

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA  $\beta$ -XILOSIDADE II DA BACTÉRIA AQUÁTICA *Caulobacter crescentus* E SEU PAPEL NO APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**JULIANA MOÇO CORRÊA**

**CASCAVEL – Paraná – BRASIL**

**Janeiro – 2011**

**JULIANA MOÇO CORRÊA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA  $\beta$ -XILOSIDADE II DA BACTÉRIA AQUÁTICA  
*Caulobacter crescentus* E SEU PAPEL NO APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Garcia Simão

**CASCADEL – Paraná – BRASIL  
Janeiro – 2011**

**Ficha catalográfica**  
**Elaborada pela Biblioteca Central do Campus de Cascavel - Unioeste**

C843a Corrêa, Juliana Moço  
Análise da expressão da  $\beta$ -Xilosidade II da bactéria aquática *Caulobacter crescentus* e seu papel no aproveitamento de resíduos agroindustriais. / Juliana Moço Corrêa — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2010.  
84 f. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.

Bibliografia.

1. Caracterização enzimática. 2. Agroindústria – Resíduos. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21ed. 631

**Bibliotecária: Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362**

**JULIANA MOÇO CORRÊA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA  $\beta$ -XILOSIDADE II DA BACTÉRIA AQUÁTICA  
*Caulobacter crescentus* E SEU PAPEL NO APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS**

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

Orientadora: Professora Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Garcia Simão  
Centro CCMF, UNIOESTE – Cascavel.

Professor Dr<sup>o</sup> Flavio Augusto Vicente Seixas  
Departamento de Bioquímica – UEM - Umuarama, PR.

Professora Dr<sup>a</sup> Silvia Renata Machado Coelho  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - UNIOESTE – Cascavel, PR.

Professora Dr<sup>a</sup> Simone Damasceno Gomes  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - UNIOESTE – Cascavel, PR.

Professor Dr<sup>a</sup> Cristina Giatti Marques de Souza  
Departamento de Bioquímica - UEM, Maringá – PR.

**Cascavel, janeiro de 2011.**

## BIOGRAFIA

**Data de nascimento:** 30/06/1984

**Naturalidade:** Cascavel – PR

**Graduação:** Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia – UNIPAR 2007

**Pós-graduação *lato sensu*:** Controle de Qualidade – UNIOESTE – 2009

## **DEDICATÓRIA**

A meus pais, João e Maria, pelo exemplo de vida e determinação.  
Ao meu marido, Marcos, o anjo que Deus colocou em minha vida...  
pela perseverança em construir uma história ao meu lado,  
por tanto amor, compreensão e apoio a mim dedicados.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela orientação espiritual sempre presente e pela força necessária para concluir mais uma etapa importante da minha vida;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* Cascavel, por abrigar o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, PGEAGRI, que tive a oportunidade de cursar e onde pude me aperfeiçoar;

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Garcia Simão pela orientação, confiança, incentivo; a quem devo especial agradecimento pela profunda dedicação e disponibilidade, que me proporcionaram um elevado nível de aprendizado e experiência que levo com carinho por toda a vida;

À Msc. Caroline Henn, pela disponibilidade de apoio ao estudo desenvolvido;

Aos Professores Dra. Marina Kimiko Kadowaki, Dra. Clarice Aoki Osaku e Dr. Rinaldo Ferreira Gandra pela disponibilização de seus laboratórios, equipamentos e reagentes durante o desenvolvimento da pesquisa;

Às docentes Dra. Luciane Sene, Dra. Fabiana Giseli da Silva Pinto e Dra. Simone Damasceno Gomes pelas importantes contribuições e pela participação em minha banca de qualificação;

À Fundação Parque Tecnológico Itaipu PTI C&T, pela concessão da bolsa de estudos;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Vera Celita Schimit, pela disposição em ajudar e sanar dúvidas;

As colegas de laboratório Luciana, Josielle, Elaine e Moara, pelo companheirismo nos erros e acertos, auxílio e amizade. Em especial à Luciana, por compartilhar e acompanhar todos os momentos desta caminhada;

Aos laços inesquecíveis de amizade e apoio proporcionados por Claudia Reis e Carla Limberger Lopes;

Finalmente, a todos os meus amigos e familiares que me incentivaram durante todo o percurso.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 Gerais .....	3
2.2 Específicos .....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
3.1 <i>Caulobacter crescentus</i> .....	4
3.2 Células vegetais .....	6
3.3 Materiais lignocelulósicos .....	7
3.4 Beta-Xilosidases .....	9
3.5 A importância do emprego da Biotecnologia em resíduos agroindustriais .....	10
3.6 Resíduos lignocelulósicos .....	12
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
4.1 Linhagens microbianas e plasmídeos .....	14
4.2 Meios e condições de cultura .....	15
4.3 Oligonucleotídeos .....	15
4.4 Extração de DNA genômico de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	15
4.5 PCR para amplificação da região promotora e gênica de <i>xynB2</i> .....	16
4.6 Visualização e preparação dos fragmentos .....	16
4.7 Preparo de plasmídeos e Reação de ligação ao DNA .....	17
4.8 Preparo de Célula competente de <i>Escherichia coli</i> .....	17
4.9 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> .....	18
4.10 Conjugação .....	18
4.11 Mini-preparação plasmideal (mini-prep) .....	18
4.12 Sequenciamento de DNA .....	19
4.13 Ferramentas de bioinformática .....	20
4.14 Ensaio de indução do gene <i>xynB2</i> em <i>E. coli</i> (DH10B) .....	20
4.15 Purificação de proteína $\beta$ -Xilosidase II de <i>xynB2</i> em <i>E. coli</i> .....	21
4.16 Determinação da atividade de $\beta$ -Xilosidase de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	21
4.17 Dosagem de proteínas .....	22
4.18 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	22
4.19 Caracterização enzimática da Beta-Xilosidase II de <i>Caulobacter crescentus</i> ..	22



4.19.1	Determinação de pH ótimo e estabilidade enzimática frente aos diferentes valores de pH .....	22
4.19.2	Determinação de temperatura ótima e estabilidade enzimática frente às diferentes temperaturas .....	23
4.19.3	Efeito de diferentes compostos sobre a atividade enzimática .....	23
4.19.4	Tolerância a Xilose .....	23
4.19.5	Parâmetros cinéticos .....	23
4.20	Produção de anticorpo policlonal .....	23
4.20.1	Western blot.....	24
4.21	Construção do mutante nulo de <i>xynB2</i> .....	24
4.22	Construção do mutante condicional.....	25
4.23	Ensaio da atividade promotora do gene <i>xynB2</i> .....	25
4.24	Preparo dos resíduos agroindustriais para os ensaios de Atividade Promotora e Caracterização do Mutante Nulo do gene <i>xynB2</i> .....	26
4.25	Ensaio de hidrólise de Xilanase de <i>Aspergillus alliaceus</i> e $\beta$ -Xilosidase de <i>C. crescentus</i> .....	27
4.26	Análise estatística.....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>29</b>
5.1	Clonagem do gene <i>xynB2</i> e análise da sequência obtida .....	29
5.1.1	Medida de expressão do gene <i>xynB2</i> em <i>E. coli</i> .....	34
5.1.2	Purificação e Caracterização enzimática de Beta-Xilosidase II recombinante de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	34
5.1.3	Caracterização Bioquímica de Beta-Xilosidase II recombinante.....	35
5.1.4	Análise do potencial de hidrólise da $\beta$ -Xilosidase II recombinante .....	40
5.1.5	Análise do anticorpo policlonal .....	41
5.2	Construção e análise do mutante nulo de <i>xynB2</i> .....	42
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.....	13
<b>Tabela 2</b> Linhagens utilizadas .....	14
<b>Tabela 3</b> Plasmídeos utilizados .....	14
<b>Tabela 4</b> Sequência dos oligonucleotídeos do gene <i>xynB2</i> .....	16
<b>Tabela 5</b> Relação de resíduos agroindústrias e outros produtos .....	27
<b>Tabela 6</b> Efeito de vários compostos sobre a atividade enzimática de $\beta$ -Xilosidase II de <i>C. crescentus</i> .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	5
<b>Figura 2</b> Representação esquemática da parede celular vegetal .....	8
<b>Figura 3</b> Características estruturais básicas da molécula de xilano .....	9
<b>Figura 4</b> Visão esquemática de um complexo celulolítico sobre a degradação da porção hemicelulósica de parede celular vegetal .....	10
<b>Figura 5</b> Confirmação da clonagem do gene <i>xynB2</i> em gel de agarose TBE 1% (1X) .....	30
<b>Figura 6</b> Sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzida do gene da $\beta$ -Xilosidade II de <i>C. crescentus</i> .....	31
<b>Figura 7</b> Comparação das sequências protéicas das cinco $\beta$ -Xilosidases codificadas pela bactéria aquática <i>Caulobacter crescentus</i> .....	33
<b>Figura 8</b> Confirmação da subclonagem do gene <i>xynB2</i> em gel de agarose TBE 1% (1X). 33	
<b>Figura 9</b> Piloto de expressão do recombinante de <i>xynB2</i> em gel SDS-PAGE 9%.....	34
<b>Figura 10</b> Gel SDS-PAGE 9% com amostras dos extratos de purificação da enzima $\beta$ -Xilosidase II .....	35
<b>Figura 11</b> Ensaio de pH ótimo da $\beta$ -Xilosidase II recombinante .....	36
<b>Figura 12</b> Ensaio de atividade de $\beta$ -Xilosidase II de <i>C. crescentus</i> em diferentes temperaturas de incubação.....	36
<b>Figura 13</b> Ensaio de estabilidade ao pH de $\beta$ -Xilosidase II purificada .....	37
<b>Figura 14</b> Ensaio de estabilidade enzimática exibida por $\beta$ -Xilosidase II de <i>C. crescentus</i> ..	37
<b>Figura 15</b> Efeito da concentração do substrato sobre a atividade de $\beta$ -Xilosidase II recombinante .....	38
<b>Figura 16</b> Efeito de tolerância a xilose de $\beta$ -Xilosidade II de <i>C. crescentus</i> .....	39
<b>Figura 17</b> Porcentagem de hidrólise do Xilano e Bagaço de Cana por ação sucessiva da Xilanase purificada de <i>A. alliaceus</i> e a $\beta$ -Xilosidase II recombinante purificada de <i>C. crescentus</i> .....	41
<b>Figura 18</b> “Western blot” realizado com anti-soro contra a $\beta$ -Xilosidase II recombinante de <i>C. crescentus</i> .....	42

<b>Figura 19</b> Estratégia de construção do mutante nulo de <i>xynB2</i> .....	43
<b>Figura 20</b> Géis de agarose dos eventos de dupla recombinação homóloga para construção de RSJU-2 .....	44
<b>Figura 21</b> Atividade relativa de $\beta$ -Xilosidase na presença de diferentes fontes de carbono. 45	
<b>Figura 22</b> Ensaio de atividade de $\beta$ -Xilosidase com diferentes cepas mutantes de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	46
<b>Figura 23</b> Fusão de transcrição gerada pela clonagem da região 5 não codificadora do gene <i>xynB2</i> no vetor <i>placZ290</i> .....	47
<b>Figura 24</b> Ensaio de Beta-Galactosidase como atividade promotora .....	47

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BC - bagaço de cana de açúcar  
BCIP - 5-bromo-4-cloro-6-indolil fosfato  
BL - bagaço de laranja  
CL - casca de laranja  
Clusters – agrupamentos de DNA  
D.O. - densidade óptica  
DNA - ácido desoxiribonucleico  
EC – “enzyme commission” número na comissão de enzimas  
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético  
EtBr – brometo de etídeo  
g – força gravitacional  
GT - gérmen de trigo  
IPTG - isopropil- $\beta$ -D-Galactopiranosídeo  
IQ – Instituto de Química  
kb – kilobase  
KDa - KiloDaltons  
 $K_M$  - Constante de Michaelis-Menten  
LB – Luria Bertani  
M2 - meio mínimo  
mM - mili molar  
MWCO – “Molecular Weight CUT-off” (valor do corte para massa molecular em KDa)  
NA1000 – cepa parenta de *Caulobacter crescentus*.  
NBT - nitroblue tetrazolium  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
ng - nanogramas  
ONPX - o-nitrofenol-Beta-D-xilopiranosídeo  
PA - palha de arroz  
pb – pares de bases  
PCR – Reação em cadeia da Polimerase  
pH – Potencial hidrogênio  
PM - palha de milho  
pMOA – Mutante Condicional que superexpressa *xynB2* na presença de xilose  
primers – oligonucleotídeo  
PT - palha de trigo  
PYE – Meio de cultura completo contendo: Peptona e extrato de levedura

RFM - resíduos fibroso de mandioca

rpm – rotação por minuto

RS - resíduo de soja

RSJU-2 – Mutante nulo do gene *xynB2*.

SDS - Sódio-Dodecil-Sulfato

SDS-PAGE – Sódio-Dodecil-Sulfato-Polyacrilamide gel electroforresis (Eletroforese desnaturante para proteínas)

SM - sabudo de milho

TAE – Tris Ácido Acético e EDTA

TE – Tris e EDTA

TBE – Tris Base Ácido Bórico e EDTA

Vmax - Velocidade máxima

*xynB2* – Gene de *Caulobacter crescentus* que codifica para Beta-Xilosidase.

$\beta$ -Xil-rec-II - Beta-Xilosidase recombinante II

$\mu$ L – micro litro

U/mg – Unidades por miligramas.

## RESUMO

### **Análise da expressão da $\beta$ -Xilosidade II da bactéria aquática *Caulobacter crescentus* e seu papel no aproveitamento de resíduos agroindustriais**

Materiais lignocelulósicos são abundantes em resíduos agroindustriais e subprodutos da agroindústria e podem ser usados para produção de combustíveis e outros químicos de interesse comercial. Uma alternativa aos métodos físicos e químicos para bioconversão de material lignocelulósico é o uso de enzimas produzidas por micro-organismos. A bactéria aquática Gram negativa *Caulobacter crescentus* apresenta potencial biotecnológico para o uso destes resíduos por conter em seu genoma vários genes que codificam para enzimas envolvidas com o metabolismo de materiais lignocelulósicos, incluindo 5 genes para  $\beta$ -Xilosidases. No presente trabalho o gene *xynB2* (1,5 kb), que codifica para a  $\beta$ -xilosidade II de *C. crescentus*, foi clonado no vetor pJet1.2 (Fermentas) e subclonado em fase de leitura nos sítios *EcoRI/XbaI* do vetor de expressão pPROEX-HTa (Invitrogen). Uma proteína de fusão com cauda de histidinas foi obtida após indução da expressão do gene *xynB2* em *E. coli* (DH10B) com IPTG (1mM). A  $\beta$ -xilosidade II recombinante ( $\beta$ -Xil-II-rec) foi purificada por cromatografia usando resina de níquel-sepharose e a enzima pura caracterizada quanto a parâmetros cinéticos e bioquímicos. Uma banda única de 65 KDa foi obtida em gel SDS-PAGE 9% para a  $\beta$ -Xil-rec-II purificada de *C. crescentus*, a qual mostrou uma atividade específica de 215 U/mg, pH ótimo igual a 6, temperatura ótima de 55°C e meia vida de 4 horas a 50°C. Após 24 h de incubação em pH 6 a enzima reteve 95% da atividade inicial. A maioria dos íons inibiu a atividade de  $\beta$ -xilosidade II, mas um aumento de 32% foi observado na presença de KCl (2mM). Os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$  foram iguais a 8,4 mM e 370  $\mu$ moles/min, respectivamente. A capacidade da  $\beta$ -Xilosidase II recombinante pura de *C. crescentus* hidrolisar xilano e o resíduo bagaço de cana foi avaliada após incubação prévia destes com a Xilanase purificada de *Aspergillus alliaceus*. As porcentagens relativas de produtos de hidrólise do xilano e bagaço de cana-de-açúcar aumentaram 2,5 e 6,5 vezes, respectivamente, após incubação por 18 horas com a  $\beta$ -Xil-II-rec pura de *C. crescentus*, ressaltando assim, a possibilidade de aplicação desta enzima em processos biotecnológicos. Em adição, a  $\beta$ -Xil-II-rec foi usada para a produção de um anticorpo policlonal em coelho que mostrou por ensaios de "Western Blot" uma elevada especificidade para reconhecimento da proteína purificada. Paralelamente, com o objetivo de investigar o papel do gene *xynB2* para *C. crescentus*, dois mutantes foram obtidos. O primeiro foi construído pela inserção de um cassete de resistência a espectinomicina dentro do gene *xynB2* por dupla recombinação homóloga, gerando uma linhagem mutante nula denominada RSJU-2. O segundo foi obtido por clonagem do gene *xynB2* sob o controle de um promotor indutível por xilose gerando uma linhagem denominada pMOA. A atividade de  $\beta$ -Xilosidase foi mensurada nas células das linhagens RSJU-2, pMOA e parental (NA1000) de *C. crescentus*, as quais cresceram na ausência e presença de diferentes resíduos agroindustriais. A depleção do gene *xynB2* fez as células mais hábeis a produzirem altas atividades de outras  $\beta$ -Xilosidases na presença de diferentes resíduos ou fontes de carbono. Estes resultados indicam que a ausência do gene *xynB2* regula positivamente a expressão de outras  $\beta$ -Xilosidases em *C. crescentus*. Por outro lado, um decréscimo na atividade de  $\beta$ -Xilosidases foi observado na linhagem pMOA, sugerindo que a superexpressão da  $\beta$ -Xilosidase II regula negativamente a atividade de  $\beta$ -Xilosidases. Para verificar se a variação nos níveis de atividade de  $\beta$ -Xilosidase ocorre como um reflexo de variações nos níveis de transcrição de genes de  $\beta$ -Xilosidases nas diferentes cepas, foi construído uma fusão de transcrição a partir da clonagem do promotor do gene *xynB2* a frente do gene *lacZ* de *E. coli*. Assim, foi quantificada a atividade de  $\beta$ -Galactosidase como uma medida da atividade do promotor do gene *xynB2*, o que demonstrou que gene *xynB2* é dependente de transcrição.

**Palavras-chave:** clonagem, purificação, lignocelulose, xilano.

## ABSTRACT

### **Analysis of $\beta$ -Xylosidase II expression of the aquatic bacterium *Caulobacter crescentus* and its role in the utilization of agro-industrial residues**

Lignocellulosic materials are abundant in agro-industrial residues and by-products of agro-industry and can be used for fuels and other chemicals of commercial interest. An alternative to physical and chemical methods for bioconversion of lignocellulosic material is the use of enzymes produced by micro-organisms. The aquatic bacterium Gram negative *Caulobacter crescentus* presents biotechnological potential for the use of these residues because it contains in its genome several gene coding for enzymes involved in the metabolism of lignocellulosic materials, including 5 genes to  $\beta$ -Xylosidases. In this study, the gene *xynB2* (1.5 kb) coding the *C. crescentus*  $\beta$ -Xylosidase II was cloned into the vector pJet1.2 (Fermentas) and subcloned in frame in the sites EcoRI/XbaI of expression vector pPROEX-Hta (Invitrogen). A histidine tail fusion protein was obtained after induction and expression of gene *xynB2* in *E. coli* (DH10B) with IPTG (1 mM). The recombinant  $\beta$ -Xylosidase II ( $\beta$ -Xyl-rec-II) was purified by chromatography using nickel-Sepharose resin and a pure enzyme was characterized by biochemical kinetics parameters. A single band of 65 kDa was obtained by SDS-PAGE 9% for *C. crescentus*  $\beta$ -Xyl-rec-II purified, which showed a specific activity of 215 U / mg, pH optimum equal to 6, the optimum temperature of 55 °C and half life of 4 h at 50 °C. After 24 h incubation at pH 6 the enzyme retained 95% of activity. Most of the ions inhibited the activity of  $\beta$ -Xylosidase II, but a 32% increase was observed in the presence of KCl (2mM). The kinetic parameters  $K_M$  and  $V_{M\max}$  were equal to 8.4 mM and 370  $\mu$ moles / min, respectively. The ability of *C. crescentus*  $\beta$ -Xyl-rec-II hydrolyse xylan and sugarcane bagasse residue was assessed after incubation with these Xylanase purified from *Aspergillus alliaceus*. The relative percentage of hydrolysis products of xylan and sugar cane bagasse, increased 2.5 and 6.5 times, respectively, after incubation for 18 hours with *C. crescentus*  $\beta$ -Xyl-rec-II pure, thus highlighting the possibility of using this enzyme in biotechnological processes. In addition,  $\beta$ -Xil-rec-II was also used for the production of a polyclonal antibody in rabbit that showed by "Western blot" assay a highly specific recognition of the purified protein. In order to investigate the role of *xynB2* gene to *C. crescentus*, two mutants were obtained. The first one was constructed by insertion of a spectinomycin resistance cassette into the *xynB2* gene by double homologous recombination, generating a null mutant strain named RSJU-2. The second one was obtained by cloning of *xynB2* gene under the control of the inducible xylose promoter generating a strain denominated pMOA.  $\beta$ -Xylosidase activity was measured in the RSJU-2, pMOA and parental strain (NA1000) cells of *C. crescentus* which were grown in the absence and in the presence of different agro-industrial residues and others carbon sources. The *xynB2* gene depletion made cells more able to produce high activities of other  $\beta$ -Xylosidases in the presence of different residues, for instance,  $\beta$ -Xylosidase activity produced by RSJU-2 cells was almost 15 times higher than the activity showed by NA1000 in the presence of sugarcane bagasse. These results indicate that the absence of *xynB2* gene up-regulates the expression of other  $\beta$ -Xylosidases in *C. crescentus*. On the other hand, a decreased activity of  $\beta$ -Xylosidase was observed in the strain pMOA, suggesting that the overexpression of  $\beta$ -Xylosidase II down-regulates *C. crescentus*  $\beta$ -Xylosidases activities. To verify that the variation in activity levels of  $\beta$ -Xylosidase occur as a consequence of variations in the levels of transcription of  $\beta$ -Xylosidases genes in different strains, we constructed a lacZ- fusion transcription by cloning the *E. coli lacZ* gene under the control of *xynB2* gene promoter. Thus, the  $\beta$ -Galactosidase activity was measured as a function of *xynB2* promoter activity. Tests of promoter activity by measuring the activity of  $\beta$ -Galactosidase in different strains showed that the *xynB2* gene is transcription-dependent.

**Keywords:** cloning, purification, lignocellulose, xylan.



## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sócio-econômico e a evolução dos hábitos e modos de vida geram consumo excessivo, conduzindo a um uso indiscriminado dos recursos naturais e à geração de grandes volumes de resíduos, esta geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do Século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (GARBOSAL & TRINDADE, 2008; SELIG et al., 2008).

Nos últimos anos, nota-se que há interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais aos quais possibilitam inúmeros bioprocessos na forma de substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (BEUKES & PLETSCHKE, 2010). O uso de resíduos além de poder ser economicamente viável pela alta disponibilidade, pode ajudar a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (JARBOET et al., 2009).

Os resíduos originados do setor agroindustrial em geral podem conter muitas substâncias de alto valor econômico, o que torna necessário o emprego de tecnologia adequada; estes materiais além de poderem ser convertidos em produtos comerciais e outras matérias-primas poderão ainda serem reaproveitadas na própria indústria que a originou, o que pode torna - lá útil em outros processos como os secundários dentro do próprio segmento industrial (PELIZER et al., 2007).

A constituição básica dos compostos proveniente de atividade agrícolas de base vegetal são de natureza lignocelulósica e sua utilização pode ser empregado como renovável e para emprego em conversão de compostos de alto valor econômico, sendo o processo de biotransformação enzimática um dos mais promissores (SÁNCHEZ, 2009).

Embora esse tipo de composto de base vegetal gerado seja biodegradável, é necessário um tempo mínimo para ser mineralizado em condições ambientais normais, porém o que se observa que em virtude da intensa atividade humana na Terra, cada dia há um aumento na dificuldade de reciclagem natural desses compostos. O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é conseqüentemente um dos que mais produzem resíduos agroindustriais (PELIZER et al., 2007).

A exploração destes compostos por via enzimática necessita de um planejamento prévio para que possa ser desenvolvido novas tecnologias que permitam cada vez mais a produção de enzimas a um custo competitivo para diversas aplicações biotecnológicas e de outros setores, incluindo o de produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, têxteis, papel & celulose e agricultura.

De acordo com estudos de Zeni e Pendrak (2006), os microrganismos apresentam capacidade de modificar quimicamente uma ampla variedade de compostos orgânicos, denominada transformações microbianas ou bioconversões, que envolvem processos nos quais microrganismos convertem um composto a produtos relacionados estruturalmente.

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores (aceleradores de reações) químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, em relação à catálise química; a redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades (MTUI, 2009).

Nas últimas décadas, o interesse industrial por enzimas microbianas degradadoras do xilano (principal constituinte da hemicelulose de células vegetais) aumentou consideravelmente. A busca por novas tecnologias ambientalmente favoráveis impulsionou o desenvolvimento de pesquisas visando à utilização de enzimas xilanolíticas nas indústrias da polpa e do papel e em outros segmentos que geram resíduos desta natureza (BENEDETTI, 2009).

Para uma completa e eficiente degradação destes compostos há necessidade de um sistema enzimático, ainda não totalmente elucidado. Entre as enzimas mais estudadas e conhecidas, contudo, estão as xilanases e  $\beta$ -Xilosidases, por participarem ativamente na degradação do xilano, principal constituinte de hemicelulose das plantas (PELIZER et al., 2007)

Uma forma bastante promissora para fazer bioconversão de material lignocelulósico é através dos microrganismos pela produção de variadas enzimas de interesse industrial. Hoje, porém, como é possível modificar geneticamente os microrganismos para que forneça qualquer enzima de interesse, a tendência é substituir as utilizadas atualmente produzidas por vegetais e animais, pelas de origem microbiana (ROBERTO et al., 2003).

De acordo com Demain (2000), 60% do total do abastecimento mundial de enzimas industriais são produzidos na Europa, e os restantes 40% nos Estados Unidos e Japão. O desenvolvimento de processos de produção de enzimas que utilizem como insumo básico os resíduos agroindustriais de base vegetal poderá vir a contribuir para a viabilidade econômica da produção de diversos processos via rota enzimática.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

O presente trabalho objetivou estudar o gene *xynB2* (1,5 kb) que codifica para uma  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus* (Número de acesso: 02442).

### 2.2 Específicos

Os objetivos foram contemplados através das seguintes etapas:

- Clonagem do gene *xynB2* que codifica para uma  $\beta$ -xilosidase II de *C. crescentus* e subclonagem em vetor de expressão para obtenção de uma proteína de fusão para purificação e caracterização bioquímica.
- Clonagem e subclonagem da região promotora de *xynB2* e avaliação da expressão do gene na presença de diferentes resíduos agroindustriais com base vegetal.
- Construção de um mutante nulo do gene *xynB2* para avaliação de seu papel para *C. crescentus*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Caulobacter crescentus*

O genoma de *C. crescentus* foi seqüenciado completamente por Marks et al., (2010) e é composto por 4.016.942 pares de bases dispostos em um único cromossomo circular abrangendo 3.767 genes. Estas informações foram depositadas no banco de genomas do NCBI - National Center for Biotechnology Information, referindo-se à *Caulobacter crescentus* (cepa NA1000). Apresentando característica de sua linhagem como sendo uma Bactéria proteobacteria, Alphaproteobacteria, Caulobacterales, Caulobacteraceae, Caulobacter, *Caulobacter crescentus*.

Como membro da subdivisão  $\alpha$  das proteobactérias, a bactéria *C. crescentus* cresce em ambientes aquáticos. Cada célula apresenta uma diferenciação e divisão assimétrica a cada ciclo, fazendo alusão a diversidade de organismos multicelulares existentes (BROWN et al., 2009). Trata-se de uma bactéria simples e altamente manipulável, sendo utilizada como sistema modelo para estudos de diferenciação e coordenação do ciclo celular (PURCELL et al., 2008).

Cavalier-Smith (2002) revisando os grandes táxons bacterianos definiu o filo das alfa-proteobactérias ao qual *C. crescentus* pertence, como sendo organismos que apresentam modos de vida variados e originais, pois possuem estrutura genômica atípica, contendo peculiaridades de capacidade ainda pouco exploradas sobre mecanismos de biorremediação de compostos orgânicos variados, potenciais produtores de combustíveis e participação ativa na degradação de compostos através do sistema enzimático.

O ciclo de vida de *C. crescentus* (Figura 1) inicia-se com a célula móvel que possui um único flagelo polar, fímbrias e tem capacidade quimiotática. Nesta fase do ciclo, o cromossomo encontra-se condensado, não sendo capaz de se replicar. Em resposta a sinais extracelulares, a célula móvel perde o flagelo e as fímbrias, o cromossomo descondensa-se e inicia-se a formação de um talo, que consiste no prolongamento da membrana e da parede celular, no mesmo pólo da célula onde se encontrava o flagelo. A célula talo inicia a duplicação do DNA e aumenta de tamanho. Aproximadamente na porção de 2/3 do ciclo, um novo flagelo é montado no pólo oposto e esta célula agora assimétrica, denominada célula pré-divisional, dá origem a duas células morfologicamente distintas com programas de expressão gênica característicos. A duração do ciclo celular é de aproximadamente 3 horas a 30 °C em meio definido (McADAMS & SHAPIRO, 2009).

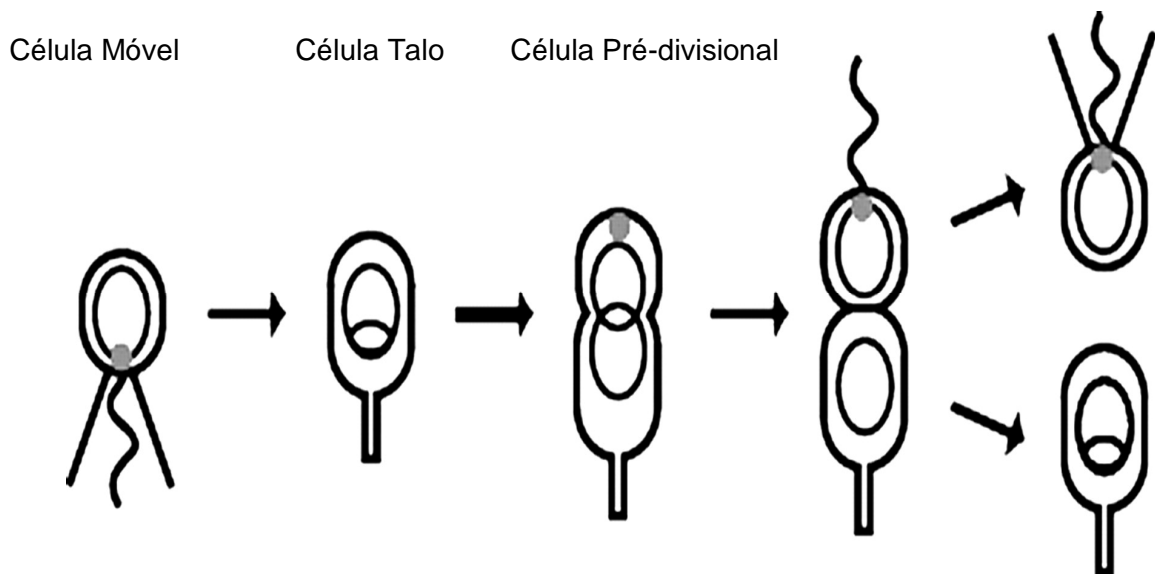


Figura 1 Ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. Fonte: Collins , Gerbay e Feller (2005).

Por conter dois estágios celulares distintos, sendo que em um deles a bactéria apresenta-se pedunculada atuando como uma célula-tronco que dá origem a células móveis, ocorre como consequência uma minimização da competição entre as células filhas geradas durante a fase de crescimento das bactérias, o que garante a colonização destas em outros locais (McADAMS & SHAPIRO, 2009).

Muitos trabalhos experimentais apontam *C. crescentus* como uma bactéria promissora para exploração biotecnológica. Bactérias pertencentes ao gênero de *Caulobacter* possuem destaques por se apresentarem extremamente ubíquas, hábeis e sobreviverem em ambientes oligotróficos (LI & TANG, 2006) e ainda por apresentarem enzimas envolvidas com o metabolismo de materiais lignocelulósicos, mostrando assim, um grande potencial para a degradação de resíduos oriundos de atividades agroindustriais (McADAMS & SHAPIRO, 2009). É importante salientar que essa bactéria já demonstrou ser capaz de remover cerca de 99% do composto tóxico Cadmio de fonte de água contaminada (PATEL et al., 2010). Dados têm mostrado que a mesma também é tolerante a urânio, por um mecanismo de ação que leva a formação de precipitados de fosfato-urânio-cálcio no meio extracelular (HU et al., 2005). Em adição a todas estas propriedades, células de *C. crescentus* formam biofilmes de alta densidade com potencial para uso em biorreatores e processos de biorremediação de ambientes contaminados (SMIT et al., 2000).

A análise do genoma de *C. crescentus* confirmou que a bactéria apresenta inúmeros “clusters” gênicos que codificam proteínas essenciais à sobrevivência em habitats pobres de nutrientes. Além daqueles genes envolvidos com a degradação de compostos aromáticos,

estão presentes os relacionados com quimiotaxia e aqueles que atuam na quebra de materiais lignocelulósicos (NIERMAN et al., 2001).

O mecanismo de assimilação de xilose na bactéria aquática *Caulobacter* é desconhecido. A via bacteriana mais bem conhecida para o catabolismo da xilose que envolve a isomerização de xilulose seguida de fosforilação a xilulose 5-fosfato é a entrada na via das pentoses, a qual está ausente em *Caulobacter*. Estes eventos são inoperantes na bactéria devido à ausência dos genes homólogos para as enzimas xilose isomerase e xilulose quinase no genoma bacteriano (JACKSON & NICOLSON, 2002). A atividade de uma xilose desidrogenase dependente de NADP (Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P), já foi descrita em *C. crescentus* (POINDEXTER, 1981), mas o gene que codifica esta enzima bem como a via catabólica da qual ela participa também ainda estão desconhecidos.

HOTTES et al. (2004) verificaram por análise de transcriptoma em *Caulobacter*, que a xilose, induz a expressão de vários genes que codificam enzimas hidrolíticas bem como um *óperon* que pode codificar uma nova via para o catabolismo de xilose. Um motivo conservado de DNA (consenso: AAAAATGGTACCGCTACCAT) foi verificado em muitos destes genes induzidos por xilose e confere aos mesmos uma expressão xilose específica. Uma fração substancial destes genes expressa proteínas envolvidas com a degradação de polímeros extracelulares derivados de plantas.

A análise do genoma de *Caulobacter crescentus* (cepa NA1000) revelou ainda que *C. crescentus* apresenta pelo menos 9 genes envolvidos diretamente na degradação do xilano (principal constituinte da hemicelulose de parede celular vegetal), quatro deles codificam para enzimas Endoxilanasas, e 5 que codificam para enzimas  $\beta$ -Xilosidasas.

### 3.2 Células vegetais

O aparecimento das primeiras formas de vida ficou intimamente associado com o desenvolvimento de barreiras físicas e químicas que permitiram aos primeiros seres demarcar o seu espaço intracelular do meio externo. Com a evolução de organismos cada vez mais complexos, estas estruturas foram igualmente assumindo graus de especialização e funcionalidades maiores, culminando, no caso das plantas verdes, algas, bactérias e fungos, no aparecimento de uma parede celular (GOYAL et al., 2008).

No reino vegetal, a parede celular desempenha funções de suporte e de formato celular, apresentando uma estrutura rígida na qual as microfibrilhas de celulose são o elemento arquitetural principal e a volta das quais se encontra ligada, de forma entrelaçada, uma matriz complexa composta por hemiceluloses, pectinas, glicoproteínas e substâncias aromáticas com características cerosas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Na lamela média abundam

fundamentalmente as pectinas, sendo muitas vezes designadas por cimento péptico, enquanto que na parede primária predominam as microfibrilhas de celulose e as hemiceluloses (xilanos, arabinosilanos, arabinanos, galactanos, arabinogalactanos, galactoglucomanos, xiloglucanos, glucanos de ligações do tipo  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4). A parede secundária, desenvolvida apenas em alguns tipos de células, aparece logo após a parede primária, junto à superfície da célula (membrana plasmática), e contém, para além de celulose, lenhina, cutina e por vezes suberina (POLIZER et al., 2007; DELGADO et al., 2006).

A complexidade da parede celular vegetal implica que as reações e mecanismos enzimáticos necessários para a sua desconstrução sejam igualmente complexos. Nos últimos anos, o entendimento acerca dos mecanismos envolvidos na degradação molecular dos polissacarídeos estruturais da parede celular, nomeadamente a celulose e a hemicelulose, cresceu significativamente. Verificou-se, assim, que nem todos os organismos utilizam a mesma estratégia para degradar os polissacarídeos da parede celular, notando-se diferenças marcadas entre sistemas presente em organismos aeróbios e anaeróbios.

A aplicação das enzimas na indústria para o branqueamento de polpa de papel já é considerado uma aplicação bem-sucedida e a bioconversão de biomassa em combustíveis e produtos químicos, continua a ser uma meta a ser alcançada. As pesquisas desenvolvidas recentemente têm demonstrado que as vias metabólicas podem ser transferidas de um organismo para outro e as proteínas podem ser modificadas para ganhar estabilidade conformacional, sugerindo que os sistemas naturais podem ser personalizados nos diferentes campos da engenharia genética e biotecnologia; e que isto possibilitará as futuras aplicações em tanque de fermentação na degradação de resíduos (DELGADO et al., 2006). Assim, as biotecnologias empregadas para transformar a biomassa em produtos comercializáveis que, gradualmente, substituirão os materiais derivados de recursos não-renováveis estão se tornando comercialmente viáveis e necessários (Collins et al., 2005).

### **3.3 Materiais lignocelulósicos**

Os materiais lignocelulósicos incluem a madeira, capim, resíduos florestais, e agrícolas diversos; apresentando a composição química principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2), variando a proporção destes componentes de acordo com a espécie vegetal que a originou (CARVALHO et al., 2009). A celulose é um polímero de alto peso molecular linear de unidades 1,4-D-glicose ligadas formando um material altamente cristalino. As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados consistindo de pentoses,

hexoses e ácidos urônicos, formando o xilano. Já a lignina é um polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanóides (DERMIBAS, 2008).

O xilano é o principal carboidrato encontrado na porção hemicelulósica de tecidos de plantas e é responsável por 1/3 de todo o carbono orgânico renovável disponível na Terra. As xilanases são os principais componentes de um consórcio enzimático que atuam despolimerizando as moléculas de xilano em unidades monoméricas de xilose; e as populações de bactérias e fungos utilizam-na como fonte de carbono primário (PETZOLD, 2006).

O xilano (Figura 3) perfaz 15-30% do conteúdo da parede celular de angiospermas e até 70% de gimnospermas, se localiza na parede celular secundária de plantas, mas pode estar presente em parede primária de monocotiledôneas. A sua estrutura varia entre diferentes espécies de plantas (LI et al, 2000; BRÜX et al., 2006).

Ainda observando a Figura 3, é possível verificar que as moléculas de glicose unem-se através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) formando cadeias lineares que interagem umas com as outras através de ligações de hidrogênio. A estrutura resultante, denominada fibrila elementar, é insolúvel em água além de apresentar alto grau de cristalinidade.

Quatro fibrilas elementares são então agrupadas por uma monocamada de hemicelulose, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (associadas entre si por meio de interações físicas e ligações covalentes). O composto natural resultante desta íntima associação é denominado microfibrila celulósica.

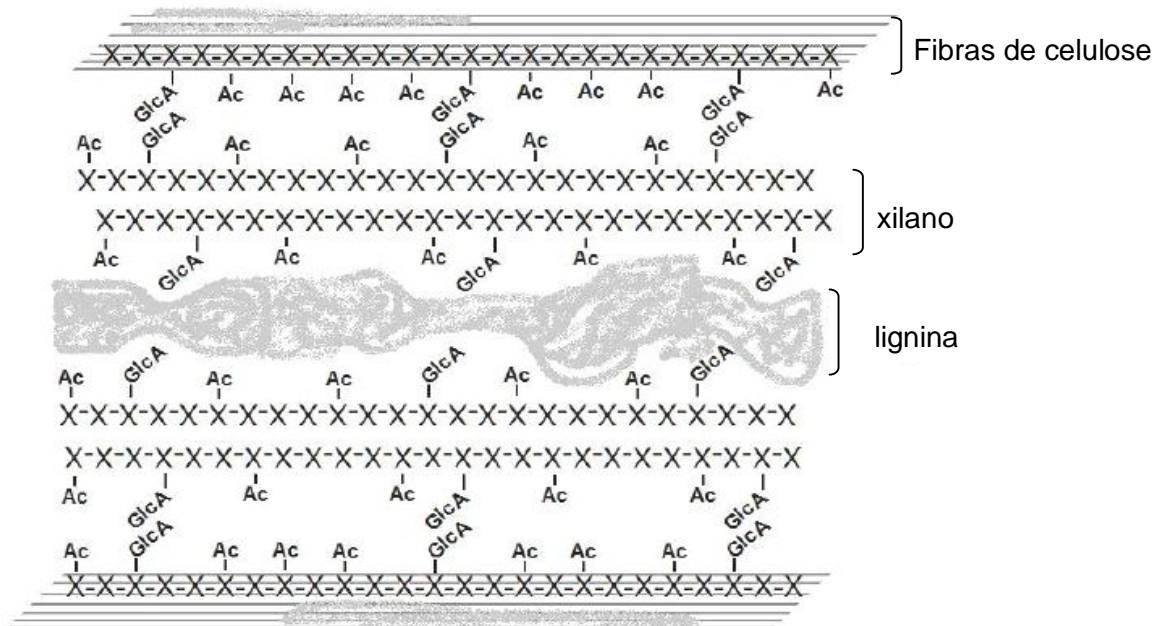


Figura 2 Representação esquemática da parede celular vegetal (Dammström, Salmén e Gatenholm, 2009).



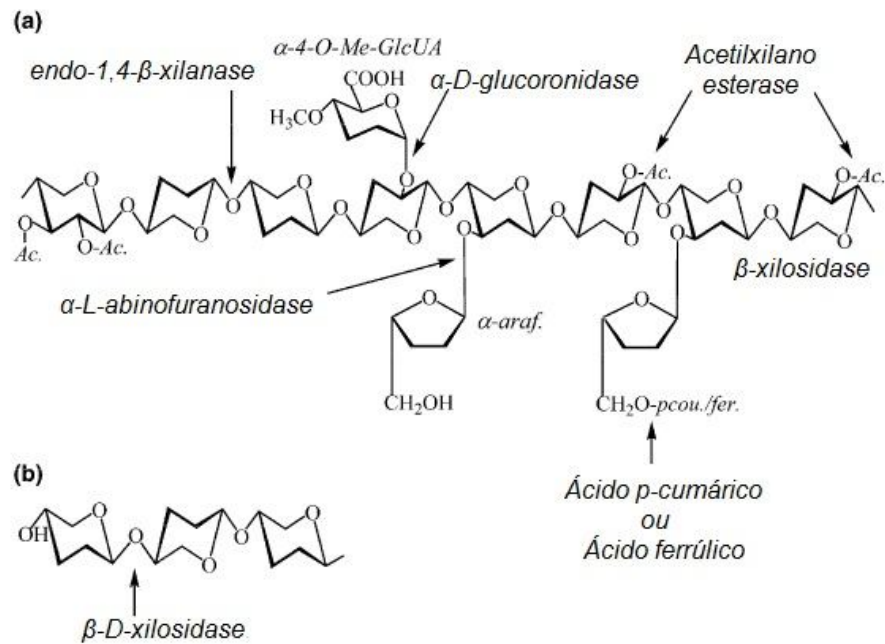


Figura 3 Características estruturais básicas da molécula de xilano. (a) e de um xilooligossacarídeo (b). A ilustração demonstra os grupos constituintes e sítios de clivagens das enzimas citadas (Fonte: Collins et al., 2005).

### 3.4 Beta-Xilosidases

Os resíduos agroindustriais de origem vegetal, em geral, contêm quantidades significativas de xilano, maior polímero de hemicelulose dos cereais e como também na chamada madeira dura (PETZOLD et al., 2006). Estes subprodutos da agroindústria funcionam como indutores de microorganismos para a produção de enzimas extracelulares como algumas xilanases. A denominação de xilanases se dá a um grupo de enzimas capazes de degradar a molécula de xilano; estas podem ser naturalmente encontradas em misturas complexas, em meio a vários outros tipos de biomoléculas (JORDAN & WAGSCHAL, 2010)

As Beta-D-Xilosidases (1,4-β-D-xilano xilohidrolase; EC 3.2.1.37) são glicosídeos hidrolases que tem papel crucial em catalizar a liberação de unidades de xilose a partir de xilooligossacarídeos derivados da degradação do xilano. A completa degradação deste abundante heteropolissacarídeo é um passo chave do ciclo do carbono na natureza; esse processo é realizado por microorganismos que são encontrados na forma livre ou no trato digestivo de animais superiores. A partir dos xilooligossacarídeos menores e xilobiose liberados pela ação de endoxilanases sobre a xilano, geram como produto a xilose. Essa enzima tem freqüente localização intracelular, mas podem estar associadas à membrana e voltadas para o lado externo, em alguns casos. A xilosidase é responsável pela remoção da causa da inibição das endoxilanases, uma vez que hidrolisa xilobiose, aumentando assim, a eficiência de hidrólise da xilana (DODD & CANN, 2009).

A degradação completa do xilano por microrganismos requer a ação cooperativa de várias enzimas (Figura 4) (LEE et al., 2009), destas, as Endoxilanases (EC 3.2.1.8) e Beta-D-Xilosidases são as mais importantes. Wong et al. (1988) defende que além de produtos hidrolíticos pela ação das xilanases, ainda há a fibra residual que é inerente ao processo degradativo; segundo o mesmo autor a utilização criteriosa de uma boa mistura de enzimas xilanolíticas podem resultar em reações mais limpas por diminuir a utilização de composto químicos e ainda obter maiores rendimentos, e menor consumo de energia; que são parâmetros vitais para a viabilidade econômica de processos industriais.

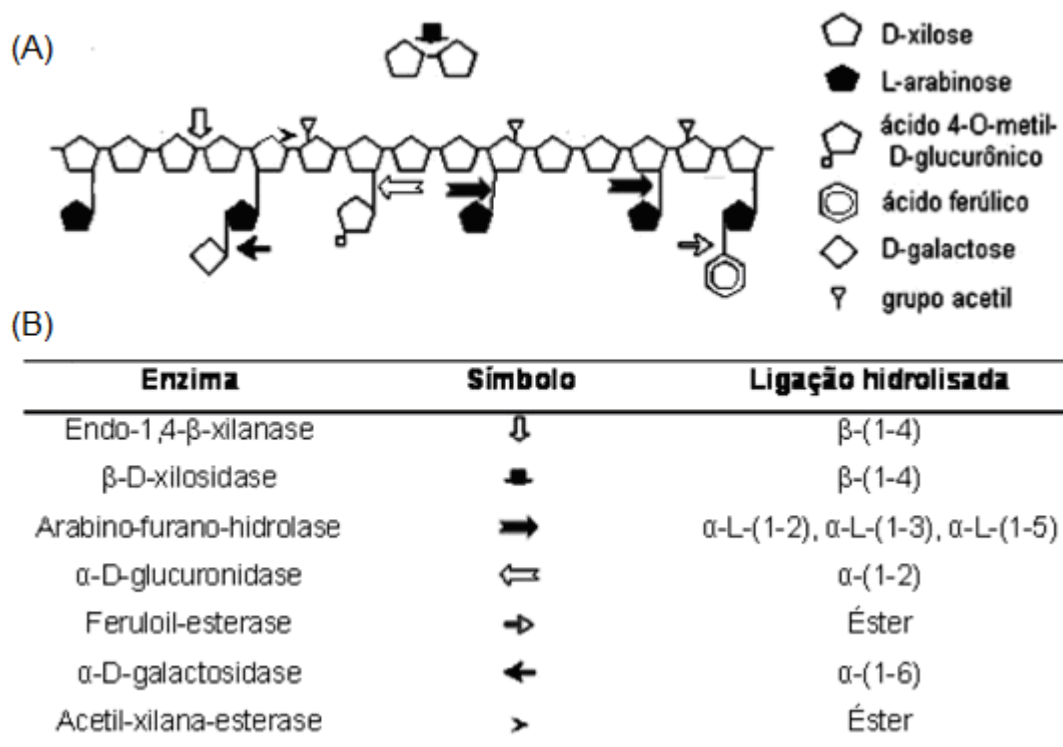


Figura 4 Visão esquemática de um complexo celulítico sobre a degradação da porção hemicelulósica de parede celular vegetal. (A) Estrutura química da molécula de hemicelulose (B) Relação símbolo e enzima envolvida na despolimerização da cadeia de hemicelulose. Proposto por ARO et al., (2005)

### 3.5 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, esses rejeitos são eliminados no meio ambiente sem qualquer planejamento, provocando como consequência um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza, em especial nos corpos hídricos (CANO & PALET, 2007).

Os resíduos agroindustriais estão entre as maiores fontes de biomassa no mundo, representando uma geração anual de 40 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos,

gerando considerável prejuízo às atividades econômicas do setor agroindustrial e ao meio ambiente (CANO & PALET, 2007).

Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente. Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos ou empregados sem tratamento, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos, são cada vez mais difundidos e necessários para que as cadeias agroindustriais possuam sistemas de gestão.

O desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção das enzimas a um custo competitivo é de grande importância para diversas aplicações biotecnológicas, incluindo o de produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, têxteis, papel e celulose e agricultura. Estima-se que aproximadamente 20% dos mais de 1 bilhão de dólares da comercialização mundial de enzimas industriais consista de celulases, hemicelulases e pectinases (MENEZES et al., 2009).

Estima-se que a biomassa vegetal, em função do curto ciclo de reposição e abundância, seja a única fonte natural capaz de fazer frente às demandas presentes e futuras por energia e matérias primas para uma série de processos, dependentes hoje de fontes não renováveis (PRADE, 1995). Nas últimas décadas, no centro das pesquisas científicas apontam a necessidade de novas tecnologias para o problema da biomassa produzida, destaca-se o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos oriundos da agroindústria como os da cultura da cana de açúcar e milho, da indústria do papel, celulose e fibras têxteis, indústria alimentícia e de rações além da indústria da produção de combustíveis e fármacos (KULKARNI et al., 1999; BEG et al., 2001; COLLINS et al., 2005).

As estratégias microbianas empregadas para a utilização destes polímeros predominantes presentes nos resíduos agroindustriais, ganha espaço em função da alta especificidade, eficiência, segurança e freqüente redução de custos em relação aos métodos físicos e químicos tradicionais (WONG et al., 1988; YOON et al., 2006).

De acordo com Demain (2000), 60% do total do abastecimento mundial de enzimas industriais são produzidos na Europa, e os restantes 40% nos Estados Unidos e Japão. O desenvolvimento de processos de produção de enzimas que utilizem como insumo básico os resíduos agroindustriais poderá vir a contribuir para a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis pela rota enzimática aqui no Brasil, devido a quantidade de resíduos gerados anualmente.

Estudos apontam ainda a bioconversão de materiais lignocelulósicos de considerável interesse não somente ambiental mais também econômica pela possibilidade de geração de novos subprodutos, o que é recebido nos setores produtivos com um considerável interesse, pois esses materiais representam vasta fonte de material bruto, que podem ser empregados no desenvolvimento de bioprocessos que resultam em produtos de alto valor agregado; entre os quais estão os açúcares fermentáveis, combustíveis, alimentos, fármacos, enzimas

e substâncias de interesse industrial, além de fazer uma gestão integrada do efluente que por não haver um desenvolvimento biotecnológico adequado tem sido erroneamente disponibilizado de forma inadequada ao ambiente (MENEZES et al., 2009).

Segundo Reis et al. (2001) deve-se ser levado em consideração que nos últimos anos, o nosso entendimento acerca dos mecanismos que estão na base da hidrólise dos principais componentes da parede celular vegetal, cresceu a um nível que permite antever a sua futura utilização na otimização de numerosos processos biotecnológicos, que se adequadamente adaptados podem ser inseridos no cotidiano da própria indústria.

De acordo com os mesmos autores é importante ressaltar ainda que a análise detalhada dos mecanismos moleculares utilizados pelas bactérias no diz respeito ao ataque hidrolítico à parede celular vegetal, esse processo da desconstrução dos polissacarídeos estruturais, como o xilano, é bastante complexo e difícil em condições de ocorrência natural. O que faz cada vez mais necessário o emprego de mecanismos genéticos e biotecnológicos nos microrganismos que permitam a super expressão dos genes envolvidos com a degradação dos compostos de base vegetal.

### **3.6 Resíduos lignocelulósicos**

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre essas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração (CASTRO, 2010).

As tendências mundiais para o avanço científico e tecnológico 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). Tais resíduos são denominados como biomassa lignocelulósica.

O termo biomassa se refere, em sua definição mais ampla, a qualquer tipo de matéria orgânica oriunda de fontes vegetais ou animais, ou de seus processos de transformação naturais ou artificiais. Estes materiais têm em comum a origem direta ou indireta do processo de fotossíntese. Por esta razão, são formados periodicamente, e sua produção não está limitada no tempo, em outras palavras, são renováveis (TAMANINI, 2004). Dentre a matéria orgânica de origem vegetal, ou seja, a biomassa vegetal temos:

- Biomassa Natural;

- Biomassa Alimentícia;
- Biomassa Residual.

Dentre as biomassas residuais podemos destacar as de composição lignocelulósica (resíduos lignocelulósicos). Segundo Tamanini (2004), a utilização de resíduos provenientes da exploração da biomassa lignocelulósica para obtenção de bioprodutos é uma alternativa para a produção de energia e de alimentos, pois a madeira e os resíduos da agroindústria constituem reservas naturais renováveis disponíveis em grandes quantidades. Os materiais lignocelulósicos incluem vários resíduos agrícolas (palhas, cascas, cavacos), madeiras duras provenientes de árvores de folhas decíduas (dicotiledôneas), madeiras moles provenientes de coníferas e resíduos das indústrias de papel.

A composição destes materiais é bastante variável, pois os constituintes possuem características químicas semelhantes às da madeira e são identificados em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento. A biomassa lignocelulósica é composta de celulose, hemicelulose, lignina (TAMANINI, 2004; RABELO, 2007). A Tabela 1 apresenta a composição química parcial dos principais resíduos lignocelulósicos.

Tabela 1 Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos

<b>Resíduos lignocelulósicos</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Farelo de cevada	23	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Bagaço de cana	47	27,5	20,3 - 26,3
Palha de trigo	33 - 42	25 - 32	16 - 23
Palha de milho	25 - 41,2	34,5	14,1
Casca de soja	40 - 53	14 - 33	1 - 3

Fonte: AGUIAR (2010), adaptado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens microbianas e plasmídeos

As linhagens de *Caulobacter crescentus* e *Escherichia coli* utilizados estão listadas na Tabela 2 e os plasmídeos na Tabela 3.

Tabela 2 Linhagens utilizadas

Linhagem	Características	Fonte ou Referência
<i>Caulobacter crescentus</i> NA1000	selvagem, sincronizável, derivada da CB15.	Evinger & Agabian, 1977*.
RSJU-2	NA1000 cujo gene <i>xynB2</i> , que codifica para $\beta$ -Xilosidase II foi interrompido pela inserção de cassete de espectinomomicina.	este trabalho*
pMOA	NA1000 que possui construção regulada por xilose e que superexpressa $\beta$ -Xilosidase II.	Moara Rodrigues Mingori (2010), dados não publicados*.
<i>Escherichia coli</i> DH10B	genótipo SmR, F' [proAB+ lacZuM15]	Invitrogen®*
S17-1	RP4-2, Tc::Mu Km::Tn7	Simon et al., 1983*.

Tabela 3 Plasmídeos utilizados

Plasmídeos	Características	Fonte ou referência
Vetores de clonagem pUCBM21 pJet 1.2/ <i>blunt</i>	Replicon ColE1, Ap <sup>R</sup> , 2725 pb. rep (pMB1), <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ), <i>eco47IR</i> , 2974 pb.	Böehringer Mannheim®* Fermentas®*
Vetor de Expressão em <i>E. coli</i> pPROEX <sup>TM</sup> HTa	(Trc), Ap <sup>R</sup> , protein tags (His) 6, N terminal, 4779 pb.	Invitrogen®*
Vetor de Expressão em <i>C. crescentus</i> pAS22	Derivados do P <sub>bbr1</sub> , Cm <sup>r</sup> , com o promotor P <sub>xyIX</sub> de <i>C. crescentus</i> à frente de um sítio de clonagem múltipla.	U. Jenal, 1977*.
Plasmídeo com gene repórter p <i>lacZ</i> /290	vetor de fusão de transcrição <i>lacZ</i> , Tet <sup>R</sup> , 2320 pb.	Gober e Shapiro, 1992*.

#### Continuação da Tabela 2

##### Outros plasmídeos

pNPTS138	replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km <sup>r</sup> ), <i>sacB</i> , 5361 pb.	D. Alley, 1991*.
pHP45Ω	Derivado do pBR322, Ap <sup>r</sup> , cassete Ω (Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> ), 4.403 pb.	Prentki & Krisch, 1984*.

\* Todos os materiais mencionados estão armazenados no laboratório de Bioquímica Molecular – CCMF (Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus de Cascavel/PR.

#### 4.2 Meios e condições de cultura

As culturas estoque de *E.coli* (DH10B e S17-1) foram crescidas em meio líquido ou sólido de LB (bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, agar 1,5%, pH 7,5) a 37 °C. Para marca de seleção do plasmídeo pJet1.2/blunt e pProEX HTa utilizou-se o antibiótico ampicilina (10 mg/mL) e para o plasmídeo pLacZ/290 o antibiótico tetraciclina (0,5 mg/mL).

Para as culturas estoque de *Caulobacter crescentus* (NA1000) foram crescidas em meio sólido ou líquido em meio de cultura PYE (bacto-peptona 0,2%, extrato de levedura 0,1%, MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, ágar bacteriológico 1,5%) ou em meio mínimo de cultivo - M2 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 18 mM, NH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, NH<sub>4</sub>Cl 9 mM, FeSO<sub>4</sub> 10 µM, MgSO<sub>4</sub> 2mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, glicose 0,2%) (Johnson e Ely, 1977) a 30 °C. Para a manutenção dos recombinantes adicionou-se os antibióticos tetraciclina (2 µg/ml) para o plasmídeo pLacZ/290, canamicina (10 µg/mL) para o plasmídeo pNPTS138, espectinomicina (20 µg/mL) para manutenção do inserto extraído de pHP45Ω, ácido nalidíxico (20 µg/ml) nas conjugações entre S17 recombinantes e *C. crescentus* selvagem e cloranfenicol (1 µg/mL) para o plasmídeo pAS22.

#### 4.3 Oligonucleotídeos

Os pares de oligonucleotídeos (Tabela 4) para obtenção do gene e região promotora que codifica para uma β-Xilosidase de *Caulobacter crescentus* foram desenhados com base no genoma da bactéria disponíveis no GenBank sendo que o gene de interesse foi designado por esta pesquisa como sendo *xynB2* (código de acesso: 02442). Os dados do seqüenciamento completo são de consulta livre através do NCBI – “National Center for Biotechnology Information” no domínio público <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>.

#### 4.4 Extração de DNA genômico de *Caulobacter crescentus*

Para obtenção de DNA molde para reações de PCR procedeu-se a extração do DNA genômico de *C. crescentus* (CHEN E KUO, 1993). A partir de culturas de *C. crescentus* crescidas por 12 a 18 horas, as células foram recuperadas em tubo de centrifuga e

centrifugadas a 12.000 rpm (18514 g) a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco por inversão do tubo em papel absorvente; em seguida foi adicionado 200 µL de tampão de lise (Tris-acetato 40 mM pH 7,8, NaOAc 20 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%) fazendo ressuspensão com a pipeta. Na seqüência adicionou-se 66 µL de NaCl 5 M e posteriormente centrifugou-se a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Passou-se o sobrenadante para novo microtubo de centrifuga. Fez-se a adição de 250 µL de solução Clorofórmio e Álcool isoamílico (24:1), promoveu-se a mistura por inversão até ficar leitoso, centrifugou-se a 12.000 rpm a temperatura ambiente por 3 minutos. Foi passado o sobrenadante para microtubo novo e adicionou-se 2 vezes o volume do recuperado com etanol 100%, centrifugou-se a 12.000 rpm a 4 °C por 3 minutos. Inverteu-se o tubo com cuidado sobre papel absorvente. Lavou-se com 500 µL de etanol 70%, por fim centrifugou-se 12.000 rpm a 4 °C por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e o tubo foi seco em estufa a 37 °C por 2 horas, posteriormente procedeu-se a ressuspensão em 50 µL de TE. O armazenamento foi feito em freezer a -20 °C.

Tabela 4 Sequência dos oligonucleotídeos do gene e região promotora de *xynB2*.

REGIÃO GENÉTICA	NOME DO OLIGO	SÍTIO DE RESTRIÇÃO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA 5' → 3'	TAMANHO FRAGMENTO GERADO
5' não codificadora P <i>xynB2</i>	<i>xynB2</i> -P5'	<i>EcoRI</i>	(5' - tat gaa ttC CGC CCg gtg ttC CGC Cag).	0,8 kb
	<i>xynB2</i> -P3'	<i>PstI</i>	(3' - tat Ctg Cag aCa aCC ggC agg CtC gCa).	
Gene <i>xynB2</i>	<i>xynB2</i> -Met	<i>EcoRI</i>	(5' -tat gaa ttC atg gCg aaC gCC ggC CCC3').	1,5 kb
	<i>xynB2</i> -Stop	<i>XbaI</i>	(5' -tat tCt aga Cta ggC Cag Cgg CtC gag3').	

#### 4.5 PCR para amplificação da região promotora e gênica de *xynB2*

A região promotora e gênica de *xynB2* foram amplificadas pelas etapas a seguir: DNA molde desnaturado a 94 °C por 3 minutos, hibridação com os oligonucleotídeos a 55 °C por 30 segundos, extensão dos fragmentos em presença de desoxiribonucleotídeos (dNTPs) a 68 °C por 2 minutos pela Taq-polimerase (Invitrogen®) em um volume final de reação de 50 µL. Foram realizados 35 ciclos em termociclador (Mastercycler Gradient eppendorf®).

#### 4.6 Visualização e preparação dos fragmentos

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese (Power Pac 200, BIO-RAD) em gel de agarose (Sigma®) com os tampões TBE 1X (Tris-Base 21,6 g; Ácido Bórico 11 g;



EDTA 0,5 M pH 8,0 4 mL, água q.s.p 1000 mL ) ou TAE 1X (Tris-Base 4,81 g; Ácido Acético glacial 1,142 mL; água q.s.p. 1000 mL), corados com Brometo de etídeo (EtBr) e visualizados em transiluminador (UV Transiluminator UVP) por luz ultravioleta. Os marcadores utilizados foram: Lambda *Hind*III ladder (BioLabs), 1 Kb DNA ladder ou 1 Kb DNA ladder plus (GibcoBRL). O fragmento correspondente ao gene *xynB2* foi tratado com Polinucleotídeo quinase (Kit Fermentas<sup>®</sup>) para tornar as extremidades não coesivas (“*blunt ends*”).

#### 4.7 Preparo de plasmídeos e Reação de ligação ao DNA

O plasmídeo pUCBM21 foi linearizado com digestão pelas enzimas de restrição *Eco*RI/*Pst*I; o plasmídeo pJet1.2/*blunt* já encontrava-se pronto para uso conforme determinação contida no kit “*CloneJET PCR cloning kit*” (Fermentas<sup>®</sup>). A ligação entre plasmídeos e insertos foram na proporção de 1:3, utilizando uma T4 DNA ligase (Fermentas<sup>®</sup>). As reações de ligação foram usadas para transformação de *E. coli* competente.

#### 4.8 Preparo de Célula competente de *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* teve durante o processo das construções genéticas o importante papel de abrigar os plasmídeos clonados e subclonados, esta passava por um procedimento para se tornar apta a receber os plasmídeos; tal procedimento foi necessário uma vez que a célula torna-se receptiva por ocorrer uma mudança de conformação temporária em sua parede celular, o que permite que ela seja transformada em um recombinante para determinada característica genética.

A bactéria foi crescida em LB-ágar por 16 horas a 37 °C. Um colônia fresca foi pré-inoculada em 2 mL de meio LB-líquido por 16 horas a 37 °C sob agitação de 120 rpm em incubador com agitação orbital. O inóculo foi transferido para 100 mL de LB-líquido; essa suspensão foi incubada de 2-3 horas a 37 °C sob mesma agitação. Ao atingir a  $D.O_{\lambda 600nm} = 0,4-0,6$  em espectrofotômetro, o cultivo era transferido para tubo de centrifuga e a centrifugação efetuada a 6.000 rpm (4629 g) a 4 °C por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 10 mL de  $CaCl_2$  0,1 M estéril, ficando posteriormente em repouso em banho de gelo para estacionar o crescimento celular por 10 minutos. Após este período, centrifugou-se as células novamente a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante novamente foi descartado e ressuspensão em 1 mL de  $CaCl_2$  0,1 M. As células competentes de *E. coli* foram mantidas em banho de gelo sob refrigeração, o uso era após 2 horas do preparo e até no máximo 48 horas nas transformações bacterianas.

#### 4.9 Transformação de bactérias *E. coli*

Para efetuar a transformação utilizou-se 200 µL das células quimicamente competentes e 2 µL de ligação de plasmídeo e inserto. Após 15 minutos em banho de gelo, as células foram submetidas a choque térmico de 90 segundos a 42 °C. Posteriormente aplicou-se 1 mL de LB-líquido para recuperação das células a 37 °C em banho Maria. Em seguida a mistura foi inoculada com o auxílio de uma alça de Drigalski no meio LB sólido com adição de antibiótico (conforme consta no item 4.2).

#### 4.10 Conjugação

Os ensaios de conjugação foram realizados com a cepa receptora *Caulobacter crescentus* e a doadora S17 misturadas com o auxílio de uma alça de Drigalski em placas de PYE. Posteriormente, foram incubadas de 8-16 horas a 30 °C em estufa. Após esse tempo, a seleção foi feita em placas contendo PYE e o antibiótico ácido nalidíxico 50 µg/mL (esta etapa é necessária para que ocorra a eliminação da *E. coli* que é sensível e manter *C. crescentus* que é resistente) e o antibiótico de seleção plasmideal para garantir a permanência de células de *Caulobacter* contendo as cópias com plasmídeos específicos.

#### 4.11 Mini-preparação plasmideal (Mini-prep)

A purificação dos plasmídeos a partir das culturas bacterianas foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um mililitro e meio de uma cultura crescida durante aproximadamente 12 horas foi centrifugado a 10.000 rpm (12857 g) a temperatura ambiente por 3 minutos. O sedimento de células foi ressuspenso em 100 µL de Solução I gelada (glicose 50 mM, tris-HCl 25 mM pH: 8,0 de EDTA 10 mM pH: 8,0 q.s.p. H<sub>2</sub>O milli-Q). Na seqüência foi adicionado 200 µL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) misturando por inversão do tubo até ficar leitoso. Em seguida adicionou-se 150 µL da solução III gelada (Acetato de potássio 5 M, ácido acético glacial, H<sub>2</sub>O milli-Q) e houve agitação do tubo em vortex por 10 segundos. Foi centrifugada a mistura a 10.000 rpm a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubo de 1,5 mL novo e adicionado 200 µL de solução Fenol equilibrado e 200 µL de Clorofórmio:Álcool isoamílico 24:1, foi agitado em vortex até completa homogeneização. Centrifugou-se 10.000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado em tubo novo e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto gelado, foi deixado em repouso em banho de gelo por 5 minutos. Novamente foi centrifugado 11.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com cuidado e foi ressuspendido em etanol 70% gelado, vortexou-se por alguns segundos e em seguida centrifugado 11.000 rpm a 4 °C por 5 minutos. O etanol foi

descartado e o precipitado de DNA foi seco pela inversão do tubo em papel absorvente, o tubo foi seco em estufa a 37 °C por 2 horas, passado este período adicionou-se 50 µl de TE/RNase.

Após confirmação das clonagens foi promovido novo crescimento bacteriano dos recombinantes em meio LB-líquido com adição do antibiótico de marca de seleção do plasmídeo, sendo submetido à nova extração de DNA plasmideal com Kit de Extração do DNA plasmidial (Invitrogen®) para que a amostra ficasse pura para posterior seqüenciamento de DNA.

O protocolo sugerido pelo fabricante (Invitrogen®) consiste em:

Ressuspender a cultura celular, previamente centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos seguido do descarte do sobrenadante, posteriormente foi adicionado 250 µL do tampão R3 que contém RNase. Em seguida foi adicionado 250 µL de tampão L7 (contendo SDS responsável pela lise celular). A mistura foi submetida a um repouso por 5 minutos em temperatura ambiente, passados este tempo adicionou-se 350 µL do tampão N4 para a precipitação do DNA, sendo a amostra misturada por inversão do tubo até completa homogeneidade, seguido de centrifugação de 12.000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente a solução foi transferida para um tubo de mini coluna fornecido pelo fabricante, e como suporte inferior foi utilizado um tubo de lavagem. A passagem da amostra pela coluna foi realizada com centrifugação 12.000 rpm por 1 min. O eluato foi descartado. A coluna passou por nova lavagem com adição de 500 µL do tampão de lavagem (W10 contendo etanol), sendo incubado por 1 minuto em temperatura ambiente, na seqüência foi centrifugado 12.000 rpm por 1 minuto. O eluato presente no tubo de lavagem foi novamente descartado. Outra lavagem foi realizada na coluna com 700 µL do tampão de lavagem (W9 com etanol), centrifugados a 12.000 rpm por 1 minuto. Após centrifugação o eluato foi descartado e procedeu-se uma nova centrifugação sobre 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 outro microtubo de 1,5 mL, e submetida à eluição do DNA pela adição de 75 µL de TE no centro da coluna. Após adição do TE a coluna ficou em repouso por 1 minuto, seguido por centrifugação por 12.000 rpm por 2 minutos. As amostras de DNA plasmideal purificadas foram identificados e armazenados a -20°C.

#### **4.12 Seqüenciamento de DNA**

A identidade do gene *xynB2* foi confirmada por seqüenciamento automatizado de DNA usando-se o kit Big Dye terminator version 3.1 (Applied Biosystems).

Protocolo de Seqüenciamento de DNA plasmidial usando Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) que consistiu em diluir o DNA numa concentração entre 100 ng a 200 ng e adicionar num microtubo de PCR de 0,2 mL juntamente com 3 µL primer (3,2 pmoles/ul); 3

μL Tampão de seqüenciamento 5 X; 2 μl BigDye v3.1, após as adições completou-se o volume para 15 μL final com água estéril. Posteriormente aplicou-se na amostra um pulso de 10.000 rpm. O tubo foi imediatamente colocado em Termociclador com programação de 96 °C por 2 minutos, 50 °C por 30 segundos, 60 °C por 4 minutos, total de 35 ciclos. Passado este procedimento foi realizado a precipitação da reação de seqüenciamento com glicogênio adicionando 25 μL do coquetel de precipitação (NaOAc 3 M pH 5,2; glicogênio 1 mg/mL; etanol 100%). Em seguida as amostras foram submetidas ao vortex e mantidas no gelo por 15 minutos. Após foi centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. Após foi invertido o tubo para descartar o excesso. Foi adicionado 50 μL de etanol 70% gelado. Foi repetido a centrifugação 4.000 rpm por 10 minutos e inversão do tubo. A amostra foi seca por 1 hora em lugar protegido da luz e posteriormente foi selada com papel alumínio a -20 °C e rotulada. As amostras foram acondicionadas e encaminhadas para seqüenciamento no Instituto de Química da USP/SP.

#### **4.13 Ferramentas de bioinformática**

As análises de bioinformática da seqüência da proteína predita do gene *xynB2* obtida do DNA genômico de *C. crescentus* foi realizada utilizando o algoritmo NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e o programa Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

#### **4.14 Ensaio de indução do gene *xynB2* em *E. coli* (DH10B)**

Células de *E. coli* (DH10B) abrigando o plasmídeo pProex HTa (~ 4,8 kb) com o fragmento de interesse *xynB2* 1,5 kb, foram submetidas um piloto de indução de expressão da proteína β-Xilosidase II. O plasmídeo pPROEX possui característica de adicionar 6 histidinas a proteína expressa o que possibilita a purificação por resina de níquel sepharose. Para tal procedimento foi feito um pré-inóculo do recombinante em 2 mL de LB-líquido adicionado de 20 μL de ampicilina (10 mg/mL), sob agitação de 120 rpm a 37 °C, após o crescimento por 16 horas, inoculou-se 1 mL deste cultivo em 50 mL de LB-líquido em novo frasco com adição de 500 μL de ampicilina. A cultura permaneceu sob agitação de 120 rpm a 37 °C até alcançar  $D.O_{\lambda 600nm} = 0,5-0,6$ , medidos em espectrofotômetro. Estando a cultura nesta condição adicionou-se à cultura celular do recombinante um indutor sintético de transcrição não metabolizável denominado IPTG (Isopropil-β-D-Galactopiranosídeo) a uma concentração final de 0,1 mM, sendo adicionado 10 μL do indutor por mililitro de cultura. A bactéria ficou sob estas condições por 4 horas, onde foram recolhidos de hora em hora uma alíquota para avaliar a expressão em gel de proteína SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

#### 4.15 Purificação de proteína $\beta$ -Xilosidase II de *xynB2* em *E. coli*

Após avaliação da expressão protéica do recombinante, promoveu-se novo crescimento sob mesmas condições mencionadas no ensaio de indução. Após crescimento a cultura foi recolhida e centrifugada a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Em seguida descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso com um coquetel composto por: 3,6 mL de LB-líquido, 20 $\mu$ L de liozima (20mg/mL) (Sigma<sup>®</sup>), 4  $\mu$ L de DNase (Invitrogen<sup>®</sup>), 40  $\mu$ L de inibidor de protease (GE<sup>®</sup>) e 400  $\mu$ L de Fast<sup>™</sup> Break Cell Lysis Reagent 10X (Promega<sup>®</sup>), a mistura foi incubada sob agitação de 116 rpm por 15 minutos a 30 °C. As células lisadas foram centrifugadas e o sobrenadante incubado com coluna pré-empacotadas que permite purificação rápida de proteínas contendo calda de histidina (carga positiva) pelo método de cromatografia de afinidade ao metal imobilizado contendo resina níquel sepharose com volume de 1,5 mL (que possui carga negativa) através do Kit His Spin Trap (GE). Para este procedimento equilibrou-se quatro colunas deste kit comercial com soluções e protocolos fornecidos pelo fabricante. Em seguida 1 mL do sobrenadante das células lisadas pelo coquetel foram passadas para cada uma das 4 colunas, posteriormente foram centrifugadas a 1600 rpm (129 g) a 4 °C por 1 minuto, para que ficasse retido todas as proteínas da cultura na resina. Descartou-se o eluato. Posteriormente foi lavado por duas vezes a coluna com 600  $\mu$ L da solução de Binding buffer (Tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, pH 7.4), a cada lavagem centrifugou-se (1.600 rpm a 4 °C por 1 minuto) e descartou-se o eluato que continha as proteínas totais de *E. coli*, ficando retido na resina somente as de interesse. A coluna foi transferida para tubo novo, onde houve a recuperação das proteínas  $\beta$ -Xilosidases recombinantes; foi eluído com 1 mL da solução de Elution buffer (Tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, pH 7.4) com centrifugação de 1.600 rpm a 4 °C por 1 minuto em cada uma das 4 colunas utilizadas. O eluato que continha a proteína purificada foi recolhido e a proteína foi dialisada com membrana de diálise *Spectrum Spectraidor* (MWCO: 6-8.000 KDa) em água destilada por 48 horas sob refrigeração a 4 °C, para retirada dos sais contidos nos tampões.

#### 4.16 Determinação da atividade de $\beta$ -xilosidase de *Caulobacter crescentus*

Em decorrência da purificação é necessário verificar se a proteína tem atividade de  $\beta$ -Xilosidase. Para tal averiguação foi submetida à amostra purificada ao ensaio padrão de determinação de atividade de  $\beta$ -Xilosidase por método proposto por Miller (1959) que consiste na incubação de 0,25 mL de ONPX (o-nitrofenol-Beta-D-xilopiranosídeo) na concentração de 1 mg/mL (solubilizado em tampão citrato de sódio 0,05M pH 5.4) e 0,025 mL da proteína purificada, a reação foi incubada por um período de 10 até 60 minutos a 50

°C em banho-Maria e em seguida foi adicionado 1 mL de solução de tetraborato de sódio saturado para interromper a reação para que fosse realizado a leitura da referida amostra em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade enzimática foi definida como aquela capaz de liberar 1 µmol de orto-nitrofenol por mililitro de reação.

#### **4.17 Dosagem de proteínas**

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), onde encubou-se a enzima em temperatura ambiente em diluições seriadas (10, 30 e 70 µL) com adição de água até o completar o volume de 100 µL na presença de 1 mL do reativo de Bradford (solução de 0,01 g Coomassie G-250; 5 ml etanol PA; 10 ml ácido fosfórico; água q.s.p 100 ml); após 15 minutos de reação a temperatura ambiente era efetuado a leitura em espectrofotômetro a 596 nm. Para a quantificação da amostra foi usado uma curva de calibração padrão de BSA - Soro Albumina bovina (200 µg/ml), os valores de quantificação proteína foram em miligramas por mililitro de purificado.

#### **4.18 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 9%**

A eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE a 9%) foi feita de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), as amostras de proteína foram coradas com solução O (tampão de amostra 2x - 0,076 g de Tris-base, 4 mL de SDS 10%, 10 mL (1 M) de DDT, 2 mL de glicerol, 100 mL de azul de bromofenol 1%, água q.s.p. para 10 mL). O marcador utilizado foi o 10 KDa Protein ladder (Gibco-BRL). A corrida foi em equipamento de eletroforese (Power Pac 200, BIO-RAD) em sistema de proteína vertical por 120 minutos, 100 Volts, 2 mA. O gel foi corado com solução de "Stain" (Etanol absoluto 50%, Ácido Acético 7%, Comassie Blue R 250 0,4%) e a descoloração do gel foi através da solução "Destain" (Etanol 30%, Ácido acético 7% e água q.s.p.).

#### **4.19 Caracterização enzimática da β-Xilosidase II de *Caulobacter crescentus***

##### **4.19.1 Determinação de pH ótimo e estabilidade enzimática frente aos diferentes valores de pH**

A influência do pH sobre a atividade da β-Xilosidase foi determinada para as faixas de pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 em Tampão McILVAINE (McILVAINE, 1921). E para análise de estabilidade ao pH a amostra ficou sob os mesmos valores de pH a 4 °C por um período de 24 horas. Os ensaios de atividade enzimática seguiu protocolo padrão conforme citado no item 4.15.

#### **4.19.2 Determinação de temperatura ótima e estabilidade enzimática frente às diferentes temperaturas**

A temperatura ótima de atividade da  $\beta$ -Xilosidase II foi estimada incubando a amostra purificada em seu pH ótimo e em temperaturas de 20 a 75 °C (escala crescente de 5 graus). E para a avaliação de estabilidade térmica a reação enzimática foram testadas nas três melhores temperaturas exibidas pela enzima na temperatura ótima, sendo que a cada 20 minutos uma alíquota foi mensurada quanto ao perfil de atividade num período de 4 horas. A estimativa de atividade seguiu a mesma citada no item 4.16.

#### **4.19.3 Efeito de diferentes compostos sobre a atividade enzimática**

A análise para verificação de eventual requerimento de íons cofatores ou sua interferência na atividade da  $\beta$ -Xilosidase em estudo foram testados os efeitos destes compostos sobre a atividade enzimática na presença das seguintes substâncias na concentração final de 2 mM:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , HgCl,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Iodo acetamida, CuCl,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{SnCl}_2$ , KCl, NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , EDTA, DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol. A estimativa de atividade seguiu a mesma do item 4.16.

#### **4.19.4 Efeito da tolerância a Xilose**

O efeito exercido pela xilose sobre a atividade de  $\beta$ -Xilosidase II foi mensurado através da encubação da enzima diluída em pH ótimo na presença de 300  $\mu\text{L}$  de xilose nas concentrações de 1 a 100 mM, utilizou-se o substrato ONPX a 1mM, o ensaio foi conduzido na temperatura e pH ótimo da enzima. A leitura foi em espectrofotômetro a 410 nm.

#### **4.19.5 Parâmetros cinéticos**

A determinação de Constante de Michaelis-Menten  $K_M$  e Velocidade máxima  $V_{\text{máx}}$  foram realizadas com uma faixa de concentração crescente de substrato ONPX (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM) sob pH 6,0 e temperatura de 55 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores calculados pelo método de Lineweaver & Burk (1934).

#### **4.20 Produção de anticorpo policlonal**

Para a produção de anticorpo policlonal usou-se a metodologia proposta por Simão e Gomes, 2001, e consistiu em utilizar uma coelha (*Oryctolagus cuniculus* – Nova Zelândia)

que foi imunizada com 1 mL de Adjuvante completo de Freud (Sigma<sup>®</sup>) com adição de 250 µL da proteína purificada β-Xilosidase II recombinante de *Caulobacter crescentus*. Após 4 semanas, a coelha recebeu uma segunda injeção contendo 1 mL de adjuvante incompleto de Freud (Sigma<sup>®</sup>) adicionado de 250 µL da proteína β-Xilosidase II recombinante purificada.

Passados o período de 15 dias da segunda imunização foi retirado uma alíquota de sangue para obtenção do anti-soro que foi testado por “Western blot”.

Durante todo o período do experimento o animal recebeu dieta padrão ração em pellets e água *ad libitum*, sendo mantida em caixa padrão, mantendo o ciclo de claro e escuro de 12 horas no biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. O presente procedimento foi protocolado, analisado e autorizado pelo Comitê de Experimentação animal da UNIOESTE – Campus de Marechal Candido Rondon sob n.º 5910.

#### **4.20.1 “Western blot”**

Para verificação da eficácia do anti-soro policlonal para β-Xilosidase, realizamos ensaio de “Western blot”, usando o soro imune do coelho como controle (obtido pelo sangue do animal antes do inóculo da proteína recombinante purificada) e o anti-soro obtido após o período de imunização mencionado anteriormente.

A separação das proteínas ocorreu por eletroforese em géis de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE, Laemli, 1970) e a transferência para membranas de nitrocelulose foi realizada no sistema molhado da BioRad. Após a transferência, as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau S 0,1% em ácido acético 10% e descorado em água destilada. O filtro foi bloqueado por 20-30 minutos em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM), com adição de leite 0,5%. Após este período, as membranas foram incubadas com TBS-leite contendo o anti-soro do imune e pré-imune, diluídos 200 X, separadamente. Passado a incubação, as membranas foram lavadas por 5 minutos duas vezes em TBS-T (TBS contendo Tween 20 a 0,05%) e uma vez em TBS, procedendo-se então a encubação com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina, seguida de nova lavagem como descrito acima.

Para a revelação com a fosfatase alcalina, foram utilizados BCIP (5-bromo-4-cloro-6-indolil fosfato; 0,3 mg/mL) e NBT (nitroblue tetrazolium; 0,15 mg/mL) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 9,0; NaCl 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

#### **4.21 Construção do mutante nulo do gene *xynB2***

Para verificar qual é o papel do gene *xynB2* para a bactéria *Caulobacter crescentus*, foi produzido um mutante nulo deste gene em estudo, conforme segue:



A partir da clonagem em pJet1.2/*blunt* do gene *xynB2*, digerimos a referida construção com a enzima de restrição *Sma*I, ao qual clivou o gene e permitiu a inserção de uma cassete de resistência a espectinomicina de 2,0 kb, retirado de pHP45Ω. Após a depleção do gene, digeriu-se a construção com *Eco*RI/*Xho*I e foi em seguida foi subclonado nos sítios *Eco*RI/*Sa*II em pNPTS138; a referida construção foi passada para S17 competente e posteriormente conjugada com *Caulobacter crescentus*. O vetor pNPTS138 é capaz de replicar em *E. coli* mas não em *C. crescentus*, por isto é considerado um vetor suicida. A manutenção do plasmídeo na bactéria só acontece quanto sequências homólogas ao genoma de *Caulobacter* estão clonadas no mesmo porque assim pode-se integrar ao genoma por recombinação homóloga. O gene Kan do pNPTS138 permite a relação positiva de clones e o gene *sacB* a seleção negativa. O gene *sacB* codifica para um levansucrase que converte sacarose em produtos tóxicos para *C. crescentus*. Assim, bactérias que tenham recebido o plasmídeo por integração homóloga são forçadas a expulsar o pNPTS para sobreviver na presença de sacarose, o que favorece um 2º evento de recombinação homóloga. A análise do genoma bacteriano por PCR permite selecionar bactérias que sejam resistentes a espectinomicina e sensíveis a canamicina e que tenham expulsado juntamente com o pNPTS138 a cópia intacta do gene *xynB2* do genoma, mantendo assim a cópia interrompida.

#### 4.22 Construção do mutante condicional

A partir da construção da fusão de tradução gerada para obtenção da proteína para purificação e caracterização, pPROEX HTa – *xynB2*, procedeu-se uma digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI/*Kpn*I e subclonou-se nos mesmos sítios em outro vetor denominado pAS22, na seqüência houve a transformação da S17 competente e posteriormente foi passado para *C. crescentus* por conjugação; o plasmídeo pAS22 possui *PxyI*X que é induzido por xilose e possui gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol. A clonagem do gene *xynB2* neste vetor permite a superexpressão da β-Xilosidase II de *C. crescentus*. Esta cepa foi denominada pMOA e foi construída pela estudante de Iniciação científica Moara Rodrigues Mingori.

#### 4.23 Ensaios da atividade promotora do gene *xynB2*

Foram realizados ensaios de atividade de β-galactosidase, que permite medir indiretamente a atividade do promotor de um determinado gene através da atividade da enzima β-galactosidase, codificada pelo gene repórter *lacZ* fusionado ao promotor de *xynB2*.

Para a realização dos ensaios as bactérias NA1000-p*LacZ-xynB2*, pMOA-p*LacZ-xynB2* e RSJU-2-p*LacZ-xynB2* eram pré crescidas em PYE com adição dos antibióticos tetraciclina; cloranfenicol+tetraciclina e espectinomicina+tetraciclina, respectivamente a 30 °C por 12 a 16 horas. Após este período as culturas eram quantificadas em espectrofotômetro (D.O.<sub>λ600nm</sub>), após foram diluídas para D.O.<sub>λ600nm</sub>=0,1 no meio de ensaio, constituído por M2 com glicose ou xilose 0,2% e adição dos resíduos agroindustriais a 1%. As culturas foram submetidas a crescimento até fase logarítmica (D.O.<sub>λ600nm</sub>=0,4-0,6).

Para analisar a atividade promotora do gene *xynB2*, a cepa *C. crescentus* contendo a construção da região promotora clonada em p*lacZ*/290, foi crescida na presença de diferentes resíduos agroindustriais para a averiguação do papel desta β-Xilosidase na degradação destes compostos vegetais através de ensaios enzimáticos de dosagem de β-Galactosidase (Miller, 1972) utilizando extratos celulares totais de *C. crescentus* crescidas M2 (Elly, 1991) suplementado com glicose 0,2% e em presença de resíduos diversos a 1%. A incubação foi a 30 °C em incubador com agitação orbital sob agitação de 116 rpm em meio mínimos M2. Nos pontos de análises retiravam-se 50 ou 100 µL da cultura e adicionava-se 800 µL e tampão Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,51 g/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,25 g/L; KCl 0,75 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,25 g/L, β-mercaptoetanol 3,6 µL/mL). As células eram rompidas por adição de 50 µL de clorofórmio e ficavam a 30 °C em banho Maria por 5 minutos. Passados este período adicionava-se 200 µL do substrato ONPG 4 mg/mL (orto-nitrofenol D-galactopiranosídeo). Incubava-se por 5 a 10 minutos e interrompia-se a reação com 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Na sequência os tubos eram centrifugados a 12.000 rpm por 3 minutos e ocorria a quantificação da fase aquosa em espectrofotômetro em D.O.<sub>λ420nm</sub>. Os níveis de expressão eram calculados em unidades Miller (U) de acordo com a reação:  $U = (1000 \times D.O._{420nm}) / (\text{tempo da reação em minutos} \times \text{volume de cultura} \times D.O._{600nm})$ .

#### **4.24 Preparo dos resíduos agroindustriais para os ensaios de Atividade Promotora e Caracterização Mutante Nulo de *xynB2***

Os resíduos utilizados nos ensaios foram obtidos em diferentes agroindústrias da Região do Oeste do Paraná. Os mesmos possuem constituição variada (tabela 5); O preparo iniciou com a secagem em estufa a 70 °C e posteriormente o acondicionamento em frascos de vidro com tampa de metal.

Para o uso nos ensaios, os resíduos eram pesados e misturados em água na concentração final de 2%, e na seqüência autoclavados em autoclave vertical (Phoenix) por 20 minutos a 121 °C, para esterilização e melhor homogeneidade dos compostos, durante os ensaios era desconsiderado a quantidade de açúcar já existente no resíduo naturalmente ou gerado em decorrência da esterilização.

Tabela 5 Relação de resíduos dos ensaios de atividade promotora e caracterização do mutante nulo do gene *xynB2*.

Nome	Composição
Mandioca	casca da raiz
Soja	semente inteira
Trigo	palha e casca da semente
Milho	palha e sabugo da espiga
Cana-de-açúcar	bagaço
Arroz	palha e casca do grão
Laranja	bagaço e casca da fruta

#### 4.25 Ensaio de hidrólise de Xilanase de *Aspergillus alliaceus* e $\beta$ -Xilosidase de *C. crescentus*

As enzimas Xilanase e  $\beta$ -Xilosidase purificadas e disponíveis foram submetidas a ensaio de hidrólise para averiguação da capacidade de metabolização dos substratos xilano e bagaço de cana.

O ensaio foi conduzido em tubo de vidro com capacidade de 5 mL, onde adicionou-se os substratos xilano e bagaço de cana com concentração de 2%, este foram diluídos em Tampão McILVAINE 6,0 para a concentração final de 1%. O volume de cada tratamento foi de 2 mL. Primeiramente foi adicionado 1 U enzimática de xilanase que ficou incubada à 50 °C por 24 horas, após este período houve a inativação da enzima por 5 minutos de fervura e na seqüência adicionamos 2 U enzimáticas de  $\beta$ -Xilosidase II, mediu-se a hidrólise em 6, 8, 18 e 24 horas. Os tratamentos controles foram aqueles que não houveram adição de enzima e no caso do controle da inativação da xilanase, uma alíquota de cada tratamento após a fervura foi incubada e testada para controle adicional.

A mensuração da hidrólise foi pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) como descrito por Miller (1959). A reação ocorrida com 125  $\mu$ L do tratamento com adição de 250  $\mu$ L do reagente DNS, as amostras eram fervidas por 5 minutos e foram adicionados 1 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro D.O.<sub>λ540nm</sub> contra um branco contendo água e DNS. A quantificação de açúcares redutores nas alíquotas foi estimada de acordo com uma curva padrão de xilose  $\mu$ mol/mL para definirmos a liberação de produtos de hidrólises nos tratamentos.

#### 4.26 Análise estatística

Nos ensaios de caracterização enzimática as análises foram conduzidas em duplicata por duas vezes, caso houvesse alguma irregularidade de valor por algum erro analítico ou indeterminado, pelo menos uma nova duplicata era realizada; os dados foram plotados no programa estatístico ORIGIN<sup>®</sup> 6.0 e passaram por análise de dispersão estatística através do desvio padrão das médias obtidas durante os ensaios.

Nos ensaios de caracterização do mutante nulo de *xynB2* e demais análises do papel do gene *xynB2* para a bactéria *C. crescentus*, foram considerados médias de três ensaios distintos que exibiram repetibilidade e conformidade de resultados, sendo estes mesclados e avaliados quando a média e desvio padrão para cálculo de barra de erros.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Clonagem do gene *xynB2* e análise da seqüência obtida

Com o objetivo de clonar o gene *xynB2* de *C. crescentus* o DNA genômico bacteriano foi usado como molde para uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos *xynB2-Met* e *xynB2-Stop*. O produto de amplificação obtido foi resolvido em gel de agarose TBE 1X a 1%. A eletroforese preparativa levou a identificação de uma banda 1,5 kb correspondente ao gene *xynB2*, que foi purificada com papel DE81 (Millipore®).

Após, o fragmento de DNA isolado foi tratado com a enzima Polinucleotídeo quinase do Kit de clonagem de produtos de PCR (Fermentas) e ligado com auxílio da enzima T4 DNA Ligase a um sítio não coesivo do vetor pJET1.2/*blunt*, que apresenta um gene de resistência a ampicilina. A reação de ligação foi em seguida usada para transformar células de *E. coli* (DH10B) quimicamente competentes. As células recombinantes obtidas foram plaqueadas em meio LB contendo o antibiótico ampicilina (LBA) para seleção dos plasmídeos recombinantes.

As colônias bacterianas que cresceram no meio LBA foram repicadas em placas novas, concomitantemente inoculadas em meio LBA líquido e submetidas a crescimento até a fase estacionária. Em seguida, as células foram usadas para mini-preparação de DNA plasmideal usando protocolo de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). O DNA plasmideal obtido foi então digerido com enzima de restrição *XbaI* por 2 horas a 37 °C. A enzima *XbaI* cliva o DNA do plasmídeo em um sítio único de *XbaI* e em outro sítio único no gene liberando um fragmento de 1,5 kb. A confirmação da clonagem pode ser realizada pela eletroforese do produto de digestão em gel de agarose TBE 1X 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 5).

O plasmídeo contendo o gene *xynB2* mostrado na Figura 5 foi usado como molde para uma reação de seqüenciamento de DNA automatizado com o oligonucleotídeo universal direto do vetor pJET como iniciador da reação. A seqüência nucleotídica obtida (Figura 6) foi comparada com outras depositadas no GenBank com auxílio do algoritmo BlastX. A identidade do gene *xynB2* foi confirmada mostrando 100% de identidade com a seqüência da  $\beta$ -Xilosidase II de *Caulobacter crescentus* (cepa NA1000) depositada no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Esta mesma seqüência nucleotídica gerou uma proteína predita (Figura 6) que mostrou maior similaridade com  $\beta$ -Xilosidases de patógenos de plantas do mesmo gênero de *Caulobacter*; revelou que para *Xanthomonas* 70% identidade (80% de homologia) com *X. fuscans*, 69% de identidade (80% de homologia) com *X. axonopodis* e 67% de identidade (79% de homologia) com *X. campestris*.

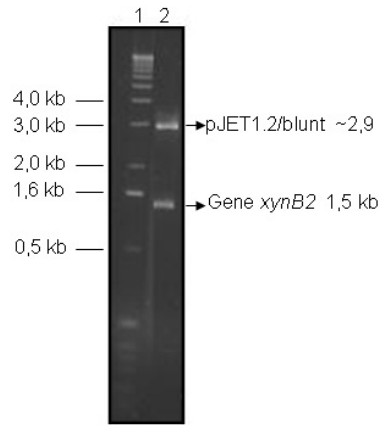


Figura 5 Confirmação da clonagem do gene *xynB2* em gel de agarose TBE 1% (1X). (a) Na canaleta 1 foi aplicado o marcador de peso molecular 1kb DNA ladder e na canaleta 2 o produto de digestão da mini-preparação plasmideal do pJET1.2/blunt contendo o gene *xynB2* de 1,5 kb clonado.

5' cgcccgggtgttccgccagatggcccgtcgtctggcctcgtcgggctatgtcgttctgggtccc  
 caacctctattaccggaccaagaaggcgccgggtgatggaaggggcyatgagcttcgccaa  
 tccccaggatcgcgagacgatcaccgctctggctcggaccgtgacgccgaccacggcgggt  
 caccgacgcccgtggcctttgtcgccttccctcgacgctcagccgcagaccaacaaggccaa  
 gcgcgtcggcgcttcagggctactgcatgggcccggcgtggccttccgcaccgcccggctc  
 gaacccacgcgcatcggcgctgtgggtcagcttccatggcggcggctcagccgcagaggg  
 gccagacagcccgaattgctgattccgaagacgaaggccgactatctcgtcgcctcgc  
 cgacaacgacgacaagcgtgatccgacgtccaaggacaagctcaaggccgcttcgccga  
 ggctaagatcaaggccacggctcgaggtctatgtcggcgccaaccacgggttgaccgtacc  
 gggcagccaagcctacaacgagcctcggcgggagaaggcctggagcgaactgctggcgt  
 gtataaggccgcctctgaggccagtgggagcggcggccttcggcgggtcgtcccattt  
 atcgtacataacaattgatagcgtatcattgccgtgtagccgttactccaagacgtgg  
 aggaaacggatgtcgtatcacgcgagccatcgtggcgggtttgtcagagcctgcgggtt  
 +1 atgcggaacgcccggccccggcgctcgggtcattgatctggatctccgccggggcggcaggg  
 M A N A G P G A R V I D L D L R R A A G  
 ccggttgatcgcttcttcgatctgtcgtcggctcggactatcctggcaccctgatccgc  
 P V D R F F D L S I G S D Y P G T L I R  
 gaggacgcccaggcgcagctgaagaccaccgctcgacgagctgggcttccgctacattcgc  
 E D S Q A Q L K T T V D E L G F R Y I R  
 ttccacgcgatcttccacgagctgtgggcaccgctgaagggtccaggcagcaagatcgtc  
 F H A I F H D V L G T V K V Q D G K I V  
 tacgatggaccaagatcgaccagctgtacgacgcctgctggccaaggggatcaagccc  
 Y D W T K I D Q L Y D A L L A K G I K P  
 ttcatcgactgggtttcacgcccagggctatgaagacgtcggatcagaccattttctac  
 F I E L G F T P F E A M K T S D Q T I F Y  
 tggaaaggggaacacctcccattccaaagccttgacccttggcgcgacctgattgacgccttt  
 W K G N T S H P K L G P W R D L I D A F  
 gtccacccttgcgcgcccgtatggcgtcagggaggtgcgaacctgggttcttcgagctc  
 V H H L R A R Y G V E E V R T W F F E V  
 tggaacgagcccattctcgacggcttctgggagaaggcggaccgaagcggcctatttcgag  
 W N E P N L D G F W E K A D Q A A Y F E  
 ctctatgacgtcaccgctcgcgccatcaaggcgatcgatccgagcctgcccgggtcggcggg  
 L Y D V T A R A I K A I D P S L R V G G  
 cccgcccagggcggcggcgtgggttccggagttcctgcccacgtgaagaagagcggc  
 P A T A G A A W V P E F L A H V K K S G  
 tggcggcgtcgattttgtcaccacccacacttacggcgtcgcagcggcgttcttcgacgag  
 S A V D F V T T H T Y G V D G G F L D E  
 aagggcgtacaggacaccaagctgtcgcgctcggccgatgcggctcgtcggggacgtgcgc  
 K G V Q D T K L S P S P D A V V G D V R  
 cgggttcgagcagatcgaggcctcggccttcccgggactgcgcttacttcaccgaa  
 R V R E Q I E A S A F P G L P L Y F T E  
 tggagcaccagctacccccgcgcgacagcgtccacgacagctatgtcagcgcgcctac  
 W S T S Y T P R D S V H D S Y V S A A Y  
 atcgtcgagaagctgcgacgggtgaaggggctgggtccaggccatgagctactggacctat  
 I V E K L R R V K G L V Q A M S Y W T Y  
 tcggatctcttcgaggagccggggcctccgacggcgccttccagggcgggtttggcctg  
 S D L F E E P G P P T A P F Q G G F G L  
 atgaacccgcaggggatccgcaagcggctcctgggttcgcctacaagctacctgaatgcgctg  
 M N P Q G I R K P S W F A Y K Y L N A L  
 aagggggcgggagctgggtcgcgctgacgatcaggcttccgcccgcgcgacgggtgatcgc  
 K G R E L V C A D D Q V F A A R D G D R  
 gtcgagctcgtggcctatgcttggcgtcaacccgatcagaaggtcagcaaccggcggcttc  
 V A I V A Y A W R Q P D Q K V S N R P F  
 tatacgaagcttacccccgcacggacgtcgaaccgctcaaggttcggctgacgagcctc  
 Y T K L H P A S D V E P L K V R L T S L  
 aagccgggacgctacaagcttctgtcgcggcgtcggctaccgcccgaacgacgcctac  
 K P G R Y K L R V R R V G Y R N D A Y  
 agcgcctatatcgatatggggtcggccacgactctgacggagtcgacgctgcaatcgtcgt

S A Y I D M G S P T T L T E S Q L Q S L  
 caggctctgaccgaagaccggccggagatcgaaaaggcattgaaggtgtccggagaaacc  
 Q A L T E D R P E I E K A L K V S G E T  
 Gtcgtcgatctgcccattgcccggccaacgacgctcgttctcattgagctcgagccgctggcc  
 V V D L P M R A N D V V L I E L E P L A  
 tag 3'  
 STOP

Figura 6 Sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzida do gene da  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus*. A seqüência gênica é mostrada com letras minúsculas enquanto que a seqüência de aminoácidos deduzida é mostrada em letras maiúsculas e diretamente sob a seqüência nucleotídica. O nucleotídeo +1 corresponde ao primeiro nucleotídeo do códon que codifica a metionina (M) iniciadora. As seqüências nucleotídicas usadas para desenho dos oligonucleotídeos empregados para a amplificação da região 5' não codificadora estão destacados em azul, e as usadas para amplificação da região codificadora estão destacados em negrito e sublinhadas. O sítio de restrição para a enzima *SmaI* está mostrada em vermelho na região central da seqüência nucleotídica codificadora. O códon de término de tradução é destacado em negrito pela palavra "stop".

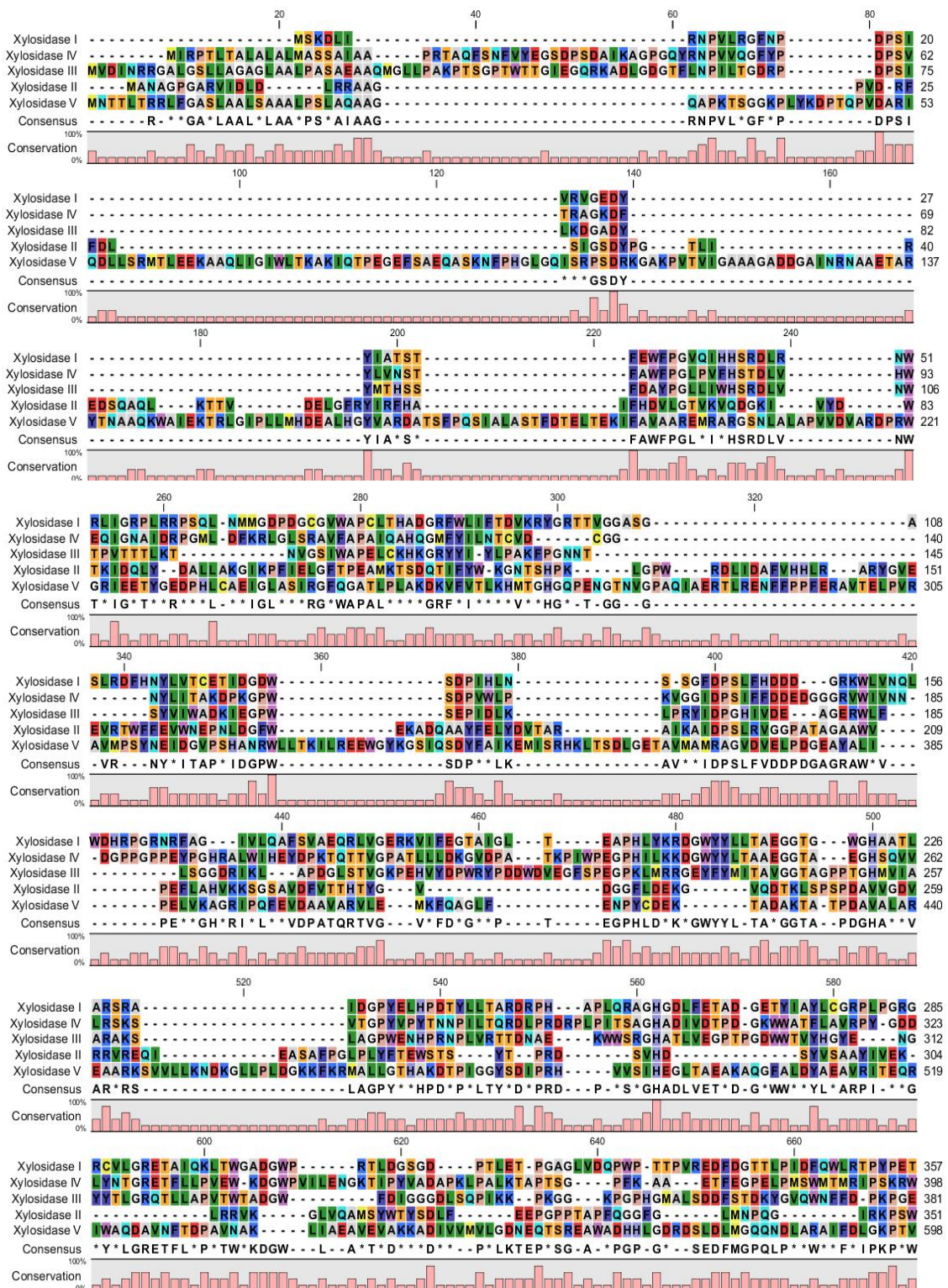
A proteína predita a partir do gene *xynB2* foi também comparada com quatro outras  $\beta$ -Xilosidases produzidas por *C. crescentus*. Como mostra a Figura 7, as  $\beta$ -Xilosidases de *C. crescentus* mostram uma baixa similaridade de seqüência entre si. Esta diferença em seqüências destas proteínas pode justificar em parte a aparente versatilidade destes genes no genoma da bactéria e podem qualificar a bactéria *C. crescentus* como promissora para metabolizar diferentes moléculas de base vegetal por expressar diferencialmente estes genes conforme sua necessidade.

Paralelamente, objetivou-se neste trabalho a sub-clonagem do gene *xynB2* em um vetor de expressão pProEX<sup>Tm</sup> HTa. Este vetor apresenta um promotor de *E. coli* indutível por IPTG e um gene de resistência a ampicilina, assim, permite a clonagem de insertos mantendo-se o quadro de leitura e leva a super-expressão do referido gene fusionado a uma cauda de 6 histidinas. Assim, para que múltiplas cópias da  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus* fossem obtidas, o gene *xynB2* clonado no vetor pJET1.2/*blunt* foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI/XbaI* e o inserto liberado foi purificado de gel de agarose TBE 1X a 1% com papel de purificação de DNA DE81 (Millipore<sup>®</sup>). O fragmento isolado obtido foi ligado ao plasmídeo pProEX<sup>Tm</sup> HTa nos mesmos sítios de restrição do inserto. A confirmação desta sub-clonagem foi feita digerindo-se a mini-preparação plasmideal obtida para o pProEX<sup>Tm</sup> HTa-*xynB2* com as enzimas de restrição *EcoRI/XbaI* (Figura 8).

Com a fusão de tradução do gene *xynB2* construída em uma cepa recombinante de *E. coli*, a  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus* foi submetida a superexpressão heteróloga, e portanto produzida em quantidade elevada pela *E. coli*. A cauda de histidinas que é fusionada á proteína expressa favorece a purificação da  $\beta$ -Xilosidase II recombinante ( $\beta$ -Xil-rec-II) por cromatografia usando resina empacotada de níquel sepharose. As cargas positivas das histidinas ligam-se ás cargas negativas da resina de níquel e favorece a eluição de uma enzima pura. Tal produção de proteínas em laboratório possibilita o estudo estrutural e de perfil de atividade sob determinadas condições de forma individual e sem interferentes.



(a)







(b)

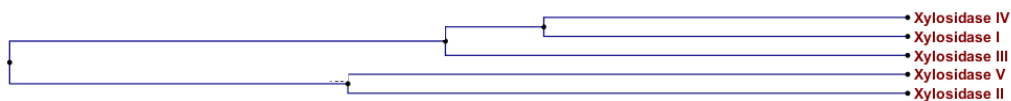


Figura 7 Comparação das seqüências proteicas das cinco  $\beta$ -Xilosidases codificadas pela bactéria aquática *Caulobacter crescentus* (cepa NA1000). (a) As seqüências foram obtidas do genoma da bactéria disponível no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O alinhamento foi realizado com auxílio do programa CLC Main Workbench 5. Os hífens correspondem a “gaps” introduzidos pelo software para maximizar o alinhamento, os asteriscos correspondem a substituições não conservativas. Os resíduos de aminoácidos estão numerados à direita. Na seqüência a descrição das diferentes  $\beta$ -Xilosidases de *C. crescentus* e seus respectivos números de acesso no GenBank:  $\beta$ -Xilosidase I - $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase (CCNA 01040);  $\beta$ -Xilosidase II ( CCNA 02442);  $\beta$ -Xilosidase III (CCNA 00856),  $\beta$ -Xilosidase IV-  $\alpha$ -L- Arabinofuranosidase (CCNA 02893);  $\beta$ -Glicosidase-  $\beta$ -Xilosidase V (CCNA 03149). (b) Árvore fenética gerada com base nas seqüências mostradas no alinhamento em (a), com o auxílio do programa CLC Main Workbench 5 e o algoritmo UPGMA.

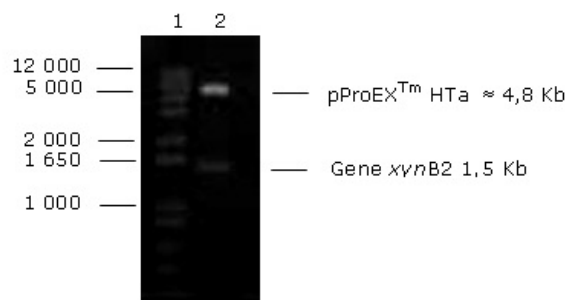


Figura 8 Confirmação da subclonagem do gene *xynB2* em gel de agarose TBE 1% (1X). (a) Na canaleta 1 foi aplicado o marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder plus e na canaleta 2 o produto de digestão da mini-preparação plasmideal do pProEX™ HTa.

### 5.1.1 Medida de expressão do gene *xynB2* em *E. coli*

A viabilidade do recombinante contendo a construção pPROEX HTa-*xynB2* foi testado quanto ao nível de expressão gênica em *E. coli* (DH10B), houve a condução de um piloto de expressão da proteína  $\beta$ -Xilosidase em pequena escala.

A cepa foi crescida em LB-líquido com ampicilina a 37 °C até fase logarítmica ( $DO_{\lambda,600nm} = 0,5-0,6$ ) sob agitação a 120 rpm em incubadora rotacional, após chegar ao crescimento desejado houve a indução das células com IPTG 1 mM. O período de indução da expressão foi de 4 horas, a expressão se mostrou crescente nos tempos 2, 3 e 4 horas (Figura 09) e produziu a proteína de interesse, demonstrando uma banda de 55 KDa que corresponde a  $\beta$ -Xilosidase II recombinantes de *C. crescentus*.

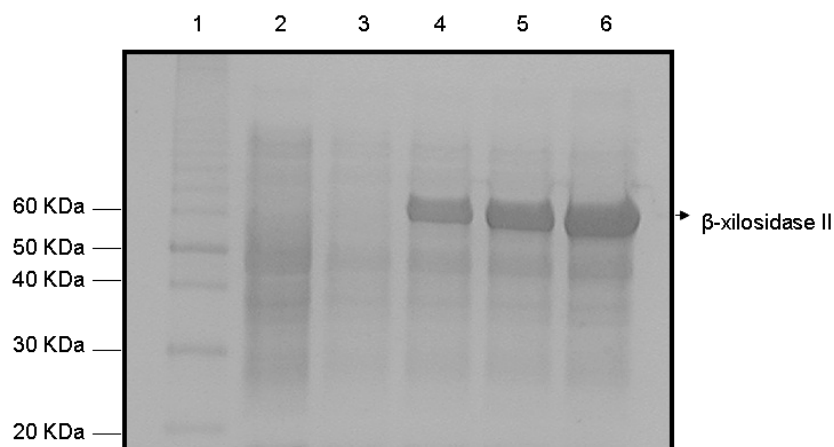


Figura 09 Piloto de expressão do recombinante de *xynB2* em Gel SDS-PAGE 9%. Na canaleta (1) Marcador 10 KDa Protein Ladder; (2) Extrato proteína DH10B selvagem; (3) Extrato protéico total do Recombinante de *xynB2* sem indução; (4),(5) e (6) Representam os tempos de indução com IPTG de 2, 3 e 4 horas.

### 5.1.2 Purificação e Caracterização enzimática de $\beta$ -Xilosidase II recombinante de *Caulobacter crescentus*

Após a comprovação da viabilidade de expressão da cepa recombinante contendo o vetor de expressão pPROEX Hta-*xynB2*, um novo crescimento foi efetuado com uma quantidade maior de meio de cultura conforme descrito no item 4.14 de materiais e métodos, para proceder a purificação protéica. O acompanhamento da purificação podem ser visualizadas na Figura 10.

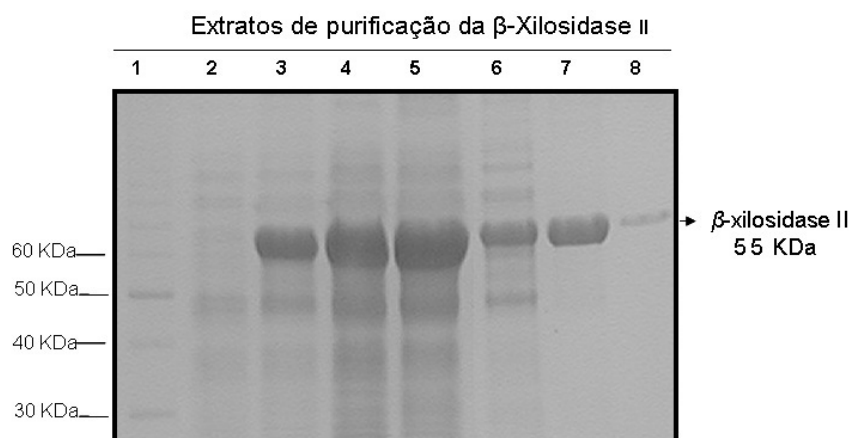


Figura 10 Gel SDS-PAGE 9% com amostras dos extratos de purificação da enzima  $\beta$ -Xilosidase II. (1) Marcador de proteína 10 KDa Protein ladder. (2) Extrato protéico da cepa DH10B contendo a construção pProEX HTa-*xynB2*; (3-5) Extrato total induzido com IPTG (1 mM) nos tempos de 2, 3 e 4 horas, respectivamente. (6) Cultura celular lisada com solução *Fast Break Cell lysis* (Promega<sup>®</sup>) adicionada à coluna de níquel sepharose. (7) Alíquota de 5  $\mu$ L da  $\beta$ -Xilosidase II recombinante após primeira eluição com 500  $\mu$ L de Tampão Fosfato-Imidazol. (8) Alíquota de 5  $\mu$ L da  $\beta$ -Xilosidase II recombinante após segunda eluição da  $\beta$ -Xilosidase II recombinante.

### 5.1.3 Caracterização Bioquímica de $\beta$ -Xilosidase II recombinante

A enzima recombinante  $\beta$ -Xilosidase II de *Caulobacter crescentus* após purificação passou por ensaios de caracterização enzimática. O rendimento alcançado na purificação foi de 339,7 unidades enzimáticas e 1,58 mg de proteína por mililitro de purificado, exibindo uma atividade específica de 215 U/mg.

O primeiro parâmetro bioquímico analisado foi o de pH ótimo da enzima em diferentes tampões McILVAINE com o substrato ONPX 1 mg/mL, sendo que a maior atividade obtida para a  $\beta$ -Xil-rec-II foi em pH 6. Quando a enzima foi incubada em valores de pH igual a 4 e 7, esta exibiu 53 e 28% de atividade residual, respectivamente.

Quando a enzima ficou sob condições de pH de 3, 8, 9 e 10 notou-se que ocorria a desnaturação da proteína devido a alta acidez e alcalinidade imposta pelos tampões, isto foi evidenciado na leitura de 410 nm em espectrofotômetro, onde não se verificava leitura dentro da linearidade de 0,1 e 1 proposta na Lei de Lambert-Beer (Figura 11). Atividades enzimáticas ótimas para  $\beta$ -Xilosidasas em valores de pH igual a 6 ou próximos de 6 também já foram reportadas em outras bactérias, como *Thermoanaerobacterium* sp (Wagschal et al., 2005), *Geobacillus thermoleovorans* (Wagschal et al., 2009) e *Selenomonas ruminantium* (Jordam, 2008) o que demonstra um sítio ativo conservado para a  $\beta$ -Xilosidase de alguns microrganismos.

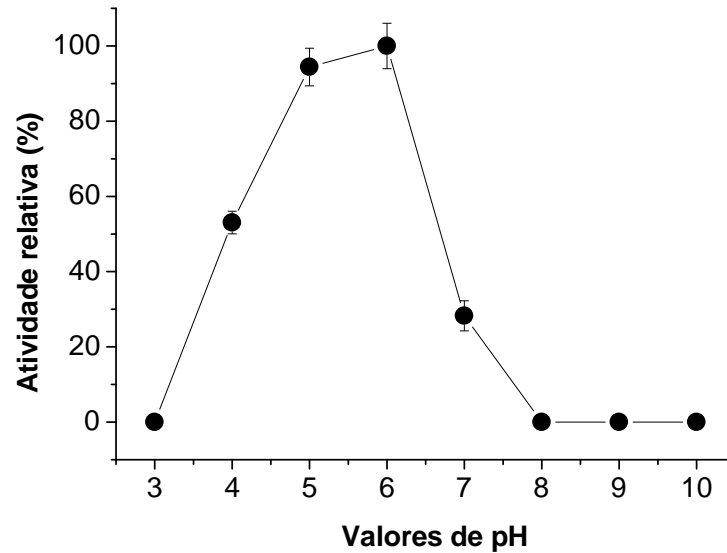


Figura 11 Ensaio de pH ótimo da  $\beta$ -Xilosidase II recombinante.

Após a determinação do melhor pH para a enzima, foram testadas diferentes condições de temperaturas: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 °C. A atividade foi determinada incubando a enzima em seu pH ótimo 6 com o substrato ONPX 1 mg/mL. Como mostra a Figura 12, a enzima exibiu um pico de atividade nas temperaturas de 50, 55 e 60 °C, sendo que todas as outras testadas demonstraram atividade relativa menor de 50%, a temperatura ótima ficou evidenciada quando a enzima ficou incubada a 55 °C, esses dados de temperatura ótima assemelham-se com o trabalho desenvolvido por Yan et al., (2008) que ao purificar uma  $\beta$ -Xilosidase de *Paecilomyces thermophila* obteve a mesma temperatura de 55 °C e um pH ótimo de 6,5. Em adição, Lembo et al., (2006) definaram a mesma temperatura para a  $\beta$ -Xilosidase do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

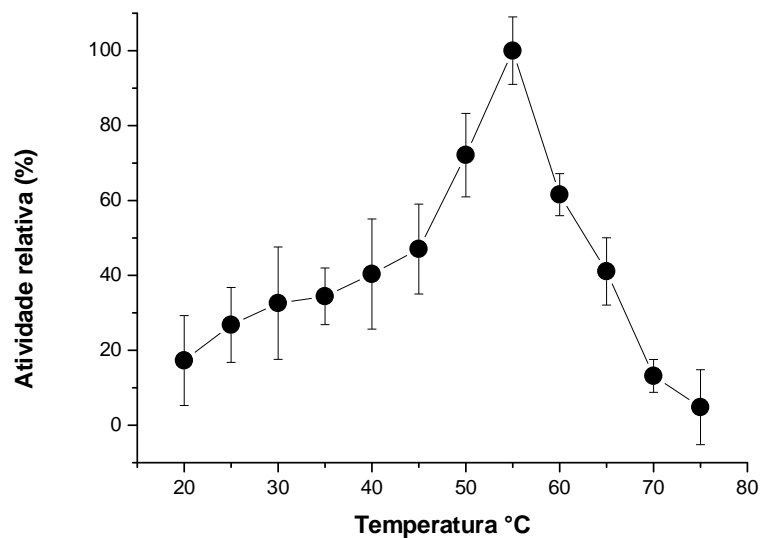


Figura 12 Ensaio de atividade de  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus* em diferentes temperaturas de incubação.

A análise da estabilidade frente a diferentes valores de pH em tampão McILAINE durante 24 horas de incubação demonstrou que a enzima é mais estável em seu pH ótimo 6 seguido do pH 5 (Figura 13).

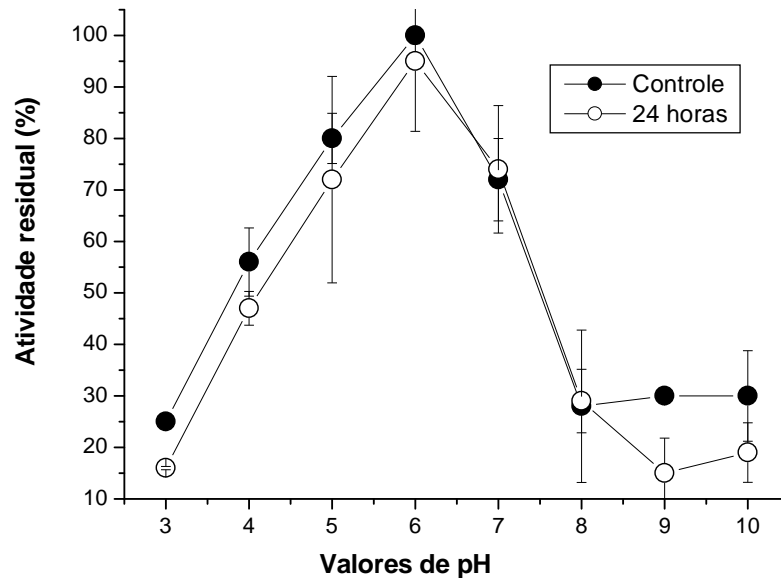


Figura 13 Ensaio de estabilidade ao pH de  $\beta$ -Xilosidase II purificada.

Em relação à termoestabilidade exibida pela enzima quando incubada nas 3 melhores temperaturas exibidas no ensaio de temperatura ótima, verificou-se no período de 4 horas de análise com mensuração de atividade a cada 20 minutos que na temperatura de 50 °C a enzima tem meia vida mesmo após o período do ensaio, já na sua temperatura ótima de 55 °C a meia vida ficou mantida somente em 3 horas de ensaio o que sugere que a presença das pontes de cisteínas existentes na sua estrutura que permite aumentar a estabilidade molecular e a resistência a proteólise nestas condições testadas (Figura 14).

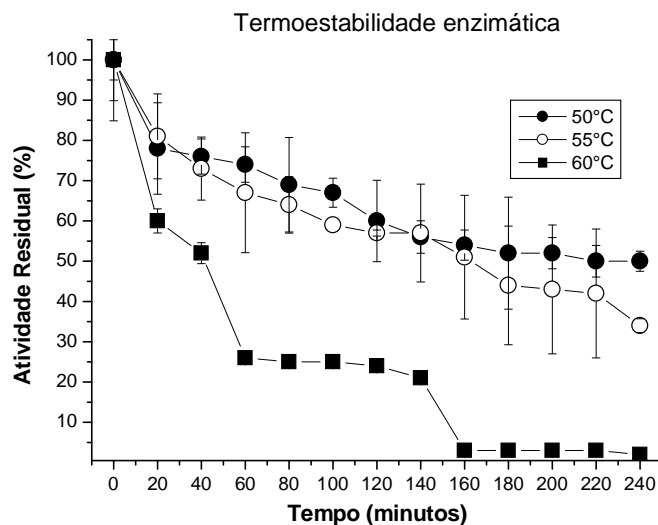


Figura 14 Ensaio de estabilidade enzimática exibida por  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus*.

Os parâmetros cinéticos foram determinados utilizando ONPX como substrato, em condições ótimas de reação para a enzima (pH 6 e 55 °C). Os resultados foram analisados através do gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver & Burk (1934), pois a enzima estudada segue a cinética de Michaelis-Menten. Os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram encontrados a partir dos dois interceptos formados no gráfico (Figura 15), no eixo x e y, respectivamente. Os resultados obtidos foram de 8,4 mM para  $K_M$  e 370  $\mu\text{moles}/\text{min}$  para  $V_{m\acute{a}x}$ .

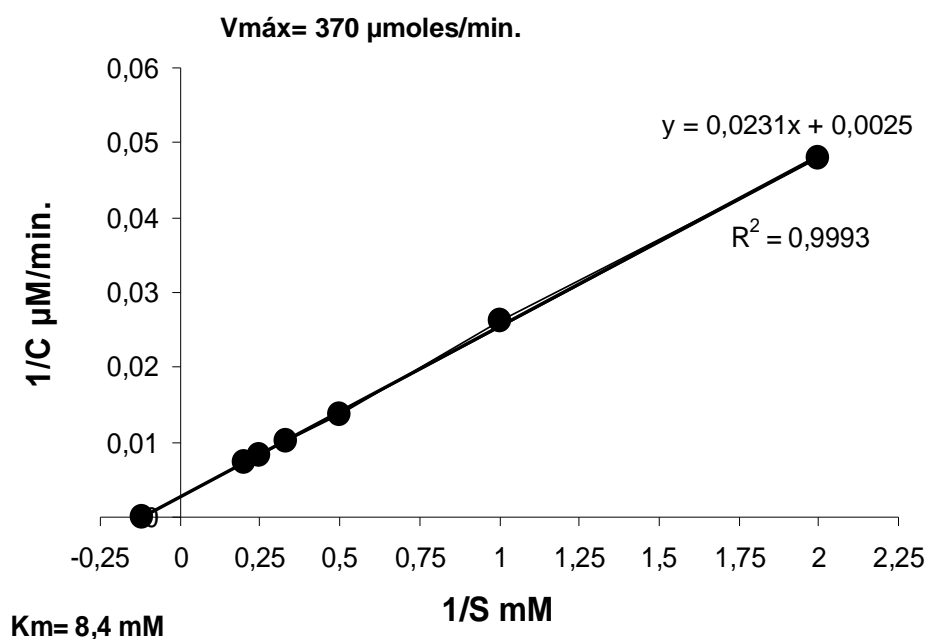


Figura 15 Efeito da concentração do substrato sobre atividade de  $\beta$ -Xilosidase II recombinante.

Na análise de uma  $\beta$ -Xilosidase da bactéria anaeróbica *Bifidobacterium breve* isolada do intestino humano, Shin e colaboradores (2003) verificaram também uma alta velocidade máxima de assimilação frente ao substrato de 121,8  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , o que se assemelha com estudos de Kubata et al., (1994) que ao estudar a referida enzima proveniente de *Aeromonas caviae* verificou uma velocidade de 182  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . O que sugere que as  $\beta$ -Xilosidases de alguns microrganismos podem apresentar um comportamento conservado para metabolizar rapidamente o substrato.

O efeito da xilose sobre a atividade enzimática foi testada incubando-se a enzima em diferentes concentrações: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM em pH 6 a 55 °C. Verificou-se uma forte inibição em todas as concentrações testadas, a atividade residual ficou prejudicada em cerca de 80% em relação à atividade enzimática sem a presença do monossacarídeo (Figura 16). A enzima em condições de atuação frente a um substrato seja *in vitro* ou naturalmente no ambiente terá uma influência deste açúcar em sua atividade, é importante ressaltar que a enzima purificada nesta análise se encontra fora da célula o que pode influenciar nos resultados, tendo em vista que a xilose é gerada é produto decorrente

de sua hidrólise quando atua nos compostos hemicelulósicos. Mas se considerarmos que os parâmetros cinéticos demonstraram alta velocidade de assimilação, pode-se sugerir que a enzima tenha vantagem numa situação em que há alta disponibilidade de substrato, o que provavelmente dará a enzima uma taxa de hidrólise rápida o que favorecerá o processo de desconstrução da hemicelulose até que tenha prejuízo em sua atividade pela influência da xilose.

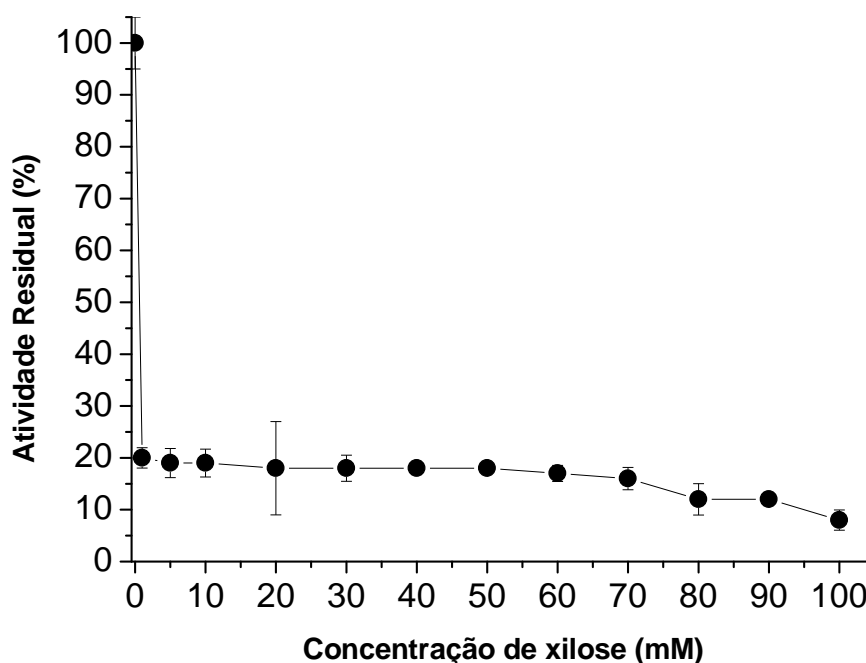


Figura 16 Efeito de tolerância a xilose de  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus*.

A fim de verificar a atividade de  $\beta$ -xilosidase II em diferentes condições de sais e outros agentes químicos. A enzima foi incubada por 15 minutos a 4 °C e posteriormente foi verificada a atividade enzimática na presença dos diferentes agentes químicos. O ensaio demonstrou que a enzima foi parcialmente inativada pelos sais  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$  e agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol; a enzima apresentou ainda uma inibição na atividade quando em contato com  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Iodo acetamida,  $\text{CuCl}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ , EDTA e DTT. Quando incubado com presença de  $\text{KCl}$  a enzima apresentou um aumento da atividade enzimática, o que sugere que o sal cloreto de potássio de alguma forma exerce um co-fator benéfico em seus sítios catalíticos o que melhorou o desempenho da mesma (Tabela 6).

Tabela 6 Efeito de vários compostos sobre a atividade enzimática de  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus*

Substância 2 mM	Atividade Relativa (%)
Controle	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	63
HgCl	48
MgSO <sub>4</sub>	24
BaCl <sub>2</sub>	26
NH <sub>4</sub> Cl	23
Iodo acetamida	23
CuCl	41
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	36
MnSO <sub>4</sub>	77
FeSO <sub>4</sub>	47
SnCl <sub>2</sub>	44
KCl	132
NaCl	25
CaCl <sub>2</sub>	31
CuSO <sub>4</sub>	23
ZnSO <sub>4</sub>	47
EDTA	23
DTT	23
$\beta$ -mercaptoetanol	65

#### 5.1.4 Análise de potencial de hidrólise da $\beta$ -Xilosidase II recombinante

Com o objetivo de se averiguar a potencialidade de aplicação  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus* em processos biotecnológicos que levem o uso de resíduos lignocelulósicos, foi realizado um ensaio incubando-se a referida enzima com a Xilanase purificada de *Aspergillus alliaceus* (gentilmente cedida por Josielle Abahão e Marina Kimiko Kadowaki do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos) na presença de xilano e bagaço de cana de açúcar. Neste experimento, verificou-se que a porcentagem relativa de produtos de hidrólise do xilano e bagaço de cana de açúcar, aumentaram 2,5 e 6,5 vezes, respectivamente, após incubação por 18 horas com a  $\beta$ -Xilosidase II recombinante pura de *C. crescentus*. (Figura 17). Este resultado sugere, que a  $\beta$ -Xilosidase II de *C. crescentus* pode ser aplicada em processos que visem a pré-degradação da fibra do bagaço da cana de açúcar liberando açúcares de 5 e 6 carbonos que possam ser usados em processos fermentativos por exemplo para a produção de compostos de valor comercial como o etanol de segunda geração (Jarboe et al., 2009).



A importância do emprego de consórcio enzimático foi evidenciado no trabalho de Gottschalk et al., (2010) que demonstrou que a sinergia enzimática entre enzimas produzidas por *Trichoderma* e *Aspergillus* sobre o bagaço de cana permitiu altos rendimentos da despolimerização das cadeias de hemicelulose; o que torna a bioconversão de biomassa lignocelulósica em açúcares mais eficientes que métodos químicos; por resultar em um equilíbrio na formação de compostos inibidores que dificultam o rendimento posterior na fermentação dos açúcares em processo como a geração de etanol celulósico. O mesmo autor enfatizou ainda que no Brasil há uma necessidade urgente de estudos no que diz respeito a melhoria no emprego deste tipo de tecnologia, tendo em vista que gera 195 milhões de toneladas anuais de resíduos somente da atividade de beneficiamento da cana de açúcar, é previsto um excedente de pelo menos 12% para os próximos dois anos.

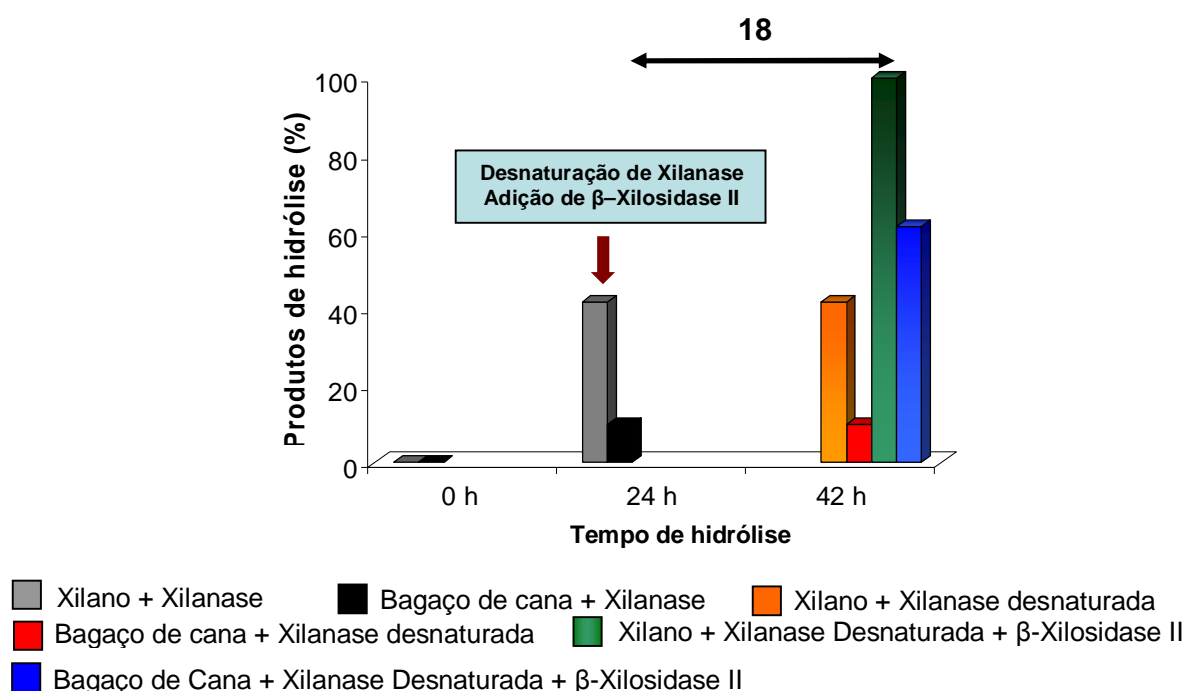


Figura 17 Porcentagem de hidrólise do xilano e bagaço de cana de açúcar por ação sucessiva da Xilanase purificada de *A. alliaceus* e a  $\beta$ -Xilosidase II recombinante purificada de *C. crescentus*.

### 5.1.5 Análise do anticorpo policlonal

A  $\beta$ -Xilosidase II pura foi também empregada para a produção de um anticorpo policlonal em coelho conforme descrito em Materiais e Métodos. A produção deste anti-soro foi obtida através do soro do coelho imunizado, o que foi confirmado com sucesso através do ensaio de “Western blot” onde a proteína  $\beta$ -Xil-rec-II pura de *C. crescentus* foi imobilizada em membrana de nitrocelulose por transferência de gel SDS-PAGE (Figura 18). O soro imunizado do coelho foi altamente específico, sendo capaz de reconhecer a proteínas pura mesmo diluído cerca de duzentas vezes, enquanto o soro pré-imune não reconheceu bandas na membrana de nitrocelulose (dados não mostrados).

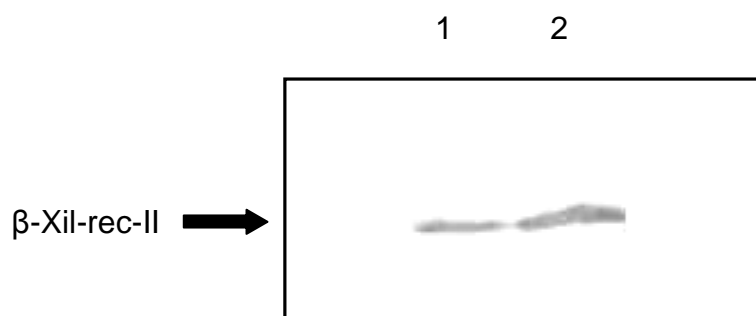


Figura 18 “Western blot” realizado com anti-soro contra a  $\beta$ -Xilosidase recombinante de *C. crescentus*. Alíquotas de 1  $\mu$ g (canaleta 1) e 3  $\mu$ g (canaleta 2) da proteína recombinante purificada conforme descrito em Materiais e Métodos foi resolvida em gel SDS-PAGE 9% e transferida para membrana de nitrocelulose. O anti-soro anti- $\beta$ -Xilosidase foi diluído em TBS-leite 1% (1:200) e incubado com a membrana de nitrocelulose por 24 horas a 22° C. Após lavagens com TBS-T e TBS a membrana foi re-incubada com anti-IgG de coelho conjugada com Fosfatase Alcalina que converte os substratos cromogênicos NBT e BCIP em produtos coloridos que podem ser visualizados no ‘blot’ acima.

## 5.2 Construção e análise do mutante nulo de *xynB2* e caracterização

Com o objetivo de se averiguar o papel do gene *xynB2* para a bactéria *C. crescentus* o mesmo foi usado para a construção de um mutante nulo. A estratégia foi baseada em dois eventos de recombinação homóloga, utilizando-se o plasmídeo pNPTS138 (M.R.K. Alley) como vetor suicida. Este plasmídeo, que não se replica em *C. crescentus*, possui uma marca de resistência à canamicina, origem de transferência e um sítio de clonagem múltipla, apresentando também o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* cujo produto, a enzima levansucrase, converte sacarose adicionada ao meio a um composto tóxico para a célula. O gene *xynB2* foi clonado neste vetor, sendo o mesmo interrompido pelo cassete de resistência à espectinomicina (retirado do PHP45 $\Omega$ , Prentki & Krisch, 1984) (Figura 19).

A construção feita em *E. coli* foi transferida por conjugação para *C. crescentus*, selecionando-se clones resistentes à canamicina e a espectinomicina. Como a origem de replicação (ColE1) do pNPTS138 não é funcional em *C. crescentus*, apenas clones que tiveram o plasmídeo integrado ao cromossomo foram viáveis, ficando assim com uma cópia funcional e uma interrompida do gene *xynB2*. O local da integração foi analisado por PCR, com os mesmos oligonucleotídeos usados para o isolamento do gene *xynB2* a partir do DNA total de *C. crescentus* e independentemente do local de integração no genoma ter sido a 5’ ou 3’ do gene selvagem. Uma colônia bacteriana exibiu no seu genoma a cópia interrompida de 3,5 kb (correspondente a 2,0 kb do cassete de espectinomicina e 1,5 kb do gene *xynB2*) além da cópia selvagem do gene *xynB2* (Figura 20 a). Esta cepa foi usada para o segundo evento de recombinação homóloga.

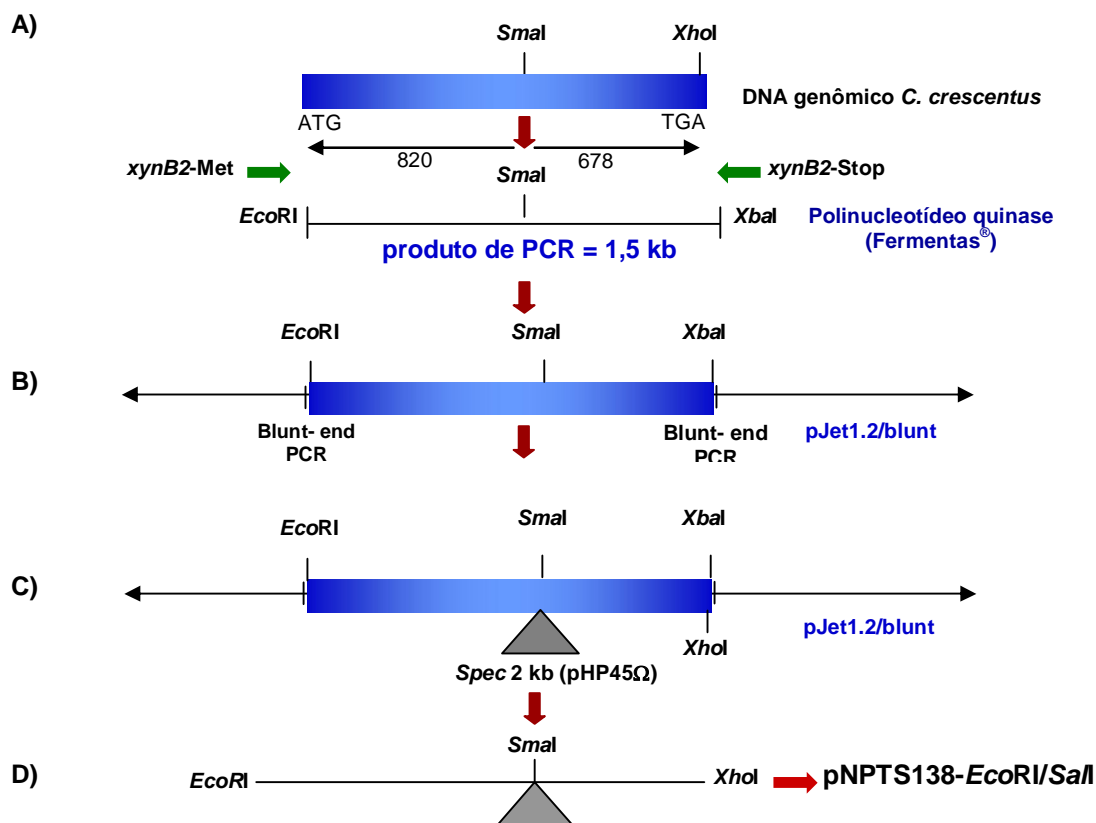


Figura 19 Estratégia de construção do mutante nulo de *xynB2*. (A) Amplificação do gene *xynB2* por PCR. (B) Clonagem no vetor pJET1.2blunt. (C) Digestão do gene *xynB2* no sítio de restrição *SmaI* e inserção do cassete de resistência a espectinomicina. (D) Sub-clonagem no vetor suicida pNPTS138.

Células da primeira recombinação foram crescidas em meio PYE espectinomicina e sacarose a 3% para selecionar bactérias que espontaneamente tenham sofrido recombinação e expulsado a cópia selvagem do gene *xynB2* juntamente com o plasmídeo. As colônias obtidas foram passadas concomitantemente para placas de PYE com adição de antibiótico espectinomicina e PYE espectinomicina com canamicina. Foram selecionadas 10 colônias que cresceram somente em presença de espectinomicina. Essas colônias foram usadas para a extração de DNA genômico e análise por PCR, o gel com os produtos de PCR revelaram duas cepas com a presença somente do gene silenciado de *xynB2*. Este mutante nulo foi denominado RSJU-2 (Figura 20 b).

Em uma próxima etapa este mutante nulo foi bioquimicamente caracterizado quanto a produção de  $\beta$ -Xilosidases. Para tal, as cepas NA1000 e RSJU-2 foram crescidas durante 24 horas até densidade óptica próxima de 0,6 em meio mínimo contendo diferentes resíduos agroindustriais a 1% e outras fontes de carbono. Após este período as células foram coletadas e lisadas para dosagem de  $\beta$ -Xilosidases.

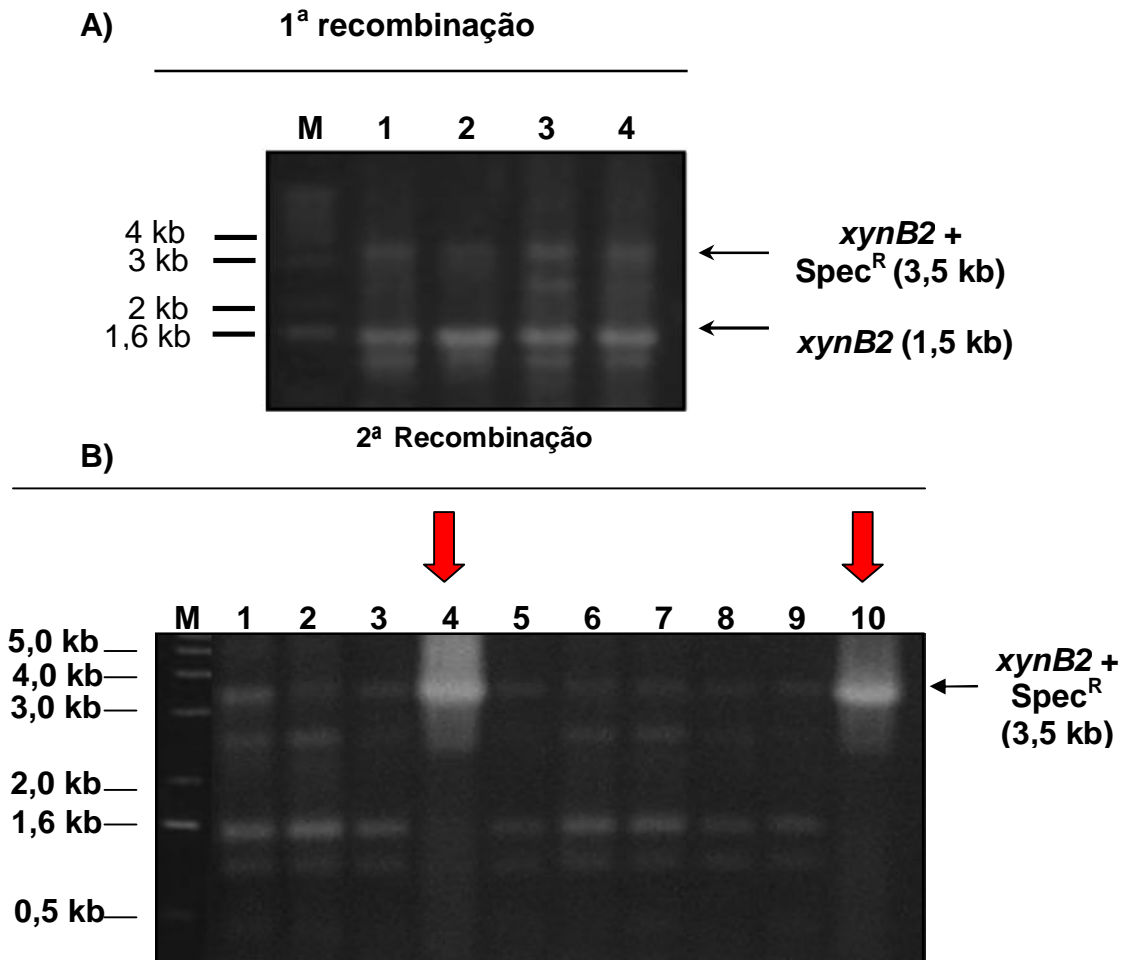


Figura 20 Géis de agarose dos eventos de dupla recombinação homóloga para construção de RSJU-2. (A) Gel de agarose TAE 1x 1,5%. M corresponde ao marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder plus e as canaletas de 1 a 3 as amostras de DNA genômico das cepas que foram submetidas ao 1º evento de recombinação homóloga, que consistiu em conjugar a cepa S17 de *E. coli* com a construção pNPTS138 – *xynB2*:: $\Delta$ Spec com *C. crescentus* o que permitiu a recombinação por homologia de sequência entre plasmídeo e bactéria receptora nas três amostras visualizadas. (B) Gel de agarose TAE 1X 1,5%. M corresponde ao marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder e as canaletas de 1 a 9 mostras o DNA genômico das bactérias que foram submetidas ao segundo evento de recombinação com adição de 3% de sacarose no meio de crescimento. As amostras 4 e 9 correspondem a DNA amplificado de cepas que ficaram apenas com a cópia interrompida do gene, confirmando a construção do mutante nulo de *xynB2*.

Na figura 21, as barras brancas expressam a atividades relativas de  $\beta$ -Xilosidases obtidas para a cepa NA1000 na presença de diferentes resíduos e as pretas as obtidas para o mutante nulo do gene *xynB2*. Para todas as fontes de carbono usadas, as atividades de  $\beta$ -Xilosidases foram maiores na cepa mutante do que na cepa parental. Estes resultados sugerem que a depleção do gene *xynB2* regula positivamente a indução de uma ou mais  $\beta$ -Xilosidases em *C. crescentus*, visto que a bactéria apresenta mais outros 4 genes que codificam 4  $\beta$ -Xilosidases diferentes. Poderíamos pensar que a indução de uma ou mais  $\beta$ -Xilosidases estaria ocorrendo apenas como um mecanismo compensatório pela ausência da

$\beta$ -Xilosidase II, o que seria mais exacerbado pela presença dos indutores presentes nos resíduos lignocelulósicos. Entretanto, a cepa RSJU-2 já mostra uma indução maior de  $\beta$ -Xilosidases do que a NA1000 mesmo em meio mínimo contendo apenas glicose como fonte de carbono. Este dado sugere que a  $\beta$ -Xilosidases II possa regular negativamente a expressão ou atividade de outras  $\beta$ -Xilosidases quando presente. Os dados na literatura a respeito da regulação de genes xilanolíticos são praticamente inexistentes, mas sabe-se que em *C. crescentus* além do fator de transcrição Sigma majoritário ( $\sigma^{70}$ ) e o Sigma específico de choque térmico ( $\sigma^{32}$ ) existem outros treze fatores Sigma com funções extracitoplasmáticas ( $\sigma^{ECF}$ ) (Marks et al., 2010). Muitos destes fatores de transcrição ainda não têm função definida, assim, é provável que os genes que codificam enzimas xilanolíticas sejam regulados por um destes e estudá-los neste contexto é uma das perspectivas do nosso laboratório.

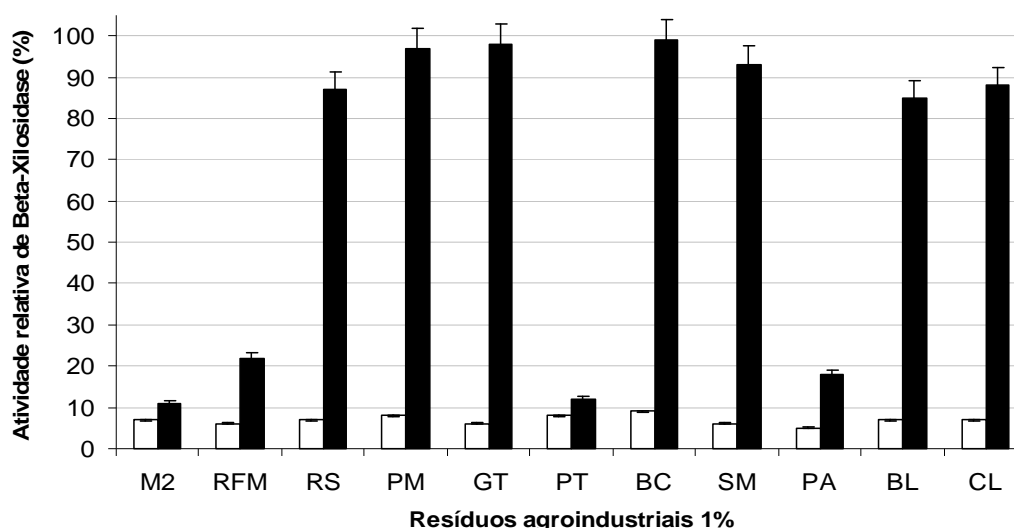


Figura 21 Atividade relativa de  $\beta$ -Xilosidase na presença de diferentes fontes de carbono. Células de *C. crescentus* cepa NA1000 (barras brancas) e RSJU-2 (barras negras) foram crescidas em M2 até fase estacionária e diluídas para D.O. 0,1-0,2 ( $\lambda$  600 nm) em diferentes fontes de carbono: M2 (meio mínimo), RFM (resíduos fibroso de mandioca), RS (resíduo de soja), PM (palha de milho), GT (gérmen de trigo), PT (palha de trigo), BC (bagaço de cana de açúcar), SM (sabudo de milho), PA (palha de arroz), BL (bagaço de laranja) e CL (casca de laranja). Após 24 horas de cultivo as células atingiram densidade óptica igual a 0,6-0,8. Alíquotas foram coletadas, centrifugadas e congeladas por 24 horas. Após lise celular em Tampão citrato 50 mM pH 5,4, alíquotas foram usadas para dosagem da atividade de  $\beta$ -Xilosidases totais.

Para confirmar a hipótese de que a ausência do gene *xynB2* pode regular positivamente a atividade de outras  $\beta$ -Xilosidases de *C. crescentus*, foi feito um experimento similar ao mostrado na Figura 22, usando M2 com glicose para NA1000 e RSJU-2, e, M2 com xilose para a cepa pMOA (M. R. Mingori - dados não publicados), que superexpressa o gene *xynB2*. Entretanto, foram selecionados apenas as melhores fontes indutoras. A atividade de  $\beta$ -Xilosidases foi mensurada após 12 e 24 horas de crescimento na presença das diferentes fontes de carbono. Como pode ser visto ainda na Figura 22 a atividade

relativa de  $\beta$ -Xilosidases no mutante nulo já é mais elevada do que a NA1000 mesmo em fonte não indutora M2 contendo glicose. Entretanto ocorreu um drástico decréscimo na atividade de  $\beta$ -Xilosidases na cepa mutante condicional pMOA, para todas as fontes de carbono usadas. Estes resultados sugerem que a presença desta proteína em muitas cópias exerce um efeito negativo na expressão de outras  $\beta$ -Xilosidases.

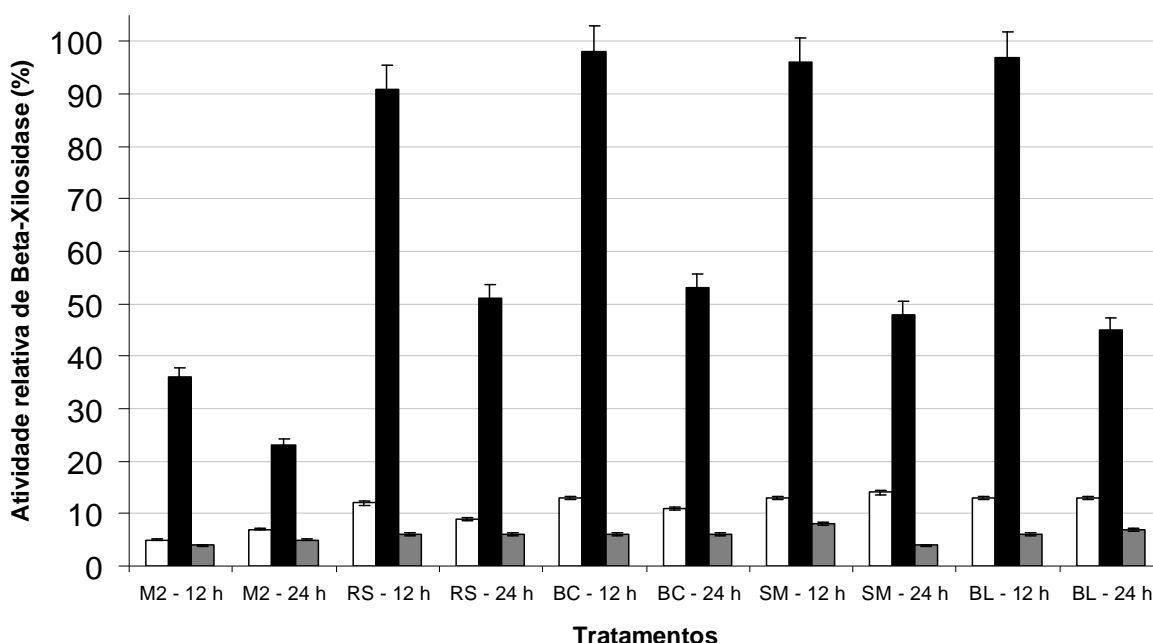


Figura 22 Ensaio de atividade de  $\beta$ -Xilosidase com diferentes cepas mutantes de *Caulobacter crescentus*. As diferentes cepas de *C. crescentus* NA1000 (barras brancas), RSJU-2 (barras negras) e pMOA (barras cinzas) foram pré-crescidas em meio mínimo M2 até fase estacionária e diluídas para D.O. 0,1 em meio contendo resíduo de soja (RS); bagaço de cana (BC); sabugo de milho (SM) e bagaço de laranja (BL) por 12 e 24 horas a 30 °C. As amostras foram analisadas conforme metodologia exposta na figura 21.

Para verificar se a variação nos níveis de atividade de  $\beta$ -Xilosidases ocorreram como um reflexo de variações nos níveis de transcrição de genes de  $\beta$ -Xilosidases nas diferentes cepas, foi usada uma fusão de transcrição a partir da clonagem do promotor do gene *xynB2* a frente do gene repórter *lacZ* que codifica a  $\beta$ -Galactosidase de *E. coli* (Figura 23) (M. M. Mingori, dados não publicados). Assim pode-se dosar a atividade de  $\beta$ -Galactosidase como uma medida da atividade do promotor do gene *xynB2*. Esta construção foi transferida por conjugação para as cepas NA1000 e os mutantes pMOA e RSJU-2 de *C. crescentus*.

Os ensaios de atividade promotora pela dosagem da atividade de  $\beta$ -Galactosidase nas diferentes cepas mostraram que a transcrição do gene *xynB2* é inibida na cepa pMOA e induzida na cepa mutante RSJU-2 (Figura 24). Outros experimentos estão sendo conduzidos para averiguar a expressão em nível de transcrição dos outros 4 genes de  $\beta$ -Xilosidases, mas este resultado mostrado na figura 24 confirma os dados de dosagem enzimática (Figuras 21 e 22) e sugere um papel regulatório para a proteína  $\beta$ -Xilosidase II por um mecanismo que ainda não está definido. Vale ressaltar que a transcrição do gene

*xynB2* na cepa parental mostrada na Figura 24 é induzida quando a bactéria cresce na presença de resíduos agroindustriais. Embora seja uma indução acanhada, o mesmo acontece nos ensaios de atividade enzimática para  $\beta$ -Xilosidases, confirmando o potencial da *C. crescentus* para o aproveitamento de resíduos agrícolas.

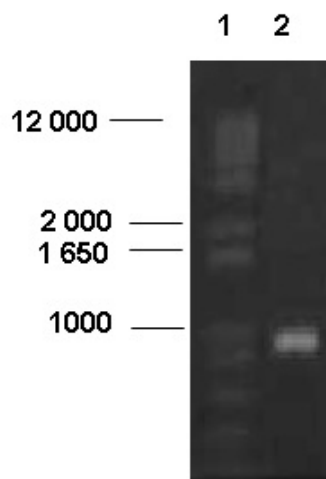


Figura 23 Fusão de transcrição gerada pela clonagem da região 5 não codificadora do gene *xynB2* no vetor *placZ290*. (A) Na canaleta 1 foi aplicado o marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder plus e na canaleta 2 o produto de PCR obtido pela clonagem da região promotora do gene *xynB2* de 0,8 Kb em *placZ/290*.

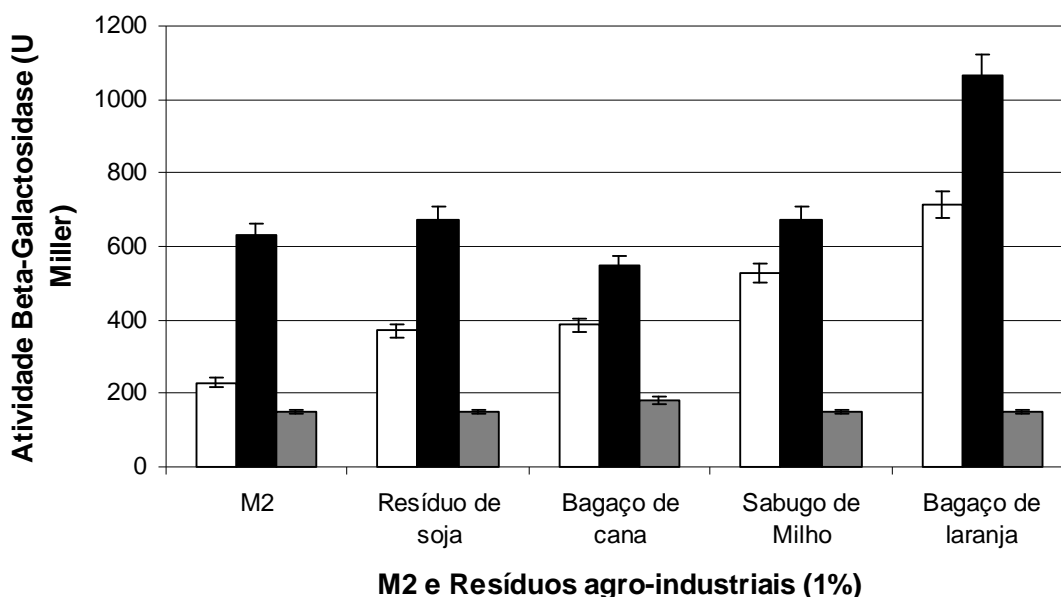


Figura 24 Ensaio de  $\beta$ -Galactosidase como atividade promotora. As células de *C. crescentus* foram crescidas em meio mínimo M2 até fase estacionária e foram diluídas para  $D.O_{\lambda 600nm}$  igual a 0,1 em meio mínimo contendo diferentes resíduos agroindustriais, e, incubadas a 30 °C até fase logarítmica de crescimento ( $D.O_{\lambda 600nm}$  0,6-0,8). Após este período, alíquotas da cultura foram retiradas e usadas para ensaio de atividade de  $\beta$ -Galactosidase como descrito em materiais e métodos. Dados obtidos para a cepa NA1000-*pLacZ-pxynB2* correspondem a barras brancas, para a cepa RSJU-S *pLacZ-pxynB2* correspondem as barras pretas e para a cepa pMOA- *pLacZ-pxynB2* as barras cinzas.

## 6 CONCLUSÕES

1 Na caracterização bioquímica verificou-se que a enzima trabalha melhor em pH 6 e temperatura ótima de 55 °C, tendo meia vida de 4 horas a 50 °C e melhora do desempenho na presença do sal KCl.

2 A partir do ensaio de hidrólise, a Beta-Xilosidase II demonstrou uma metabolização de xilano e bagaço de cana de 2,5 e 6,5 vezes, respectivamente, o que confirma a possibilidade de aplicação biotecnológica em diversos bioprocessos além da bancada.

3 A atividade de  $\beta$ -Xilosidase é induzida na presença de resíduos agrícolas em *C. crescentus*, e no caso específico da  $\beta$ -Xilosidase II esta indução é dependente de transcrição.

4 É provável que a Beta-Xilosidase II tenha um papel regulatório para a bactéria uma vez que sua depleção induz a atividade de outras  $\beta$ -Xilosidases e quando é superexpressa provoca um drástico declínio nestas atividades.

5 A caracterização completa das cepas mutantes RSJU-2 e pMOA pode nos fornecer não somente dados interessantes a cerca da regulação da expressão das  $\beta$ -Xilosidases mas também pode fornecer aplicações biotecnológicas para *C. crescentus*.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do gene em estudo da bactéria *Caulobacter crescentus* deu início a elucidação do sistema enzimático pertencente a esta bactéria.

As análises do crescimento destes microrganismos na presença de diferentes resíduos agroindustriais despertou a viabilidade de se aplicar em processos biotecnológicos seja em reatores ou ainda em processos de pré-tratamento de material de origem vegetal; mas para isso estudos posteriores a estes tem de surgir para contornar as dificuldades e falta de investigações científicas desta natureza.

Uma das dificuldades encontradas na execução do presente trabalho foi a escassez de trabalhos científicos com  $\beta$ -Xilosidases de bactérias, o que sugere um campo de estudos amplo e ainda pouco estudado.

O gene em análise nesta investigação revelou uma importante ferramenta para estudos posteriores de regulação gênica nesta bactéria.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Toledo, 2010.

ALLEY, M.R.K.; GOMES, S.L.; ALEXANDER, W.; SHAPIRO, L. Genetic analysis of a temporally transcribed chemotaxis gene cluster in *Caulobacter crescentus*. **Genetics**, Bethesda-MD, USA, n. 129, 1991. 333-342 p.

ANDRADE, S.V.; POLIZELI, M.L.T.M.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A. Effect of carbon source on the biochemical properties of  $\beta$ -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, San Diego, CA, v. 39, 2004. 1931-1938 p.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol Review**, Amsterdam, NL, n. 29, 2005. 719-735 p.

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 Microbiology Physiology**, San Diego, CA, n. 54, 2009.

BENEDETTI, A.C.E.P. Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP 2009.

BEUKES, N.; PLETSCHKE, B.I. Effect of lime pré-treatment on the synergistic hydrolysis of sugarcane bagasse by hemicellulases. New York, **Bioresource Technology** 101, 2010. 4472-4478 p.

BRÜX, C.; DAVID, A.B.; SHEZIFI, D.S.; LEON, M.; NIEFIND, K.; SHOHAM, G.; SHOHAM, Y. The structure of an inverting GH43  $\beta$ -Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, CA, n. 359, 2006. 97-109 p.

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, 2007. 96-105 p.

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

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

CAVALIER-SMITH, T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. Intern. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 52, 2002. 297-354 p.

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, 1993. 22-60 p.

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

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, n. 70, 2006. 477-481 p.

DAMMSTRÖM, S. SALMÉN, L. GATENHOLM, P. On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. **BioResources** n. 4. v. 1., 2009. 3-14 p.

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

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

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

EVINGER, M. AGABIAN N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer. **Journal Bacteriology**, Washington-DC, n 132, 1977. 294-301 p.

FONTES, C.M.; FERNANDES, T.H.; FERREIRA, L.M.A. Estratégias de degradação biológica da celulose e hemiceluloses. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa-ES, 1996, 106-115 p.

GARBOSAL, F.G.; TRINDADE, J.L.F. Bioconversão de resíduos agroindustriais – uma revisão. **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: agroindústria, energia e meio ambiente**. n.º 4; v. 2. Ponta Grossa: UTFPR, 2008.

GILKES, N.R.; HENRISSAT, B.; KILBURN, D.G.; MILLER, R.C. Jr.; WARREN, R.A.J. Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiological Reviews**, Bethesda-MD, USA, v.55, n.2, 1999. 303-315 p.

GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BOM, E.P.S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering**, Netherlands, NL, n. 51, 2010. 72-78 p.

GOYAL, M.; KALRA, K.L.; SAREEN, V.K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich linocellulosic waster by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo/BR 39, 2008. 535-541 p.

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

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**, Washington, DC n. 186, 2004. 1448-1461 p.

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 Bacteriol.**, Washington-DC, 187, 2005. 8437-8449 p.

JACKSON, S. & S. W. NICOLSON. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. *Comp. Biochem. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular biology*. Vancouver, CA, 131, 2002. 613–620 p.

JARBOET, L.R.; SHANMUGAN, K.; INGRAM, L.O. The desk encyclopedia of microbiology. In: Ethanol. **Ed. Moselio Schaechter**, Oxford: Elsevier, 2009. 428-437 p.

JENAL, U.; FUCHS, T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. **EMBO Journal**, London, UK, n.19, 1977. 5648-5669 p.

JOHNSON, R.C. & ELY, B. Isolation of spontaneously derived mutants of *Caulobacter crescentus*. **Genetics**, Bethesda-MD, USA n. 86, 1977. 25-32 p.

JORDAN, D.B.  $\beta$ -D-Xylosidase from *Selenomonas ruminantium*: catalyzed reactions with natural and artificial substrates. **Appl. Biochem. Biotechnology**, New York, NY, n. 146, 2008. 137-149 p.

JORDAN, D.B.; WAGSCHAL, K. Properties and applications of microbial  $\beta$ -D-Xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, NY, n. 86, 2010. 1647-1658 p.

KUBATA, B.K.; SUZUKI, T.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; TAKAMIZAWA, K. Purification and characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 Xylanase V, which produces exclusively Xylobiose from xylan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, n. 60, 1994. 531-535 p.

KULKARNI, N.; ABHAY, S. & RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, NL, n. 23, 1999. 411-456 p.

LEE, J.W.; PARK, J.Y.; KWON, M.; CHOI, I.G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Osaka, JP, n. 107 (1), 2009. 33-37 p.

LI, G.; TANG, J.X. Fluctuation analysis of *Caulobacter crescentus* adhesion. **Journal Biophysical**, Maryland, US, n. 90, 2006. 2206-2212 p.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, Washington-DC, n. 56 (3), 1934. 658-666 p.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, New York, NY, n. 227, 1970. 680-685 p.

LEEUEWSTEIN, J.M.. Gerenciamento Ambiental, São Paulo: v. 3, n. 13, jan./fev. 2001.

LEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH, Jr.; FILHO, E.X.F. Purification and partial characterization of a new  $\beta$ -Xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoida*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, NY, n. 22, 2006. 475-479 p.

LI, K., AZADI, P., COLLINS, R., TOLAN, J., Kim, J. and Eriksson, K. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, USA, n. 27, 2000. 89-94 p.

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, n.192 (14), 2010. 3678-3688 p.

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 (1), 2009. 68-78 p.

McADAMS, H.H.; SHAPIRO, L. System-level design of bacterial cell cycle control. **FEBS Letters**, Heidelberg, DE, n. 583, 2009. 3984-3991 p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, 1959. 426-428 p.

MILLER, J.M. Experiments in Molecular genetics. **Cold Spring Harbor Laboratories**, 1972.

McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, DC, n. 49, 1921. 183-186 p.

MTUI, G.Y.S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, Nairobi, n. 8 (8), 2009. 1398-1415 p.

NIERMAN W.C.; FELDBLYUM, T.V.; LAUB, M.T.; PAULSEN L.; NELSON, K.E.; EISEN, J. HEIDELBERG, M.R.K.; OHTA, N.; MADDOCKI, J.R.; POTOCKA, W.C.; NEWTON, A.; STEPHENS, C.; PHADKEI, N.D.; ELY, B.; DEBOY, R.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GWINN, M. 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, O.W.; WHITE, O.; SALZBERGT, S.; VENTER, C.; SHAPIRO, L. FRASER, C. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, 98 (7). 4136-4141, 2001.

PRENTKI, P & KRISCH, H.M. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, Worcestes, USA, n. 29, 1984. 303-313 p.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residue sugarcane bagasse. **Bioresourch Technology**, Netherlands, UK, n. 74, 2000. 69-90 p.

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, n. 162, 2010. 1160-1173 p.

PELIZER, L.H.; PONTINERI, M.H.; MORAES, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-indústriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, Santiago, CL, v. 2, 2007.

PETZOLD, K.; SCHWIKAL, K.; HEINZE, T. Carboxymethyl xylan – synthesis and detailed structure characterization. **Carbohydrate Polymers**, Melbourn, AU, v. 64, 2006. 292-298 p.

POLIZELLI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCEI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, Washington, DC, (Mini-Review), v. 67, n.5, 2005, 577-591 p.

POINDEXTER, J. A. The Caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiology Reviews**, São Paulo, SP, n. 45, 1981. 123-179 p.

PURCELLL, E.B.; BOUTTE, C.C.; CROSSON, S. Two-component signaling systems and cell cycle control in *Caulobacter crescentus*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, NY, n. 30, 2008.

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 em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP**, 2007.

REIS, T.A.F.C.; DIAS, C.M.G.A.; FONTES, M.; SOARES, C.; FERREIRA, L.M.A. Avaliação do potencial biotecnológico de xilanases do *Clostridium thermocellum* e *Cellvibrio mixtus*: sua utilização na suplementação de dietas à base de trigo para frangos de carne. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa-ES, 2001.

ROBERTO, I.C.; MUSSATO, S.I.; RODRIGUES, R.C.L.B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, San Diego, CA, n. 17, 2003. 171-176 p.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, San Diego, CA, v. 27, 2009. 185-194 p.

SIMÃO, R.C.G.; GOMES, S.L. Structure, Expression, and Functional Analysis of the gene coding for Calmodulin in the *Chytridiomycete Blastocladiella emersoni*. **Journal Bacteriology**, Washington-DC, 183(7), 2001. 280-288 p.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, N.Y., 1989.

SHALLOM, D. & SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, San Diego, CA, n. 6, 2003. 219–228 p.

SHAPIRO, L. The control of timing and spatial organization during *Caulobacter* cell differentiation. **The Harvey Lectures Series**, 88, 1992. 23-48p.

SELIG, M.J.; KNOSHAUG, E.P.; ADNEY, W.S.; HIMMEL, M.E.; DECKER, S.R. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresource Technology**, Netherlands, UK, n. 99, 2008. 4997-5005 p.

SHIN, H.Y.; LEE, J.H.; LEE, J.Y.; HAN, Y.O.; HAN, M.J.; KIM, D.H. Purification and characterization of ginsenoside Ra-hydrolyzing  $\beta$ -D-Xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japan, JP, n. 26, 2003. 1170-1173 p.

SIMON, R.; PRIEFFER, U & PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Journal Biotechnology**, San Diego, CA, n. 1:, 1983. 784-790 p.

SMIT, J.; SHERWOOD, C S & TURNER, R F. Characterization of high density monolayers of the biofilm bacterium *Caulobacter crescentus*: evaluating prospects for developing immobilized cell bioreactors. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, n. 46, 2000. 339–349 p.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª Edição. 719 p. **Editora Artmed**. 2004.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Revista Semina**, Londrina, BR, Ciências Agrárias, v. 25 (4), 2004. 315-330 p.

ZENI, G.; PENDRAK, I.P. Bionconversão de celulose em proteína utilizando a levedura *Cândida utilis* e o fungo *Pleurotus ostreatus*. Ponta Grossa: Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal Tecnológica do Paraná, **UTFPR**, 2006. 58 p.

WAGSCHAL, K.; FRANQUI-ESPIET, D.; LEE C.C.; ROBERTSO, G.H.; WONG D.W. Enzyme-coupled assay for  $\beta$ -Xylosidase hydrolysis of natural substrates. **Applied Environment Microbiology**, Washington, DC, n. 71, 2005. 5318-5323 p.

WAGSCHAL, K.; HENG, C.; LEE C.C.; ROBERTSON, G.H.; ORTS, W.J.; WONG D.W. Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -Xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. **Applied Biochemistry Biotechnology**, ., Washington, DC, n. 155, 2009. 304-313 p.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Revista Microbiologia.**, Palo Alto, CA, n. 51, 1987, 221-271 p.

WONG, K.K.Y., TAN, L.U.L. and SADDLER, J.N. Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Reviews**, Palo Alto, CA, n. 52:, 1988. 305–317p.

YAN, Q.J.; WANG, Z.Q.; YANG, S.Q.; ZHU, H.F.; LI, L.T. A xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresource Technology**, San Diego, CA, n. 99, 2008. 5402-5410 p.

YOON, K.Y.; WOODDAMS, E.E. & HANG, Y.D. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. Zurich/Switzerland, **LWT – Food, Science and Technology**, San Diego, CA, v. 39, n.4, 2006. 388-392 p.