e domínio público (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*). A sequência gerada foi depositada no *GenBank* sob o número de acesso KJ934703.1. Em ambas as análises de identificação taxonômica, o fungo foi classificado como pertencente à linhagem da espécie *Thermomyces lanuginosus*.

O microrganismo foi crescido a 42 °C durante 7 dias em tubos contendo meio sólido BDA (infusão de batata 20%, dextrose 1,5% e ágar 1,5%) e posteriormente foram armazenados sob refrigeração a 4 °C com repiques periódicas a cada 30 dias.

### 2.2. Preparo dos resíduos da agroindústria e biomassa vegetal

As fontes de carbono testadas nos ensaios para crescimento do fungo e indução da atividade enzimática para  $\beta$ -Xilosidase foram selecionadas: palha de milho, cascas de laranja, banana e maracujá. Os resíduos/biomassa vegetal foram previamente secos em estufa a 70 °C, por 24 horas, seguido de trituração (moinho de facas SL30 tipo Willey) com a utilização da peneira de 20 *mesh*, e posteriormente os resíduos foram armazenados em frascos de vidro à temperatura ambiente.

### 2.3. Condições de cultivo do *T. lanuginosus*

Os conídeos do fungo recém-crescido foram submetidos à preparação de suspensão ( $1 \times 10^5$  conídeos  $\text{mL}^{-1}$ ) em água destilada estéril e inoculados em 25 ml de meio mineral ( $\text{NaNO}_3$  0,3 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g;  $\text{KCl}$  0,05 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 g; caseína 0,1 mg em pH 6.0) e suplementados com 1% (p/v) das diferentes fontes de carbono selecionadas. Os cultivos SMF (Fermentação Submersa) foram realizados de duas formas: líquido estacionário e líquido agitado (150 rpm) a 42 °C por 7 dias em duplicata biológica. A fonte de carbono que foi mais eficiente em induzir a atividade enzimática passou a ser explorada nos ensaios do delineamento experimental.

O acompanhamento da produção enzimática foi realizado por obtenção de células miceliais de *T. lanuginosus* coletados nos dias de ensaio por meio de filtração da cultura a vácuo em papel Whatman estéril. O micélio obtido foi recolhido e congelado, em seguida foi macerado na proporção de 1:1 com 1g de pérolas de vidro e ressuspensão com 5mL de água destilada gelada, centrifugados a 4 °C, 8.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nos ensaios analíticos.

### 2.4. Determinação de biomassa celular

As amostras utilizadas para a determinação de biomassa foram filtradas em papel de filtro (Whatman®) de 5  $\mu\text{m}$ , secos durante 48 h a 105 °C e pesados em balança analítica.

### 2.5. Planejamento experimental

Os melhores parâmetros definidos após crescimento do fungo sob diferentes condições foram aplicadas ao planejamento experimental que se baseou em três fatores, sendo eles: concentração do resíduo como fonte de carbono (palha de milho); temperatura e concentração da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) por 5 dias em cultivo em meio líquido agitado a 150 rpm.

A matriz experimental  $2^3$  foi composta por três pontos centrais e seis pontos axiais, onde os dois níveis combinados com três fatores totalizaram 17 ensaios. Selecionou-se a combinação de 0,25g de palha de milho com 0,0525 g de extrato de levedura como ponto central, pois esta foi a melhor condição definida para a atividade de  $\beta$ -Xilosidase intracelular nos ensaios realizados preliminarmente. Em seguida, os valores foram adicionados ao ponto central do delineamento e a influência da temperatura também foi combinada nos ensaios na faixa de 23 a 46 °C (Tabela 1). A análise estatística foi realizada de modo a obter os efeitos lineares e o modelo foi ajustado de acordo com a Equação 1, para descrever a superfície de resposta.

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i,j=1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 1})$$

**Tabela 1.** Níveis utilizados dos fatores utilizados no DCCR

Variáveis*	-1,68	-1	0	1	+1,68
X1	0,04g (0,2%)	0,125g (0,5%)	0,25g (1%)	0,375g (1,5%)	0,46g (2%)
X2	23 °C	28 °C	35 °C	42 °C	46 °C
X3	0,005g (0,01%)	0,025g (0,05%)	0,0525g (0,2%)	0,0807g (0,3%)	0,1g (0,4%)

\* X1 – Palha de milho; X2 – Temperatura; X3 – Extrato de levedura.

### 2.6. Dosagem da atividade de $\beta$ -Xilosidase e determinação de proteína

A atividade de  $\beta$ -Xilosidase foi determinada utilizando 0,5 ml de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiransídeo (pNPX) na concentração de 10 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6.0 com 0,05 mL do extrato enzimático bruto (com ou sem diluição), que foram incubados por um intervalo de 10 até 60 minutos a 50°C em banho úmido. A reação foi interrompida com solução saturada de tetraborato de sódio. As amostras foram analisadas em leitura em espectrofotômetro a  $\lambda$  410 nm, utilizando-se como padrão uma curva de *p*-nitrofenol de 0 a 0,6  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto de reação. A determinação de proteína foi pelo método de Bradford [24] usando o soro albumina bovino como padrão.

### 2.7. Influência das condições de ensaio na produção de $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus*

Com o crescimento de *T. lanuginosus* nas diferentes condições de ensaios mencionadas, foi possível definir importantes parâmetros a serem considerados no planejamento experimental, bem como: fonte de carbono, tipo de cultivo e melhor tempo para produção de atividade de  $\beta$ -Xilosidase.

### 2.8. Influência do pH e temperatura na atividade da $\beta$ -Xilosidase intracelular de *T. lanuginosus*

A atividade da  $\beta$ -Xilosidase intracelular foi analisada em diferentes condições de pH (Tampão McIlvaine de 5 a 7.5). Para análise do efeito da temperatura a condição de pH ótimo foi mantida, e o extrato bruto contendo a enzima foi incubado nas temperaturas de 50 a 70 °C com variações de 5 graus. As condições definidas de pH e temperatura

ótimos foram fixadas para as análises de termoestabilidade nas 3 melhores condições de temperatura exibida.

### 2.9. Pré-tratamento para extração de hemicelulose da palha de milho

A palha de milho foi tratada em tubos vedados contendo 0,35g de palha de milho *in natura* com 10 mL de água deionizada mantidos em bloco digestor por 1 hora a 200 °C. Em seguida, foram imediatamente colocados em banho de gelo. Após a separação da fase líquida da sólida, a hemicelulose contida na porção líquida foi precipitada com etanol absoluto (3-vezes o volume) por 48 horas. O precipitado obtido foi recuperado por filtração e em seguida seco em estufa a 37 °C por um período de 3 dias.

### 2.10. Hidrólise enzimática e efeito da xilose sobre a $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus*

A  $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus* foi avaliada quanto a sua capacidade de hidrólise em presença da hemicelulose da palha de milho e xilano de beechwood (ambos a 1% - w/v), em tratamentos com e sem pré-hidrólise com extrato bruto contendo elevada atividade de Xilanase extracelular da mesma cepa de *T. lanuginosus* submetida às mesmas condições de crescimento e cultivo. As duas frações enzimáticas, Xilanase extracelular e  $\beta$ -Xilosidase intracelular foram incubadas em duas temperaturas distintas 37 e 50 °C na presença da 1% (p/v) de hemicelulose de palha de milho e 1% (p/v) de xilano de beechwood. No decorrer do processo foram quantificados os açúcares redutores totais pelo método de dosagem de DNS[25] e a retenção da atividade enzimática para  $\beta$ -Xilosidase ao longo do ensaio por dosagem padrão com pNPX. Os açúcares redutores presentes tanto no xilano de beechwood como na hemicelulose de palha de milho foram mensurados antes de iniciar a hidrólise com os extratos supracitados e os valores obtidos foram usados para apresentar resultados normalizados. As amostras que resultaram da sacarificação enzimática foram submetidas à cromatografia de camada delgada para avaliação da conversão em xilo-oligossacarídeos; principalmente de xilose; paralelamente promoveu-se a dosagem de xilose residual na amostra de hemicelulose de 12 horas pelo kit Megazyme<sup>®</sup>. A influência da presença e ausência de xilose na concentração detectada no processo de sacarificação sobre a atividade de  $\beta$ -Xilosidase nas temperaturas testadas na hidrólise, também foi averiguada.

### 2.11. Análise de cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de hidrólise

A análise dos produtos de hidrólise formados a partir da ação sinérgica das enzimas: Xilanase (extracelular) e a  $\beta$ -Xilosidase (extrato bruto intracelular) de *T. lanuginosus* foi realizada por cromatografia ascendente em camada delgada de sílica de 10x10 cm (DC-AlufolienKieselgel 60 sem indicador fluorescente, Merck®). Os produtos de hidrólise foram recolhidos dos ensaios nas duas temperaturas ensaiadas em diferentes tempos e foram submetidos à fervura por 10 minutos e congelados. Aplicou-se 5µL de padrão xilose 2mg/mL (Sigma®) e 4 µL de cada amostra na placa cromatográfica de sílica. A placa foi desenvolvida duas vezes com uma mistura butanol, piridina e água destilada na proporção de 7:3:1 (v/v/v). A revelação dos produtos de hidrólise foi realizada utilizando uma solução de 0.3% de orcinol (p/v) em metanol e ácido sulfúrico na proporção de 9:1. Posteriormente, a placa foi colocada em estufa a 100 °C até o aparecimento das bandas correspondentes aos produtos da degradação dos xilooligossacarídeos gerados.

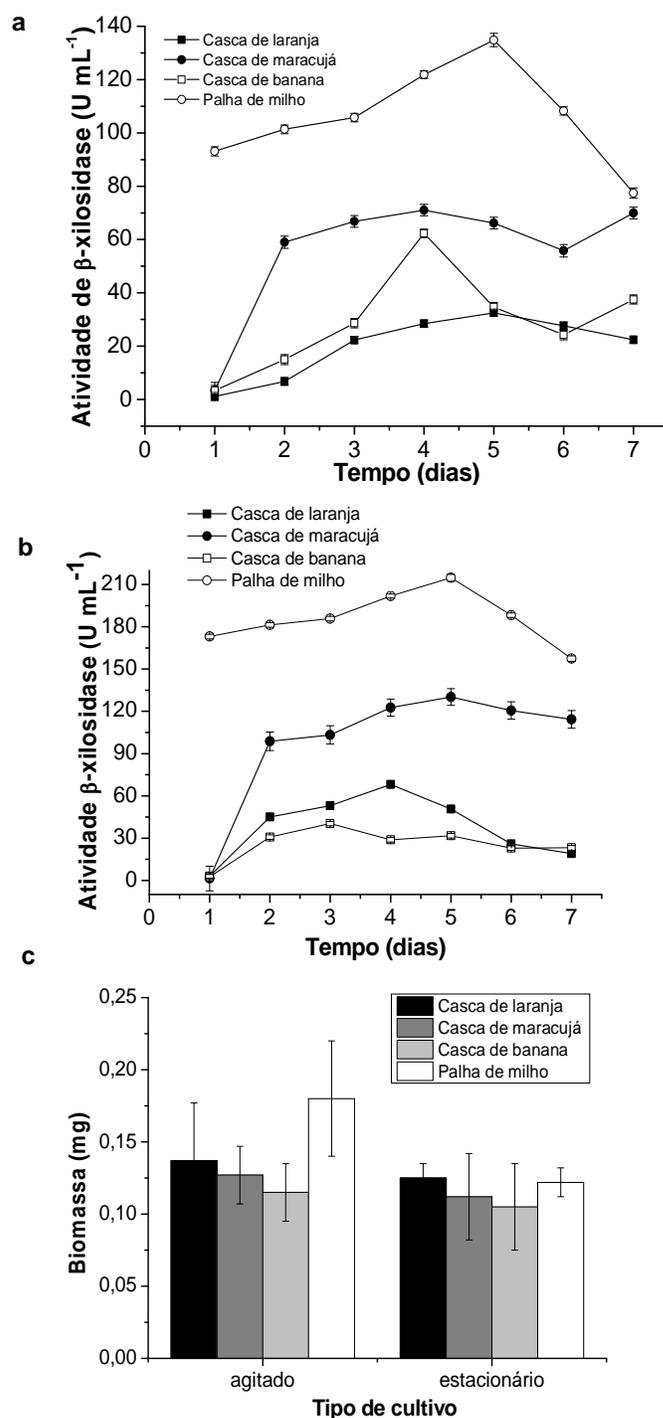
## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Produção enzimática de $\beta$ -Xilosidase por *T. lanuginosus* em diferentes fontes de carbono

O fungo *T. lanuginosus* foi crescido em diferentes condições (tipo de resíduo, cultivo e tempo de incubação) para que houvesse a determinação das melhores condições para a produção de  $\beta$ -Xilosidase com elevada atividade. O tipo de biomassa vegetal que levou a maior atividade enzimática por *T. lanuginosus* foi a palha de milho 1%, quando comparado com resultados obtidos na presença de cascas de laranja, casca de maracujá e casca de banana. Tanto em cultivo estacionário como em agitado, a palha de milho foi o melhor indutor de  $\beta$ -Xilosidase intracelular, levando a uma produção máxima de 214 U mL<sup>-1</sup> após 5 dias de cultivo sob agitação (Fig. 1a) (Fig. 1b). O cultivo agitado na palha de milho também foi o mais efetivo para a produção de biomassa micelial (Fig. 1c).

O crescimento dos fungos de um modo geral pode ser influenciado pela taxa de aeração nos cultivos, em função da maior disponibilidade de oxigênio durante o crescimento, e isto, de certa forma, pode levar a influenciar positivamente também a produtividade enzimática [13]. Entretanto, diferentes microrganismos se comportam de forma peculiar mediante as condições de crescimento a eles submetidas. Diante disso, é sempre essencial avaliar a combinação de diferentes efeitos exercidos sobre as enzimas de interesse. Diferentes fontes de carbono têm sido empregadas para a avaliação da indução da atividade de hemicelulases em geral em outros isolados de *T. lanuginosus* e,

dentre estes estudos, há destaque para o uso de resíduos derivados do processamento do milho como promissores indutores enzimáticos [2, 13, 14].



**Fig. 1.** (a) Produção enzimática de  $\beta$ -xilosidase intracelular de *T. lanuginosus* durante 7 dias de cultivo em meio mineral suplementado com 1% de diferentes resíduos como fonte de carbono a 42 °C e em condições estacionárias. (b) Produção enzimática de  $\beta$ -xilosidase intracelular de *T. lanuginosus* durante 7 dias em cultivo em meio mineral suplementado com 1% de resíduos/biomassa vegetal como fonte de carbono a 42 °C e agitação de 150 rpm. (c) Avaliação de crescimento fúngico em diferentes fontes de carbono e condições de cultivos.

O resíduo sabugo de milho foi reportado como resíduo complexo na indução de xilanase na linhagem de *T. lanuginosus* DSM 5826 quando comparado ao xilano [13] por induzir uma baixa produção enzimática. Os efeitos de aeração no cultivo também foram primordiais no estudo realizado por Reddy et al. [2], os quais averiguaram a produção de hemicelulases de células de *T. lanuginosus* SSBP crescidas em biorreator. Estes ensaios mostraram uma indução enzimática global de hemicelulases proporcional ao aumento da agitação [2].

Embora haja alguns trabalhos desenvolvidos com *T. lanuginosus* na literatura, o uso de resíduos em processos fermentativos com este fungo filamentoso objetivando a produção enzimática ainda é incipiente. Até o momento foram relatados que o sabugo de milho [13,15], pectina cítrica/polpa de beterraba [3], palha de trigo [11] e farelo de trigo [16] têm potencial aplicabilidade para indução enzimática dos complexos xilanolíticos e hemicelulolíticos. Entretanto, a aplicação de planejamento experimental com esse microrganismo visando a avaliação da indução de  $\beta$ -Xilosidases até então não foi reportado, sendo o presente trabalho o primeiro registro com esta abordagem.

### 3.2 Planejamento experimental

Em decorrência da determinação dos melhores parâmetros para produção enzimática, as melhores condições foram realizadas com o uso do planejamento experimental DCCR como forma de obter mais rendimentos da atividade enzimática. O planejamento foi baseado em três distintos fatores, sendo eles: concentração de fonte de carbono (palha de milho) como fonte de carbono; temperatura e concentração do extrato de levedura (fonte de nitrogênio) por 5 dias em cultivos do tipo SMF sob agitação a 150 rpm.

A matriz experimental  $2^3$  foi composta por três pontos centrais e seis pontos axiais, onde os dois níveis combinados com três fatores totalizaram 17 ensaios. Selecionou-se a combinação de 0,25g de palha de milho com 0,0525 g de extrato de levedura como ponto central, pois esta foi a melhor condição encontrada para a atividade de  $\beta$ -Xilosidase intracelular nos ensaios preliminares realizados (Fig. 1). Diante disso tais valores foram adicionados ao ponto central do delineamento. A influência da temperatura também foi combinada nos ensaios na faixa de 23 a 46 °C, tendo em vista a condição termofílica apresentada pela cepa isolada (Tabela.1).

Na Tabela.2 são apresentados os valores codificados e reais do planejamento realizado com os três pontos centrais e os seis pontos axiais com o total de 17 ensaios

realizados. Os valores de atividade de  $\beta$ -Xilosidase são apresentados individualmente por ensaio acompanhado do erro padrão correspondente.

**Tabela 2.** Matriz do delineamento (DCCR) com valores codificados e reais das variáveis de estudo (concentração de resíduo, temperatura e concentração de extrato de levedura) acompanhado dos valores reais dos ensaios.

Ensaio	Valores codificados			Valores reais				Atividade	
	X1	X2	X3	Palha de milho		Temperatura	Extrato de levedura		$\beta$ -xilosidase
	Níveis			(g)	(%)	°C	(g)	(%)	U ml <sup>-1</sup>
1	-1	-1	-1	0,125	0,5	28	0,025	0,05	237 ±18,30
2	1	-1	-1	0,375	1,5	28	0,025	0,05	263 ±5,00
3	-1	1	-1	0,125	0,5	42	0,025	0,05	554 ±13,52
4	1	1	-1	0,375	1,5	42	0,025	0,05	569 ±19,11
5	-1	-1	1	0,125	0,5	28	0,0807	0,3	279 ±29,54
6	1	-1	1	0,375	1,5	28	0,0807	0,3	281 ±19,13
7	-1	1	1	0,125	0,5	42	0,0807	0,3	529 ±20,55
8	1	1	1	0,375	1,5	42	0,0807	0,3	1386 ±37,11
9	0	0	0	0,25	1	35	0,0525	0,2	1258 ±60,58
10	0	0	0	0,25	1	35	0,0525	0,2	974 ±63,45
11	0	0	0	0,25	1	35	0,0525	0,2	1095 ±82,63
12	-1,68	0	0	0,04	0,2	35	0,0525	0,2	248 ±18,70
13	+1,68	0	0	0,46	2	35	0,0525	0,2	1031 ±96,72
14	0	-1,68	0	0,25	1	23	0,0525	0,2	245 ±16,58
15	0	+1,68	0	0,25	1	46	0,0525	0,2	297 ±6,86
16	0	0	-1,68	0,25	1	35	0,005	0,01	442 ±11,35
17	0	0	+1,68	0,25	1	35	0,1	0,4	940 ±2,29

As estimativas dos efeitos das variáveis avaliadas mostraram-se positivas na presente análise, pois demonstraram que tanto a temperatura, a palha de milho e o extrato de levedura levaram a um aumento na atividade enzimática de 302, 324 e 247 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. As análises das variáveis possibilitaram gerar um modelo matemático de segunda ordem (Equação 2), onde  $pm$  representa palha de milho,  $t$  a temperatura e  $el$  o extrato de levedura.

$$\hat{\beta} = (1107,73 + (162,435pm - 163,005pm^2) + (151,434t - 293,537t^2) + (123,753el - 144,798t^2)) \quad (\text{Eq. 2})$$

O resumo da análise de regressão (ANOVA) foi apresentado em termos significativos a 10% de probabilidade ( $p < 0,10$ ) na Tabela 3. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 0,76 e o teste F mostrou que o modelo é adequado para prever os resultados através de superfície de resposta, confirmando assim o modelo matemático apresentado (equação 2). A figura 2 mostra o comportamento dos dados no delineamento com as três variáveis testadas e mostram a otimização almejada.

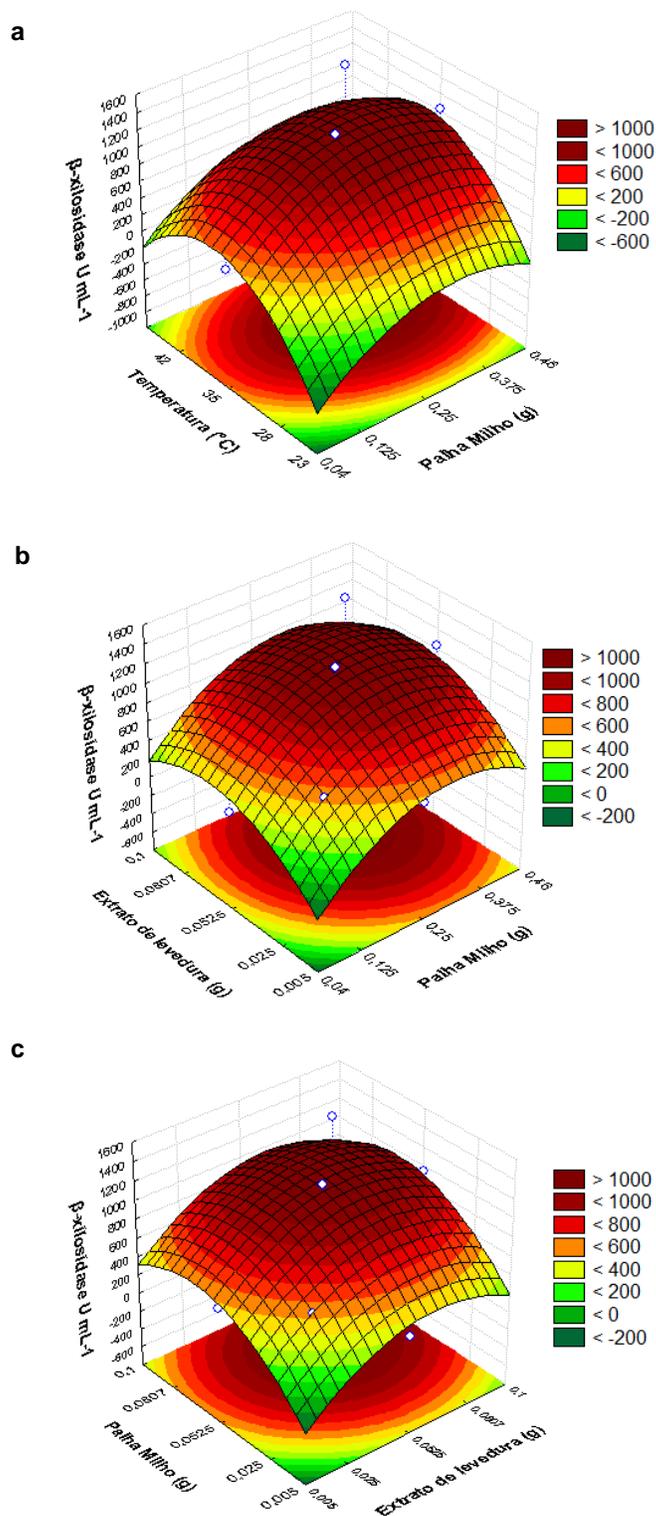
Tabela 3. Resumo da ANOVA que valida o modelo matemático de 2º ordem.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcalc	Ftab
Regressão	1944602	6	324100,33	5,34	2,46
Resíduos	607313	10	60731,3		
<b>Total</b>	<b>2551915</b>	<b>16</b>			

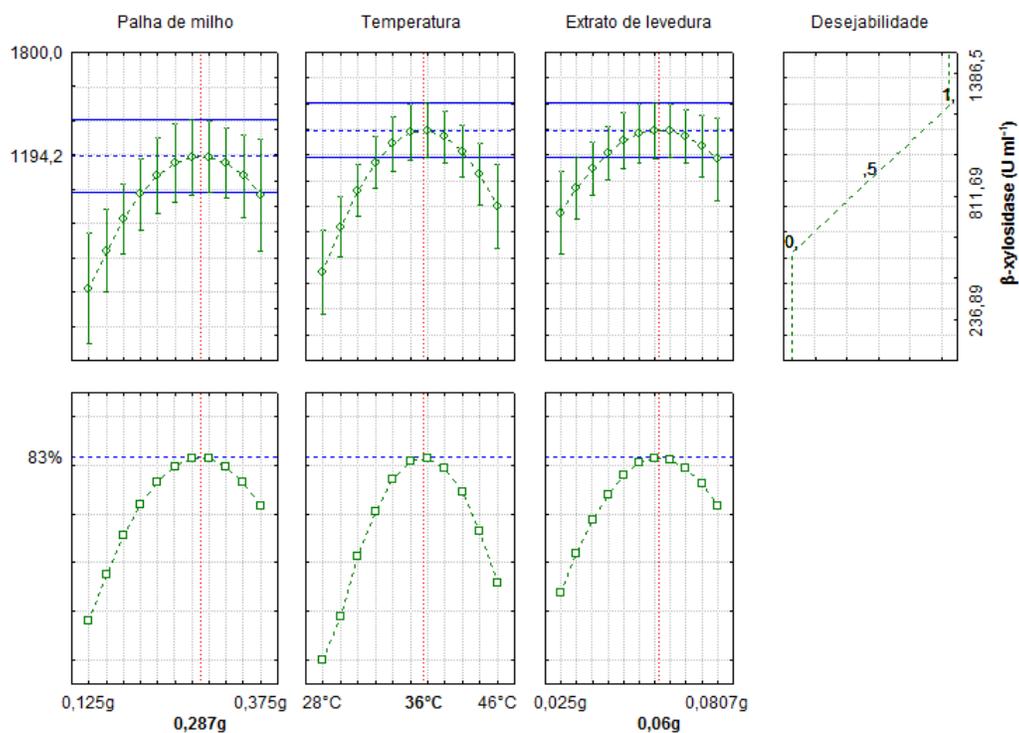
$R^2 = 0,76$ ; p-valor  $< 0,10$

As superfícies de respostas representam o modelo matemático que possibilita verificar a combinação dos três fatores analisados no experimento, a influência de cada um e a atividade máxima da enzima  $\beta$ -Xilosidase. As condições de maior produção de  $\beta$ -Xilosidase são obtidas nas concentrações que estão próximas da condição do ponto central para os três fatores estudados, embora apresente regiões de curvas de contorno que indicam valores um pouco menores do ponto central para as três variáveis e que levam às mesmas respostas.

A otimização das condições que maximizam a produção enzimática de interesse necessita de análise do comportamento individual das respostas para conhecimento das regiões aceitáveis. As condições de desejabilidade (Fig. 3) mostram que a combinação dos fatores para alcançar a melhor produção de  $\beta$ -Xilosidase deve conter 0,287 g (1,15%) de palha de milho com 0,06 g (0,18%) de extrato de levedura a uma temperatura de 36°C. O perfil dos valores preditos e da desejabilidade do modelo apresentaram que é possível obter um máximo de 1194 U mL<sup>-1</sup> da enzima  $\beta$ -Xilosidase com rendimento esperado de 83%.



**Fig. 2.** Superfícies de resposta geradas pela análise de variância para a produção de  $\beta$ -xilosidase em função do (a) temperatura e resíduo de palha de milho, (b) extrato de levedura e palha de milho (c) temperatura e extrato de levedura. A porção mais escura do gráfico mostra concentrações mais elevadas de atividade enzimática.



**Fig. 3.** Condições ótimas e desejáveis para a produção de  $\beta$ -xilosidase.

### 3.2.1. Validação das condições experimentais otimizadas

As condições determinadas na desejabilidade do experimento foram validadas, ensaiando-se 6 repetições com duplicata biológica e com dosagens enzimáticas em duplicata nos extratos obtidos a partir dos micélios. Os cultivos seguiram em meio líquido com agitação (150 rpm) por 5 dias a 36 °C, conforme definições indicadas de desejabilidade (Fig. 3). A obtenção de extrato bruto enzimático intracelular e as dosagens de atividade de  $\beta$ -Xilosidase seguiram protocolo mencionado em Materiais e Métodos. A atividade enzimática obtida no ensaios foi de 1003 U mL<sup>-1</sup> com atividade específica de 1683 U mg<sup>-1</sup>. Considerando que inicialmente os ensaios sem aplicação do planejamento experimental permitiam uma atividade de  $\beta$ -Xilosidase total máxima de 214 U mL<sup>-1</sup>, a otimização alcançada foi quase 500% superior a esta, com um aumento real de 4,7 vezes na atividade de  $\beta$ -Xilosidase.

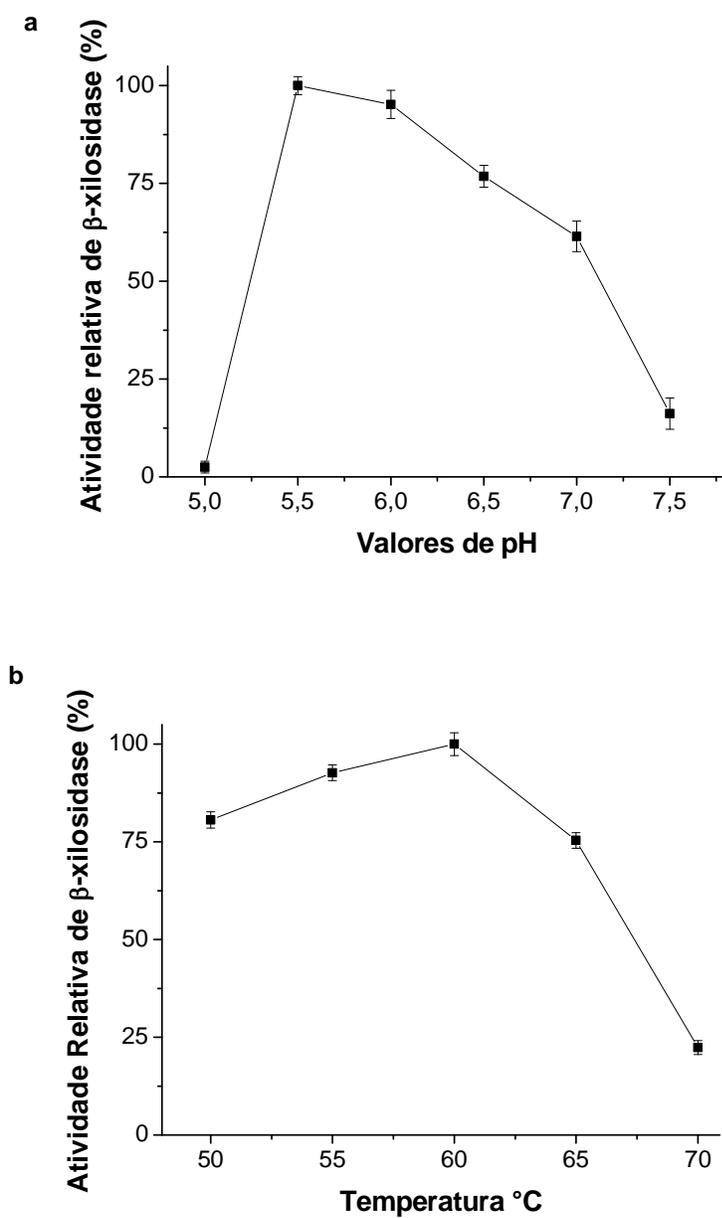
Como mencionado acima, ao processar combinados do experimento no programa estatístico Statistica 7<sup>®</sup>, os dados gerados mostraram que seria possível uma atividade predita máxima de 1194 U mL<sup>-1</sup> e as condições experimentais apontaram para uma produção de 1003 U mL<sup>-1</sup>, ou seja, 84% em relação ao predito em condições reais. Neste estudo, a necessidade de planejamento nos experimentos para determinar melhores condições de indução enzimática foi fortemente evidenciada. Dentre as grandes vantagens

da aplicação da abordagem matemática para obtenção de elevadas atividades enzimáticas, vale destacar os aspectos econômicos laboratoriais, pois o número de ensaios executados para se alcançar o estado ótimo é evidentemente menor, além, é claro, da eficiência, pois um menor tempo é empregado para a determinação de parâmetros e ainda o uso reduzido de componentes necessários nos cultivos. O presente trabalho indicou um resíduo pouco explorado e amplamente produzido em abundância nos continentes Americanos, a palha de milho, como sendo o melhor indutor de  $\beta$ -Xilosidase intracelular de *T. lanuginosus*.

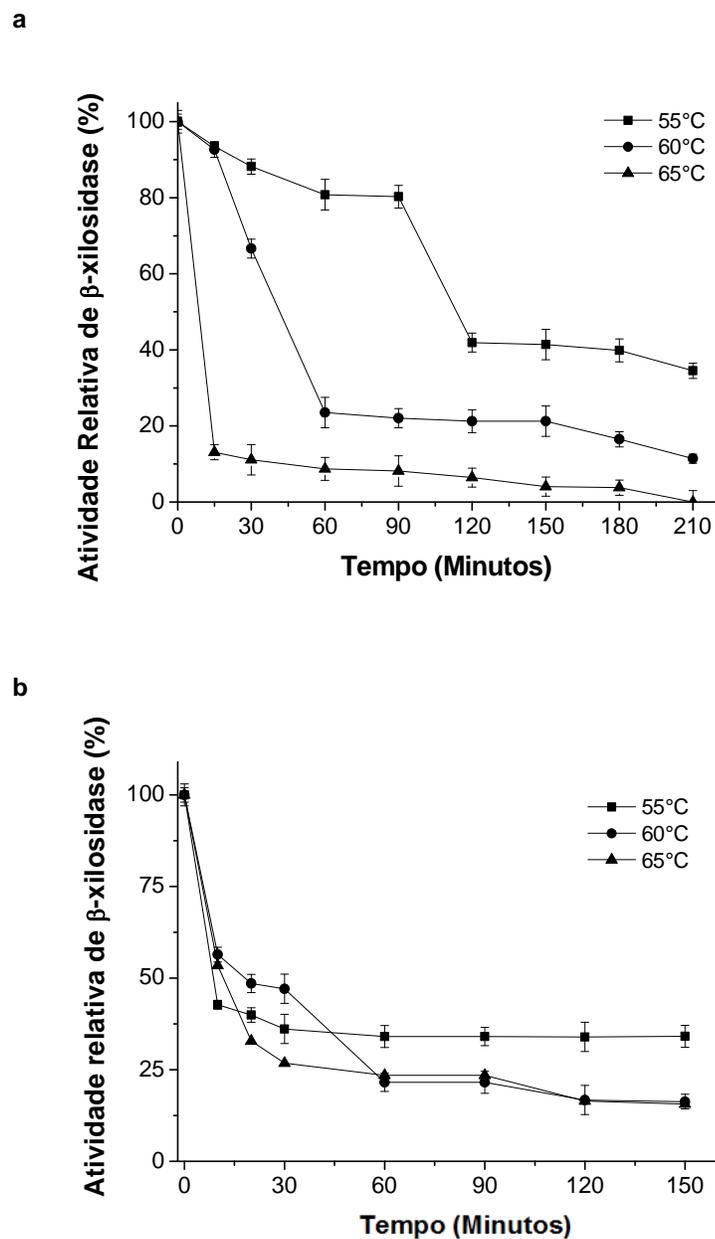
### 3.3 Caracterização parcial de extrato bruto para atividade $\beta$ -xilosidásica

O extrato bruto enzimático foi submetido a uma caracterização parcial para melhor conhecimento do perfil apresentado pela enzima. As condições ensaiadas em diferentes tampões McILvaine indicaram que o melhor pH corresponde a 5,5 (Fig. 4.a) e a temperatura de 60 °C (Fig. 4.b). No estudo de Lenartovicz et al. [15], o fungo *Aspergillus fumigatus* mostrou pH ótimo de 5,4 e temperatura ótima de 70 °C. O *Lactobacillus brevis* NCDC01 crescido em farelo de trigo a 1% revelou possuir pH e temperatura ótimos em 6.0 e 40 °C [17]. No trabalho desenvolvido por Jordan e colaboradores com a bactéria *Selenomonas ruminantium* GA192, resultados indicaram uma  $\beta$ -Xilosidase com característica de pH ótimo de 5,3 e temperatura de 25 °C [17]. Já em *Alicyclobacillus acidocaldarius*, as melhores condições ensaiadas revelaram pH 5,5 e 50 °C [19]. Todos estes dados sugerem a versatilidade e a heterogeneidade das características bioquímicas das  $\beta$ -Xilosidasas em microrganismos pró e eucarióticos.

A  $\beta$ -Xilosidase intracelular de *T. lanuginosus* apresentou melhor termoestabilidade em temperatura de 55 °C em condições fisiológicas de pH (pH 7) (Fig. 5a), mantendo 80% da atividade em 90 minutos de ensaios. Entretanto, a termoestabilidade da  $\beta$ -Xilosidase exibida em pH ótimo mostrou baixo desempenho, pois após 30 minutos houve um expressivo decréscimo na atividade enzimática, que se manteve posteriormente estável na maior parte do tempo ensaiado nas três temperaturas observadas (Fig. 5b).



**Fig. 4.** (a) Efeito do pH sobre a atividade  $\beta$ -xilosidase intracelular de *T. lanuginosus*, incubado em solução tampão McIlvaine pH 5.0 a 7.5 e com dosagem padrão com pNPX. (b) Efeito da temperatura sobre a atividade  $\beta$ -xilosidase intracelular de *T. lanuginosus*, incubado em solução tampão McIlvaine pH 5.5 por 10 minutos nas temperaturas de 50° C a 70 °C e com dosagem padrão com pNPX.



**Fig. 5.** Perfil de estabilidade da atividade da  $\beta$ -xilosidase intracelular de *T. lanuginosus*. (a) Termoestabilidade exibida nas três melhores temperaturas 55, 60° C e 65 °C ao longo de 210 minutos de ensaio. (b) Estabilidade no pH 5.5 exibida nas temperaturas de 55° C, 60° C e 65° C ao longo de 150 minutos de ensaio.

### 3.4 Sacarificação enzimática usando Xilanase e $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus*

A  $\beta$ -Xilosidase aqui estudada foi submetida a um teste de sacarificação enzimática em duas temperaturas 37 e 50 °C com e sem pré-hidrólise com extrato extracelular contendo elevada atividade de Xilanase e ausência de atividade de  $\beta$ -Xilosidase (dados não mostrados) obtido do mesmo isolado fúngico. As enzimas  $\beta$ -Xilosidase bruta intracelular e Xilanase bruta extracelular foram incubadas na mesma quantidade cada uma de 2 U mL<sup>-1</sup> com dois diferentes substratos: 1% xilano de beechwood (p/v) e 1% de hemicelulose de palha de milho (p/v). Na hidrólise, em ambas as temperaturas na presença do substrato xilano de beechwood as enzimas tiveram comportamentos peculiares. Quando individualizada, a xilanase produziu quantidade semelhante de açúcares redutores em ambas as temperaturas e os substratos (tabela 4). Já em sinergia com a Beta-xilosidase, notou-se 3,4x mais produção de açúcares no xilano a 50 °C (tabela 4), o que mostra a importância de combinar as enzimas durante a sacarificação. Porém, na presença de ambos os substratos testados, a  $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus* mostrou ser mais eficiente em promover a sacarificação realizada em ensaios contendo Xilanase previamente adicionado nas duas temperaturas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Produção de açúcares redutores na hidrólise enzimática de ação individual e sinérgica de *beta-xilosidase* e xilanase de *T. lanuginosus*

ENSAIOS	37 °C			50 °C		
	Açúcares redutores g/L			Açúcares redutores g/L		
	Xil*	Xil+ $\beta$ **	$\beta$ ***	Xil	Xil+ $\beta$	$\beta$
<b>Xilano beechwood 1%</b>	0,201	0,29	0,985	0,221	0,76	1,168
<b>Hemicelulose de palha de milho 1%</b>	0,125	0,25	1,007	0,151	0,43	1,923

\*Xil – xilanase; \*\*Xil+ $\beta$  – sinergia de xilanase e *beta-xilosidase*; \*\*\* $\beta$  – *beta-xilosidase*.

Quanto ao rendimento em açúcares redutores gerados relativo à ação individual de  $\beta$ -Xilosidase no ensaio, ficou evidente a elevada capacidade de conversão da enzima, pois na hidrólise a 50 °C a conversão relativa foi 80% superior quando comparada à sacarificação efetuada apenas pela Xilanase na hemicelulose derivada da palha de milho (dados não mostrados). Uma conversão discretamente menor foi verificada usando xilano

como substrato na mesma temperatura, ou seja, a eficiência da  $\beta$ -Xilosidase foi apenas 50% superior a verificada pela ação individualizada da enzima Xilanase. A atividade enzimática de  $\beta$ -Xilosidase foi monitorada durante todo o processo de sacarificação e mostrou uma constância, mantendo cerca de 80% de sua atividade ao longo do tempo de ensaio na presença do substrato hemicelulose de palha de milho (Fig. 6a).

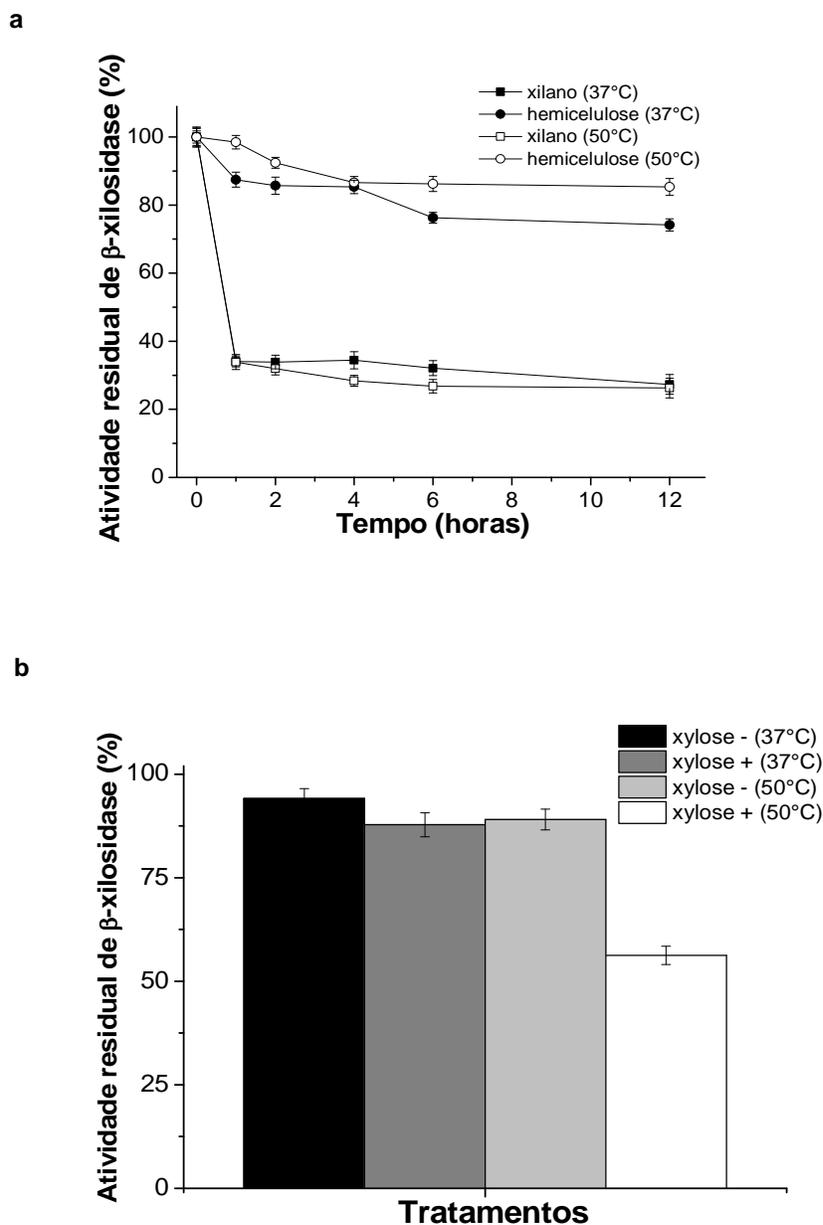
O rendimento da  $\beta$ -Xilosidase frente à conversão dos substratos testados em xilo-oligossacarídeos representados em valores de açúcares redutores totais mostrou a capacidade de gerar 0,29 e 1168 g L<sup>-1</sup> a partir de xilano, e, entre 1007 e 1923 g L<sup>-1</sup> a partir da hemicelulose da palha de milho nas duas condições ensaiadas de 37 e 50 °C, respectivamente. As amostras também foram averiguadas quanto ao teor de xilose produzida conforme método e instruções contidas no *Kit D-xylose Assay* (Megazyme®), que indicou uma produção de 207  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup> de xilose a 37° C e 205  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup> de xilose a 50° C em 24 horas de ensaio. A xilose produzida pode ser visualizada qualitativamente na Fig. 7.

A capacidade sinérgica de hidrolisar xilano (1%, p/v) e bagaço de cana de açúcar (1%, w/v) também foi mensurada no trabalho de Corrêa et al [20], onde foram usadas uma Xilanase fúngica e uma  $\beta$ -Xilosidase bacteriana purificadas, e também detectaram a importante contribuição da  $\beta$ -Xilosidase para o processo de desconstrução da hemicelulose devido a um aumento expressivo na produção de açúcar redutor, em relação ao que havia sido produzido no pré-hidrolizado pela Xilanase. Yang e colaboradores [21] combinaram  $\beta$ -Xilosidase e Xilanase recombinantes purificadas de *Humicola insolens* expressas em *E. coli* em hidrólise de xilano de birchwood e beechwood a 37° C e alcançaram aumentos de sacarificação de 1 e 1,29 vezes superiores, respectivamente, na ação sinérgica das enzimas.

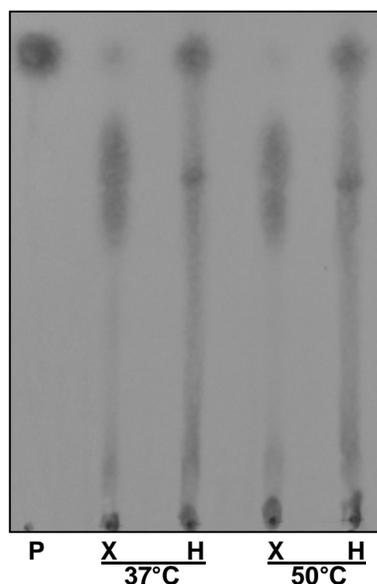
A Xilanase e a  $\beta$ -Xilosidase de *Neurospora crassa* também foram usadas para sacarificação do xilano, e obtiveram 18% de hidrólise pela ação individual da Xilanase, 68% com a combinação de ambas e 48% com suplementação de apenas  $\beta$ -Xilosidase, evidenciando que mesmo individualmente a enzima constitui importante ferramenta de despolimerização de xilo-oligossacarídeos [22].

No presente trabalho, a atividade de  $\beta$ -Xilosidase foi acompanhada ao longo do ensaio e mostrou uma elevada performance junto substrato hemicelulose de palha de milho, onde detectou-se a retenção de cerca de 80% da atividade ao longo do tempo (Fig. 6a) e também na maior parte do ensaio, evidenciando uma estabilidade após decorrido 1 hora após início da sacarificação, o que sugere fortemente que a enzima não esteve sujeita

aos efeitos dos possíveis inibidores enzimáticos frequentemente produzidos durante o processo.



**Fig. 6.** Comportamento da atividade de *beta-xilosidase* durante a sacarificação. (a) Atividade residual exibida pela  *$\beta$ -xilosidase* intracelular de *T. lanuginosus* durante a hidrólise de 12 horas em xilano de beechwood (1%, w/v) e hemicelulose de palha de milho (1%, w/v) a 37° C e a 50° C. (b) Atividade residual exibida pela  *$\beta$ -xilosidase* de *T. lanuginosus* em presença e ausência de xilose 200 mM nos tempos de 12 e 24 horas nas temperaturas de 37 e 50 °C.



**Fig. 7.** Análise da cromatografia de camada delgada. TLC dos produtos da hidrólise de  $\beta$ -xilosidase de *T. lanuginosus* obtidos em 12 horas em xilano de beechwood (1%, w/v) e hemicelulose de palha de milho (1%, w/v) nas temperaturas de 37° C e 50 °C. P (padrão de xilose); X (xilano de beechwood 1%, w/v); H (hemicelulose de palha de milho 1%, w/v).

Determinando como parâmetros os níveis de xilose detectados durante a sacarificação da hemicelulose da palha de milho com a  $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus*, foi realizado um ensaio para verificar o comportamento de atividade enzimática na ausência e na presença de até 200mM de xilose sem a presença de outro substrato, em ambas temperaturas usadas na hidrólise (37 e 50° C) por 12 horas. Neste experimento foi possível analisar que a 37 °C a atividade de  $\beta$ -Xilosidase se manteve em cerca de 85% da inicial; já em 50 °C, a enzima permaneceu com um pouco mais de 56% de atividade, quando comparados a enzima com ausência total de xilose (Fig. 6b). É importante salientar que em condições reais de ensaio de sacarificação os produtos de hidrólise de  $\beta$ -Xilosidase são liberados gradualmente no meio reacional a partir do substrato natural, seja ele o xilano ou a hemicelulose de palha de milho. Porém quando se busca verificar a inibição pelo produto final da hidrólise da  $\beta$ -Xilosidase, no caso a própria xilose, o composto é adicionado na presença da enzima de forma súbita, o que justifica uma maior inibição pelo produto, super-estimando o que de fato acontece em um processo de sacarificação (Fig. 6a). Porém, de um modo geral, os dados aqui apresentados indicam fortemente que a  $\beta$ -Xilosidase de *T. lanuginosus* pode ser empregada de forma satisfatória

para a sacarificação da hemicelulose derivada da palha de milho, um resíduo amplamente produzido em abundância nos continentes Americanos, fornecendo assim uma alternativa interessante para ensaios futuros para produção de energia que dependa da conversão da biomassa vegetal. Assim, estratégias de sucesso para a produção de hemicelulases com características biotecnológicas vantajosas não dependem apenas da seleção de novos microrganismos, mas também de melhorar as estratégias experimentais que levem o aproveitamento máximo do seu potencial [23].

#### 4. Conclusão

O presente estudo demonstra o potencial do uso da palha de milho como substrato para obtenção de elevados índices de  $\beta$ -Xilosidase intracelular ( $1.003 \text{ U mL}^{-1}/1.683 \text{ U mg}^{-1}$ .) em *T. lanuginosus*. Este abundante resíduo agroindustrial representa uma biomassa de fácil acesso e pode levar a reduções significativas nos custos para produção de enzimas quando utilizado como fonte de carbono. Embora seja amplamente usado para compor a alimentação animal é subutilizado para fins biotecnológicos, levando a seu acúmulo no ambiente. Neste trabalho, foi testado as melhores condições para a produção de  $\beta$ -Xilosidase usando experimentação planejada mostrando um aumento de quase 500% ou 4,7 vezes em termos de rendimento enzimático. Os resultados deste trabalho apontam para uma perspectiva real para o uso da palha de milho não só para produção enzimática, mas também para processos que envolvem a sacarificação da hemicelulose. Estudos adicionais ainda serão necessários e estão sendo conduzidos visando sua aplicação na produção de biocombustíveis.

#### Referências

- [1] Juturu V, Wu JC. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2013;88: 353–363. doi: 10.1002/jctb.3969.
- [2] Reddy V, ReddyP, Pillay B, Singh S. Effect of aeration on the production of hemicellulases by *T. lanuginosus* SSBP in a 30 l bioreactor. Process Biochemistry 2002; 37 (11) : 1221-28. doi: 10.1016/S0032-9592 (02) 00004-3.
- [3] Puchart V, Katapodis P, Biely P, Kremnický L, Christakopoulos P, Vršanská M, Kekos D, Macris BJ, Bhat MK. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by

the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 1999;24 (5–6): 355-361. doi: 10.1016/S0141-0229 (98) 00132-X.

[4] Purkarthofer H, Sinner M, Steiner W. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme and Microbial Technology* 1993;15 (8) : 677-682. Doi: 10.1016/0141-0229 (93) 90068-D.

[5] Purkarthofer H, Steiner W. Induction of endo- $\beta$ -xylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 1995;17 (2) : 114-118. doi: 10.1016/0141-0229 (94) 00039-T.

[6] Cesar T, Mrša V. Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 1996;19 (4) : 289-296. doi: 10.1016/0141-0229 (95) 00248-0.

[7] Li DC, Yang YJ, Peng YL, Shen CY. Purification and characterization of extracellular glucoamylase from the thermophilic *Thermomyces lanuginosus*. *Mycological Research* 1998;102 (5) : 568-572. doi: 10.1017/S0953756297005200.

[8] Nguyen QD, Rezessy-Szabó JM, Claeysens M, Stals I, Hoschke Á. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology* 2002;31 (3) : 345-352. doi: 10.1016/S0141-0229 (02) 00128-X.

[9] Li XT, Jiang ZQ, Li LT, Yang SQ, Feng WY, Fan JY, Kusakabe I. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresource Technology* 2005;96 (12) : 1370-1379. doi: 10.1016/j.biortech.2004.11.006.

[10] Puchart V, Biely P. Simultaneous production of endo- $\beta$ -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Biotechnology* 2008;137 (1–4) : 34-43. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.07.1789.

- [11] Bokhari SAI, Rajoka MI, Javaid A, Shafiq-ur-Rehman, Ishtiaq-ur-Rehman, Latif F. Novel thermodynamics of xylanase formation by a 2-deoxy-d-glucose resistant mutant of *Thermomyces lanuginosus* and its xylanase potential for biobleachability. *Bioresource Technology* 2010;101 (8) : 2800-2808. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.072.
- [12] Schneider V E, Peresin D, Trentin AC, Bortolin TA, Sambuichi, RHR. Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas 2012. Relatório de pesquisa In.: <http://www.ipea.gov.br>.
- [13] Singh S, MadlalaAM, Prior B A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews* 2003;27 (1) : 3–16. doi: 10.1016/S0168-6445 (03) 00018-4.
- [14] Bennett NA, Ryan J, Biely P, Vrsanska M, Kremnický L, Macris BJ, Kekos D, Christakopoulos P, Katapodis P, Claeysens M, Nerinckx W, Ntauma P, Bhat MK. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882. *Carbohydrate Research* 1998;306 (3) : 445-455. doi: 10.1016/S0008-6215 (97) 10076-3.
- [15] Lenartovicz V, Souza CGM, Moreira FG, Peralta RM. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable  $\beta$ -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry* 2003;38 (12) : 1775-80. Doi: 10.1016/S0032-9592 (02) 00261-3.
- [16] Hoq MM, Hempel C, DeckwerWD. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation, aeration, and medium components on production. *Journal of Biotechnology* 1994;37 (1) : 49-58. doi: 10.1016/0168-1656 (94) 90202-X.
- [17] LasradoLD, Gudipati M. Purification and characterization of  $\beta$ -d-xylosidase from *Lactobacillus brevis* grown on xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* 2013;92 (2) : 1978-83. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.081.

[18] Jordan DB, Li XL, Dunlap CA, Whitehead TR, Cotta MA.  $\beta$ -xylosidase for conversion of plant cell wall carbohydrates to simple sugars. 2009; US Patent 20090280541.

[19] Thompson DN, Thompson VS, Schaller KD, Apel WA, Reed DW, Lacey JA. Thermal and acid tolerant  $\beta$ -xylosidases, genes encoding, related organisms, and methods. 2009; US Patent 20090226978.

[20] Corrêa JM, Graciano L, Abrahão J, Loth EA, Gandra RF, Kadowaki MK, Henn C, Simão R C. Expression and characterization of a GH39  $\beta$ -xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168 (8) : 2218-29.

doi: 10.1007/s12010-012-9931-1

[21] Yang X, Shi P, Huang H, Luo H, Wang Y, Zhang W, Yao B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. *Food Chemistry* 2014;148 (1) : 381-387. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.062.

[22] Deshpande V, Lachke A, Mishra C, Keskar S, Rao, M. Mode of action and properties of xylanase and  $\beta$ -Xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1986;28: 1832–37. doi: 10.1002/bit.260281210.

[23] Delabona P S, Pirota, R D P B, Codima C A, Tremacoldi C, Rodrigues A, Farinas C S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*; 2012; 37: 243-250. doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.006.

[24] 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* 1976; 72: 248-254. doi:10.1016/0003-2697 (76) 90527-3.