

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**ESTUDO DE HEMICELULASES ATRAVÉS DE RT-qPCR E
EXPRESSÃO HETERÓLOGA**

Tatiane Fernanda Leonel

Tecnóloga em Biocombustíveis

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**ESTUDO DE HEMICELULASES ATRAVÉS DE RT-qPCR E
EXPRESSÃO HETERÓLOGA**

Discente: Tatiane Fernanda Leonel

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Dra. Elisângela Soares Gomes Pepe

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária

FICHA CATALOGRÁFICA

L583e

Leonel, Tatiane Fernanda

Estudo de hemicelulases através de RT-qPCR e expressão heteróloga / Tatiane Fernanda Leonel. -- Jaboticabal, 2021
89 f. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Coorientador: Elisângela Soares Gomes Pepe

1. Manooligossacarídeos. 2. Manosidase. 3. Bagaço. 4.
Bacteroidetes. 5. RT-qPCR. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DE HEMICELULASES ATRAVÉS DE RT-qPCR E EXPRESSÃO HETERÓLOGA

AUTORA: TATIANE FERNANDA LEONEL

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

COORIENTADORA: ELISÂNGELA SOARES GOMES PEPE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dra. THAÍS CARVALHO MAESTER CASANOVA (Participação Virtual)
Ecobiotech Biotecnologia e Automação / Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. LUÍZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS (Participação Virtual)
FATEC / Ribeirão Preto/SP

Prof.ª Dr.ª JANETE APPARECIDA DESIDERIO (Participação Virtual)
Vice-Diretoria / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 07 de julho de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tatiane Fernanda Leonel - nascida na cidade de Araraquara (SP), em 8 de outubro de 1993. No ano de 2015 graduou-se em Tecnologia em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC/SP). Em agosto de 2015 iniciou o curso de mestrado através do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal), obtendo o título de mestre em agosto de 2017. Em agosto de 2017 iniciou o curso de doutorado vinculado ao mesmo Programa de Pós-Graduação. Durante o desenvolvimento da sua dissertação e tese teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“O Senhor é o meu pastor e nada me faltará”.

Salmos 23.1.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Neide Leonel e Geraldo Leonel (*in memoriam*), por terem me proporcionado o privilégio de apenas estudar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter guiado meus passos, pois devo a ele ter chegado até aqui. Aos meus pais, Neide Leonel e Geraldo Leonel (*in memoriam*), pelo amor, apoio e incentivo em todas as minhas escolhas. Por terem feito o melhor, me proporcionando o privilégio de estudar, e realizar o meu maior sonho. As minhas melhores amigas e companheiras as minhas irmãs: Ana Paula, Isabel, Queila e Èrica, seus ensinamentos valiosos enriqueceram a minha caminhada, e por terem me dado os meus maiores presentes, meus lindos sobrinhos a alegria dos meus dias: Gabriela, João Pedro e meu pequeno Samuel. À minha querida orientadora Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, que transmitiu seu conhecimento com humildade, e sempre teve uma solução para contornarmos as dificuldades, agradeço seu acolhimento em seu grupo de pesquisa, desde ao estágio até o doutorado, sou extremamente grata.

À minha grande amiga, irmã e coorientadora, Elisangela Gomes Soares Pepe pelos momentos de amizade, descontração, ajuda nos trabalhos teóricos e práticos e principalmente pelos seus ensinamentos. Ao técnico do laboratório João Carlos Campanharo por ter me ajudado. A Dr^a. Erica Mendes Lopes por ter auxiliado na etapa de anotação das sequências de β -manosidases. Aos demais professores, amigos e funcionários do departamento de Tecnologia, que tornaram meus dias de estudos e pesquisas muito mais agradáveis. Às demais pessoas que não foram citadas aqui e que colaboraram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, Câmpus Jaboticabal. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida, que possibilitou minha dedicação exclusiva. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Composição e aplicação da biomassa bacteriana	4
2.2 Aplicação dos componentes da biomassa lignocelulósica em Biorrefinarias	7
2.3 Pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos	8
2.4 Enzimas microbianas e sua aplicação Biotecnológica	9
2.5 Indução e expressão de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	10
2.6 A importância das enzimas hemicelulases	11
2.7 Utilização das enzimas manosídeses para a aplicação biotecnológica dos polissacarídeos de Manano	12
2.8 Mineração de dados Metagenômicos e Genômicos a partir de consórcios	14
2.9 Bacteriófagos	15
2.10 A Bactéria <i>Chitinophaga</i> sp. (CB10).....	16
2.11 Reação em cadeia de polimerase em Tempo Real Quantitativo (RT – qPCR)	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVOS GERAIS	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Predição dos “Polysaccharide Utilization Loci” (PUL)	19
4.2 Análise Fenética	20
4.3 Condições de cultivo para a curva de desenvolvimento bacteriano e análise de PCR tempo real quantitativa (RT-qPCR).....	20
4.4 Condições de cultivo para as análises de crescimento da bactéria CB10 em diferentes substratos	21

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	21
4.6 Análise de açúcar redutor por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	22
4.7 Experimento de PCR em tempo real (RT-qPCR) para avaliar a expressão gênica dos genes da manosidase	22
4.8 Análise de Dados do estudo de PCR em tempo real quantitativa	24
4.9 Clonagem heteróloga	25
4.9.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a Clonagem heteróloga	25
4.9.2 Clonagem da proteína recombinante	26
4.9.3 Extração e purificação da proteína recombinante	27
4.9.4 Purificação da proteína recombinante	27
4.10 Análise dos dados	28
5. RESULTADOS	28
5.1 Anotação de uma CB10 β -manosidases: GH2 convencional versus CAZymes semelhantes associadas a Pul-like	28
5.2 CB10 β -manosidase: GH2 CAZymes mais próximas de <i>Bacteroides</i> spp	29
5.3 Padrão de crescimento CB10 contra diferentes fontes de carbono	32
5.4 Expressão diferencial de bagaço versus glicose de manosidases	34
5.5 Clonagem da proteína recombinante	37
5.6 Extração e purificação da proteína recombinante	39
6.DISSCUSSÃO	41
6.1 Anotação de uma CB10 β -manosidases: GH2 convencional versus CAZymes semelhantes associadas a Pul-like	41
6.2 CB10 β -manosidase: GH2 CAZymes mais próximas de <i>Bacteroides</i> spp	42
6.3 Padrão de crescimento CB10 contra diferentes fontes de carbono	43
6.4 Expressão diferencial de manosidases em bagaço versus glicose	45
6.5 Extração e purificação da proteína recombinante	47
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICES	62
Apêndice A. Análise de integridade do RNA, avaliada utilizando o dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer	62

Apêndice B. Curvas de diluições dos genes: CB10-153.446; CB10-00347 e de referência SigmA, respectivamente.....	62
Apêndice C. Curvas de amplificação RT-qPCR.	63

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Principais componentes da biomassa lignocelulósica. Fonte: Canilha (2010).	4
Figura 2. Figura 2. (A) Representação da molécula da cadeia de celulose única com ligação glicosídica. Fonte: Santos et al. (2012), (B) 2 Estrutura da celulose com destaque para as regiões cristalina e amorfa (Fonte: adaptado Börjesson et al. (2015).	6
Figura 3. Representação da molécula da hemicelulose Fonte: Santos et al. (2012)	6
Figura 4. Figura 4. (A) Representação da molécula de lignina. Fonte: Santos et al. (2012); (B) Precursores básicos na formação da molécula de lignina. Fonte: Adaptado de Gambarato (2014).	7
Figura 5. Figura 5. Imagem mostra o sistema de utilização de polissacarídeos (PULs) pelo filo Bacteroidetes. GH, glicosídeo hidrolase; PL, polissacarídeo liase; CE, carboidrato esterase; *, família nova. Os círculos amarelos representam os monossacarídeos que formam a espinha dorsal de um polissacarídeo. As estrelas vermelhas e azuis representam diferentes grupos na cadeia lateral dos polissacarídeos. Fonte: Hao et al. (2021).....	16
Figura 6. Anotação de genes agrupados em “semelhantes a PULs” associados com CAZyme GH2 β -manosidase CB10-00347, obtido de <i>Chitinophaga</i> sp. CB10. A anotação foi realizada por meio do programa CGC-Finder. As sequências de GH2 identificadas em estudos anteriores foram anotadas usando a ferramenta dbcan2 (Zhang et al., 2018). A previsão do PUL putativo foi realizada pelo CGC-Finder (Huang et al., 2018). Os clusters de genes CAZyme (CGCs) foram anotados com base em genes de depositados relacionados (i) CAZymes usando o banco de dados CAZy (Cantarel et al., 2009); (ii) Transporter Classification (TCs) foram pesquisados contra	

TCDB (Saier et al., 2016), e Transcription Factors (TFs) pesquisados contra CollectTF (Kiliç et al., 2014), DBTBS (Sierro et al., 2008) e RegulonDB (Gama-Castro et al., 2016). A anotação para CGCs foi realizada usando a ferramenta dbcan2 (Zhang et al., 2018). Legenda: CAZyme, “Carbohydrate-Active Enzymes”; nulo, não anotado; STP, proteínas de transdução de sinal; TC, classificação do transportador; TF, fator de transcrição..... 29

Figura 7. Dendrograma fenético gerado pelo programa MEGA 5 para β -manosidases. A análise foi realizada com base na matriz de distâncias gerada a partir de um alinhamento feito pelo T-coffee, utilizando o método de otimização de agrupamento Neighbour Joining (Saitou et al., 1987). A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de bootstrap (10.000 réplicas) é mostrada ao lado dos ramos (Felsenstein et al., 1985). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades, com base na similaridade; as distâncias foram calculadas usando o método de correção de Poisson (Zuckerkindl et al., 1965) e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por local. A análise envolveu 36 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Havia um total de 330 posições no conjunto de dados final (Kumar et al., 2016). Círculo e Triângulo: respectivamente, β -manosidases CB10-153.446 e CB10-00347..... 31

Figura 8. Placas de meio de ágar BHB suplementadas com diferentes substratos (10,0 g L⁻¹), resultantes do cultivo após 96 horas, respectivamente, (A) Glicose, (B) Galactomanana (Goma de alfarroba de Ceratonia siliqua), (C) Carboximetilcelulose (CMC), (D) Aloe vera. As placas inferiores representam os tratamentos B-E corados com Vermelho Congo (1%). 32

Figura 9. Cromatogramas do perfil de açúcar detectados por CLAE-RID do meio de cultura com CB10 cultivado com galactomanana, demonstrando a degradação do polissacarídeo gerando manose (Azul), como foi evidenciado pela comparação da sobreposição do padrão de solução pura que demonstra a localização do pico de

manose (preto), que está ausente na amostra de controle (meio de cultura sem cultivo, vermelho).34

Figura 10. Curvas de crescimento bacteriano de *Chitinophaga* sp. CB10, em meio de cultura BHB sólido com bagaço de cana de açúcar por Unidade de Contagem de Colônias (UFC) e em meio de cultura BHB líquido adicionado de glicose por leitura de densidade óptica (DO₆₀₀).....36

Figura 11. Nível de expressão dos genes de β -manosídeses, respectivamente associados (CB10-00347) e não associados (CB10-153.446) a aglomerados semelhantes a PUL, calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para *Chitinophaga* sp. CB10 em meio de cultura BHB líquido com bagaço de cana-de-açúcar em relação ao controle endógeno (SigmaA) e indução enzimática negativa (glicose), nos períodos de 24; 96 e 144 horas.37

Figura 12. Construção de vetor de expressão pET28a+ β -manosídesase. A. Amplificação de fragmento β -mannosídesase (2613pb) analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Amostras: M: Marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder (Fermentas); CN Controle negativo da reação; 1: amostra amplificada com DNA polimerase não comercial e 2: amostra amplificada com DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum Taq High Fidelity - Invitrogen). B. Vetor pET28a; C. Teste de indução de expressão enzimática nas temperaturas de 30°C e 37°C (0,1mM IPTG). Amostras: M1: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; T0, células sem indução com IPTG; T2-T6 células sob indução no período de 2 horas até 6 horas.38

Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) Teste de indução de expressão enzimática nas temperaturas de 30°C nas concentrações de 0,1mM, 0,5mM e 1,0mM IPTG. Amostras: M: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; T0, células sem indução com IPTG; T2-T6 células sob indução no período de 2 horas até 6 horas. A seta preta indica aonde a banda de expressão deveria estar, em aproximadamente 100 kDa.39

Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page). Teste de indução de expressão enzimática nas temperaturas de 25°C e 37°C nas concentrações de 1,0mM IPTG. Amostras: M: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; T0, células sem indução com IPTG; T2-T6 células sob indução no período de 2 horas até 6 horas. A seta preta indica aonde a banda de expressão deveria estar, em aproximadamente 100 kDa..... 40

Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page). Testes de purificação de expressão enzimática nas temperaturas de 37°C nas concentrações de 1,0 mM IPTG. Amostras: M: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; Sendo A extratos de extração da proteína nativa sem imidazol (1º-4º frações da extração), D extratos de purificação da proteína 1º fração do extrato sem imidazol e os demais (2º ao 6º) com imidazol nas concentrações 15 mM,50 mM,100 mM,1 M, Sendo B extratos de extração da proteína nativa com imidazol com a adição de NaCl 100 mM (1º-4º frações da extração), E extratos de purificação da proteína com imidazol com a adição de NaCl 100 mM: 5 mM,10 mM,15 mM,50 mM,100 mM,1 M totalizando 6 extratos (1º ao 6º), Sendo C extratos de extração com imidazol com a adição de NaCl 200 mM (1º-4º frações da extração), F extratos de purificação da proteína com imidazol com a adição de NaCl 200 mM: 5 mM,10 mM,15 mM,50 mM,100 mM,1 M totalizando 6 extratos (1º ao 6º). A seta branca indica aonde a banda de purificação deveria estar, em aproximadamente 100 kDa. 41

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Composição da biomassa lignocelulósica por fonte	5
Tabela 2. Características dos oligonucleotídeos usados para a análise de RT-qPCR	24
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na clonagem heteróloga da ORF. CB10_153.4461 β -manosidases	26

ESTUDO DE HEMICELULASES ATRAVÉS DE RT-qPCR E EXPRESSÃO HETERÓLOGA

RESUMO - A produção de energia e de químicos renováveis a partir de resíduos agroindústrias de origens lignocelulósicas se tornou uma alternativa viável para minimizar os impactos causados pela utilização de combustíveis de origem fóssil. Porém, tal processo envolve altos custos, tendo em vista a recalcitrância da parede celular vegetal, o que dificulta a liberação de açúcares fermentáveis, fazendo-se necessário o uso de etapas de pré-tratamento e hidrólise frequentemente conduzidas em condições de concentração de reagentes químicos, temperatura e pressão elevadas, o que resultam na produção de metabólitos secundários e tóxicos indesejáveis. Assim, diversos estudos estão sendo realizados a fim de otimizar o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica, proporcionando um produto final menos oneroso e menos tóxico. Algumas enzimas de origens microbiológicas já estão sendo estudadas para serem utilizadas nessa etapa, sejam estas de função celulolítica, hemicelulolítica, lignocelulolítica ou mesmo auxiliar, porém a falta de eficiência, aliada ao alto custo de produção tem demandado a busca por novas moléculas para desconstrução da parede celular em formulações de coquetéis enzimáticos mais efetivos. Diante disto, o presente estudo teve por objetivo estudar duas hemicelulases da família GH2 de β -manosidases, obtidas por prospecção *in silico* e anotadas à partir do genoma da bactéria *Chitinophaga* sp. CB10 que foi isolada de um consórcio microbiano enriquecido a partir de uma pilha de bagaço de cana-de-açúcar. CB10 demonstrou ser uma fonte rica em carboidrases, com 350 domínios CAZyme previstos, o que pode explicar sua capacidade de se desenvolver a partir de carboidratos de diferentes complexidades estruturais: glicose, carboximetilcelulose, galactomanana, goma *Aloe vera* e bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço da cana-de-açúcar é uma fonte rica em polímeros complexos, de forma que a diversidade de metabólitos liberados pela hidrólise enzimática destes polímeros tem um papel importante para a química verde, incluindo a hidrólise por vias enzimáticas minoritárias, como é o caso da degradação de conjugados de manana. Nesse sentido, CB10 demonstrou níveis de aumento consideráveis de expressão gênica para mananases na presença de bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono, quando comparado aos níveis de expressão em glicose (controle). Estes aumentos apresentaram respectivos níveis de 4,8x para o gene CB10-00347, localizado dentro de um agrupamento gênico identificado como “Polysaccharide Utilization Loci” (PUL), e 5,6x de aumento para o gene CB10-153.446, não associado a nenhum cluster enzimático. Essas enzimas compartilharam menos do que 45% de identidade com enzimas caracterizadas do gênero *Chitinophaga* pertencente ao filo Bacteroidetes. O grau de novidade - conforme demonstrado pela baixa identidade com enzimas caracterizadas anteriormente; a notável capacidade de crescer em diferentes substratos; a confirmação de atividade de mananase, evidenciada pela liberação de oligossacarídeos residuais no cultivo com galactomanano (HPLC-RID, 12,3 mMol); associados à capacidade de expressar mananases em uma baixa concentração de condições indutoras (bagaço-de-cana contém cerca de 0,2% de manose) indicam o alto potencial para a aplicação de CB10 como fonte de enzimas na produção de oligossacarídeos conjugados de manose a partir de biomassa. Além destes resultados, grandes esforços foram empreendidos com o intuito de compreender melhor a atividade de uma das enzimas preditas para β -manosidase (ORF

CB10_153.446) utilizando ensaios de expressão heteróloga de proteína recombinante. Entretanto, apesar de diversas tentativas de otimização, não houve êxito na estratégia de expressão proteica em *E. coli* BL21 DE3, sendo necessários novos estudos para usufruir do potencial biotecnológico demonstrado pelas demais técnicas utilizadas, visando aplicação biotecnológica em biorrefinarias de precursores pré-bióticos e outros oligossacarídeos funcionais focados no indústrias alimentícias e farmacêuticas.

Palavras-chave: Manooligossacarídeos; β -manosidase, bagaço, Bacteroidetes, RT-qPCR

STUDY OF HEMICELLULASES THROUGH RT-qPCR AND HETEROLOGICAL EXPRESSION

ABSTRACT – The production of renewable energy and chemicals from agribusiness residues of lignocellulosic origins has become a viable alternative to minimize the impacts caused by the use of fossil fuels. However, this process involves high costs, in view of the recalcitrance of the plant cell wall, which hinders the release of fermentable sugars, requiring the use of pre-treatment and hydrolysis steps often carried out under conditions of concentration of chemical reagents', elevated temperature and pressure, which result in the production of undesirable secondary and toxic metabolites. Thus, several studies are being carried out in order to optimize the process of saccharification of lignocellulosic biomass, providing a less costly and less toxic final product. Some enzymes of microbiological origins are already being studied to be used at this stage, whether they have cellulolytic, hemicellulolytic, lignocellulolytic or even auxiliary functions, but the lack of efficiency, combined with the high cost of production has demanded the search for new molecules to deconstruct the cell wall in more effective enzyme cocktail formulations. Therefore, this study aimed to study two hemicellulases of the GH2 family of β -mannosidases, obtained by in silico prospection and annotated from the genome of the bacterium *Chitinophaga* sp. CB10 which was isolated from an enriched microbial consortium from a pile of sugarcane bagasse. CB10 proved to be a rich source of carbohydrates, with 350 predicted CAZyme domains, which may explain its ability to develop from carbohydrates of different structural complexities: glucose, carboxymethylcellulose, corn starch, galactomannan, Aloe vera gum and sugarcane bagasse -of sugar. Sugarcane bagasse is a rich source of complex polymers, so the diversity of metabolites released by the enzymatic hydrolysis of these polymers plays an important role in green chemistry, including hydrolysis by minor enzymatic pathways, as is the case of the degradation of mannan conjugates. In this sense, CB10 showed considerable levels of increased gene expression for mannanases in the presence of sugarcane bagasse as the only source of carbon, when compared to expression levels in glucose (control). These increases showed respective levels of 4.8x for the CB10-00347 gene, located within a gene cluster identified as "Polysaccharide Utilization Loci" (PUL), and 5.6x increase for the CB10-153.446 gene, not associated with any enzyme cluster. These enzymes shared less than 45% identity with characterized enzymes from the genus *Chitinophaga* belonging to the phylum Bacteroidetes. The degree of novelty - as demonstrated by the low identity with previously characterized enzymes; the remarkable ability to grow on different substrates; confirmation of mannanase activity, evidenced by the release of residual oligosaccharides in culture with galactomannan (HPLC-RID, 12.3 mMol); associated with the ability to express mannanases in a low concentration of inducing conditions (cane bagasse contains about 0.2% of mannose) indicate the high potential for the application of CB10 as an enzyme source in the production of oligosaccharides conjugated from mannose to from biomass. In addition to these results, great efforts were undertaken in order to better understand the activity of one of the predicted enzymes for β -mannosidase (ORF CB10_153.446) using heterologous recombinant protein expression assays. However, despite several optimization attempts, the protein expression strategy in *E. coli* BL21 DE3 was not successful, and further studies are needed to take advantage of the biotechnological potential demonstrated by the other techniques used, aiming at biotechnological application in biorefineries of prebiotic and

precursors other functional oligosaccharides focused on the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Manooligosaccharides; β -mannosidase, bagasse, Bacteroidetes, RT-qPCR

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: "Auxiliary Activities"
Bis-tris: 2,2-Bis(hidroximetil)-2',2"-nitrilotrietanol
CBM: "Carbohydrate-Binding Module"
CO₂: gás carbônico
CEs: "Carbohydrate Esterases"
DNA: ácido desoxirribonucleico
DO: densidade óptica
EC: "Enzyme Commission"
GHs: "Glycoside Hydrolases"
GTs: "glycosyltransferases"
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa: kilodaltons
LB: Luria Bertani
M: molar
mg: miligrama
mM: millimolar
mw: massa molecular
NCBI: "National Center for Biotechnology Information"
ORF: Open Reading Frame
p/v: peso por volume
pb: pares de bases
PCR: reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico - log [H⁺]
PLs: Polysaccharide Lyases
pI: ponto isoelétrico
pKa: constante de ionização
pNP: p-nitrofenol
RNA: ácido ribonucleico
rpm: rotações por minuto
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-Page: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato
TE: Tampão de extração
Tris: tris[hidroximetil]aminometano
μg: micrograma
μL: microlitro
v/v: volume por volume
BAG: Bagaço de cana de açúcar
GLI: Glicose
ALO: Aloe vera
CMC: Carboximetilcelulase

1. INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de biomassas são descartadas na natureza ou eliminadas por queimas causando grande impacto ambiental, no entanto, substratos lignocelulósicos podem ser utilizados na obtenção de produtos secundários com alto valor agregado (Taha et al., 2016).

Resíduos agroindustriais ricos em lignocelulose como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, palha, casca e farelo de cereais, possuem a fração hemicelulósica composta principalmente por xilana, heteropolissacarídeo formado por monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, além de ramificações contendo arabinose, galactose, manose, glicose e ácidos urônicos. Esses polissacarídeos são denominados xiloglicanos, xilanas, mananas, galactomananas, glicomananas, galactoglicomananas e glicanos β -(1-3, 1-4). A manose é abundante em muitos tecidos vegetais e resíduos lignocelulósicos, sendo encontrada nas plantas como reserva de carboidratos sem amido. Contudo, o conteúdo de manose, não é muito significativo em bagaço de cana (0,2%) quando comparado aos teores de xilana (24,7%) ou mesmo arabinano (1,6%). Além do conteúdo reduzido de D-manose, o bagaço apresenta ainda pequenos traços de outros açúcares como L-ramnose e D-galactose associados a xilana (Brienzo, et al., 2016; Martin C, et al., 2017). A prevalência de alguns tipos de açúcares pode levar à uma visão simplista de que as vias minoritárias, como as envolvidas na degradação de manose na biomassa da cana-de-açúcar, podem ser negligenciadas pois oligossacarídeos de diferentes complexidades podem ser obtidos através da biorrefinaria, com o auxílio de enzimas específicas (Moreira, L. R. 2008; Ishii et al., 2016).

As principais enzimas envolvidas na hidrólise e liberação de oligossacarídeos de diferentes tipos de polímeros de manose são chamados coletivamente de mananases. Dentre estas, algumas atuam com atividade “endo” específica, ou seja, atuam no interior da cadeia polissacarídica e são denominadas “1,4- β -D manan manno-hidrolase” (ou β -mananase, E.C 3.2.1.78). Outras, por sua vez, possuem atividade “exo” específica (atuando nas extremidades da cadeia), e são denominadas “1,4- β -D-manopiranosídeo” (ou β -manosidase, E.C 3.2.1.25). Além destas, outras enzimas, como por exemplo β -glucosidase (1,4- β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.1.21), atuam de forma auxiliar no processo de sacarificação de oligossacarídeos conjugados

de manose liberados ao longo da clivagem da cadeia principal (Moreira, L. R. 2008; Malgas S., 2015).

Entre essas enzimas, a β -manosidase tem um papel essencial no processamento de oligossacarídeos por agir atacando as extremidades terminais na extremidade não redutora, bem como clivando a manobiose em unidades de manose. As β -manosidases são produzidas por vários organismos, como plantas, animais, fungos e bactérias (Dhawan, S. e Kaur, J. 2007). Por outro lado, o uso da biomassa lignocelulósica têm demonstrado notável potencial para produção de oligossacarídeos como celo-oligossacarídeos (COS), pecto-oligossacarídeos (POS), xilo-oligossacarídeos (XOS), principalmente devido à simplicidade do processo (Amorim et al., 2019a; Cano et al., 2020). Apesar disso, ainda são poucos os relatos na literatura que exploram a produção de oligossacarídeos em cultivos microbianos, como por exemplo a obtenção de XOS através da obtenção conjunta de oligômeros e enzimas xilanolíticas no meio fermentado ou a otimização das condições de cultivo para a recuperação de XOS (Gautério et al., 2018; Menezes; Rossi; Ayub, 2017; Pereira et al., 2018). Considerando que oligossacarídeos como XOS e COS derivam de componentes majoritários na biomassa e ainda são pouco explorados, ainda mais é desconhecido o universo das rotas bioquímicas de oligossacarídeos minoritários como os oligossacarídeos de manose, que podem gerar compostos ainda mais singulares para aplicação biotecnológica.

Apesar das β -manosidases possuírem diversas aplicações promissoras na indústria em diversos setores como alimentos, detergentes, combustíveis, rações, indústrias de papel e celulose, agente protetor, entre outros, são ainda relativamente pouco exploradas quando comparadas às outras carboidrases, como celulasas e xilanases. As enzimas mananases microbianas podem atuar em uma ampla faixa de pH (3-7,5) e temperatura (45-92°C), o que é altamente desejável para várias aplicações industriais, e tem despertado grande interesse dos pesquisadores por ser uma alternativa viável e eficaz para o uso em grande escala uma vez sejam otimizados os custos e processos de produção (Moreira, L. R. 2008; Costa DAL, Filho EXF. 2019).

Considerando o grande potencial para a aplicação das enzimas mananases, e a importância da busca por novas enzimas que possam ser aplicadas em processos biotecnológicos com custo mais acessíveis, o presente trabalho teve por objetivo

estudar duas β -manosídeses anotadas no genoma de uma bactéria pertencente ao filo Bacteroidetes, *Chitinophaga* sp. CB10 (Kishi et al., 2017), que foi isolada em estudos anteriores de um consórcio microbiano proveniente de uma pilha de bagaço de cana-de-açúcar (Constancio et al., 2020). Este gênero é conhecido por sua extensa capacidade de degradação enzimática de materiais polissacarídeos complexos, atuando na ciclagem de carbono em seu ambiente natural.

As análises de anotação subsequente de seu genoma parcial permitiram a identificação de 350 domínios CAZyme envolvidos na degradação de biomassa: 202 GHs, 77 GTs, 44 CEs, 33 CBM, 16 PL e 7 AA. Mais das 30 Vias de utilização de polissacarídeos “Polysaccharide Utilization Loci” (PULs) foram identificadas para este genoma e 27% de suas GHs anotados foram encontradas em clusters semelhantes a PUL (Funnicelli, 2018, dados não publicados). O sistema PUL são agrupamentos gênicos peculiares a este filo, especializado na degradação efetiva de diferentes carboidratos incluindo o uso de degradação de polissacarídeo (Kong, Xiang-Kun et al., 2019).

Assim, este estudo abrange a expressão em tempo real no bagaço de cana de açúcar de duas β - manosídeses pertencentes à família GH2 prospectadas e submetidas a anotação funcional por homologia do genoma de CB10. O objetivo principal do trabalho foi fornecer descobertas teóricas e práticas que contribuam para a elucidação do funcionamento da maquinária genética desta bactéria na degradação de manano, reforçando a sua capacidade de degradação e os benefícios da aplicação dessas enzimas na desconstrução da biomassa vegetal, ainda que em situações em que o teor de manana seja muito baixo, como é o caso do bagaço da cana.

2. REVISÃO LITERATURA

2.1. Composição e aplicação da Biomassa lignocelulósica

Grandes quantidades de materiais lignocelulósicos são gerados no mundo anualmente, muitas das quais tidas como resíduos da produção agroindustrial. O interesse pelo aproveitamento eficiente dos compostos presentes na biomassa lignocelulósica tem crescido nos últimos anos, pois o processamento destes materiais gera subprodutos com alto valor agregado (Santos et al., 2012).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%), e lignina (5-30%) (Zhang et al., 2004; Zheng et al., 2017). Na Figura 1 observa-se um corte transversal da parede de uma célula vegetal, na qual podemos observar a celulose, se apresentando em feixes, envolta pela hemicelulose. A estrutura tridimensional do material é gerada pela conexão entre a lignina e a hemicelulose.

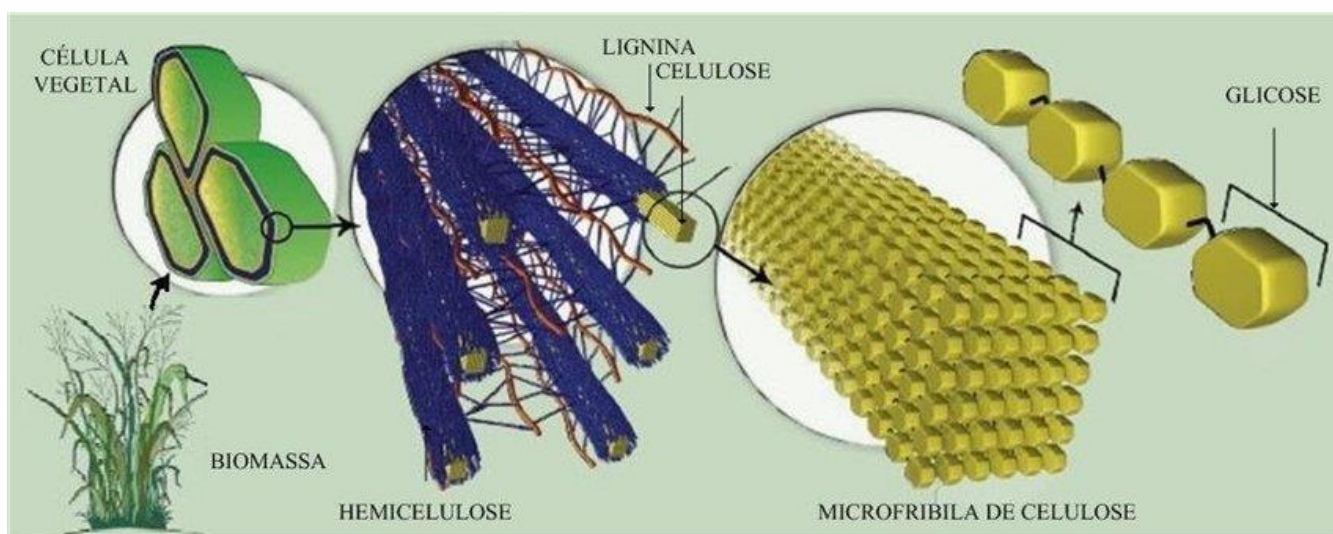


Figura 1. Principais componentes da biomassa lignocelulósica. Fonte: Canilha (2010).

A composição da fonte de biomassa lignocelulósica, depende de diversos fatores como o tipo de vegetal, as condições de crescimento, tempo de colheita, entre outros (Silva et al., 2010). Na Tabela 1, apresenta-se um comparativo da composição de celulose, hemicelulose e lignina de acordo com a fonte de biomassa.

Tabela 1. Composição da biomassa lignocelulósica por fonte

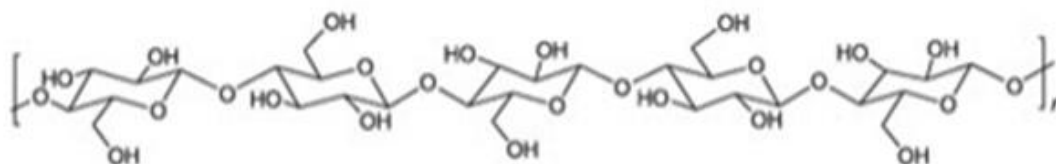
Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

Atualmente, a biomassa lignocelulósica representa a maior fonte de carboidratos naturais do planeta, sendo que a maior dificuldade de aproveitar tal recurso para a produção de químicos e outros produtos de alto valor agregado são suas características morfológicas e químicas que conferem resistência a sua hidrólise em compostos menores utilizáveis (Santos et al., 2012; Santos et al., 2019).

A celulose é um dos principais polímeros naturais, abundantes, renováveis e amplamente utilizados e se encontra em maior proporção independente da origem da biomassa, como mostra a Tabela 1, constituída de monômeros de glicose ligados por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 2 - A) (Pérez et al., 2002; Zhang et al., 2004). Possui em sua estrutura regiões altamente ordenadas e cristalinas que são insolúveis e resistentes à degradação química e enzimática, além de regiões amorfas com estrutura desorganizada como pode ser visto na Figura 2 (B), (Silva et al., 2009; Horn et al., 2012). A celulose de fontes vegetais tem sido convencionalmente empregada para a produção de papel e na indústria têxtil, com notável valorização comercial.

A



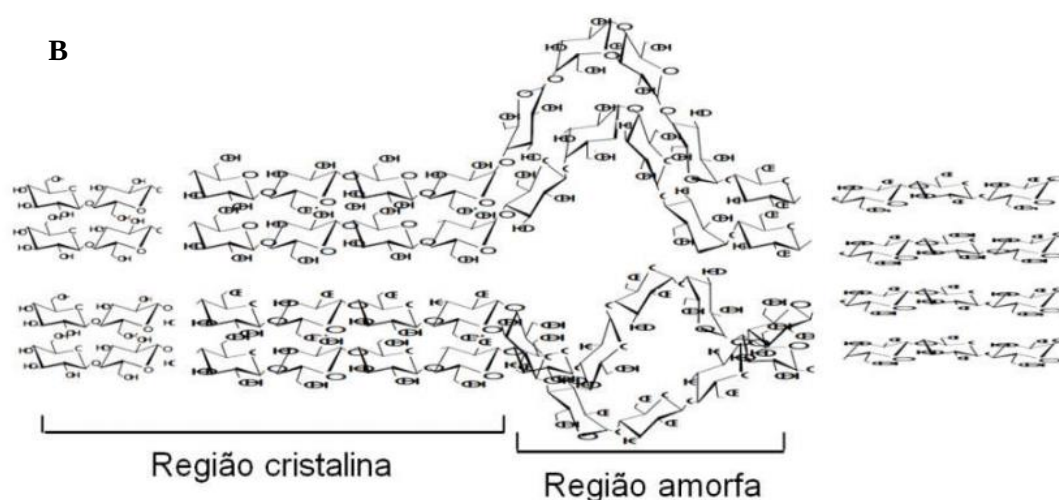


Figura 2. (A) Representação da molécula da cadeia de celulose única com ligação glicosídica. Fonte: Santos et al. (2012), 2. (B) Estrutura da celulose com destaque para as regiões cristalina e amorfa. Fonte: Adaptado Börjesson et al. (2015).

O segundo polímero em maior concentração após a celulose é a hemicelulose (Tabela 1), composta de polissacarídeos polimerizados, como D-xilose, D-glucose, D-galactose, D-manose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. A hemicelulose possui uma estrutura ramificada (Figura 3), entrelaçada à celulose (Figura 1), o que confere estabilidade e recalcitrância à biomassa lignocelulósica (Santos et al., 2012; Wang et al., 2014; Zheng et al., 2017).

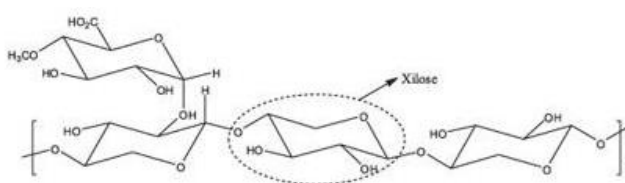


Figura 3. Representação da molécula da hemicelulose. Fonte: Santos et al. (2012).

A hidrólise da hemicelulose resulta em uma mistura de xilose e outros monossacarídeos, como arabinose, glicose, manose e ácidos urônicos, dependendo da fonte vegetal extraída (Uday et al., 2016).

O terceiro composto da biomassa lignocelulósica é a lignina, e a estrutura da lignina não é homogênea, sendo que sua composição varia de acordo com sua fonte de biomassa (Santos et al., 2012) (Tabela 1), podendo representar uma fração de 5-

30% da biomassa lignocelulósica (Zhang et al., 2004). Sua composição é definida como uma substância hidrofóbica com estrutura tridimensional e amorfa altamente ramificada (Figura 4 - A) (Silva et al., 2011). O mecanismo de síntese da lignina se dá a partir de três precursores monoméricos: o álcool coniferílico, álcool sinapílico e o álcool *p*-cumarílico (Leite, 2016), como está representado na Figura 4 (B). A lignina possui diversas aplicações para a produção de produtos com potencial valor, como fibra de carbono, plásticos de engenharia, elastômeros termoplásticos, espumas poliméricas, membranas e uma variedade de produtos químicos aromáticos (Ragauskas et al., 2014; Petridis e Smith 2018).

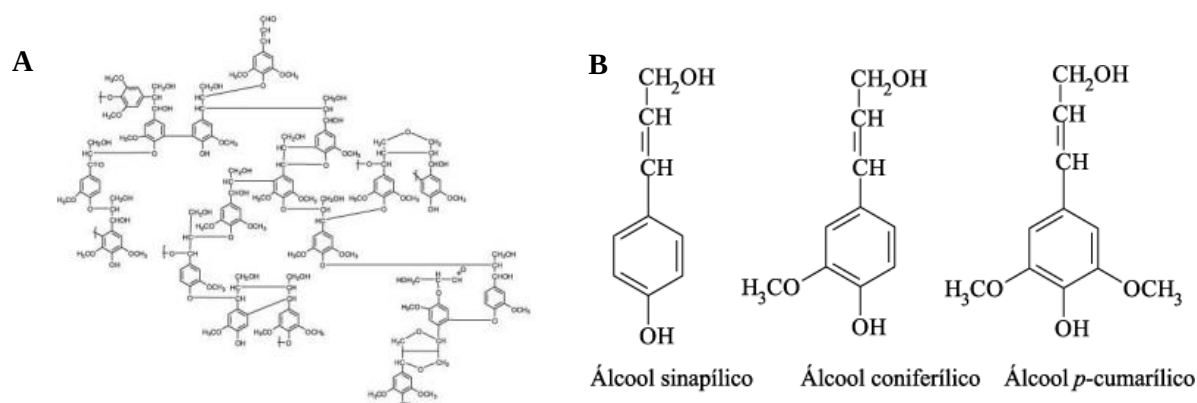


Figura 4. (A) Representação da molécula de lignina. Fonte: Santos et al. (2012); (B) Precursores básicos na formação da molécula de lignina. Fonte: Adaptado de Gambarato (2014).

2.2. Aplicação dos componentes da biomassa lignocelulósica em Biorrefinarias

A busca por fontes alternativas de energia que substituam parcialmente ou totalmente os combustíveis fósseis cresce significativamente, visto que a demanda energética tem aumentado. Fontes renováveis tidas como resíduos que seriam descartados apresentam um grande potencial para atender aos desafios da sustentabilidade, pois é um material rico em carbono. A biomassa é abundante, barata e facilmente encontrada, seu aproveitamento permite a coprodução de combustíveis, compostos químicos, eletricidade e calor. Neste contexto, surge o conceito de biorrefinaria, que é um complexo industrial similar a uma refinaria de petroquímica, onde utiliza como matéria prima principal a biomassa lignocelulósica, explorando

todos os compostos disponíveis e diversos produtos químicos de alto valor agregado, dentre estes biofármacos, insumos químicos, alimentos e ração animal (Kamm et al., 2006; Takkellapati et al., 2018; Seghetta et al., 2016).

Diferentes tipos de resíduos pós colheitas podem ser utilizados como matéria-prima, entre eles estão: palha (trigo, arroz), caules (caroço de algodão) e bagaço (cana-de-açúcar, sorgo doce) (Kamm et al., 2006). O Brasil se destaca quando comparado com os demais países, isto porque possui grande disponibilidades de culturas agrícolas de grande extensão, com destaque para a indústria canavieira, e sua composição favorece a produção de diversificados produtos. A composição da biomassa de cana-de-açúcar favorece a produção etanol de segunda geração, butanol, 1,4-diácidos, ácido aspártico, ácido glutâmico, carvão ativado, lactato de etila, ácido láctico, ácido succínico, xilitol, xilo-oligossacarídeos, furfural, glicerol, sorbitol, dentre outros (Irmak, 2017). No entanto, ainda é necessário a otimização do processo para que se tenha um completo aproveitamento.

2.3. Pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos

Para que os materiais lignocelulósicos sejam utilizados como matérias primas para a produção de etanol de segunda geração e de outras substâncias químicas, é necessário que seus componentes sejam separados através da etapa de pré-tratamento, que tem como objetivo desorganizar o complexo lignocelulósico (Ramos 2015). Para que ocorra a hidrólise eficiente da celulose em seus respectivos açúcares monoméricos (Agbor et al., 2011). Os pré-tratamentos podem ser físicos (explosão de vapor e explosão de fibra de amônia), físico-mecânicos (moagem), físico-químicos (pré-tratamento ácido, pré-tratamento alcalino, métodos oxidativos e métodos orgânico solvente), biológicos (bactéria ou levedura) ou a combinação desses métodos (Kumar et al., 2009; Singh et al., 2015). Vários fatores podem influenciar a hidrólise da celulose, que incluem a porosidade do material de biomassa, cristalinidade da celulose e o conteúdo de hemicelulose e lignina, acessibilidade da enzima e/ou ácido em atingir a celulose (Mcmillan 1994). Alguns tipos de pré-tratamentos, utilizando biomoléculas presentes no metabolismo microbiano, possuem

grande benefícios, devido a sua alta especificidade pelos substratos, maior eficiência catalítica, boa relação, custo benefício (Nnolim; Okoh; Nwodo, 2020).

2.4. Enzimas microbianas e sua aplicação Biotecnológica

A conversão enzimática de polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica é uma das rotas tecnológicas mais promissoras para a obtenção de bioprodutos de interesse econômico e biocombustível de segunda geração (2G) (Soccol et al., 2017; Farinas, 2018). Contudo, para que o processo seja economicamente viável, é importante o incentivo do estudo de novas enzimas para que se possa obter coquetéis enzimáticos eficientes a custos mais acessíveis para a aplicação em grande escala. As enzimas microbianas podem ser obtidas de microrganismos de diferentes ecossistemas naturais: solos, resíduos agroindustriais e materiais em decomposição. Os microrganismos (bactérias e fungos) possuem em seus genomas diferentes enzimas extracelulares, como lacases, peroxidases, celulases e hemicelulases, que atuam de forma sinérgica para aumentar a hidrólise da biomassa de lignocelulose. Estas enzimas desempenham um importante papel nas indústrias biotecnológicas porque são mais estáveis do que as enzimas obtidas de vegetais e animais (Lepcha et al., 2018).

As técnicas de produção de enzimas microbianas por expressão heteróloga, possuem muitas vantagens econômicas quando bem-sucedidas pois podem ser produzidas em um curto período de tempo e espaço devido à sua alta consistência, sendo que a modificação e otimização do processo podem ser feitas por meio de técnicas de fermentação (Gurung et al., 2013).

Já é conhecido que algumas espécies de fungos e bactérias possuem em seu metabolismo complexos enzimáticos ligno(hemi)celulolítico (Hansen et al., 2015; Cunha et al., 2016; Naidu; Siddiqui e Idris, 2020). Os principais gêneros que possuem enzimas aplicadas em diversos campos da biotecnologia são: *Aspergillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma* e *Lactobacillus* (Singh et al., 2016). Nesse sentido, diversos estudos têm buscado identificar novas espécies microbianas produtoras de ligninases, celulases e hemicelulases para potencializar a degradação da lignocelulose e melhorar os rendimentos em monossacarídeos (De Cassia Pereira et

al., 2015; Marques et al., 2018; Pereira Scarpa et al., 2019). Entretanto, grande parte desses estudos têm sido realizados por meio do cultivo de microrganismos isolados para a produção de enzimas. Como alternativa, consórcios microbianos de diferentes fontes, podem ser utilizados para se obter extratos enzimáticos mais eficientes e com poder sinérgico superior (Copete-Pertuz et al., 2019; De Oliveira Rodrigues et al., 2020).

2.5. Indução e expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

A tecnologia do DNA recombinante surgiu no início dos anos de 1970, ela é decorrente de uma série de descobertas extremamente importantes que ocorreram anteriormente (Azevedo, 2008). Com o avanço da biologia molecular, vários sistemas de expressão vêm sendo utilizados para a produção de proteínas heterólogas (Aizemberg et al., 2011).

Bactérias e fungos constituem sistemas tradicionais e bem sucedidos que frequentemente são utilizados para a obtenção de enzimas, eles apresentam vantagens, tais como, genomas bem caracterizados fáceis de manipular, cultivo simples e barato em comparação com células de mamíferos (Gasser; Mattanovich, 2007; Aizemberg et al., 2011).

A bactéria *Escherichia coli* foi a primeira a ser utilizada para produção de enzimas com aplicações farmacêuticas devido seu sistema possuir muitos benefícios, como descrito acima (Swartz, 2001; Baneyx, 1999). No entanto, seu sistema de expressão também apresenta algumas desvantagens, que incluem a produção de proteases que podem danificar a proteína exógena; incapacidade da *E. coli* em realizar as modificações pós-tradução, como a glicosilação necessárias em algumas proteínas de eucariotos; deficiência em realizar outras modificações necessárias para a montagem de proteínas mais complexas, como é o caso de coprodução de chaperonas, etc. O dobramento incorreto da proteína heteróloga expressa, pode resultar na formação de agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão. A maioria das proteínas produzidas por essa bactéria estão na forma de corpúsculo de inclusão, devido a pequena quantidade de chaperonas no citoplasma (Yuan, 2002).

Tais deficiências podem comprometer a atividade de algumas proteínas ou mesmo inviabilizar a expressão heteróloga por questões como toxicidade ou incompatibilidade de preferência por códons de uso raro (Huang; Lian Yang, 2012).

Algumas estratégias genéticas têm sido utilizadas a fim de solucionar estes problemas durante mais de duas décadas, visando melhorar os bioprocessos bacterianos e simplificar os procedimentos de recuperação de proteínas, que incluem o projeto de vetores de expressão eficientes, melhoria das cepas de produção, deleção de genes de proteases, retirada de stop códons, retirada de peptídeos sinais (Jonasson et al., 2002). Outras modificações que contribuem para a expressão de uma proteína é a alteração nas condições de cultivos como, concentração ideal de oxigênio, pH, indutor e temperatura (Yee e Blanch 1992).

Apesar do grande conhecimento adquirido isto não é o suficiente para garantir um sistema eficiente de expressão para todas as proteínas recombinantes, já que cada uma delas pode apresentar diferentes problemas, esses devem ser otimizados com constantes ajustes nas metodologias que são baseadas em abordagens de tentativa-erro (Bustamante Filho, 2010).

2.6. A importância das enzimas hemicelulases

Como o próprio nome sugere, as hemicelulases formam um importante grupo de enzimas que hidrolisam hemicelulose (Shallom e Shoham, 2003). A hemicelulose é composta por uma variedade de heteropolissacarídeos, possuem na composição de suas cadeias diversos tipos de açúcares, como por exemplo: pentoses (β -D-xilose; α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose; β -D-glicose; α -D-galactose) e ácidos (4-ácido metil glucurônico; α -D-galacturônico). A heterogeneidade da composição da biomassa faz com que seja necessário a ação sinérgica de várias enzimas durante o processo de hidrólise desses polissacarídeos, como endoxilanasas, xilosidasas, arabinofuranosidasas, endomananasas e manosidasas, dentre outras (Canilha et al., 2012). A hidrólise da biomassa lignocelulósica utilizando o pré-tratamento enzimático tem sido visto como mais vantajoso do que outras técnicas, como por exemplo a utilização de ácidos concentrados que pode causar toxicidade durante o processo, corrosão de equipamentos e formação de inibidores (compostos furânicos e ácidos

orgânicos de cadeia curta) exigindo um maior controle do método (Mood et al., 2013; Silveira et al., 2018). O pré tratamento alcalino, por sua vez, são mais indicados para a remoção de lignina (Mood et al., 2013; Rabelo et al., 2014; Rodrigues et al., 2017), promovem alterações na estrutura da celulose, principalmente na cristalinidade, na distribuição das regiões cristalinas e amorfa, além de uma despolimerização parcial, dependendo do substrato, da temperatura aplicada e da concentração alcalina (Xu; Sun, 2016).

Em vista da otimização do processo de utilização da biomassa lignocelulósica, os coquetéis enzimáticos contendo misturas de ligninases, celulasas e hemicelulasas produzidos por culturas mistas de microrganismos podem favorecer a degradação mais eficiente e maximizar a liberação de açúcares (Ferreira et al., 2016; Yang et al., 2004), o processo requer menos energia e condições de reação amenas e não gera inibidores se a desacetilação da biomassa for realizada previamente (Brummer et al., 2014; Mohnot et al., 2016).

2.7. Utilização das enzimas manosidases para a aplicação biotecnológica dos polissacarídeos de Manano

O manano é um dos principais componentes da hemicelulose, sua principal função é atuar como reserva de carboidratos no endosperma das plantas. Sua estrutura química é subdividida em manano puro, glucomanano, galactomanano e galactoglucomanano (Bremner e Wilkie 1971; Chauhan et al., 2014b). As mananas e galactomananas puras são encontradas em algas e nas sementes de plantas como coco e café verde (Cerveró et al., 2010). Glucomananos encontram-se presentes principalmente na parede celular de madeiras duras, enquanto que o galactoglucomanano está presente junto com xilano em madeiras macias (Chauhan et al., 2012).

Para a hidrólise completa do manano é necessário a ação sinérgica das enzimas chamadas comumente de manosidases, que atuam quebrando as ligações β -1,4. Essas enzimas são classificadas em diferentes famílias de glicosil hidrolases (GHs) e, com base no seu modo de ação, podem ser encontradas em dois grupos: endo-hidrolases que clivam ligações glicosídicas localizadas dentro de uma molécula

e exo-hidrolases responsáveis por quebrar ligações glicosídicas terminais não redutoras (Henrissat e Davies 1997). Ambas as endo e exo - β -mananases atuam liberando mano-oligômeros com seus respectivos modos de ação, como descrito acima (Chauhan et al., 2012, 2014b, 2014c; Malgas et al., 2015).

Recentemente houve um aumento significativo do interesse de aplicação das manosidases na produção de mano-oligossacarídeos, pois estes açúcares possuem diversas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias e farmacêutica. Algumas destas aplicações podem ser enumeradas como: prebióticos para melhorar a saúde humana e animal (Rahmani et al., 2017); suplementação de ração animal (Odetallah et al., 2002); utilização na indústria de papel (Suurnäkki et al., 1997); para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos junto com outras enzimas na sacarificação industrial da hemicelulose para a conversão de biomassa em bioenergia (Sun e Cheng 2002; Ademark et al., 1999). Como já mencionado, para que a conversão desses polímeros em monossacarídeos seja eficiente, é necessário a atuação de outras enzimas além da manosidases, como galactosidases, glucosidases e acetil esterases (Chauhan et al., 2012). Entretanto, as β -manosidases são essenciais para que o manano seja hidrolisado completamente (Reddy et al., 2013). Assim, uma vez que as manosidases convertem manano em mano-oligossacarídeos, elas têm importantes aplicações biotecnológicas onde a degradação completa do manano é necessária.

2.8. Mineração de dados Metagenômicos e Genômicos a partir de consórcios

Os dados obtidos de análises genômicas e metagenômicas a partir de amostras complexas, tais como consórcios microbianos, possuem grande potencial biotecnológico. Estes dados submetidos às análises por ferramentas de bioinformática permitem a descoberta de novas enzimas com potencial de aplicação em diversas áreas de interesse industrial, tais como biocombustíveis e biorrefinaria de químicos de alto valor agregado a partir de biomassa (Rosnow et al., 2017). Com isso, essa ferramenta permite explorar enzimas de consórcios microbianos isolados dos mais diferentes ambientes tais como, resíduos de árvores, resíduos de palha de milho e de cana-de-açúcar (Xie et al., 2014; Kishi et al., 2017; Larsbrink, Johan et al., 2017).

Recentemente, em um trabalho publicado por Zhu et al. (2016) e colaboradores, após uma análise metagenômica e metaproteômica de um consórcio microbiano de palha de milho denotou-se a importância de alguns filos bacterianos: Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, nos quais foi possível identificar um vasto arsenal de Glicosil hidrolases (GHs) para a desconstrução de material de origem lignocelulósica. Interessantemente, cada um destes filos considerados prevalentes estava associado a um nicho metabólico específico dentro do consórcio de palha de milho, o que revela a importância de trabalhar com isolados provenientes de consórcios.

Outro trabalho recentemente publicado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), Constancio et al. (2020) e colaboradores, analisaram dois consórcios de bactérias celulolíticas, o primeiro SCS obtido de amostras de solo de campo de cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e o segundo SCB proveniente de um depósito de bagaço de cana-de-açúcar em uma usina de etanol. Ambos os consórcios liberaram grandes quantidades de glicose durante o cultivo e foram capazes de se desenvolver quando avaliadas diferentes fontes de carbono no meio de cultivo. Também foi detectado em ambos os cultivos enzimas de interesse industrial como celulasas, amilases, lipases e proteases. Os resultados mostraram que ambos os consórcios foram capazes de degradar celulose, e que eles eram uma fonte eficiente de produção de enzimas, o que proporcionaria uma nova escolha para uso em diferentes aplicações biotecnológicas.

2.9. Bacteroidetes

Membros do filo Gram-negativo Bacteroidetes estão espalhados por diversos nichos ecológicos, incluindo habitats marinhos, de água doce e terrestres, e são notavelmente abundantes na microbiota do canal alimentar (Martens et al., 2011; White et al., 2014). A capacidade de quebra e utilização de polissacarídeos empregada por bactérias deste filo está intimamente relacionada com “Polysaccharide Utilization Loci” (PULs), os quais são agrupamentos gênicos que agem sinergicamente no reconhecimento, ligação, hidrólise e utilização de polissacarídeos, um termo utilizado pela primeira vez por Bjursell, Martens e Gordon et al. (2006) para descrever grupos de genes reguladores que estão envolvidos no processo de detecção, sequestro, digestão enzimática e transporte de complexo de carboidratos. PULs codificam um complemento de proteínas de ligação ao glicano da superfície celular (SGBPs), transportadores dependentes de TonB (TBDTs), CAZymes (mais frequentemente GHs, mas também PLs e CEs onde necessita de substrato específico) e sensores de carboidratos/reguladores transcricionais (Figura 5). A complexidade de PULs muitas vezes está relacionada com a especificidade dos substratos e pode incluir enzimas auxiliares, como proteases sulfatases e fosfatases (Foley et al., 2016; Hamaker et al. 2014; Martens et al., 2014; Renzi et al., 2015). Esses sistemas constituem a principal estratégia de aquisição de nutrientes implantada pelo filo Bacteroidetes e, portanto, estão intrinsecamente ligados à colonização de nichos nutricionais e ao estabelecimento de ecossistemas microbiano.

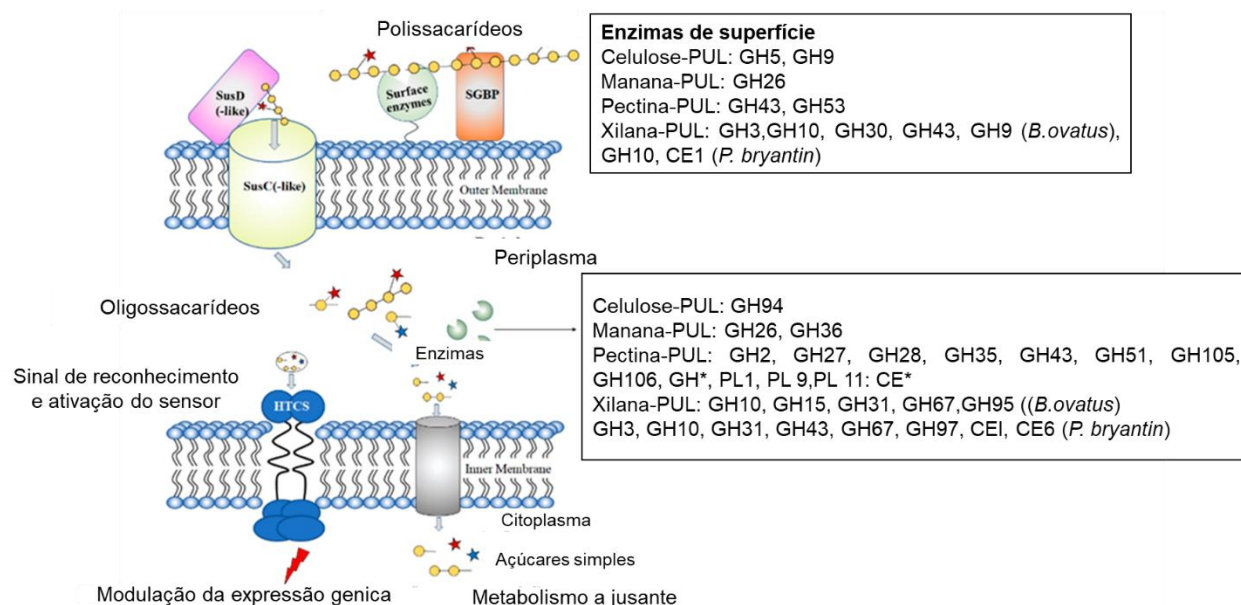


Figura 5. Imagem mostra o sistema de utilização de polissacarídeos (PULs) pelo filo Bacteroidetes. GH, glicosídeo hidrolase; PL, polissacarídeo liase; CE, carboidrato esterase; *, família nova. Os círculos amarelos representam os monossacarídeos que formam a espinha dorsal de um polissacarídeo. As estrelas vermelhas e azuis representam diferentes grupos na cadeia lateral dos polissacarídeos. Fonte: Hao et al. (2021).

2.10. A Bactéria *Chitinophaga* sp. CB10

A bactéria gram-negativa *Chitinophaga* sp. CB10 pertencente ao filo Bacteroidetes foi isolada de um consórcio microbiano proveniente de uma pilha de bagaço de cana-de-açúcar residual da produção de etanol, obtido anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) (Constancio et al., 2020). Este isolado teve o Draft de seu genoma montado por Kishi e colaboradores (2017) tendo seu genoma parcial depositado no NCBI GenBank sob o número de acesso MLAV000000000. Trabalhos subsequentes do grupo de pesquisa (Funniceili, 2018, dados não publicados) com o referido consórcio microbiano identificou a capacidade da bactéria CB10 em degradar o polímero carboximetilcelulose (CMC) motivando a anotação posterior de genes relacionados à degradação de materiais lignocelulósicos (Funniceili, 2018, dados não publicados).

O gênero *Chitinophaga* está associado às comunidades microbianas de ambientes agrícolas e florestais, onde a biomassa vegetal e fúngica é degradada (Larsbrink et al., 2017), sendo intensamente relacionado com a decomposição de quitina, além, de apresentar atividade celulolítica (Mckee; Brumer, 2015; Proença D.N.

et al., 2017; Sangkhobol e Skerman, 1981) o que incentiva a busca por novos genes para atuar na degradação de biomassa lignocelulósica.

Conforme o esperado, considerando o ambiente de origem do microrganismo, CB10 possui em seu genoma enzimas que estão intimamente relacionadas com a capacidade de degradação de polissacarídeos.

Em continuação as pesquisas dadas pelo nosso grupo de pesquisa LBMP, o recente trabalho publicado por Leonel et al. (2021) e colaboradores, extraído desta tese de doutorado, reforçou através da técnica de expressão em tempo real a atividade de duas β -manosídeses pertencentes à família GH2: CB10-153.446 e CB10-00347, ambas prospectadas do genoma da bactéria CB10 em cultivo com do bagaço de cana-de-açúcar. As enzimas estudadas demonstraram expressão por um período de 144 horas e liberação de oligossacarídeos (Figura 11) reforçando sua capacidade de desconstrução da parede celular da planta, levando à liberação de frações de hemicelulose contendo grupos manana que têm potenciais aplicações na síntese de oligossacarídeos para a produção de biocombustíveis, prebióticos, drogas e outros biocompostos.

2.11. Reação em cadeia de polimerase em Tempo Real Quantitativo (RT – qPCR)

A reação em cadeia de polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) é uma técnica muito utilizada na área de biologia molecular, e tornou-se uma ferramenta essencial na investigação biológica, tendo como finalidade quantificar níveis de expressão gênica de um determinado gene. A técnica foi descrita pela primeira vez por Higuchi et al. (1993), na qual desenvolveram um sistema que acoplava uma câmera de vídeo para monitoramento da reação durante todos os ciclos. O mecanismo permitia a detecção do aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (Higuchi et al., 1993), o que se configurou na maior diferença em relação à técnica de PCR convencional, na qual os dados são observados apenas no final da reação. Para a realização da reação RT-qPCR em tempo real, é necessária uma plataforma que contenha um termociclador, com um sistema óptico para a captação dos sinais fluorescentes e também um computador com um software para a aquisição

de dados e análise final da reação (Novais; Pires-Alves, 2004; Bustin, 2002). A análise de RT-qPCR é de alta precisão e sensível, e requer uma gama de requisitos para que os dados gerados possuam confiabilidade.

Neste trabalho foi utilizado o corante SYBR® Green como fluoróforo, o princípio de sua detecção é se ligar entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma luz verde (Novais; Pires Alves, 2004). Com isso se tem a possibilidade de observar um ponto no gráfico gerado pelo programa do aparelho de PCR em tempo real, denominado Cycle Threshold (Ct), que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, apresentando valores logarítmicos que são utilizados em análises quantitativas. A análise dos dados pode ser de duas formas: por quantificação absoluta, na qual se determina o número de cópias relacionado com o sinal de uma curva padrão, ou por quantificação relativa, na qual se relaciona a transcrição do gene alvo com o número de cópias de outro transcrito (Novais; Pires-Alves, 2004; Schmittgen et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve por objetivo expressar através da técnica de Real time em tempo real quantitativo (RT-qPCR) duas β -manosidases prospectadas e anotadas no genoma de *Chitinophaga* sp. na presença e ausência de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes tempos de cultivo, e avaliar a capacidade hidrolítica da bactéria frente a diferentes substratos com complexidade estrutural. Com intuito de compreender a atividade de uma das enzimas β -manosidases, foi então realizada a clonagem de uma das enzimas e ensaios de expressão heteróloga a fim de caracterizá-la através de estudos cinéticos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Análise de expressão em tempo real (RT-qPCR) para a avaliação da expressão gênica das duas β -manosidases (CB10-153.446 e CB10-00347) frente a um controle de expressão endógeno (Sigma-A) em diferentes fases de desenvolvimento de cultivo (lag, log e estacionária), cultivados na presença de glicose ou bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono;

3.2.2. Avaliação da capacidade hidrolítica da bactéria CB10 frente a diferentes substratos com complexidade estrutural, pelas técnicas de HPLC-RID e DNS;

3.2.3. Clonagem e expressão heteróloga de uma β -manosidases (CB10_153.4461);

3.2.4. Extração e purificação de uma proteína recombinante de β -manosidase (CB10_153.4461).

4. MATERIAIS E METODOS

O trabalho foi realizado utilizando a bactéria *Chitinophaga* sp. CB10 derivada do banco de cultura do Laboratório de Bioquímica e Microrganismos e Plantas (LBMP) na FCAV/UNESP de Jaboticabal. As técnicas utilizadas neste trabalho não oferecem risco ao meio ambiente e para saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança.

4.1. Predição dos “Polysaccharide Utilization Loci” (PUL)

As sequências de β -manosidases (GH2) utilizadas neste trabalho foram obtidas por homologia empregando domínios conservados e HMMs (Modelo Oculto de Markov) pela Dra. Erica Mendes Lopes, através de anotação do genoma parcial sequenciado da bactéria *Chitinophaga* sp. CB10 de estudos anteriores realizados por Kishi e colaboradores (2017), o qual está depositado sob o número de acesso MLAV00000000 da base de dados do NCBI. As análises de predição dos “Polysaccharide Utilization Loci” (PUL), Glicosil hidrolases (GHs) e fenética (descrita no tópico 4.2) foram realizadas pela bioinformática Ms^a Michelli Funicelli utilizando a ferramenta dbcan2 (Zhang et al., 2018) incluindo a busca por domínio dbCAN CAZyme (por pesquisa HMMER), refinadas pela busca de motivos conservados curtos (por pesquisa Hot pep) e bancos de dados do CAZy (por pesquisa DIAMOND), usando parâmetros padrão contra o banco de dados CAZy (versão 2019). A previsão de PUL putativo foi procedida pelo CGC-Finder (Huang et al., 2018) realizado com a ferramenta dbcan. Os clusters de genes CAZyme (CGCs) são anotados com base em genes de assinatura relacionados a (i) CAZymes usando o banco de dados CAZy

(Cantarel et al., 2009); (ii) A classificação do transportador (TCs) foi pesquisada contra TCDB (Saier et al., 2016) e fatores de transcrição (TFs) pesquisado contra CollectTF (Kilic et al., 2014), DBTBS (Sierro et al., 2008) e RegulonDB (Gama-Castro et al., 2016). A anotação para CGCs foi realizado usando a ferramenta dbcan2 (Zhang et al., 2018), os dados já foram publicados no artigo Leonel et al. (2021), e as sequencias estão disponibilizadas no material suplementar.

4.2. Análise Fenética

O alinhamento múltiplo das sequências de proteínas realizado neste estudo entre as sequências da família GH2 previamente caracterizadas obtidas a partir da base de dados CAZy (Cantarel et al., 2009), e não caracterizadas obtidas da base de dados BRENDA (Schomburg et al., 2002), foram realizados por T-Coffee (Notredame et al., 2008) usando o modo mcoffee. A inferência fenética foi realizada empregando o método de neighbour-joining aplicando o modelo de Poisson e deleção par a par com 10000 réplicas de bootstrap, usando o software MEGAX (Kumar et al 2016).

4.3. Condições de cultivo para a curva de desenvolvimento bacteriano e análise PCR tempo real quantitativa (RT-qPCR)

Para a curva de desenvolvimento da bactéria CB10, foi utilizado o meio de cultivo BHB líquido ($0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$; $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1,0 \text{ g L}^{-1}$; NH_4NO_3 ; $0,05 \text{ g L}^{-1}$; FeCl_3 ; $10,0 \text{ g L}^{-1}$ Glicose, pH 7,0) e sólido com a adição de ágar ($6,0 \text{ g L}^{-1}$) (Bushnell; 1941), substituindo a fonte de carbono Glicose (GLU) por $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de Bagaço de cana-de-açúcar lavado, seco, triturado e peneirado (32 mesh a 0,5mm) (BAG). Para a curva de crescimento, os cultivos contendo a bactéria foram incubados em agitador orbital (30°C /150 rpm) pelo período de 0, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. O número de células viáveis foi avaliado em meio sólido após o cultivo preliminar em meio líquido contendo bagaço, por unidades formadoras de colônias (UFC) e em meio líquido por densidade óptica DO_{600} para o tratamento controle (glicose). Para as análises de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), a bactéria foi cultivada como descrito neste item, em meios de cultivos líquidos. Foram retiradas alíquotas para extração de RNA total nos tempos:

24, 96 e 144 horas, para abrangência de todas as fases de desenvolvimento bacteriano.

4.4. Condições de cultivo para as análises de crescimento da bactéria CB10 em diferentes substratos

Para avaliar a capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono, a bactéria CB10 foi cultivada em meio BHB líquido como descrito no item 4.3, substituindo a Glicose ($10,0 \text{ g L}^{-1}$) por diferentes fontes de carbono ($10,0 \text{ g L}^{-1}$): Bagaço de cana-de-açúcar lavado, seco, triturado e peneirado (32 mesh a 0,5mm) (BAG), Galactomanana (goma de alfarroba) (GAL); e *Aloe vera* (ALV) pelo período de 96 horas ($30^\circ\text{C}/150 \text{ rpm}$). A capacidade de desenvolvimento bacteriano em extrato sólido foi avaliada de maneira similar, utilizando o meio de cultivo BHB sólido para os mesmos substratos avaliados em meio líquido, acrescido do tratamento Carboximetilcelulose (CMC). Após a inoculação, as placas foram incubadas pelo período de 96 horas em B.O.D a 30°C . A capacidade de degradação foi observada através da formação dos halos de colônias. Os halos de hidrólise foram revelados pela aplicação de Vermelho Congo (1%) por 15 min, seguido de lavagem com NaCl (1 M) por 10 min (Kasana et al., 2008).

4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise do perfil cromatográfico dos açúcares residuais da atividade metabólica bacteriana sobre as diferentes fontes de carbono do meio de cultura foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após o cultivo da bactéria CB10, pelo período de 96 horas, alíquotas de 1 mL foram submetidas à centrifugação (centrífuga Sorvall a 16.266 xg por 30 minutos a 4°C) e posteriormente filtradas (filtro Millipore, membrana de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$). Em seguida, as amostras foram injetadas no sistema de HPLC equipado com detector RID (Shimadzu, modelo RID-10A). Alíquotas de $10 \text{ }\mu\text{L}$ foram injetadas e eluídas em uma fase móvel de acetonitrila, ou seja, água (75:25, vol: vol) nas seguintes condições cromatográficas: temperatura de injeção de 35°C , fluxo de $1,0 \text{ mL/min}$. Como controle negativo, o meio de cultura foi utilizado em

tempo zero para cada condição de fonte de carbono. Para a quantificação, foram preparadas soluções padrão de 100 μM de cada açúcar padrão (manose, glicose).

4.6. Análise de açúcar redutor por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

A análise dos açúcares redutores residuais oriundos da atividade metabólica bacteriana sobre diferentes fontes de carbono foi realizada através da análise de açúcar redutor por ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) como descrito por Miller, (1959). Após o cultivo (item 4.3), as culturas foram centrifugadas ($16.266 \times g$ por 30 minutos a 4°C) e uma alíquota de 100 μL do sobrenadante acrescida da mesma proporção do reagente de DNS foi incubada no aparelho de ciclagem de temperatura tipo PCR Thermo scientific Bio-Rad PTC-100® thermal cycler (95°C por 5 minutos, 4° por 1 minuto e 20° por 10 minutos). Após a reação, foi realizada a leitura da absorbância 540 nm em espectrofotômetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer. A absorbância medida foi comparada aos valores de uma curva padrão de manose ($\text{mw} = 180,2 \text{ g/mol}$) entre 0 a 20 mM, para detectar a presença de açúcares redutores liberados em cada cultivo.

4.7. Experimento de PCR em tempo real (RT-qPCR) para avaliar a expressão gênica dos genes da manosidase

Para realizar a avaliação da expressão gênica em tempo real (RT-qPCR), foi necessário desenhar os pares de oligonucleotídeos iniciadores (Forward e Reverse) para as β -manosidases, a partir das sequências obtidas do genoma parcial sequenciado da bactéria CB10 depositado no número de acesso da base de dados NCBI: MLAV000000000 (Kishi et al., 2017). As sequências foram confirmadas em bancos de dados (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e alinhadas com o programa Bioedit (Hall, 1999) usando a ferramenta ClustalX 1.5b (Thompson et al., 1994). Os pares de oligonucleotídeos foram projetados com o programa Primer3Express (software PrimerExpress, Applied Biosystems, versão 7500) seguindo os parâmetros descritos por Schmittgen e colaboradores (2008). Para o controle endógeno “housekeeping” entre os genes candidatos foi selecionado o fator Sigma A rRNA (fator

sigma primário da RNA polimerase) este foi identificado como o mais estável e adequado quando analisado em softwares recomendados.

Após o desenho dos pares de oligonucleotídeos, foi realizado o processo de extração do RNA total, as bactérias foram cultivadas conforme descrito no item anterior, e alíquotas de 2 ml das culturas foram centrifugadas ($10.000 \times g$, a 22°C por 10 minutos) para obtenção do pellet bacteriano. Este foi ressuspense em $100 \mu\text{L}$ de solução de lise ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ lisozima em 1 mL em tampão TE) e pré-aquecido a 37°C por 10 minutos (Eppendorf ThermoMixer®) após prosseguiu-se utilizando o kit de isolamento de RNA (Mini RNA spin, Synapse biotechnology) seguindo as instruções do fabricante.

Após obter o RNA total, sua integridade foi avaliada utilizando o dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer (Apêndice A), enquanto que a concentração foi avaliada usando o kit de fluorômetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Após a quantificação do RNA total, foi realizada a síntese de RNA em cDNA, seguindo as instruções do fabricante do kit SuperMix SuperScript™ III First-Strand Synthesis (Invitrogen).

Antes de realizar a reação final de RT-qPCR em tempo real, foi necessário realizar a padronização das concentrações por meio de uma curva de diluição em série no mesmo equipamento, para isso, utilizou-se as seguintes concentrações de primers: $100/100 \text{ nM}$; $300/300 \text{ nM}$ e $600/600 \text{ nM}$ e de: cDNA as seguintes concentrações: 200 ng ; 100 ng ; 50 ng ; 25 ng ; $12,5 \text{ ng}$; $6,25 \text{ ng}$ e $3,12 \text{ ng}$; totalizando sete pontos, para cada gene (Apêndice B). Todos os genes analisados apresentaram eficientes com valores de R^2 igual a $0,99$ e EFF%: entre 90 e 106% . Sendo assim, a concentração de 130 ng de cDNA mostrou-se com melhores resultados para todos os genes estudados.

Após a padronização e a escolha das melhores concentrações como descrito na Tabela 2, foram realizadas as reações de amplificações das β -manosidases, utilizando as seguintes concentrações; 130 ng de cDNA; $6,5 \mu\text{L}$ de SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) $1,25 \mu\text{L}$ de cada iniciador (F e R) nas seguintes concentrações: $100/100 \text{ nM}$ para o gene CB10-153.446, $300/300 \text{ nM}$ para CB10-00347 e $100/100 \text{ nM}$ para o gene SigmaA, em um volume final de reação de $12,5 \mu\text{L}$ (água ultrapura). O programa de amplificação por PCR consistiu em uma desnaturação inicial ($94^\circ \text{C} / 5 \text{ min}$); seguido

por 35 ciclos de amplificação (94°C / 40 seg; 56°C / 1 min; 72 ° C / 45 seg) e uma extensão final (72°C / 7 min). A PCR quantitativa foi realizada usando Applied Biosystems 7500 Real-Time versão 1.3 (Copyright 2001-2004-Applied Biosystems) (Apêndice C).

Tabela 2. Características dos oligonucleotídeos usados para a análise de RT-qPCR

Nome do gene	Nome (ORF)	Sequência Primer (5' – 3')	Tamanho (pb)	T _m (°C)	Eficiência Primer (%)	R ²	Slope
β-mannosidase	CB10 00347	F:CCGGTGAATAAAATCGTCA R:TTGCCTCCACGAATAATTG	127pb	57.15	106.8	0.99	-3.168
β-mannosidase	CB10 153.4461	F:TTCCACTCTTCTCCCATCA R:CGCTTCAAACCATTCCATA	102pb	57.15	92.3	0.994	-3.520
Sigma A rRNA	CB10 04158	F:CGCCAACTCAAAATCACTAA R:TCCACTTTCCCAATCTCTCT	83pb	58.06	90.7	0.994	-3.567

Notas: F, primer forward; R, primer reverse, T_m, temperatura melting, R² coeficiente de determinação, pb, pares de base

4.8. Análise de Dados do estudo de PCR em tempo real quantitativa

Para a análise dos dados gerados pela quantificação relativa dos níveis de expressão gênica, foi empregado o método de quantificação (ciclo de limiar) baseado no Algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que gera o valor de expressão do gene alvo normalizado para o calibrador endógeno. Para cada tratamento (tratamento e controle) foi detectado o valor de C_t, tanto para o gene alvo quanto para o de referência. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação foi detectado. O valor do C_t do gene alvo foi subtraído do valor da média do C_t dos três genes de referência para ajustar a reação nos diferentes tratamentos de tempos de cultivos analisados, sendo obtido o valor de ΔC_t . O valor de ΔC_t de cada gene alvo do tratamento (bactéria cultivada com bagaço de cana-de-açúcar) foi subtraído do valor do ΔC_t da amostra controle (calibrador – bactéria cultivada com glicose) para cada tempo analisado, tendo-se o valor de $\Delta\Delta C_t$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do gene de referência, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência, os dados obtidos foram analisados de uma maneira relativa, utilizando a metodologia do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método de análise

apresenta os resultados em relação ao ΔC_t de um gene normalizador (Schmittgen et al., 2008).

4.9. Clonagem heteróloga

4.9.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a Clonagem heteróloga

Para a clonagem heteróloga da ORF CB10_153.446 β -manosidases (E.C. 3.2.1.25), foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos (ou *primers*) de acordo com a sequência gênica da proteína de interesse, previamente obtida a partir do genoma de *Chitinophaga* sp. CB10, como estão descritos na Tabela 3. Para a construção foram levados em consideração os sítios de restrição das enzimas escolhidas: BamHI para o primer Forward e XhoI para o Reverse, coincidentes com os sítios de clonagem do vetor de expressão e enzimas que não clivavam o gene, facilitando assim a clonagem e posterior expressão do inserto no vetor pET28a. Os parâmetros de amplificação foram avaliados com a ferramenta online “PCR Primer Stats” (Sequence Manipulation Suits, www.bioinformatics.org) com o intuito de verificar a presença de auto-pareamentos, formação de grampos de GC, temperatura de “melting”, “hairpins” dentre outros problemas indesejáveis para melhor amplificação. O DNA genômico de *Chitinophaga* sp. CB10 foi utilizado como molde em uma reação de PCR contendo os iniciadores descritos. Para a padronização inicial utilizou-se uma DNA polimerase não comercial (produzida em nosso laboratório e gentilmente cedida pelo técnico João Carlos Campanharo). Após a otimização da reação utilizou-se uma DNA polimerase de alta fidelidade (*Platinum Taq High Fidelity* - Invitrogen). O tamanho fragmento de DNA amplificado apresentou o tamanho de aproximadamente 2539 pb, e foi restrito utilizando as enzimas BamHI e XhoI seguido de purificação em colunas utilizando o kit “DNA Clean e Concentrator” (Zymo Research, Irvine, Califórnia, EUA) seguindo as orientações do fabricante

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na clonagem heteróloga da ORF. CB10_153.4461 β -manosidases

Endonuclease de restrição	Sequência 5' – 3' de cada oligonucleotídeo	Tamanho do fragmento (pb)
F: BamHI	TATAggatccCAGGTAGACACGCTGAAG	2539
R: XhoI	TATATActcgagTTATTTTTTATAAGTGTCAACCAAC	

Notas: F, primer forward; R, primer reverse, pb, pares de base

4.9.2. Clonagem da proteína recombinante

Com o intuito de clonagem da ORF de interesse, foi extraído o DNA plasmidial do vetor pET28a utilizando o kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA)”, seguindo as especificações do fabricante, quantificado em aparelho NanoDrop e visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídeo (0,5 mg. μ L). A imagem do gel foi documentada utilizando o aparelho Gel Doc 100 (através do software Image Lab version 6.0.1 BioRad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América). Em seguida, o DNA plasmidial foi submetido a uma reação de restrição com as enzimas específicas (F: BamHI e R: XhoI) e desfosforilação com a FastAP “Thermosensitive Alkaline Phosphatase” (Thermo Fisher Scientific). O vetor linearizado obtido foi purificado em colunas conforme anteriormente descrito para o inserto. Posteriormente o amplicon e o vetor foram submetidos à reação de ligação com a enzima DNA ligase T4 (Thermo Fisher Scientific) a 16 °C durante 16 horas. O vetor recombinante pET28a foi transformado por meio de choque térmico em células competentes de *Escherichia coli* BL21 DE3 (New England Biolabs) desenvolvidas para clonagem e expressão de proteínas recombinantes. A confirmação da clonagem foi realizada a partir de PCR de colônias, bem como por sequenciamento do vetor recombinante pelo Sanger ABI 3130 XL (Applied Biosystems®) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando os “primers” de sequenciamento do vetor (T7 “forward” e T7 “reverse”). Os vetores recombinantes contendo o gene de interesse (clones) foram coletados, adicionados em meio Luria Bertani (LB) contendo o antibiótico canamicina 50 μ g.mL⁻¹ e cultivados a 37 °C durante 16 horas. Após esse período, uma alíquota de cada clone foi coletada (800 μ L) e adicionada em tubos contendo glicerol (20% v/v), congeladas em nitrogênio

líquido e armazenadas a -80 °C. Após, foi selecionado os clones positivos para os ensaios de expressão.

4.9.3. Extração da proteína recombinante

Com intuito de expressar a β -manosidase previamente transformada em células competentes de *E. coli*, como descrito no item 4.11.1, uma colônia isolada foi inoculada em meio LB contendo canamicina à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e deixada sob agitação constante a 37°C até atingir a fase logarítmica de crescimento, com D.O₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. A cultura foi então induzida com 0,1-0,5 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), e após 6 horas de cultivo, centrifugada a 10.000 xg por 20 minutos a 4°C, a fim de analisar a expressão da proteína de interesse em comparação às proteínas totais. A confirmação da expressão das proteínas foi avaliada através da técnica de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 10% - SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As amostras foram previamente incubadas a 100°C por cinco minutos em tampão de amostra (glicerol, 20%; SDS, 4%; de β -mercaptoetanol, 5%; azul de bromofenol [0,02%]; Tris-HCl, 6mM pH 6,8), a seguir, aplicada em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS. A separação de proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (125 V e 25 mA). Após o gel foi corado pelo método de Azul de Comassie (0,2% Azul de Comassie, 40% Metanol, 10% Ácido Acético) e descorado em solução contendo 10% de ácido acético (v/v). A extração da proteína iniciou-se pela ressuspensão do pellet bacteriano obtido após a expressão em tampão de extração [20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10% (v/v) glicerol] acrescido de 10 mg.mL^{-1} de Lisozima. Após 30 minutos no gelo, as amostras foram rompidas no aparelho Branson Sonifier 250 (Branson, Connecticut, EUA) e centrifugadas por 20 minutos, a 4°C, 17.000 xg, para separação de extratos solúveis e insolúveis. A fração resultante de cada etapa, da extração foi analisada por SDS-PAGE conforme descrito e o primeiro extrato foi utilizado para a purificação.

4.9.4. Purificação da proteína recombinante

Após a expressão como descrito no item 4.9.3, foi realizado a purificação por afinidade da proteína utilizando uma coluna carregada com níquel (Ni²⁺ - NTA) o que permite a purificação de proteínas com cauda de histidina (6xHis tag). Para isso o primeiro extrato foi incubado durante 1 hora a 4°C sobre agitação com 3,5 mL de resina Ni²⁺ -NTA (Qiagen, Hilden, Germany) e tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 20 mM de imidazol. Após o período de incubação, a amostra composta pelo extrato acrescido de resina, foi depositada em uma coluna de cromatografia Poly-Prep (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), e submetida a um gradiente de imidazol nas concentrações; 5 mM, 10 mM, 15 mM, 50 mM, 100 mM, 1 M. Os extratos resultantes de cada etapa foram analisados por SDS-Page.

4.10. Análise dos dados

Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e os resultados apresentados como valores médios acrescidos do respectivo desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Anotação de uma CB10 β -manosidases: GH2 convencional versus CAZymes semelhantes associadas a Pul-like

Duas β -manosidases GH2 previstas foram anotadas funcionalmente por homologia e prospecção para domínios conservados do genoma sequenciado de *Chitinophaga* sp. CB10, uma bactéria gram-negativa pertencente ao filo Bacteroidetes, isolada de um consórcio microbiano advindo de biomassa lignocelulósica (Kishi et al., 2017; Constancio et al., 2020). As β -manosidases anotadas (CB10-153.446 e CB10-00347) compartilharam menos de 27% de identidade entre si (cobertura “Query coverage” de 58%, Blastp, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A CB10-00347 foi anotada dentro do “Polysaccharide Utilization Loci” (PULs), um complexo de gene que age sinergicamente no reconhecimento, ligação, hidrólise e utilização de polissacarídeos, (Figura 6), enquanto a CB10-153.446 não mostrou qualquer associação com agrupamentos enzimáticos específicos.

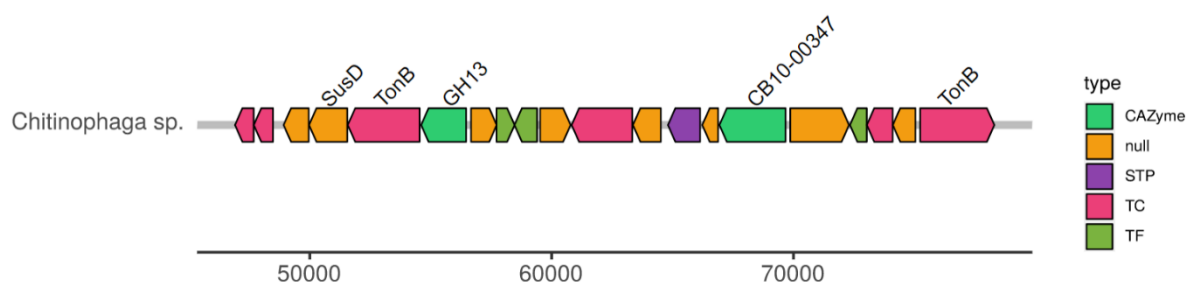


Figura 6. Anotação de genes agrupados em “semelhantes a PULs” associados com CAZyme GH2 β -manosidase CB10-00347, obtido de *Chitinophaga* sp. CB10. A anotação foi realizada por meio do programa CGC-Finder. As sequências de GH2 identificadas em estudos anteriores foram anotadas usando a ferramenta dbcan2 (Zhang et al., 2018). A previsão do PUL putativo foi realizada pelo CGC-Finder (Huang et al., 2018). Os clusters de genes CAZyme (CGCs) foram anotados com base em genes de depositados relacionados (i) CAZymes usando o banco de dados CAZy (Cantarel et al., 2009); (ii) Transporter Classification (TCs) foram pesquisados contra TCDB (Saier et al., 2016), e Transcription Factors (TFs) pesquisados contra CollectTF (Kiliç et al., 2014), DBTBS (Sierro et al., 2008) e RegulonDB (Gama-Castro et al., 2016). A anotação para CGCs foi realizada usando a ferramenta dbcan2 (Zhang et al., 2018). Legenda: CAZyme, “Carbohydrate-Active Enzymes”; nulo, não anotado; STP, proteínas de transdução de sinal; TC, classificação do transportador; TF, fator de transcrição.

5.2. CB10 β -manosidase: GH2 CAZymes mais próximas de *Bacteroides* spp.

Com o objetivo de buscar uma melhor caracterização, as β -manosidases de CB10 foram comparadas a dois conjuntos de dados: o de β -manosidases obtidas do banco de dados Cazy (<http://www.cazy.org/>), correspondendo a enzimas funcionalmente caracterizadas e identificadas de acordo com o grupo GH2, e as β -manosidases obtidas do banco de dados Brenda (<https://www.brenda-enzymes.org/>), correspondentes às sequências funcionais preditas. Como resultado, a CB10 β -manosidases mostraram um alto grau de novidade: CB10-153.446 (“Query coverage” de 99%) compartilhou 43,59% de identidade com uma β -manosidase de *Bacteroides thetaiotaomicron*, enquanto CB10-00347 (Query coverage 91%) compartilhou apenas 27,93% de identidade com uma β -manosidase de *B. xylanisolvens*. Com o objetivo de visualizar a distribuição por grupos de maior similaridade para as sequências, estas foram submetidas a uma análise fenética, tendo como padrão as sequências do Cazy caracterizadas experimentalmente. O resultado da árvore fenética é mostrado na

Figura 7, onde é possível observar que a maioria das sequências foram agrupadas em cinco clados. Embora tenham sido agrupadas em diferentes clados (Clados A e E), as duas sequências de β -manosídeses putativas de CB10 foram agrupadas com as sequências que já haviam apresentado maior similaridade com a análise de Blastp, correspondendo às β -manosídeses de bactérias do gênero *Bacteroides* (filo Bacteroidetes). A sequência de CB10-153.446 se agrupou no maior clado (Clado A), sendo que a sequência mais próxima de β -manosídease é a de BtMan2A de *Bacteroides thetaiotaomicron* (Q8AAK6), uma β -manosídease experimentalmente caracterizada por cristalografia raios-X, que contém os seguintes domínios conservados: "Glyco_hydro_2"; "Mannosidase" e Ig_manosídease.

A β -manosídease CB10-00347, por sua vez, agrupou-se com as sequências de *Bacteroides xylanisolvens* (D4VPT7) e *B. vulgatus* (A0A0P0L162) no clado E. Infelizmente, estas sequências do banco de dados Brenda não foram previamente caracterizadas, enquanto que as sequências caracterizadas do banco de dados NCBI mais próximas à CB10-00347 foram β -manosídeses de eucariotos (Q5H7P5.4 e Q75W54.3). Do ponto de vista dos domínios funcionais, as sequências mais próximas da β -manosídease putativa CB10-00347 apresentaram os seguintes respectivos conjuntos de domínios conservados: 4VPT7, proteína do domínio tipo C F5/8 e Beta-manosídease; A0A0P0L162, Glyco_hydro_2 e Glyco_hydro_2_C.

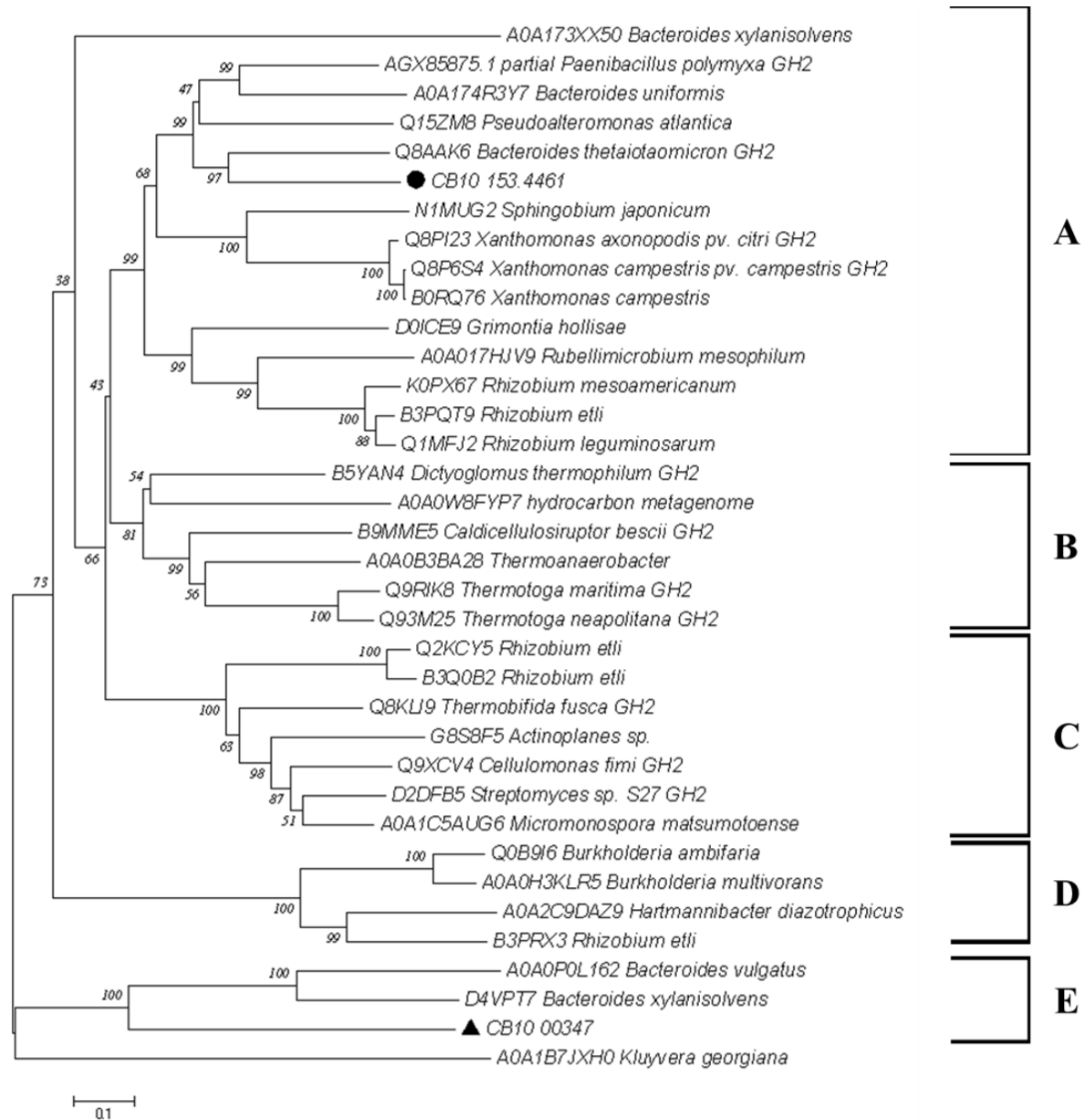


Figura 7. Dendrograma fenético gerado pelo programa MEGA 5 para β -manosidases. A análise foi realizada com base na matriz de distâncias gerada a partir de um alinhamento feito pelo T-coffee, utilizando o método de otimização de agrupamento Neighbour Joining (Saitou et al., 1987). A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de bootstrap (10.000 réplicas) é mostrada ao lado dos ramos (Felsenstein et al., 1985). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades, com base na similaridade; as distâncias foram calculadas usando o método de correção de Poisson (Zuckerkandl et al., 1965) e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por local. A análise envolveu 36 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Havia um total de 330 posições no conjunto de dados final (Kumar et al., 2016). Círculo e Triângulo: respectivamente, β -manosidases CB10-153.446 e CB10-00347.

5.3. Padrão de crescimento de CB10 contra diferentes fontes de carbono

Foi avaliada a capacidade de crescimento da bactéria *Chitinophaga* sp. CB10 através da formação de colônias contra quatro fontes de carbono de diferentes complexidades estruturais: Glicose; Galactomanano da goma de alfarroba; Carboximetilcelulose (CMC); Polpa extraída de folhas de *Aloe vera* (Figura 8). Após o cultivo, as placas foram coradas com Vermelho Congo para destacar o contorno da colônia e possíveis halos. Como pode ser visto nas placas de polissacarídeo coradas com vermelho do Congo (Figura 8), pode-se observar o consumo do polissacarídeo nas regiões limítrofes da colônia, marcadas por regiões mais claras que o entorno, sem grandes sinais de dispersão pela placa.

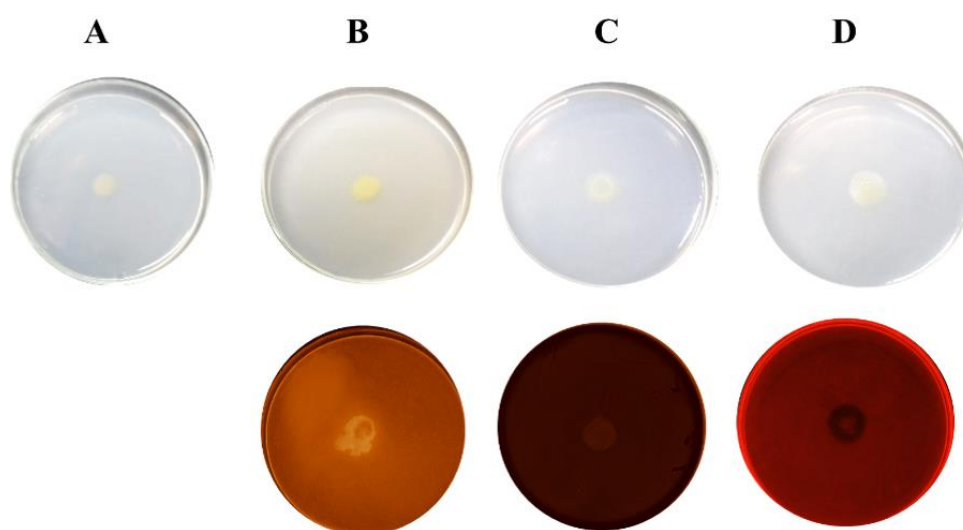


Figura 8. Placas de meio de ágar BHB suplementadas com diferentes substratos (10,0 g L⁻¹), resultantes do cultivo após 96 horas, respectivamente, (A) Glicose, (B) Galactomanana (Goma de alfarroba de *Ceratonia siliqua*), (C) Carboximetilcelulose (CMC), (D) *Aloe vera*. As placas inferiores representam os tratamentos B-E corados com Vermelho Congo (1%).

Além do cultivo estático em meio sólido, as culturas foram feitas sob agitação em meio líquido, visando a quantificação dos açúcares liberados por hidrólise por técnicas de CLAE e DNS, para substratos polissacarídeos naturais. A avaliação do acetomanano e polissacarídeos de galactomanana (McKee et al., 2019) foi feita respectivamente para os derivados de *Aloe vera* e goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*). Além disto, foi realizada a quantificação dos açúcares liberados do cultivo da

bactéria *Chitinophaga* sp. CB10 em bagaço de cana-de-açúcar, que é a biomassa de onde a bactéria foi isolada, cuja hemicelulose é composta predominantemente de L-arabino- (4-O-metil-D-glucurono) -D-xilano, contendo pequenos traços de D-manose (Brienzo et al., 2016). A cultura líquida sob agitação pode proporcionar uma melhor assimilação dos nutrientes, permitindo a interação das partículas em solução com as células bacterianas, ao mesmo tempo pode levar à dispersão e diluição das toxinas produzidas pelo metabolismo bacteriano, o que não ocorre muito bem em uma cultura sólida. A CB10 foi capaz de se desenvolver vigorosamente nesses substratos ao usá-los como a única fonte de carbono no meio BHB, o que indica a versatilidade de seu metabolismo. Entretanto, os oligossacarídeos liberados no meio de cultura foram consumidos quase que inteiramente em seu desenvolvimento, de forma que os resíduos sobressalentes foram suscetíveis à detecção por HPLC-RID apenas para o substrato galactomanano, como pode ser visto na Figura 9, que mostra os cromatogramas do perfil de açúcares detectados por CLAE-RID do meio de cultura com galactomanana após cultivo bacteriano (em azul) sobrepondo o controle de tratamento (em vermelho) e o padrão de manose (em preto). Na curva cromatográfica correspondente ao sobrenadante da cultura bacteriana (Fig. 9, azul), observa-se a presença de dois picos, um referente à manose (retenção em 8,7 min) e o outro correspondente à galactose (retenção de 7,3 min), além do pico maior, que aparentemente é um artefato da corrida cromatográfica, correspondendo ao solvente da fase móvel (4,3 min). A presença desses açúcares, ausentes no controle, fornece evidências da atividade metabólica do CB10 sobre o substrato de galactomanana, uma vez que a conversão de galactomanana em monossacarídeos D-manose e D-galactose requer a ação de pelo menos duas enzimas, β -manosidase e α -galactosidase (embora outras enzimas sejam necessárias para que isso aconteça com eficácia). A quantificação dos carboidratos das amostras foi realizada por calibração externa na faixa dinâmica de trabalho de 12 a 100 mMol e permitiu a detecção de 12,34 mMol de manose nas culturas de CB10 em BHB suplementado com galactomanana. A análise de DNS corroborou com os dados obtidos pela análise de CLAE-RID, de forma que as culturas com BAG e ALO não permitiram a detecção de açúcares liberados por hidrólise, mesmo quando as amostras foram concentradas

5X. Para a cultura de galactomanana, o ensaio de DNS permitiu estimar a quantidade de açúcares redutores liberados em $2,32 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

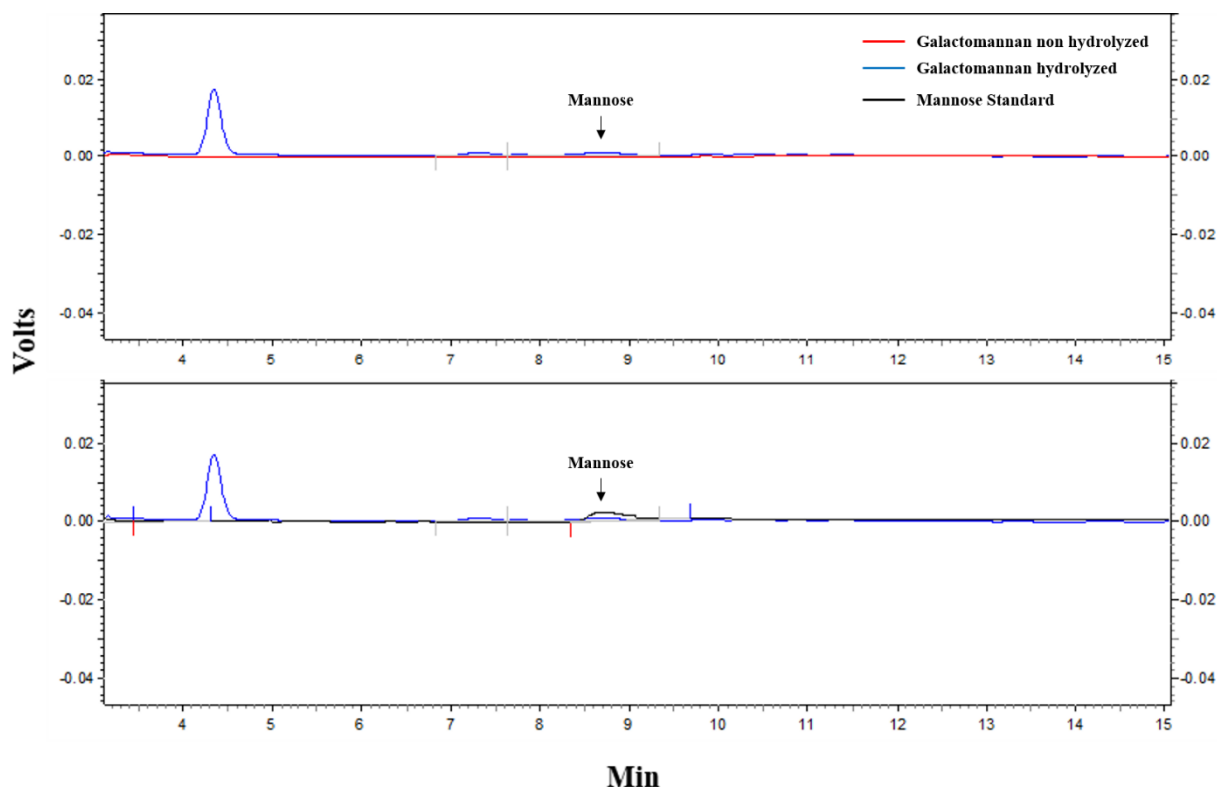


Figura 9. Cromatogramas do perfil de açúcar detectados por CLAE-RID do meio de cultura com CB10 cultivado com galactomanana, demonstrando a degradação do polissacarídeo gerando manose (Azul), como foi evidenciado pela comparação da sobreposição do padrão de solução pura que demonstra a localização do pico de manose (preto), que está ausente na amostra de controle (meio de cultura sem cultivo, vermelho).

5.4. Expressão diferencial de β -manosídeses na presença de bagaço versus glicose

Foi realizada uma análise de expressão em tempo real para duas β -manosídeses GH2, CB10-153.446 e CB10-00347 em bagaço (BAG) e em glicose (GLU, controle). Inicialmente, foi analisado o crescimento da CB10 contra o tratamento BAG e o controle GLU como fontes de carbono, visando identificar o perfil de desenvolvimento bacteriano em cada uma das culturas. A Figura 10 mostra as curvas de desenvolvimento da bactéria CB10 no meio de cultura mínimo BHB para os tratamentos BAG e GLU, pelas respectivas técnicas: contagens de Unidades

Formadoras de Colônias (UFC) e densidade óptica (OD_{600}). A fase preparatória de adaptação das culturas (Lag) apresentou ligeira diferenciação inicial e, por até oito horas, ambos os tratamentos permaneceram com multiplicação celular aparentemente muito abaixo do limite de detecção das técnicas utilizadas. A fase de adaptação foi mais curta para o tratamento GLU, estendendo-se por até 24 horas, quando o cultivo mudou para crescimento exponencial. Para o tratamento de BAG, essa fase de adaptação foi mais longa, passando por um período de multiplicação lenta por até 72 horas, quando a fase log realmente começou. Considerando a natureza distinta das fontes de carbono analisadas, essa diferença nas fases de adaptação é totalmente compreensível, uma vez que a glicose é um açúcar simples, facilmente absorvível pela maioria das bactérias e processado em seu metabolismo; enquanto a biomassa lignocelulósica é uma fonte de carbono extremamente complexa, exigindo a expressão induzida de várias enzimas e consequentemente uma fase de adaptação mais longa. Ambas as curvas diminuíram em 144 horas de cultivo, fato que pode ser justificado tanto pela escassez de nutrientes quanto pelo aumento de rejeitos celulares potencialmente tóxicos. O padrão de crescimento da bactéria CB10 orientou a escolha dos pontos a serem analisados por PCR em tempo real (RT-qPCR), correspondendo a 24 (fase lag), 96 (fase estacionária) e 144 horas (fase de declínio).

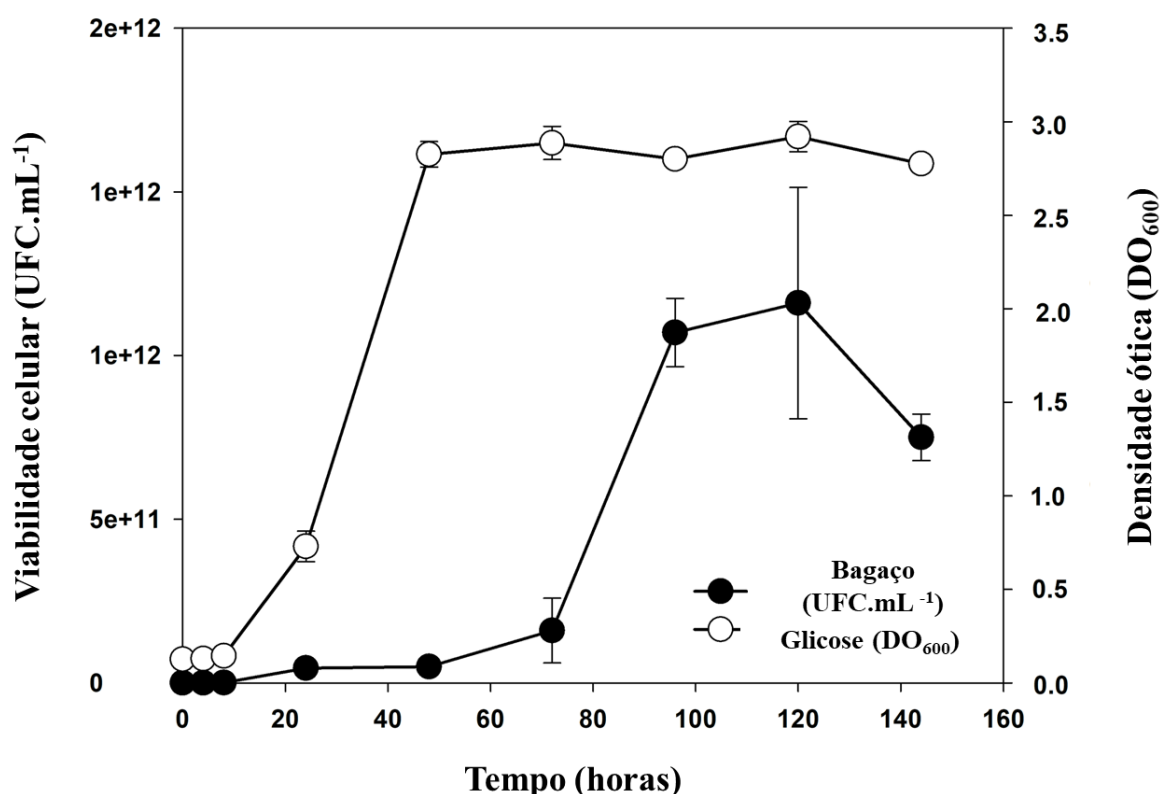


Figura 10. Curvas de crescimento bacteriano de *Chitinophaga* sp. CB10, em meio de cultura BHB sólido com bagaço de cana de açúcar por Unidade de Contagem de Colônias (UFC) e em meio de cultura BHB líquido adicionado de glicose por leitura de densidade óptica (DO₆₀₀).

Os resultados dos níveis crescentes de expressão gênica em amostras da bactéria CB10 cultivadas no bagaço da cana-de-açúcar às 24, 96 e 144 horas em relação aos mesmos períodos de cultivo de glicose (controle negativo de indução de expressão) são ilustrados na Figura 11. Observa-se que no período de 24 horas os níveis de expressão de ambas as enzimas permaneceram basais e iguais, ambos muito baixos quando comparados aos obtidos nos períodos de 96 e 144 horas. Após 96 horas, observou-se uma condição de indução da expressão gênica diferente do controle não induzido (glicose) e o nível de expressão constituinte do controle endógeno (SigmaA), com os respectivos níveis dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para CB10-00347 e CB10-153.446, apresentando um aumento na expressão de 4,8x e 5,6x, sendo, portanto, menor para β -manosidase localizada na via PUL-like. Curiosamente, os períodos de 96 horas e 144 horas mostraram uma alta estabilidade do nível de

expressão gênica específica para cada gene ao longo do tempo, e os respectivos valores permaneceram praticamente os mesmos para os dois tempos.

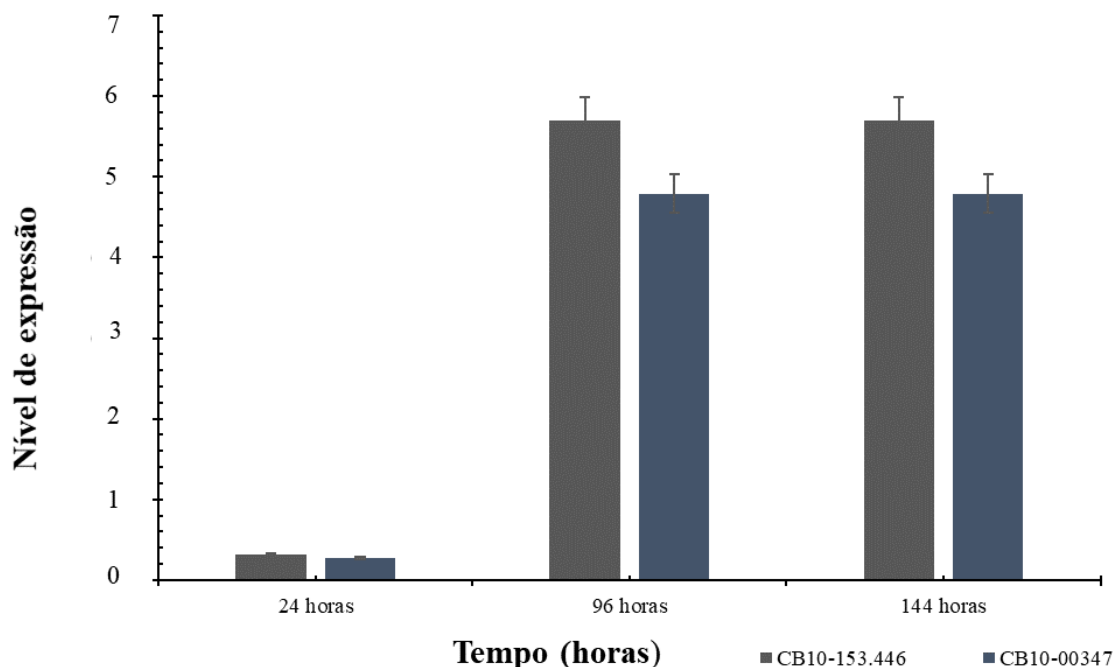


Figura 11. Nível de expressão dos genes de β -manosidases, respectivamente associados (CB10-00347) e não associados (CB10-153.446) a aglomerados semelhantes a PUL, calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para *Chitinophaga* sp. CB10 em meio de cultura BHB líquido com bagaço de cana-de-açúcar em relação ao controle endógeno (SigmaA) e indução enzimática negativa (glicose), nos períodos de 24; 96 e 144 horas.

5.5. Clonagem da proteína recombinante

Para a clonagem do gene de β -manosidases (ORF CB10_153.446) foram desenhados oligonucleotídeos específicos de acordo com a sequência gênica da proteína de interesse, previamente obtida a partir do genoma de *Chitinophaga* sp., como estão descritos na Tabela 3. Para a construção foi levado em consideração os sítios de restrição das enzimas escolhidas BamHI e XhoI, coincidentes com os sítios de clonagem do vetor de expressão e enzimas que não clivavam o gene, respectivamente, facilitando assim a clonagem e posterior expressão do inserto no vetor pET28a. Os parâmetros de amplificação foram avaliados com a ferramenta online “PCR Primer Stats” (Sequence Manipulation Suits, www.bioinformatics.org)

com o intuito de verificar a presença de auto-pareamentos, formação de grampios de GC, temperatura de “melting”, “hairpins” dentre outros problemas indesejáveis para melhor amplificação. O DNA genômico de *Chitinophaga* sp. foi utilizado como molde em uma reação de PCR, utilizou-se uma DNA polimerase não comercial (Figura 12 A, 1). Após a otimização da reação utilizou-se uma DNA polimerase de alta fidelidade para a amplificação definitiva (“*Platinum Taq High Fidelity*” - Invitrogen) (12.A, 2). Conforme esperado, o fragmento de DNA amplificado apresentou o tamanho de aproximadamente 2500 pb. Os fragmentos obtidos foram então clonados em vetor pET28a (Novagen, Figura 12.B) e transformados em células competentes de *Escherichia coli* BL21 DE3 (New England Biolabs). As construções obtidas foram avaliadas por sequenciamento e digestão enzimática, o clone positivo foi então utilizado para os ensaios de expressão (Figura 12.C), conforme melhor descrito no item 5.6. a seguir.

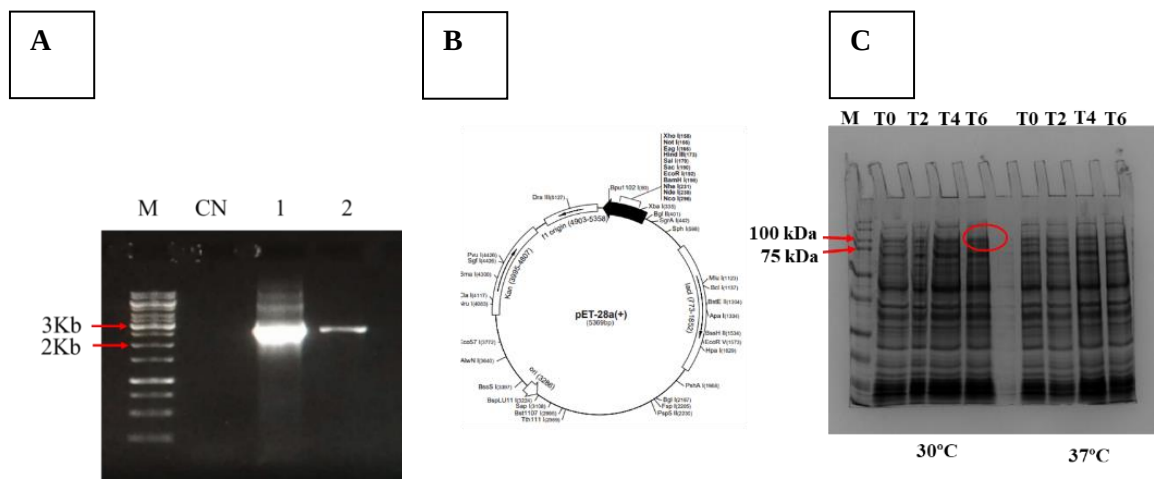


Figura 12. Construção de vetor de expressão pET28a+ β -mannosidase. A. Amplificação de fragmento β -mannosidase (2613pb) analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo ($0,4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Amostras: M: Marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder (Fermentas); CN Controle negativo da reação; 1: amostra amplificada com DNA polimerase não comercial e 2: amostra amplificada com DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum Taq High Fidelity - Invitrogen). B. Vetor pET28a; C. Teste de indução de expressão enzimática nas temperaturas de 30°C e 37°C (0,1mM IPTG). Amostras: M1: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; T0, células sem indução com IPTG; T2-T6 células sob indução no período de 2 horas até 6 horas.

5.6. Extração e purificação da proteína recombinante

Para os ensaios de expressão, colônias isoladas de clones contendo vetor de expressão pET28a/BL21DE3 ligado ao gene de interesse foram cultivadas em pré-inóculo (cultivo por 16 horas) a 2% para um volume de 1 L de cultivo final (meio Luria-Bertani, suplementado com $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina), em agitador orbital a 37°C , 200 rpm. Após adição do pré-inóculo, a suspensão celular foi cultivada até atingir D.O_{600} 0,5-0,6 (T0) mostrados na Figura 13. Após este período, as células foram cultivadas sob indução com IPTG nas concentrações de 0,1mM, 0,5mM e 1,0mM na temperatura de 30°C , pelo período de 6 horas. Analisando a Figura 13 de expressão, e comparando o tempo inicial (T0) sem a indução do IPTG com os demais tempos com a indução (T2-T6) observa-se que a expressão não foi perceptível. Existe uma banda na altura esperada, mas como ela está presente no controle sem indução (T0), e seu nível de expressão aparece aparentemente igual ao longo do tempo de indução de 2 a 6 horas (T2, T4 e T6), tudo indica que ou se trata de uma banda do próprio hospedeiro (*E. coli* BL21 DE3) ou a expressão se deu em nível basal mesmo sem indutor, mas se manteve nos mesmos níveis de forma não diferencial após a indução.

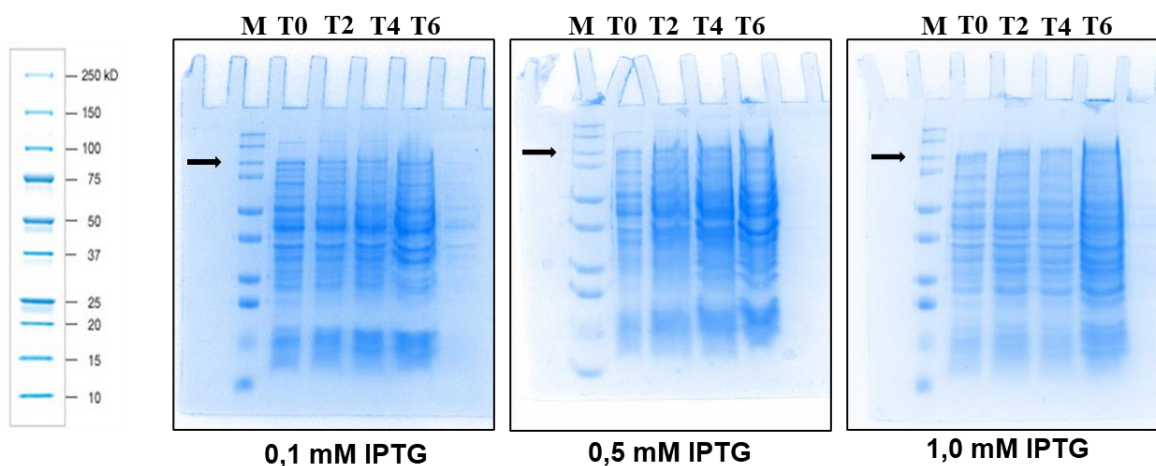


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) Teste de indução de expressão enzimática nas temperaturas de 30°C nas concentrações de 0,1mM, 0,5mM e 1,0mM IPTG. Amostras: M: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; T0, células sem indução com IPTG; T2-T6 células sob indução no período de 2 horas até 6 horas. A seta preta indica aonde a banda de expressão deveria estar, em aproximadamente 100 kDa.

A fim de otimizar a expressão foram realizados outros testes expressão alterando as temperaturas para 25°C e 37°C com a indução de 1,0 mM de IPTG. O tempo inicial sem a indução (T0) comparado com os demais tempos com a indução (T2-T6) demonstra igualmente ausência de êxito na expressão.

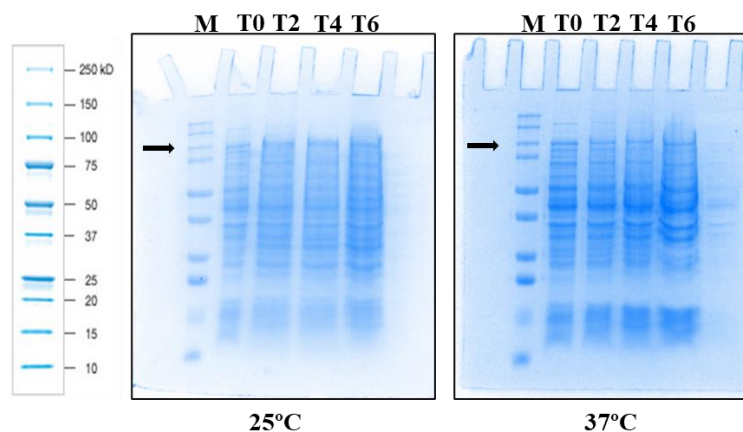


Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page). Teste de indução de expressão enzimática nas temperaturas de 25°C e 37°C nas concentrações de 1,0mM IPTG. Amostras: M: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; T0, células sem indução com IPTG; T2-T6 células sob indução no período de 2 horas até 6 horas. A seta preta indica aonde a banda de expressão deveria estar, em aproximadamente 100 kDa

Após a tentativa de expressão em diferentes condições, foi realizada uma tentativa de purificação da proteína obtida mesmo em níveis basais de expressão, a fim de obter a proteína mesmo que em baixas concentrações. A Figura 15 mostra as respectivas extrações (superior, A-C) e purificações (inferior D-F) nas condições de extração da proteína nativa sendo: (A): extração com tampão sem imidazol contendo 100 mM de NaCl; (B): extração com tampão contendo 20 mM de imidazol e 100 mM de NaCl; (C): extração com tampão contendo 20 mM de imidazol e 200 mM de NaCl. Após a extração, o primeiro extrato de cada um dos respectivos tratamentos foi utilizado para a purificação (D-F) com coluna de afinidade de histidina nas concentrações de 5 mM, 10 mM, 15 mM, 50 mM, 100 mM, 1 M de Imidazol.

Nenhum dos métodos utilizados resultou em a proteína purificada. No gel (F), referente a purificação obtida a partir da extração utilizando 200 mM de NaCl é possível visualizar duas bandas nas frações 2 e 3 de imizadol, mas o tamanho da banda (150 KDa) não corresponde a proteína de interesse (aproximadamente 100 KDa), podendo ser uma banda presente da *E.coli*.

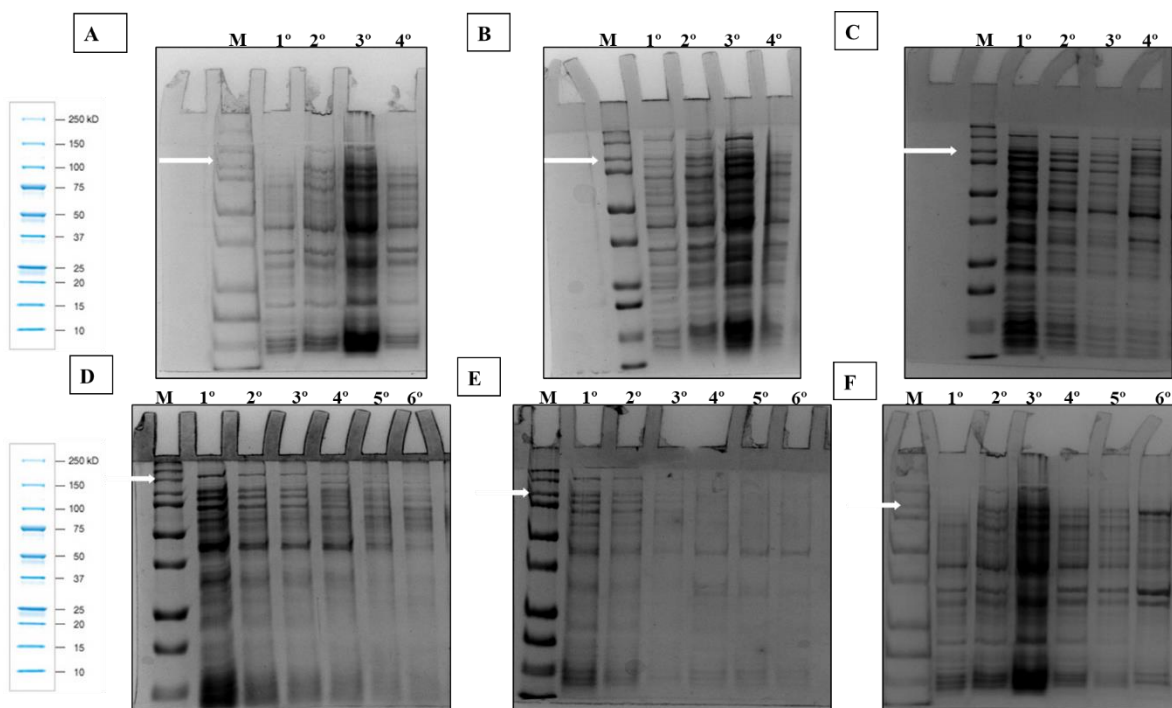


Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page). Testes de purificação de expressão enzimática nas temperaturas de 37°C nas concentrações de 1,0 mM IPTG. Amostras: M: marcador de tamanho molecular Bio-Rad Dual Color; Sendo A extratos de extração da proteína nativa sem imidazol (1°-4° frações da extração), D extratos de purificação da proteína 1° fração do extrato sem imidazol e os demais (2° ao 6°) com imidazol nas concentrações 15 mM, 50 mM, 100 mM, 1 M, Sendo B extratos de extração da proteína nativa com imidazol com a adição de NaCl 100 mM (1°-4° frações da extração), E extratos de purificação da proteína com imidazol com a adição de NaCl 100 mM: 5 mM, 10 mM, 15 mM, 50 mM, 100 mM, 1 M totalizando 6 extratos (1° ao 6°), Sendo C extratos de extração com imidazol com a adição de NaCl 200 mM (1°-4° frações da extração), F extratos de purificação da proteína com imidazol com a adição de NaCl 200 mM: 5 mM, 10 mM, 15 mM, 50 mM, 100 mM, 1 M totalizando 6 extratos (1° ao 6°). A seta branca indica aonde a banda de purificação deveria estar, em aproximadamente 100 kDa.

6. DISCUSSÃO

6.1. Anotação de uma CB10 β -manosidases: GH2 convencional versus CAZymes semelhantes associadas a Pul-like

Bactérias do filo Bacteroidetes são agentes degradadores de carboidratos complexos que codificam coletivamente uma ampla diversidade de GHs em seus genomas, incluindo enzimas secretadas convencionais e enzimas especiais localizadas em grupos de genes denominados " Polysaccharide Utilization Loci ", ou PUL (Thomas et al., 2011; El Kaoutari et al., 2013). Os PULs possuem mecanismos

bastante complexo, com a organização de algumas carboidrases fixadas na membrana plasmática ou confinadas no espaço periplasmático, além da presença de canais específicos para a entrada de oligossacarídeos nas células (SusC/TonB) e proteínas ligantes de polissacarídeos (SusD), estas últimas atuando para conectar bactérias à fonte de carbono. Cada PUL codifica proteínas específicas envolvidas no reconhecimento, ligação e hidrólise de um tipo particular de carboidrato (Martens et al., 2009). Um exemplo disso pode ser observado em um estudo recente em que a bactéria *Chitinophaga pinensis* em cultivo com conjugados de manana induziu a expressão de hidrolases ativas de carboidratos, provavelmente pela ação de PULs (Larsbrink et al., 2017). Do ponto de vista do arsenal enzimático biológico, a bactéria *Chitinophaga* sp. CB10 do filo Bacteroidetes objeto deste estudo, é extremamente promissora, contendo uma variedade de CAZymes (350 domínios previstos), e estudos ainda em andamento indicam fortemente que CB10 é uma nova espécie do gênero *Chitinophaga* (Funniceili, 2018, dados não publicados). A maioria desses CAZymes corresponde a GHs (202), dos quais 27% estavam localizados em cerca de trinta vias semelhantes a PUL identificadas ao longo de todo o genoma, incluindo uma GH2 β -manosídeses semelhante a PUL associada (CB10-00347, Figura 6) e uma GH2 β -manosídeses sem associação a qualquer grupo de genes (CB10-153.446). A análise de homologia dessas enzimas por alinhamento global (BlastP/NCBI) contra o banco de dados "UniProtKB/SwissProt não redundante" indica um alto grau de novidade, uma vez que as sequências compartilham entre 28-43% de identidade com enzimas previamente caracterizadas (Funniceili 2018, dados não publicados).

6.2. CB10 β -manosídesase: GH2 CAZymes mais próximas de *Bacteroides* spp.

Nos resultados do dendrograma fenético (Figura 7) a sequência de CB10-153.446 agrupou-se com a sequência Q8AAK6, uma GH2 β -manosídesase de *Bacteroides thetaiotaomicron*, denominada BtMan2. *B. thetaiotaomicron* pertence à microbiota intestinal humana natural e tem um papel importante no equilíbrio da saúde humana. A BtMan2 apresentou um pH ótimo de 5,6 e tolerância térmica de até 58 °C, o que pode ser especialmente útil para processos industriais. Curiosamente, a enzima

mostrou-se completamente resistente a ataques proteolíticos, indicando que é uma enzima adequada para atuar como uma hidrolase extracelular. Essa resistência é perfeitamente compatível com sua adaptação à seu ambiente, uma vez que o intestino é rico em secreção de enzimas proteolíticas (Tailford et al., 2007). Por inferência de homologia, esses resultados contribuem com a hipótese de que CB10-153.446 é uma enzima extracelular, o que é reforçado por anotações sem associação a qualquer cluster PUL.

Por sua vez, a sequência putativa da GH2 β -manosidase CB10-00347 agrupou-se com as sequências ainda não caracterizadas, de forma que mais estudos serão necessários para entender seu papel no metabolismo de *Chitinophaga* sp. CB10. Além disso, a CB10-00347 foi prevista pelo software Prokka como um "precursor de exo-beta-D-glucosaminidase", provavelmente devido a um de seus três domínios ser reconhecido no Banco de dados do Pfam (<http://pfam.xfam.org/>): domínios Glyco_hydro_2, Glyco_hydro_2C e Exo-beta-D-glucosaminidase. De acordo com Côté e colaboradores (2006), várias exo-beta-D-glucosaminidase (GlcNase) foram anotadas em bancos de dados como β -manosidases putativas, o que dificulta a predição por homologia, frequentemente exigindo etapas experimentais para a classificação correta. Além disso, CB10-00347 teve um nível de expressão substancial no bagaço, que não possui nenhum substrato GlcNase (ou seja, hidrolisados de quitosana, muitas vezes de fontes de fungos), o que sustenta a hipótese de que se trata de uma nova β -manosidase.

6.3. Padrão de crescimento de CB10 contra diferentes fontes de carbono

Bactérias do gênero *Chitinophaga* sp. têm um amplo espectro de fontes de carbono assimiláveis para seu desenvolvimento, sejam essas fontes formadas por uma estrutura simples, como dextrina, maltose, trealose, celobiose, gentiobiose, sacarose, turanose, estaquiose, lactose, melibiose, metil bD-glicosídeo, D- salicina, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-bD-manosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido N-acetil-neura-minico, a-D-glicose, D-manose, D-frutose, D -galactose, D-fucose, L-ramnose, D-sorbitol, D-manitol, entre muitos outros (Lv YY et al., 2018) ou por vários

tipos de polissacarídeos complexos como glucomanano, galactomanano, biomassa lignocelulósica de madeira macia (McKee et al., 2015; Larsbrink et al., 2017), biomassa de fungos mortos (McKee et al., 2019) ou biomassa de gramíneas, como o bagaço da cana-de-açúcar (Kishi et al., 2017). Em relação à capacidade de cultivo em diferentes substratos, nossos resultados mostraram que em meio sólido, CB10 foi capaz de se desenvolver em diferentes fontes de carboidratos, como carboximetilcelulose, goma *Aloe vera* e galactomanana, revelando um grande potencial de plasticidade nutricional, o que concorda com a grande variedade de CAZymes preditas neste organismo.

O Vermelho Congo é um corante solúvel em água, capaz de corar celulose, fibrilas amilóides, produtos de amido agrícola e outros polissacarídeos, o que o torna uma boa ferramenta de teste para indicar o consumo de polissacarídeos por crescimento bacteriano em um meio de cultura (Lamb et al., 2005). Assim, utilizamos esse corante para corar as placas e destacar o contorno da colônia e possíveis halos. Aparentemente, nas condições de cultivo avaliadas para o substrato em meio sólido, os substratos mais complexos (Manana presentes nos extratos das plantas de *Aloe vera* e, goma de alfarroba) poderiam oferecer mais nutrientes do que as fontes mais simples (Glicose e CMC), o que parece ter dado aos substratos complexos maiores vantagens sobre as fontes de carbono simples em condições de crescimento estático (Figura 8).

A goma do extrato vegetal de *Aloe vera* é composta predominantemente por carrisina e acetomanano linear, sua estrutura é composta de resíduos D-manosil ligados a β - (1 $\rightarrow$ 4), com C-2 ou C-3 acetilado e algumas cadeias laterais principalmente de galactose ligadas a C-6 (Moreira et al., 2008). A goma de alfarroba é formada por algumas impurezas residuais (1,2% de minerais e extratos vegetais) e principalmente por um polissacarídeo galactomanano neutro composto de unidades de manose espaçadas a cada quatro unidades por ramos laterais de unidades de galactose (Moreira et al., 2008) (Sigma Aldrich®). A galactomanana é alvo de pesquisas em diversos campos da biotecnologia, principalmente na indústria de alimentos, como espessante, sendo um aditivo alimentar com baixa toxicidade e baixo custo de disponibilidade (Urdiain et al., 2004).

Em Bacteroidetes, PULs são identificados como o principal meio pelo qual a produção de CAZymes é regulada em resposta à disponibilidade de carboidratos (Martens et al., 2009). Além disso, a literatura recentemente relatou a importância de sistemas reguladores semelhantes aos PULs em outros filos, como o mecanismo relacionado ao uso de manana em *Bacillus* sp. em *Firmicutes* (Song et al., 2018). Muitas das enzimas da via PUL são responsáveis pela desconstrução natural da biomassa, a fim de adquirir nutrição do material vegetal em decomposição. Essas importantes enzimas presentes nos genomas microbianos são consideradas uma rica fonte de enzimas úteis industrialmente (Wang et al., 2013; Martens et al., 2009).

No entanto, embora a ancoragem de enzimas hidrolíticas de PULs em estruturas fixas na membrana bacteriana e parede celular facilite a absorção celular de monossacarídeos hidrolisados, ela impede a dispersão das enzimas no meio extracelular. Essa característica pode levar relativamente à falta de halos densos nas placas de cultura sólida, uma vez que não há dispersão da maioria das hidrolases no sistema fora dos limites da colônia. Como pode ser visto nas placas de polissacarídeos coradas com vermelho Congo (Figura 8), o consumo do polissacarídeo pode ser observado nas regiões de borda da colônia, marcadas por regiões mais claras que os arredores, sem grandes sinais de dispersão ao longo da placa. Isso pode indicar que no período de 96 horas, para o cultivo estático dos substratos avaliados, aparentemente não foram produzidas enzimas que foram excretadas em sistemas livres pela bactéria, havendo apenas enzimas de alguma forma associadas à parede bacteriana, seja por transmembrana ou potencialmente associada a um sistema semelhante a PUL.

6.4. Expressão diferencial de manosidases em bagaço versus glicose

De forma similar ao cultivo estático (meio de cultura sólido), o microrganismo também apresentou um crescimento vigoroso na cultura sob agitação (meio de cultura líquido), inclusive em tratamentos em que apenas substratos naturais foram utilizados como fontes de carbono e nutrientes (bagaço de cana-de-açúcar, *Aloe vera* e gomas galactomanana). Apesar disso, entre estas fontes de carbono naturais apenas a hidrólise da galactomanana permitiu a detecção de oligossacarídeos no meio de

cultura, o que indica que os açúcares liberados foram utilizados quase que inteiramente no desenvolvimento da cultura bacteriana para os outros tratamentos.

Os oligossacarídeos possuem diversas aplicações em diversos campos dentro de biorrefinarias de biomassas, tais como; indústrias farmacêuticas, nutracêutica, cosmética e alimentícia. Dentre as biomassas vegetais, as culturas alimentares são muito promissoras para facilitar a obtenção de oligossacarídeos pela biorrefinaria, principalmente celoligossacarídeos (COS), pectooligossacarídeos (POS), xilooligossacarídeos (XOS) e outros, considerados menos abundantes, como oligômeros contendo manose, arabinose, galactose e diversos açúcares ácidos (Cano et al., 2020). Considerando que os oligossacarídeos mais abundantes são facilmente obtidos de diferentes fontes, como, por exemplo, o que ocorre com o processo de auto-hidrólise de diferentes biomassas (ex: sabugo de milho, casca de arroz, casca de cevada, broto de videira, casca de castanha e casca de amendoim, entre outros) que resultam na produção de oligossacarídeos (Cano et al., 2020), novas abordagens precisam ser desenvolvidas para expandir a disponibilidade de oligômeros raros. Entre essas novas abordagens, podemos citar a busca por novas enzimas, bem como a busca por biomassas não óbvias, mesmo aquelas compostas por conteúdo de oligômero menos direcionado, uma vez que novas fontes de materiais têm maior chance de sucesso na produção de novos insumos químicos.

Frequentemente, o baixo teor de manana (0,2%) no bagaço da cana-de-açúcar não se destaca nos estudos de bioenergética e biorrefinaria dessa biomassa, uma vez que o foco desses estudos são as xilanas da hemicelulose e os açúcares fermentescíveis derivados da celulose (Brienzo et al., 2016). No entanto, oligossacarídeos de diferentes complexidades podem ser obtidos por meio de biorrefinarias de biomassa, que podem ter propriedades únicas (Martin et al., 2011). Conforme relatado anteriormente, CB10 foi isolada de um consórcio bacteriano degradador de lignocelulose obtido de uma pilha de bagaço de cana-de-açúcar, e seu genoma tem plasticidade impressionante para degradação de carboidratos em seus duzentos GHs, entre outros domínios de CAZymes. A funcionalidade desses GHs é evidenciada na habilidade desse organismo em usar fontes de carbono de diferentes graus de complexidade (Figura 8), e essas enzimas parecem fazer parte do complexo enzimático responsável por atuar no metabolismo da acetomanana e galactomanana,

permitindo que o microrganismo sobreviva usando essas fontes de carbono ricas em manana.

Uma vez comprovada a existência de enzimas funcionais para mananases no isolado CB10, e considerando que estudos recentes relataram mecanismos de expressão de mananases em *Chitinophaga pinensis* para compostos ricos em gluco e galactomanana (Larsbrink et al 2017; McKee et al., 2019), o objetivo deste estudo foi investigar se as duas β -manosidases anotadas no genoma estariam expressas no bagaço de cana, onde as porções do polímero contendo manose são aparentemente desprezíveis, enquanto a abundância de outros polímeros é evidente (Brienzo et al., 2016).

Os resultados mostraram considerável expressão gênica após 96 horas de cultivo no bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono: cerca de cinco vezes mais do que o observado para o controle de expressão negativa (glicose), permanecendo estável por 144 horas. embora outras estruturas de carbono mais abundantes estivessem presentes no bagaço da cana-de-açúcar esta fonte de carbono estimulou a expressão de mananases. Isso indica que novos estudos detalhando a composição química para diversas frações durante o curso de tempo de degradação podem levar à descoberta de novos intermediários oligossacarídeos. Em seguida, as taxas do novo composto poderiam ser incrementadas pelo uso de coquetéis enzimáticos purificados, bem como pelo uso de organismos modificados para priorizar rotas bioquímicas raras em vez das mais abundantes.

6.5. Extração e purificação da proteína recombinante

As análises de tentativas de expressão da proteína recombinante β -manosidases em *E. coli* ocorreu em diferentes condições de temperatura (25°C; 30 °C; e 37°C), diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM), a fim de verificar a influência dessas condições, sobre a expressão da proteína recombinante. Apesar das inúmeras tentativas a proteína não foi expressa.

Trabalhos anteriores relatam algumas desvantagens de utilizar a *E. coli* como célula hospedeira, o metabolismo em si da bactéria possui algumas intrinsidades que fazem com que a proteína não seja expressa em sua correta conformação original,

além da proteína não sofrer glicosilação (Swartz, 2001), ou dobramento incorreto, o alto nível de expressão citoplasmática pode resultar na formação de agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão (Baneyx, 1999).

Como a proteína não foi detectada super expressa nem no pellet e nem no sobrenadante, ela pode ter sido degradada pela ação de proteases, ou mesmo não expressa por deficiências na fase transcricional, como por exemplo falta de otimização de códon para expressão em *E. coli* como hospedeiro, o que pode levar ineficiência de transcrição por ausência de tRNAs raros (Baneyx, 1999).

Considerando que, embora de forma não diferencial do controle anterior a indução (T0) existe uma banda proteica fraca na altura esperada (seta, 100 KDa), pode ter ocorrido um escape de expressão basal potencialmente tóxico para o hospedeiro, o que de alguma forma pode ter acionado mecanismos de defesa celular do microrganismo a fim de impedir a indução enzimática, seja em níveis transcricionais, seja em fase de dobramento pós traducional. Novos estudos, utilizando novas cepas como a BI21 Plys, que é indicada para expressão de proteínas tóxicas; a C43, que é indicada para expressão de proteínas difíceis ou de membrana e mesmo a Artics, que possui chaperonas para auxiliar o dobramento correto proteico, poderão propiciar a expressão do gene de interesse, permitindo que o potencial revelado no presente trabalho possa ser explorado para obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados revelaram que a bactéria CB10 é capaz de ativar seu metabolismo relacionado à degradação da manana mesmo em condições onde a quantidade do composto é extremamente baixa (0,2% no bagaço), expressando tanto uma enzima relacionada ao mecanismo PUL quanto uma aparentemente de desempenho independente, cuja expressão é cerca de 14% superior. Os resultados mostraram uma expressão gênica considerável e estável para o período de 96 horas, sendo que esses níveis permaneceram praticamente os mesmos para a fase de declínio (144 horas). O alto número de domínios CAZyme identificados no CB10 aparentemente confere plasticidade ao organismo, permitindo que ele se desenvolva em todas as fontes de carbono avaliadas. A capacidade de utilizar diferentes

biomassas vegetais como fonte de carbono também indica um alto potencial para a produção de enzimas para aplicações biotecnológicas em diversos campos, como na indústria alimentícia e farmacêutica, sendo ainda corroborada pela literatura que indica que a hidrólise da biomassa do bagaço de cana-de-açúcar e do *Aloe vera* e as gomas de alfarroba são amplamente promissoras para a produção de carboidratos funcionais de baixa toxicidade. A proteína β -manosidases, apesar das inúmeras tentativas de otimização não foi expressa e nem purificada, no entanto as outras análises sensíveis descritas acima revelaram que esta proteína foi detectada e que apresentou grande potencial na produção de oligossacarídeos, nossos esforços podem ser utilizados para o aprimoramento e obtenção desta proteína futuramente, visto que não são poucos os relatos na literatura que indicam dificuldades durante o processo de obtenção de uma proteína heteróloga, indicando que este processo é extremamente variável para cada proteína, sendo que o caminho do êxito na expressão heteróloga perpassa por diversos percalços relativos a uma abordagem empírica fundamentada em tentativa/erro e eventualmente acerto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abt, B., Foster, B., Lapidus, A., Clum, A., Sun, H., Pukall, R., ... & Klenk, H. P. (2010). Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134 T). **Standards in genomic sciences**, 3(1), 15-25.

Ademark P, De Vries RP, Hägglund P, Ståhlbrand H, Visser J (2001) Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation. **European Journal of Biochemistry** 268:2982–2990.

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, 29(6), 675-685.

Aizemberg, R. et al. (2011). Optimal Conditions for Biomass and Recombinant Glycerol Kinase Production Using the Yeast *Pichia pastoris*. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 49, n. 3, p. 329–335.

Amorim, C.; Silvério, S. C.; Prather, K. L. J.; Rodrigues, L. R. (2019a). From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 0–1.

Asano, I., Hamaguchi, K., Fujii, S., & IINO, H. (2003). In vitro digestibility and fermentation of manooligosaccharides from coffee mannan. **Food Science and Technology Research**, 9(1), 62-66.

Azevedo, J.L. Genética de Microrganismos. (2008). Baneyx. F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. 10(5):411-21. 1999.

Baneyx. F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. 10(5):411-21. 1999.

Bjursell MK, Martens EC, Gordon JI. (2006). Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. **Journal of biological chemistry**. 281:36269–36279.

Börjesson, M., & Westman, G. (2015). Crystalline nanocellulose—preparation, modification, and properties. **Cellulose-fundamental aspects and current trends**, 159-191.

Bremner, I.; Wilkie, K. C. B. (1971). The hemicelluloses of bracken: Part II. A galactoglucomannan. **Carbohydrate Research**, v. 20, n. 2, p. 193-203.

Brienzo M, Carvalho AFA, Figueiredo FC, Neto PO (2016). Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. **Food waste: Practices, management and challenges**.; 155-188.

Brummer, V., Skryja, P., Jurena, T., Hlavacek, V., & Stehlik, P. (2014). Suitable technological conditions for enzymatic hydrolysis of waste paper by Novozymes® Enzymes NS50013 and NS50010. **Applied biochemistry and biotechnology**, 174(4), 1299-1308.

Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, 41(5), 653.

Bustamante Filho, I. C. Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen. Tese (Doutorado em Zootecnia), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, 25(2), 169-193.

Canilha, L., Kumar Chandel, A., dos Santos Milessi, T.S., Fernandes Antunes, F.A., da Costa Freitas, W.L., das Graças Almeida Felipe, M. e da Silva, S.S. (2012). Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of biomedicine & biotechnology** 1–15.

Cano ME, Garcí'a-Martin A, Morales PC, Wojtusik M, Santos VE, Kovensky J et al. Ladero M. (2020) Production of Oligosaccharides from Agrofood Wastes. **Fermentation.**; 6: 31.

Carbohydrate-Active enZymes Database. Glycoside Hydrolase family classification [Internet]. Available from: <http://www.cazy.org/>.

Cerveró, J. M., Skovgaard, P. A., Felby, C., Sørensen, H. R., & Jørgensen, H. (2010). Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for production of bioethanol. **Enzyme and microbial technology**, 46(3-4), 177-184.

Costa, D. A. L., & Ferreira Filho, E. X. (2019). Microbial β -mannosidases and their industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, 103(2), 535-547.

Chauhan PS, Soni SK, Sharma P, et al. (2014b). A mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11: statistical optimization of production and application in biobleaching.

Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P., & Gupta, N. (2012). Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Applied microbiology and biotechnology**, 93(5), 1817-1830.

Chauhan, P. S., Sharma, P., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Purification and characterization of an alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in mannoooligosaccharides preparation having prebiotic potential. **European Food Research and Technology**, 238(6), 927-936.

Chen, H., & Wang, L. (2017). Enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. Technologies for **Biochemical Conversion of Biomass**, 65-99.

Copete-Pertuz, Ledys S. et al. (2019) Enhancement of ligninolytic enzymes production and decolourising activity in *Leptosphaerulina* sp. by co-cultivation with *Trichoderma viride* and *Aspergillus terreus*. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 1536-1545.

Cunha, J. R. B., Santos, F. C. P. D., Assis, F. G. D. V. D., & Leal, P. L. (2016). Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. **Revista Ceres**, 63(5), 597-604.

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic acids research**, 37(suppl_1), D233-D238.

Côté, N., Fleury, A., Dumont-Blanchette, É., Fukamizo, T., Mitsutomi, M., & Brzezinski, R. (2006). Two exo- β -D-glucosaminidases/exochitosanases from actinomycetes define a new subfamily within family 2 of glycoside hydrolases. **Biochemical Journal**, 394(3), 675-686.

Canilha, L., Milagres, A. M. F., Silva, S. S., Silva, J. A., Felipe, M. G. A., Rocha, G. J. M., & Carvalho, W. (2010). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, 44, 48-54.

Constancio, M. T. L., Sacco, L. P., Campanharo, J. C., Castellane, T. C. L., de Oliveira Souza, A. C., Weiss, B., & Alves, L. M. C. (2020). Exploring the Potential of Two Bacterial Consortia to Degrade Cellulosic Biomass for Biotechnological Applications. **Current Microbiology**, 77(10), 3114-3124.

Day, U. S. P. et al. (2015). Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041–1054, 2016.

Dhawan, S., & Kaur, J. (2007). Microbial mannanases: an overview of production and applications. **Critical reviews in biotechnology**, 27(4), 197-216.

Desiderato, J. G., Alvarenga, D. O., Constancio, M. T., Alves, L., & Varani, A. M. (2018). The genome sequence of *Dyella jiangningensis* FCAV SCS01 from a lignocellulose-decomposing microbial consortium metagenome reveals potential for biotechnological applications. **Genetics and molecular biology**, 41(2), 507-513.

Dong, W. W., Kong, D. L., Zhang, Q., Zhu, J., Wang, Y. W., Song, J. L., & Ruan, Z. Y. (2018). *Chitinophaga salinisoli* sp. nov., isolated from saline soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, 111(2), 265-273.

De cassia Pereira, J. et al. (2015). Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928-939.

De Oliveira Rodrigues, P., Gurgel, L. V. A., Pasquini, D., Badotti, F., Góes-Neto, A., & Baffi, M. A. (2020). Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, 145, 2683-2693.

El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., & Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, 11(7), 497-504.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: A justification. **Evolution**, 39, 783-791.

Farinas, Cristiane S. (2018). Solid-state fermentation for the on-site production of cellulolytic enzymes and their use in the saccharification of lignocellulosic biomass. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Elsevier**. p. 169-183.

Ferreira, J. A., Mahboubi, A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. **Bioresource technology**, 215, 334-345.

Foley, M. H., Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). The Sus operon: a model system for starch uptake by the human gut Bacteroidetes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 73(14), 2603-2617.

Funnicelli, M.I.G. (2018). **Explorando uma comunidade bacteriana isolada de uma pilha de bagaço de cana-de-açúcar e seu potencial funcional na degradação de biomassa lignocelulósica**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Gama-Castro, S., Salgado, H., Santos-Zavaleta, A., Ledezma-Tejeida, D., Muñiz-Rascado, L., García-Sotelo, J. S., ... & Collado-Vides, J. (2016). RegulonDB version 9.0: high-level integration of gene regulation, coexpression, motif clustering and beyond. **Nucleic acids research**, 44(D1), D133-D143.

Gambarato, B. C. Isolamento e caracterização de ligninas de palha de cana-de-açúcar, Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo), 111 fls, 2014.

Gasser, B.; Mattanovich, D. (2007). Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? **Biotechnology letters**, v. 29, n. 2, p. 201–12.

Gautério, G. V.; Vieira, M. C.; Gonçalves, L. G. G.; Hübner, T.; Sanzo, A. V.L.; Kalil, S. J. (2018). Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335–345.

Gurung, Neelam et al. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed research international**, v. 2013.

Hamaker, B. R., & Tuncil, Y. E. (2014). A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. **Journal of molecular biology**, 426(23), 3838-3850.

Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, 50(9), 1327-1341.

Henrissat, B., & Davies, G. J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. **Plant physiology**, 124(4), 1515-1519.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. Kinetic (1993) PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company** 11, 1026-1030.

Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., & Eijsink, V. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels** 5: 45.

Ham, S. J., Lee, H. J., Cho, H. Y., Kim, J. H., Kim, Y. J., Shin, D. H., ... & Park, H. Y. (2011). Cloning and characterization of a modular GH5 β -1, 4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. **Bioresource technology**, 102(19), 9185-9192.

Huang, L., Zhang, H., Wu, P., Entwistle, S., Li, X., Yohe, T., & Yin, Y. (2018). dbCAN-seq: a database of carbohydrate-active enzyme (CAZyme) sequence and annotation. **Nucleic Acids Research**, 46 (D1), D516-D521.

Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids.*; 41:95–98.

Huang, C.-J.; Lin, H.; Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–399.

Ishii J, Okazaki F, Djohan AC, Hara KY, Asai-Nakashima N, Teramura H, et al. (2016) From mannan to bioethanol: cell surface co-display of β -mannanase and β -mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Biofuels**. Sep 2;9(1):188.

Irmak, S. (2017). Biomass as Raw Material for Production of High-Value Products. In: Jaya Shankar Tumuluru (Eds.), Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy. London: IntechOpen, p. 201–225.

Jin, D., Kong, X., Wang, J., Sun, J., Yu, X., Zhuang, X., ... & Bai, Z. (2018). *Chitinophaga caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 68(7), 2209-2213.

Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A. K., & Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology and applied biochemistry**, 35(2), 91-105.

Jian H, Zhu LW, Zhang WM, Sun DF, Jiang JX. (2013). Enzymatic production and characterization of manno- 639 oligosaccharides from *Gleditsia sinensis* galactomannan gum. **International Journal of Biological Macromolecules** Apr; 55:282-8.

Kamm, B., Gruber, P. R., & Kamm, M. (Eds.). (2006). Biorefineries-industrial processes and products Weinheim: **Wiley-VCH Journal** (No. 1).

Kong, X. K., Chen, D., Huang, J. W., Cheng, X. K., & Jiang, J. D. (2019). *Chitinophaga deserti* sp. nov., isolated from desert soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 69(6), 1783-1788.

Kılıç, S., White, E. R., Sagitova, D. M., Cornish, J. P., & Erill, I. (2014). CollecTF: a database of experimentally validated transcription factor-binding sites in Bacteria. **Nucleic acids research**, 42(D1), D156-D160.

Kishi, L. T., Lopes, E. M., Fernandes, C. C., Fernandes, G. C., Sacco, L. P., Alves, L. M. C., & Lemos, E. G. (2017). Draft genome sequence of a Chitinophaga strain isolated from a lignocellulose biomass-degrading consortium. **Genome announcements**, 5(3).

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, 33(7), 1870-1874.

Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current microbiology**, 57(5), 503-507.

Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, 48(8), 3713-3729.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic acids research**, 42(D1), D490-D495.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lv, Y. Y., Zhang, X. J., Li, A. Z., Zou, W. L., & Zhu, H. H. (2018). *Chitinophaga varians* sp. nov., isolated from forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 68(7), 2139-2144.

Lamb, J., & Loy, T. (2005). Seeing red: the use of Congo Red dye to identify cooked and damaged starch grains in archaeological residues. **Journal of Archaeological Science**, 32(10), 1433-1440.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–5.

Larsbrink, J., Tuveng, T. R., Pope, P. B., Bulone, V., Eijsink, V. G., Brumer, H., & McKee, L. S. (2017). Proteomic insights into mannan degradation and protein secretion by the forest floor bacterium *Chitinophaga pinensis*. **Journal of proteomics**, 156, 63-74.

Leite, Rogério Fagundes. (2016). **Fracionamento de lignina de bagaço de cana: caracterização e eletrofiação**. Tese (Doutorado em Ciência de Materiais) - Universidade Federal de Pernambuco, Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/17655>.

Leonel, T. F., Pepe, E. S. G., Castellane, T. C. L., Vantini, J. D. S., Funniceili, M. I. G., & Lemos, E. G. D. M. (2021). Bagasse minority pathway expression: Real time study of GH2 β -mannosidases from bacteroidetes. **PloS one**, 16(3), e0247822.

Lepcha, Khusboo; GHOSH, Shilpi. (2018). Glycoside hydrolases from a thermophilic microbial consortium and their implication in the saccharification of agroresidues. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 15, p. 160-166.

Marques, Natália Paganini et al. (2018). Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75.

Martens, E. C., Kelly, A. G., Tauzin, A. S., & Brumer, H. (2014). The devil lies in the details: how variations in polysaccharide fine-structure impact the physiology and evolution of gut microbes. **Journal of molecular biology**, 426(23), 3851-3865.

Martens EC, Lowe EC, Chiang H, Pudlo NA, Wu M, McNulty NP, Abbott DW, Henrissat B, Gilbert HJ, Bolam DN, Gordon JI. (2011). Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. **PLoS Biol** 9:e1001221.

Malgas, S., van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2015). A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. **World journal of microbiology and biotechnology**, 31(8), 1167-1175.

Martens, E. C., Koropatkin, N. M., Smith, T. J., & Gordon, J. I. (2009). Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes Sus-like paradigm. **Journal of Biological Chemistry**, 284(37), 24673-24677.

Martin, C., Puls, J., Saake, B., & Schreiber, A. (2011). Effect of glycerol pretreatment on component recovery and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose Chemistry and Technology**, 45(7), 487.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, 31(3), 426-428.

Moreira, L. R. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology Biotechnology**, 79, 165-178.

McKee LS, Martínez-Abad A, Ruthes AC, Vilaplana F, Brumer H. (2019). Focused Metabolism of β -Glucans by the Soil Bacteroidetes Species *Chitinophaga pinensis*. **Applied Environmental Microbiology**. 9;85(2): e02231-18.

Menezes, B. S.; Rossi, D. M.; Ayub, M. A. Z. (2017). Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–12.

McKee LS, Brumer H. (2015). Growth of *Chitinophaga pinensis* on Plant Cell Wall Glycans and Characterisation of a Glycoside Hydrolase Family 27 β -l-Arabinopyranosidase Implicated in Arabinogalactan Utilisation. **PLoS One**. 8;10(10):e0139932.

McMillan JD (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. **American Chemical Society**, pp 292-324.

Mohnot, D., Biswas, R., & Bisaria, V. S. (2016). Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Residues. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, 543-560.

Mood Haghighi, S. et al. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93.

Naidu, Y.; Siddiqui, Y.; Idris, A. S. (2020). Comprehensive studies on optimization of lignohemicellulolytic enzymes by indigenous white rot hymenomycetes under solid-state cultivation using agro-industrial wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 259, p. 110056.

Nnolim, N. E.; Okoh, A. I.; Nwodo, U. U. (2020). Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00483.

Novais, C. M.; Pires-Alves, M. (2004). PCR em tempo real. Uma Inovação Tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. 33.

Notredame, C. (2000). higgins, DJ, heringa, J. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. **Journal of Molecular Biology**, 302, 205-217.

Omori, W. P., Pinheiro, D. G., Kishi, L. T., Fernandes, C. C., Fernandes, G. C., Gomes-Pepe, E. S., & de Souza, J. A. (2019). Draft genome of *Thermomonospora* sp. CIT 1 (Thermomonosporaceae) and in silico evidence of its functional role in filter cake biomass deconstruction. **Genetics and molecular biology**, 42(1), 145-150.

Odetallah NH, Ferket PR, Grimes JL, McNaughton JL (2002) Effect of mannan-endo-1,4-beta-mannosidase on the growth performance of turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meal. **Poultry Science** 81:1322–1331.

Parkinson PG. (1983). The typification and status of the name *Chaetangium* (algae). **Taxon.**; 32.4: 605-610.

Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**. Jun;67(5):577-91.

Pereira, G. F.; Bastiani, D. De; Gabardo, S.; Squina, F.; Ayub, M. A. Z. (2018). Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 78–85.

Pereira Scarpa, J. DE C. et al. (2019). Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141 p. 111795.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T. e Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. **International Microbiology**, 5: 53–63.

Petridis, L., & Smith, J. C. (2018). Molecular-level driving forces in lignocellulosic biomass deconstruction for bioenergy. **Nature Reviews Chemistry**, 2(11), 382-389.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, n.9, p.2002-2007.

Proença, D. N., Whitman, W. B., Shapiro, N., Woyke, T., Kyrpides, N. C., & Morais, P. V. (2017). Draft genome sequence of the cellulolytic endophyte *Chitinophaga costaii* A37T2 T. **Standards in genomic sciences**, 12(1), 1-7.

Rabelo, S. C. et al. (2014). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357.

Ragauskas AJ, Beckham GT, Biddy MJ, Chandra R, Chen F, Davis MF, Davison BH, Dixon RA, Gilna P, Keller M, Langan P, Naskar AK, Saddler JN, Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Wyman C (2014) Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. **Science** 344:1246843.

Rahmani N, Kashiwagi N, Lee J, Niimi-Nakamura S, Matsumoto H, Kahar P, Lisdiyanti P, Yopi PB, Ogino C, Kondo A (2017) Mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Kitasatospora* sp. isolated in Indonesia and its potential for production of mannoooligosaccharides from mannan polymers. **AMB Express** 7:100.

Reddy, S. K., Rosengren, A., Klaubauf, S., Kulkarni, T., Karlsson, E. N., de Vries, R. P., & Stålbrand, H. (2013). Phylogenetic analysis and substrate specificity of GH2 β -mannosidases from *Aspergillus* species. **FEBS letters**, 587(21), 3444-3449.

Ramos, L. P., da Silva, L., Ballem, A. C., Pitarelo, A. P., Chiarello, L. M., & Silveira, M. H. L. (2015). Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource technology**, 175, 195-202.

Renzi, F., Manfredi, P., Dol, M., Fu, J., Vincent, S., & Cornelis, G. R. (2015). Glycan-foraging systems reveal the adaptation of *Capnocytophaga canimorsus* to the dog mouth. **MBio**, 6(2).

Rodrigues, P. DE O. et al. (2017) Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 173–181, 2017.

Rosnow, J. J., Anderson, L. N., Nair, R. N., Baker, E. S., & Wright, A. T. (2017). Profiling microbial lignocellulose degradation and utilization by emergent omics technologies. **Critical reviews in biotechnology**, 37(5), 626-640.

Sangkhobol, V., & Skerman, V. B. D. (1981). Chitinophaga, a new genus of chitinolytic myxobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 31(3), 285-293.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. 1987 Jul;4(4):406-25.

Santos, C.A., Morais, M.A.B., Terrett, O.M., Lyczakowski, J.J., Zanphorlin, L.M., Ferreira-Filho, J.A., Tonoli, C.C.C., Murakami, M.T., et al. (2019). An engineered GH1 β -glucosidase displays enhanced glucose tolerance and increased sugar release from lignocellulosic materials. **Scientific Reports** 9: 1–10.

Santos, Fernando A.; QUEIRÓZ, José H. de. (2012) Potential of sugarcane straw for ethanol production. **Química Nova**, v. 35, p. 1-1, 1.

Schmittgen, T.D.AND LIVAK, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, 3(6), 1101-1104.

Seghetta, M. et al. (2016). Life cycle assessment of macroalgal biorefinery for the production of ethanol, proteins and fertilizers – A step towards a regenerative bioeconomy. **Journal of Cleaner Production**, v. 137, p. 1158–1169.

Shallom, D.; Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228.

Silva, R., Haraguchi, S. K., Muniz, E. C., & Rubira, A. F. (2009). Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, 32(3), 661-671.

Silva, V. F. N. et al. (2011). Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 809–817.

Silveira, M. H., Vanelli, B. A., & Chandel, A. K. (2018). Second generation ethanol production: potential biomass feedstock, biomass deconstruction, and chemical platforms for process valorization. In **Advances in Sugarcane Biorefinery** (pp. 135-152).

Singh, G., Verma, A. K., & Kumar, V. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. **3 Biotech**, 6(1), 3.

Singh, J., Suhag, M., & Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. **Carbohydrate polymers**, 117, 624-631.

Soccol, C. R., Costa, E. D., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Vandenberghe, L. D. S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation** 1: 52–71.

Schomburg I, Chang A, Schomburg D. (2002) BRENDA, enzyme data and metabolic information. **Nucleic Acids Resource**. Jan 1;30(1):47-9.

Schmittgen TD, Livak KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**.;3(6):1101-8.

Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**. 12(2):195-201.

Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology** 83:11.

Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Buchert, J., & Viikari, L. (1997). Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. **Biotechnology in the pulp and paper industry**, 261-287.

Sangkhol, V., & Skerman, V. B. D. (1981). Chitinophaga, a new genus of chitinolytic myxobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 31(3), 285-293.

Saier MH Jr, Reddy VS, Tsu BV, Ahmed MS, Li C, Moreno-Hagelsieb G. (2016). The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. **Nucleic Acids Resource**. Jan 4;44(D1):D372-9.

Sierro N, Makita Y, de Hoon M, Nakai K. (2008). DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. **Nucleic Acids Resource** Jan;36(Database issue):D93-6.

Song, Y., Sun, W., Fan, Y., Xue, Y., Liu, D., Ma, C., ... & Zhang, T. (2018). Galactomannan Degrading Enzymes from the Mannan Utilization Gene Cluster of Alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 and Their Synergy on Galactomannan Degradation. **Journal of agricultural and food chemistry**, 66(42), 11055-11063.

Sharma, S.; BAJAJ, B. K. (2018). Xylanase production from a new strain of *Aspergillus terreus* S9 and its application for saccharification of rice straw using combinatorial approach. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, n. 3, p. 1210–1219.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Resource**.22 (22):4673–80.

Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. **Frontiers in microbiology**, 2, 93.

Tailford, L. E., Money, V. A., Smith, N. L., Dumon, C., Davies, G. J., & Gilbert, H. J. (2007). Mannose foraging by *Bacteroides thetaiotaomicron*: structure and specificity of the β -mannosidase, BtMan2A. **Journal of Biological Chemistry**, 282(15), 11291-11299.

Taha, M.; Foda, M.; Shahsavari, E.; Aburto-Medina, A.; Adetutu, E.; Ball, A. (2016). Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 190–197.

Takkellapati, S., Li, T. e Gonzalez, M.A. (2018). An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. **Clean Technologies and Environmental Policy** 20: 1615–1630.

Urdiain, M., Doménech-Sánchez, A., Albertí, S., Benedí, V. J., & Rosselló*, J. A. (2004). Identification of two additives, locust bean gum (E-410) and guar gum (E-412), in food products by DNA-based methods. **Food additives and contaminants**, 21(7), 619-625.

Wang, G., Huang, X., Ng, T.B., Lin, J. e Ye, X.Y. (2014). High phylogenetic diversity of glycosyl hydrolase family 10 and 11 xylanases in the sediment of Lake Dabusu in China. **PLoS ONE** 9: e112798.

Wang, C., Lv, Y., Li, A., Feng, G., Bao, G., Zhu, H., & Tan, Z. (2019). *Chitinophaga silvisoli* sp. nov., isolated from forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 69(4), 909-913.

Wang L, Hatem A, Catalyurek UV, Morrison M, Yu Z. (2013). Metagenomic insights into the carbohydrate- active enzymes carried by the microorganisms adhering to solid digesta in the rumen of cows. **PLoS One**. Nov 5;8(11):e78507.

Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Brucoleri R, et al. (2015). antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Resource**. Jul 621 1;43(W1):W237-43.

White BA, Lamed R, Bayer EA, Flint HJ. 2014. Biomass utilization by gut microbiomes. **Annual Review Microbiology**. 68:279 –296.

Xie, S., Syrenne, R., Sun, S., & Yuan, J. S. (2014). Exploration of natural biomass utilization systems (NBUS) for advanced biofuel—from systems biology to synthetic design. **Current opinion in biotechnology**, 27, 195-203.

Xu, J. K.; Sun, R. C. (2016). Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery** p. 431–459.

Yuan, L. D., & Hua, Z. C. (2002). Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, 25(2), 300-304.

Yee, L., & Blanch, H. W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio/technology*, 10(12), 1550-1556.

Yang, Y. H. et al. (2004). Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium. **Colloids and Surfaces B**, v. 34, p. 1–6.

Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., ... & Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic acids research**, 46(W1), W95-W101.

Zong, Y., Wu, M., Liu, X., Jin, Y., Wang, G., & Li, M. (2019). *Chitinophaga lutea* sp. nov., isolated from arsenic-contaminated soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 69(7), 2114-2119.

Zhang, Y. H. P.; LYND, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824.

Zheng, Y., Shi, J., Tu, M. e Cheng, Y.-S. (2017). Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels. In: Li, Y. & Ge, X. (Eds.), **Advances in Bioenergy**, p. 1–68.

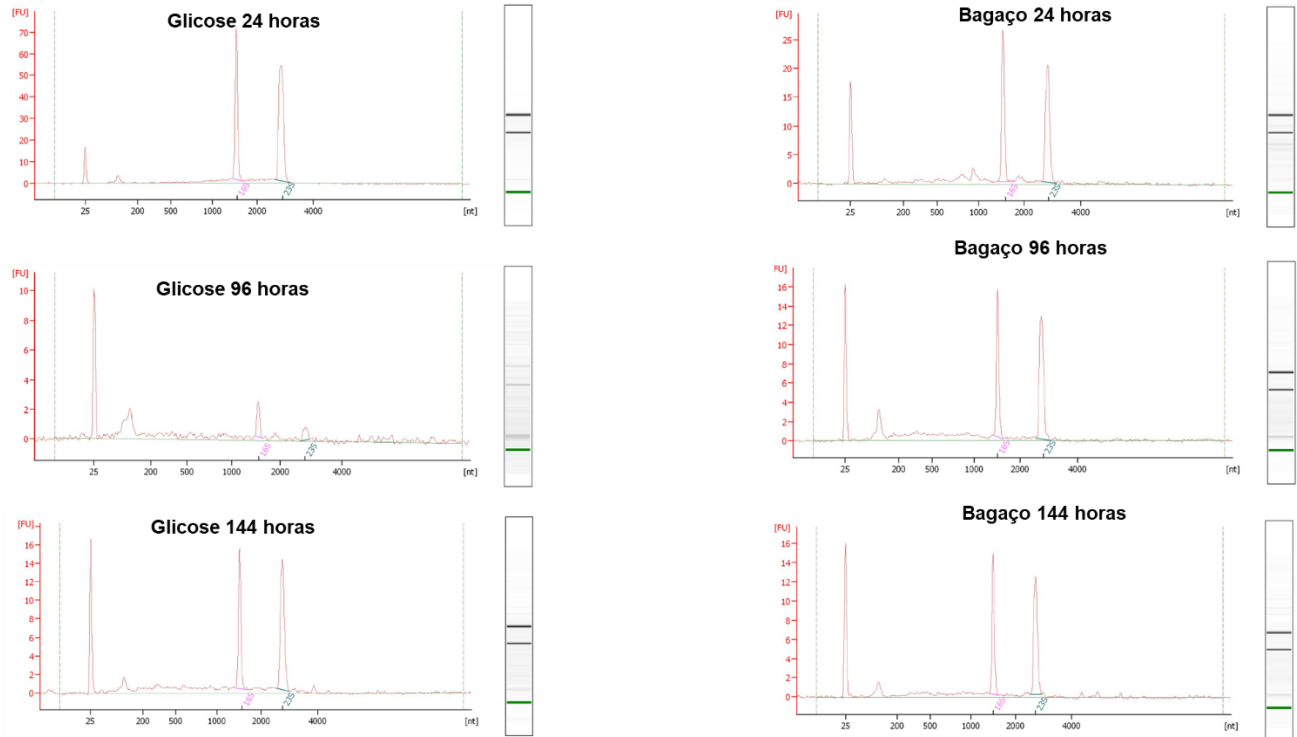
Zuckerlandl, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. **In Evolving genes and proteins** (pp. 97-166).

Zhu N, Yang J, Ji L, Liu J, Yang Y and Yuan H, (2016). Metagenomic and metaproteomic analyses of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5 reveal its taxonomic and enzymatic basis for degrading lignocellulose. **Biotechnology Biofuel** 9(243):1–23.

APÊNDICES

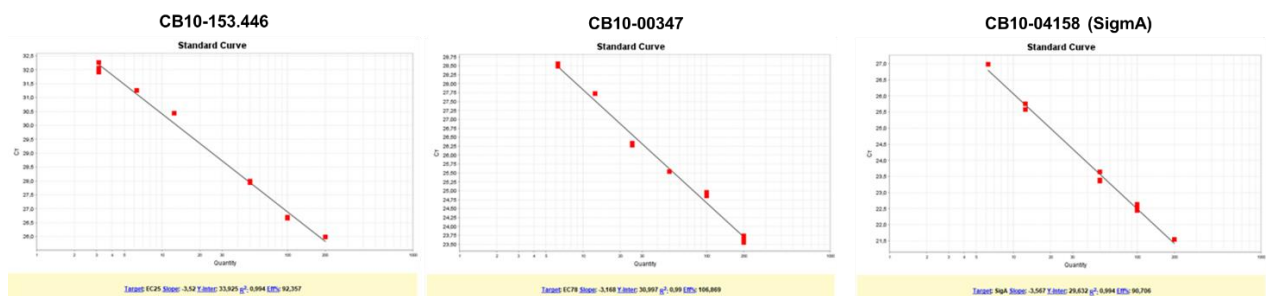
Apêndice A.

Figura 1. Análise de integridade do RNA, avaliada utilizando o dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer



Apêndice B.

Figura 2. Curvas de diluições dos genes: CB10-153.446; CB10-00347 e de referência SigmaA, respectivamente.



Apêndice C.

Figura 3. Curvas de amplificação RT-qPCR.

