

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EXPRESSÃO DO GENE *xynB5* QUE CODIFICA UMA β -XILOSIDASE
MULTIFUNCIONAL de *Caulobacter crescentus***

PRISCILA INNOCENTI JUSTO

**CAMPUS DE CASCAVEL – PR
2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EXPRESSÃO DO GENE *xynB5* QUE CODIFICA UMA β -XILOSIDASE
MULTIFUNCIONAL de *Caulobacter crescentus***

PRISCILA INNOCENTI JUSTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa em Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Garcia Simão

**CAMPUS DE CASCAVEL – PR
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

J97e Justo, Priscila Innocenti
Expressão do gene xynB5 que codifica uma β -Xilosidase multifuncional de *Caulobacter crescentus*. / Priscila Innocenti Justo.— Cascavel, 2014.
84 p.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Garcia Simão

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2014
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas

1. *Caulobacter crescentus*. 2. Resíduos agroindustriais. 3. β -xilosidase. 4. β -Glicosidase. 5. Clonagem e expressão. 6. Biotecnologia. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 660.6

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9^a/965

PRISCILA INNOCENTI JUSTO

**EXPRESSÃO DO GENE *xynB5* QUE CODIFICA UMA β -XILOSIDASE
MULTIFUNCIONAL de *Caulobacter crescentus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa em Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde, apresentada à seguinte banca examinadora:

Membros titulares:

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Garcia Simão

Centro de Ciências Médicas Farmacêuticas, UNIOESTE – Cascavel, PR

Membro externo:

Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Paiva Alegre Maller

Pós-Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biociências – Cascavel, PR

Membro interno:

Prof. Dr. Alexandre Maller

Centro de Ciências Médicas Farmacêuticas, UNIOESTE – Cascavel, PR

Membros suplentes:

Membro externo:

Prof.^a Dr.^a Cristina Giatti Marques de Souza

Departamento de Bioquímica, UEM – Maringá, PR

Membro interno:

Prof. Dr. José Luís da Conceição Silva

Centro de Ciências Médicas Farmacêuticas, UNIOESTE – Cascavel, PR

CAMPUS DE CASCAVEL - PR

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA EM 04 DE DEZEMBRO DE 2014.



PROFA. DRA. Rita de Cássia Garcia Simão
PCF-UNIOESTE (ORIENTADORA)



PROF. DR. ALEXANDRE MALLER
TITULAR INTERNO (UNIOESTE)



PROFA. DRA. ANA CLAUDIA PAIVA ALEGRE MALLER
TITULAR EXTERNO (PÓS-DOCTORANDA, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE, UNIOESTE)



PROF. DR. EDUARDO BORGES DE MELO
COORDENADOR – PCF-UNIOESTE

BIOGRAFIA RESUMIDA

Priscila Innocenti Justo, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida no dia 10 de julho de 1983. Formou-se em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, em julho de 2008. Ingressou no programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas na UNIOESTE (*campus* de Cascavel, PR) no Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, para desenvolver projeto experimental na linha de pesquisa **Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde**, orientada pela docente permanente do programa Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Garcia Simão. Trabalha na área de Análises Clínicas no Laboratório Alvaro de Cascavel.

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos".

(Isaac Newton)

Dedico este trabalho aos meus pais Sonia e Francisco, com quem aprendi muito sobre a vida, as minhas irmãs Raquel e Larissa, e a minha sobrinha Gabriella.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela “vida” e pela oportunidade de crescimento espiritual concedida a mim e a todos os companheiros de jornada que pude conviver até hoje.

Aos meus pais Sonia e Francisco, eles são fundamentais em tudo na minha vida e atuam como alicerces para minha caminhada. São exemplos de luta, dedicação, caráter e afeto. Só cheguei onde estou por causa dos seus ensinamentos.

As minhas irmãs Raquel e Larissa, e a minha sobrinha Gabriella, por tudo que pude passar ao lado delas e pela paciência em suportar este momento de tão grande importância para mim. Agradeço pela compreensão e apoios incondicionais.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rita, pela amizade, confiança, dedicação, exemplo, ensinamentos e mais do que tudo pela paciência. Muito obrigado pela magnífica orientação e por confiar em minha capacidade!!!

A todos os professores da Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas e em especial a Prof^a. Dr^a. Marina e Prof. Dr. José Luis, pelos conhecimentos disponibilizados ausentes de qualquer tipo de cobrança.

Aos meus colegas de mestrado, Érika, Jucelaine, João Ricardo, Nyéssia, Cleber, Giovane, Carla, Sérgio, Renan e Eduardo, que passaram por esta etapa de dois anos comigo, nossa primeira turma foi ótima.

Aos meus amigos de pesquisa, em especial aos do Laboratório de Biologia Molecular, Juliana, Luciana, Adilson e Elaine, pela convivência amigável, colaboração e momentos de descontração. Ju, sua contribuição foi essencial para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos de trabalho do Laboratório Alvaro, em especial Andréia e Janaína, pelo incentivo e por me ensinar que conhecimento sempre deve ser compartilhado. Ao setor de Externos, Marciane, Luiza, Maria, Douglas, Ivan, Angela, Fabiola, Alan e Claudinei, pela competência em resolver os problemas que apareceram em minha ausência. E em especial ao Neuri e Gabriel por permitir minha ausência para que eu pudesse realizar o meu sonho.

A todos os meus amigos que fiz ao longo da vida, pela companhia, conversas e apoio que me dedicaram. Principalmente pela compreensão dos momentos de ausência.

Agradeço também aos membros da banca de avaliação desta dissertação, Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Garcia Simão, Prof. Dr. Alexandre Maller, Dr^a. Ana Claudia Paiva Alegre Maller, Prof^a. Dr^a. Cristina Giatti Marques de Souza e Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva, pela disponibilidade de avaliar e dar sugestões a este trabalho.

Finalmente, a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho e conclusão do mestrado em Ciências Farmacêuticas.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais.	1
1.2 A importância do emprego da biotecnologia em resíduos agroindustriais	2
1.3 Resíduos agroindustriais: materiais lignocelulósicos	4
1.4 Hemicelulose e Xilano	5
1.5 Hidrólise do xilano e complexo xilanolítico	9
1.6 Classificação das enzimas do complexo xilanolítico	12
1.7 Mecanismos catalíticos das Glicosil Hidrolases (GHs)	13
1.8 β -Glicosidase	14
1.9 β -Xilosidase	17
1.10 Glicosil Hidrolases da Família 3 (GH3)	18
1.11 Aplicações biotecnológicas das enzimas do complexo xilanolítico e glicosidases	18
1.12 O modelo de estudo <i>Caulobacter crescentus</i>	22
1.13 Métodos para expressão de proteínas heterólogas	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos	29
3.2 Meios e Condições de cultivo	32
3.3 Oligonucleotídeos	32
3.4 Extração e Clonagem do gene <i>xynB5</i>	33
3.4.1 Extração do DNA genômico de <i>C. crescentus</i>	33
3.4.2 Reação de amplificação do gene <i>xynB5</i>	33
3.4.3 Visualização e confirmação da amplificação	34
3.4.4 Construção dos vetores e das linhagens bacterianas	35
3.4.4.1 Vetor de clonagem	35
3.4.4.2 Reação de ligação do pJET1.2- <i>xynB5</i>	35
3.4.4.3 Vetor de subclonagem	35
3.4.4.4 Reação de ligação do pTricHisA- <i>xynB5</i>	36
3.4.4.5 Preparo da célula competente de <i>E. coli</i>	37
3.4.5 Transformação das células de <i>E. coli</i> TOP10	37
3.4.6 Seleção dos transformantes	38
3.4.6.1 Mini-preparação de DNA plasmideal (Lise Alcalina)	38

3.4.6.2 Mini-preparação de DNA plasmideal (Invitrogen®)	39
3.4.7 Digestão e confirmação das clonagens	40
3.4.8 Eletroeluição e concentração do DNA genômico para subclonagem	40
3.5 Sequenciamento do clone obtido	41
3.6 Análise da Sequência	41
3.7 Expressão e purificação da proteína recombinante do gene <i>xyB5</i>	42
3.7.1 Ensaio de expressão da proteína recombinante	42
3.7.2 Purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante solúvel	42
3.7.3 Purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante insolúvel	43
3.7.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	44
3.8 Dosagem das proteínas	44
3.9 Determinação da atividade enzimática da β -Glicos./ β -Xilos. V de <i>C. crescentus</i>	45
3.9.1 β -Glicosidase	45
3.9.2 β -Xilosidase	45
3.9.3 α -L-Arabinofuranosidase	46
3.10 Caracterização enzimática da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de <i>C. crescentus</i>	47
3.10.1 Determinação do pH ótimo	47
3.10.2 Determinação da temperatura ótima	47
3.10.3 Constante de Michaelis-Menten (K_m) e vel. máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para pNPG e pNPX	48
3.11 Análise estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Visualização e confirmação da amplificação	49
4.2 Digestão e confirmação das clonagens	49
4.3 Análise das sequências	53
4.4 Ensaio de expressão da proteína recombinante	55
4.5 Purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante solúvel	57
4.6 Purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante insolúvel	59
4.7 Determinação das atividades enzimáticas da proteína purificada	60
4.8 Caracterização enzimática da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de <i>C. crescentus</i>	61
4.8.1 Determinação do pH ótimo	62
4.8.2 Determinação da temperatura ótima	64
4.9 Constante de Michaelis-Menten (K_m) e Vel. máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para pNPG e pNPX	66
5. CONCLUSÕES	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

EXPRESSÃO DO GENE *xynB5* QUE CODIFICA UMA BETA-XILOSIDASE MULTIFUNCIONAL EM *C. crescentus*

RESUMO

A manipulação genética de microrganismos tem propiciado grandes avanços para a produção de enzimas que possam auxiliar na bioconversão da biomassa vegetal a combustíveis e químicos. O principal componente da hemicelulose que compõem a biomassa vegetal é o xilano, e sua degradação depende da ação sinérgica de várias enzimas, das quais Xilanases e β -Xilosidases destacam-se como as principais. A análise do genoma de *Caulobacter crescentus* revelou que esta bactéria apresenta pelo menos oito genes envolvidos com a degradação do xilano, três deles codificam para endo-Xilanases, e cinco codificam para β -Xilosidases. O presente trabalho objetivou a caracterização enzimática de uma destas enzimas, a β -Glicosidase/ β -Xilosidase de *C. crescentus*. Para isto o gene *xynB5* (CCNA 03149) foi clonado em pJET1.2/*blunt* e subclonado no vetor de expressão pTricHisA para a produção de uma proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidinas amino-terminal. A enzima recombinante foi induzida com IPTG na cepa TOP10 de *E. coli* e a proteína foi purificada com o auxílio de colunas pré-empacotadas de níquel-sepharose. A caracterização da enzima pura mostrou um pH ótimo igual a 6 para ambas as atividades enzimáticas e uma temperatura ótima de 50 °C para β -Glicosidase e 60 °C para β -Xilosidase, na presença dos substratos ρ NPG e ρ NPX, respectivamente, embora também tenha ocorrido uma pequena atividade na presença de ρ NPA. A proteína multifuncional teve sua atividade enzimática preponderante para β -Glicosidase (7,6 U mL⁻¹) em relação a atividade de β -Xilosidase (4,3 U mL⁻¹). Além de maior especificidade para ρ NPG ($K_m = 0,24 \pm 0,008$ mM) em relação à obtida para ρ NPX ($K_m = 0,64 \pm 0,032$ mM) embora a $V_{m\acute{a}x}$ para ambos substratos não tenham apresentado diferença significativa nas condições ótimas de cada enzima (ρ NPG = $0,041 \pm 0,001$ μ M min⁻¹ e ρ NPX = $0,055 \pm 0,002$ μ M min⁻¹). Os dados de caracterização confirmaram os sugeridos na anotação genômica para *C. crescentus*. Estas características multifuncionais da proteína são importantes para futuras aplicações biotecnológicas como o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: *Caulobacter crescentus*, resíduos agroindustriais, β -Glicosidase, β -Xilosidase, clonagem e expressão.

EXPRESSION OF THE *xynB5* GENE ENCODING A MULTIFUNCTIONAL BETA-XYLOSIDASE in *C. crescentus*

ABSTRACT

The genetic manipulation of microorganisms has provided great advances in the production of enzymes involved in the bioconversion of biomass to fuels and chemicals. The main component of hemicellulose that compose the plant biomass is xylan, and its degradation dependent on the synergistic action of several enzymes, including xylanases and β -xylosidases stand as the major. The analysis of the genome of *Caulobacter crescentus* showed that this bacterium has at least eight genes encoding enzymes involved in the degradation of xylan, three coding for endo-xylanases and five β -xylosidases. In the present report, the enzymatic characterization of a *C. crescentus* β -glucosidase/ β -xylosidase V was performed. For this purpose the *xynB5* gene (CCNA 03149) was cloned into pJET1.2 /blunt and subcloned into the expression vector pTricHisA for producing a recombinant protein fused to an amino-terminal His-tag. The recombinant enzyme was induced with IPTG in *E. coli* (TOP10 strain) and the protein was purified using pre-packaged nickel-sepharose column. The characterization of the pure enzyme showed an optimum pH of 6 for both enzyme activity and a temperature optimum of 50 ° C to β -glucosidase and 60 ° C to β -xylosidase in the presence of pNPG and pNPX substrates, respectively, while also there has been a small activity in the presence of pNPA. The multifunctional protein had its predominant enzyme activity to β -glucosidase (7.6 U ml⁻¹) and a secondary β -xylosidase activity (4.3 U ml⁻¹). In addition to greater specificity for pNPG ($K_m = 0.24 \pm 0.008$ mM) compared to that obtained for pNPX ($K_m = 0.64 \pm 0.032$ mM) although the V_{max} for both substrates was not statistically significant difference in optimal conditions of each enzyme (pNPG = 0.041 ± 0.001 μ M min⁻¹ and pNPX = 0.055 ± 0.002 μ M min⁻¹). In fact, data to enzymatic characterization corroborated the suggested in genomic annotation to *C. crescentus*. These multifunctional characteristics of the protein are important for biotechnological applications like the future reuse of agroindustrial residues.

Keywords: *Caulobacter crescentus*, agroindustrial residues, β -Glycosidase, β - xylosidase, cloning and expression.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação estrutural entre celulose e hemicelulose.	08
Tabela 2 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.	29
Tabela 3 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.	29
Tabela 4 – Sequência de oligonucleotídeos do gene <i>xynB5</i> .	32
Tabela 5 – Protocolo da reação de amplificação para o gene <i>xynB5</i> .	34
Tabela 6 – Protocolo da reação de digestão para o plasmídeo pTricHisA.	36
Tabela 7 – Protocolo da reação de ligação do plasmídeo pTricHisA- <i>xynB5</i> .	36
Tabela 8 – Sistema de tampão de pH McIlvaine.	47
Tabela 9 – Atividade enzimática da proteína recombinante purificada através de protocolo de purificação de proteínas solúveis na presença de diferentes substratos.	60
Tabela 10 – Atividade enzimática da proteína recombinante purificada através de protocolo de purificação de proteínas insolúveis na presença de diferentes substratos.	61
Tabela 11 – Comparação da sequência da proteína β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de <i>C. crescentus</i> predita a partir da sequência do gene <i>xynB5</i> com β -Xilosidases de outras bactérias.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.	06
Figura 2 – Estrutura da molécula do polissacarídeo xilano mostrando seus principais constituintes monoméricos e os pontos de ação das principais enzimas do complexo xilanolítico.	11
Figura 3 – Mecanismo de ação catalítico para β -Glicosidase por inversão e retenção do carbono anomérico.	15
Figura 4 – O ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i> mostrando duas células filhas, uma com talo e a outra com flagelo, sendo diferentes em estrutura e funções.	23
Figura 5 – Dogma central da Biologia Molecular.	26
Figura 6 – Mapa físico e de restrição do vetor de clonagem pJET1.2/ <i>blunt</i> (Fermentas®).	30
Figura 7 – Mapa físico (A) e de restrição (B) do vetor de expressão pTrcHisA (Invitrogen®).	31
Figura 8 – Gel de eletroforese em agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X mostrando gene <i>xynB5</i> de <i>C. crescentus</i> amplificado por PCR.	49
Figura 9 – Confirmação da clonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com enzima de restrição <i>HindIII</i> .	51
Figura 10 – Confirmação da clonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com as enzimas de restrição <i>EcoRI/HindIII</i> .	51
Figura 11 – Confirmação da subclonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com enzima de restrição <i>HindIII</i> .	52
Figura 12 – Segunda confirmação da subclonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com as enzimas de restrição <i>EcoRI/HindIII</i> .	52
Figura 13 – Estrutura do gene <i>xynB5</i> (CCNA 03149) de <i>C. crescentus</i> obtida após etapas de clonagem.	54
Figura 14 – Ensaio de indução de expressão do gene <i>xynB5</i> de <i>C. crescentus</i> .	56
Figura 15 – Confirmação da expressão e purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V em gel SDS-PAGE 9%.	57
Figura 16 – Gel SDS-PAGE 9% indicando as etapas de indução da expressão do gene <i>xynB5</i> e purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V multifuncional de <i>C. crescentus</i> .	58
Figura 17 – Etapas de purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de <i>C. crescentus</i> a partir de corpos de inclusão.	59

Figura 18 – Efeito do pH na atividade da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante sobre o substrato sintético pNPG e pNPX e determinação do pH ótimo.	63
Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante sobre o substrato sintético pNPG e pNPX e determinação da temperatura ótima.	65
Figura 20 – Representação gráfica das funções lineares ($R^2 = 0,95$) obtidas para a atividade β -Glicosidásica da proteína recombinante na presença de diferentes concentrações do substrato pNPG (0,5-15 mM).	67
Figura 21 – Representação gráfica das funções lineares ($R^2 = 0,98$) obtidas para a atividade β -Xilosidásica da proteína recombinante na presença de diferentes concentrações do substrato pNPX (0,5-15 mM).	67
Figura 22 – Comparação da sequência da proteína β -Xilosidase/ β -Glicosidase V de <i>C. crescentus</i> predita a partir da sequência do gene <i>xynB5</i> com β -Xilosidases de outras bactérias	69
Figura 23 – A proteína predita a partir do gene <i>xynB5</i> sugere que a β -Glicosidase V/ β -Xilosidase de <i>C. crescentus</i> é uma GH3	71

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp^R – Resistente a ampicilina
AX – Arabinoxilanos
BGL – β -Glicosidase
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
C – Carbono
CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
CAZy – *Carbohydrate-Active enZymes Database*
CB15 – Cepa de *Caulobacter crescentus*
CDART – *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool*
CCNA 03149 – Número de acesso do gene *xynB5* na página do NCBI
DMSO – Dimetil sulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DO – Densidade óptica
EC number – *Enzyme Commission number*
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EMBL – *European Molecular Biology Laboratory*
EtBr – Brometo de Etídeo
FOS – Fruto-oligossacarídeos
g – Rotação gravitacional
GAG – Glicosaminoglicano
GAX – Glucuronoarabinoxilano
GOS – Glico-oligossacarídeos
GH – Glicosil Hidrolase
GH3 – Glicosil Hidrolase da Família 3
His tag – Cauda de Histidina
IOS – Isomalto-oligossacarídeos
IMAC – *Immobilized metal-ion affinity chromatography*
IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IPTG – Isopropil- β -D-Galactopiranosídeo
kb – Kilobases
kDa – KiloDaltons
LB – Meio de cultura Luria-Bertani (Bacto-triptona, extrato de levedura e NaCl) para *E.coli*
mA – MiliAmpere
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio
mL – Mililitro
mM – Milimolar
NA1000 – Mutante derivado da cepa CB15 com capacidade conjugativa
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOAc – Acetato de Sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
 PA – Persulfato de Amônia
 pb – Pares de bases
 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
 pH – Potencial Hidrogeniônico
 pJET1.2/blunt – Plasmídeo utilizado como vetor de clonagem
 Primer – Oligonucleotídeo
 SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
 pTrcHisA – Plasmídeo utilizado como vetor de expressão
 PYE – Meio de cultura completo (Peptona e extrato de levedura) para *C. crescentus*
 TAE – Tris Ácido Acético e EDTA
 TE – Tris e EDTA
 TE/RNase – Tris e EDTA mais RNase
 TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
 TOP10 – Linhagem de *Escherichia coli* usada para expressão em vetor pTrcHisA
 tRNA – RNA transportador
 U/mg – Unidades por miligramas
 U/mL – Unidades por mililitro
 UV – Ultravioleta
 V – Volts
xynB5 – Gene de *C. crescentus* que provavelmente codifica para β -Glic./ β -Xil. V
 XOS – Xilo-oligossacarídeos
 ng – Nanogramas
 nm – Nanômetro
 µg – Microgramas
 µg/mL – Microgramas/mililitros
 µL – Microlitro
 µM – Micromolar
 pM/µL – Picomoles por microlitro

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As pesquisas atuais indicam que a exploração indiscriminada dos recursos naturais levará ao seu esgotamento em um curto espaço de tempo, gerando a falta de elementos essenciais para subsistência humana, principalmente os combustíveis fósseis. Neste contexto, a busca por alternativas ao uso do petróleo utilizando recursos renováveis de energia, vem mobilizando internacionalmente setores acadêmicos, industriais, sociais, econômicos e governamentais, com ênfase nos estudos de processos biotecnológicos com menor impacto ambiental (PEREIRA JÚNIOR et al., 2008).

A tendência destes estudos é desenvolver processos biotecnológicos para a produção de bioetanol celulósico ou de segunda geração, que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica como a palha de milho e soja, casca de arroz e laranja, bagaço de cana-de-açúcar, além de resíduos da indústria de celulose, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais (VÁSQUEZ et al., 2007).

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de relevância na inovação tecnológica mundial, exibindo características econômicas e operacionais, que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais (WONG et al., 1988; YOON et al., 2006).

A conversão enzimática de resíduos agroindustriais, que possuem em sua estrutura a celulose e a hemicelulose, tem ganhado destaque. Estes resíduos constituem as mais importantes fontes de biomassa no mundo devido ao baixo custo, sendo encontradas em abundância no Brasil (BON et al., 2008). O principal componente da hemicelulose é o xilano, envolvendo em sua degradação um conjunto de enzimas do complexo xilanolítico, destacando-se as Xilanases (EC 3.2.1.8) e β -Xilosidases (EC 3.2.1.37).

Na natureza existe um grande número de microrganismos que produzem enzimas xilanolíticas. Devido ao imenso potencial destas enzimas, vêm sendo realizadas diversas pesquisas envolvendo-as, visando à redução de impactos ambientais e gerando benefícios econômicos pela sua aplicação em processos industriais (HALTRICH et al., 1996). Porém, para fins industriais, a produção de enzimas precisam ser otimizadas para obter maiores níveis de atividade enzimática.

A Engenharia Genética de Microrganismos tem propiciado grandes avanços para a produção de enzimas que possam auxiliar na conversão da biomassa vegetal em etanol

celulósico. Com isso, o entendimento e o melhoramento das atividades dos microrganismos capazes de degradar a celulose e hemicelulose em moléculas de açúcar e etanol tem assumido um papel essencial nas pesquisas relacionadas ao biocombustível, com o objetivo de reduzir os custos totais da produção (LIU et al., 2006).

Algumas enzimas ainda não caracterizadas envolvidas com o metabolismo de materiais lignocelulósicos são produzidas por *Caulobacter crescentus*, uma bactéria aquática Gram-negativa não patogênica, capaz de sobreviver em ambientes oligotróficos e que mostra um grande potencial para exploração biotecnológica. A análise do genoma de *C. crescentus* (cepa NA1000) revelou que esta bactéria apresenta pelo menos oito genes envolvidos diretamente na degradação do xilano, três deles codificam para enzimas endo-Xilanases, e cinco que codificam para enzimas β -Xilosidases.

Recentemente, dois dos cinco genes que codificam para enzimas β -Xilosidases (EC 3.2.1.55) e (EC 3.2.1.37), *xynB1* e *xynB2*, foram estudados em nosso laboratório, levando a purificação de duas proteínas recombinantes que foram totalmente caracterizadas, tendo uma delas a estrutura tridimensional definida e depositada em banco de dados de domínio público (GRACIANO et al., 2012; CORRÊA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; CORRÊA et al., 2014).

O presente projeto deu continuidade à pesquisa das β -Xilosidases de *C. crescentus* estudando o gene *xynB5* desta bactéria através de abordagens moleculares e caracterizando o seu produto, a enzima β -Glicosidase/ β -Xilosidase (EC 3.2.1.21), para verificar o seu potencial uso biotecnológico.

1.2 A importância do emprego da biotecnologia em resíduos agroindustriais

A população humana produz milhões de toneladas de resíduos agroindustriais anualmente e, na maioria das vezes, são eliminados no meio ambiente sem planejamento, gerando um acúmulo excessivo de materiais orgânicos. Os resíduos agrícolas ou agroindustriais estão entre as maiores fontes de biomassa no mundo e são constituídos em grande parte pelo xilano. Eles geram um considerável prejuízo às atividades econômicas do setor agroindustrial e ao meio ambiente (CANO & PALET, 2007).

Desta forma, estes resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e um potencial poluente, além de representarem perdas de biomassa e nutrientes de alto valor. No passado, os resíduos agroindustriais eram dispostos em aterros sanitários ou empregados

na ração animal ou adubo, sem qualquer tratamento. Atualmente, com os conceitos de sustentabilidade, a recuperação e reaproveitamento de subprodutos e a bioconversão de resíduos, são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG et al., 2003).

No Brasil, as indústrias alimentícias produzem uma grande quantidade de subprodutos, tais como bagaços, farelos, cascas e sementes. Utilizar estes subprodutos como matéria-prima para os bioprocessos torna-se viável devido ao seu baixo custo econômico e sua grande disponibilidade. As pesquisas envolvendo os bioprocessos crescem exponencialmente e o foco da maioria delas é a busca por produtos com um alto valor agregado como, proteínas de alta digestibilidade, enzimas, biofertilizantes, biossurfactantes dentre outros metabólitos microbianos (SOCCOL & VANDENBERGH, 2003; COUTO & SANROMÁN, 2006).

Os estudos indicam que a biomassa vegetal, em função do curto ciclo de reposição e grande abundância é a única fonte natural capaz de fazer frente às demandas presentes e futuras de energia. Além disso, pode ser usada como matéria-prima para uma série de processos, dependentes hoje de fontes não renováveis (PRADE, 1996). Apesar desta informação ter sido relatada há quase 20 anos, ela continua cada vez mais atual.

Mundialmente, as principais linhas de pesquisa para utilização dos resíduos agroindustriais através de processos biotecnológicos são: (1) o enriquecimento protéico, onde microrganismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; (2) e a produção de compostos de alto valor agregado, utilizando matéria-prima de baixo custo, como produção de enzimas, metabólitos secundários, biopesticidas e biocombustíveis (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003).

As estratégias dos microrganismos empregadas para a utilização dos biopolímeros, predominantes em resíduos agroindustriais, ganham espaço devido sua alta especificidade, eficiência, segurança e redução de custos, quando comparados aos métodos físicos e químicos tradicionais (WONG et al., 1988; YOON et al., 2006).

É importante ressaltar que a análise detalhada dos mecanismos moleculares utilizados por bactérias no ataque hidrolítico à parede celular vegetal, revelou que o processo de degradação dos polissacarídeos como o xilano é complexo e ineficiente em condições naturais. É necessário adotar mecanismos genéticos e biotecnológicos adicionais nos microrganismos com o potencial de degradar os compostos vegetais. Através da Engenharia Genética de Microrganismos é possível produzir enzimas com interesse biotecnológico que auxiliam na conversão da biomassa vegetal em etanol celulósico (REIS et al., 2001).

Do total de abastecimento das enzimas industriais no mundo, 60% são produzidas na Europa e os 40% restantes nos Estados Unidos e Japão (DEMAIN, 2000). Estima-se que aproximadamente 20% dos mais de um bilhão de dólares da comercialização de enzimas industriais, consistam em celulasas, hemicelulasas e pectinases (MENEZES et al., 2009).

O desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção de enzimas a um custo competitivo é de grande importância não só para a produção de biocombustíveis, como para aplicações biotecnológicas em setores químicos, farmacêuticos, de alimentos, de bebidas (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxirredutase), ração animal, têxtil (amilase, celulase, pectinase, oxirredutase), papel (lipase, oxirredutase, xilanase), de detergente (celulase, lipase, protease, oxirredutase) e de couro (lipase, protease) (NIELSEN & OXENBOLL, 1998; BHAT, 2000; KIRK et al., 2002).

Os estudos apontam ainda que a bioconversão de resíduos lignocelulósicos tem considerável interesse não somente ambiental, mas também econômico, pela possibilidade de geração de novos subprodutos. Estes resíduos representam uma vasta fonte de material bruto, que podem ser empregados no desenvolvimento de processos que resultem em produtos de alto valor agregado, como açúcares fermentáveis, alimentos, fármacos, enzimas e substâncias de interesse industrial (MENEZES et al., 2009).

As tendências mundiais para os avanços científicos e tecnológicos na área de novos combustíveis destacam a importância da utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima nos processos de produção. A reutilização e reciclagem destes resíduos de base vegetal podem minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e diminuir o uso de combustíveis fósseis, além de resultar em uma melhora no aproveitamento da matéria-prima, que é de grande interesse na atualidade (RABELO, 2007).

Assim, as tecnologias empregadas para transformar biomassa em produtos comercializáveis que gradualmente substituirão os materiais derivados de fontes não renováveis, estão se tornando comercialmente viáveis e a cada dia mais necessárias (COLLINS et al., 2005).

1.3 Resíduos agroindustriais: materiais lignocelulósicos

No reino vegetal, a parede celular desempenha funções importantes de suporte e de formato celular, apresentando uma estrutura rígida na qual as microfibrilas de celulose são elementos arquiteturais principais. A sua volta se encontram ligadas, de forma entrelaçada,

uma matriz complexa composta por hemiceluloses, pectinas, glicoproteínas e substâncias aromáticas com características cerosas (TAIZ & ZEIGER, 2004). A grande complexidade da parede celular vegetal explica porque as reações e mecanismos enzimáticos necessários para a sua desconstrução são complexos.

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes de energia renováveis mais abundantes, compreendendo em sua maioria pelos materiais agroindustriais, sendo a sua recuperação e reaproveitamento importantes e necessários (CASTRO & PEREIRA, 2010).

Os materiais lignocelulósicos incluem madeira, capim, resíduos florestais e agrícolas, apresentando na composição química celulose, hemicelulose e lignina, variando a proporção destes componentes de acordo com a espécie vegetal que o originou (CARVALHO et al., 2009).

1.4 Hemicelulose e Xilano

A celulose é um polissacarídeo de alto peso molecular e o composto mais abundante nos vegetais. É linear, formado por moléculas de glicose com unidades β -1,4-glicosídicas ligadas. As cadeias estão ordenadas formando uma estrutura cristalina fortemente estabilizada por pontes de hidrogênio inter e intramoleculares. Por este motivo a celulose é um polissacarídeo insolúvel à água e com alta resistência a enzimas e agentes químicos (BISARIA & GHOSE, 1981; DERMIBAS, 2008; DODD & CANN, 2009).

A hemicelulose é considerada o segundo polissacarídeo mais abundante nos vegetais. É ramificada e amorfa, podendo ser formada por moléculas de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos (β -D-glucurônico, α -D-4-O-metilglucurônico, α -D-galacturônico) (Figura 1). Já a lignina é um biopolímero aromático, sintetizado a partir de precursores fenilpropanóides (BISARIA & GHOSE, 1981; DERMIBAS, 2008; DODD & CANN, 2009).

As hemiceluloses são definidas como heteropolímeros não amiláceos e não celulósicos, que podem ser extraídos da parede celular dos vegetais superiores (FENGEL & WENEGER, 1989; SJOSTROM, 1993).

São polissacarídeos solúveis em reagentes alcalinos, de baixa massa molecular, apresentando entre 50 e 300 unidades glicosídicas. Representam cerca de 30 a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, correspondendo em torno de 40% do peso seco da biomassa vegetal (COUGHLAN et al., 1993; UFFEN, 1997; FERREIRA-FILHO, 2004).

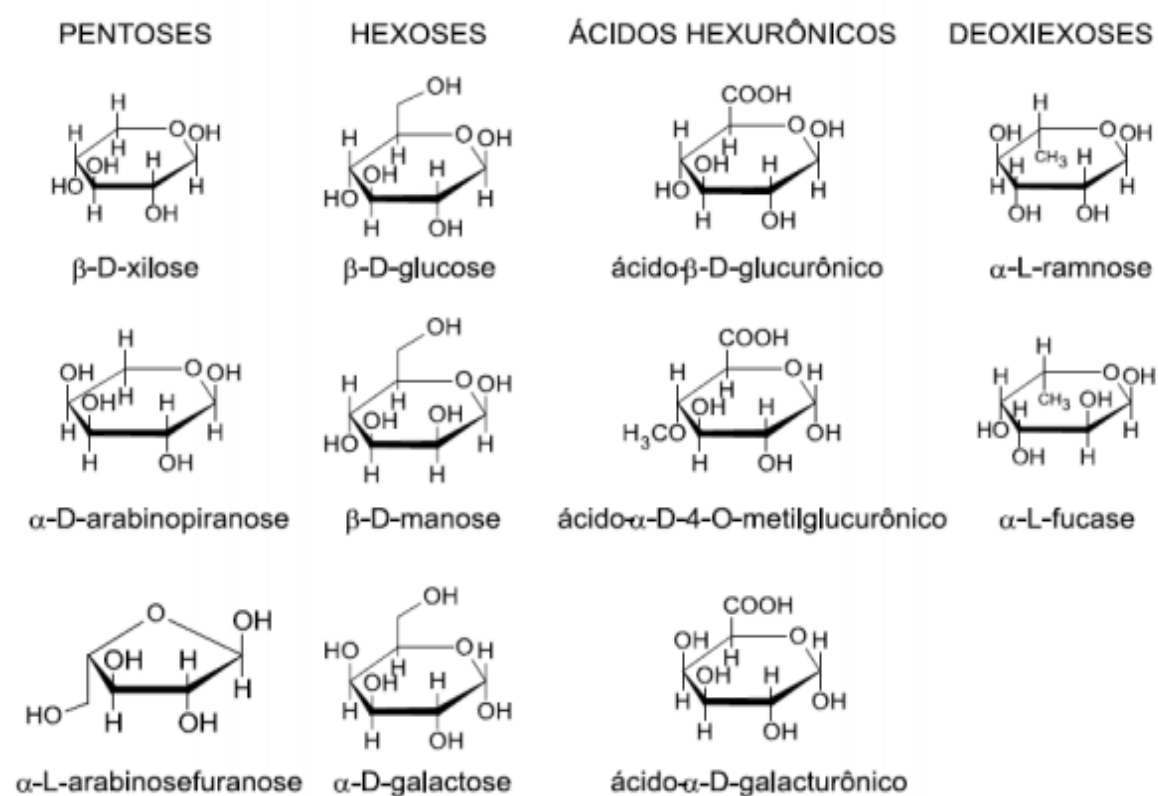


Figura 1 – Estrutura química dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (modificado de FENGEL & WENEGER, 1989).

As cadeias principais da hemicelulose podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como é o caso dos xilanos (xilose), ou por duas ou mais unidades, como os glucomananos (glicose e manose). Desta forma, as hemiceluloses são classificadas de acordo com os resíduos de açúcares presentes em sua molécula como: D-xilano, L-arabinano, D-galactano, manano, galactoglucomanano, arabinoxilano, arabinogalactano, glucano e xiloglucano. E estão frequentemente associadas aos polissacarídeos pécticos, porém esses últimos não incluídos no grupo das hemiceluloses (COLLINS et al., 2005; DELGADO et al., 2006). As principais diferenças entre a celulose e a hemicelulose estão apresentadas na Tabela 1, de acordo com Zhang e Lynd (2004) e Bon et al. (2008).

A variedade de ligações químicas e ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribuem para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas distintas conformações (JACOBSEN & WYMAN, 2000).

Dentre as hemiceluloses, a maior classe é a dos xilano, que depois da celulose é o polissacarídeo mais abundante na madeira e nos resíduos agrícolas e agroindustriais (PRADE, 1996). Como os demais polissacarídeos de origem vegetal, o xilano apresenta grande variabilidade química e molecular, variando de espécie para espécie, o que está relacionado à suas funções em cada uma das plantas (EBRINGEROVÁ & HEINZE, 2000). O polissacarídeo xilano tem uma estrutura linear que consiste em resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, podendo ainda apresentar resíduos substituintes como L-arabinofuranosil, acetil, glucuronosil e 4-O-metilglucuronosil (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993; WONG & SADDLER, 1993).

As cadeias laterais do biopolímero determinam a solubilidade, conformação e a reatividade da molécula de xilano e portanto, influenciam grandemente o modo e extensão de sua clivagem enzimática. Assim as ramificações desempenham papéis importantes na hidrólise do xilano, pois muitas vezes podem ocasionar impedimentos estéricos, evitando a formação do complexo enzima-substrato (WONG et al., 1988). Enquanto as hemiceluloses presentes nas madeiras duras são constituídas principalmente de xilanos, nas madeiras macias, são mais comuns os glucomananos (KUMAR et al., 2008). Os xilanos estão presentes na forma parcialmente acetilada em várias plantas, sendo que existem ainda diferenças na acetilação da madeira macia e madeira dura. O xilano de madeira dura é altamente acetilado (70%), enquanto que o xilano de madeira macia não. A solubilidade parcial do xilano em água deve-se principalmente a presença do grupo acetil (KULKARNI et al., 1999).

Tabela 1 – Comparação estrutural entre celulose e hemicelulose.

CELULOSE	HEMICELULOSE
1. Possui natureza homopolissacarídica (unidades de glicose ligadas entre si)	1. Possui natureza heteropolissacarídica (várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si)
2. Alto grau de polimerização (100 a 15.000)	2. Baixo grau de polimerização (50 a 300)
3. Forma arranjo fibroso	3. Não forma arranjo fibroso
4. Apresenta regiões cristalinas e amorfas	4. Apresenta somente regiões amorfas
5. Difícil hidrólise por ácido inorgânico diluído a quente	5. Hidrolisa facilmente em ácido inorgânico diluído a quente
6. Insolúvel em soluções alcalinas (porém solúvel a elevadas temperaturas e/ou concentração) de reagentes	6. Solúvel em soluções alcalinas diluídas
7. Estrutura linear	7. Estrutura ramificada
8. As moléculas de glicose que formam a celulose são unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), um tipo de ligação covalente, resultante da reação de condensação	8. As moléculas de xilose que formam o xilano (principal hemicelulose) são unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), com ramificações de ácido 4-O-metilglucurônico unidos à cadeia principal por ligações α -(1,2)

Dados retirados de Zhang e Lynd (2004) e Bon et al. (2008).

A acetilação ocorre mais frequentemente no O-3 do que no O-2 e quanto maior o grau de acetilação, maior a solubilidade em água (BIELEY, 1985).

A existência de um complexo enzimático, tendo enzimas com funções especializadas é uma estratégia que os microrganismos apresentam para alcançar a total hidrólise deste heteropolissacarídeo, aumentando a disponibilidade do carbono para o seu crescimento e as chances de sobrevivência na natureza (KHENG & OMAR, 2005).

1.5 Hidrólise do xilano e complexo xilanolítico

Na natureza, o xilano é completamente hidrolisado a monossacarídeos pela ação conjunta de diferentes enzimas. A heterogeneidade da estrutura do xilano é responsável pela diversidade de enzimas necessárias para a sua total degradação. Este sistema enzimático é conhecido como complexo xilanolítico e inclui principalmente a β -1,4-D-Xilanase e a β -D-Xilosidase, as quais atuam sobre a cadeia principal do polissacarídeo (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; POLIZELI et al., 2005). Conjuntamente, as enzimas Xilanases e β -Xilosidases hidrolisam os xilo-oligossacarídeos do xilano, gerando moléculas de xilose. A xilose, em substituição a glicose, também pode ser utilizada por microrganismos como fonte de carbono (FINELL et al., 2002).

As endo-Xilanases são as principais enzimas no processo de despolimerização do xilano, hidrolisando ligações glicosídicas internas ao longo de sua cadeia, liberando xilo-oligossacarídeos de vários tamanhos, resultando em um menor grau de polimerização do mesmo. Geralmente os produtos formados pela ação das endo-Xilanases são os xilo-oligossacarídeos maiores, e posteriormente, podem ser liberados a xilotriose e xilobiose. O mecanismo de clivagem do xilano não é ao acaso e o ataque ao substrato depende do seu comprimento e grau de polimerização, bem como da presença de grupos substituintes (WONG et al., 1988; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

As exo- β -D-Xilosidases são enzimas que hidrolisam xilo-oligossacarídeos menores e as xilobioses, liberados pela ação das endo-Xilanases sobre o xilano, produzindo a xilose. A especificidade destas enzimas por pequenos oligossacarídeos de xilose é elevada (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

A capacidade hidrolítica das endo-Xilanases aumenta com o comprimento da cadeia, enquanto que das exo-Xilanases diminui com o comprimento da cadeia, pois hidrolisam xilo-oligossacarídeos em monossacarídeos de xilose (PRADE, 1996). Algumas Xilanases

purificadas são hábeis em hidrolisar xilotriose, mas não arabino-xilotriose, indicando que substituintes α -L-arabinosil protegem as ligações xilosídicas dos xilanos (TAKENISHI & TSUJISAKA, 1975). Todavia, os substituintes podem ter uma função positiva para que as ligações enzima-substrato ocorram, uma vez que muitas Xilanases demonstram preferência em hidrolisar cadeias ramificadas de xilano (FREDERICK et al., 1985).

Outras enzimas que constituem o complexo xilanolítico e são responsáveis por eliminar os resíduos substituintes específicos são α -L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), Acetil-xilano Esterase (EC 3.1.1.72), α -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22), α -D-Glucuronidase (EC 3.2.1.139), Esterase de Ácido Ferúlico (EC 3.1.1.73) e Esterase de Ácido p -Cumárico (EC 3.1.1) (FERREIRA-FILHO, 1994; COLLINS, 2005). São conhecidas como enzimas auxiliares ou desramificantes, atuando em conjunto com as Xilanases e β -Xilosidases no processo de hidrólise do xilano (Figura 2). Podem atuar nas ligações entre um resíduo da cadeia principal e um grupo substituinte, ou podem quebrar ligações entre os grupos substituintes (de VRIES & VISSER, 2001).

Demonstrou-se que Xilanases, β -Xilosidases e α -L-Arabinofuranosidases são as enzimas chaves na hidrólise do arabinoxilano (TUNCER & BALL, 2003; SORENSEN et al., 2007). Os arabinoxilanos (AX) são os principais polissacarídeos não-amiláceos encontrados em muitos grãos de cereais (trigo, sorgo, cevada, arroz, centeio) e fazem parte das dietas ricas em fibras (SAGHIR et al., 2008). Já na cana-de-açúcar, o principal polissacarídeo encontrado são os glucuronoarabinoxilanos (GAX), que possuem cadeia principal de xilose com ramificações de ácido glucurônico e arabinose (BUCKERIDGE et al., 2010).

Segundo Wong et al. (1988), a utilização criteriosa de uma boa mistura de enzimas xilanolíticas pode resultar em reações mais limpas. Primeiro por diminuir a utilização de compostos químicos; e segundo por obter maiores rendimentos, com um menor consumo de energia. Parâmetros estes, vitais para a viabilidade econômica do processo industrial (WONG et al., 1988).

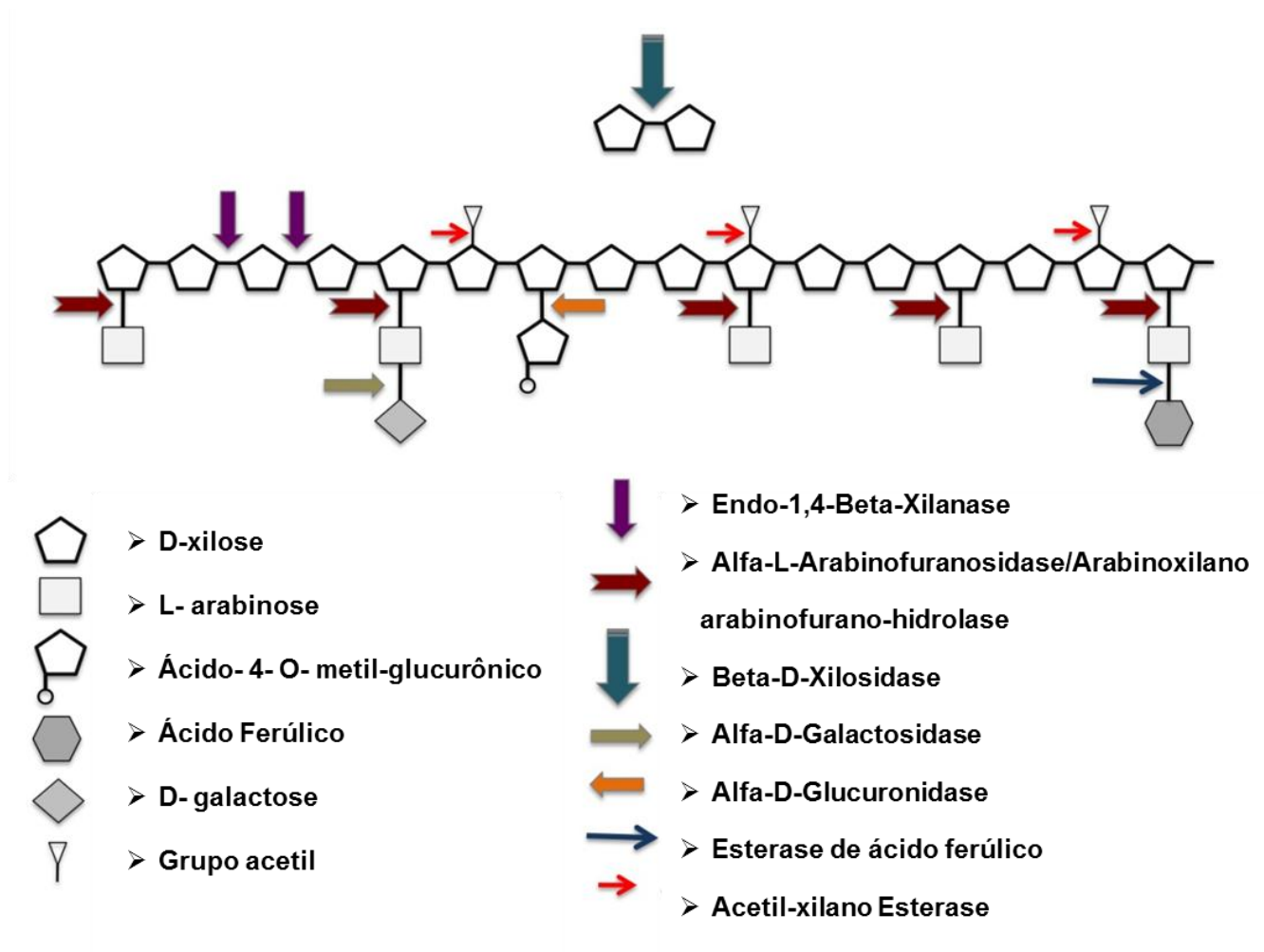


Figura 2 – Estrutura da molécula do polissacarídeo xilano mostrando seus principais constituintes monoméricos e os pontos de ação das principais enzimas do complexo xilanolítico. As endo- β -1,4-Xilanases hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 internas da molécula do xilano e liberam xilo-oligossacarídeos. As exo- β -Xilanases, liberam a xilose a partir da extremidade não-redutora da molécula do xilano. As β -Xilosidases hidrolisam xilo-oligossacarídeos curtos e principalmente xilobiose a monômeros de xilose (modificado de SOUZA, 2013)

1.6 Classificação das enzimas do complexo xilanolítico

As Xilanases e β -Xilosidases envolvidas na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, são definidas pelo CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes Database*) como Glicosil Hidrolases (GHs). As GHs consistem em uma das maiores classes de enzimas com função na degradação dos carboidratos, realizando a hidrólise da ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre uma molécula de carboidrato e uma de não-carboidrato (HENRISSAT et al., 1995; HENRISSAT & DAVIES, 2000). Esta classificação segue critérios baseados pelo substrato, similaridade da sequência de aminoácidos, estrutura tridimensional e no mecanismo de ação (HENRISSAT & DAVIES, 1997).

Quando a classificação dos grupos de enzimas é feita com base na especificidade pelo substrato, critérios estabelecidos pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) devem ser seguidos. Conforme determina a IUBMB, cada enzima recebe um código denominado “EC number” (*Enzyme Commission number*). GHs são representadas pelo código EC 3.2.1.x, onde cada dígito caracteriza o tipo de reação catalisada. O primeiro dígito representa a classe de acordo com o tipo de reação química que catalisa (3 = hidrolases: hidrólise de ligações covalentes); o segundo dígito representa a subclasse que define em qual grupo as enzimas atuam (2 = glicosilases); o terceiro dígito representa a subsubclasse que tem os grupos químicos específicos que participam da reação (1 = S- e O-glicosidase) e o quarto dígito representa o substrato específico, e em alguns casos, também o mecanismo molecular ou tipo de ligação entre as moléculas (HENRISSAT & DAVIES, 1997).

O sistema de classificação baseado na especificidade por substrato é um dos mais simples na categoria das Glicosil Hidrolases. No entanto, este sistema não é muito adequado para enzimas que agem sobre vários substratos, sendo particularmente relevantes para GHs que atuam sobre polissacarídeos complexos presentes na natureza e que exibem ampla especificidade (DAVIES & HENRISSAT, 1995). Desta forma, a classificação de Xilanases e β -Xilosidases por este sistema é limitada, devido à heterogeneidade e complexidade do xilano (COLLINS et al., 2005). Além disso, este sistema não leva em conta as características estruturais das enzimas. Consequentemente, enzimas que agem sobre os substratos similares podem ser incluídas em uma mesma classe, sem que suas características estruturais, modo de ação e relações evolutivas sejam considerados (DAVIES & HENRISSAT, 1995).

O critério de classificação das GHs atualmente empregado foi sugerido por Henrissat em 1991 (HENRISSAT, 1991; COLLINS et al., 2005) e classifica as famílias de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos e sua arquitetura de dobramento. As GHs com

domínios conservados são classificadas dentro de uma mesma família. Assim, quando as sequências de aminoácidos de duas ou mais GHs são alinhadas em um domínio, estas são incluídas em uma mesma categoria (HENRISSAT et al., 1995). Como a estrutura molecular e o mecanismo de ação de uma enzima estão relacionados à sua estrutura primária, esse sistema reflete características estruturais e mecânicas (COLLINS et al., 2005).

Inicialmente esta classificação agrupou as GHs em 35 famílias denominadas famílias de 1 a 35 (HENRISSAT, 1991). No decorrer dos anos, houve um aumento nas sequências de Glicosil Hidrolases depositadas nos bancos de dados (EMBL, GenBank e SWISS-PROT) até a presente data há o reconhecimento de 133 famílias descritas no site CAZy (http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html), o qual é atualizado regularmente.

Através desta classificação é possível agrupar enzimas com diferentes especificidades por substratos e algumas enzimas que hidrolisam o mesmo substrato podem ser encontradas em diferentes famílias. No entanto, as estruturas tridimensionais das proteínas são mais conservadas do que suas sequências de aminoácidos (DAVIES & HENRISSAT, 1995), e por esta razão, a estrutura tridimensional das GHs vem sendo utilizadas para agrupar as famílias em clãs, ou seja, grupos de enzimas que apresentam semelhantes arquiteturas de dobramento. Existem pelo menos 14 clãs de famílias de GHs designados de GH-A até GH-N, sendo maior o GH-A, que agrupa 19 famílias relacionadas (HENRISSAT & DAVIES, 1997; COUTINHO & HENRISSAT, 1999).

1.7 Mecanismos catalíticos das Glicosil Hidrolases (GHs)

Enzimas agrupadas entre as GHs podem atuar clivando a ligação glicosídica por dois mecanismos distintos: por retenção da configuração do carbono anomérico (Figura 3–A) e por inversão da configuração do carbono anomérico (Figura 3–B) (COLLINS et al., 2005). A maioria das enzimas caracterizadas até o momento tende a adotar o mecanismo clássico de retenção proposto por Koshland (1953).

Segundo McCarter e Withers (1994), um duplo mecanismo de deslocamento está envolvido na retenção de Glicosil Hidrolases que direciona a configuração do carbono anomérico após sua catálise. Tal mecanismo inclui passos de glicosilação e transglicosilação. Dois ácidos carboxílicos, que pertencem aos resíduos de aminoácidos carregados negativamente (Ácido Glutâmico ou Ácido Aspártico) constituem os grupos catalíticos que podem estar em uma das extremidades da cadeia glicosídica. A glicosilação constitui a

primeira etapa da reação, na qual um grupo carboxílico age como um ácido, promovendo a catálise ácida do oxigênio glicosídico. O outro grupo carboxílico atua como uma base, formando um complexo intermediário covalente: glicosil-enzima. Supõe-se que o estado de transição tenha principalmente um caráter dissociativo, isto é, a quebra das ligações glicosídicas acontece antes do ataque pelo grupo nucleofílico.

A transglicosilação constitui a segunda etapa da reação onde o complexo glicosil-enzima é hidrolisado pela água, com o outro resíduo atuando como catalisador básico e desprotonando a molécula de água nucleofílica, formando assim uma nova ligação glicosídica. Entretanto, o rendimento das reações de transglicosilações é baixo, porque o produto da reação pode ser imediatamente utilizado como substrato para as hidrólises enzimáticas subsequentes (McCARTER & WITHERS, 1994).

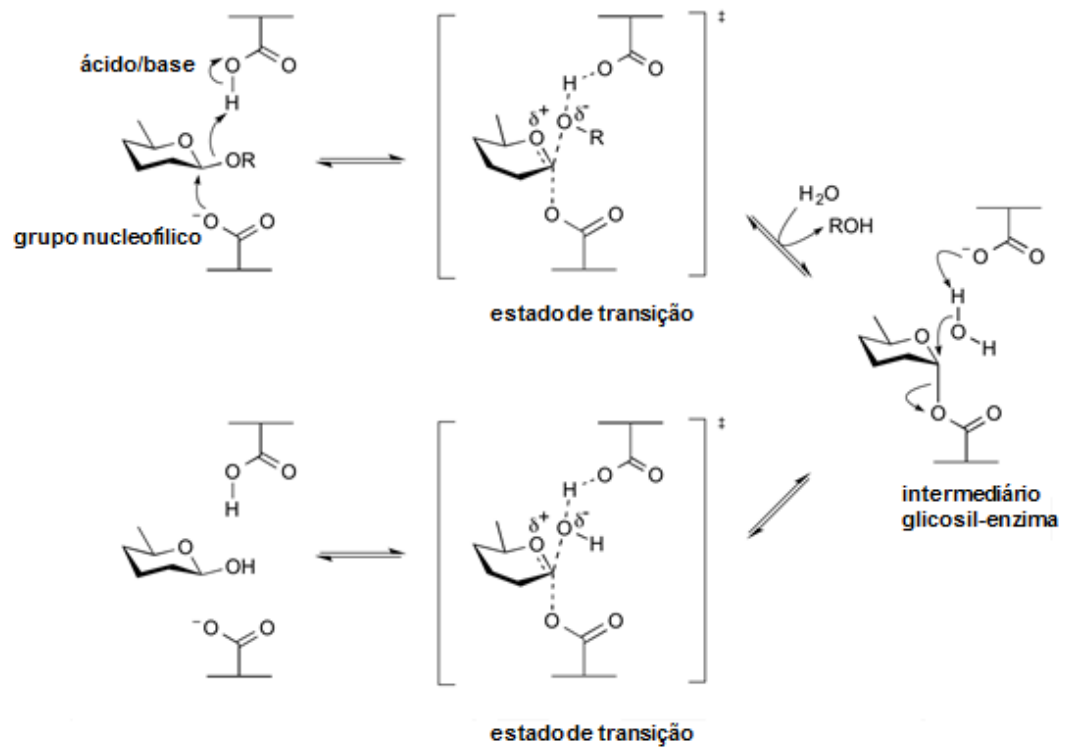
Um simples deslocamento leva a inversão das GHs e consequentemente a inversão da configuração anomérica. Em fato, dependendo do substrato utilizado, a hidrólise da ligação β -glicosídica pode levar a uma configuração do tipo alfa ou beta. Como mencionado acima, a catálise envolve dois aminoácidos carboxilados da enzima, Aspartato ou Glutamato, que atuam como ácido e base respectivamente. Neste caso, uma molécula de água ativada pelo resíduo básico ataca o carbono anomérico, hidrolisando a ligação glicosídica, levando à inversão da configuração (McCARTER & WITHERS, 1994; MOTOMITSU et al., 2009).

1.8 β -Glicosidase

As β -Glicosidases representam um grupo de enzimas com funções variadas e hidrolisam ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora de oligossacarídeos de cadeia pequena, alquil e aril β -D-glicosídeos. Alguns exemplos são capazes de hidrolisar também β -D-galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilosídeos e β -D-fucosídeos (FAN et al., 2011).

Podem ser classificadas com base na especificidade pelo substrato e pela similaridade da sequência de aminoácidos (HENRISSAT & DAVIES, 1997). Baseado na especificidade pelo substrato, elas são divididas em três classes. A Classe I, a qual contém aril β -D-glicosídeos, são as Endoglicanases (endo-1,4 β -D-glicanase EC 3.2.1.14) que atacam as ligações glicosídicas em regiões internas da molécula de celulose, gerando oligossacarídeos de diversos comprimentos (BHATIA et al., 2002; VARNAI et al., 2010; SIGHANIA et al., 2010).

A – Mecanismo catalítico para β -Glicosidase por retenção do C anomérico



B – Mecanismo catalítico para β -Glicosidase por inversão do C anomérico

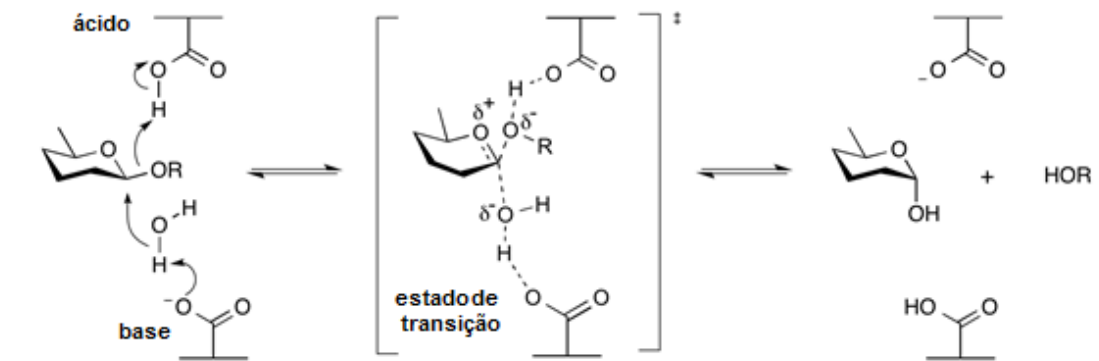


Figura 3 – Mecanismo de ação catalítico para β -Glicosidase por inversão e retenção do carbono anomérico (modificado de KOSHLAND, 1953; McCARTER & WITHERS, 1994).

A Classe II, a qual contém as verdadeiras Celobiohidrolases ou Exoglicanases (exo-1,4 β -D-glicanase EC 3.2.1.91) que atacam as extremidades dos oligossacarídeos produzidos pela ação das Endoglicanases (BHATIA et al., 2002; VARNAI et al., 2010; SIGHANIA et al., 2010).

E a Classe III, a qual contém as β -Glicosidases (1,4 β -D-glicosidase EC 3.2.1.21) que hidrolisam as celobioses em oligossacarídeos solúveis. Esta Classe III de glicosidases catalisam normalmente as ligações glicosídicas β 1,4; β 1,6; β 1,2 e α 1,3; α 1,4; α 1,6 (BHATIA et al., 2002; VARNAI et al., 2010; SIGHANIA et al., 2010). Estas enzimas estão distribuídas nas famílias GHs 1, 3, 4, 5, 9, 17, 30, e 116, conforme similaridade da sequência de aminoácidos (JUTURU & WU, 2014).

As famílias GH1, GH5 e GH30 são agrupadas ao mais amplo clã de GHs (GH-A). Em microrganismos são encontradas β -Glicosidases da família GH1 (CAIRNS & ESEN, 2010).

Podem catalisar reações de transglicosilação de ligações β -glicosídicas em conjugados glicosídicos formando glico-oligossacarídeos (GOS) com diferentes aplicações na indústria alimentícia e saúde humana (YANG et al., 2008). Variações de β -Glicosidases estão distribuídas em todos os tipos de organismos e possuem papéis importantes em diversos processos biológicos, dependendo da localização e do sistema biológico em que essas reações ocorrem. Em microrganismos celulolíticos, por exemplo, elas são membros da família de enzimas celulolíticas e agem de maneira sinérgica convertendo celulose à glicose; e esta pode ser fermentada a etanol, tendo, portanto grande relevância biotecnológica (LYND et al., 2002).

Em humanos, as β -Glicosidases realizam a hidrólise de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos). As deficiências genéticas nesta enzima estão associadas a desordens do metabolismo de carboidratos, como diabetes e obesidade, e o acúmulo excessivo de glicosilceramidas no baço, fígado e linfonodos, que podem levar a Doença de Gaucher (PANDEY & MISHRA, 1995). Inibidores de glicosidases são agentes de grande interesse terapêutico, porque apresentam atividade contra vírus, crescimento tumoral e metástase, diabetes, Doença de Gaucher e outras síndromes associadas ao armazenamento lisossomal de glicoenfingolipídeos (MELO & CARVALHO, 2006).

1.9 β -Xilosidase

As β -Xilosidases hidrolisam xilo-oligossacarídeos (XOS) derivados do xilano, pela ação das endo-Xilanases, à xilose (BEG et al., 2001). Até o presente momento, estas enzimas estão distribuídas nas famílias GHs 3, 30, 39, 43, 52, 54, 116 e 120, baseada na similaridade das sequências de aminoácidos conservadas (CANTAREL et al., 2009; RAVANAL et al., 2013). Com exceção da família GH43, que opera via o mecanismo de inversão da configuração do carbono anomérico, as outras famílias operam via a retenção.

A família GH39 pertence ao mais amplo clã de GHs (GH-A), os seus membros clivam ligações glicosídicas através da retenção da configuração do carbono anomérico e possuem oito repetições de uma estrutura tridimensional do tipo (β/α) (HENRISSAT et al., 1995). Além das β -Xilosidases, a família GH39 contém as α -L-Iduronidases, as quais estão envolvidas com a degradação lisossomal dos glicosaminoglicanos (GAGs) em organismos superiores. As deficiências nesta enzima podem conduzir ao acúmulo de GAGs, resultando na alteração conhecida como Mucopolissacaridose do Tipo I ou também conhecida como Síndrome de Hurler ou Scheie (UNGER et al., 1994).

Em adição à capacidade hidrolítica, algumas β -Xilosidases têm capacidade de transglicosilação na presença de alta concentração de xilose, levando a formação de XOS, que contêm duas a sete moléculas de xilose unidas por uma ligação β -(1-4). Os XOS podem ser empregados como pré-bióticos e apresentam um impacto positivo nas funções fisiológicas da saúde humana, como a redução dos níveis de colesterol, aumento da disponibilidade biológica de cálcio, redução do risco de câncer de cólon, efeito citotóxico em células leucêmicas humanas, efeitos benéficos no diabetes mellitus tipo 2 e atuam como agentes antimicrobianos e antioxidantes (MUSSATO & MANCILHA, 2007; SHEU et al., 2008; CHEN et al., 2009).

As β -Xilosidases são ativas contra o substrato artificial *p*-nitrofenil. Muitas são específicas pelo xilopiranosídeo, como o *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo. Outras são capazes de clivar o-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo, *p*-nitrofenil- β -L-arabinopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo ou *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (KITAMOTO et al., 1999). Muitas destas enzimas purificadas não são capazes de degradar o xilano. Elas apresentam pouca ou nenhuma atividade contra este polímero (POLIZELI et al., 2005).

Com algumas exceções (KIM & YOON, 2010), a maioria das β -Xilosidases de bactérias são intracelulares, enquanto estas enzimas de fungos são ligadas as células ou

extracelulares. Podem possuir componentes monoméricos (TSUJIBO et al., 2001), diméricos (CONTRERAS et al., 2008) ou tetraméricos (SAKKA et al., 1993) para sua função catalítica.

1.10 Glicosil Hidrolases da Família 3 (GH3)

As atividades enzimáticas conhecidas das GH3 são β -Glicosidases (EC 3.2.1.21), β -D-Xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), 1,3- β -Glicosidases (EC 3.2.1.58), 1,4- β -Glicosidases (EC 3.2.1.74), β -Glicosilceramidases (EC 3.2.1.45), N-acetil- β -D-Glicohexosaminidases (EC 3.2.1.52) entre outras. Sua classificação é baseada em similaridades das sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes correspondentes. Possuem poucas estruturas de β -Glicosidases (BGLs) resolvidas e essas utilizam um Aspartato no ataque nucleofílico e um Glutamato como próton doador conforme descrito no <http://www.cazy.org/GH3.html>.

As BGLs EC 3.2.1.21 pertencentes à família GH3 realizam uma série de funções, incluindo a degradação da biomassa celulósica, remodelação da parede celular de plantas e bactérias, metabolismo energético e na defesa de patógenos. Existem várias enzimas desta família caracterizada bifuncionais, com atividade tanto de α -L-Arabinofuranosidase e β -D-Xilosidase (LEE et al., 2003).

1.11 Aplicações biotecnológicas das enzimas do complexo xilanolítico e glicosidases

Os biopolímeros predominantes em materiais lignocelulósicos podem ser obtidos por processos químicos e biotecnológicos. Os processos biotecnológicos abordam a utilização de enzimas e são mais vantajosos em função da alta especificidade, eficiência, segurança e redução de custos quando comparado aos métodos físicos e químicos tradicionais (YOON et al., 2006).

Desta forma, a conversão do xilano em monossacarídeos pode ser realizada pela hidrólise ácida ou enzimática. No entanto, o primeiro libera resíduos tóxicos que podem comprometer a subsequente fermentação microbiana, formando frequentemente subprodutos indesejáveis como furfural, hidroximetilfurfural, além de outros produtos inibidores da fermentação. Também exige altos investimentos operacionais e pode levar a ocorrência de corrosão e problemas ambientais (LAUDISCH, 1979). Desta maneira, a hidrólise enzimática

é um processo mais específico que pode ser conduzido sob condições brandas, embora também haja a formação de compostos inibidores, além do grande desafio de se selecionar e otimizar as enzimas mais resistentes aos diferentes inibidores (BIELY, 1985).

A prospecção de novos microrganismos produtores de enzimas do complexo xilanolítico constitui uma etapa importante em processos biotecnológicos, nos quais estas enzimas podem ser empregadas. Enzimas que degradam o xilano são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas e as preparações comerciais de enzimas xilanolíticas são obtidas em escala industrial principalmente de fungos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* (HALTRICH et al., 1996; POLIZELI et al., 2005).

Muito interesse tem sido dispensado à bioconversão de recursos renováveis em produtos economicamente importantes. A produção de bioetanol a partir das pentoses, como a xilose; e das hexoses, como a glicose, vem sendo amplamente estudado (SAHA, 2003a; KATAHIRA et al., 2004). Dentre os açúcares utilizados para a produção de etanol, a xilose representa de 5 a 20%. Além disso, a xilose também vem sendo utilizada por microrganismos para a produção do xilitol utilizado na indústria alimentícia, um poli-álcool com poder adoçante semelhante ao da sacarose (PARAJO et al., 1998; SAHA, 2003a). Alguns microrganismos possuem a capacidade de converter a xilose em etanol por fermentação, como a *Pichia stipites* e *Candida shehatae* (SCREENATH & JEFRIES, 2000).

Os XOS são oligômeros de açúcar formados por unidades de xilose, com diferentes graus de polimerização e aparecem naturalmente em frutos, vegetais, leite e mel. Sua produção industrial é obtida através dos materiais lignocelulósicos, obtidos por meio da hidrólise ácida ou enzimática. Normalmente, os materiais típicos para a produção de XOS são provenientes de uma base rica em xilano, com algumas cadeias heterocíclicas de éter, devendo ser hidrolisada para gerar compostos degradados de cadeia longa (ENEYSKAYA et al., 2007). Para a produção dos XOS por enzimas são necessários complexos enzimáticos contendo Xilanases e/ou β -Xilosidases. Estas enzimas podem ser adicionadas diretamente a reação, imobilizadas ou produzidas *in situ* por microrganismos (BEG et al., 2001; LEMBO et al., 2001; XIONG et al., 2004; YOON et al., 2006). Através destes métodos, as cadeias de XOS podem ser produzidas, sendo preferíveis para o uso em alimentos as cadeias que contenham entre 2 a 4 resíduos de xilose (van LOO et al., 1999).

Atualmente, os XOS são bastante utilizados como adoçante ou como aditivos na indústria de alimentos, mas também podem ser empregados na indústria farmacêutica (YAMADA et al., 1993). Observou-se que a suplementação de XOS na dieta de ratos diabéticos foi capaz de reduzir a concentração de açúcares e lipídeos no sangue destes animais

(IMAIZUMI et al., 1991). Em relação à saúde humana, XOS são considerados pré-bióticos, uma vez que favorecem seletivamente o crescimento de pró-bióticos como os *Lactobacillus* sp e *Bifidobacterium bifidum*, promovendo uma série de benefícios, como a redução da constipação intestinal, o favorecimento da digestão e a absorção de nutrientes. Em adição, auxiliam na prevenção de infecções gastrintestinais, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (GIBSON, 2004).

Em todo o planeta existe uma grande preocupação com a qualidade de vida e a saúde humana, aumentando assim os cuidados com os alimentos consumidos. Desde então, percebe-se o crescente interesse nos alimentos que apresentam componentes ou substâncias funcionais, ou seja, aqueles que auxiliam ou modulam o bom funcionamento do organismo, de modo a promover a saúde. Estes componentes ou substâncias podem estar presentes naturalmente nos alimentos ou podem ser adicionados aos produtos industrializados. Os XOS possuem a vantagem de serem obtidos através de fontes altamente disponíveis e de baixo custo, como dos resíduos florestais e agroindustriais. Também tem a vantagem de possuírem propriedades pré-bióticas semelhantes ou superiores aos demais compostos, como os fruto-oligossacarídeos (FOS) e os isomalto-oligossacarídeos (IOS) (MENEZES & DURRANT, 2009).

Em outro contexto, as enzimas do complexo xilanolítico estão sendo utilizadas em diversos processos da indústria do papel e celulose (BIELY, 1985; VIIKARI et al., 1994; PRADE, 1996; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; HAARHOFF et al., 1999; MEDEIROS et al., 2003; POLIZELI et al., 2005). A realização do pré-tratamento com enzimas do complexo xilanolítico diminui o consumo de produtos químicos, principalmente o cloro e o óxido de cloro. Viikari et al. (1994), foi o primeiro a demonstrar que os tratamentos da polpa de papel com hemicelulases podem substituir a necessidade de cloro para o seu branqueamento, sendo que outros pesquisadores também confirmaram esse resultado. O branqueamento enzimático resulta da clivagem das ligações entre lignina e os carboidratos da estrutura da polpa (KULKARNI et al., 1999). Este processo de pré-branqueamento reduziu o uso de compostos clorados em até 30% e como resultado houve a diminuição de 15 a 20% na liberação de organoclorados nos efluentes da indústria de papel, composto altamente tóxico para o ambiente (VIIKARI et al., 1994; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). No entanto, deve-se ressaltar que para uma maior eficiência e especificidade da aplicação das enzimas xilanolíticas, deve-se trabalhar com extratos resistentes à alcalinidade e a altas temperaturas, e totalmente livres de celulasas (KULKARNI et al., 1999).

A aplicação deste grupo de enzimas na ração animal também é muito frequente, devido ao custo cada vez maior das matérias-primas tradicionais, assim justifica-se a busca de ingredientes alternativos (AHUJA et al., 2004). O uso de enzimas exógenas para reduzir os custos das rações animais, representa uma das alternativas mais versáteis para auxiliar na melhor rentabilidade neste setor. As enzimas xilanolíticas são capazes de hidrolisar as hemiceluloses presentes nos cereais como o trigo e o milho, facilitando a digestão de todos os nutrientes presentes e reduzindo a excreção de estrume, nitrogênio e fósforo (REIS et al., 2001).

Os animais denominados monogástricos, não produzem enzimas capazes de degradar os polissacarídeos estruturais que compõem a parede celular de plantas, como o xilano e a celulose. Com isso, eles possuem um menor aproveitamento dos alimentos à base de cereais. Estas enzimas, muitas vezes produzidas por microrganismos presentes no intestino, aumentam a energia metabolizável e diminuem a viscosidade dos alimentos, favorecendo o ganho de peso desses animais (REIS et al., 2001; CONTE et al., 2003; POLIZELI et al., 2005).

Na indústria de alimentos, a combinação de pectinases, celulasas e hemicelulasas, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, são usadas na extração e clarificação de sucos de fruta, apresentando vantagens sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do produto final (BIELY, 18985; BHAT, 2000, BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005).

As Xilanases e β -Xilosidases são utilizadas em aplicação conjunta com outros polissacarídeos nas vinícolas. Elas reduzem a concentração de β -glicanas que aumentam a viscosidade dos mostos e prejudicam a etapa de filtração, realizada para a clarificação de vinhos. E as β -Glicosidases realizam a liberação de aromas no vinho (da SILVA, 1997).

As β -Glicosidases vem sendo utilizadas na indústria de alimento devido sua capacidade de realçar o sabor dos alimentos e bebidas, além de promover uma melhora nutricional dos alimentos. Elas realizam a liberação de vitaminas e antioxidantes, potencializando o seu aproveitamento para a saúde (DOUGHERTY et al., 2012).

Algumas vitaminas são encontradas nos vegetais em forma glicosídica e quando convertida em angliconas pelas β -Glicosidases, melhoram a disponibilidade nutricional. Além disso, centenas de compostos flavorizantes de plantas tem estrutura β -Glicosídica. A transformação desses compostos em bebidas e alimentos tem a qualidade enriquecida pela ação das β -Glicosidases, aumentando a qualidade sensorial destes alimentos tratados (CAIRNS & ESEN, 2010).

Na fabricação de cervejas ocorre a liberação de longas cadeias de arabinoxilanos dos cereais, que aumentam a viscosidade das cervejas, podendo deixá-las turvas. As Xilanases, β -Xilosidases e Arabinofuranosidases auxiliam na solubilização dos arabinoxilanos, produzindo oligossacarídeos menores, diminuindo sua viscosidade e eliminando a turbidez da cerveja (van der BROECK et al., 1990; KULKARNI et al., 1999).

As enzimas xilanolíticas citadas acima que solubilizam os arabinoxilanos, também são usadas na panificação, sendo aplicadas sobre a farinha de trigo, a qual é constituída por 2 a 3 % de arabinoxilanos. Estes arabinoxilanos absorvem cerca de 1/3 de água adicionada na massa, o que impede o desenvolvimento do glúten, reduz o volume do pão e prejudica sua textura. Assim, a aplicação de uma mistura de enzimas xilanolíticas na farinha, leva a liberação da água retida nos arabinoxilanos, melhorando o manuseio da massa e permitindo a obtenção de um produto final com maior volume e melhor estrutura de miolo, além de aumentar significativamente o tempo de prateleira destas massas panificadas. Ainda, o emprego destas enzimas podem efetivamente substituir os aditivos utilizados na panificação como emulsificantes, oxidantes, malte de cevada ou de trigo. Na Europa, o uso de brometo de potássio na massa do pão e de dióxido de enxofre na massa do biscoito foi vetado. Em substituição a esses compostos são aplicadas as hemicelulases (KULKARNI et al., 1999; CAMACHO & AGUIAR, 2003).

Além disso, estas enzimas em conjunto com Celulases (EC 3.2.1.4) e/ou Pectinases (EC 3.2.1.15) podem ser utilizadas na maceração de tecidos e no processo de fibras vegetais, liquefação da mucilagem do café, extração de condimentos e pigmentos, óleos vegetais e amido (BIELY, 1985; WONG et al., 1988; PRADE et al., 1996; KULKARNI et al., 1999; COLLINS et al., 2005). Estas enzimas também podem ser usadas na indústria de detergentes e na produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos que atuem como agentes antimicrobianos (COLLINS et al., 2005).

1.12 O modelo de estudo *Caulobacter crescentus*

A *Caulobacter crescentus* é membro da subdivisão alfa das Proteobactérias, filo composto por bactérias Gram-negativas, cresce em ambientes aquáticos e é de vida livre. Apresenta um ciclo celular caracterizado por divisão assimétrica e passa por eventos de diferenciação celular (BROWN et al., 2008). Em função de seu ciclo de vida característico, *C. crescentus* tem sido amplamente utilizada como um microrganismo modelo de estudo do

controle do ciclo celular. Apresenta duas células filhas diferenciadas, sendo uma delas de forma livre flagelada e outra imóvel pedunculada, cada uma com características morfológicas e de regulação distintas. O ciclo de vida completo da bactéria dura 3 horas, e nas atividades experimentais é comum encontrar uma cultura mista, ou seja, contendo, células flageladas móveis, pedunculadas imóveis e pré-divisionais (Figura 4) (CURTIS & BRUN, 2010).

Além disso, a sua utilização em estudos de manipulação genética é possível devido o desenvolvimento de ferramentas moleculares, pois a mesma apresenta seu genoma completamente sequenciado (NIERMAN et al., 2001; MARKS et al., 2010). O ciclo celular de *C. crescentus* é completado em aproximadamente 3 horas a 30°C em um meio definido (McADAMS & SHAPIRO, 2009).

O genoma da *C. crescentus* cepa NA1000, adotada como modelo de estudo em muitos experimentos no nosso laboratório, foi sequenciado completamente por Marks et al. (2010) e é composto por 4.016.942 pares de bases, disposto em um único cromossomo circular, abrangendo 3.767 genes. Estas informações foram depositadas no banco de dados de sequências de DNA e de aminoácidos, GenBank, do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA (NCBI). As características de sua linhagem são *Proteobactéria*, *Alphaproteobactéria*, *Caulobacterales*, *Caulobacteraceae*, *Caulobacter*, *Caulobacter crescentus*.

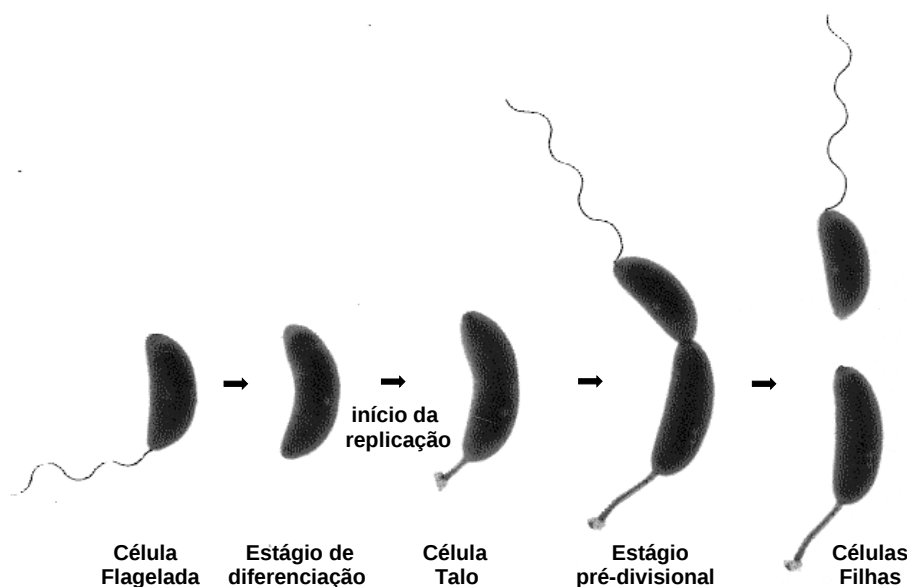


Figura 4 – O ciclo celular de *Caulobacter crescentus* mostrando duas células filhas, uma com talo e a outra com flagelo, sendo diferentes em estrutura e funções. A célula flagelada é móvel, porém incapaz de replicar o DNA. A célula talo ou pedunculada é imóvel, no entanto capaz de replicar o DNA (modificado de CURTIS & BRUN, 2010).

As bactérias do gênero das *Caulobacter* podem ser encontradas em lâminas imersas em de água doce, sendo encontradas até mesmo em água corrente da torneira. Ainda pode ser encontrada em qualquer época do ano e em solos neutros ou ligeiramente ácidos; com alto teor de umidade e baixo conteúdo orgânico. Estas bactérias também podem ser encontradas na água do mar, porém não há relatado nenhum tipo de halofílica. Em águas não perturbadas, esta bactéria representa um dos principais componentes do biofilme que forma a interface água-atmosfera. Outra característica peculiar deste gênero é a sobrevivência em ambientes oligotróficos, onde as mesmas participam da reciclagem do carbono, decompondo fontes destes elementos em baixas concentrações. Em geral, são encontradas em ambientes pobres em nutrientes e com pH próximo a neutralidade (POINDEXTER, 1981)

As células de *Caulobacter* estão equipadas com sensores ambientais e vias metabólicas que são adequadas para explorar metabólitos provenientes da decomposição de matéria vegetal. Evidências apontam que se a concentração de nutrientes no meio for elevada, ocorre à inibição do seu crescimento, pois gera a inibição de enzimas ligadas ao transporte ativo de substâncias. Isto caracteriza a *Caulobacter* como uma bactéria com importante adaptação de sobrevivência em condições oligotróficas, devido a capacidade de crescer lentamente sob baixa condição nutricional e de parar a progressão do ciclo celular em condição limitante de fonte carbono e nitrogênio (LAUB et al., 2007).

Trabalhos experimentais apontam a *C. crescentus* como uma bactéria promissora para exploração biotecnológica (ALIPOUR-ASSIABI et al., 2006), por apresentar enzimas envolvidas com o metabolismo de materiais lignocelulósico (McADAMS & SHAPIRO, 2009). A *C. crescentus* é capaz de degradar uma variedade de compostos aromáticos incluindo o benzoato, fenol e *p*-hidroxibenzoato (CHATTERJEE & CHATTERJEE, 1987) e compostos tóxicos como policlorofenol (MANNISTO et al., 1999). Dados têm mostrado que ela é tolerante ao urânio, por um mecanismo de ação que leva a formação de precipitados de fosfato-urânio-cálcio no meio extracelular (HU et al., 2005). Essa bactéria já demonstrou ser capaz de remover aproximadamente 99% do composto tóxico de cádmio de águas contaminadas (PATEL et al., 2010). Em adição a estas propriedades, a *C. crescentus* tem a capacidade de formar biofilmes de alta densidade e uma biocola muito potente. Os biofilmes têm potenciais usos em biorreatores e processos de biorremediações de ambientes contaminados (SMIT et al., 2000). A biocola demonstra que esta bactéria é promissora na área médica, para o uso de adesivos cirúrgicos biodegradáveis, para fechar ferimentos ou como cola dental. Porém tem-se tido problemas na sua extração (TSANG et al., 2006).

Após o sequenciamento de seu genoma, a *C. crescentus* apresentou um inesperado potencial para a degradação de materiais lignocelulósicos. Os genes envolvidos com a degradação codificam um conjunto de enzimas como: Celulases (endo-1,4-Glucanases e β -Glicosidases), 3 endo- β -Xilanases e 5 β -Xilosidases. Dentre esta última, três bifuncionais, duas com funções de α -L-Arabinofuranosidase e uma β -Glicosidase (MARKS et al., 2010).

Os principais produtos monoméricos formados pela degradação dos materiais lignocelulósicos por estas enzimas são glicose (a partir da celulose) e a xilose (a partir do xilano). O mecanismo de assimilação do monômero de xilose na bactéria aquática *C. crescentus* é desconhecido. A via bacteriana mais conhecida para o catabolismo da xilose é a que envolve a isomerização de xilulose, seguida pela fosforilação de xilulose-5-fosfato e a sua entrada na via das pentoses, via ausente em representantes do gênero *Caulobacter*. Estes eventos são inoperantes devido à ausência dos genes homólogos para as enzimas xilose isomerase e xilulose quinase no genoma bacteriano (HOTTES et al., 2004). A atividade de uma xilose desidrogenase dependente de NADP já foi descrita em *C. crescentus* (POINDEXTER, 1964), mas o gene que codifica esta enzima, bem como a via catabólica da xilose da qual ela participa são ainda desconhecidos.

1.13 Métodos para expressão de proteínas recombinantes

O entendimento do dogma central da Biologia Molecular é essencial para a produção de proteínas recombinantes, uma vez que este compreende os três processos principais que a célula utiliza para que a informação genética seja expressa: replicação, transcrição e tradução (Figura 5) (LEHNINGER, 1985).

Expressão heteróloga de proteína significa que uma proteína é experimentalmente colocada em uma célula que normalmente não a expressa. A expressão de proteínas funcionais em hospedeiros heterólogos é um desafio da biotecnologia. A utilização de microrganismos geneticamente modificados, capazes de sintetizar proteínas em grande quantidade, apresenta para ponto de vista econômico, uma vantagem considerável em relação aos processos clássicos de produção (JUTURU & WU, 2014).

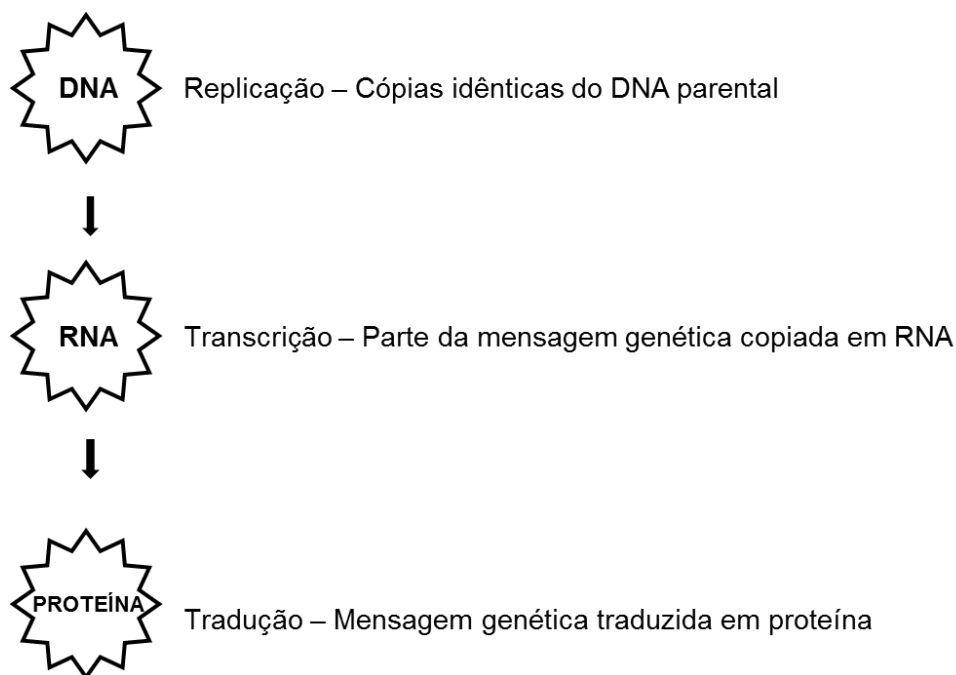


Figura 5 – Dogma central da Biologia Molecular. Mostram os três processos principais que a célula utiliza para que a mensagem genética seja expressa (adaptado de LEHNINGER, 1985).

Desde o advento da tecnologia do DNA recombinante (rDNA), os pesquisadores têm transformado a *E. coli* no principal hospedeiro da Biologia Molecular para a expressão de proteínas recombinantes em grandes quantidades (JUTURU & WU, 2014). Mas o sistema de expressão de proteínas heterólogas adequado depende de qual proteína deseja-se produzir.

A produção de proteínas em *E. coli* geneticamente engenheiradas tem permitido a obtenção destas moléculas para a caracterização bioquímica, determinação da sua estrutura tridimensional, produção de anticorpos, entre outros (RÜCKER et al., 2001). Em adição, a expressão de proteínas recombinantes fusionadas a cauda de histidina (His Tag) tem possibilitado a obtenção de proteínas com grau de pureza adequado para os ensaios cristalográficos, necessários para a compreensão da estrutura e função da proteína alvo (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Embora a clonagem do DNA seja relativamente fácil, a expressão dos genes clonados ainda é uma tarefa muito árdua. Infelizmente as explicações não são totalmente compreendidas, geralmente as proteínas recombinantes expressas em *E. coli* geram agregados

insolúveis, denominados corpos de inclusão, ou são prematuramente degradadas ou desnaturadas (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Os estudos dos genes e das proteínas por ele expressas, têm sido favorecidos pelos procedimentos que alteram a permeabilidade celular do hospedeiro, para que o DNA de interesse seja introduzido e ocorra a clonagem. Por estes procedimentos é possível introduzir plasmídeos carregando genes alterados ou selvagens, dos organismos que se desejam estudar, e que expressam as proteínas recombinantes (CHEN & DUBNAU, 2004). Estas proteínas recebem grande atenção das áreas médicas e biotecnológicas. Os primeiros produtos oferecidos no mercado mundial a partir da tecnologia do rDNA foram os produtos farmacêuticos (insulina, interferons, eritropoietina e vacinas de DNA) e enzimas industriais (para o beneficiamento de alimentos, fabricação de detergentes e papel) (PORRO et al., 2005).

Para expressão de uma proteína recombinante, recomenda-se que primeiro o gene de interesse seja clonado em um vetor de clonagem, sua identidade confirmada e em seguida, seja realizada a subclonagem em um vetor de expressão apropriado (PASSAGLIA & ZAHA, 1996).

A verificação da produção da proteína recombinante é feita através da eletroforese, um dos métodos mais empregados para a separação e análise qualitativa de moléculas. O gel mais comum para proteínas é o SDS-PAGE, composto por polímeros intercalados de acrilamida e bis-acrilamida para formar uma fina malha cruzada (LAEMMLI, 1970). Como as cargas das proteínas estão igualmente negativas por ação do detergente SDS, as proteínas são separadas pelo peso molecular. Assim as moléculas pépticas menores atravessam a malha mais rapidamente que as de maior tamanho, em direção ao polo positivo do campo elétrico.

Para ter aplicabilidade na indústria, as BGLs e as outras enzimas requerem a produção em larga escala, bem como o conhecimento detalhado de seus mecanismos de reação (BHATIA et al., 2002). Por esta razão, a clonagem molecular de genes codificantes para BGLs tem sido estudada (SPIRIDONOV & WILSON, 2001; BHATIA et al., 2002; JANG & CHEN, 2003), não representando apenas uma poderosa ferramenta para a produção de proteínas em grande escala, mas também oferecendo a possibilidade da aplicação de métodos de engenharia de proteínas na análise da atividade enzimática e no melhoramento de suas funções (LI & LEE, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar o gene *xynB5* (número de acesso: CCNA 03149) de *Caulobacter crescentus*, purificar o seu produto β -Glicosidase/ β -Xilosidase V para posterior caracterização bioquímica.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 – Extrair o DNA genômico de *C. crescentus* e amplificar o gene *xynB5* usando oligonucleotídeos específicos, desenhados com base no genoma bacteriano;
- 2 – Clonar o gene *xynB5* em um vetor de clonagem pJET1.2/*blunt* e confirmar a identidade do gene por sequenciamento de DNA. Subclonar o gene *xynB5* em um vetor de expressão pTrcHisA, para obter uma proteína recombinante e reconfirmar a integridade da clonagem por sequenciamento de DNA;
- 3 – Expressar e purificar a proteína recombinante por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna cromatográfica de níquel-sepharose;
- 4 – Verificar expressão e purificação da proteína recombinante em gel desnaturante de poliacrilamida;
- 5 – Paralelamente, testar e caracterizar as atividades enzimáticas desta proteína purificada, usando substratos específicos para β -Xilosidase, β -Glicosidase e α -L-Arabinofuranosidase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos

As linhagens bacterianas de *C. crescentus* e *E. coli* utilizadas no presente trabalho estão listadas na Tabela 2. Os plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 3.

Tabela 2 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

LINHAGENS	CARACTERÍSTICAS	FONTE OU REFERÊNCIA
<i>C. crescentus</i> NA1000	Linhagem sincronizável utilizada como padrão, derivado da cepa selvagem CB15	EVINGER & AGABIAN, 1997
<i>E. coli</i> TOP10	lacZΔM15 F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen®
<i>E. coli</i> pJET1.2-xynB5	Cepa TOP10 contendo o gene xynB5 clonado no vetor pJET1.2	Este trabalho
<i>E. coli</i> pTrcHisA-xynB5	Cepa TOP10 contendo o gene xynB5 clonado no vetor de expressão pTrcHisA	Este trabalho

Tabela 3 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.

LINHAGENS	CARACTERÍSTICAS	FONTE OU REFERÊNCIA
pJET1.2/blunt (Figura 6)	Vetor de clonagem, pMB1, Amp ^R , eco47IR, Plac UV5, T7, MSC	Thermo®
pTrcHisA (Figura 7)	Vetor de expressão, fornece uma fusão com His-tag na extremidade amino-terminal	Invitrogen®

Amp^R: marca de resistência a Ampicilina.

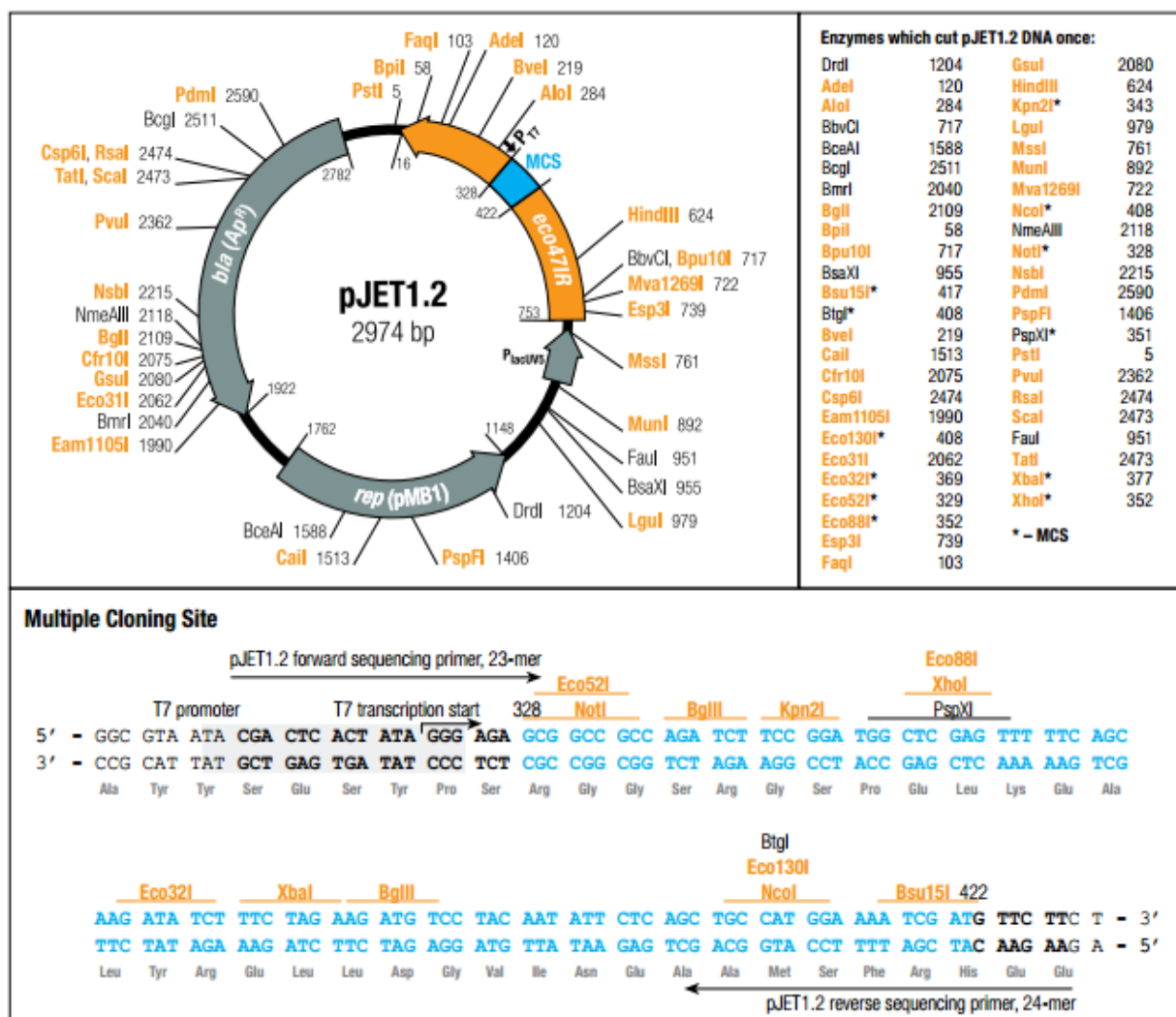
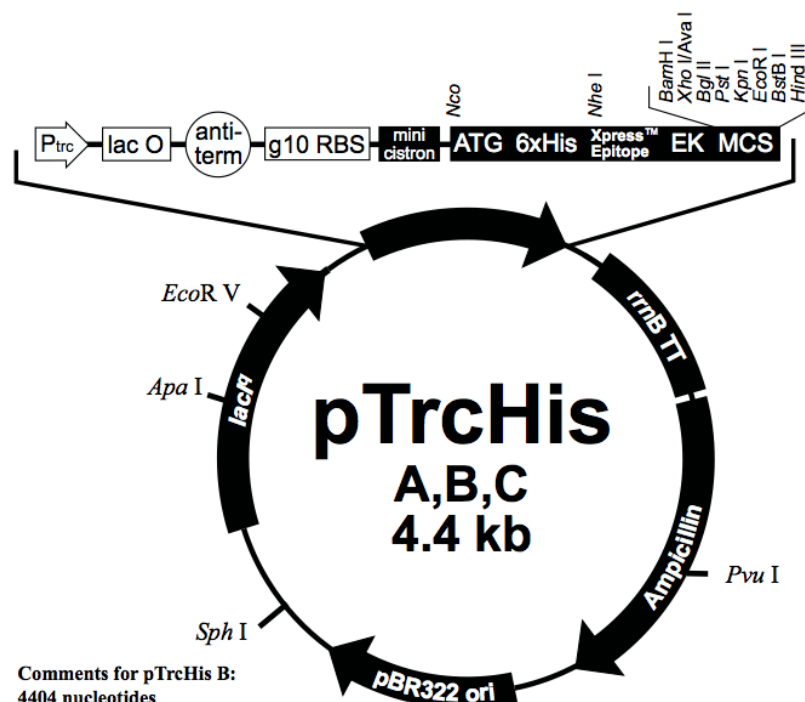


Figura 6 – Mapa físico e de restrição do vetor de clonagem pJET1.2/*blunt* (Fermentas®). O plasmídeo apresenta 2.974 pares de bases e contém vários elementos como a região de início de replicação a partir do rep (pMB1); gene *bla* (Amp^R) que codifica β -Lactamase que confere resistência a ampicilina à bactéria hospedeira; PlacUV5, promotor modificado de *Plac* para expressão do gene em um nível suficiente para permitir seleção positiva; promotor T7 altamente específico para T7 RNA polimerase para transcrição do promotor in vitro do inserto clonado; MCS, Múltiplo Sitio de Clonagem com região a para a inserção e excisão do fragmento clonado e um sítio *blunt* (não coesivo) para a ligação do fragmento de PCR.

A



B

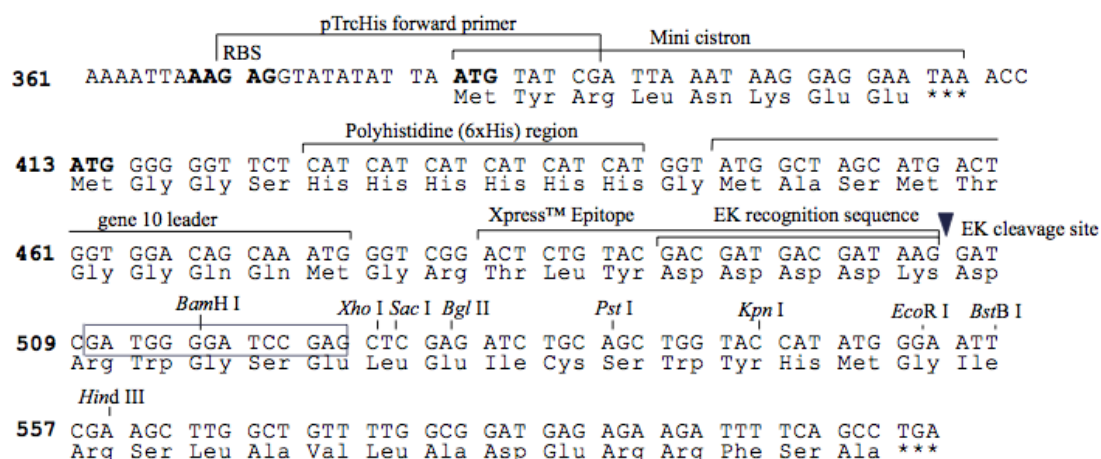


Figura 7 – Mapa físico (A) e de restrição (B) do vetor de expressão pTrcHisA (Invitrogen®). O plasmídeo apresenta 4.400 pares de bases e o gene *xynB5* foi clonado dentro do quadro de leitura com a cauda de histidinas presente na extremidade amino-terminal do vetor pTrcHisA usando-se os sítios de restrição *EcoRI/HindIII*, o quais foram originalmente introduzidos nos oligonucleotídeos direto e reverso usados para isolar o gene por PCR, respectivamente.

3.2 Meios e Condições de cultivo

As culturas de *E.coli*, cepa TOP10, foram crescidas em meio líquido de LB (bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5) a 37°C; e em meio sólido de LB ágar (LB mais ágar bacteriológico 1,5%).

As culturas estoque de *C. crescentus*, cepa NA1000, foram crescidas em meio líquido de PYE (bacto-peptona 0,2%, extrato de levedo 0,1%, MgSO₄ 0,2 g/L, CaCl₂ 0,5 mM) a 30°C; e em meio sólido de PYE ágar (PYE mais ágar bacteriológico 1,5%).

As culturas estoques das bactérias deste trabalho foram mantidas em glicerol 50% a -80°C. O antibiótico Ampicilina 10 mg/mL (Sigma®) foi usado como marca de seleção dos plasmídeos pJET1.2/*blunt* e pTrcHisA.

3.3 Oligonucleotídeos

Os pares de oligonucleotídeos usados para obtenção do gene *xynB5* que codifica para uma enzima β -Glicosidase/ β -Xilosidase de *C. crescentus* NA1000 foram desenhados com base no genoma da bactéria disponível no GenBank (número de acesso: CCNA 03149) e estão mostrados na Tabela 4. Os dados do sequenciamento completo são de consulta livre através do NCBI no domínio público <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>. Este gene com 2.421 pares se base codifica para uma proteína predita denominada β -Glicosidase/ β -Xilosidase, que codificam 806 aminoácidos, formando uma estrutura enzimática esperada de aproximadamente 95 kDa. Durante o desenvolvimento da pesquisa, este gene foi nomeado como *xynB5*. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Bioneer-AccuOligo® e foram diluídos em 100 μ L de água Mili Q estéril, ficando na concentração de 1 pM/ μ L.

Tabela 4 – Sequência de oligonucleotídeos do gene *xynB5*.

Região do gene	Nome do oligonucleotídeo	Sítio de restrição e sequência
<i>xynB5</i>	<i>xynB-leu-F</i>	<i>EcoRI</i> -leu (5' aa <u>gaattc</u> tgaacaccacccacccgc 3')
	<i>xynB5-stop-R</i>	<i>HindIII</i> -stop(5' tata <u>aagctt</u> ttaagcgaccgtcagcgt 3')

Os sítios de restrição *EcoRI* e *HindII* estão em negrito e sublinhados.

3.4 Extração e Clonagem do gene *xynB5*

3.4.1 Extração do DNA genômico de *C. crescentus*

A purificação do DNA bacteriano de *C. crescentus* foi realizada através do isolamento de DNA genômico pela técnica descrita por Chen e Kuo (1993), conforme protocolo a seguir. Este DNA genômico foi utilizado como molde na reação de amplificação do gene *xynB5*.

As culturas bacterianas foram crescidas em 2,0 mL de meio PYE líquido sob agitação de 120 rpm por 12 horas a 30° C. No dia seguinte, a cultura foi centrifugadas a 12.000 x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente (TA) e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 200 µL de tampão de lise contendo Tris-acetato 40 mM em pH 7,8; NaOAc 20 mM; EDTA 1 mM e SDS 1%. Na suspensão foi adicionada 66 µL de NaCl 5 M, seguida de uma centrifugação a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo micro-tubo e adicionado 250 µL de Clorofórmio e Álcool Isoamílico como agente de desnaturação protéica, na proporção 24:1.

O material foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 x *g* por 3 minutos a 4° C. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo micro-tubo e adicionado 2X o volume recuperado de Etanol 100% gelado. Foi deixado precipitar no freezer durante 12 horas a - 4° C. O passo seguinte seguiu-se com a centrifugação da amostra a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4° C e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 µL de Etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4° C. Descartou-se com cuidado o sobrenadante e a amostra foi seca em estufa por 2 horas a 37° C. Após este período, o tubo contendo o precipitado de DNA genômico foi ressuspenso em 50 µL de TE/RNase. A amostra foi armazenada a uma temperatura de - 20° C até o momento de uso.

3.4.2 Reação de amplificação do gene *xynB5*

A amplificação do gene *xynB5* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na qual a solução foi preparada para um volume final de 50 µL usando a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®) e o termociclador *PCR – Mastercycler Gradiente* (Eppendorf®). O protocolo utilizado para reação de amplificação está descrito na Tabela 5.

A reação iniciou-se com a desnaturação do molde de DNA a 94° C por 30 segundos, o segundo passo foi o anelamento dos oligonucleotídeos a 55° C por 30 segundos e após seguiu-se a extensão da fita molde a 68° C por 2 minutos. Estes passos foram realizados 35 vezes para obter-se o DNA amplificado. Após os ciclos, a reação permaneceu a 68° C por 10 minutos e foi mantida a - 20° C até o uso. Posteriormente, foi realizada a quantificação do DNA amplificado através do método espectrofotométrico a 260 nm e a aplicação em gel de agarose 1% para confirmação do produto de PCR gerado.

Tabela 5 – Protocolo da reação de amplificação para o gene *xynB5*.

REAGENTES	QUANTIDADE
DNA genômico de <i>C. crescentus</i>	1 µL
Tampão da reação 2X (Invitrogen®)	25 µL
Oligonucleotídeo <i>xynB5-leu</i> (1 pM/µL)	1 µL
Oligonucleotídeo <i>xynB5-stop</i> (1 pM/µL)	1 µL
DMSO	5 µL
<i>Platinum Taq DNA Polimerase</i> (Invitrogen®)	1 µL
Água Milli Q estéril (Fermantas®)	16 µL
Volume total	50 µL

3.4.3 Visualização e confirmação da amplificação

Uma alíquota de 5 µL do produto de PCR foi submetida à eletroforese preparativa no sistema *Power Pac 200* (Bio Rad®), em gel de agarose 1% (Sigma®) e com tampão de corrida TAE 1X (242 g Tris-base; 57,1 mL Ácido acético glacial; 100 mL EDTA 0,5 M em pH 8,0; para 1000 mL de água destilada, para o TAE 50X). Aplicou-se junto com o produto de PCR, o tampão de amostra GLB (sacarose 40%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%) na concentração de 10% do volume final. A corrida eletroforética se deu em uma corrente elétrica de 100 V e 2,0 mA durante 1 hora para géis médios (40 mL) e 2 horas para géis grandes (40 mL). O gel foi corado com Brometo de Etídio (EtBr) 10 mg/mL. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 kb *DNA ladder Plus* (Invitrogen®) e o DNA visualizado no transiluminador na luz ultravioleta (UV).

3.4.4 Construção dos vetores e das linhagens bacterianas

3.4.4.1 Vetor de clonagem

O plasmídeo pJET1.2/*blunt* (Thermo®) utilizado como vetor de clonagem, foi adquirido linearizado e apresenta 2.974 pares de base, segundo determinações do fabricante do *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo®). O pJET1.2/*blunt* permite uma rápida clonagem e reprodução dos fragmentos inseridos conforme abordado na Figura 4 desta seção.

3.4.4.2 Reação de ligação do pJET1.2-*xynB5*

O produto final da amplificação do fragmento de interesse por PCR com a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®) geraram extremidades coesivas. Então foi necessário antes da ligação, torná-las *blunt* (não coesivas).

Foi realizada uma reação com 10 µL de tampão de reação 2X *Blunting reaction*, 1 µL do produto de PCR, 1 µL da enzima termoestável *DNA Blunting* do *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo®) e 6 µL de água livre de nuclease obtida no kit, totalizando um volume final da reação de 18 µL. A reação foi incubada por 5 minutos a 70° C e resfriada imediatamente por cinco minutos a 4° C no banho de gelo, para a inativação da enzima.

Adicionou-se 1 µL do pJET1.2/*blunt Cloning vector*, 0,5 µL da *T4 DNA Ligase* 5 U/µL do *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo®) e incubou-se por 30 minutos a 22° C. Desta reação, foi utilizado 20 µL para a transformação.

3.4.4.3 Vetor de subclonagem

O plasmídeo pTrcHisA intacto (Invitrogen®) utilizado como vetor de subclonagem, foi linearizado pela reação de digestão descrita na Tabela 6, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (Invitrogen®) e incubado por 2 horas a 37° C. O plasmídeo linearizado foi quantificado através do método espectrofotométrico a 260 nm para posteriormente realizar a reação de ligação.

Tabela 6 – Protocolo da reação de digestão para o plasmídeo pTricHisA.

REAGENTES	QUANTIDADE
pTricHisA intacto (Invitrogen®)	20 µL
Tampão da enzima 1X (Invitrogen®)	8 µL
<i>EcoRI</i> (Invitrogen®)	1 µL
<i>HindIII</i> (Invitrogen®)	1 µL
Água Milli Q estéril (Fermantas®)	50 µL
Volume total	80 µL

3.4.4.4 Reação de ligação do pTricHisA-*xynB5*

A ligação entre plasmídeo e inserto foi na proporção de 1:3 (50/150 ng). Para a reação de ligação da subclonagem, foi utilizada a enzima *T4 DNA Ligase* 3U/mL (Promega®) seguindo o protocolo de reação de ligação descrito na Tabela 7 e incubada a 22° C por 18 horas. Desta reação, foi utilizado 20 µL para a transformação de células *E.coli* competentes.

Tabela 7 – Protocolo da reação de ligação do plasmídeo pTricHisA-*xynB5*.

REAGENTES	QUANTIDADE
pTricHisA digerido <i>EcoRI/HindIII</i>	2 µL
Tampão da enzima (Promega®)	2 µL
<i>xynB5</i> digerido <i>EcoRI/HindIII</i>	0,2 µL
<i>T4 DNA Ligase</i> 3U/mL (Promega®)	0,5 µL
Água Milli Q estéril (Fermantas®)	15,3 µL
Volume total	20 µL

3.4.4.5 Preparo da célula competente de *E.coli*

A bactéria *E.coli* TOP10 teve o papel de abrigar os plasmídeos clonados e subclonados. Desta maneira foi necessário deixá-la apta para receber o plasmídeo recombinante através do tratamento químico com cloreto de cálcio 0,1 M conforme Sambrook et al. (1989).

As células de *E.coli* TOP10 crescidas em meio LB ágar foram inoculadas com auxílio de uma alça de platina em 10 mL de meio LB líquido. Esta cultura cresceu com agitação de 120 rpm durante a noite, a 37°C. No dia seguinte foi diluído 1 mL da cultura em 30 mL do meio LB líquido. Esta suspensão foi incubada sob agitação de 120 rpm, de 2 a 3 horas a 37°C, até atingir a fase midi-log com DO entre 0,4 e 0,6 a 600 nm. Ao atingir a fase exponencial de crescimento, células de *E. coli* presentes na cultura foram transferidas para um tubo de centrífuga previamente gelado e centrifugadas a 6.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante que continha o meio de cultura e ressuspendeu as células em 10 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril, deixando em repouso em banho de gelo por 10 minutos.

Centrifugou-se novamente a 6.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril. As células competentes foram mantidas em banho de gelo até o seu uso, não excedendo 48 horas.

3.4.5 Transformação das células de *E. coli* TOP10

A partir das células de *E.coli* TOP10 quimicamente competentes, a transformação foi realizada pelo método de choque térmico, com mudanças bruscas de temperatura para alterar a permeabilidade da membrana celular, permitindo a entrada do DNA exógeno. Utilizou-se 20 µL da reação de ligação contendo o plasmídeo com o inserto e 200 µL das células quimicamente competentes de *E.coli* TOP10. Após 15 minutos de banho de gelo, as células foram submetidas ao choque térmico por 90 segundos a 42°C. Adicionou-se 1 mL de LB líquido para crescimento das células sob agitação de 120 rpm por 1 hora a 37°C. Nesta fase, as células bacterianas que receberam os plasmídeos, expressaram o gene de resistência a ampicilina. Em seguida, foram semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100 µg/mL), com auxílio da alça de Drigalski.

3.4.6 Seleção dos transformantes

Após a seleção das colônias transformantes, estas foram inoculadas em LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) sob agitação de 120 rpm por 12 horas a 37°C. Estas células foram recuperadas em micro-tubos e centrifugadas a 12.000 x *g* por 5 minutos a TA. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram submetidas à extração do DNA plasmideal através de duas técnicas distintas: mini-preparação de DNA plasmideal convencional (Lise Alcalina) e através do Kit comercial de mini-preparação plasmideal (Invitrogen®).

3.4.6.1 Mini-preparação de DNA plasmideal (Lise Alcalina)

A primeira purificação dos plasmídeos a partir da cultura bacteriana, foi realizada pelo método de Lise Alcalina descrita por Sambrook et al. (1989), baseada na diferença da desnaturação em condições alcalinas do DNA plasmideal e do DNA cromossômico. Resumidamente, as células obtidas da cultura bacteriana e centrifugadas foram ressuspensas em 100 µL da solução I gelada (Glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM) adicionado para realizar a lise celular. Depois adicionado 200 µL da solução II preparada na hora (200 µL NaOH 0,2 N; 1 mL SDS 1% e 8,8 mL de Água estéril). Misturou-se por inversão e nesta fase houve a liberação para o meio do DNA plasmideal, restos celulares e DNA genômico da *E. coli*. Posteriormente, realizou-se a precipitação com a adição de 150 µL da solução III gelada (Acetato de potássio 5 M; Ácido acético glacial) agitando por 10 segundos. Centrifugou-se a 12.000 x *g* por 5 minutos a TA, e o sobrenadante transferido para um novo micro-tubo, isolando o plasmídeo dos restos de materiais celulares, contendo também o DNA genômico. A purificação foi realizada com a adição de 200 µL de fenol e 200 µL da solução Clorofórmio e Álcool isoamílico na proporção 24:1, submetido ao vórtex e centrifugação a 12.000 x *g* por 5 minutos a TA.

O sobrenadante (fase aquosa) recuperado foi transferido para um novo micro-tubo e adicionado 1 mL de Etanol gelado 100%. Centrifugou-se a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 500 µL de Etanol gelado 70%, centrifugou e verteu-se novamente o líquido sobrenadante, secando o DNA plasmideal em estufa por 2

horas a 37° C. Após este período, o plasmídeo foi ressuspensão em 50 µL de TE/RNase e armazenado a - 20° C.

3.4.6.2 Mini-preparação de DNA plasmideal (Invitrogen®)

Para o sequenciamento, foi necessário que o material genético estivesse ultra-puro. Desta forma, para a cepa recombinante confirmada tanto da clonagem, quanto da subclonagem, foi realizada a extração do DNA plasmideal pelo Kit de Purificação da Invitrogen®, conforme protocolo do fabricante.

O método de lise por este kit foi realizado inicialmente pela ressuspensão do precipitado celular dos recombinantes com 250 µL do tampão R3 que contém RNase. Em seguida, acrescentou-se 250 µL de tampão L7 que contém SDS, responsável pela lise. A mistura foi submetida a um repouso por 5 minutos a TA e após este período foi adicionado 350 µL do tampão N4 para a precipitação do DNA, misturando por inversão até a homogeneidade. Em seguida foi centrifugado a 12.000 x *g* por 10 minutos a TA. Posteriormente, a solução foi transferida para uma mini-coluna usando como suporte um micro-tubo. A passagem da amostra pela coluna foi realizada com centrifugação a 12.000 x *g* por 1 minuto a TA. O eluato passado pela mini-coluna foi descartado.

A extração do produto celular foi realizada através da adição de 500 µL do tampão W10 contendo Etanol adicionado na mini-coluna para lavagem e incubados por 1 minuto a TA. Centrifugou-se a 12.000 x *g* por 1 minuto a TA e o eluato presente no micro-tubo foi novamente descartado. Outra lavagem foi realizada na coluna com 700 µL do tampão W9 contendo Etanol, centrifugado a 12.000 x *g* por 1 minuto a TA. Após centrifugação, o eluato foi descartado e procedeu-se uma nova centrifugação sob as mesmas condições para remover os resíduos do tampão W9. Nesta fase, a coluna após ser limpa com papel absorvente no lado externo, foi transferida para um novo micro-tubo e submetida à extração do DNA pela adição de 75 µL de TE no centro da coluna. O TE na coluna ficou em repouso por 1 minuto a TA, em seguida foi centrifugado a 12.000 x *g* por 2 minutos a TA. As colunas foram descartadas e a mini-preparação do DNA plasmideal purificada foi identificada e armazenada a - 20° C.

3.4.7 Digestão e confirmação das clonagens

O DNA plasmideal extraído pelo protocolo de Lise Alcalina dos possíveis recombinantes foi submetido a uma digestão dupla e a clivagem realizada pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (Invitrogen®) por 2 horas a 37° C. O produto da digestão foi visualizado submetendo uma alíquota de 5 µL à eletroforese preparativa no sistema *Power Pac 200* (Bio Rad®), em gel de agarose 1% (Sigma®) e com tampão de corrida TAE 1X. Aplicou-se junto com o produto de digestão, o tampão de amostra GLB (sacarose 40%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%) na concentração de 10% do volume final. Após a corrida, o gel foi corado com EtBr e visualizado no transiluminador na luz UV.

O marcador de peso molecular utilizado foi 1 kb *DNA ladder Plus* (Invitrogen®) e esperou-se verificar ao final da eletroforese, fragmentos de aproximadamente 2,4 kb correspondente ao gene *xynB5*, de aproximadamente 2,9 kb correspondente ao plasmídeo pJET1.2/*blunt* e de 4,4 kb correspondente ao plasmídeo pTrcHisA.

3.4.8 Eletroeluição e concentração do DNA genômico para subclonagem

A subclonagem do gene *xynB5* foi realizada fazendo-se uma maxi-preparação do DNA plasmideal contendo o inserto de interesse em pJET1.2/*blunt* para obter grandes quantidades da amostra, seguido de recuperação do DNA por eletroeluição.

O gel contendo o fragmento de interesse foi cortado e acomodado no saco de diálise para a eletroeluição. Adicionou-se 400 µL de tampão TAE 0,5X no saco de diálise e deixou-se eluir a 20 V por 18 horas. Inverteu-se a polaridade da eletroforese por 5 minutos, simplesmente para favorecer a remoção do DNA que fica aderido às paredes do saco de diálise. Retirou-se a solução com o inserto e precipitou-se com 250 µL de Fenol e 250 µL da solução de Clorofórmio e Álcool isoamílico na proporção 24:1. Centrifugou-se a 12.000 x *g* por 3 minutos a TA, recuperou-se o sobrenadante (fase aquosa) para um novo micro-tubo e adicionou-se 500 µL da solução de Clorofórmio e Álcool isoamílico na proporção 24:1. Centrifugou-se a 12.000 x *g* por 3 minutos a TA, recuperou-se o sobrenadante para um novo micro-tubo, adicionou-se 1 µL de tRNA, 0,1X do volume do sobrenadante de Acetato de sódio 3 M pH 5,4 e 2,5X o volume do sobrenadante de Etanol gelado 100%. Deixou-se 18 horas a - 20° C, centrifugou-se a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4° C e verteu-se

cuidadosamente o Etanol 100%. Lavou-se novamente o micro-tubo com 500 µL de Etanol gelado 70%. Centrifugou-se nas mesmas condições do passo anterior e verteu novamente o Etanol 70%, secando o micro-tubo em estufa por 2 horas a 37° C. Após este período, o DNA foi ressuspensão em 50 µL de TE/RNase e armazenado a - 20° C.

Foi confirmado o tamanho do fragmento em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, e o inserto foi quantificado através do método espectrofotométrico a 260 nm, para obedecer à proporção de 1:3 de plasmídeo/inserto para a reação de ligação.

3.5 Sequenciamento do clone obtido

A identidade do gene *xynB5* foi confirmada pelo sequenciamento automatizado de DNA, realizando a reação de sequenciamento na Universidade Estadual do Oeste de Paraná – UNIOESTE, Cascavel/PR e a leitura realizada pelo serviço de sequenciamento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo/SP. Para a reação de sequenciamento realizado na UNIOESTE, foi usado o kit *BigDye Terminator version 2.2* (Life Technologies-Applied Biosystems®) conforme especificações do fabricante.

Para reação de sequenciamento dos clones contendo pJET1.2-*xynB5* foi realizado utilizando os primers do *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo®) e para os clones contendo o pTrcHisA-*xynB5* foi utilizado os primers *xynB5-leu-F* e *xynB5-stop-R*.

3.6 Análise da Sequência

Após a obtenção das sequências nucleotídicas do gene *xynB5* em sequenciador automatizado de DNA, as mesmas foram analisadas utilizando o programa *Clone Manager*, o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e o BLASTX do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. O alinhamento da proteína predita a partir do gene *xynB5* foi realizado com o programa Clustal W2 do EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*). A comparação dos domínios protéicos presentes na β-Glicosidase/β-Xilosidase de *C. crescentus* foi realizada com auxílio da ferramenta denominada CDART (*Conserved Domain Architecture Retrieval Tool*) disponibilizada também no NCBI.

3.7 Expressão e purificação da proteína recombinante do gene *xynB5*

3.7.1 Ensaio de expressão da proteína recombinante

As células de *E. coli* TOP10 transformada contendo o plasmídeo pTricHisA com o fragmento de interesse *xynB5* de 2,4 kb, foram submetidas a um piloto de expressão da proteína recombinante. Para este procedimento, foi feito um pré-inóculo destas células em LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). Após 16 horas, inoculou-se 100 µL da cultura em 10 mL de LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). Esta suspensão foi incubada de 2 a 3 horas a 37°C com agitação de 120 rpm até atingir a fase midi-log com DO entre 0,4 e 0,6 a 600 nm. Ao atingir a fase exponencial de crescimento, as células de *E. coli* transformadas foram induzidas com um indutor sintético denominado IPTG (isopropil-β-D-galactopiranosídeo) a uma concentração final de 0,5 e 1 mM. As células ficaram sob estas condições até 4 horas, recolhendo-se uma alíquota de 1 mL antes da indução para o controle negativo e alíquotas de 1 mL a cada hora para avaliação da expressão da proteína recombinante de interesse. Estas alíquotas foram centrifugadas a 12.000 x *g* por 3 minutos a 4°C e adicionado 200 µL de solução O (0,076 g Tris-base; 4 mL de SDS 10%; 10 µL DDT 1M; 2 mL Glicerol, 100 µL de Azul de bromofenol 1% e completar para 10 mL de Água destilada). Foram fervidas por 5 minutos a 100°C e em seguida congeladas para posterior visualização em gel desnaturante de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

3.7.2 Purificação da β-Glicosidase/β-Xilosidase V recombinante solúvel

Após indução de 50 mL de células TOP10 contendo o vetor pTriCHisA-*xynB5* nas mesmas condições realizadas para o melhor ensaio de expressão (IPTG 1 mM, incubação de 4 horas a 37°C), denominado ensaio piloto, a cultura foi centrifugada a 5.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão em solução de lise celular contendo *Fast Break Cell Lysis Reagent* 10X (Promega®), preparada conforme protocolo do fabricante onde para cada 1 mL de solução foi adicionado 880 µL do meio LB líquido, 100 µL da solução *Fast Break Cell Lysis Reagent* 1X (Promega®), 10 µL de lisozima 40 mg/mL (Sigma®), 10 µL de pool de inibidores de proteases (GE-Healthcare®) e 1

μ L DNase 122U/mL (Invitrogen®). Para 50 mL de cultura crescida, foi preparada 4 mL de solução de lise.

A mistura foi incubada sob agitação de 80 rpm por 30 minutos a 25° C. As células lisadas foram centrifugadas e o sobrenadante adicionado à coluna pré-empacotada de níquel-sepharose do Kit *His Spin Trap* (GE-Heathcare®), que permite a purificação pela triagem de proteínas contendo a cauda de histidina por cromatografia de afinidade ao níquel imobilizado a resina sepharose (IMAC). A coluna foi previamente equilibrada conforme recomendação do fabricante e a purificação foi visualizada em gel desnaturante de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE).

Para equilibrar as colunas foi adicionado 600 μ L de tampão de ligação – *Biding Buffer*, contendo Tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 5 mM, pH 7,4. A solução contendo os 4 mL do lisado celular da cultura induzida foi passada em quatro mini-colunas, sendo aplicado em cada uma o volume de 1 mL. Centrifugou-se a 1600 x *g* por 1 minuto a 4° C e neste passo as proteínas de fusão contendo a cauda de histidinas ficaram aderidas a resina de níquel-sepharose. A lavagem da coluna foi realizada com 600 μ L de tampão de lavagem – *Wash Buffer* contendo tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, pH 7,4 e centrifugado a 1600 x *g* por 1 minuto a 4° C. A eluição da proteína foi feita com tampão de eluição – *Elution Buffer* contendo diferentes concentrações de Imidazol (tampão fosfato 200 mM; NaCl 500 mM; Imidazol nas concentrações de 100 a 500 mM, pH 7,4).

Alíquotas de 5 μ L da proteína purificada foram aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE).

3.7.3 Purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante insolúvel

Após a indução nas mesmas condições realizadas para o ensaio piloto, 50 mL de células TOP10 contendo o vetor pTriCHisA-*xynB5* foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 4 mL de solução de lise celular contendo *Fast Break Cell Lysis Reagent* 10X (Promega®), preparada conforme protocolo do fabricante onde para cada 1 mL de solução foi adicionado 880 μ L do meio LB líquido, 100 μ L da solução *Fast Break Cell Lysis Reagent* 1X (Promega®), 10 μ L de lisozima 40 mg/mL (Sigma®), 10 μ L de pool de inibidores de proteases (GE-Heathcare®) e 1 μ L DNase 122U/mL (Invitrogen®). Adicionou-se 0,1% (v/v) de Triton X-100 e incubou-

se a 30°C por 15 minutos. Centrifugou a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. O precipitado contendo a fração insolúvel foi novamente ressuspensão em 4 mL da solução de lise com 1% (v/v) de Triton X-100 e 1% (v/v) de Tween 20. Incubou-se por 15 minutos a 25°C e centrifugou a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4 °C, seguido pela purificação da proteína recombinante em uma coluna de níquel-sepharose (Sigma®), seguindo o mesmo protocolo utilizado para a coluna de níquel-sepharose da GE-Heathcare® citado acima.

3.7.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para verificar a expressão e purificação da proteína recombinante, foi feita uma análise em gel desnaturante de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE).

Preparou-se as soluções *Running Gel* contendo 2,5 mL de solução L (36,2 g de Tris-base para 200 mL em pH 8,8), 3,0 mL de solução N (Acrilamida 30%), 70 µL de PA (Persulfato de Amônia 20%), 7 µL TEMED e 4,5 mL de Água destilada completando 10 mL e *Stacking Gel* contendo 1,25 mL solução M (12 g de Tris-base para 200 mL em pH 6,8), 0,75 mL solução de N, 30 µL de PA, 7 µL TEMED e 3 mL de Água destilada completando 5 mL. As soluções foram submetidas a polimerização sequencial com intervalo de aproximadamente 20 minutos entre *Running* e *Stacking Gel* e feita em cuba de eletroforese vertical modelo *Mini-Protein* (Bio-Rad®). As amostras das proteínas foram submetidas a uma corrida em eletroforético com corrente elétrica de 100 V e 1,0 mA durante 180 minutos com tampão de corrida 1X (Tris-base 0,30%; Glicina 1,44%; SDS 0,1%), juntamente com marcador de peso molecular 10 kDa *Protein Ladder* a fim de verificar a banda específica da expressão.

Ao término da corrida eletroforética, as bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após o repouso durante 2 horas na solução corante *Stain* contendo Etanol absoluto 50%, Ácido acético 7% e Camassie Blue R 250 0,4%, seguida pela descoloração com *Destain* contendo Etanol 30%, Ácido acético 7% e Água 63%, trocando esta solução com lavagens subsequentes com uma leve agitação, por períodos de 20 minutos.

3.8 Dosagem das proteínas

A quantificação das proteínas depois de confirmada a purificação no gel SDS-PAGE 9%, foi determinada pelo método colorimétrico conforme descrito por Bradford (1976). A

curva de calibração padrão foi determinada utilizando Soro Albumina Bovina (200 µg/mL) e a solução corante de Bradford contendo 0,01 g Coomassie G-250, 5 mL Etanol 100% e 10 mL Ácido fosfórico completando com Água destilada para um volume final de 100 mL. Após incubação durante 15 minutos a TA, a quantidade de proteínas foi determinada por leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Como amostra controle para o espectrofotômetro, foi utilizada uma solução contendo 100 µL de água destilada com 1 mL da solução corante de Bradford.

3.9 Determinação da atividade enzimáticas da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus*

3.9.1 β -Glicosidase

A determinação da atividade enzimática da β -Glicosidase foi realizada segundo método de Tan et al. (1987) e seguindo o protocolo adaptado por Corrêa et al. (2012), através da estimativa do *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado a partir do reagente *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG).

Uma alíquota de 25 µL da proteína recombinante foi adicionada a 0,25 mL de *p*NPG 1mg/mL, em tampão McIlvaine 0,05 M com diferentes pHs (Tabela 8). As reações foram conduzidas incubando-se em banho-Maria a 50°C, por um período de 30 a 60 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução saturada de Tetraborato de sódio. O *p*-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotômetro a 410 nm. A atividade enzimática foi expressa em 1µmol de *p*-nitrofenol liberado por minuto por mL de enzima. A solução saturada de Tetraborato de sódio foi adicionada para interromper a reação catalisada pela β -Glicosidase recombinante.

3.9.2 β -Xilosidase

A determinação da atividade enzimática da β -Xilosidase foi realizada segundo método de Tan et al. (1987) e seguindo o protocolo adaptado por Corrêa et al. (2012), através da

estimativa do ρ -nitrofenol (ρ NP) liberado a partir do reagente ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NPX).

Uma alíquota de 25 μ L da β -Xilosidase V recombinante foi adicionada a 0,25 mL de ρ NPX 1mg/mL, em tampão McIlvaine 0,05 M com diferentes pHs. As reações foram conduzidas incubando-se em banho-Maria a 50°C, por um período de 30 a 60 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução saturada de Tetraborato de sódio. O ρ -nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotômetro a 410 nm. A atividade enzimática foi expressa em 1 μ mol de ρ -nitrofenol liberado por minuto por mL de enzima. A solução saturada de Tetraborato de sódio foi adicionada para interromper a reação catalisada pela β -Xilosidase recombinante.

3.9.3 α -L-Arabinofuranosidase

A determinação da atividade enzimática da α -L-Arabinofuranosidase foi realizada segundo método de Tan et al. (1987) e seguindo o protocolo adaptado por Corrêa et al. (2012), através da estimativa do ρ -nitrofenol (ρ NP) liberado a partir do reagente ρ -nitrofenil- α -L-Arabinofuranosídeo (ρ NPA), gerando resíduos de arabinofuranosídeo e ρ -nitrofenol.

Uma alíquota de 25 μ L da proteína recombinante foi adicionada a 0,25 mL de ρ NPA 1mg/mL, em tampão McIlvaine 0,05 M com diferentes pHs. As reações foram conduzidas incubando-se em banho-Maria a 50°C, por um período de 30 a 60 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução saturada de Tetraborato de sódio. O ρ -nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 410 nm. A atividade enzimática foi expressa em 1 μ mol de ρ -nitrofenol liberado por minuto por mL de enzima. A solução saturada de Tetraborato de sódio foi adicionada para interromper a reação catalisada pela α -L-Arabinofuranosidase recombinante.

Tabela 8 – Sistema de tampão de pH McIlvaine

pH requerido*	0,2 M Na ₂ HPO ₄ (mL)	0,1 M Ácido cítrico (mL)
3	4,11	15,89
4	7,71	12,29
5	10,3	9,7
6	12,63	7,37
7	16,47	3,53
8	19,45	0,55
9	20,00	0,00

Fonte: McILVAINE (1921). *Tabela reduzida e adaptada para os pH de interesse na pesquisa.

3.10 Caracterização enzimática da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus*

3.10.1 Determinação do pH ótimo

A influência do pH sobre a atividade enzimática da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* foi verificada com a incubação de 5 μ L da enzima purificada, 20 μ L de tampão McIlvaine específico para cada pH na faixa de 3 a 9, adicionados em 250 μ L dos substratos ρ NPG e ρ NPX 1mg/mL separadamente, em banho-Maria, por 60 minutos a 50° C. Finalizando a reação com 1 mL de Tetraborato de sódio saturado e posteriormente lido em espectrofotômetro a 410 nm.

3.10.2 Determinação da temperatura ótima

A influência da temperatura ótima sobre a atividade enzimática da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* foi estimada incubando-se 5 μ L da enzima purificada, 20 μ L de tampão McIlvaine no pH ótimo para cada substrato, adicionado em 250 μ L dos substratos ρ NPG e ρ NPX 1mg/mL separadamente, em banho-Maria, por 60 minutos e com temperaturas

variando de 30 a 70° C. Foi finalizada a reação com 1 mL de Tetraborato de sódio saturado e posteriormente lido em espectrofotômetro a 410 nm.

3.10.3 Constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para os substratos ρ NPG e ρ NPX

As propriedades cinéticas da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V purificada foram determinadas realizando-se o ensaio da atividade enzimática nas condições ótimas de pH e temperatura, variando a concentração dos substratos ρ NPG e ρ NPX de 0,5 a 15 mM. A constante de Michaelis-Menten (K_m) foi determinada com a concentração do substrato no qual metade da taxa máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) foi atingida e calculada plotando 1 sobre a atividade específica da enzima versus 1 sobre a concentração dos substratos. Os ensaios foram realizados em duplicata e os parâmetros cinéticos calculados baseados no método do duplo recíproco de Lineweaver e Burk (1934).

3.11 Análise estatística

Os ensaios de caracterização enzimática foram realizadas em duplicatas, com repetições para os dados inconsistentes. Os dados foram plotados no programa estatístico Origin® 6.0 (Data Analysis and Technical Graph) e Excel, e analisados através da dispersão das médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Visualização e confirmação da amplificação

Com o objetivo de clonar o gene *xynB5* de *C. crescentus*, o DNA genômico deste microrganismo foi utilizado como molde para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com adição dos oligonucleotídeos *xynB5-leu* e *xynB5-stop* (Tabela 4). O produto do PCR obtido foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão de corrida TAE 1X, levando a confirmação da amplificação do fragmento de interesse de 2.421 pares de bases (Figura 8).

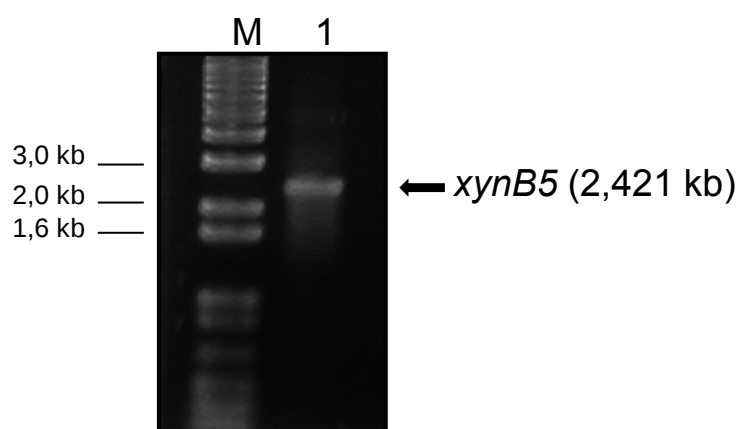


Figura 8 – Gel de eletroforese em agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X mostrando gene *xynB5* de *C. crescentus* amplificado por PCR. **(M)** Marcador de peso molecular 1 kb *DNA ladder Plus* (Invitrogen®). **(1)** 5 μ L Produto do PCR: fragmento de 2,421 kb correspondente ao gene *xynB5* de *C. crescentus*. Gel corado com EtBr e visualizado em luz UV.

4.2 Digestão e confirmação das clonagens

O produto de PCR correspondendo ao gene *xynB5* foi quantificado através do método espectrofotométrico em 260 nm obtendo uma concentração de 0,9 μ g/ μ L de DNA. Em seguida, recebeu um tratamento para obtenção de extremidades não-coesivas com a enzima *DNA Blunting*. Foi ligado no plasmídeo pJET1.2/*blunt*, que apresenta um gene de resistência

a ampicilina (Amp^R), com o auxílio da enzima T4 DNA *Ligase*, seguindo a proporção 1:3 de plasmídeo/inserto. Esta reação foi usada para transformar a *E. coli* TOP10 quimicamente competente. As colônias crescidas em meio LB ágar com ampicilina, foram inoculadas em meio LB líquido com o mesmo antibiótico, para crescimento, proliferação plasmideal e para realizar a mini-preparação de DNA plasmideal do pJET1.2/*blunt* supostamente ligado ao gene *xynB5*, de acordo com o protocolo de Lise Alcalina descrito em Material e Métodos (SAMBROOK et al., 1989).

O DNA plasmideal purificado obtido, primeiramente foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III por 2 horas a 37°C para a sua linearização, liberando um fragmento de aproximadamente 5,3 kb para a colônia 5 (Figura 9). Foram testadas 11 colônias crescidas no LB ágar e somente para a colônia 5 confirmou-se a clonagem. Posteriormente, estas 11 colônias foram reanalisadas através de uma segunda digestão dupla *Eco*RI/*Hind*III. Formou-se o inserto de tamanho 2,421 kb, correspondente ao gene *xynB5*, para a colônia 5 (Figura 10).

Para obter a proteína β -Glicosidase/ β -Xilosidase de *C. crescentus* em quantidades suficientes para realizar a purificação e os testes bioquímicos de caracterização enzimática, foi necessário subclonar o gene *xynB5* em um vetor de expressão. A partir da colônia 5, a qual foi confirmada a clonagem (Figura 9 e 10), foi realizada uma maxi-preparação de DNA plasmideal e feita a eletroeluição do DNA de interesse. A quantificação do inserto foi realizada através do método espectrofotométrico a 260 nm, obtendo uma concentração de 0,45 μ g/ μ L de DNA, o qual foi ligado no vetor de expressão pTrcHisA, que apresenta um gene de resistência a ampicilina, com auxílio da T4 DNA *Ligase*, e que leva a super-expressão do gene fusionado a uma cauda de histidinas na extremidade amino-terminal na presença do indutor sintético IPTG.

A confirmação da subclonagem foi realizada primeiro pela visualização no gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X do fragmento de aproximadamente 6,8 kb, após digestão do produto da mini-preparação de DNA plasmideal com a enzima de restrição *Hind*III (Figura 11). E depois pela visualização no gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X dos fragmentos 2,421 kb, correspondente ao gene *xynB5* e 4,4 kb, correspondente ao vetor de expressão pTrcHisA (Figura 12), após digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI/*Hind*III do produto da mini-preparação de DNA plasmideal.

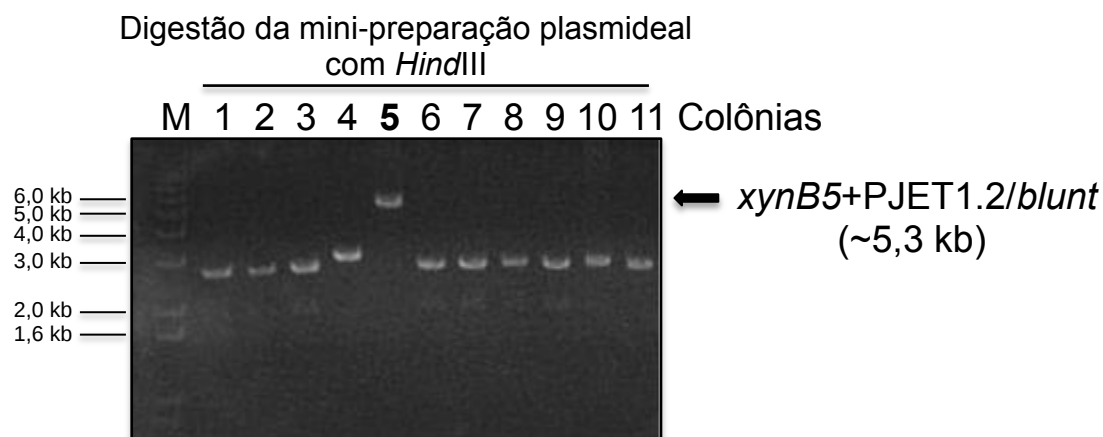


Figura 9 – Confirmação da clonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com enzima de restrição *Hind*III. **(M)** Marcador de peso molecular 1 kb *DNA ladder Plus* (Invitrogen®). **(5)** Confirmação da clonagem do gene *xynB5* no plasmídeo pJET1.2/*blunt*, após digestão do DNA plasmideal com *Hind*III que gerou um fragmento de aproximadamente 5,3 kb (*xynB5* 2,421 kb + pJET1.2/*blunt* 2,974 kb). As demais canaletas (1-4 e 6-11), mostram apenas o plasmídeo linearizado de 2,974 kb. Gel corado com EtBr e visualizado em luz UV.

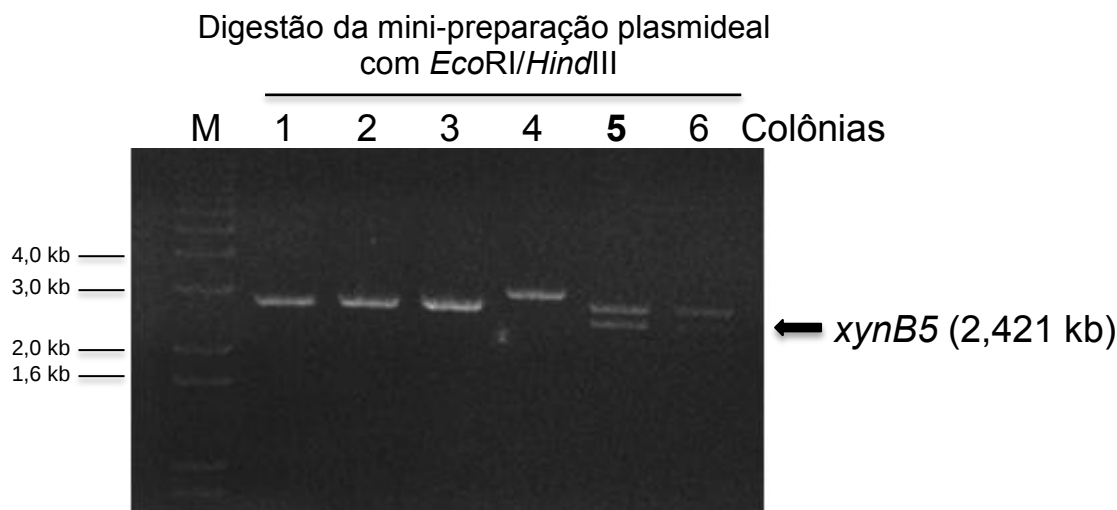


Figura 10 – Confirmação da clonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI/*Hind*III. **(M)** Marcador de peso molecular 1 kb *DNA ladder Plus* (Invitrogen®). A clonagem foi confirmada nas digestões mostradas nas canaletas **(5)** e **(6)** porque gerou fragmentos de 2,421 kb (*xynB5*) e 2,974 kb (pJET1.2/*blunt*). O clone **(5)** foi selecionado para experimentos subsequentes. As demais canaletas (1-4), mostram apenas o plasmídeo linearizado de 2,974 kb. Gel corado com EtBr e visualizado em luz UV.

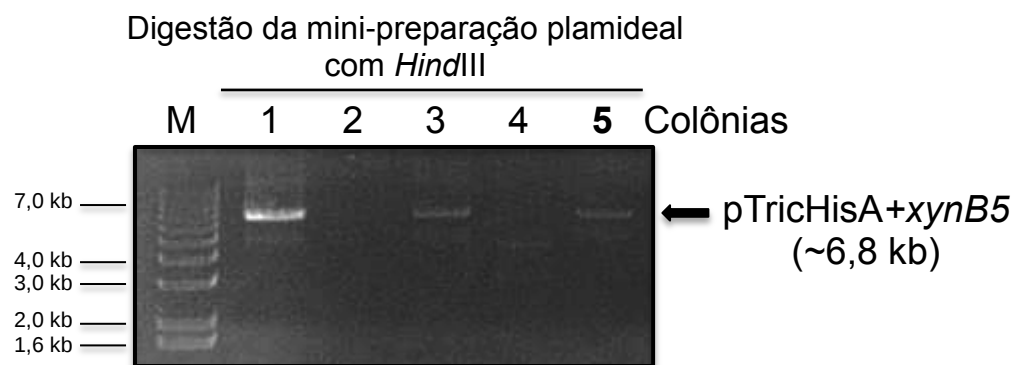


Figura 11 – Confirmação da subclonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com enzima de restrição *Hind*III. **(M)** Marcador de peso molecular 1 kb *DNA ladder Plus* (Invitrogen®). Nas canaletas **(1)**, **(3)** e **(5)** ocorreu a confirmação da subclonagem do gene *xynB5* no plasmídeo pTrcHisA, após digestão do DNA plasmideal com *Hind*III que gerou um fragmento de aproximadamente 6,8 kb (*xynB5* 2,4 kb + pTrcHisA 4,4 kb). As demais canaletas (2 e 4), não obteve-se produto de digestão. Gel corado com EtBr e visualizado em luz UV.

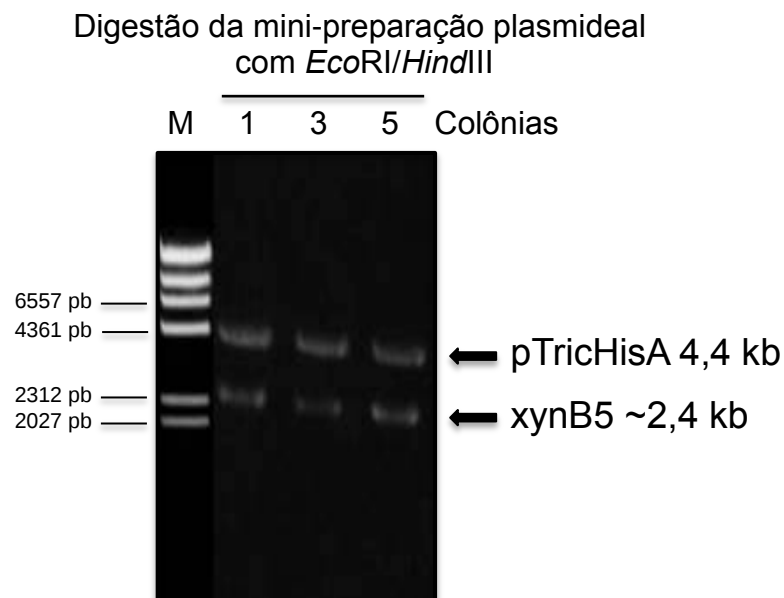


Figura 12 – Segunda confirmação da subclonagem em gel de agarose 1% com tampão de corrida TAE 1X, após digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI/*Hind*III. **(M)** Marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (Invitrogen®). As canaletas **(1)**, **(3)** e **(5)** correspondem aos clones previamente confirmados na digestão com *Hind*III. O plasmídeo pTrcHisA de 4,4 kb e o gene *xynB5* de *C. crescentus* de aproximadamente 2,4 kb estão indicados por setas.

4.3 Análise das sequências

A análise da sequência do gene *xynB5* de *C. crescentus* e da sua proteína foi obtida utilizando o programa *Clone Manager* e os algoritmos BLAST e BLASTX do NCBI. Este gene que possui 2.421 nucleotídeos que codificam para 806 aminoácidos, formando uma enzima de aproximadamente 95 kDa (Figura 13).

```
1  ATGAACACCACCCTCACCCGCCGCTGTTCGGCGCGAGTCTCGCGGCCCTGTCCGCCGCAGCC
1  M N T T L T R R L F G A S L A A L S A A A
64 CTGCCCAGCCTGGCGCAAGCCGCCGCAAGCCCCAAGACCTCGGGCGGCAAGCCGCTTTAC
22 L P S L A Q A A G Q A P K T S G G K P L Y
127 AAGGATCCGACCCAGCCGGTCGACGCGCGCATCCAGGACCTGCTGTGCGCGCATGACCTGGAG
43 K D P T Q P V D A R I Q D L L S R M T L E
190 GAGAAGGCCGCCAGCTGATCGGCATCTGGCTGACCAAGGCCAAGATCCAGACGCCGGAAGGC
64 E K A A Q L I G I W L T K A K I Q T P E G
253 GAGTTCTCGGCCGAGCAGGCCAGCAAGAACTTCCCGCACGGCCTTGGCCAGATCTCGCGCCCG
85 E F S A E Q A S K N F P H G L G Q I S R P
316 TCCGACCGCAAGGGCGCCAAGCCGGTGACGGTGATCGGCGCGGCCGCCGGCGCCGACGACGGA
106 S D R K G A K P V T V I G A A A G A D D G
379 GCCATCAACCGTAACGCCGCCGAAACCGCCCGCTACACCAACGCCGCCCAGAAGTGGGCGATC
127 A I N R N A A E T A R Y T N A A Q K W A I
442 GAAAAAACCCGCCTGGGCATCCCGCTGCTCATGCACGACGAGGCCCTGCACGGCTATGTGGCG
148 E K T R L G I P L L M H D E A L H G Y V A
505 CGCGATGCGACCAGCTTCCCGCAGTCGATCGCCCTGGCCTCGACCTTCGACACCGAACTGACC
169 R D A T S F P Q S I A L A S T F D T E L T
568 GAGAAGATCTTCGCGGTGCGCGCCCGCGAAATGCGGGCCCGCGGCTCGAACCTGGCCCTGGCC
190 E K I F A V A A R E M R A R G S N L A L A
631 CCGGTGGTTCGACGTGGCCCGCGACCCGCGCTGGGGCCGCATCGAGGAGACCTACGGCGAAGAC
211 P V V D V A R D P R W G R I E E T Y G E D
694 CCGCACCTGTGCGCCGAGATCGGCCTGGCCTCGATCCGCGGCTTCCAGGGAGCGACCTGCCC
232 P H L C A E I G L A S I R G F Q G A T L P
757 CTGGCCAAGGACAAGGTGTTCTGTCACCCTCAAGCACATGACCGGCCATGGCCAGCCCGAGAAC
253 L A K D K V F V T L K H M T G H G Q P E N
820 GGCACCAATGTCTGGTCCGGCCAGATCGCTGAGCGCACCTGCGCGAGAACTTCTTCCCGCCG
274 G T N V G P A Q I A E R T L R E N F F P P
883 TTCGAGCGCGCGGTGACCGAACTGCCGGTGCGCGCGGTCTATGCCAGCTATAACGAGATCGAC
295 F E R A V T E L P V R A V M P S Y N E I D
946 GGCGTGCCCTCGCACGCCAACCGCTGGCTGCTGACCAAGATCCTGCGCGAGGAGTGGGGCTAC
316 G V P S H A N R W L L T K I L R E E W G Y
1009 AAGGGCTCGATCCAGAGCGACTACTTCCGCATCAAGGAGATGATCAGCCGTCACAAGCTGACC
337 K G S I Q S D Y F A I K E M I S R H K L T
1072 AGCGATCTGGGCGAGACGGCCGTGATGGCCATGCGCGCCGGCGTTCGATGTGAGCTGCCCCGAC
358 S D L G E T A V M A M R A G V D V E L P D
1135 GGCGAGGCCTACGCCCTGATCCCCGAGCTGGTGAAGGCCGGCCGCATCCCGCAGTTCGAGGTC
379 G E A Y A L I P E L V K A G R I P Q F E V
1198 GACGCCGCCGTCGCCCCGGGTGCTGGAGATGAAGTTCCAGGCCGGTCTCTTCGAGAACCCTAC
400 D A A V A R V L E M K F Q A G L F E N P Y
1261 TGCGACGAGAAGACCGCCGACGCCAAGACCGCCACGCCGACGCCGTCGCCCTGGCCCCGCGAA
421 C D E K T A D A K T A T P D A V A L A R E
1324 GCCGCCCGCAAGTCCGTGGTCTCTTGAAGAACGACAAGGGCCTGCTGCCCTGGACGGCAAG
442 A A R K S V V L L K N D K G L L P L D G K
1387 AAGTTCAAGCGCATGGCGCTCCTGGGCACCCACGCCAAGGACACGCCGATCGGCGGCTATTG
```

```

463   K F K R M A L L G T H A K D T P I G G Y S
1450 GACATCCCGCGTCACGTGGTCTCGATCCACGAGGGCCTGACCGCCGAGGCCAAGGCCAGGGC
484   D I P R H V V S I H E G L T A E A K A Q G
1513 TTCGCGCTCGACTACGCCGAGGCCGTGCGGATCACCGAGCAGCGCATCTGGGCCCAGGACGCG
505   F A L D Y A E A V R I T E Q R I W A Q D A
1576 GTCAACTTCACCGACCCGCGCGTCAACGCGAAACTCATCGCGGAAGCCGTGAGGTGCGCAAG
526   V N F T D P A V N A K L I A E A V E V A K
1639 AAGGCCGATATCGTGGTTCATGGTGTGGGCGACAACGAGCAGACCAGCCGCGAGGCCTGGGCC
547   K A D I V V M V L G D N E Q T S R E A W A
1702 GACCATCACCTGGGCGACCGTGACAGCCTGGACCTGATGGGCCAGCAGAACGACCTGGCCCGC
568   D H H L G D R D S L D L M G Q Q N D L A R
1765 GCGATCTTCGATCTGGGCAAGCCGACCGTGGTGTTCCTGCTCAACGGCCGTCCGCTGTGATC
589   A I F D L G K P T V V F L L N G R P L S I
1828 AACCTGCTGAAAGAGCGCGCCGACGCCATCATCGAGGGCTGGTACCTGGGCCAAGAGACCGGC
610   N L L K E R A D A I I E G W Y L G Q E T G
1891 CACGCCGCCGCCGACGTGCTGTTCGGCCGCGCCAATCCGGGCGGCAAGCTGCCGGTCAGCATC
631   H A A A D V L F G R A N P G G K L P V S I
1954 GCCCGCGACGTGCGCCAGCTGCCGGTCTACTACAACCGCAAGCCCACGGCCCCGCGGGCTAT
652   A R D V G Q L P V Y Y N R K P T A R R G Y
2017 CTGGATGGCGAGACCACCCCGCTCTACCCGTTTCGGTTTCGGCCTGTCTGACACCACTTCGAC
673   L D G E T T P L Y P F G F G L S Y T T F D
2080 GTCTCGGCGCCGCGCCTGGCCAAGGCCAAGATCGGCCAGGGCGAGACCGTCAAGGTGAGGTC
694   V S A P R L A K A K I G Q G E T V K V E V
2143 GATGTGACCAACACCGCAAGGTGGCCGCGACGAGGTGGTCCAGCTCTATGTCCACGACGAG
715   D V T N T G K V A G D E V V Q L Y V H D E
2206 GCGGCCTCGGTACCCCGTCCGGTGTGAGCTCAAGCACTTCAAGCGCGTCACCCTGGCCCCC
736   A A S V T R P V L E L K H F K R V T L A P
2269 GGCGCCAAGACCACGGTCACCTTCGAGATCAAGCCCTCGGACCTGTGGATGTGGAACCTGGAC
757   G A K T T V T F E I K P S D L W M W N L D
2332 ATGAAGCGCGTGGTTCGAGCCCGGCGACTTCTCGATCCTGGTGGGCCCCAACTCCGTGGACCTG
778   M K R V V E P G D F S I L V G P N S V D L
2395 AAGAAGACGACGCTGACGGTCGCTTAA
799   K K T T L T V A *

```

Figura 13 – Estrutura do gene *xynB5* (CCNA 03149) de *C. crescentus* obtida após etapas de clonagem. A figura acima gerada com o programa *Clone Manager*, corresponde a sequência nucleotídica do gene *xynB5* de *C. crescentus* que é composta por 2.421 pares de bases que codificam para uma proteína predita de 806 aminoácidos. Os códons de início (ATG) e término (TAA) de tradução estão destacados em negrito na sequência nucleotídica, bem como a sequência em aminoácidos da proteína predita. As regiões sublinhadas correspondem as sequências nucleotídicas usadas para o desenho dos oligonucleotídeos empregados na reação de PCR para as etapas de clonagem.

O plasmídeo pJET1.2/*blunt* contendo o gene *xynB5* correspondente ao clone 5 (Figura 9 e 10) foi usado como molde para uma reação de sequenciamento de DNA automatizado usando oligonucleotídeos universais do próprio vetor de clonagem. A sequência obtida foi comparada com outras depositadas no GenBank com auxílio do algoritmo BLAST. A sequência do gene *xynB5* foi confirmada mostrando 99% de identidade com a sequência de β -Glicosidase/ β -Xilosidase de *C. crescentus* cepa NA1000. Também obteve-se esta mesma porcentagem de identidade para a β -Xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase de *C. crescentus* cepa CB15. Este fato justifica o uso do substrato pNPA para testar a atividade enzimática.

O plasmídeo pTrcHisA contendo o gene *xynB5* correspondente aos clones 1, 3 e 5 (Figura 11 e 12) foram usados como molde para uma reação de sequenciamento de DNA automatizado com os oligonucleotídeos específicos do gene (Tabela 4 e destacados na Figura 13). A sequência do gene *xynB5* novamente foi confirmada mostrando 99% de identidade com a sequência de β -Glicosidase/ β -Xilosidase de *C. crescentus* cepa NA1000 para o clone 1 e 5, e 98% de identidade para o clone 3. Também obteve-se estas mesmas identidades para a β -Xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase de *C. crescentus* cepa CB15. Estes dados sugerem fortemente que foi efetuado a clonagem correta do gene *xynB5*.

A sequência nucleotídica com o auxílio do algoritmo BLASTX gerou uma proteína com elevada similaridade com outras β -Xilosidases de espécies do gênero *Caulobacter* como *C. vibrioides* (92%) e *C. segnis* (92%), além de alta similaridade com bactérias de outro gênero como a *Asticcacaulis excentricus* (77%), *A. benevestitus* (76%) e *Duganella zoogloeoidea* (74%).

Quando o produto do gene *xynB5* é comparado com as outras β -Xilosidases de *C. crescentus*, nota-se uma baixa similaridade das sequências entre si, o que sugere que as mesmas desempenham papéis complementares durante o metabolismo das hemiceluloses. Esta diversidade entre as proteínas para que a *C. crescentus* é importante para que ela possa explorar diferentes substratos vegetais (CORRÊA, 2011).

4.4 Ensaio de expressão da proteína recombinante

As cepas recombinantes contendo o gene *xynB5* de *C. crescentus* foram submetidas à expressão para produção em quantidades maiores da proteína heteróloga em *E. coli*. Primeiro realizou-se um piloto de expressão com os clones 1, 3 e 5 (Figura 11 e 12) para posteriormente, nas mesmas condições, realizar a purificação da proteína recombinante

expressa. Os clones foram crescidos em LB líquido com ampicilina sob agitação de 120 rpm a 37°C até a fase midi-log. Após atingir o crescimento desejado, houve a indução da expressão com IPTG 1 mM e o período de indução foi de 4 horas. Retirou-se uma alíquota de 1 mL antes da indução para ser usado como controle e uma alíquota de 1 mL a cada 1 hora de indução.

Observou-se uma banda evidente, ressaltando a expressão da proteína recombinante visualizada no gel desnaturante de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) correspondente à proteína β -Glicosidase/ β -Xilosidase de *C. crescentus*, que apresentou uma estrutura protéica de aproximadamente 95 kDa nos intervalos de 1 a 4 horas de indução (Figura 14).

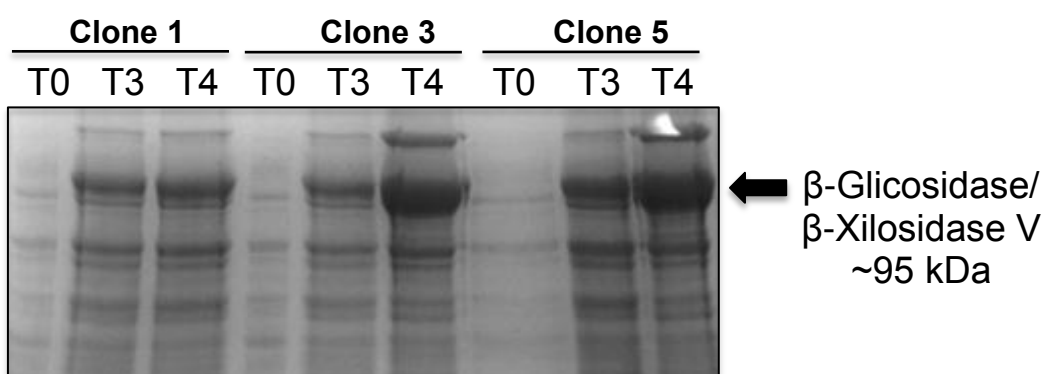


Figura 14 – Ensaio de indução de expressão do gene *xynB5* de *C. crescentus*. Células de diferentes clones de *C. crescentus* contendo a construção pTriCHis-*xynB5* foram crescidas até fase exponencial e induzidas durante 4 horas com 1 mM de IPTG. Nos tempos de 0, 3 e 4 horas alíquotas das células foram coletadas, centrifugadas e o precipitado celular lisado com tampão de lise de eletroforese de proteínas. Amostras de 20 μ L do extrato bruto celular preparado foram resolvidos em um gel SDS-PAGE 9%. A flecha a direita resalta a indução da β -Glicosidase/ β -Xilosidase recombinante de *C. crescentus* expressa.

4.5 Purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante solúvel

Paralelamente ao ensaio piloto de expressão, a β -Glicosidase/ β -Xilosidase recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade, conforme descrito em Material e Métodos com concentrações crescentes de Imidazol e o protocolo para proteínas solúveis. Uma boa eficiência na purificação pode ser visualizada no gel desnaturante de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) (Figura 15).

Como mencionado anteriormente, este gene que possui 2.421 pb, que codifica uma proteína bifuncional para β -Glicosidase/ β -Xilosidase, expressa uma proteína com aproximadamente 95 kDa. A cauda de histidina favoreceu a purificação da proteína por cromatografia de afinidade usando colunas empacotadas de níquel-sepharose. As cargas positivas da cauda de histidina ligaram-se a carga negativa da resina para garantir a purificação.

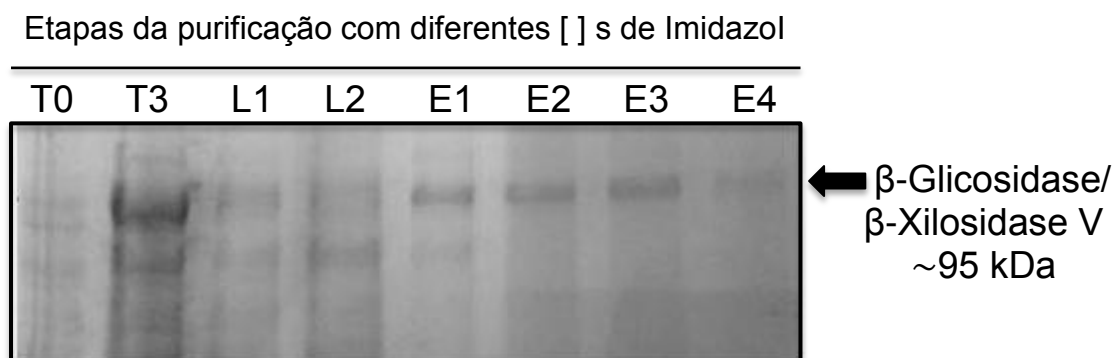


Figura 15 – Confirmação da expressão e purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V em gel SDS-PAGE 9%. **(T0)** Extrato protéico da cepa *E. coli* TOP10 contendo a construção pTrcHisA-xynB5 na ausência de IPTG. **(T3)** Extrato protéico induzido com 1mM de IPTG no tempo 3 horas. **(L1 e L2)** Alíquotas da lavagem da coluna de níquel-sepharose com 20 mM de Imidazol. **(E1-E4)** Alíquotas da proteína recombinante purificada, anteriormente adicionadas a coluna de níquel sepharose e eluidas em tampão fosfato de sódio contendo diferentes concentrações do Imidazol. **(E1)** Eluida com 100 mM de Imidazol. **(E2)** Eluida com 200 mM de Imidazol. **(E3)** e **(E4)** Eluida com 500 mM de Imidazol.

Foi realizado um segundo ensaio de expressão do gene *xynB5* e purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus*, para visualização de uma alíquota do precipitado no gel SDS-PAGE 9% (Figura 16). A *E. coli* é o microrganismo hospedeiro para expressão de proteínas mais frequentemente utilizado pela simplicidade e velocidade de multiplicação celular (ARAKAWA et al., 2003), porém a expressão frequentemente pode levar a proteínas agregadas e insolúveis expressas em corpos de inclusão (LEFEBVRE et al., 2004).

Os corpos de inclusão normalmente estão localizados no citoplasma, embora também possam ser formados no espaço periplasmático bacteriano (QORONFLEH et al., 2007). Desta forma, houve a confirmação de agregados de corpos de inclusão produzidos por *E. coli*, durante a super-expressão da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus*.

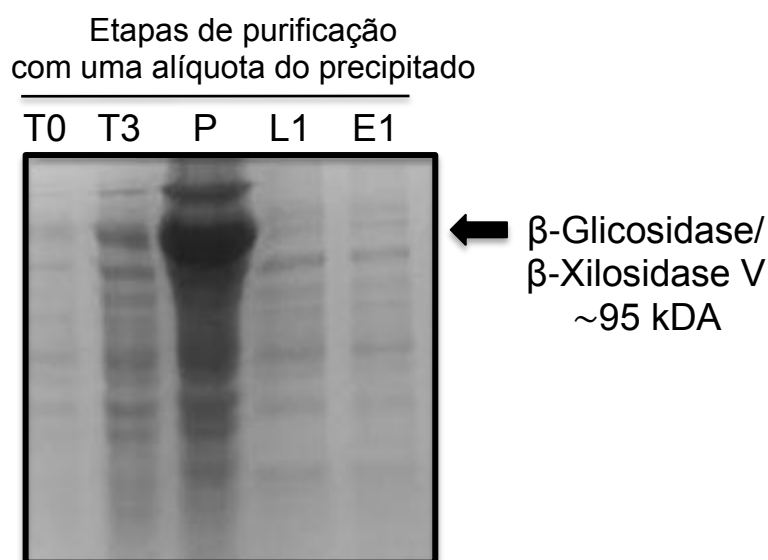


Figura 16 – Gel SDS-PAGE 9% indicando as etapas de indução da expressão do gene *xynB5* e purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V multifuncional de *C. crescentus*. **(T0)** e **(T3)** Correspondem aos tempos de 0 e 3 h de indução com IPTG, respectivamente. **(P)** Refere-se a uma alíquota de 10 μ L do precipitado celular após lise com a solução *Fast Break Cell Lysis*. **(L1)** Indica a primeira lavagem da coluna de níquel-sepharose com tampão fosfato de sódio contendo 20 mM de Imidazol após a passagem do lisado. **(E1)** Corresponde a uma alíquota de 10 μ L da proteína recombinante eluída com tampão fosfato contendo 500 mM de Imidazol.

4.6 Purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante insolúvel

Para verificar se era possível aumentar as atividades enzimáticas obtidas, caso fosse retiarada a proteína recombinante dos corpos de inclusão, foi realizada uma terceira purificação seguindo o protocolo de purificação para proteínas insolúveis detalhada em Material e Métodos.

Na primeira etapa, a lise foi realizada conforme o protocolo de proteínas solúves e além disso, utilizando 0,1% de Triton X-100 (v/v). O lisado foi purificado em coluna de níquel sepharose e uma alíquota deste extrato purificado foi adicionada em um gel SDS-PAGE 9% (Figura 17) e testado a atividade enzimática para diferentes substratos, descrito no item 4.7.

Na segunda etapa, a lise foi realizada utilizando também 1% de Triton X-100 (v/v) e 1% de Tween 20 (v/v). Uma alíquota do extrato parcialmente purificado em coluna de níquel sepharose foi adicionada em um gel SDS-PAGE 9% (Figura 17) e testado a atividade enzimática para diferentes substratos, descrito no item 4.7.

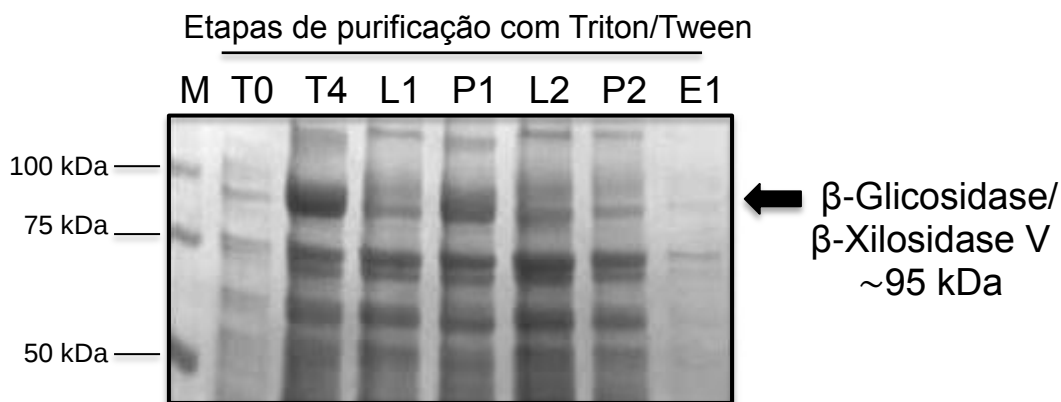


Figura 17 – Etapas de purificação da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* a partir de corpos de inclusão. As células de *E. coli* foram crescidas até a fase log e induzidas com 1 mM de IPTG por 0 (**T0**) a 4 horas a 37°C (**T4**). Células super-expressando a β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante foram lisadas com 0,1% de Triton X100 (v/v), passado na coluna de níquel-sepharose (Sigma®) e eluída em tampão fosfato de sódio contendo 500 mM de Imidazol (**L1**). O primeiro precipitado (**P1**) gerado após esta lise apresentou ainda a proteína recombinante induzida sugerindo que são expressas em corpos de inclusão. O **P1** foi novamente lisado com 1% de Triton X100 e 1% de Tween 20, como descrito em Material e Métodos. O segundo lisado (**L2**) evidenciou a presença da proteína recombinante que foi purificada em coluna de níquel-sepharose (Sigma®). Entretanto, uma quantidade significativa da proteína recombinante ainda ficou retida no precipitado como mostra o SDS-PAGE 9% acima (**P2**). A β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* foi eluída em tampão fosfato de sódio contendo 500 mM de Imidazol e obtida a enzima parcialmente purificada (**E1**).

4.7 Determinação das atividades enzimáticas da proteína purificada

Para os extratos purificados através do protocolo de purificação para proteínas solúveis apresentados na Figura 15, foram dosadas as atividades enzimáticas com os substratos ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NPX), ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPG) e ρ -nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (ρ NPA) 1mg/mL. Estes substratos foram diluídos em tampão McIlvaine a pH 4, 5, 6 e 7. A enzima recombinante purificada apresentou atividade para os três substratos testados sendo predominante a atividade da β -Glicosidase (Tabela 9).

Para os extratos purificados através do protocolo de purificação para proteínas insolúveis apresentados na Figura 17, foram dosadas as atividades enzimáticas com os substratos ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NPX), ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPG) e ρ -nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (ρ NPA) 1mg/mL. Estes substratos foram diluídos em tampão McIlvaine a pH 6.

Além das atividades apresentarem-se menores na segunda purificação, a enzima foi parcialmente purificada. Desta forma, foi utilizado o protocolo de purificação de enzimas solúveis para proceder com a caracterização enzimática.

Tabela 9 – Atividade enzimática da proteína recombinante purificada através de protocolo de purificação de proteínas solúveis na presença de diferentes substratos. Os dados foram epressos em atividade enzimática total (U/mL) e em atividade enzimática específica (U/mg de proteína total). Representam a média aritmética de duas análises independentes.

pH	Atividade Enzimática			Atividade Enzimática		
	U/mL			U/mg		
	β -Xil	β -Glic	α -Ara	β -Xil	β -Glic	α -Ara
4,0	3,75	4,00	2,72	0,039	0,04	0,028
5,0	3,90	4,01	2,91	0,040	0,041	0,030
6,0	4,30	7,60	2,99	0,044	0,078	0,031
7,0	3,81	4,87	2,72	0,039	0,050	0,028

Tabela 10 – Atividade enzimática da proteína recombinante purificada através de protocolo de purificação de proteínas insolúveis na presença de diferentes substratos. Os dados foram epressos em atividades enzimáticas totais (U/mL) e em atividade específica (U/mg de proteína total). Representam a média aritmética de duas análises independentes.

Extrato	Atividade Enzimática			Atividade Enzimática		
	U/mL			U/mg		
	β -Xil	β -Glic	α -Ara	β -Xil	β -Glic	α -Ara
Lisado 1 (L1)	0,75	0,28	0,17	0,010	0,003	0,002
Lisado 2 (L2)	2,58	1,59	0,81	0,035	0,021	0,011
Purificado (E1)	1,78	1,14	0,52	0,018	0,011	0,005

L1 (extrato purificado): *xynB5*-rec lisado com *Fast Break Cell Lysis* e 0,1% Triton X100 (v/v). Purificado em coluna de níquel-sepharose e eluida em tampão fosfato de sódio contendo 500 mM de Imidazol.

L2 (extrato bruto): *xynB5*-rec lisado primeiro com *Fast Break Cell Lysis* e 0,1% Triton X100 (v/v), e uma segunda lise com 1% de Triton X100 e Tween 20 (v/v).

E1 (extrato purificado): *xynB5*-rec lisado primeiro com *Fast Break Cell Lysis* e 0,1% Triton X100 (v/v), e uma segunda lise com 1% de Triton X100 e Tween 20 (v/v). Purificado em coluna de níquel-sepharose e eluida em tampão fosfato de sódio contendo 500 mM de Imidazol.

4.8 Caracterização enzimática da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus*

A proteína recombinante mostrou-se ativa na presença de diferentes substratos tanto usando o protocolo de proteínas solúveis como o de proteínas insolúveis (Tabela 9 e 10). Assim, optou-se por fazer a caracterização enzimática da proteína de fusão a partir das amostras obtidas no protocolo de proteína solúveis, visto que este forneceu um rendimento com maior teor de purificação, ou seja, apenas uma banda de tamanho esperado foi visualizada no gel SDS-PAGE 9% (Figura 15) e uma maior atividade enzimática (Tabela 9). Entretanto, vimos em ambas as purificações, que embora a proteína reconheça e metabolize três diferentes substratos, a atividade enzimática obtida para ρ NPA foi muito acanhada. Assim, os ensaios de caracterização concentraram-se apenas na atividade contra ρ NPG e ρ NPX.

4.8.1 Determinação do pH ótimo

A enzima recombinante β -Glicosidase/ β -Xilosidase V após purificação seguindo o protocolo de proteínas solúveis, passou por ensaios de caracterização bioquímica. O primeiro parâmetro bioquímico analisado foi o pH ótimo em diferentes tampões McIlvaine, pHs de 3 a 9, com os substratos pNPG e pNPX 1mg/mL. Esta reação foi realizada em banho-Maria 50° C incubada por 60 minutos e finalizada com Tetraborato de sódio saturado. A reação foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 410 nm.

A enzima apresentou atividades enzimáticas na faixa de pHs de 3 a 9, sendo o pH ótimo 6, onde obteve-se a maior atividade enzimática tanto para o substrato pNPG quanto pNPX (Figura 18).

Este pH ótimo foi observado para outras duas β -Xilosidasas de *C. crescentus* purificadas e caracterizadas como a β -Xilosidase I, produto do gene *xynB1* (GRACIANO et al., 2012) e a β -Xilosidase II, produto do gene *xynB2* (CÔRREA et al., 2012).

Também foi observado este pH para a enzima bifuncional β -Glicosidase/ β -Xilosidase, produto do gene *RubGX1* bacteriano estudado por abordagens metagenômicas (ZHOU et al., 2012). A enzima multifuncional β -Glicosidase/ β -Xilosidase/ α -Arabinosidase do gene *Bgxa1* bacteriano estudado por abordagens metagenômicas, apresentou pH ótimo 6 para o substrato pNPG, pH 8,5 e 6,5 respectivamente para os substratos pNPX e pNPA (GRUNINGER et al., 2014). Ainda apresentou pH 6,2 para uma β -Glicosidase extraída de uma bactéria anaeróbica termofílica (PATCHETT et al., 1987) e pH de 6 a 6,5 para uma β -Glicosidase de *Streptomyces sp.* (ATCC 11238) (PÉREZ-PONS et al., 1995).

As enzimas bifuncionais β -Glicosidase/ β -Xilosidase do crustáceo *Cardisoma armatum* apresentou pH ótimo 5,6 (YA, 2014) e do fungo *Mucor circinelloides* apresentou pH ótimo 5 (YUHONG et al., 2014).

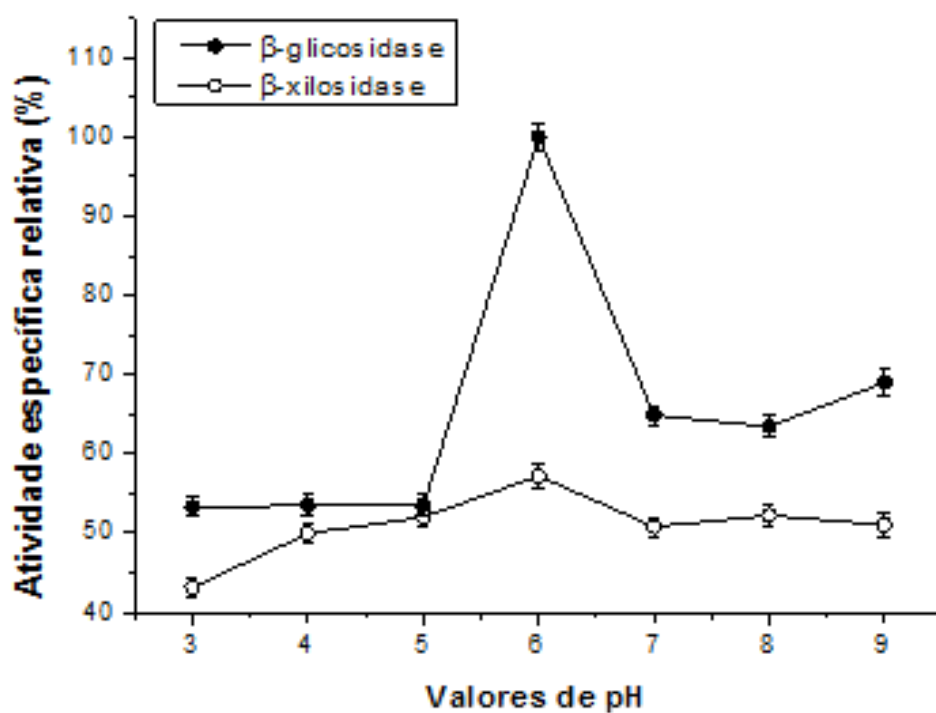


Figura 18 – Efeito do pH na atividade enzimática da β-Glicosidase/β-Xilosidase V recombinante sobre o substrato sintético ρNPG e ρNPX e determinação do pH ótimo. A atividade de β-Glicosidase e β-Xilosidase foi mensurada por incubação da enzima com os substratos ρNPG (●) e ρNPX (◻) na presença de tampão McIlvaine em pHs crescentes de 3 a 9. A reação foi incubada por 60 minutos a 50 ° C. Os valores foram apresentados em relação ao pH que apresentou maior atividade (pH 6) como 100%.

4.8.2 Determinação da temperatura ótima

Após a determinação do pH ótimo da enzima, foram testadas diferentes temperaturas 30, 40, 50, 60, 70° C. A atividade enzimática foi determinada incubando-se a enzima recombinante purificada em seu pH ótimo 6, com os substratos pNPG e pNPX 1mg/mL, por 60 minutos (Figura 19).

A temperatura ótima foi de 50° C para o substrato pNPG e 60° C para o substrato pNPX. No entanto, a 30° C, cerca de 78% da atividade da enzima ainda estava presente para os dois substratos testados, e a 60° C, cerca de 69% e 78% da atividade da enzima ainda estavam presentes para os substratos pNPG e pNPX respectivamente, demonstrando que a mesma possui atividade maior que 50% em temperaturas moderadamente frias e quentes.

Para outras duas β -Xilosidases de *C. crescentus* purificadas e caracterizadas como a β -Xilosidase I (GRACIANO et al., 2012) e a β -Xilosidase II (CÔRREA et al., 2012), observou-se a temperatura ótima de 45 e 55° C, respectivamente.

Também foi observado a temperatura ótima de 50° C para a enzima bifuncional β -Glicosidase/ β -Xilosidase, produto do gene *RubGX1* bacteriano estudado por abordagens metagenômicas (ZHOU et al., 2012) e para uma β -Glicosidase de *Streptomyces sp.* (ATCC 11238) (PÉREZ-PONS et al., 1995).

A enzima multifuncional β -Glicosidase/ β -Xilosidase/ α -Arabinosidase do gene *Bgxa1* bacteriano estudado por abordagens metagenômicas, apresentou 45° C de temperatura ótima para o substrato pNPG e 40° C para os substratos pNPX (GRUNINGER et al., 2014).

As enzimas bifuncionais β -Glicosidase/ β -Xilosidase do crustáceo *Cardisoma armatum* apresentou temperatura ótima de 60° C (YA, 2014) e do fungo *Mucor circinelloides* apresentou temperatura ótima de 50° C (YUHONG et al., 2014).

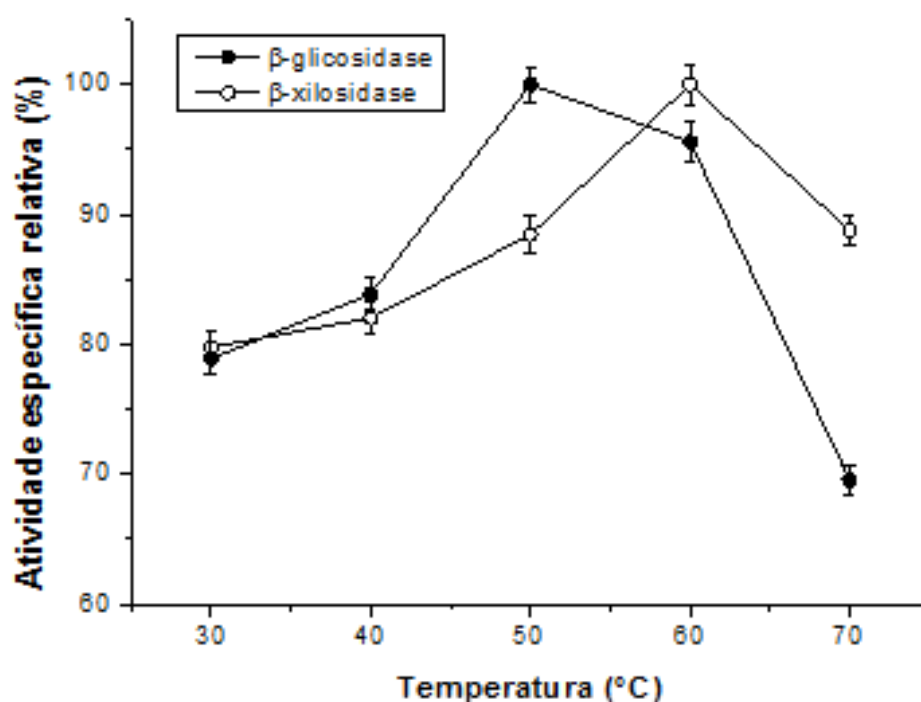


Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade enzimática da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V recombinante sobre o substrato sintético ρ NPG e ρ NPX e determinação da temperatura ótima. Aliquotas da enzima recombinante purificada foram incubadas com os substratos ρ NPG (●) e ρ NPX (○) na presença de tampão McIlvaine em pH 6 (pH ótimo). A reação foi incubada por 60 minutos a diferentes temperaturas de 30 a 70° C. Os valores foram apresentados em relação a temperatura que apresentou maior atividade (50° C para o substrato ρ NPG e 60° C para o substrato ρ NPX) como 100%.

4.9 Constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para os substratos ρ NPG e ρ NPX

Os parâmetros cinéticos foram determinados utilizando os substratos ρ NPG e ρ NPX nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima β -Glicosidase/ β -Xilosidase V para cada um destes substratos. A concentração dos substratos variou de 0,5 a 15 mM. Os valores dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados baseados no gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver e Burk (1934), pois segue a cinética de Michaelis-Menten e apresentados conforme Figuras 20 e 21.

O K_m da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* para o ρ NPG foi de $0,24 \pm 0,008$ mM e o $V_{m\acute{a}x}$ foi de $0,041 \pm 0,001$ μ M/min. O K_m da β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* para o ρ NPX foi de $0,64 \pm 0,032$ mM e o $V_{m\acute{a}x}$ foi de $0,055 \pm 0,002$ μ M/min. Os estudos dos parâmetros cinéticos sugerem que embora a proteína recombinante purificada seja multifuncional, esta apresenta uma atividade preponderante para β -Glicosidase, porque uma menor quantidade de substrato é necessária para que a enzima atinja a metade da velocidade máxima ($K_m = 0,24$ mM). Por outro lado, a habilidade da enzima em metabolizar diferentes substratos confere a mesma, a possibilidade de ser aplicada com maior eficiência em processos biotecnológicos, principalmente aqueles que dependem da eficiente desramificação da hemicelulose, como no caso da produção de biocombustíveis a partir da biomassa vegetal.

Para as outras duas β -Xilosidases de *C. crescentus* purificadas e caracterizadas como a β -Xilosidase I, produto do gene *xynB1*, apresentou K_m $2,89 \pm 0,13$ mM e $V_{m\acute{a}x}$ $1,4 \pm 0,04$ μ M/min (GRACIANO et al., 2012) e a β -Xilosidase II, produto do gene *xynB2*, apresentou K_m $9,3 \pm 0,45$ mM e $V_{m\acute{a}x}$ 402 ± 19 μ M/min (CÔRREA et al., 2012).

Foi observado para β -Glicosidase/ β -Xilosidase, produto do gene *RubGX1* bacteriano um K_m 0,164 mM para o ρ NPG e 0,03 mM para o ρ NPX (ZHOU et al., 2012). A β -Glicosidase/ β -Xilosidase/ α -Arabinosidase do gene *Bgxa1* bacteriano apresentou uma eficiência catalítica 100x maior para β -Glicosidase do que a β -Xilosidase e α -Arabinosidase (GRUNINGER et al., 2014).

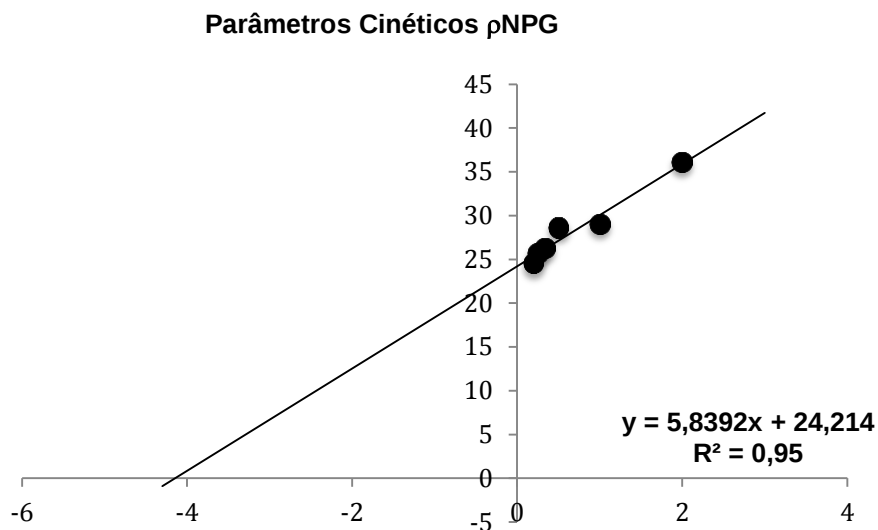


Figura 20 – Representação gráfica das funções lineares ($R^2 = 0,95$) obtidas para a atividade β -Glicosidásica da proteína recombinante na presença de diferentes concentrações do substrato ρ NPG (0,5-15 mM). No gráfico duplo recíproco o eixo (y) corresponde a $1/V$ (velocidade) da reação enzimática, o intercepto da reta no eixo (y) marca o ponto em que a enzima atinge a metade de sua velocidade máxima e o eixo (x) corresponde a $1/[S]$ (substrato). O intercepto no eixo (x) marca o ponto $-1/K_m$, que permite o cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m) a qual indica a concentração de substrato usada pela enzima para alcançar a metade da sua velocidade máxima. Assim, os parâmetros cinéticos calculados a partir da equação da reta obtida ($y=ax+b$) para a atividade de β -Glicosidase da proteína recombinante foram: $V_{\text{máx}} = 0,041 \pm 0,001 \mu\text{M}/\text{min}$ e $K_m = 0,24 \pm 0,008 \text{ mM}$.

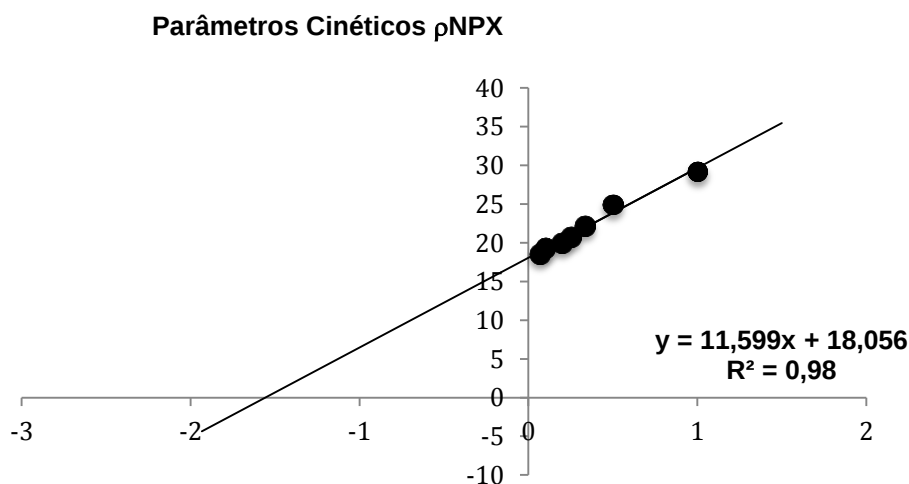


Figura 21 – Representação gráfica das funções lineares ($R^2 = 0,98$) obtidas para a atividade β -Xilosidásica da proteína recombinante na presença de diferentes concentrações do substrato ρ NPX (0,5-15 mM). No gráfico duplo recíproco o eixo (y) corresponde a $1/V$ (velocidade) da reação enzimática, o intercepto da reta no eixo (y) marca o ponto em que a enzima atinge a metade de sua velocidade máxima e o eixo (x) corresponde a $1/[S]$ (substrato). O intercepto no eixo (x) marca o ponto $-1/K_m$, que permite o cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m) a qual indica concentração de substrato usada pela enzima para alcançar a metade da sua velocidade máxima. Assim, os parâmetros cinéticos calculados a partir da equação da reta obtida ($y=ax+b$) para a atividade de β -Xilosidase da proteína recombinante foram: $V_{\text{máx}} = 0,055 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{min}$ e $K_m = 0,64 \pm 0,032 \text{ mM}$.

A comparação da sequência da proteína predita a partir do gene *xynB5* de *C. crescentus* usando o algoritmo Clustal W2 para proteína do NCBI evidenciou que a β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* apresenta aproximadamente 92% de identidade com a β -Xilosidase da bactéria correlata *C. segnis* e aproximadamente 70% de identidade com uma β -Xilosidase de *Asticcacaulis excentricus*, uma Gram-negativa que assim como bactérias do gênero *Caulobacter* também pertence a Família *Caulobacteraceae* (Figura 22 e Tabela 11). Isto sugere uma elevada conservação para o gene *xynB5* neste grupo de Alfa-Proteobactérias

C.crescentus	MNTTLTRRLFGASLAALSAAALPSLAQAAGQAPKTSGGKPLYKDPQTQFVDARIQDLLSRM	60
C.segnis	MTTATRRLFGASLAALSAAALPALAQTASNAPKTSGGKPLYKDPAQPIDARVQDLLGRM	60
A.excentricus	-----MTLQLNRHFAAGVVSATALAVSAASHAATDKPLYKDASASVEARTITDLLKRM	52
	: **::: * :.. *.:::: .*****.: :.:** *** **	
C.crescentus	TLEEKAAQLIGIWLTKAKIQTPEGEFSAEQASKNFPHGLGQISRPSDRKGAKFVTVIGAA	120
C.segnis	TLEEKAAQLIGIWLTKNKIQTPEGEFSPEQASKNFPNGLGQISRPSDRKGAKFVTVIGAA	120
A.excentricus	TLEEKVAQMCIWLQKGIQNEKGFDPKKASEAFPHGLGMIARPSDRRGVENTQAN---	109
	*****.:**::: *** * ***, :*:..:***: **:* **:****:*.:. .	
C.crescentus	AGADDGAINRNAETARYTNAAQKWAIEKTRLGIPLIMHDEALHGYVARDATSFQSIAT	180
C.segnis	AGADDGAINRNAKETARYTNAAQKWAIEKTRLGIPLIMHDEALHGYVARDATSFQAIAT	180
A.excentricus	AGADVGVINRNPLETAVYINAAQKWAIEKTRLGIPMFHHEESLHGYVARDSTSFQAIAT	169
	*** * * **** * *****:*****:*****:*.:.:*****:*****:*.:. *	
C.crescentus	ASTFDTELTEKIFAVAAREMRARGSNLALAPVVDVARDPRWGRIEETYGEDPHLCAEIGL	240
C.segnis	ASTFDTELTEKIFAVAAREMRARGSNLALAPVVDVARDPRWGRIEETYGEDPHVCAEIGL	240
A.excentricus	ASSFDQLVEKVFVCAKEMRARGANLALAPVVDVCREPRWGRVEETYGEDTHLMGVMGK	229
	:.:*.:.:*.:.:*.:.:*****:*****:*.:.:*****:*****:*.:. : *	
C.crescentus	ASIRGFQGTTLPLAKDKVFVTLKHMIGHGQPENGTNVGPQIAERTLRENFPPFFERAVT	300
C.segnis	AAIRGFQGTTLPLAKDKVFVTLKHMIGHGQPENGTNVGPQISERVLENFPPFFERAVT	300
A.excentricus	AAVLGFSGTDRKLAKDKVFATLKHMIGHGQPENGTNVGPAPISERTLREVFPPFFEKIVK	289
	:.:*.:.:*****:*****:*****:*.:.:*** *****: *	
C.crescentus	ELPVRVMPSPSYNEIDGVPSHANRWLLTKILREEWGYKGSIQSDYFAIKEMISRHKLTSDL	360
C.segnis	ELPVRVMPSPSYNEIDGVPSHGRWLLTKILREEWGYKGSVQSDYFAIKEMISRHKLTSDL	360
A.excentricus	ETPIAAVMPSPSYNEIDGVPSHANKWLLDTVLRGEWGFKGVLVSDYFAIKEMISRHHLPDM	349
	* *: *****:*.:.:*** :.:.:*** **:* : *****:*****:*.:. *	
C.crescentus	GETAVMAMRAGVDVLPDGEAYALIPELVKAGRIPQFEVDAVARVLEMKFQAGLFENPY	420
C.segnis	GETAVRAMHAGVDVLPDGEAYALIPELVKAGRIPQFEIDAARVRLTMKFEGGLFENPY	420
A.excentricus	TEAAYRAVKAGVDIETPDGEAYPNLIKLVQSGRVSEAEIDAIVHRILELKLGLFENPY	409
	: *:*****:*****:*.:.:***:*.:.:*** * *: * ** *****	
C.crescentus	CDEKTADAKTATPDAVALAREAAARKSVVLLKNDKGLLPDGGKKFKRMALLGTHAKDTPIG	480
C.segnis	CDEKTADAKTATPDAVALAREAAARKAVVLLKNDKGVLPDGGKKFKRLALLGTHAKDTPIG	480
A.excentricus	VDAKQADKLTATPDAIALAREAAVRSVAVLLKNN-GVLPDGGKVGKLLLLGTHAKDTPIG	468
	* * * *****:*****:*.:.:*****: *****:*.:. *****	
C.crescentus	GYSDIPRHVVSIHEGLTAEAKAQGFALDYAEAVRITQRIWAQDAVNFTDPAVNAKLIAE	540
C.segnis	GYSDVPRHVVSIYEGLTAEAKAQGFALDYAEAVRITQRIWAQDVNFTDPAVNAKLIAE	540
A.excentricus	GYSEVPRHVVSIHEGLEKEAKAQGFLEYREAIRLTEKRDWAADVKFVDPAVNAKLIAE	528
	:**:*** *****:*.:.:***:***:*** * *: * *****	

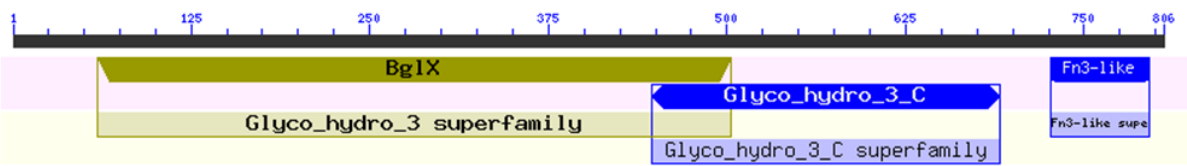
O resultado do alinhamento local fornecido pelo BLAST para proteínas ainda evidenciou a presença de domínios conservados ao longo da sequência dos 806 aminoácidos da proteína predita β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus*. Esta análise sugere fortemente que esta proteína pertence ao grupo 3 das Glicosil Hidrolases com um domínio conservado denominado BglX, característico em β -Glicosidases/ β -Xilosidases que atuam no espaço periplasmático em Gram-negativas (YANG et al., 1996; VARGHESE et al., 1999) (Figura 23– A).

Além destes domínios, foi encontrado na porção carboxi-terminal da proteína também um domínio Fn3-like, ou seja, um domínio *Fibronectin type III-like*, cuja função ainda não está estabelecida para o grupo das β -Glicosidases/ β -Xilosidases bacterianas. Segundo a ferramenta *Conserved Domain Architecture Retrieval* (CDART) fornecida pelo NCBI (GEER et al., 2002), a distribuição dos domínios GH3 (BglX) e Fn3-like tal qual ocorre na β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* e evidenciada pela figura 23–A, também ocorre em outras 93 hidrolases bacterianas, em 78 glicosidases bacterianas que provavelmente atuam no espaço periplasmático e em 39 glicosil hidrolases bacterianas de um modo geral. Estes dados sugerem uma sintenia na distribuição destes domínios em diferentes bactérias, indicando que provavelmente executam uma função conservada nas proteínas envolvidas com o metabolismo de açúcares em bactérias Gram negativas.

Interessantemente, o perfil de atuação em nível de diferentes substratos da GH3 β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* é relativamente diferenciado, quando comparado com a GH43 β -Xilosidase I/ α -L-arabinofuranosidase e GH39 β -Xilosidase II da mesma bactéria (Figura 23–B). O produto do gene *xynB5*, é capaz de atuar sobre diferentes substratos como ρ NPX, ρ NPG e ρ NPA, divergindo do produto do gene *xynB1* que atua sobre α NPX e ρ NPA, mas apresenta atividade preponderante de β -Xilosidase (GRACIANO et al., 2012) do produto do gene *xynB2* que atua especificamente sobre ρ NPX (CORRÊA et al., 2012), não apresentando atividade sob os demais substratos evidenciados na figura 23–B. Uma outra característica é o fato de que a BglX periplasmática originalmente caracterizada em *E. coli* (YANG et al., 1996) apresenta atividade preponderante de β -Glicosidase mas não de β -Xilosidase, já o produto do gene *xynB5* (Figura 23–B) codifica uma enzima multifuncional, também com atividade preponderante para β -Glicosidase. O produto do gene *RubGX1* bacteriano estudado por abordagens metagenômicas (ZHOU et al., 2011), também preserva tanto a atividade de β -Xilosidase quanto a de β -Glicosidase, porque foi capaz de atuar sobre ambos os substratos específicos destas enzimas. Embora tenhamos mostrado neste trabalho

que o produto do gene *xynB5* apresente níveis acanhados de atividade enzimática quanto comparados aos obtidos para β -Xilosidase II de *C. crescentus* (CORRÊA et al., 2012), este apresenta a versatilidade degradar diferentes substratos, certamente apresenta-se aplicável como uma proteína bifuncional, com atividade glicosidásica e xilosidásica e portanto, sendo um alvo interessante para ser usado em processos biotecnológicos de sacarificação simultânea de celulose e xilano, a seus produtos fermentáveis glicose e xilose, respectivamente.

A



B

Microrganismo	Gene	Atividade Xilosidásica	Atividade Glicosidásica	Atividade Arabinofuranosidásica	Fonte
β -Xil-V <i>C. crescentus</i>	<i>xynB5</i>	pNPX +	pNPG +	pNPA +	Este estudo
β -Xil-I <i>C. crescentus</i>	<i>xynB1</i>	oNPX +	pNPG -	pNPA +	Graciano et al., 2012
β -Xil-II <i>C. crescentus</i>	<i>xynB2</i>	pNPX +	pNPG -	pNPA -	Corrêa et al., 2012
β -Gli <i>E. coli</i>	<i>bglX</i>	oNPX -	oNPG +	nd	Yang et al., 1996
β -Xil (bactéria não cultivável)	<i>RuBGX1</i>	pNPX +	pNPG +	nd	Zhou et al., 2011

(+) presença da atividade enzimática; (-) ausência da atividade enzimática; (nd) não determinado; pNPX: p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo; oNPX: o-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo; pNPG: p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo; oNPG: o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo; pNPA: p-nitrofenil- α -D-arabinofuranosídeo.

Figura 23 – A proteína predita a partir do gene *xynB5* sugere que a β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus* é uma GH3. **(A)** Domínios estruturais conservados estão presentes ao longo dos 806 aminoácidos que compõem a β -Glicosidase/ β -Xilosidase V de *C. crescentus*. BglX denota um domínio conservado para β -Glicosidase periplasmática em glicosil hidrolases do tipo 3 em bactérias Gram negativas. Assim, dois domínios conservados para GH3 podem ser evidenciados ao longo da estrutura da proteína em **(A)**, além do domínio Fn3-like. **(B)** A presença e ausência de atividade enzimática contra substratos específicos é comparadas para β -Glicosidase/ β -Xilosidase V bem como outras duas diferentes β -Xilosidasas de *C. crescentus* já estudadas, *E. coli* e uma β -Xilosidase de bactéria não cultivável caracterizada por abordagem metagenômica.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, o gene *xynB5* de *C. crescentus* foi super-expresso em *E. coli* e a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade usando colunas de níquel-sepharose. A enzima recombinante superexpressa e purificada β -Glicosidase/ β -Xilosidase foi caracterizada para suas duas possíveis atividades na presença dos respectivos substratos pNPG, pNPX e pNPA, com atividade predominantes para os dois primeiros substratos. Nestes ensaios a proteína mostrou um pH ótimo igual a 6 para ambas as atividades preponderantes e uma temperatura ótima de 50 °C para β -Glicosidase e 60 °C para β -Xilosidase. A avaliação dos parâmetros cinéticos para a β -Glicosidase/ β -Xilosidase mostrou que a concentração de substrato para a enzima alcançar a metade da velocidade máxima é menor para pNPG do que para pNPX, indicando uma maior especificidade para pNPG em relação a pNPX, conforme previsto na anotação genômica para a bactéria. Este foi o primeiro trabalho que mostrou a caracterização de uma hidrolase multifuncional para três diferentes substratos em *C. crescentus* e representa uma característica interessante para ser explorada em processos biotecnológicos que dependem da liberação de açúcares de 5 e 6 carbonos, podendo atuar em coquetéis enzimáticos associadas a outras enzimas já caracterizadas da bactéria para uma maior eficiência na desconstrução da biomassa vegetal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, S.; FERREIRA, G.; MOREIRA, A. Utilization of enzymes for environmental applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.24, p.125-154, 2004.
- ALIPOUR-ASSIABI, E.; LI, G.; POWERS, T. R.; TANG, J. X. Fluctuation analysis of *Caulobacter crescentus* adhesion. **Journal Biophysical**, Maryland, US, v.90, n.6, p.2206-2212, 2006.
- ARAKAWA, K., MORI, K., IKEDA, K.; et al. G-language Genome Analysis Environment: a workbench for nucleotide sequence data mining. **Bioinformatics**, v.19, p.305–306, 2003.
- BEG, Q. K.; KAPPOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v.56, p.326-338, 2001.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v.18, p.355-383, 2000.
- BHATIA, P.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidase: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.375-407, 2002.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.3, n.11, p.286-290, 1985.
- BISARIA, V. S., GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, n.1, p.90-104, 1981.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: **Interciência**: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], Rio de Janeiro, 2008.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos, Duluth, v.72, p. 248-256, 1976.
- BROWN, P. J. B.; HARDY, G. G.; TRIMBLE, M. J.; BRUN, Y. V. Complex regulatory pathways coordinate cell cycle progression and development in *Caulobacter crescentus*. **Advance in Microbiology Physiology**, San Diego, CA, v.54, p.1-101, 2008.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Org.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 365-380, 2010.
- CAIRNS, J.R.K.; ESEN, A. β -glucosidase. Cellular Molecullar. **Life Science**, v.67, p.3389-3405, 2010.
- CAMACHO, N. A.; AGUIAR, O. G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. And it is application in bakery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.104, p.159-172, 2003.

CANO, A; PALET, C. Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS. **Journal of Membrane Science**, San Diego, CA, v.291, n.1-2, p.96-105, 2007.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.233-238, 2009.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, São Paulo, SP, v.32, n.8, p.2191-2195, 2009.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. J. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, SP, v.33, n.1, p.181-188, 2010.

CHATTERJEE, D. K.; CHATTERJEE, P. Expression of degradative genes of *Pseudomonas putida* in *C. crescentus*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.169, n.7, p.2962-2966, 1987.

CHEN, I.; DUBNAU, D. DNA uptake during bacterial transformation. **Nature Reviews Microbiology**, Reino Unido, v.2, p.241-249, 2004.

CHEN, L.L.; ZHANG, D.H.; CHEN, X.L.; SUN, C.Y.; ZHOU, B.C.; ZHANG, Y.Z. Purification and enzymatic characterization of two Beta-endoxylanases from *Trichoderma* sp K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresource Technology**, v.100, p.5230-5236, 2009.

CHEN, W. P.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, Seattle, USA, n.21, p.22-60, 1993.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, NL, v.29, n.1, p.3-23, 2005.

CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G.; FIALHO, E. T.; MUNIZ, J. A. Effect of phytase and xylanase upon the metabolizable energy of whole rice bran in broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, p.1147-1156, 2003.

CONTRERAS, L. M.; GÓMEZ, J.; PRIETO, J.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-VICO, F.; BLANCO, F. J.; NEIRA, J. L. The Family 52 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: Structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.1784, p.1924-1934, 2008.

CORRÊA, J. M. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização da β -Xilosidase I da bactéria aquática *Caulobacter crescentus***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE. p.1-69. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Cascavel-PR, 2011.

CORRÊA, J. M.; GRACIANO, L.; ABRAHÃO, J.; LOTH, E. A.; GANDRA, R. F.; KADOWAKI, M. K.; HENN, C.; SIMÃO, R. C. G. Expression and characterization of a GH39 β -Xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.168, n.8, p.2218-2229, 2012.

CORREIA, J. M.; MINGORI, M. R.; GANDRA, R. F.; LOTH, E. A.; SEIXAS, F. A. V.; SIMÃO, R. C. G. Depletion of the *xynB2* Gene Upregulates β -Xylosidase Expression in *C. crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.2, p.1085-1097, 2014.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. B-1,4-D-xilan-degrading enzyme system: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology Applied Biochemistry**, London, v.17, n.3, p.250-289, 1993.

COUGHLAN, M. P.; TUOHY, M. G.; FERREIRA-FILHO, E. X.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKA, M.; HUGHES, M. M. **Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. Hemicelluloses and hemicellulases.** In: Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. P. London: Portland Press, p.29-51, 1993.

COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat, H. and Svensson, B. (eds), **Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 3–12, 1999.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A Review. **Journal of Food Engineering**, v.76, n.3, p.291-302, 2006.

CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, p.13-41, 2010.

da SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases: ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.31, n.2, p.249-260, 1997.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, Cambridge, v.3, p.853-859, 1995.

de VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.65, n.4, p.497-522, 2001.

DELGADO, L. A.; ESTRADA, J. V.; COTERA, L. B. F.; DENDOOVEN, L.; LARA, M. E. H.; HORCASITAS, M. C. M. Induction of xylanases by sugar cane bagasse at different cell densities of *Cellulomonas flavigena*. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, NY, v.70, n.4, p.477-481, 2006.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.18, n.1, p.26-31, 2000.

DERMIBAS, A. Products from lignocellulosic materials via Degradation Processes. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, Mortimer Street, London, v.30, n.1, p.27-37, 2008.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob Change Biology Bioenergy**, Garsington Road-Oxford, v.18, n.1, p.2-28, 2009.

DOUGHERTY, M.J.; D'HASELEER, P.; HAZEN, C.J.; SIMMONS B.A.; ADAMS, P.D.; HADI, M. Glucoside hydrolases from targeted compost metagenome, activity-screening and functional characterization. **BMC Biotechnology**, v.12, n.38, p.1472-6750, 2012.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation, procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, Basel, v.21, p.542-556, 2000.

ENEYSKAYA, E. V.; IVANEN, D. R.; BOBROV, K. S.; ISAEVA-IVANOVA, L. S.; SHABALIN, K. A.; SAVEL'EV, A. N. Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.457, p.225-234, 2007.

EVINGER, M.; AGABIAN, N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. **Journal of Bacteriology**, v.132, p.294-301, 1997.

FAN, H-X.; MIAO, L-L.; LIU, Y.; LIU, H-C.; LIU, Z-P. Gene cloning and characterization of a cold-adapted β -glucosidase belonging to glycosyl hydrolase family 1 from a psychrotolerant bacterium *Micrococcus antarcticus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.49, p.94-99, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry ultrastructure, reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, p.106-131, 1989.

FERREIRA-FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirao Preto, v.27, p.1093-1109, 1994.

FERREIRA-FILHO, E. X. **Xylanases**. In: Suraia, S.; Pietro, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirao Preto: Legis Summa Ltda, p.137-148, 2004.

FINELL, J.; JOKELA, J.; LEISOLA, M.; RIEKKOLA, M. L. Total hydrolysis of xylotetrose and xylobiose by soluble and cross-linked crystalline xylanase II from *Trichoderma reesei*. **Biocatalysis and Biotransformation**, Berlin, v.20, p.281-290, 2002.

FREDERICK, M. M.; KIANG, C. H.; FREDERICK, J. R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger* I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.27, n.4, p.525-532, 1985.

GEER, L. Y.; DOMRACHEV, M.; LIPMAN, D. J.; BRYANT, S. H. CDART: Protein Homology by Domain Architecture, **Genome Research**, v.12, n.10, p.1619-1623, 2002.

GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, Oxford, v.18, p.287-298, 2004.

GRACIANO, L.; CORRÊA, J. M.; GANDRA, R. F.; SEIXAS, F. A. V.; KADOWAKI, M. K.; SAMPAIO, S. C.; DA CONCEIÇÃO SILVA, J. L.; OSAKU, C. A.; SIMÃO, R. C. G. The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus* β -Xylosidase I. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n.9, p.2879-2888, 2012.

GRUNINGER, R. J.; GONG, X.; FORSTER, R. J.; McALLISTER, T. A. Biochemical and kinetic characterization of the multifunctional β -glucosidase/ β -xylosidase/ α -arabinosidase, Bgxa1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, n.7, p.3003-3012, 2014.

HAARHOFF, J.; MOES, C. J.; CERFF, C.; van WYK, W. J.; GERISCHER, G.; JANSE, B. J. H. Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.21, p.415-420, 1999.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Essex, v.58, p.137-161, 1996.

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

HENRISSAT, B.; CALLEBAU, I.; FABREGA, S.; LEHN, P.; MORNON, J. P.; DAVIES, G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. **PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, n.15, p.7090-7094, 1995.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. **Plant Physiology**, Cambridge, v.124, n.4, p.1515-1519, 2000.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v.7, n.5, p.637-644, 1997.

HOTTES, A. K.; MEEWAN, M.; YANG, D.; ARANA, N.; ROMERO, P.; McADAMS, H. H.; STEPHENS, C. Transcriptional Profiling of *Caulobacter crescentus* during Growth on Complex and Minimal Media. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.5, p.1448-1461, 2004.

HU, P.; BRODIE, E. L.; SUZUKI, Y.; McADAMS, H. H.; ANDERSEN, G. L. Whole-Genome Transcriptional Analysis of Heavy Metal Stresses in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, Washington-DC, v.187, n.24, p.8437-8449, 2005.

IMAIZUMI, K.; NAKATSU, Y.; SATO, M.; SEDARNAWATI, Y.; SUGANO, M. Effect of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty-chain fatty-acids in diabetic rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.55, p.195-205, 1991.

JACOBSEN S. E.; WYMAN, C. E. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for applications to current and novel pretreatment process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.84, p.81-96, 2000.

JANG, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World journal of Microbiology e Biotechnology**, v.19, p.263-268, 2003

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.33, p.188-203, 2014.

KATAHIRA, S.; FUJITA, Y.; MIZUIKE, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes of the surface of xylose

utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.5407-5414, 2004.

KHENG, P. P.; OMAR, I. C. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. **Journal Science Technology**, Songklanakarin, v.27, n.2, p.332-335, 2005.

KIM, Y. A.; YOON, K. H. Characterization of a *Paenibacillus woosonggensis* b-xylosidase/a-arabinofuranosidase produced by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v.20, p.1722-1716, 2010.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v.13 n.4, p. 345-351, 2002.

KITAMOTO, N.; YOSHINO, S.; OHMIYA, N.; TSUKAGOSHI, N. Sequence analysis, overexpression, and antisense inhibition of a beta-xylosidase gene, *xylA*, from *Aspergillus oryzae* KBN616. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.1, p.20-24, 1999.

KOSHLAND, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biological Reviews Cambridge Philosophical Society**, v.28, p.416-436, 1953.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; MALA, R. Molecular aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.23, n.4, p.411-456, 1999.

KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.35, n.5, p.377-391, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.226, p.680-685, 1970.

LAUB, M. T.; SHAPIRO, L.; McADAMS, A. H. Systems biology of *Caulobacter*. **Annual Review of Genetics**, Estados Unidos, v.41, n.1, p.429-441, 2007.

LAUDISCH, M. R. Fermentable sugars from cellulosic residues. **Process Biochemistry**, London, v.14, p.21-25, 1979.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, n.2, p.167-198, 2003.

LEE, R. C.; HRMOVA, M.; BURTON, R. A.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G. B. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with alpha-L-arabinofuranosidase and beta-D-xylosidase activity. Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. **The Journal Biological Chemistry**, v. 14;278(7), p5377-5387, 2003.

LEFEBVRE, J. L.; ONO, F.; PUGLIELLI, C.; SEIDNER, G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; BREHM, P.; GRANATO, M. Increased neuromuscular activity causes axonal defects and muscular degeneration. **Journal Development**, v.11, p.2605-2618, 2004.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo: Savier, 1985. p. 194, 195 e 553.

- LEMBO, T.; da SILVA, R.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E. Production, characterization, and properties of b-glucosidase and b-xylosidase from strain of *Aureobasidium* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v.38, p.549-552, 2001.
- LI, Y.K.; LEE, J.A. Cloning and expression of β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: a new member of family B β -glucosidase. **Enzyme Microbiology Technology**, v.24, p.144-150, 1999.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, **Journal of the American Chemical**, Estados Unidos, v.56, n. 3, p. 658-666, 1934.
- LIU, C. F.; SUN, R. C.; QIN, M.; HANG, A.P.; REN, J. L.; XUB, F.; WU, S. B. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. **Industrial Crops and Products**, v.26, p.212-219, 2006.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; van ZYL, W. H. Microbial Cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology**, v.66, p.506-577, 2002.
- MANNISTO, M. K.; TIROLA, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; KULOMAA, M. S.; PUHAKKA, J. A. Diversity of chlorophenol-degrading bacteria isolated from contaminated boreal groundwater. **Archives of Microbiology**, v.171, n.3, p.189-197, 1999.
- MARKS, M. E.; CASTRO-ROJAS, C. M.; TEILING, C.; DU, L.; KAPATRAL, V.; WALUNAS, T. L.; CROSSON, S. The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. **Journal Bacteriology**, Washington-DC, v.192, n.14, p.3678-3688, 2010.
- McADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. System-level design of bacterial cell cycle control. **FEBS Letters**, Heidelberg, DE, v.583, n.24, p.3984-3991, 2009.
- McCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion un Structural Biology**, v.4, p.885-892, 1994.
- MCILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal Biological Chemistry**, Estados Unidos, v.49, n.1, p 183-186, 1921.
- MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FERREIRA-FILHO, E. X. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.52, p.97-100, 2003.
- MELO, E. B.; CARVALHO, I. alfa e b-glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.29, n.4, 2006.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, São Leopoldo-RS, BR, v.5, n.1, p.68-78, 2009.
- MOTOMITSU, K.; YUJI, H.; SHINYA, F.; MASAFUMI, H.; TAKANE, K.; KENJI, Y. Conversion of inverting glycoside hydrolases into catalysts for synthesizing glycosides employing a glycosynthase strategy. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v.21, p.23-39, 2009.
- MUSSATO, S. L.; MANCILLA, I. M. Non-digestible oligossacharides: a review. **Carbohydrates Polymers**, v.68, p.587-597, 2007.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v.12, n.2, p. 69-71, 1998.

NIERMAN, W. C.; FELDBLYUM, T V; LAUB, M T; PAULSEN, I T; NELSON, K E; EISEN, J; HEIDELBERG, J F; ALLEY, M R K; OHTA, N; MADDOCK, J R; POTOCKA, I; NELSON, W C; NEWTON, A; STEPHENS, C; PHADKE, N D; ELY, B; DEBOY, R T; DODSON, R J; DURKIN, A S; GWINN, M L; HAFT, D H; KOLONAY, J F; SMIT, J; CRAVEN, M B; KHOURI, H; SHETTY, J; BERRY, K; UTTERBACK, T; TRAN, K; WOLF, A; VAMATHEVAN, J; ERMOLAEVA, M; WHITE, O; SALZBERG, S L; CRAIG VENTER, J; SHAPIRO, L; FRASER, C. M. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.7, p.4136–4141, 2001.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p.81-84, 2003.

PANDEY, M.; MISHRA, S. Cloning and expression of β -glucosidase gene from the yeast *Pichia etchellsii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.80, p.446-453, 1995.

PARAJO, J. C.; DOMINGUES, H.; DOMINGUES, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, Oxford, v.65, p.191-201, 1998.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnica de DNA recombinante. In: ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. São Paulo: Ed. Mercado Aberto, c.15, p.307-331, 1996.

PATCHETT, M. L.; DANIEL, R. M.; MORGAN, H. W. Purification and properties of a stable beta-glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium. **Biochemical Journal**, v.243, n.3, 1987.

PATEL, J.; WILSON, G.; McKAY, R. M. L.; VICENT, R.; XU, Z. Self-immobilization of recombinant *Caulobacter crescentus* and its application in removal of cadmium from water. **Applied Biochemistry Biotechnology**, New York, NY, v.162, n.4, p.1160-1173, 2010.

PEREIRA JÚNIOR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, Rio de Janeiro: Ed. Amiga Digital UFRJ, v.2, p.8, 2008.

PÉREZ-PONS, J. A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Properties of a novel glucose-enhanced beta-glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 6, p.145-153, 1995

POINDEXTER, J. S. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. **Microbiological Reviews**, v.28, p.231-295, 1964.

POINDEXTER, J. S. The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiological Reviews**, São Paulo, SP, v.45, n.1, p.123-179, 1981.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.67, n.5, p. 577-591, 2005.

PORRO, D.; SAUER, M.; et al. Recombinant protein production in yeasts. **Molecular Biotechnology**, v.31, n.3, p.245-259, 2005.

PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, Newcastle, v.13, p.101-131, 1996.

QORONFLEH, W.; HESTERBERG L. K.; et al. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. **Protein Expression and Purification**, v.55, p.209-224, 2007.

RABELO, C. S. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP, 2007.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

RAVANAL, M. C.; ALEGRÍA-ARCOS, M.; GONZALES-NILO, F. D.; EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces two GH family 43 enzymes with b-xylosidase activity, one monofunctional and the other bifunctional: Biochemical and structural analyses explain the difference. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.540, p.117-124, 2013.

REIS, T. A. F. C.; DIAS, F. M. V.; FONTES, C. M. G. A.; SOARES, M. C.; FERREIRA, L. M. A. Biotechnological potential of xylanases from *Clostridium thermocellum* and *Cellvibrio mixtus*: their utilization as a supplement of wheat based diets for broilers. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.96, n.539, p.125-134, 2001.

RÜCKER, E.; SCHNEIDER, G.; STEINHAUSER, K.; LOWER, R.; HAUBER, J.; STAUBER, R. H. Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. **Protein Expression and Purification**, v.21, p.220-223, 2001.

SAGHIR, S.; IQBAL, M. S.; HUSSAIN, M. A.; KOSCHELLA, A.; HEINZE, T. Structure characterization and carboxymethylation of arabinoxylan isolated from Ispaghula (*Plantago ovata*) seed husk. **Carbohydrate Polymer**, Barking, v. 74, n.2, p. 309-317, 2008.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.30, p.279-291, 2003a.

SAKKA, K.; YOSHIKAWA, K.; KOJIMA, Y.; KARITA, S.; OHMIYA, K.; SHIMADA, K. Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium* xylA gene encoding a bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.57, p.268-272, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 Ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 Ed. Cold Spring Harbor Press, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, C. R.; POLO, C. C.; CORRÊA, J. M.; SIMÃO, R. C. G.; SEIXAS, F. A. V.; MURAKAMI, M. T. Accessory domain changes accessibility and molecular topography of the

catalytic interface in monomeric GH39 β -Xylosidases. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v.68, n.10, p.1339-1345, 2012.

SCREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. **Bioresource Technology**, Oxford, v.72, p.253-260, 2000.

SHEU, W. H. H.; LEE, I.T.; CHEN, W., CHAN, Y.C. Effects of xylooligosaccharides in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.54, p.396-401, 2008.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541-549, 2010.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. 2 Ed. California: Academic Press, p. 63-70, 1993.

SMIT, J.; SHERWOOD, C. S.; TURNER, R. F. Characterization of high density monolayers of the biofilm bacterium *C. crescentus*: evaluating products for developing immobilized cell bioreactors. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v.46, n.4, p.339-349, 2000.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p.205-218, 2003.

SORENSEN, H. R.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, n.4, p.908-918, 2007.

SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Dr. Anuj Chandel (Ed.), ISBN: 978-953-51-1119-1, InTech, 2013. DOI: 10.5772/54325. Available from: <http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/microbial-degradation-of-lignocellulosic-biomass>

SPIRIDONOV, N. A.; WILSON, D. B. Cloning and biochemical characterization of BglC, a beta-glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. **Current Microbiology**, v.42, n.4, p.295-301, 2001.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.17, n.1, p.39-67, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 Ed. Editora Artmed, p.719, 2004.

TAKENISHI, S.; TSUJISAKA, Y. On the modes of action of three xylanases produced by strain of *Aspergillus niger* van Tieghen. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.39, p.2315-2323, 1975.

TAN, L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. Purification and characterization of a thermostable xylanase from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.689-692, 1987.

TSANG, P. H.; LI, G.; BRAUN, Y. V.; FREUND, L. B.; TANG, J. X. Adhesion of single bacterial cells in the micronewton range. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v.103, n.15, p.5764–5768, 2006.

TSUJIBO, H.; TAKADA, C.; TSUJI, A.; KOSAKA, M.; MIYAMOTO, K.; INAMORI, Y. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding an intracellular b-D-xylosidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.65, p.1824-1831, 2001.

TUNCER, M.; BALL, A. S. Co-operative actions and degradation analysis of purified xylan-degrading enzymes from *Thermomonospora fusca* BD25 on oat spelt xylan. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, p.1030-1035, 2003.

UFFEN, R. L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.1, p.1-6, 1997.

UNGER, E. G.; DURRANT, J.; ANSON, D. S.; HOPWOOD, J. J. Recombinant alpha-L-iduronidase: characterization of the purified enzyme and correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblast. **Biochemistry Journal**, v.304, p.43-49, 1994.

van der BROECK, H. C.; de GRAAFF, L. L.; HILLE, J. D. R.; van OUYEN, A. J. J.; HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of xylanase in bread making and preparation of feed and paper products. **European Patent Applications**, London, v.90, p.202-220, 1990.

van LOO, J.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOSKINS, M.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; van VLIET, T.; van den HEUVEL, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the endo Project. **The British Journal Nutrition**, Wallingford, v.81, p.121-132, 1999.

VARGHESE, J. N.; HRMOVA, M.; FINCHER, G. B. Three-dimensional structure of a barley beta-D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. **Structure**, v.7, n.2, p.179-190, 1999.

VARNAL, A.; SIIKA, M.; VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.185-193, 2010.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA JÚNIOR, M. B.; PEREIRA JÚNIOR, N. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137-140, n.12, p.141-153, 2007.

VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDWUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.13, p.335-350, 1994.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. **Application of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries**. In: Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. P. Hemicelluloses and hemicellulases. London: Portland Press, p.127-143, 1993.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, Washington, v.52, n.3, p.305-317, 1988.

XIONG, H.; WEYMAN, N. V.; LEISOLA, M.; TURUNEM, O. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochemistry**, London, v.39, p.729-733, 2004.

YA, C. K.; KONÉ, F. M. T.; GNANGUI, S. N.; DABONNÉ, S.; KOUAME, L. P. A Beta-glucosidase with Beta-xylosidase Activity from the Digestive Juice of the Land Crab *Cardisoma armatum*. **Asian Journal of Applied Sciences**, v.2, 2014.

YAMADA, H.; ITOH, K.; MORISHITA, Y.; TAMAGUCHI, H. Structure and properties of oligosaccharides from wheat bran. **Cereal Foods World**, St. Paul, v.38, p.490-492, 1993.

YANG, M.; LUOH, S. M.; GODDARD, A.; REILLY, D.; HENZEL, W.; BASS, S. The bglX gene located at 47.8 min on the Escherichia coli chromosome encodes a periplasmic beta-glucosidase. **Microbiology**, v.7, p.1659-1665, 1996.

YANG, S.; JIANG, Z.; YAN, Q.; ZHU, H. Characterization of a Thermostable Extracellular β -Glucosidase with Activities of Exoglucanase and Transglycosylation from *Paecilomyces thermophile*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.602–608, 2008.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. **Food Science and Technology**, Oxford, v.39, n.4, p.388-392, 2006.

YUHONG, H.; GRELL, M. N.; ZHAO, H.; LANGE, L. Identification of a β -glucosidase from the *Mucor circinelloides* genome by peptide pattern recognition. **Enzyme and Microbial Technology**, v.67, p.47-52, 2014.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, n.7, p.797-824, 2004.

ZHOU, J.; BAO, L.; CHANG, L.; LIU, Z.; YOU, C.; LU, H. Beta-xylosidase activity of a GH3 glucosidase/xylosidase from yak rumen metagenome promotes the enzymatic degradation of hemicellulosic xylans. **Letters in Applied Microbiology**, v.54, n.2, p.79-87, 2012.

ZHOU, J.; COPELAND, B.; ZHANG, C.; LIU, Z.; BHATTI, S.; SAUVE, R.; ZHOU, S. Identification of prokaryotic organisms in goat rumen based on metagenomic DNA sequences. **Journal of Research in Biology**, v.6, p.451–455, 2011.