

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

Caulobacter crescentus: SUPEREXPRESSÃO HOMÓLOGA DO GENE *xynA1* E
APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO COM A XILANASE I
EM PANIFICAÇÃO

BRUNA SIMIONI

CASCADEL – PR
2019

BRUNA SIMIONI

***Caulobacter crescentus*: SUPEREXPRESSÃO HOMÓLOGA DO GENE *xynA1* E
APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO COM A XILANASE I
EM PANIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*
em Ciências Farmacêuticas da Universidade
Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de
Cascavel, como requisito para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Marina Kimiko
Kadowaki

**CASCADEL - PR
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Simioni, Bruna

Caulobacter crescentus: superexpressão homóloga do gene xynal e aplicação do extrato enzimático enriquecido com a xilanase I em panificação / Bruna Simioni; orientador(a), Rita de Cássia Garcia Simão; coorientador(a), Bruna Simioni, coorientador(a)II, Marina Kimiko Kadowaki, 2020.
64 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2020.

1. Alveografia. 2. Farinha. 3. Elasticidade. 4. Enzima. I. Simão, Rita de Cássia Garcia. II. Simioni, Bruna. III. Kadowaki, Marina Kimiko. IV. Título.

BRUNA SIMIONI

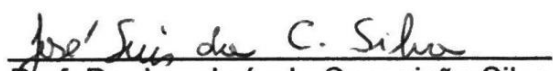
***Caulobacter crescentus*: SUPEREXPRESSÃO HOMÓLOGA
DO GENE *xynA1* E APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO
ENRIQUECIDO COM XILANASE I EM PANIFICAÇÃO**

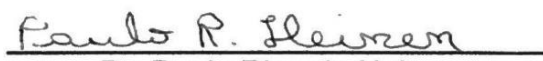
Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação *stricto sensu* em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná como pré-requisito para
obtenção do título de Mestra em
Ciências Farmacêuticas. Área de
concentração: CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS.

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

BANCA EXAMINADORA:


Prof^ª. Dr^ª. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE


Prof. Dr. Jose Luis da Conceição Silva
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE


Dr. Paulo Ricardo Heinen
Centro Universitário Fundação Assis
Gurgacz
FAG

**Cascavel - PR
2020**

BIOGRAFIA RESUMIDA

Bruna Simioni, nascida em 26 de abril de 1995, em São Jorge D'Oeste - PR, é graduada em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (*campus* de Cascavel), em 2017. Durante a graduação, foi monitora das disciplinas Química Analítica Qualitativa e Quantitativa, Química Orgânica e Imunologia Clínica; também, foi Membro do CRF Júnior (projeto de extensão). Realizou Iniciação Científica com bolsa do CNPq e Trabalho de Conclusão de Curso nos laboratórios de Bioquímica do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da UNIOESTE, nos grupos de pesquisa "Bioquímica e Biotecnologia"; "Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde". Trabalhou como farmacêutica na rede Farmácias Estrela. Atualmente, é mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, na linha de pesquisa intitulada "Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde"; trabalha na rede Farmácias Minipreço.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

Dedico este trabalho a Deus e à minha família, que sempre foi meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por esta conquista. Não existe recompensa maior na vida do que alcançar qualquer meta por meio de nossos esforços. Obrigada por me guiar, me dar forças nos momentos difíceis e por me abençoar com pessoas maravilhosas, que encontrei durante essa caminhada.

Meu eterno agradecimento aos meus pais, Ivanor Simioni e Eliana Giacomel Simioni. Vocês são meu maior exemplo e tudo o que eu tenho de mais precioso. À minha irmã, Angela Simioni, minha companheira e amiga.

Aos meus amigos e professores do Laboratório de Bioquímica, pela oportunidade de aprender a cada dia, pelo apoio quando precisei e pelas dúvidas sanadas. Vocês foram imprescindíveis para que essa caminhada fosse mais leve e alegre.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Garcia Simão, e co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Marina Kimiko Kadowaki, exemplos de força e determinação; obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, por acreditarem e confiarem em mim e no meu trabalho.

Agradeço à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas, por permitir a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Ao Moinho Rio Azul (Céu Azul – PR), por abrir as portas e permitir a realização dos testes de aplicabilidade em panificação e em alveógrafo.

Meus agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

***Caulobacter crescentus*: SUPEREXPRESSÃO HOMÓLOGA DO GENE *xynA1* E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA XILANASE I EM PANIFICAÇÃO**

RESUMO

A exploração da diversidade microbiana, juntamente com a engenharia genética, permite a utilização e otimização de fontes de enzimas com aplicação na indústria biotecnológica. A análise do genoma sequenciado de *Caulobacter crescentus* demonstra que ela possui inúmeros genes induzidos por resíduos agroindustriais e biomassas, os quais codificam enzimas utilizadas em processos industriais, incluindo celulasas, xilanases e cinco diferentes β -xilosidases. Essas enzimas fazem parte de uma demanda crescente em diversos setores industriais, tais como panificação, clarificação de papel, estonagem de tecidos, rações animais, entre outros. No presente trabalho, foi criada a cepa mutante de *C. crescentus*, que superexpressa o gene *xynA1* (CCNA_02894), o qual codifica uma endo-1- β -xilanase (EC:3.2.1.8) bacteriana. O gene *xynA1* foi subclonado no vetor pAS22, que apresenta um promotor induzível por xilose, o qual passou a substituir o promotor original do gene *xynA1*, levando ao aumento de mais de 20 cópias do produto gênico clonado por célula bacteriana. O mutante condicional obtido foi denominado *BS-xynA1* e cultivado em meio mínimo M2, suplementado com xilose 0.3% (p/v), além de diferentes resíduos agroindustriais. A maior atividade xilanásica extracelular foi de 17,22 U.mL⁻¹ e atividade específica 278,64 U mg⁻¹, após 18 horas de crescimento bacteriano na presença de palha de milho 0,2% (p/v). Alíquotas do extrato enzimático bruto, com essa elevada atividade específica, foram utilizadas nos diferentes ensaios de aplicabilidade dos processos biotecnológicos, no laboratório de panificação de indústria regional de farinha. Em testes de panificação, a adição enzimática reduziu o tempo de batimento em 9% e promoveu um aumento na altura dos pães de 18,2%, em relação ao controle, além de melhorar a formação da estrutura alveolar. Nos testes em alveógrafo, a adição enzimática gerou um aumento dos seguintes parâmetros, em comparação com os controles: 18,8% de aumento na extensibilidade da massa; 8,3% de aumento na energia de deformação da massa, mostrando um incremento na força da massa; e 5,2% de aumento na elasticidade; além disso, a adição enzimática também gerou redução de 6,0% na tenacidade e redução de 20,6% no índice tenacidade/elasticidade, em relação ao controle, demonstrando a queda da rigidez da massa pela ação da enzima. Com os resultados das análises, concluiu-se que o extrato enzimático, contendo xilanase I, possui aplicabilidade como auxiliar de processamento na indústria de panificação, pela sua capacidade de melhorar as características reológicas da massa, aumentando o volume do pão, além de melhorar a estrutura alveolar do miolo. Segundo o nosso conhecimento até o presente momento, é a primeira vez que a xilanase I, produzida por expressão homóloga em *C. crescentus*, é usada com sucesso na indústria da panificação. Isso foi possível graças à linhagem inédita, *C. crescentus BS-xynA1*.

PALAVRAS-CHAVE: Mutante; Alveografia; Elasticidade; Tenacidade; Farinha; Pão.

***Caulobacter crescentus*: HOMOLOGOUS OVEREXPRESSION OF THE XYN A1 GENE AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION OF XYLANASE I IN BAKING**

ABSTRACT

Exploration of microbial diversity along with genetic engineering allows the use and optimization of enzyme sources for use in the biotechnology industry. Analysis of the sequenced genome of *Caulobacter crescentus* demonstrates that it has numerous genes induced by agroindustrial residues and biomass, which encode enzymes used in industrial processes, including cellulases, xylanases and five different β -xylosidases. These enzymes are part of a growing demand in various industrial sectors, such as baking, paper clarification, fabric layering, animal feed, among others. In the present work, the mutant *C. crescentus* strain that overexpresses the *xynA1* gene (CCNA_02894) encoding a bacterial endo-1- β -xylanase (EC: 3.2.1.8) was created. The *xynA1* gene was subcloned into the pAS22 vector, which features an xylose-inducible promoter that replaced the original *xynA1* gene promoter, leading to an increase of more than 20 copies of the cloned gene product per bacterial cell. The conditional mutant obtained was named *BS-xynA1* and grown in minimal medium M2 supplemented with xylose 0.3% (w/v) addition of different agro-industrial residues. The highest extracellular xylanase activity was 17.22 U mL⁻¹ and specific activity 278.64 U mg⁻¹ after 18 hours of bacterial growth in the presence of 0.2% (w / v) corn straw. Aliquots of crude enzyme extract with this high specific activity were used in the different tests applicability of biotechnological processes in regional flour industry baking laboratory. In baking tests, enzymatic addition reduced beating time by 9% and increased bread height by 18.2% compared to control, in addition to improving alveolar structure formation. In alveograph tests the enzymatic addition generated an increase of the following parameters compared to the controls: 18.8% increase in mass extensibility; 8.3% increase in mass deformation energy, showing an increase in mass force; and 5.2% increase in elasticity; In addition, the enzymatic addition also led to a 6.0% reduction in toughness and a 20.6% reduction in the toughness/elasticity ratio in relation to the control, demonstrating the decrease in mass stiffness by enzyme action. With the results of the analysis it was concluded that the enzyme extract containing xylanase I has applicability as a processing aid in the bakery industry because of its ability to improve the rheological characteristics of the dough, increasing the bread volume and improving the alveolar structure of the crumb. To our knowledge to date, this is the first time that xylanase I produced by homologous expression in *C. crescentus* has been successfully used in the bakery industry. This was made possible by the unpublished strain *C. crescentus BS-xynA1*.

KEYWORDS: Mutant; Alveography; Elasticity; Tenacity; Flour; Bread.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos gerais	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. O modelo de estudo <i>Caulobacter crescentus</i>	14
3.2. Hemicelulose e xilana	15
3.3. Xilanases: enzimas desconstrutoras de hemicelulose	16
3.4. Xilana: constituinte da fibra alimentar na farinha	18
3.5. Aplicabilidade das xilanases em panificação	19
3.6. Xilanase I de <i>Caulobacter crescentus</i>	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Linhagens bacterianas e condições de cultura	24
4.2. Subclonagem do gene <i>xynA1</i> no vetor de expressão pAS22	24
4.3. Transformação da cepa DH5 α de <i>E. coli</i>	27
4.4. Transformação da sepa S17 de <i>E. coli</i>	27
4.5. Transformação da <i>C. crescentus</i> por transconjugação com S17 de <i>E. coli</i>	27
4.6. Curva de crescimento, consumo de xilose e expressão da proteína recombinante	28
4.7. Expressão da XynA1 em cultivo com diferentes resíduos	28
4.8. Quantificação das enzimas presentes no extrato extracelular bruto	29
4.9. Xilanases comerciais versus xilanase da cepa <i>BS-xynA1</i>	29
4.10. Teste para confirmação da ausência de bactérias viáveis nos extratos enzimáticos	30
4.11. Testes de aplicabilidade dos extratos enzimáticos em panificação	30
4.11.1. Tratamento enzimático na formulação do pão	30
4.11.2. Teste em alveógrafo	32
4.11.3. Análise estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Subclonagem do gene <i>xynA1</i> no vetor de expressão pAS22	34
5.2. Construção das linhagens bacterianas	34

5.3. Transformação bacteriana por conjugação	35
5.4. Caracterização do mutante <i>BS-xynA1</i>	36
5.4.1. Crescimento, consumo de xilose e produção de xilanase	36
5.4.2. Produção de xilanase em diferentes resíduos	38
5.4.3. Quantificação das enzimas presentes no extrato extracelular bruto produzido pela cepa <i>BS-xynA1</i>	39
5.4.4. Xilanases comerciais <i>versus</i> xilanase da cepa <i>BS-xynA1</i>	41
5.4.5. Teste para confirmação da ausência de bactérias viáveis nos extratos enzimáticos	42
5.5. Testes de aplicabilidade dos extratos enzimáticos em panificação	42
5.5.1. Tratamento enzimático na formulação do pão	42
5.5.2. Teste em alveógrafo	44
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição das cepas e plasmídeos utilizadas.	25
Tabela 2 Formulação dos testes	31
Tabela 3 Composição dos testes em alveógrafo	33
Tabela 4 Valores das alturas dos testes nos pães	43
Tabela 5 Resultados das alveografias	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 O ciclo celular de <i>C. crescentus</i> .	14
Figura 2 Configurações da xilose.	16
Figura 3 Diversas ligações encontradas em uma variedade de xilanas isoladas das paredes das células vegetais.	17
Figura 4 Funcionalidade de enzimas xilanolíticas na desconstrução da xilana.	17
Figura 5 Representação esquemática do mecanismo de xilanase no cozimento.	20
Figura 6 Representação da ação da xilanase na célula de gás da rede de glútem.	21
Figura 7 A análise filogenética foi realizada usando o programa MEGA6.06.	22
Figura 8 Perfil de SDS-PAGE do lisado celular de <i>E. coli</i> LMG194 recombinante, indicando a superexpressão do gene heterólogo <i>xynA1</i> e purificação da xilanase recombinante de <i>C. crescentus</i> .	23
Figura 9 Representação esquemática do gene <i>xynA1</i> clonado no vetor pJET1.2blunt e os sítios de restrição utilizados para remoção do fragmento gênico do vetor.	25
Figura 10 Construção genética da subclonagem do gene <i>xynA1</i> no plasmídeo pAS22 nos sítios <i>EcoRI</i> e <i>EcoRV</i> .	26
Figura 11 Alveógrafo Chopin modelo AlveoPC.	32
Figura 12 Eletroforese em Gel de agarose 1 %.	34
Figura 13 Eletroforese em Gel de agarose 1 %.	35
Figura 14 Curva de crescimento celular e consumo de xilose das cepas <i>C. crescentus</i> NA 1000 pAS22 e BS- <i>xynA1</i> em meio M2 suplementado com xilose 0,3 %, a 30 °C e 120 rpm.	36
Figura 15 Atividade da xilanásica extracelular das cepas controle Cc-pAS22 (círculo aberto) e mutante BS- <i>xynA1</i> (círculo fechado).	37
Figura 16 Atividade de xilanase intracelular das cepas Cc-pAS22 (círculo aberto) BS- <i>xynA1</i> (círculo fechado).	38
Figura 17 Produção de xilanase I na presença de diferentes resíduos agroindustriais.	39
Figura 18 Atividades de diferentes enzimas co-induzidas no extracelular bruto da cepa controle Cc-pAS22 e mutante BS- <i>xynA1</i> .	40
Figura 19 Comparação entre a atividade específica (U mg ⁻¹) de diferentes	41

xilanases comerciais e a enzima *XynA1* de *C. crescentus*.

Figura 20 Teste para confirmação da esterilidade dos extratos enzimáticos. 42

Figura 21 Resultado dos testes no pão após processo de fermentação. 43

Figura 22 Resultado dos testes no pão após forneamento. 44

Figura 23 Resultado do teste em alveógrafo. 45

1 INTRODUÇÃO

As enzimas, essenciais componentes do metabolismo dos seres vivos, têm a capacidade de promover e catalisar reações químicas. Microrganismos ou substâncias com essa propriedade já eram usados por populações humanas muito antigas para modificar alimentos – fermentar massas e produzir pão, fermentar uvas e obter o vinho, ou alterar o leite e fabricar queijo, por exemplo.

Após serem desvendadas pelos cientistas, as enzimas passaram a ser cada vez mais empregadas, com variadas finalidades. Hoje, elas são úteis em uma vasta abrangência de setores, inclusive, na indústria, não apenas na área de alimentos, mas em muitas outras áreas também.

Enzimas bacterianas são frequentemente mais utilizadas que enzimas derivadas de vegetais ou animais. Isso se deve à facilidade de manipulação genética, fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e crescimento rápido de microrganismos em cultivos baratos. Enzimas de origem microbiana, além de possuírem produção mais conveniente e segura, também são mais estáveis que suas enzimas vegetais e animais correspondentes.

Os benefícios oferecidos pelas enzimas são especificidade, condições suaves e quantidade reduzida de coprodutos. Ao escolher a enzima certa, pode ser possível controlar quais produtos são gerados; além disso, as reações colaterais indesejadas são minimizadas devido à sua especificidade. A planta industrial que usa reações enzimáticas pode ser construída e operada a um custo de capital e energia muito menor.

No mundo todo, o pão é um dos alimentos básicos mais antigos, comuns e tradicionalmente consumidos. As constantes mudanças no setor de panificação e a crescente demanda por alimentos com melhores características possibilitaram que as enzimas ganhassem uma significativa importância na formulação de produtos de panificação.

Ainda que alguns aditivos e coadjuvantes de tecnologia não sejam considerados indispensáveis à produção de pães, eles são os promotores de melhores características tecnológicas no processo de produção e melhores propriedades sensoriais no produto final. As enzimas são alguns desses ingredientes enriquecedores, que atuam como produtos biológicos seguros, os quais substituem ingredientes químicos com um grande número de vantagens, tanto na produção de pão francês como de pães industrializados.

Outras vantagens que podem ser obtidas com a aplicação de enzimas em formulações de produtos panificados são a redução da quantidade de açúcar e gordura adicionados, sem perda de qualidade final.

Recentemente, novas enzimas vêm sendo introduzidas à tecnologia de panificação; dentre elas, destacam-se as xilanases, glicose-oxidases, lipases e proteases. A adição das enzimas em panificação objetiva melhorar às características

reológicas da massa, pois atua nas moléculas do amido ou das proteínas e gera aumento ao volume do pão, bem como melhora à estrutura do miolo.

A biotecnologia enzimática ganha terreno rapidamente devido às várias vantagens que oferece sobre as tecnologias convencionais. O campo das enzimas industriais experimenta grandes iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando tanto no desenvolvimento de uma série de novos produtos quanto na melhoria do processo e desempenho de vários produtos existentes.

A análise do genoma sequenciado de *C. crescentus* revela que ela possui inúmeros genes, os quais codificam para enzimas de interesse industrial, incluindo uma celulase, três xilanases e cinco diferentes β -xilosidases. *C. crescentus* é um microrganismo não patogênico e ubíquo; suas enzimas ainda não foram totalmente estudadas, apesar de possuírem potencial industrial a ser explorado e compreendido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

Criar uma cepa mutante de *Caulobacter crescentus*, que superexpresse o gene *xynA1* (CCNA_02894), o qual codifica a enzima endo-1,4-beta-xilanase (EC:3.2.1.8), homóloga de *Caulobacter crescentus* (cepa NA1000). Avaliar o potencial biotecnológico dos extratos extracelulares enriquecidos com a enzima XynA1, em farinha de trigo, para o processo de panificação.

2.2 Objetivos específicos:

- Obter o gene *xynA1* de vetor de clonagem pJET1.6 *Blunt* (Fermentas®); subclonar no vetor de expressão pAS22 e transformar *Escherichia coli* (DH5 α) com a construção pAS22-*xynA1*;
- Transferir a construção pAS22-*xynA1* para a cepa de *E. coli* S17, que possui função conjugativa;
- Conjugar a construção gênica pAS22-*xynA1* da *E. coli* (S17) para *C. crescentus* (NA1000);
- Isolar o mutante *BS-xynA1* por seleção com antibióticos (ácido nalidíxico e cloranfenicol);
- Induzir a expressão e secreção para o meio extracelular da enzima XynA1 na cepa *BS-xynA1*;
- Caracterizar o extrato extracelular e quantificar a atividade xilanolítica, bem como atividade das demais enzimas, que são naturalmente coexpressas em *C. crescentus* (pectinase, β -glicosidase, β -xilosidase, endo- β -1,4-celulase e α -L-arabinofuranosidase), quando cultivada na presença de complexos lignocelulósicos;
- Testar a aplicabilidade do extrato enzimático extracelular, em processos biotecnológicos de panificação, em agroindústria regional de farinha.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O modelo de estudo *Caulobacter crescentus*

A bactéria *Caulobacter* é obrigatoriamente aeróbica, heterotrófica, de vida livre, oligotrófica e pode utilizar uma variedade de fontes de carbono (STEPHENS et al., 2007). Todas as cepas bacterianas de *Caulobacter* conhecidas são consideradas inofensivas e estão presentes em quase todos os ambientes aquáticos, bem como em muitos tipos de solo (HOSOI-TANABE et al., 2010; RICHMOND; VANCOUVER; RICHMOND, 2001).

Caulobacter crescentus, uma bactéria Gram-negativa, que cresce em ambientes aquáticos diluídos, é um membro da subdivisão- α de proteobactérias. Invariavelmente, diferenciam-se e dividem-se assimetricamente em cada ciclo celular, temas recorrentes que sublinham a diversidade celular em organismos multicelulares. *C. crescentus* é um sistema modelo unicelular simples e altamente manipulável para estudar a diferenciação celular, a divisão assimétrica e sua coordenação com a progressão do ciclo celular (LAUB et al., 2000).

Seu ciclo possui duas células filhas diferenciadas: uma delas é de forma livre e outra é imóvel pedunculada; cada qual apresenta características morfológicas e metabólicas distintas. O seu ciclo de vida completo dura 3 horas; nas atividades experimentais, encontra-se uma cultura mista, que contém células flageladas móveis, pedunculadas imóveis e pré-divisionais (Figura 1) (CURTIS; BRUN, 2010).

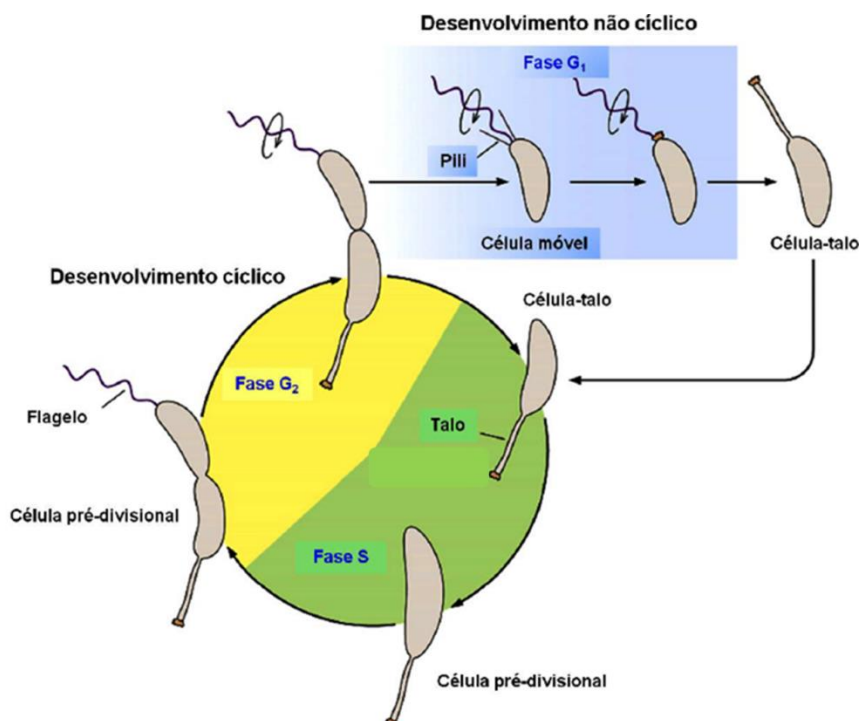


Figura 1 O ciclo celular de *C. crescentus*. Duas células filhas, uma com talo e a outra com flagelo, sendo diferentes em estrutura e funções. A célula flagelada é móvel, porém, incapaz de replicar o DNA. Já a célula talo ou pedunculada, é imóvel, no entanto, capaz de replicar o DNA.

Fonte: Adaptado de Curtis & Brun (2010).

Características como a presença de genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos e resistência a metais pesados permitiram a construção do mutante *Caulobacter* JS4022/p723-6H. Esse mutante fornece uma solução prática e eficaz para a separação final de metais tóxicos, dissolvidos da fase aquosa de uma variedade de fontes de água contaminada, como corpos de água naturais, água potável, escoamento superficial e águas residuais (ZHAOHUI; LEI; PATEL, 2010).

A sua utilização em estudos de manipulação genética é possível devido ao desenvolvimento de ferramentas moleculares, pois apresenta seu genoma completamente sequenciado (NIERMAN et al., 2001; MARKS et al., 2010). Na sequência completa do genoma de *C. crescentus* (cepa CB15), existem 4.016.942 pares de bases em um único cromossomo circular, que codifica 3.767 genes. O genoma contém múltiplos grupos de genes, que codificam proteínas essenciais para a sobrevivência em um habitat pobre em nutrientes (NIERMAN et al., 2001).

A análise do genoma de *C. crescentus* mostrou a presença de oito genes, que estão diretamente envolvidos na degradação da biomassa vegetal; cinco desses genes codificam enzimas com atividade beta-xilosidase; três têm atividade de endo-xilanase e um para celulase. Desses, três genes (*xynB1*, *xynB2* e *xynB5*), que codificam as β -xilosidases e o gene *xynA1*, que codifica uma xilanase, foram previamente estudados (CORRÊA et al., 2012, 2014; GRACIANO et al., 2012, 2015; JUSTO et al., 2015, BOSETTO et al., 2016).

Por análise transcriptômica, foi demonstrado que o crescimento em xilose, um componente da xilana do polímero da parede celular da planta, também induz à transcrição de genes, que codificam proteínas usadas para metabolizar outros componentes de xilana, indicando uma regulação robusta (HOTTE et al., 2004).

3.2 Hemicelulose e xilana

A parede celular nos vegetais desempenha funções importantes de sustentação e de formato celular, possuindo uma estrutura rígida, na qual as microfibrilas de celulose são elementos principais. Em sua volta, existe uma matriz complexa e entrelaçada, a qual é composta por hemiceluloses, pectinas, glicoproteínas e lignina (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A celulose é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, homogêneo, que é formado por resíduos de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4. As hidroxilas dos resíduos de glicose formam muitas ligações de hidrogênio, constituindo o conjunto das fibras uma estrutura cristalina estável e insolúvel (KING et al., 2011).

O termo xilana agrega diferentes heteropolissacarídeos, cuja cadeia principal é constituída por resíduos do monossacarídeo xilose. A xilose é um polihidroxialdeído de cinco carbonos (aldopentose), encontrada mais comumente na natureza em sua configuração piranosídica (Figura 02) (THORSHEIM et al., 2015).

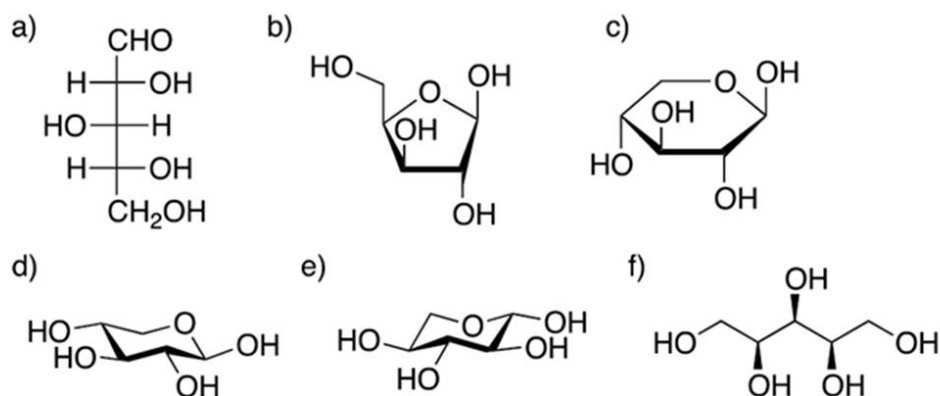


Figura 2 Configurações da xilose. (a) D-xilose, forma aberta. (b) β -D-xilofuranose, projeção de Haworth. (c) β -D-xilopiranosose, projeção de Haworth. (d) β -D-xilopiranosose, conformação da cadeira. (e) β -L-xilopiranosose, conformação da cadeira. (f) Xilitol.
Fonte: Thorsheim et al. (2015).

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos altamente diversificados da parede celular de plantas, formados por resíduos de açúcares monoméricos, que podem ser xilose, manose, galactose ou glicose, unidos por ligações do tipo β , na cadeia principal (KING et al., 2011). Geralmente, a cadeia principal é substituída nas posições dos carbonos 2 e 3 por resíduos de açúcares ou outros grupamentos químicos (THORSHEIM et al., 2015).

As cadeias principais da hemicelulose podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como exemplo das xilanas (xilose), ou por duas ou mais unidades, como os glucomananos (glicose e manose). Sendo assim, as hemiceluloses classificam-se de acordo com os resíduos de açúcares, que constituem sua molécula, a saber: D-xilana, L-arabinano, D-galactano, manano, galactoglucomanano, arabinoxilano, arabinogalactano, glucano e xiloglucano. Frequentemente, estão ligados, associados aos polissacarídeos pécticos, porém, estes últimos não estão incluídos no grupo das hemiceluloses (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Existem várias ligações que podem ser encontradas em uma variedade de xilanas e estão representadas na Figura 3.

3.3 Xilanases: enzimas desconstrutoras de hemicelulose

As xilanas são hidrolisados em seus componentes de monossacarídeos pela ação sinérgica de diferentes enzimas (Figura 4). Esse sistema enzimático é conhecido como o complexo xilanolítico e inclui, principalmente, endo- β -1,4-D-xilanase (E.C.3.2.1.8) e β -D-xilosidase (E.C. 3.2.1.37), que atuam na cadeia principal do polissacarídeo (POLIZELI et al., 2005; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

As endo- β -1,4-D-xilanases clivam a cadeia principal da xilana, produzindo xiloligossacarídeos, que podem ser convertidos à xilose por β -D-xilosidases (PUCHART et al., 1999). As exo- β -D-xilosidases são enzimas menos frequentes, que hidrolisam xiloligossacarídeos e xilobioses menores, os quais são liberados pela

ação de endoxilanases na xilana, produzindo xilose. As especificidades dessas enzimas em oligossacarídeos de xilose são altas (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

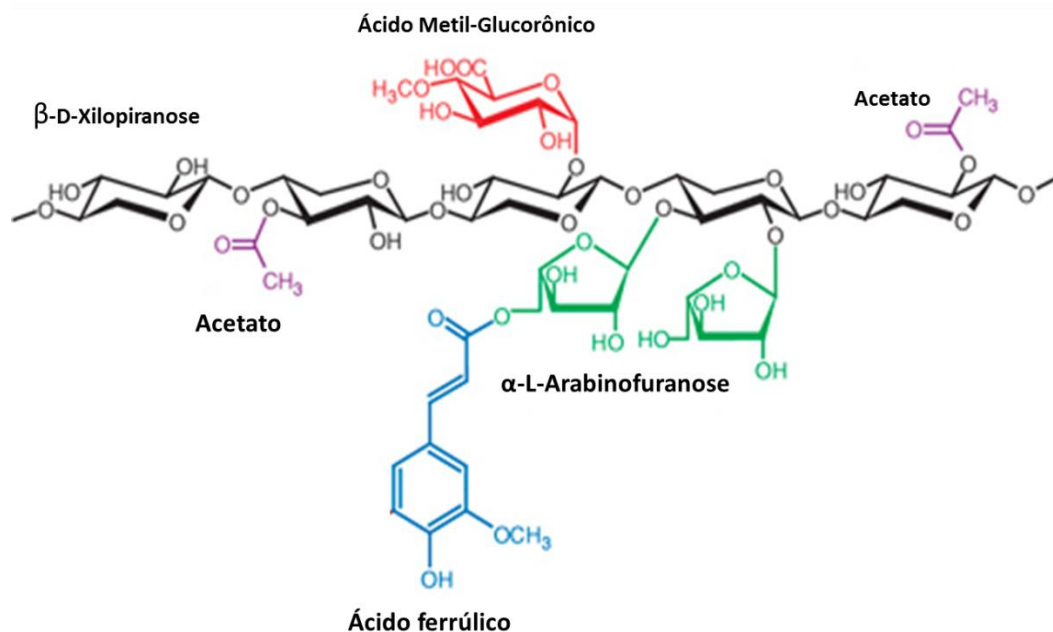


Figura 3 Diversas ligações encontradas em uma variedade de xilanas isoladas das paredes das células vegetais. O ácido ferrúlico pode formar uma ponte de ácido di ferrúlico com resíduos de ácido ferrúlico ligados a outras cadeias de arabinoxilana. Os resíduos de xilose podem ser dissustituídos ou monossustituídos com arabinose nas posições O-2 e O-3.

Fonte: Adaptado de Dodd & Cann (2009).

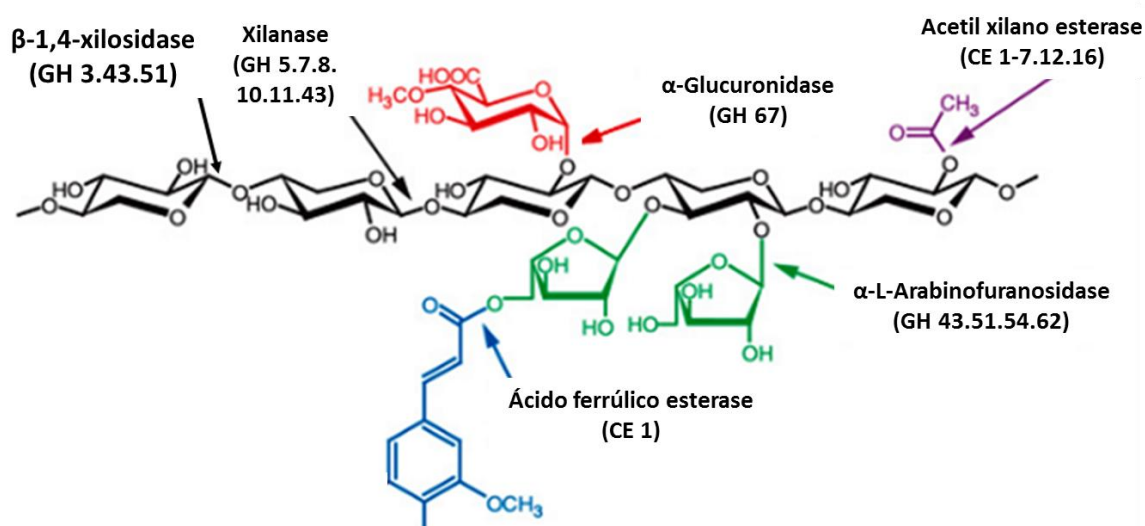


Figura 4 Funcionalidade de enzimas xilanolíticas na desconstrução da xilana. Xilanases, acetilxilanoesterases e ácido ferrúlico esterases funcionam juntas para produzir xiloligossacarídeos curtos e substituídos com a liberação concomitante de subprodutos de ácido ferrúlico e ácido acético. As arabinofuranosidas e glucuronidas libertam a arabinose e o ácido glucurônico, a partir desses xiloligossacáridos substituídos. E as xilosidase, por fim, convertem os xiloligossacáridos nos seus açúcares xilose constituintes.

Fonte: Adaptado de Dodd & Cann (2009).

Outras enzimas xilanolíticas acessórias são responsáveis pela catálise e retirada de substituintes específicos da cadeia principal da xilana, que incluem α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22), α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139), esterase do ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) e esterase do ácido *p*-cumárico (EC 3.1.1) (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; JUTURU; WU, 2014).

Xilanases e β -xilosidases envolvidas na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica são definidas pelo CAZY (Carbohydrate Active Enzymes database), como glicosil hidrolases (GHs). Essa classificação segue critérios baseados pelo substrato, similaridade da sequência de aminoácidos, estrutura tridimensional e no mecanismo de ação (LOMBARD et al., 2014).

3.4 Xilana: constituinte da fibra alimentar na farinha

O pão consiste em uma estrutura de espuma sólida, instável e elástica, contendo uma fase contínua composta de uma rede elástica de moléculas de proteína de glúten reticuladas e de moléculas de polímero de amido. Principalmente, amilose não complexada e complexada com moléculas lipídicas polares; também, fase descontínua de grânulos de amido deformados, gelatinizados, inchados e deformados. As propriedades e as características finais do produto são influenciadas pela mistura física e mecânica, reações químicas (incluindo reações catalisadas por enzimas) e efeitos térmicos (tempo e temperatura de cozimento) (GRAY; BEMILLER, 2006).

A fibra alimentar do pão é constituída de polissacarídeos de cereais não-amiláceos, os quais são compostos, sobretudo, por arabinoxilanas, β -glucano e peptídeos de arabinogalactana. Os arabinoxilanos constituem a maior fração de polissacarídeos não amiláceos das paredes celulares de muitos cereais, como trigo e centeio. Mesmo sendo constituintes menores da farinha, os arabinoxilanos têm a capacidade de afetar significativamente as propriedades da massa e do produto final cozido. Arabinoxilanos e arabinogalactanos possuem propriedades funcionais importantes para a indústria de cereais. Eles podem melhorar o desenvolvimento e a estabilidade da massa, aumentando sua capacidade de absorção de água. Esses polissacarídeos também conferem viscosidade e podem aumentar a permeabilidade do gás, contribuindo para a elasticidade do filme proteico à sua volta. Além disso, durante a panificação, eles melhoram o volume do pão, a firmeza do miolo, reduzem a retrogradação e, portanto, melhoram a vida útil e a estabilidade do armazenamento do pão (MIGUEL et al., 2013).

3.5 Aplicabilidade das xilanases em panificação

As xilanases têm sido amplamente utilizadas na indústria de panificação por décadas. Elas são empregadas na panificação, juntamente com α -amilase, maleato amilase, glucose oxidase e proteases. As xilanases quebram a hemicelulose na farinha de trigo, auxiliando a redistribuição da água, deixando a massa mais macia e fácil de amassar. Durante o processo de cozimento do pão, elas geram maior flexibilidade e elasticidade, permitindo que a massa cresça. Com o uso de xilanases, há um aumento no volume dos pães, maior absorção de água e maior resistência à fermentação (CAMACHO; GUILAR, 2003; HARBAK; THYGESEN, 2002). Na fabricação de biscoitos, a xilanase é recomendada para torná-las cremosas, mais leves e melhorar a textura, palatabilidade e uniformidade das bolachas (POLIZELI et al., 2005).

As xilanases são utilizadas como auxiliares de processamento na indústria de moagem e panificação. Nessas indústrias, as xilanases são, muitas vezes, referidas como hemicelulases ou pentosanases. O termo hemicelulase refere-se à capacidade da enzima hidrolisar compostos não amiláceos insolúveis, encontrados na farinha, enquanto o termo pentosanase indica que o substrato para a enzima, a xilana, é composto por monômeros de pentose (HARBAK; THYGESEN, 2002).

As xilanases são usadas como condicionadores de massa para obter melhor processabilidade da massa, melhor estabilidade ao estresse mecânico à etapa da massa, aumento do volume do pão, melhoria da estrutura do miolo e redução do endurecimento. A farinha contém arabinoxilano extraível em água e arabinoxilano não extraível em água. A diferença na solubilidade da água pode estar relacionada à estrutura, tamanho e à presença de mais ou menos regiões arábicas-substituídas do xilana. Tem sido bem documentado que arabinoxilano extraível em água tem um efeito positivo e arabinoxilano não extraível em água tem um efeito negativo no desempenho de cozimento. Na panificação, efetiva-se a preferência a enzimas xilanases com alto efeito solubilizante em arabinoxilano não extraível em água, em comparação com a atividade em arabinoxilano não extraível em água e, preferencialmente, com despolimerização das xilanas (COURTIN; DELCOUR, 2002).

O efeito das xilanas parcialmente degradadas no processo de cozimento é apenas pouco compreendido. Degradação do arabinoxilano não extraível em água, que, de outra maneira, formaria barreiras físicas ao desenvolvimento da rede de glúten, pode fazer parte da explicação do motivo pelo qual as xilanases funcionam na panificação. A degradação do arabinoxilano não extraível em água também diminui a capacidade de ligação à água da xilana, levando à redistribuição da água da xilana para glúten, o que facilita o acúmulo da rede de glúten. Solubilização do arabinoxilano não extraível em água também pode ser importante porque a quantidade de arabinoxilano solúvel aumenta, proporcionando uma influência positiva, ao elevar o arabinoxilano extraível em água. O efeito está ligado a um

reforço do filme líquido, que envolve as bolhas de gás carbônico durante a fermentação da massa. Esse efeito positivo pode ser explicado por um aumento na viscosidade, por meio da formação de um reforço de rede secundário e mais fraco, a rede de glúten, pelo entrelaçamento e, talvez, pela formação de pontes diferentes (GAONKAR; MCPHERSON, 2006).

Possíveis interações entre oligômeros de xilana, liberados pela ação da xilanase e glúten, foram propostas, com base no aumento da quantidade de xilana associada ao glúten, quando as xilanases são utilizadas; esse mecanismo está representado nas Figuras 5 e 6.

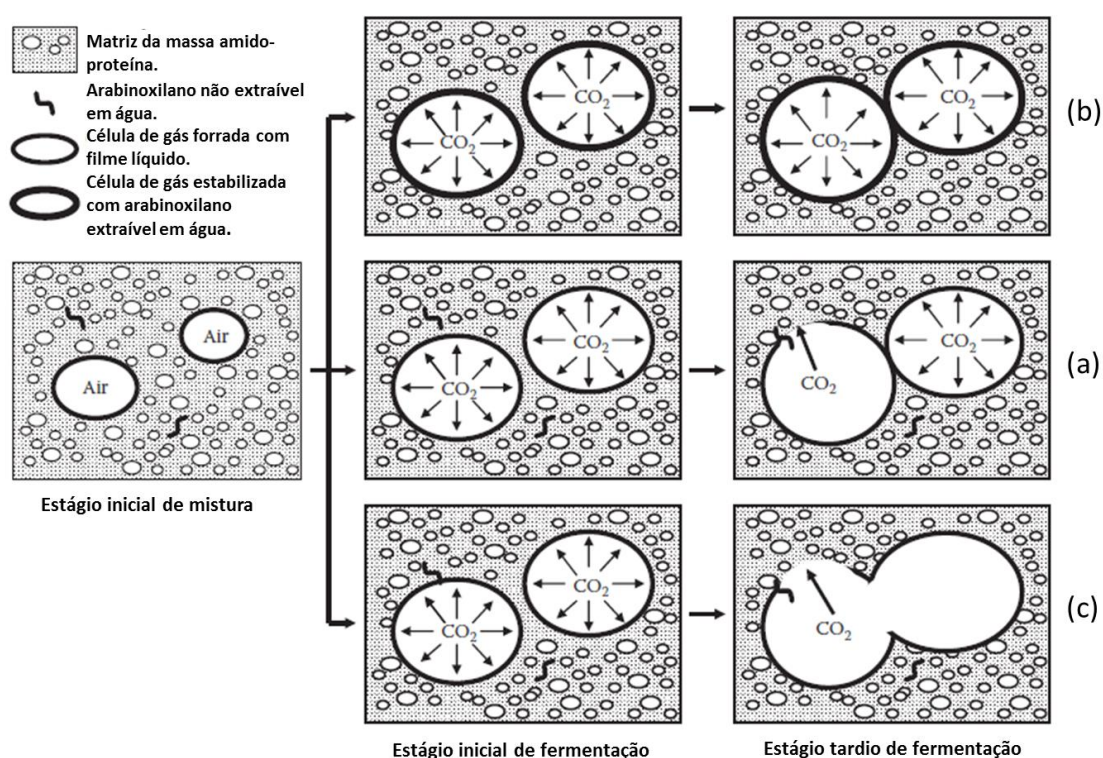


Figura 5 Representação esquemática do mecanismo de xilanase no cozimento. (a) O modelo representa a situação sem adição de xilanase. Existe alguma estabilização dos filmes líquidos por arabinoxilano extraível em água e o material de parede celular, rico em arabinoxilano não extraível em água, tem um impacto negativo nas células de gás. (b) O modelo é quando uma boa xilanase de cozimento, com especificidade para o arabinoxilano não extraível em água, é adicionada; ele ilustra que o filme líquido é ainda estabilizado por meio do xilana solubilizado do arabinoxilano não extraível em água, de forma que o efeito negativo do arabinoxilano não extraível em água é reduzido. (c) O modelo representa a situação com uma xilanase de cozimento pobre, com especificidade para arabinoxilano extraível em água, levando a uma estabilização reduzida das células de gás.

Fonte: Adaptado de Coutin & Delcour (2002).

O uso de enzimas na panificação é conhecido desde a década de cinquenta. No ano de 1997, após a observação de que a presença de xilana é prejudicial às características físico-químicas de certos produtos de panificação, preparações comerciais de enzimas, que hidrolisam hemiceluloses ou pentosanas, passaram a ser utilizadas para melhorar tanto o volume do pão como a qualidade do miolo,

diminuindo gradualmente o interesse em enzimas que agem sobre o glúten e o amido. Esse fato, isoladamente, pode ser considerado uma revolução à tecnologia de enzimas de cozimento, mas, adicionando pentosanases à massa, foi observado, ainda, um grande efeito de antiendurecimento no pão (LINKO; JAVANAINEN; LINKO, 1997).

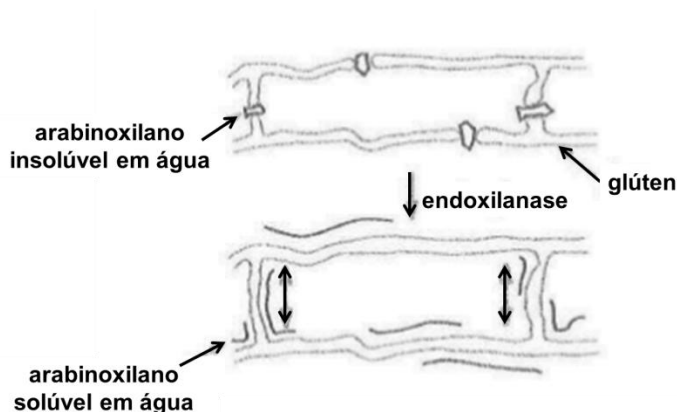


Figura 6 Representação da ação da xilanase na célula de gás da rede de glúten. Células de gás da rede de glúten, contendo arabinoxilano insolúvel em água, e a conversão desse arabinoxilano em arabinoxilano extraível em água, por ação da endoxilanasase, geram filme líquido estabilizado com base no xilana solubilizado na parede das células de gás.

Fonte: Adaptado de Hille & Schooneveld-Bergmans (2004).

Estudos com tratamentos enzimáticos de xilanases em pães mostraram um aumento significativo à redução de açúcares na massa, favorecendo a fermentação e a retenção de gases. Observou-se, também, aumento significativo no volume do pão, diminuição da densidade e melhora no volume específico. Firmeza, crocância e rigidez foram significativamente menores em comparação com o controle, resultando um pão mais macio (CUNHA et al., 2018).

3.6 Xilanase I de *Caulobacter crescentus*

O primeiro estudo sobre clonagem, superexpressão e caracterização enzimática de uma xilanase de *C. crescentus* foi realizado por GRACIANO e col. (2015), no laboratório de Bioquímica da UNIOESTE. Em tal estudo, o gene *xynA1* foi superexpresso em *E. coli*, utilizando 0,02% de arabinose, após clonagem no vector pJet1.2/blunt e subclonagem no vector de expressão pBAD/gIIIa, que fornece uma proteína de fusão com histidinas carboxiterminais, denominada XynA1.

A sequência prevista para a xilanase de *C. crescentus* do gene *xynA1*, anotada como provável GH10 no GenBank, foi comparada com outras xilanases, que pertencem ao mesmo grupo de glico-hidrolases, de acordo com o CAZY (<http://www.cazy.org/Glicosídeo-Hidrolases.html>). Uma árvore filogenética foi montada, usando o método de junção de vizinhos e o bootstrap no programa MEGA 6.06. A xilanase GH11 também foi usada para comparação e foi definida como um grupo externo. A análise da proteína prevista, codificada pelo gene *xynA1*, mostrou

maior similaridade com outras famílias GH10 da classe Caulobacteraceae das alfa-proteobactérias.

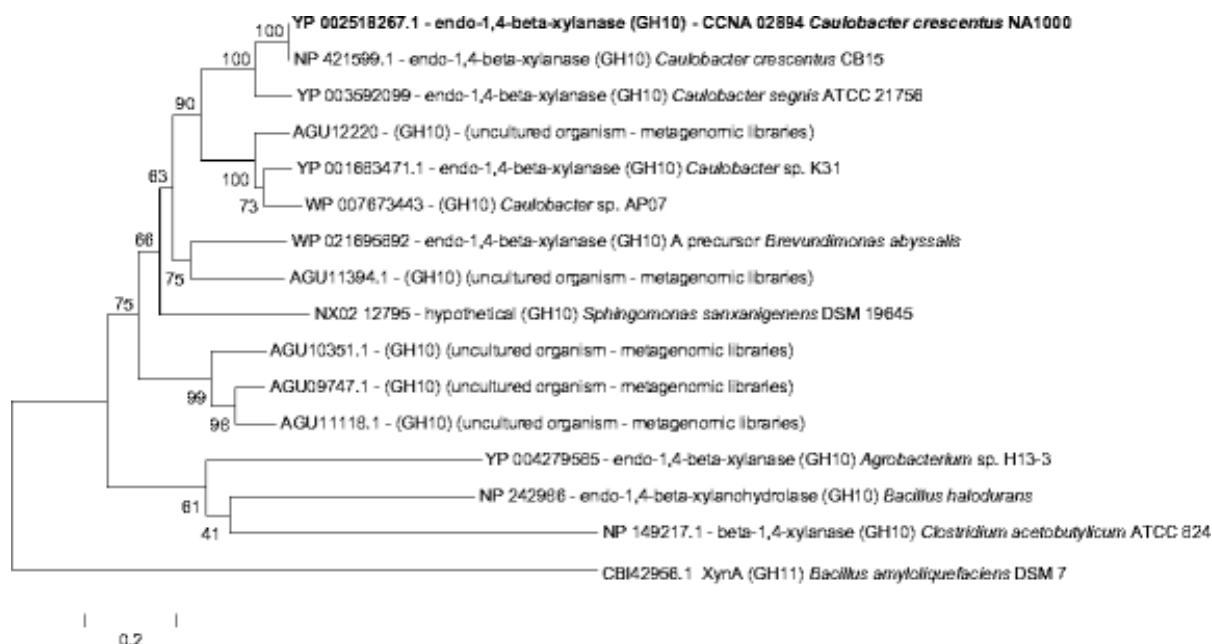


Figura 7 A análise filogenética foi realizada usando o programa MEGA6.06. A árvore foi montada pelo método de junção de vizinhos, com a sequência completa de xilanases GH10 de *C. crescentus* (destaque) e de outras bactérias obtidas de CAZY. Uma xilanase GH11 também foi usada como grupo externo para confirmar o relacionamento. A porcentagem de árvores idênticas, em que a taxa agrupada foi associada ao teste de autoinicialização (500 repetições), é mostrada ao lado dos galhos. A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos galhos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas, usadas para inferir uma árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por local. A análise incluiu 16 sequências de aminoácidos. Todas as posições, que continham lacunas e dados ausentes, foram eliminadas. Um total de 184 posições compôs o conjunto final de dados.

Fonte: Estrada de Graciano (et al., 2015).

A caracterização de XynA1 purificada mostrou atividade enzimática de 18,26 U mL⁻¹ e atividade específica de 2,22 U mg⁻¹, na presença de xilana de *Beechwood* como substrato. Dados cinéticos para XynA1 revelaram valores de K_M e V_{máx} de 3,77 mg.mL⁻¹ e 10,20 µM.min⁻¹, respectivamente. O peso molecular, determinado por SDS-PAGE, foi de aproximadamente 50 kDa (Figura 7).

A enzima apresentou um pH ótimo de 6,0 e uma temperatura ótima de 50°C. Além disso, 80% da atividade da XynA1 foi mantida a 50°C por 4 horas de incubação, sugerindo uma estabilidade térmica para os processos biotecnológicos.

Conhecendo as características da enzima XynA1, percebe-se sua relevância e potencial para ser superexpressa e aplicada em diferentes setores industriais, por exemplo, na panificação, setor alimentício que demanda altas quantidades de enzimas como coadjuvantes de tecnologia. Isso, pois visa melhorar, constantemente, a qualidade de seus produtos, tendo em vista a crescente exigência do consumidor por alimentos cada vez mais saborosos, visualmente atrativos e saudáveis.

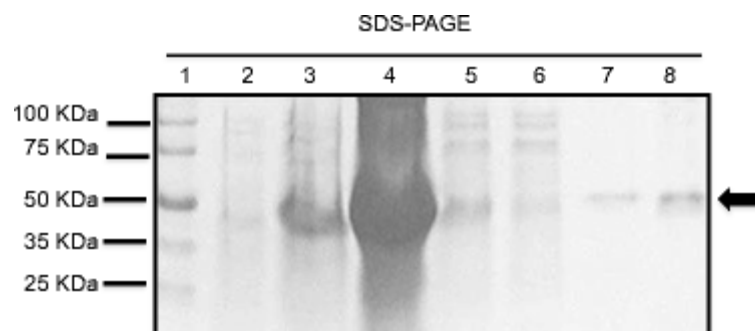


Figura 8 Perfil de SDS-PAGE do lisado celular de *E. coli* LMG194 recombinante, indicando a superexpressão do gene heterólogo *xynA1* e purificação da xilanase recombinante de *C. crescentus* (colunas): 1 marcadores de peso molecular de proteínas de amplo espectro (Promega®); 2 proteínas totais extraídas da cepa LMG194; 3 proteínas totais da estirpe LMG194, contendo a construção pBAD/gIII A-*xynA1*, após 4h de indução com arabinose a 0,02% (p/v) a 37°C; Alíquota de 4 da pastilha após lise celular; 5 – 6 tampão obtido após lavagem das colunas; Eluato 7 - 8 das colunas de níquel-Sepharose, com tampão contendo imidazol 500 mM, mostrando a xilanase purificada de aproximadamente 50 kDa.

Fonte: Extraído de Graciano (et al., 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultura

As cepas e plasmídeos utilizados estão descritos na Tabela 1. As linhagens bacterianas de *E. coli*, cepas DH5 α e S17, foram utilizadas para subclonagem e conjugação, respectivamente. Ambas foram cultivadas a 37°C e mantidas a 4°C, em meio Luria-Bertani (LB) sólido (bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5). Após a subclonagem do gene *xynA1* (CCNA_02894), as cepas DH5 α e S17, contendo a construção pAS22-*xynA1*, foram cultivadas a 37°C e mantidas a 4°C, em meio LB sólido, contendo cloranfenicol (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

A linhagem bacteriana *C. crescentus* NA1000 foi crescida a 30°C e mantida a 4°C, em meio PYE sólido (bacto-peptona 0,2%, extrato de levedura 0,1%, MgSO_4 1,7 mM, CaCl_2 0,5 mM) (POINDEXTER, 1964). Após conjugação, a cepa mutante BS-*xynA1* foi cultivada a 30°C e mantida a 4°C, em meio PYE sólido, contendo cloranfenicol (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ácido nalidíxico (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Para indução da expressão da xilanase (XynA1) e demais enzimas, a cepa BS-*xynA1* foi cultivada a 30°C, 120 rpm, em meio mínimo (M2) (Na_2HPO_4 12 mM, NH_4Cl 9 mM, KH_2PO_4 8 mM, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 0,5 mM, FeSO_4 10 mM) (ELY, 1991), suplementado com xilose 0,3% (p/v), meio M2, suplementado com glicose 0,2% (p/v), meio M2, suplementado com xilose 0,3% (p/v), e adicionado de diferentes resíduos agroindustriais na concentração de 0,2% (p/v).

4.2 Subclonagem do gene *xynA1* no vetor de expressão pAS22

O gene *xynA*, contendo, na totalidade, 1.158 pares de bases (Graciano et al. 2015), foi isolado da construção pJET1.2-*xynA1*, da maneira descrita a seguir (Figura 8). O fragmento de DNA de 1.793 pb, presente na construção pJET1.2-*xynA1*, contendo a metionina iniciadora, o seu códon de parada e, para além desta, uma parte do plasmídeo pJeT1.2 - que não é traduzida quando clonado no vetor pAS22 de *C. crescentus* - foi digerido com enzima de restrição *XhoI* (Thermo Fischer Scientific®). Essa enzima cliva a referida construção apenas promovendo a sua linearização. Em seguida, realizou-se uma reação com a enzima DNA *Blunting* (Fermentas®) para obtenção de uma extremidade não coesiva, que permitisse o processo de subclonagem no vetor pAS22, em um outro sítio não coesivo, em passos subsequentes. Com o gene ainda parcialmente ligado ao vetor pJET1.2, por uma de suas extremidades, mas contendo uma extremidade não coesiva, este foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (Thermo Fischer Scientific®).

Tabela 1 Descrição das cepas e plasmídeos utilizados.

Cepas/Plasmídeos	Genótipo/Descrição	Fonte/Referência
<i>E. coli</i>		
DH5α	Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 phoA sup144 thi-1 gyrA96 relA1</i> (ϕ 80 <i>lacZDM15</i>).	Invitrogen®.
S17	<i>F-lambda</i> (-) <i>thi pro recA hsdR⁻ hsdM⁺ RP4</i> derivativo e integrado no cromossomo com <i>Tet::Mu</i> , <i>Km::Tn7/E. coli</i> com função conjugativa.	(SIMON; PRIEFFER; PUHLER, 1983)
DH5α-pAS22- <i>xynA1</i>	<i>E. coli</i> DH5α contendo a construção pAS22- <i>xynA1</i> .	Este estudo.
S17-pAS22- <i>xynA1</i>	<i>E. coli</i> S17 contendo a construção pAS22- <i>xynA1</i> .	Este estudo.
DH5α-pAS22	<i>E. coli</i> DH5α contendo o plasmídeo pAS22.	Este estudo.
S17-pAS22	<i>E. coli</i> S17 contendo o plasmídeo pAS22.	Este estudo.
<i>C. crescentus</i>		
NA1000	<i>syn-1000</i> , cepa parental sincronizável derivativo da cepa selvagem CB15 de <i>C. crescentus</i> .	(EVINGER; AGABIAN, 1977)
<i>Caulobacter crescentus</i> NA1000 pAS22-BS- <i>xynA1</i>	NA1000 contendo a construção pAS22- <i>xynA1</i> .	Este estudo.
C.c-pAS22	NA100 contendo o plasmídeo pAS22.	Este estudo.
Plasmídeos		
pAS22	Derivados do Pbb1, Cm^R , com o promotor do gene <i>xylX</i> de <i>C. crescentus</i> à frente do múltiplo sítio de clonagem.	(JENAL; FUCHS, 1998)
pAS22- <i>xynA1</i>	pAS22 contendo o gene <i>xynA1</i> de <i>C. crescentus</i> , regulado pelo promotor <i>PxylX</i> induzido por xilose.	Este estudo.

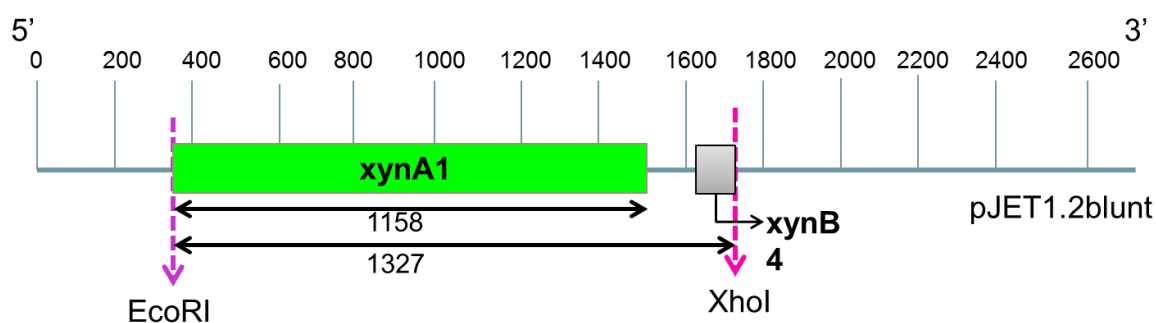


Figura 9 Representação esquemática do gene *xynA1* clonado no vetor pJET1.2blunt e os sítios de restrição utilizados para remoção do fragmento gênico do vetor.

Após as digestões, o material genético foi resolvido por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (Tris-Base, Ácido Acético glacial e EDTA). A banda do gel de 1793 pb, correspondente ao gene *xynA1*, e uma porção não traduzida do plasmídeo pJET1.2blunt - que permanece pós códon de parada do gene *xynA1* -, foram recortadas do gel com bisturi e recuperadas com um kit de extração, o *Pure Link – Gel Extraction Kit* (Invitrogen®).

O plasmídeo, utilizado para superexpressão da xilanase (XynA1) de *C. crescentus*, foi o pAS22 (JENAL; FUCHS, 1998). Esse plasmídeo apresenta um promotor induzível por xilose e permite um aumento em expressão de mais de 20 cópias por célula do gene clonado à frente. A construção é viável para aumento de expressão com uso de xilose porque o gene *xynA1* de *C. crescentus* mostrou não ser regulado por xilose em análise transcriptômica (HOTTES et al., 2004). Assim, como o gene *xynA1* não estará sob o controle do seu próprio promotor, a cópia genômica do gene não é induzida por xilose; incrementos na quantidade de xilanase serão oriundos de super-expressão gênica. A digestão dupla do plasmídeo foi realizada com as enzimas de restrição *EcoRI* e *EcoRV* (Thermo Fischer Scientific®); esse vetor linearizado foi ligado ao fragmento de DNA correspondente ao gene *xynA1* (*EcoRI*/Blunt), com auxílio da enzima T4 DNA Ligase (BioLabs®). A Figura 8 representa a construção da inserção do gene *xynA1* no pAS22.

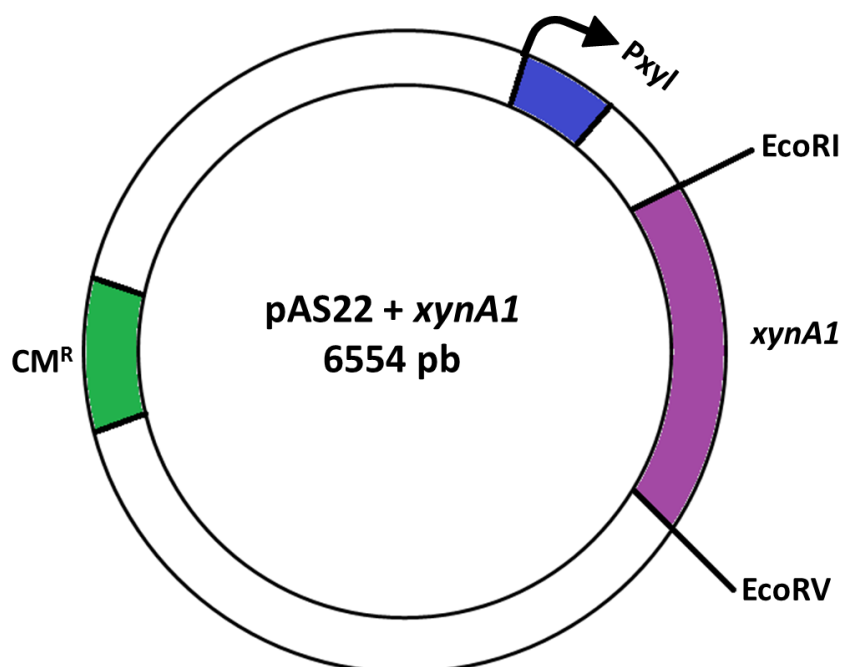


Figura 10 Construção genética da subclonagem do gene *xynA1* no plasmídeo pAS22, nos sítios *EcoRI* e *EcoRV*.

4.3 Transformação da cepa DH5α de *E. coli*

Utilizou-se a construção pAS22-*xynA1* para transformação (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) da cepa DH5α de *E. coli* por método químico (clássico). Essa cepa é frequentemente usada para aplicações de clonagem de rotina; as mutações *recA1* e *endA1* aumentam a estabilidade da inserção e melhoram a qualidade do DNA plasmidial preparado, o que possibilita maior eficiência de transformação. A seleção dos transformantes foi feita pelo crescimento em meio, contendo cloranfenicol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), marca de resistência do vetor pAS22. Após a seleção do transformante, o seu material plasmidial foi extraído por minipreparação plasmidial, submetido a uma digestão dupla com enzimas de restrição *EcoRI/KpnI* e resolvido por eletroforese em gel de agarose 1% TAE 1X, para confirmar o tamanho do gene clonado.

4.4 Transformação da cepa S17 de *E. coli*

A construção pAS22-*xynA1* foi obtida em uma maior quantidade e concentração, por meio de minipreparação plasmidial da cepa, contendo a referida construção; foi usado para transformação por método químico (clássico) da cepa de *E. coli* S17, que apresenta funções conjugativas com *C. crescentus*. A seleção dos transformantes foi feita pelo crescimento em meio contendo cloranfenicol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), marca de resistência do vetor pAS22. Após a seleção do transformante, o seu material plasmidial foi extraído por minipreparação plasmidial, submetido a uma digestão dupla com enzimas de restrição *EcoRI/KpnI* e resolvido por eletroforese em gel de agarose 1% TAE 1X, para confirmar o tamanho do recombinante.

4.5 Transformação da *C. crescentus* por transconjugação com S17 de *E. coli*

Cepas transformantes de *E. coli* S17, contendo a construção gênica pAS22-*xynA1* foram usadas para transformação por conjugação da cepa de NA1000 *C. crescentus*. Os transconjugantes NA1000-pAS22 e NA1000-pAS22-*xynA1* foram selecionados em meio PYE sólido, contendo cloranfenicol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido nalidíxico ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), em temperatura de 30°C por 48 horas. A cepa *C. crescentus* NA1000, contendo apenas o vetor pAS22, foi usada em todos os experimentos como controle. A cepa mutante, que superexpressa homologamente o gene *xynA1*, ou seja, a NA1000, contendo a construção pAS22-*xynA1*, passou a ser denominada BS-*xynA1*.

4.6 Curva de crescimento, consumo de xilose e expressão da proteína recombinante

As cepas NA1000 e *BS-xyA1* foram usadas para pré-inóculos, em 10 mL de meio PYE líquido com cloranfenicol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido nalidíxico ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), por 12 horas, a 30°C e 120 rpm. Quando as células chegaram à fase exponencial (log), foram diluídas para um valor de densidade óptica (DO) $\lambda = 600 \text{ nm}$ igual a 0,1, em meio M2 suplementado com xilose 0,3% (p/v) e cultivadas a 30°C , com agitação de 120 rpm.

Após 6 horas de incubação, a cada duas horas, uma alíquota de 2 mL de solução de crescimento foi coletada. Desse volume, 1 mL foi utilizado para quantificação de crescimento celular, por meio de leitura da densidade óptica (DO) em $\lambda = 600 \text{ nm}$, em espectrofotômetro. O outro volume de 1 mL foi centrifugado a $5.000 \times g$ a 4°C por 10 min. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados com sistema de filtração em poliestireno a vácuo de $0,22 \mu\text{m}$, contendo membranas de polietersulfona de baixa ligação a proteínas, estéreis e livre de pirogênicos (Ciencor®). Assim, foram reservados para as análises de atividade da enzima xilanase I e dosagem do consumo de xilose pelo Método do Orcinol para pentoses (HERBERT; PHIPPS; STRANGE, 1971).

Os precipitados celulares, provenientes da centrifugação, foram congelados para posterior quantificação da xilanase intracelular. O precipitado de células congeladas foi lizado com 350 μL de tampão fosfato 50 mM, pH 6, sob vórtex vigoroso, até ser descongelado. As amostras foram mantidas em gelo e os níveis de dosagem da atividade global das enzimas xilanolíticas foram determinados.

4.7 Expressão da enzima XynA1 em cultivo com diferentes resíduos

O pré-inóculo e inóculo foram realizados da mesma forma que o item 4.5, porém, o meio M2 foi suplementado com xilose 0,3% (p/v) e diferentes resíduos agroindustriais 0,2% (p/v) (palha de milho, sabugo de milho, palha de trigo, palha de arroz, bagaço de cana, resíduo de soja, resíduo do aspirador e resíduo do polidor de indústria de farinha de trigo). Todos os resíduos foram preparados, conforme descrito em Corrêa et al. (2014).

As culturas foram incubadas a 30°C , com agitação de 120 rpm, durante 18 horas, e centrifugadas a $5.000 \times g$, a 4°C , por 10 min. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados com sistema de filtração em poliestireno a vácuo de $0,22 \mu\text{m}$ e reservados para análise de atividade XynA1.

O sobrenadante que apresentou maior atividade de xilanase I foi também caracterizado quanto à presença das enzimas: celulase, pectinase, α -L-arabinofuranosidase, β -glicosidase, β -xilosidase e α -amilase.

Como a bactéria apresenta três genes para xilanases (*xynA1*, *xyn2* e *xynA3*), portanto, duas enzimas podem ser expressas em condições induzidas. Nesses experimentos, foram usados, como controle, a cepa NA1000, contendo apenas o vetor pAS22.

4.8 Quantificação das enzimas presentes no extrato extracelular bruto

As reações para verificar a atividade da xilanase I e II foram realizadas utilizando 1% (p/v) da xilana de *Beechwood* (Sigma[®]) (em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 para xilanase I e tampão McIlvaine pH 8,0 para xilanase II) como substrato, seguido de incubação a 50 e 60°C, respectivamente.

As reações para verificar a atividade da celulase e α -amilase foram realizadas utilizando carboximetilcelulose (CMC) 1% (p/v), em tampão citrato do sódio 50 mM (pH 5,5) e amido 1% (p/v), em tampão citrato do sódio 50 mM (pH 5,0) como substratos, respectivamente, seguido de incubação a 40°C.

Os açúcares redutores foram medidos usando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). As atividades xilanolíticas e celulolíticas foram definidas em U.mL⁻¹ como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por mL de solução, por min de reação (U).

A determinação das atividades enzimáticas de β -glicosidase, β -xilosidase, α -L-arabinosidase foram realizadas utilizando os reagentes p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p NPG), p -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (p NPX) e p -nitrofenil- α -L-arabinofuranósídeo (p NPA) (Sigma[®]), respectivamente, de acordo com o método de Justo et al. (2015), estimando a quantidade de p -nitrofenol (p NP) liberada do respectivo reagente.

A dosagem de proteínas totais foi estimada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que utiliza como padrão a albumina de soro bovino (BSA – Bio-Rad[®]).

4.9 Xilanases comerciais versus xilanases da cepa *BS-xynA1*

A atividade xilanolítica foi mensurada nas diferentes misturas comerciais de xilanases, obtidas para aplicação em indústrias de panificação. Dentre elas, foram testadas: Spring CA 400 (produzido por Granotec do Brasil S.A. Nutrição e Biotecnologia), Mega Cell 899 e Xylamax 292 (produzidos por Prozin Ind. E Com. Ltda.).

Os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com o descrito no item 4.7, variando-se apenas as temperaturas de incubação (40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C). O mesmo procedimento foi efetivado para o extrato bruto, contendo a enzima XynA1 de *C. crescentus*.

4.10 Teste para confirmação da ausência de bactérias viáveis nos extratos enzimáticos

O meio de cultura, no qual o mutante BS-xynA1 cresceu, foi centrifugado a 5.000 x g a 4°C por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado com sistema de filtração em poliestireno a vácuo de 0,22 µm, contendo membranas de polietersulfona de baixa ligação a proteínas, estéreis e livres, de pirogênicos (Ciencor®). A completa ausência de bactérias viáveis nos extratos foi testada por plaqueamento de uma alíquota de 100 µL de extrato bruto enzimático, em cada uma das três placas dos meios PYE, a 30°C e LB a 37°C, seguido de incubação por 48 e 24 horas, respectivamente, para averiguação de crescimento microbiano. Alíquotas dos filtrados foram usadas para testes de ensaios enzimáticos, após o processo de centrifugação e filtração.

4.11 Testes de aplicabilidade dos extratos enzimáticos em panificação

Os extratos enzimáticos, contendo atividade xilanolítica, foram testados como coadjuvantes de processamento (coadjuvantes tecnológicos) no pão de forma, com farinha de trigo branca (sem ferro, ácido fólico, aditivos ou melhoradores) do tipo 0000 (classificação segundo o Art. 661 do Código Alimentar Argentino). Os testes foram realizados no laboratório de panificação de indústria regional de farinha (Oeste do Paraná, Brasil).

4.11.1 Tratamento enzimático na formulação do pão

Os testes na panificação foram realizados em triplicata; as formulações foram padronizadas, sendo compostas pelos seguintes ingredientes: farinha de trigo branca (sem ferro, ácido fólico, aditivos ou melhoradores) do tipo 0000 (classificação segundo o Art. 661 do Código Alimentar Argentino), açúcar, sal, fermento biológico fresco (Fleischmann®), gordura vegetal (Coamo®) e água.

A partir de uma formulação básica de pão de forma branco, foram preparadas outras duas formulações, seguindo um planejamento experimental, no qual a variável independente é a quantidade de extrato enzimático adicionado. O volume de água presente na solução enzimática foi utilizado para recalcular e corrigir a quantidade de água necessária para corresponder à formulação padrão.

Na tabela 2, consta a relação das quantidades de cada ingrediente utilizado em cada uma das formulações dos testes.

O preparo das massas para cada um dos testes foi realizado de acordo com as seguintes etapas de panificação: Mistura (Fase I e Fase II); Divisão; Modelagem; Fermentação e Crescimento; e Forneamento.

Mistura (Fase I e Fase II): Esta etapa começou com a separação e pesagem dos ingredientes, nas quantidades certas, de acordo com a receita.

Fase I - Colocou-se a farinha, o açúcar, a água, em temperatura de 4 a 6°C (já adicionada da solução enzimática para os testes T2 e T3), e o sal na masseira (Amassadeira Espiral modelo AM-12 Automática marca FAMAG®). Misturaram-se os ingredientes por 3 minutos, em velocidade lenta (100 rpm).

Fase II - Nesta etapa, foram adicionados, à mistura que estava na masseira, a gordura vegetal e o fermento biológico fresco. Bateram-se todos os ingredientes, em velocidade rápida (190 rpm), até a massa atingir o ponto de véu.

Divisão: Nesta etapa, a massa foi dividida em partes iguais de 500 gramas, com auxílio de espátula e balança.

Modelagem: A modelagem é o processo que dá forma ao pão. Foi realizada pela passagem da massa uma única vez em máquina modeladora. O trabalho obedeceu a três fases: laminação, enrolamento e alongamento. A laminação uniformiza o pedaço de massa. No enrolamento, a massa é enrolada em dobras. Já o alongamento, “sela” (une) os pontos de dobra na massa. Isso é importante, pois retém o gás dentro da massa durante a fermentação e forneamento, determinando o formato simétrico do pão.

Fermentação e Crescimento: A massa já modelada foi colocada em formas padrões, as quais foram, então, acomodadas em câmara de controle de fermentação, com temperatura de 28°C para fermentar; o descanso ocorreu por 4 horas.

Forneamento: A massa, já modelada no formato do pão e fermentada (crescida), foi colocada no forno, preaquecido a 180°C, no qual permaneceu por 30 minutos.

Após o término do forneamento, estando os pães em temperatura ambiente, foram feitas as medidas de suas alturas, com base em régua métrica; os pães também foram cortados ao meio para observação da formação da estrutura alveolar (miolos). Por fim, foram fotografados e comparados os pães controles com os pães adicionados de enzima, nas diferentes concentrações.

Tabela 2 Formulações dos testes.

Ingredientes	T1	T2	T3
Farinha	1000 g	1000 g	1000 g
Sal	20 g	20 g	20 g
Açúcar	60 g	60 g	60 g
Gordura vegetal	40 g	40 g	40 g
Fermento	20 g	20 g	20 g
Água	500 mL	440 mL	380 mL
Solução Enzimática*	-	60 mL	120mL

*Solução enzimática com atividade de 17,220 U mL⁻¹.

4.11.2 Teste em alveógrafo

A capacidade de adição enzimática causar alterações às características viscoelásticas da farinha foi determinada pelo meio de alveografia, que simula o comportamento da massa na fermentação, ao imitar em grande escala a formação de alvéolos, originados na massa pelo gás carbônico (CO_2), produzido pelos fermentos. As características viscoelásticas das massas foram, então, avaliadas pelos diferentes parâmetros da alveografia.

Para a realização do teste, utilizou-se o Alveógrafo Chopin, modelo AlveoPC (Figura 9), desenvolvido pela CHOPIN Technologies (Villeneuve-la-Garenne, França), de acordo com as metodologias AACC (*International Association for Cereal Science and Technology*) 54-60.02 (Aprovado: 1984, Revisado: 1999) e ICC (*International Association for Cereal Science and Technology*) 121 (Aprovado: 1972, Revisado: 1992).



Figura 11 Alveógrafo Chopin modelo AlveoPC (CHOPIN Technologies®, Villeneuve-la-Garenne, França).

Para o teste com adição enzimática, a determinação do volume de extrato enzimático foi baseada na mesma proporção de extrato enzimático por Kg de farinha utilizada no teste T3 de panificação. Para o teste controle, utilizou-se nenhuma adição de enzima. Os componentes dos testes estão descritos na Tabela 3.

Em ambas as amostras, controle e teste, mantiveram-se os mesmos parâmetros padronizados: Humidade 14,4%; Hidratação: 50%; Base de hidratação: B 15% H_2O , de acordo com o que está preconizado na metodologia da AACC.

Primeiramente, o cloreto de sódio foi diluído na água, obtendo-se uma solução salina de 2,5% (p/v); adicionou-se, também, à solução salina, a solução enzimática (apenas no teste com adição enzimática).

Tabela 3 Composição dos testes em alveógrafo.

Componentes	Teste controle	Teste com adição enzimática
Farinha	250 g	250 g
Água	127,7 mL	97,7 mL
Cloreto de sódio	3,1925 g	3,1925 g
Solução enzimática*	-	30 mL

*Solução enzimática com atividade de $17,220 \text{ U mL}^{-1}$.

Um total de 250 gramas de farinha foi adicionado ao misturador ($24 \pm 2^\circ \text{C}$); o motor e *timer* foram acionados e a solução salina foi adicionada no tempo de 20 segundos. Posteriormente, deixou-se misturar por 1 minuto, incluindo os 20 segundos de adição da solução salina, então, o motor foi parado e, com uma espátula, os lados do misturador foram raspados. Essa operação foi realizada em 1 minuto. O misturador foi ligado novamente e prosseguiu-se com a etapa de mistura até se completar 8 minutos de tempo total. O misturador foi parado para inversão da rotação da pá de mistura e iniciaram-se os procedimentos para o corte de 5 pedaços da massa.

Após o corte, cada pedaço seguiu para a câmara de descanso do alveógrafo, a $25 \pm 0,2^\circ \text{C}$. Decorridos 28 minutos do início da mistura da massa, o primeiro pedaço foi transferido para o centro da placa fixa do alveógrafo, já untada com vaselina. A tampa foi colocada e rosqueada. A placa móvel foi girada em 2 voltas completas, em 20 segundos; após 5 segundos, o anel e a tampa foram retirados e o pedaço foi inflado até ruptura da bolha formada. Essa operação foi repetida com os outros 5 pedaços de massa.

Os parâmetros, obtidos nos gráficos, gerados no computador, pelos alveogramas, foram: tenacidade (P), que mede pressão máxima exercida na expansão da massa (mm); extensibilidade (L), que mede o comprimento da curva (mm) e energia de deformação da massa (W), que corresponde ao trabalho mecânico necessário para expandir a bolha até a ruptura, expressa em 10^{-4} J . A partir dos valores de P e L, obtêm-se o valor de Tenacidade/Extensibilidade (P/L), que expressa o equilíbrio da massa, em que P é a tenacidade ou resistência da massa à deformação e L a extensibilidade da massa.

4.11.3 Análise estatística

Os testes foram realizados em três experimentos independentes, exceto os testes em alveógrafo, os quais foram realizados em estudo quintuplicado. Os erros padrão foram utilizados para validar os resultados.

Os dados, obtidos nos teste de tratamento enzimático na formulação do pão panificação e no teste de alveografia, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com teste *post hoc* de Tukey, com significância de 99%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Subclonagem do gene *xynA1* no vetor de expressão pAS22

O fragmento de DNA, de aproximadamente 1.793 pb, contendo todo o gene *xynA1*, além de uma porção do vetor pJET1.2Blunt, após o códon de parada do gene *xynA1*, previamente preparado, conforme descrito na seção *Materiais e Métodos* - com uma extremidade coesiva *EcoRI* e outra *blunt* -, foi subclonado no vetor de expressão pAS22, previamente digerido com as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*, as quais fornecem uma extremidade de DNA coesiva e outra não coesiva.

A construção pAS22-*xynA1* foi usada para transformar a cepa DH5 α de *E. coli* e a confirmação da clonagem foi realizada por minipreparação plasmidial, seguida de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI*/*KpnI*, as quais geram extremidades coesivas e fornecem maior eficiência de digestão, quando usadas juntas, do que as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*, seguido de resolução em gel de agarose 1% em TAE 1X. A eletroforese em gel evidenciou a presença de uma banda de DNA próxima a 5 Kb, que corresponde ao plasmídeo pAS22 (5.23 Kb), e outra banda próxima a 2 Kb, referente ao inserto (1.793 pb), confirmando a clonagem em vetor de expressão (Figura 10).

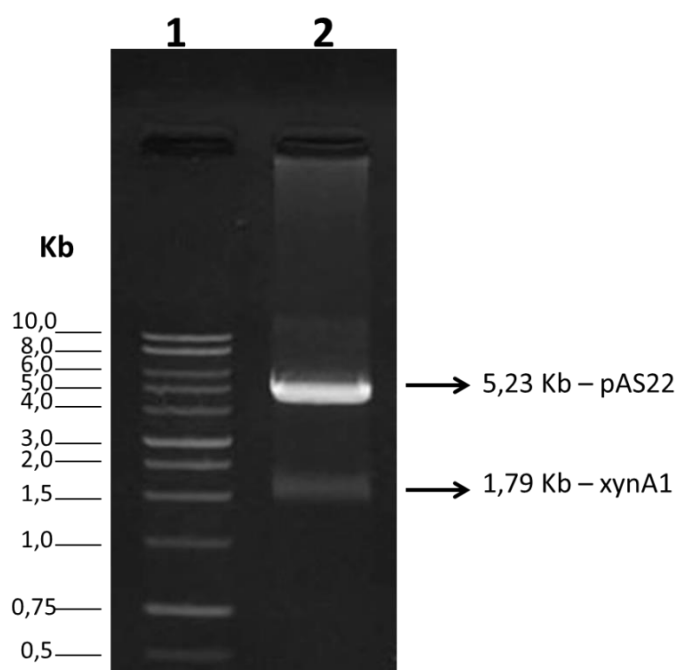


Figura 12 Eletroforese em Gel de agarose 1%. (1) Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Ludwig ®). (2) Plasmídeo pAS22-*xynA1*, extraído da cepa DH5 α -pAS22-*xynA1*, digerido com *EcoRI*/*KpnI*.

5.2 Construção das linhagens bacterianas

A construção pAS22-*xynA1* foi então transferida para a cepa S17 de *E. coli*, por transformação com cloreto de cálcio e choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH;

MANIATIS, 1989). A seleção dos transformantes foi feita pelo crescimento em meio contendo cloranfenicol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), visto que o vetor pAS22 apresenta um cassette de resistência para esse antibiótico. A cepa S17 de *E. coli* tem funções conjugativas e transfere material genético de forma eficiente para *C. crescentus*.

A confirmação da construção na cepa S17 foi feita por meio de extração do material plasmidial por minipreparação plasmidial, seguida de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI/KpnI* e resolução em gel de agarose 1%, em TAE 1X. O gel de eletroforese apresentou uma banda de DNA próxima a 5 Kb, que corresponde ao plasmídeo pAS22 (5.23 Kb), e outra banda próxima a 2 Kb, referente ao fragmento de DNA, contendo todo o gene *xynA1* (1.793 pb), o que confirma, assim, a presença da construção pAS22-*xynA1* na cepa S17 (Figura 11).

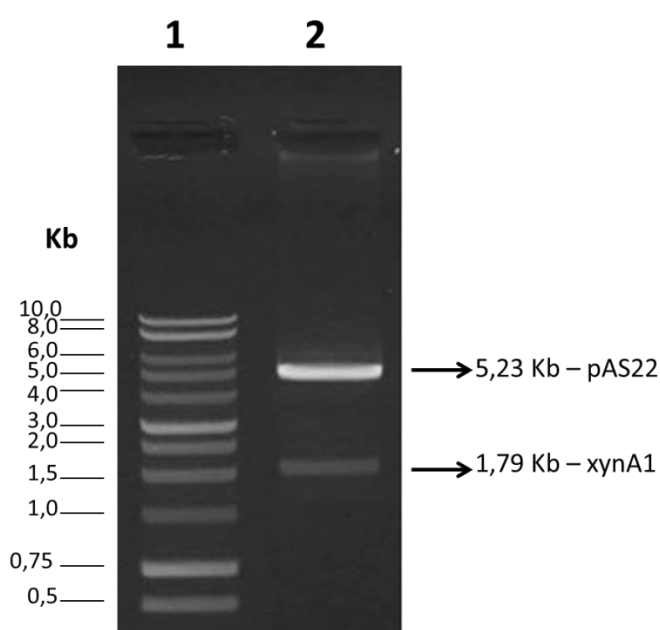


Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Ludwig ®). (2) Plasmídeo pAS22-*xynA1* extraído da cepa S17-pAS22-*xynA1*, digerido com *EcoRI/KpnI*.

5.3 Transformação bacteriana por conjugação

Após a confirmação da transformação, cepas transformantes de *E. coli* S17, contendo a construção pAS22-*xynA1*, foram usadas para transformação da cepa *C. crescentus* NA1000 por conjugação. Uma alçada da cultura fresca da cepa *E. coli*, contendo o vetor pAS22-*xynA1*, foi misturada a duas vezes a quantidade de células frescas de *C. crescentus* da cepa NA1000, em meio PYE sólido. Após 48 horas de crescimento, a 30°C, amostras das culturas bacterianas crescidas na placa foram estriadas para uma nova placa PYE sólido, contendo cloranfenicol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), marca de seleção do vetor pAS22 e ácido nalidíxico ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), marca de seleção da cepa NA1000 e não de *E. coli*, em temperatura de 30°C, por 48 horas. Colônias isoladas, crescidas nessas placas, foram novamente estriadas em uma nova placa

PYE, contendo a mesma quantidade de cloranfenicol e ácido nalidíxico, e as células analisadas ao microscópio para certificação de que apenas as células de *C. crescentus* estariam presentes. Em seguida, alíquotas das células mutantes foram denominadas *BS-xynA1* e estocadas a -20°C e -80°C, para caracterizações subsequentes. Paralelamente à construção do mutante *BS-xynA1*, foi realizada a construção de uma cepa controle na cepa NA1000, por conjugação do plasmídeo vazio pAS22.

5.4 Caracterização do mutante *BS-xynA1*

5.4.1. Crescimento, consumo de xilose e produção de xilanase

O mutante *BS-xynA1* foi, inicialmente, caracterizado quanto ao crescimento em meio mínimo M2, suplementado com xilose 0,3% (Figura 12). Ao analisar o crescimento bacteriano *versus* o consumo de xilose, ao longo do tempo e, em paralelo, os perfis de atividades xilanásica extra e intracelulares (Figuras 13-14), pode-se perceber que a produção xilanásica é diretamente proporcional à captação de xilose na cepa *BS-xynA1*.

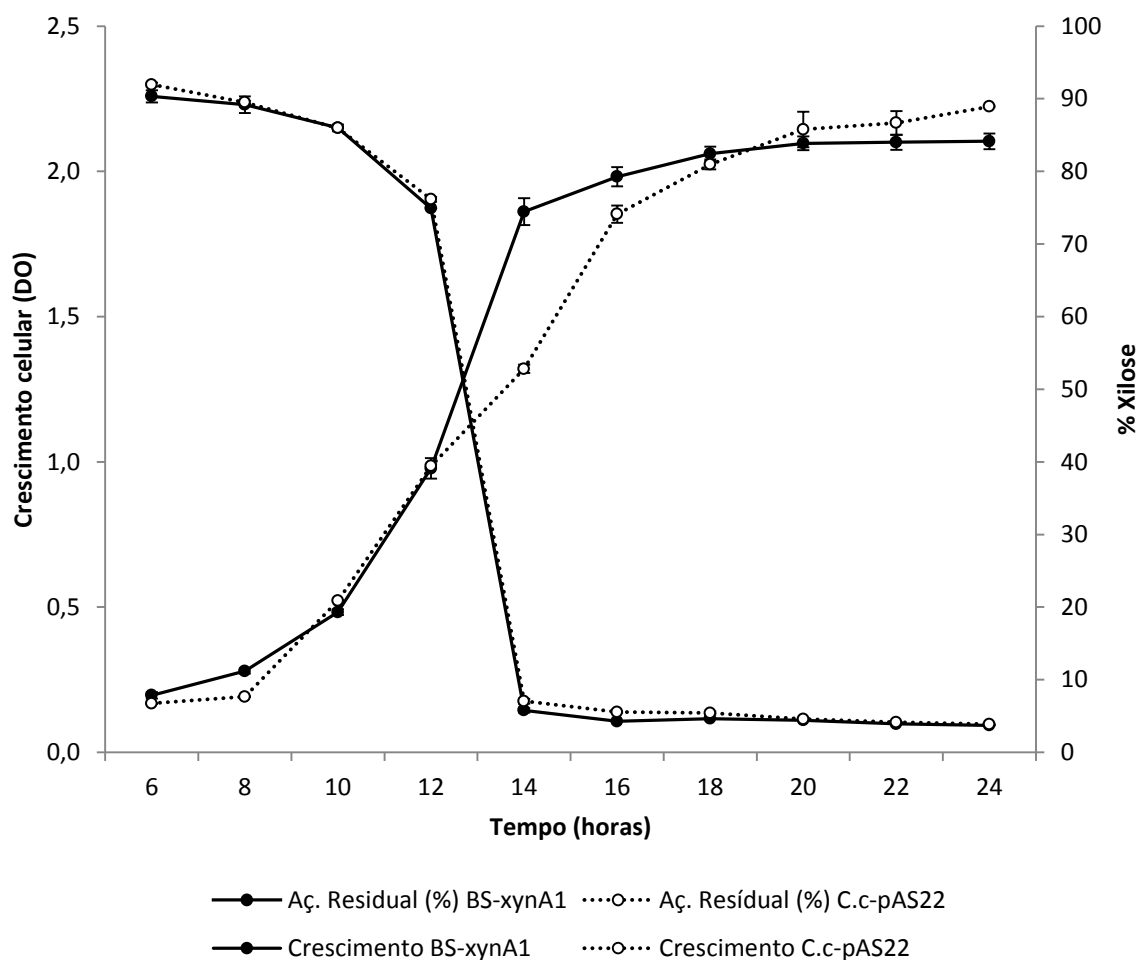


Figura 14 Curva de crescimento celular e consumo de xilose das cepas *C. crescentus* NA 1000 pAS22 e *BS-xynA1*, em meio M2, suplementado com xilose 0,3%, a 30°C e 120 rpm.

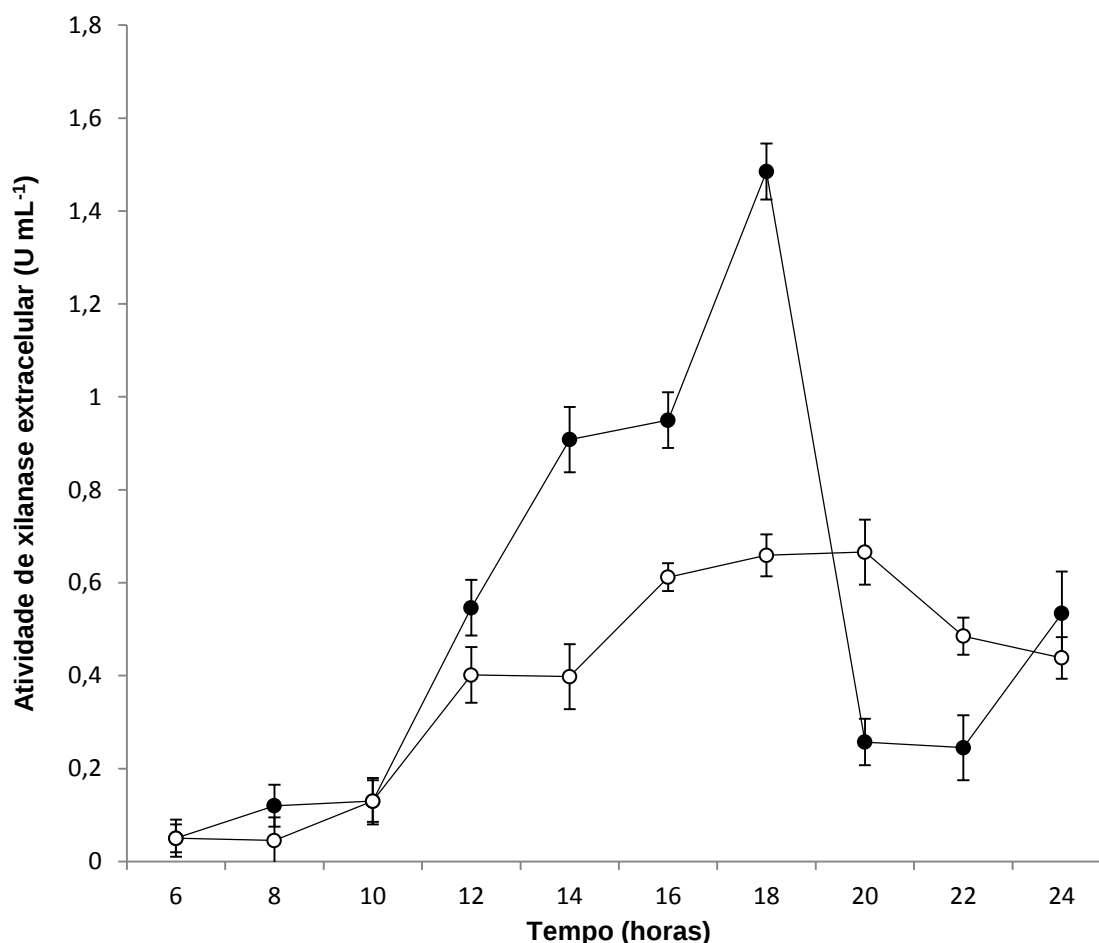


Figura 15 Atividade da xilanásica extracelular das cepas controle Cc-pAS22 (círculo aberto) e mutante BS-xynA1 (círculo fechado). As células bacterianas foram crescidas em meio M2, a 30°C e 120 rpm.

As cepas controle Cc-pAS22 e mutante BS-xynA1 foram submetidas a crescimento em meio mínimo, contendo glicose 0,2% e xilose 0,3%, respectivamente, por 24 horas. As atividades de xilanase extracelular e intracelular das referidas cepas foram mensuradas (Figura 13 e 14). A atividade extracelular mostrou um pico de produção de xilanase de 1,485 U mL, após 18 horas de crescimento na cepa mutante (Figura 13). Na cepa controle, os níveis de xilanase permaneceram invariáveis entre 16 a 20 horas de crescimento e foram, em média, cerca de 1,5 vezes inferiores aos verificados na cepa mutante (Figura 13). A atividade xilanásica intracelular foi crescente na cepa controle Cc-pAS22, comparada à cepa mutante BS-xynA1 (Fig. 14), de maneira que a produção ótima foi de 6,16 U mL, ou seja, mais que 8 vezes superior à verificada na cepa mutante, após 24 horas de cultivo, induzido com xilose (Fig. 14). Nossos dados sugerem que a cepa mutante, ao superexpressar a xilanase I de *C. crescentus*, secreta a enzima para o espaço extracelular, pois elevados níveis da enzima foram observados quando a cepa mutante foi crescida na presença de xilose e dosada no meio extracelular (Fig. 13), com níveis bem sutis, quando quantificada no meio intracelular (Fig. 14).

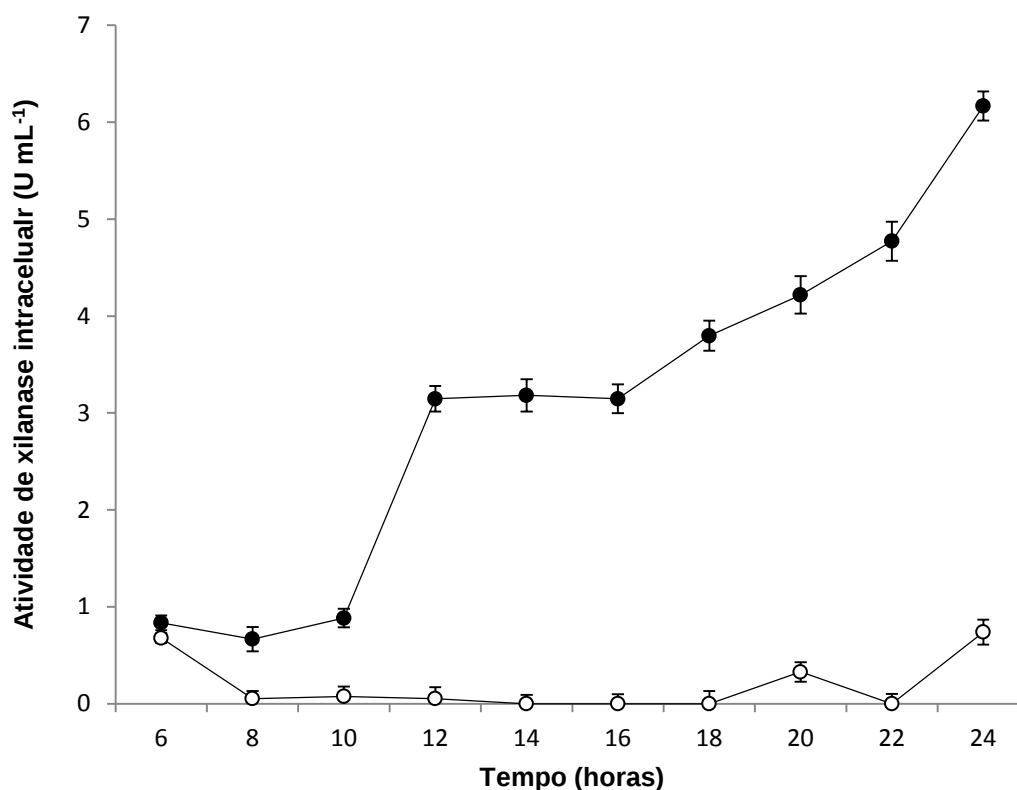


Figura 16 Atividade de xilanase intracelular das cepas *Cc-pAS22* (círculo aberto) *BS-xynA1* (círculo fechado). Células bacterianas foram crescidas em meio M2, suplementado com glicose 0,2% (p/v) (*Cc-pAS22*) e xilose 0,3% (p/v) (*BS-xynA1*), a 30°C e 120 rpm, durante 24 horas; alíquotas da cultura foram removidas e as atividades xilanólíticas mensuradas.

5.4.2. Produção de Xilanase em diferentes resíduos

O mutante *BS-xynA1* foi submetido a crescimento em diferentes fontes de carbono, a 0,2% (p/v), a fim de se avaliar o melhor resíduo indutor para a produção de xilanase. A Figura 15 expressa os valores de atividade de xilanase extracelular, obtidos com cada um dos resíduos testados. Entre os resíduos agroindustriais, testados como indutores da atividade de xilanase I, na cepa *C. crescentus BS-xynA1*, a palha de milho apresentou um grande destaque (Figura 15). A maior atividade xilanásica obtida foi de $17,22 \pm 0,22 \text{ U mL}^{-1}$ e atividade específica $278,64 \pm 3,59 \text{ U mg}^{-1}$. Praticamente, não houve variação na atividade enzimática obtida na presença de (PT) palha de trigo, (RP) resíduo do polidor e (RA) resíduo do aspirador de indústria de farinha de trigo ($1,9 \text{ U mL}^{-1}$).

Diversos estudos já relataram que a xilanase é uma enzima induzível e secretada em meios, contendo xilana pura ou resíduos ricos em xilana. A indução é iniciada, principalmente, pela xilana. Vários relatos mostraram indução de xilanase por lignoceluloses, como farelo de trigo, palha de arroz, sabugo de milho e bagaço de cana de açúcar (BEG et al., 2001). A xilose foi o carbono preferido para a produção de xilanase por *Arthrobacter sp.* (KHANDEPARKAR; BHOSLE, 2006).

Enquanto, para o *Streptomyces rameus*, o melhor indutor da produção de xilanase foi a dextrose (BHOSALE et al., 2011). Vários trabalhos mostram que a indução de xilanase parece ser específica da espécie em diferentes cepas bacterianas (FATOKUN; NWODO; OKOH, 2016).

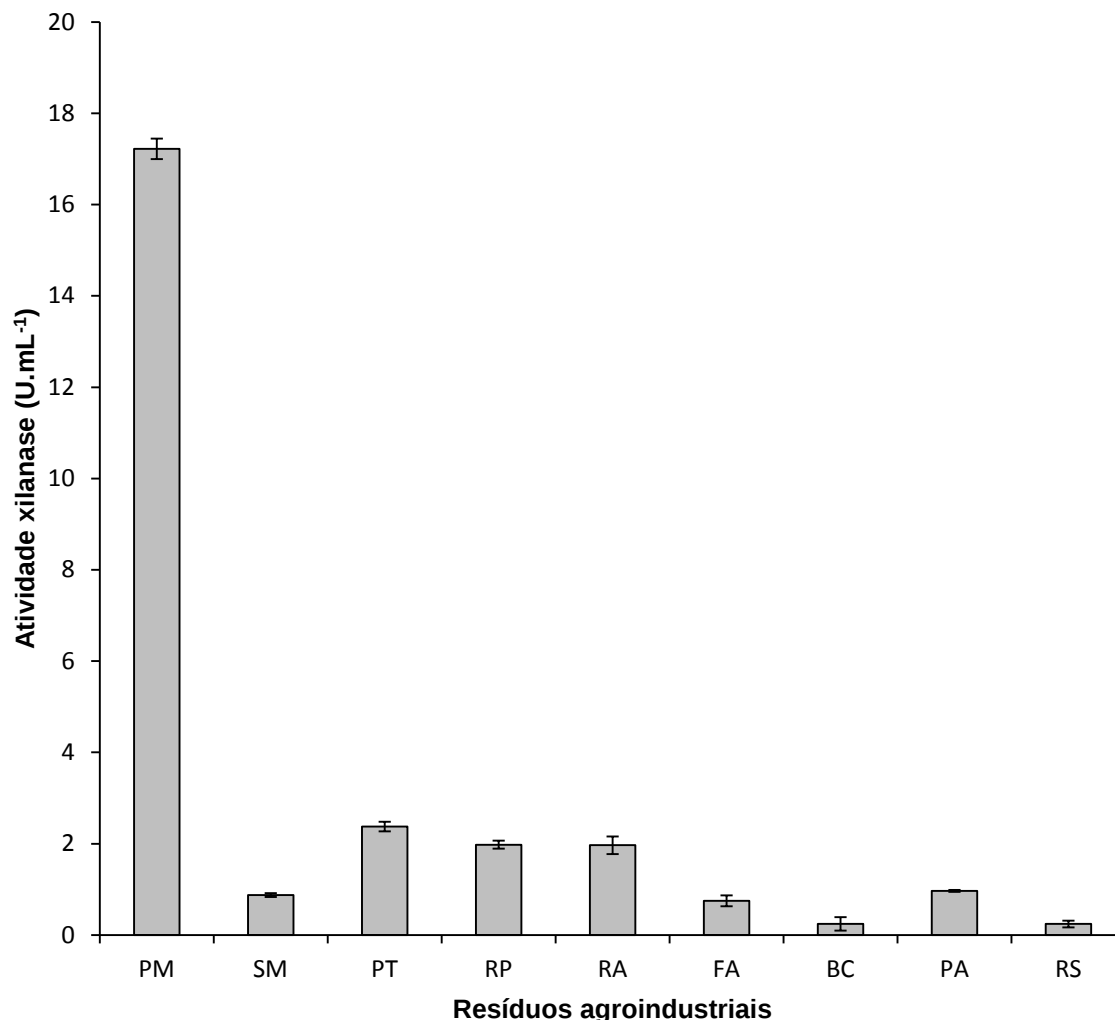


Figura 17 Produção de xilanase I na presença de diferentes resíduos agroindustriais. Células da cepa *BS-xynA1* de *C. crescentus* foram crescidas em meio mínimo M2, contendo 0,3% de xilose (p/v) e suplementado com 0,2% (p/v) de diferentes resíduos agroindustriais: PM palha de milho, SM sabugo de milho, PT palha de trigo, BC bagaço de cana, PA palha de arroz, RS resíduo de soja, FA farinha de trigo, RP resíduo do polidor e RA resíduo do aspirador de indústria de farinha de trigo. O inóculo foi realizado diluindo as células na fase estacionária para uma DO 600 nm de 0,1 no mesmo meio de cultura, contendo diferentes fontes de carbono. Crescimento bacteriano ocorreu a 30°C por 18h, com agitação a 120 rpm.

5.4.3. Quantificação das enzimas presentes no extrato extracelular bruto produzido pela cepa *BS-xynA1*

Com o objetivo de melhor caracterizar o extrato extracelular induzido para produção de xilanase I, este também foi avaliado quanto à capacidade de produzir outras enzimas, a saber: celulase, pectinase, α -amilase, β -glicosidase, β -xilosidase e α -L-arabinosidase. O extrato extracelular obtido do cultivo da cepa *BS-xynA1* de *C.*

crescentus, em meio M2, suplementado com palha de milho 0,2%, a 30°C, 120 rpm, por 18 horas, foi plotado graficamente e está representado na Figura 16.

Na presença de palha de milho, a dosagem xilanásica em pH 6 e a 50°C foi igual a 17.22 U mL⁻¹. A atividade, direcionada para xilanase II, ou seja, onde os parâmetros adotados são pH ótimo 8 e temperatura ótima de 60°C (JACOMINI, 2019), efetiva-se como uma atividade para 1.16 U.mL⁻¹, ou seja, a atividade de xilanase II foi cerca de 15 vezes inferior à atividade de xilanase I, no mutante BS-xynA1, que superexpressa, de forma homóloga, essa enzima bacteriana (Fig. 16).

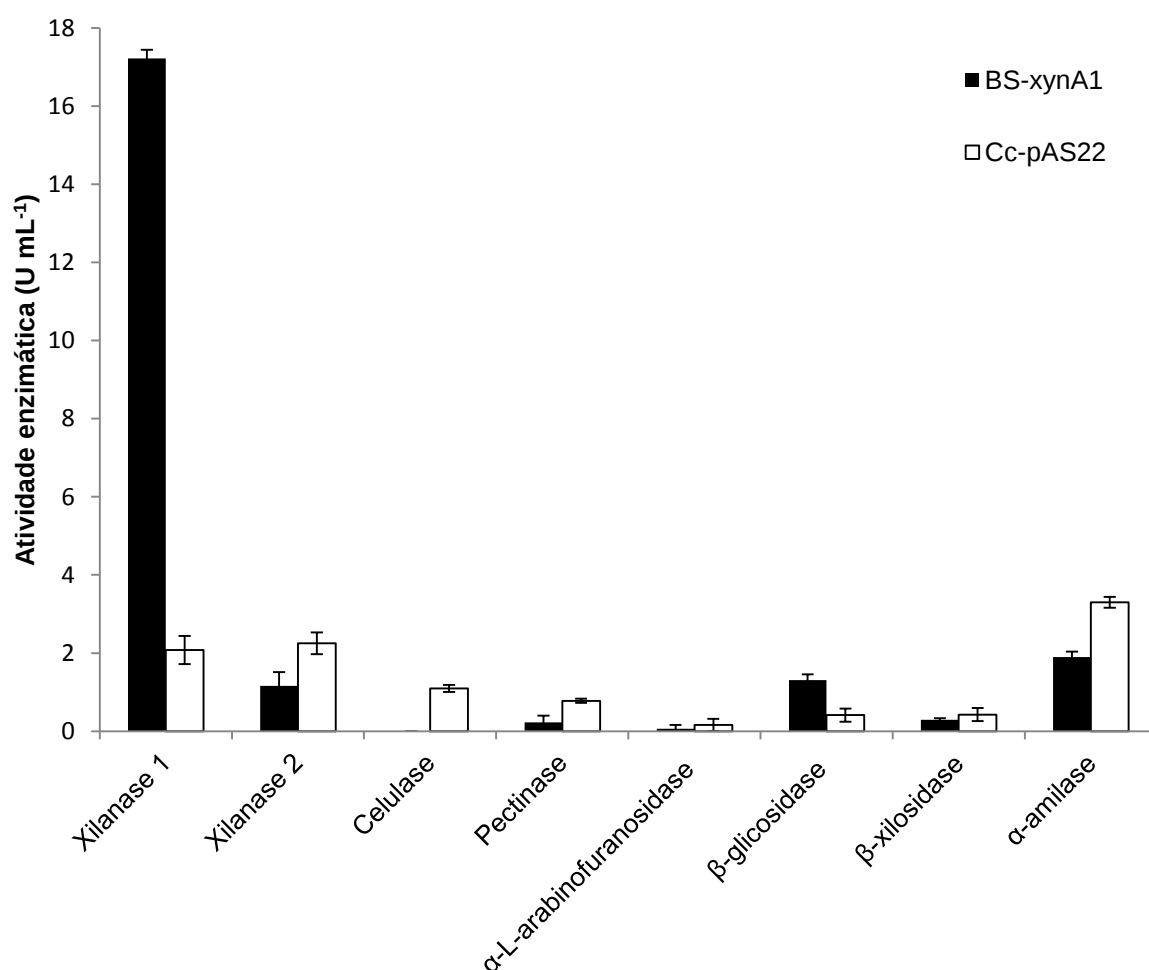


Figura 18 Atividades de diferentes enzimas coinduzidas ao extracelular bruto da cepa controle Cc-pAS22 e mutante BS-xynA1. Cultivadas em meio M2, suplementado com palha de milho 0,2% (p/v), a 30°C, 120 rpm, por 18 horas.

Ao comparar as atividades das enzimas xilanase II, celulase, pectinase, α-amilase, β-xilosidase e α-L-arabinosidase, é possível notar que todas são coexpressas com a xilanase I (Fig. 16- barras brancas). Vale ressaltar que a atividade de todas essas outras enzimas ainda é mais reprimida no mutante BS-xynA1 (Fig. 16 – barras negras). Avaliando-se globalmente a quantificação das atividades das enzimas, presentes nos extratos extracelulares dos cultivos das cepas *C. crescentus* BS-xynA1 e Cc-pAS22, pode-se observar uma alta produção de

xilanase I e uma baixa produção das enzimas, em geral, nos extratos da *BS-xynA1*; em contrapartida, os extratos da cepa Cc-pAS22 demonstraram baixa atividade enzimática de xilanase I e maior atividade das demais enzimas. Esses dados sugerem que, de fato, esteja ocorrendo a indução da atividade promotora por xilose, a partir do vetor pAS22, no mutante *BS-xynA1*, o que leva à superexpressão e atividade específica da xilanase I de *Caulobacter crescentus*, no meio extracelular.

5.4.4. Xilanases comerciais versus xilanases da cepa *BS-xynA1*

Enzimas comerciais foram usadas nesses ensaios como parâmetro comparativo para quantificação de atividade específica. Os valores das atividades específicas (U mg^{-1}) das enzimas comerciais e da enzima XynA1, presente no extrato extracelular bruto, obtido da filtração do cultivo da cepa, estão expressos na Figura 17.

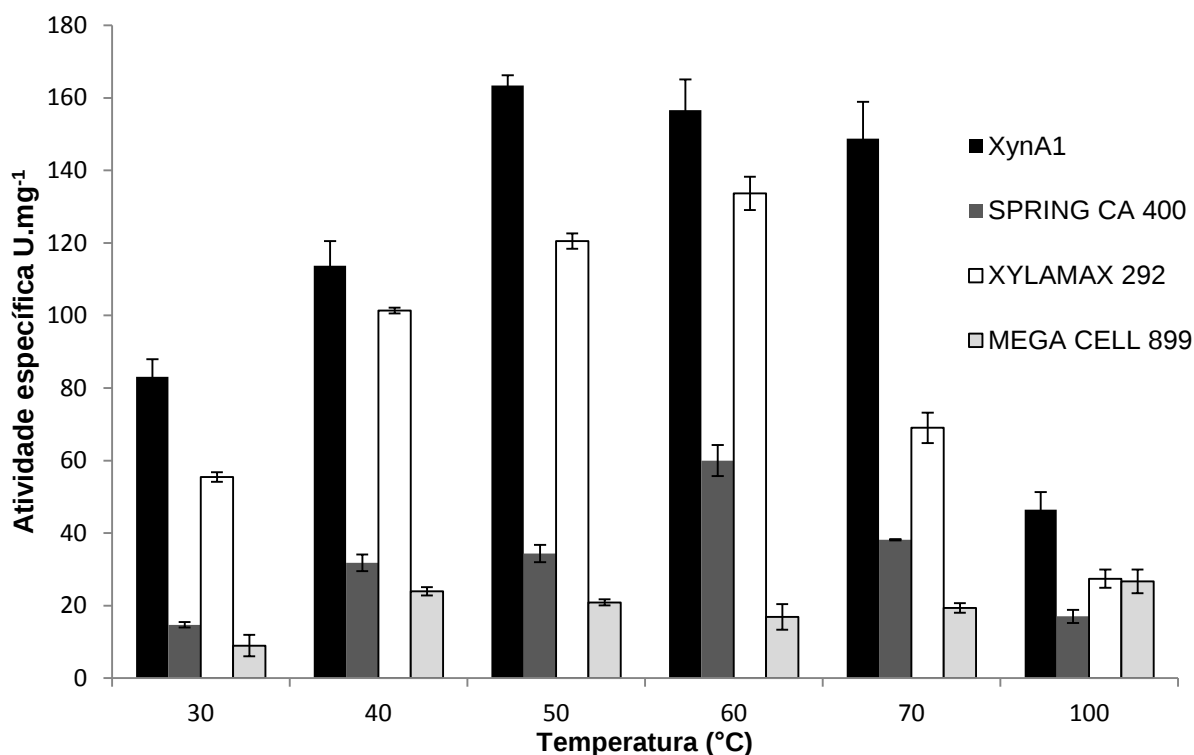


Figura 19 Comparação entre a atividade específica (U mg^{-1}) de diferentes xilanases comerciais e a enzima XynA1 de *C. crescentus*.

Nos ensaios de comparação de atividade específica, a enzima XynA1 apresentou valores mais elevados em todas as temperaturas testadas, em comparação com as xilanases comerciais. A maior atividade observada, $163,397 \text{ U mg}^{-1}$, foi na temperatura de 50°C , que coincide com a temperatura ótima da enzima, previamente determinada pelo estudo realizado por GRACIANO et al., (2015). A enzima também demonstrou níveis elevados de atividades nas temperaturas de 60, 70, 80 e 100°C , característica imprescindível para enzimas utilizadas em processos de cozimento, como é o caso dos pães.

Observando-se a Figura 17, pode-se concluir a robustez da enzima XynA1 e a sua grande amplitude de temperaturas em que possui atividade, demonstrando possuir as qualidades necessárias para uma enzima de panificação.

5.4.5. Teste para confirmação da ausência de bactérias viáveis nos extratos enzimáticos

Após o plaqueamento e incubação dos extratos enzimáticos, nos meios PYE, 30°C e LB 37°C, por 48 horas, houve a comprovação da ausência de bactérias viáveis pela ausência de qualquer crescimento bacteriano (Figura 18).

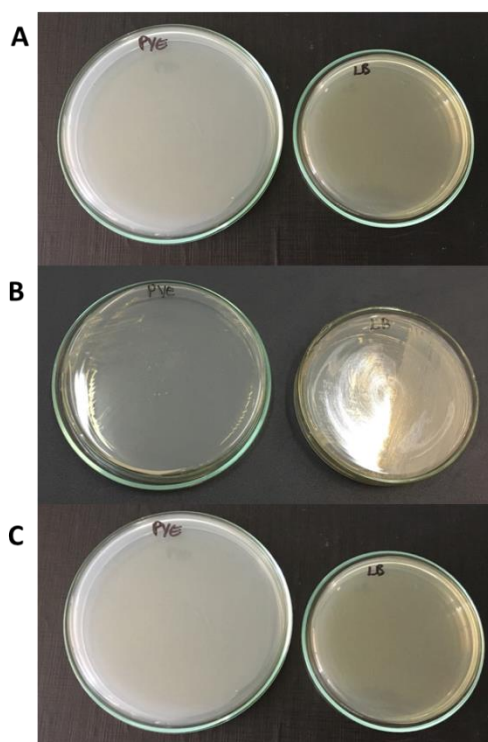


Figura 20 Teste para confirmação da esterilidade dos extratos enzimáticos. (A) Teste. (B) Controle positivo. (C) Controle negativo.

5.5 Testes de aplicabilidade do extrato enzimático em panificação

5.5.1 Tratamento enzimático na formulação do pão

O testes de panificação foram realizados em triplicata e a adição da XynA1 reduziu o tempo de batimento em 9%, além de promover um aumento, na altura final dos pães, de 18,2%, em relação ao controle, além de melhorar a formação da estrutura alveolar (Tabela 4).

As Figuras 19 e 20 mostram as imagens dos testes, após o processo de fermentação e forneamento, respectivamente. Na Tabela 4, há os valores dos tempos de batimento e as medições da altura de cada teste, após fermentação e após forneamento.

Quando a enzima XynA1 foi adicionada como coadjuvantes à panificação, obteve-se resultado semelhante ao obtido nos pães de farinha melhorada, com adição de xilanases comerciais (HILLE; SCHOONEVELD-BERGMANS, 2004). Outros trabalhos também demonstram as melhoras nas características de pães, com a adição de xilanases, porém, todos eles utilizaram enzimas comerciais (FROHBERG; QUANZ, 2008; HILHORST et al., 1999).

Tabela 4 Valores das alturas dos testes nos pães.

Parâmetros	T1	T2	T3
Tempo de batimento para obtenção do ponto de véu (min)	11	10	10
Altura após fermentação (cm)	7,9 ± 0,05	8,6 ± 0,04	9,3 ± 0,05
Altura após forneamento (cm)	8,8 ± 0,07	9,8 ± 0,08	10,4 ± 0,07

(T1) Controle sem adição de extrato enzimático. (T2) Adição de 60 mL de extrato enzimático em 1 kg de farinha. (T3) adição de 120 mL de extrato enzimático em 1 kg de farinha. Extrato enzimático com atividade de 17,220 U mL⁻¹.



Figura 21 Resultado dos testes no pão, após processo de fermentação. (T1) Controle sem adição de extrato enzimático. (T2) Adição de 60 mL de extrato enzimático em 1 kg de farinha. (T3) adição de 120 mL de extrato enzimático em 1 kg de farinha. Extrato enzimático com atividade de 17,220 U mL⁻¹.

O estudo, realizado por Jiang et al., não utiliza enzima comercial, mas sim, uma xilanase isolada do *Thermomyces lanuginosus* CAU44, utilizando técnicas onerosas de purificação enzimática (JIANG et al., 2005). No presente trabalho, utilizamos o extrato extracelular bruto (sem purificações prévias), visto que a xilanase I é secretada em preponderância em relação a outras enzimas (Figura 16) e encontra-se em elevada atividade específica no extrato, devido à superexpressão mutacional; tem-se, assim, a vantagem de não dispendir tempo e custos com metodologias complexas de purificação e isolamento enzimático.

No trabalho, realizado por Cunha et al., (2018), utilizou-se, em teste de panificação, a enzima proveniente do gene sintético *xynBS27* de *Streptomyces sp.*, o S27 clonado e expresso em *Pichia pastoris*, o qual, após purificação, foi empregado como um aditivo ao processo de panificação, promovendo uma diminuição na rigidez e melhorias no volume específico. Nos testes com tratamento enzimático do pão, utilizando o extrato bruto de *BS-xynA1*, também foram obtidos resultados semelhantes de melhoria das características dos pães.



Figura 22 Resultado dos testes no pão, após forneamento. (A) Foto dos pães inteiros; (B) Foto dos pães cortados, exatamente ao meio. (T1) Controle sem adição de extrato enzimático. (T2) Adição de 60 mL de extrato enzimático em 1 kg de farinha. (T3) adição de 120 mL de extrato enzimático em 1 kg de farinha. Extrato enzimático com atividade de 17,220 U mL⁻¹.

5.5.2 Teste em alveógrafo

As alveografias foram realizadas em estudo quintuplicado. A Figura 21 ilustra os gráficos das alveografias do teste controle e do teste com adição enzimática, respectivamente. Ao compará-los, pode-se perceber a diferença entre eles, sendo que o gráfico do teste, com adição enzimática, apresentou aumento na extensibilidade (L), redução na tenacidade (P), o que demonstra que o tratamento com a enzima favorece a formação de uma massa menos rígida e mais maleável.

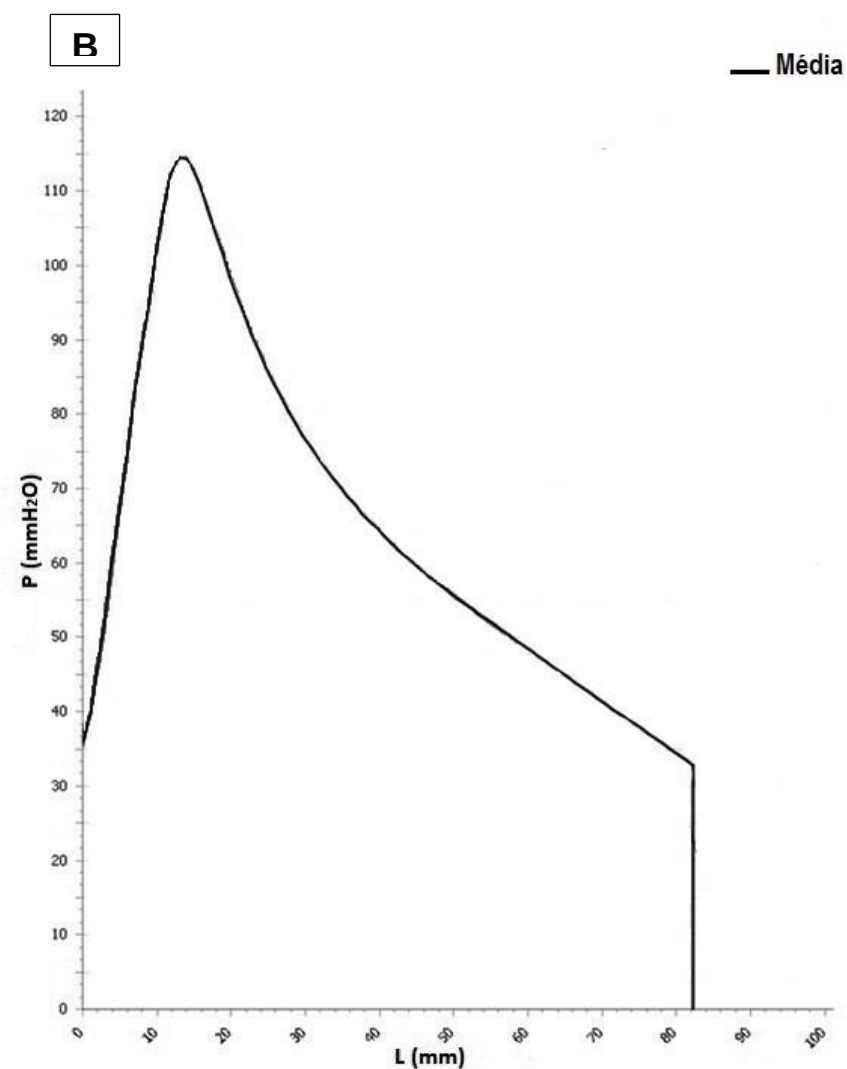
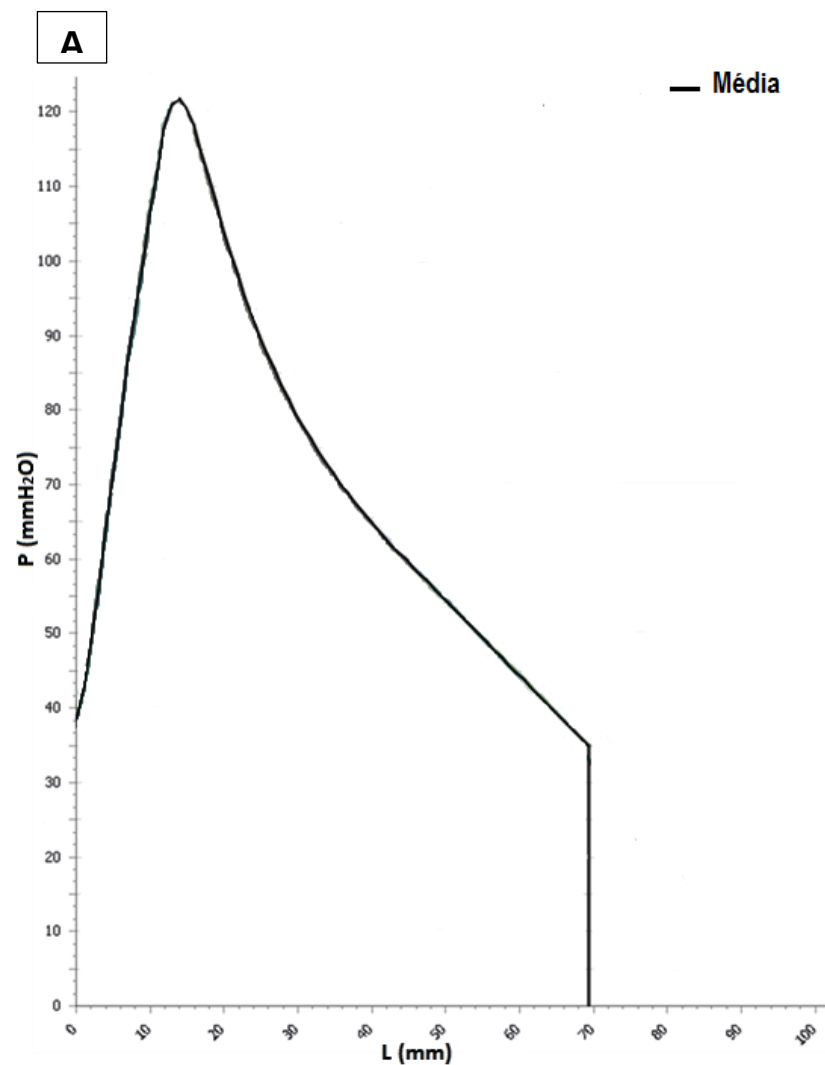


Figura 23 Resultado do teste em alveógrafo. (A) Gráfico da alveografia do teste controle. (B) Gráfico da alveografia do teste com tratamento enzimático (30 mL de extrato em 250 g de farinha). Eixo das abscissas: valores de L (extensibilidade) expresso em milímetros (mm). Eixo das ordenadas: valores de P (tenacidade) expresso em milímetros de água (mmH₂O). Média obtida do estudo quintuplicado.

A Tabela 5 mostra os resultados da Figura 21 de forma quantitativa, calculados pelo programa por meio dos gráficos das alveografias de ambos os testes.

Nos testes em alveógrafo, a adição enzimática gerou um aumento de 18,8% (de 69 mm para 82 mm) na extensibilidade (L) da massa, em comparação com o controle, o que mostra aumento na capacidade de extensão da massa, sem que ela se rompa.

A adição enzimática também gerou redução de 6,0% (de 134 mmH₂O para 126 mmH₂O) na tenacidade (P), demonstrando a queda da rigidez da massa pela ação da enzima.

O aumento da extensibilidade (L) e a redução na tenacidade (P) levaram à redução de 20,6% (de 1,94 para 1,54), no índice de tenacidade/elasticidade (P/L), em relação ao controle, resultando uma massa mais balanceada.

No teste em alveógrafo, a adição de enzima xilanase I produziu uma diminuição na pressão máxima (P) e na resistência à tração, tenacidade/extensibilidade (P/L). Isso significa que a água, libertada pela hidrólise das pentosanas insolúveis, reduziu a tenacidade da massa, assim como no estudo de Osella et al., (2013), o qual utilizou a enzima comercial, xilanase de *Bacillus subtilis*, constatando que, quanto maior a concentração de enzima, menor a consistência da massa durante a amassadura e também a melhora da qualidade dos pães, quando a xilanase foi adicionada à farinha de baixa qualidade.

Tabela 5 Resultados das alveografias.

Parâmetros gerados pelo alveógrafo	Teste controle	Teste com adição enzimática
P (tenacidade)	134 mmH ₂ O	126 mmH ₂ O
L (extensibilidade)	69 mm	82 mm
W (energia de deformação da massa)	326 10 ⁻⁴ J	353 10 ⁻⁴ J
P/L (Tenacidade/Extensibilidade)	1,94	1,54
Ie (índice de elasticidade)	53,6 %	56,4 %

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho mostraram que a xilanase I de *C. crescentus*, homologamente superexpressa e secretada no meio bacteriano extracelular, pode ser facilmente esterilizada por filtração e usada satisfatoriamente para aplicação biotecnológica na indústria de panificação. XynA1 tem clara aplicabilidade como auxiliar de processamento na indústria de panificação, devido à sua capacidade de melhorar o desempenho reológico, características da massa, aumentando o volume do pão e melhorando a estrutura alveolar. Pelo que sabemos, é a primeira vez que a xilanase I é produzida por expressão homóloga em *C. crescentus* e tem sido utilizada com sucesso na indústria de panificação.

7 REFERÊNCIAS

- BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 326–338, ago. 2001.
- BHOSALE, H. J. et al. Production of xylanase by *Streptomyces rameus* grown on agricultural wastes. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, n. 4, p. 505–512, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CAMACHO, N. A.; GUILAR, G. Production, Purification, and Characterization of a Low-Molecular-Mass Xylanase from *Aspergillus* sp. and Its Application in Baking. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 159–171, 2003.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.
- CORRÊA, J. M. et al. Expression and characterization of a GH39 β -xylosidase II from *caulobacter crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 8, p. 2218–2229, 2012.
- CORRÊA, J. M. et al. Depletion of the *xynB2* gene upregulates β -xylosidase expression in *C. crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1085–1097, 2014.
- COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 3, p. 225–243, 2002.
- CUNHA, C. C. D. Q. B. et al. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–14, 2018.
- CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 1, p. 13–41, 2010.
- ELY, B. Genetics of *Caulobacter crescentus*. In: **Methods in enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 2p. 372–384.
- EVINGER, M.; AGABIAN, N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. **Journal of Bacteriology**, v. 132, n. 1, p. 294–301, 1977.
- FATOKUN, E. N.; NWODO, U. U.; OKOH, A. I. Classical optimization of cellulase and xylanase production by a marine streptomyces species. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 6, n. 10, p. 1–14, 2016.
- FROHBERG, C.; QUANZ, M. **USE OF LINEAR POLY-ALPHA-1,4-GLUCANS AS RESISTANT STARCH** United States Patent, 2008.

GAONKAR, A. G.; MCPHERSON, A. **Ingredient interactions effects on food quality**. 2. ed. Broken Sound Parkway NW: 2006, 2006.

GRACIANO, L. et al. The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus* β -Xylosidase I. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 2879–2888, 2012.

GRACIANO, L. et al. Cloning and Expression of the xynA1 Gene Encoding a Xylanase of the GH10 Group in *Caulobacter crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3915–3929, 2015.

GRAY, J. A.; BEMILLER, J. N. Bread Staling: Molecular Basis and Control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 1–21, 2006.

HARBAK, L.; THYGESEN, H. V. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1–8, 2002.

HERBERT, D.; PHIPPS, P. J.; STRANGE, R. E. Chemical Analysis of Microbial Cells. **Methods in Microbiology**, v. 5, p. 209–344, 1971.

HILHORST, R. et al. Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 808–813, 1999.

HILLE, J. D. R.; SCHOONEVELD-BERGMANS, M. E. F. Hemicellulases and Their Synergism in Breadmaking. 2004.

HOSOI-TANABE, S. et al. Comprehensive Analysis of an Antarctic Bacterial Community with the Adaptability of Growth at Higher Temperatures than those in Antarctica. **Biocontrol Science**, v. 15, n. 2, p. 57–62, 2010.

HOTTES, A. K. et al. Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. **J Bacteriol**, v. 186, n. 5, p. 1448–1461, 2004.

JACOMINI, D. **CONSTRUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL BIOTECNOLÓGICO DO GENE xynA2 DE *Caulobacter crescentus***. [s.l.] Unioeste, 2019.

JENAL, U.; FUCHS, T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. **EMBO Journal**, v. 17, n. 19, p. 5658–5669, 1998.

JIANG, Z. Q. et al. Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 69–76, 2005.

JUTURU, V.; WU, J. C. HUA. Microbial exo-xylanases: a mini review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 81–92, 2014.

KHANDEPARKAR, R. D. S.; BHOSLE, N. B. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 732–742, 2006.

KING, B. C. et al. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference

among plant pathogenic fungi. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, p. 4, 2011.

LAUB, M. T. et al. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2144–2148, 2000.

LINKO, Y. Y.; JAVANAINEN, P.; LINKO, S. Biotechnology of bread baking. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 10, p. 339–344, 1997.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

MARKS, M. E. et al. The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 14, p. 3678–3688, 2010.

MIGUEL, A. S. M. et al. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. In: MUZZALUPO, I. (Ed.). **Food Industry**. [s.l.] InTechOpen, 2013. v. ip. 287–321.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

NIERMAN, W. C. et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 4136–4141, 2001.

OSELLA, C. et al. Effect of xylanase on the technological behaviour of wheat flours. v. 1, n. August, p. 33–39, 2013.

POINDEXTER, J. S. Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. **Bacteriological reviews**, v. 28, n. 3, p. 231–95, 1964.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PUCHART, V. et al. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 5–6, p. 355–361, 1999.

RICHMOND, J. S.; VANCOUVER, W. H. B.; RICHMOND, N. J. F. **EXPRESSION AND SECRETION OF HETEROLOGOUS POLYPEPTIDES FROM CAULOBACTER** United States Patent, 2001.

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

STEPHENS, C. et al. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 2181–2185, 2007.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39–67, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

THORSHEIM, K. et al. Chemistry of xylopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 418, p.

65–88, 2015.

ZHAOHUI, X.; LEI, Y.; PATEL, J. Bioremediation of soluble heavy metals with recombinant. **Bioengineered Bugs**, v. 1018, n. May, p. 206–212, 2010.