

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA AGROPECUÁRIA E AMBIENTAL
CAMPUS JABOTICABAL

Relatório Científico Final

**ESTUDO DE HEMICELULASES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO ATRAVÉS
DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA**

Pós-doutoranda: Dr^a Tatiane Fernanda Leonel

Supervisora: Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Programa de Pós-doutorado na Unesp - 91/2017

Julho, 2024

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a clonagem heteróloga	6
2.2 Clonagem da proteína recombinante	6
2.3 Extração e purificação da proteína recombinante	7
2.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis	7
2.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida	6
3. DESENVOLVIMENTO	8
3.1 Análise <i>in silico</i> , clonagem e expressão das hemicelulases-Obtenção das sequências de hemicelulas	8
3.2 Clonagem da proteína recombinante	9
3.3 Tentativas de Expressão e purificação das hemicelulases	11
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	12
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

ESTUDO DE HEMICELULASES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO ATRAVÉS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

RESUMO- A utilização de biocatalisadores em processos biotecnológicos tem incentivado pesquisas para identificar novas enzimas eficientes e estáveis para o setor agroindustrial. Entre essas enzimas, destacam-se as que degradam materiais lignocelulósicos, essenciais para a produção de biocombustíveis e subprodutos de alto valor agregado em biorrefinarias verdes. As mananases são cruciais no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, sendo o manano um dos componentes da hemicelulose. Essas enzimas têm aplicações variadas, incluindo a síntese de ração animal, clareamento de sucos de frutas, branqueamento de papel, produção de biocombustíveis e de mono-oligossacarídeos (MOS) com potencial para promover a saúde. Dada a diversidade de enzimas de origem microbiológica, é relevante isolar e identificar microrganismos em ambientes naturais que possuam enzimas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos. Identificamos duas β -manosídeses (CB10_153.4461 e CB10_00347) no genoma da *Chitinophaga* sp. CB10, isolada do bagaço de cana-de-açúcar, durante o doutorado. A CB10 demonstrou capacidade de degradar manano, mesmo em baixa concentração (0,2% no bagaço). A expressão gênica dessas duas mananases foi considerável e estável durante 96 horas, com níveis mantidos durante a fase de declínio. A análise do genoma de CB10 revelou um alto número de domínios CAZyme, sugerindo grande plasticidade do organismo e permitindo seu desenvolvimento em diversas fontes de carbono. Com base nesses resultados, propusemos um projeto de pós-doutorado para obter essas enzimas de forma solúvel e aplicá-las em processos industriais. Os resultados das análises revelaram dificuldade em obter a enzima de forma solúvel, sugerindo acumulação em corpúsculos de inclusão. Essa formação complicou a purificação e a obtenção da enzima ativa, exigindo estratégias adicionais para solubilizar e recuperar a atividade enzimática, incluindo a otimização das condições de expressão (temperatura, pH, tempo de incubação) e o uso de outras células competentes. Os resultados obtidos durante este período de pós-doutorado motivaram a continuidade do projeto como uma proposta futura de pós-doutorado financiada. Este projeto destaca a importância de investigar a eficiência de diferentes células competentes, pHs e temperaturas na expressão da enzima, ressaltando a necessidade de realizar análises futuras mais abrangentes, melhor compreensão e aplicação prática desses resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Hemicelulose. Biocombustíveis. Resíduos industriais. Biorrefinarias verdes.

STUDY OF HEMICELLULASES OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST THROUGH HETEROLOGOUS EXPRESSION

ABSTRACT: The use of biocatalysts in biotechnological processes has encouraged research to identify new efficient and stable enzymes for the agroindustrial sector. Among these enzymes, those that degrade lignocellulosic materials, essential for the production of biofuels and high-value by-products in green biorefineries, stand out. Mannanases are crucial in the pre-treatment of lignocellulosic biomass, with mannan being one of the components of hemicellulose. These enzymes have varied applications, including the synthesis of animal feed, whitening of fruit juices, bleaching of paper, production of biofuels and production of manno-oligosaccharides (MOS) with the potential to promote health. Given the diversity of enzymes of microbiological origin, it is relevant to isolate and identify microorganisms in natural environments that contain enzymes involved in the degradation of lignocellulosic materials. We identified two β -mannosidases (CB10_153.4461 and CB10_00347) in the genome of *Chitinophaga* sp. CB10, isolated from sugarcane bagasse, during my doctorate. CB10 demonstrated the ability to degrade mannan, even at low concentration (0.2% in bagasse). The gene expression of these two mannanases was considerable and stable during 96 hours, with levels maintained during the decline phase. Analysis of the CB10 genome revealed a high number of CAZyme domains, suggesting the organism's great plasticity and allowing its development on diverse carbon sources. Based on these results, we proposed a postdoctoral project to obtain these enzymes in a soluble form and apply them in industrial processes. The results of the analyzes revealed difficulty in obtaining the enzyme in a soluble form, suggesting accumulation in inclusion bodies. This formation complicated the purification and obtaining of the active enzyme, requiring additional strategies to solubilize and recover the enzymatic activity, including the optimization of expression conditions (temperature, pH, incubation time) and the use of other competent cells. The results obtained during this postdoctoral period motivated the continuation of the project as a future funded postdoctoral proposal. This project highlights the importance of investigating the efficiency of different competent cells, pHs and temperatures in enzyme expression, highlighting the need to carry out more comprehensive future analyses, better understanding and practical application of these results.

KEYWORDS: Hemicellulose. Biofuels. Industrial waste. Green biorefineries.

1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis são recursos finitos e não renováveis, responsáveis por gerar uma variedade de poluentes, incluindo gases que contribuem para o efeito estufa. Na busca por alternativas menos impactantes ambientalmente, destacam-se as energias solar, eólica, hídrica e a proveniente de biomassa lignocelulósica. Além de fornecer energia, a biomassa lignocelulósica permite a produção de biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e energia, consolidando o conceito de biorrefinaria. Este conceito integra diversas rotas de conversão (bioquímicas, microbianas, químicas e termoquímicas) para otimizar o aproveitamento da biomassa.

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por 46,2% de celulose, 27,8% de hemicelulose, 21,1% de lignina e 1% de cinzas (Santos et al., 2009). Atualmente, há um interesse significativo na aplicação isolada de seus constituintes. A hemicelulose, o segundo biopolímero mais abundante, é promissora para a síntese de subprodutos de alto valor agregado, com aplicações tanto na química quanto na saúde animal. Por exemplo, o monossacarídeo manano pode ser utilizado na produção de prebióticos e probióticos, que são alternativas naturais aos antibióticos dietéticos na prevenção de doenças de importância médico-veterinária (Badia et al., 2013). Além disso, a hemicelulose é empregada como insumo na alimentação animal, embora sua aplicabilidade seja limitada pela falta de fermentação eficiente pela microbiota intestinal. Estudos sobre a despolimerização da hemicelulose via hidrólise enzimática mostram-se promissores para a produção de oligossacarídeos com melhor aproveitamento energético (Carvalho et al., 2008).

Para a extração de oligossacarídeos de biomassas lignocelulósicas, são necessários pré-tratamentos, como os ácidos, alcalinos ou enzimáticos. Os métodos enzimáticos são alternativos sustentáveis às abordagens químicas severas, pois não geram resíduos altamente poluentes. Além disso, a combinação de métodos enzimáticos com pré-tratamentos brandos, como o álcali diluído, pode ser eficaz, uma vez que a hidrólise enzimática da biomassa nativa frequentemente resulta em baixo rendimento devido a características estruturais como cristalinidade, porosidade e revestimento por lignina (Hamelinck et al., 2005; Wolf, 2011).

A otimização dos processos de pré-tratamento é crucial para a viabilidade comercial das biorrefinarias lignocelulósicas (Larsbrink et al., 2017). A maioria das pesquisas visa desenvolver técnicas que aumentem a acessibilidade química da biomassa, reduzindo os custos (Sharma; Sharma; Kuila, 2016; Zhou et al., 2016).

Este trabalho teve como objetivo estudar duas ORFs promissoras da obtidas da bactéria *Chitinophaga* sp. CB10, recentemente isolada e sequenciada no LBMP, capazes de utilizar biomassa como única fonte de carbono (Kishi et al., 2017). Leonel et al. (2021) reforçaram a atividade de duas β -manosidases, pertencentes à família GH2: CB10-153.446 e CB10-00347, em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando expressão por 144 horas e liberação de oligossacarídeos.

Diante dessas considerações, definimos a nossa proposta de pós-doutorado para alcançar nossos objetivos;

Explorar as β -manosidases obtidas no trabalho anterior de Leonel et al. (2021), expressando-as de forma heteróloga e caracterizando sua atividade hemicelulásica. Pretendemos elucidar seu papel na

degradação da biomassa lignocelulósica, especialmente do bagaço de cana-de-açúcar e de outras biomassas similares.

Esses estudos lançarão bases para aprimorar o processo de degradação de biomassa lignocelulósica em diversos processos biotecnológicos, desenvolvendo um coquetel enzimático viável para utilização em biorrefinarias. Utilizaremos diferentes tipos de biomassa com ou sem pré-tratamento químico, incluindo bagaço de cana, sabugo de milho e biomassa de soja, além de mucilagens vegetais ricas em conjugados de mananas para aplicações em cosméticos e alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a Clonagem heteróloga

Para a clonagem heteróloga das ORFs de β -manosidases: CB10_153.446 e CB10 00347, 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 1**. Para a construção foi levado em consideração os sítios de restrição das enzimas escolhidas; para a β -mannosidase (CB10 153.4461) BamHI para o primer Forward e XhoI para o Reverse, e para a β -mannosidase (CB10 00347) HindIII 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.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na clonagem heteróloga da ORF. CB10_153.4461 β -manosidases

Nome do gene	Endonuclease de restrição	Sequência 5' – 3' de cada oligonucleotídeo	Tamanho do fragmento (pb)
β -mannosidase CB10 153.4461	F: BamHI R: XhoI	TATAGgatccCAGGTAGACACGCTGAAG TATATActcgagTTATTTTTTATAAGTGTCAACCAAC	2539
β -mannosidase CB10 00347	F: HindIII R: XhoI	TATAaagcttCAGGAACAATATGAGCTGAAC TATATActcgagTTATTTTTTATAAGTGTCAACCAAC	2582

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

2.2. Clonagem da proteína recombinante

Com o intuito de clonagem das ORFs de interesse, o DNA plasmidial do vetor pET28a foi extraído 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.µL). 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 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* nas cepas BL21 DE3, C43, Artic, e LEMO 21 (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 µg.mL⁻¹ e cultivados a 37 °C durante 16 horas. Após esse período, uma alíquota de cada clone foi coletada (800 µL) e adicionada em tubos contendo glicerol (20% v/v), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Posteriormente, foram selecionados os clones positivos para os ensaios de expressão.

2.3.Extração e purificação da proteína recombinante

Com intuito de expressar a hemicelulase previamente transformada em células competentes de *E. coli*, uma colônia isolada foi inoculada em meio Lúria Bertani (LB) contendo canamicina a 50 µg/mL, 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 induzida com 0,1-0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), posteriormente, centrifugada a 10000 xg por 10 minutos a 4°C, a fim de analisar a expressão da proteína de interesse em comparação às proteínas totais. Uma vez determinada a melhor condição de expressão, ensaios de expressão em volumes maiores foram realizados em etapas posteriores. A confirmação da expressão das proteínas foi realizada através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% - SDS-PAGE. A corrida foi realizada com tampão Tris-Glicina [50 mM de Tris-HCl; 150 mM de Glicina e 0,1% de SDS (p/v)]. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue [40% de metanol (v/v); 10% de ácido acético glacial (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (p/v)] e descorado em solução contendo 10% de ácido acético (v/v) e 10% de etanol (v/v). A extração foi iniciada pela ressuspensão do material em tampão de extração [10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10% (v/v) glicerol] acrescido de 10 mg/mL 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, 17000 xg, para separação de extratos solúveis e insolúveis. A fração resultante de cada etapa, desde a extração até a purificação foi analisada por SDS-PAGE conforme descrito posteriormente (item 2.4).

2.4.Determinação da concentração de proteínas solúveis

A concentração de proteína total foi determinada através do método de Bradford (1976), empregando uma curva-padrão preparada com albumina sérica bovina em diferentes concentrações. A proteína pura, por

sua vez, foi estimada por espectrometria, através da leitura da absorbância em comprimento de onda de 280nm em aparelho espectrofotômetro modelo Nanodrop1000 (*Thermo Scientific*) empregando os valores estimados no software Protparam para o coeficiente de absorção molar e a massa molecular da proteína.

2.5.Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

O padrão proteico das amostras extraídas e purificadas foi analisado através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (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 bromofeno [0,02%]; Tris-HCl, 62mM pH 6,8), a seguir, aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS. A separação de proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (125 V e 25 mA). As amostras foram coradas pelo método de Azul de Coomassie (0,2% Azul de Coomassie, 40% Metanol, 10% Ácido Acético).

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Análises *in silico*, clonagem e expressão das hemicelulases - Obtenção das sequências de hemicelulases

A bactéria do presente estudo é a *Chitinophaga* sp. CB10, foi isolada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) de um consórcio microbiano proveniente de uma pilha de bagaço de cana-de-açúcar, residual da produção de etanol, (Constancio et al., 2020), seu genoma parcial (82 Mbp e 7,173 ORFs) foi sequenciado por Kishi e colaboradores (2017) e depositado no NCBI GenBank sob o número de acesso: MLAV000000000. Análises subsequentes do grupo de pesquisa 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). A bactéria pertence ao gênero *Chitinophaga* sp., filo Bacteroidetes que 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.

Para a busca das enzimas do presente trabalho, foi realizado uma análise *in silico* de genes no genoma desta *Chitinophaga* sp, levando em consideração: os motivos e domínios conservados das famílias Glicosil Hidrolases (GHs), além de informações funcionais das enzimas homólogas previamente caracterizadas. Através de uma busca na base de dados desta bactéria utilizando montagens de “motifs” conservados por H.M.M. (Modelo Oculto de Markov) para genes ortólogos à β -manosídeses utilizando a ferramenta “HMM Binding”, foram encontradas quatro ORFs putativas (CB10_169.4723; CB10_197.5153; CB10_153.4461 e CB10_198.5167). Após garantir que as sequências estavam corretamente montadas e completas através de

remontagem das mesmas contra todas as “reads” similares em um mesmo “Contig”, procedeu-se a triagem da melhor ORF através de análises *in silico*.

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 presente em bactérias do filo, (Figura 1), enquanto a CB10-153.446 não mostrou qualquer associação com agrupamentos enzimáticos específicos. Bacterioidetes (Leonel et al., 2021, dados publicados)

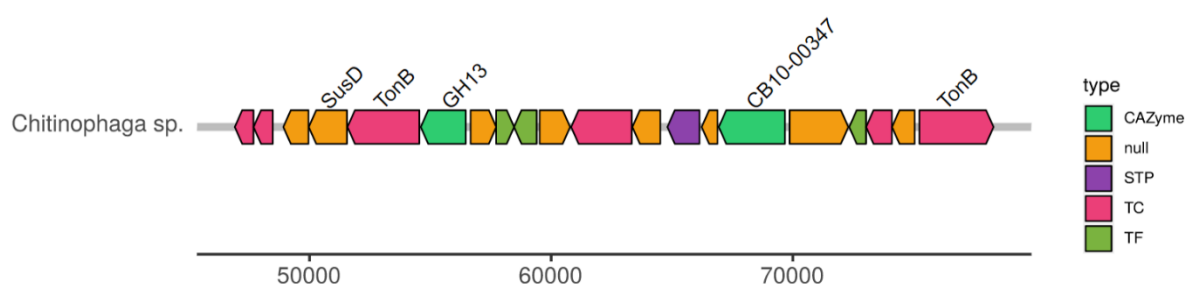


Figura 1. Anotação de genes agrupados em “semelhantes a PULs” associados com CAZyme GH2 β -manosidase CB10-00347, obtido de *Chitinophaga* sp. CB10. A anotação foi realizada por meio do programa CGC-Finder. As sequências de GH2 identificadas em estudos anteriores foram anotadas usando a ferramenta dbcan2 (Zhang et al., 2018).

Fonte: Leonel et al., 2021.

Com o intuito de elucidar o mecanismo de ação destas enzimas foi então realizado uma análise de expressão destas enzimas, através da técnica de Real time em tempo real quantitativo (RT-qPCR) 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. Os resultados obtidos 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 (Leonel et al., 2021), estimulando a continuação do presente trabalho, e a tentativa de obtenção desta proteína, para possíveis aplicações biotecnológicas, já que durante a tese de doutorado não se teve êxito no processo de clonagem heteróloga.

3.2. Clonagem da proteína Recombinante

Para clonar os genes da β -manosidase (CB10_153.4461 e CB10_00347) foram projetados primers específicos com base na sequência gênica das proteínas de interesse, previamente obtida do genoma de *Chitinophaga* sp. (**Tabela 1**). Esses primers foram desenhados para coincidir com os sítios de restrição, presentes no vetor de expressão pET28a, facilitando tanto a clonagem quanto a expressão do gene.

A amplificação do DNA genômico de *Chitinophaga* sp. foi realizada por PCR, utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum Taq High Fidelity - Invitrogen). O fragmento amplificado, foi então clonado no vetor pET28a e transformado em células competentes de *Escherichia coli* BL21 DE3 como pode ser observado na **Figura 2**.

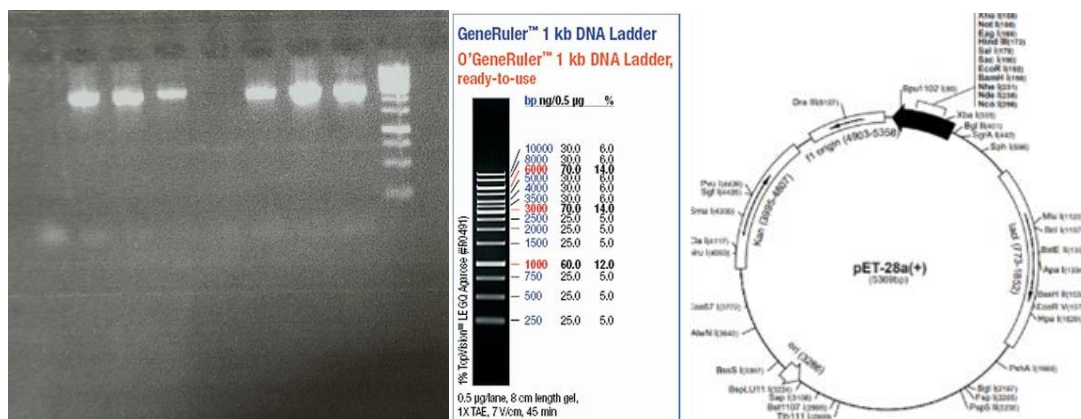


Figura 2. Construção de vetor de expressão analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,4 µg/mL). pET28a + β-manosidase CB10-153.446 : Amostras: M: Marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder (Fermentas); 1, 2 e 3 amostra amplificada com DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum Taq High Fidelity - Invitrogen). 4 CN: Controle negativo da reação; pET28a + β-manosidase CB10 00347: Amostras: M: Marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder (Fermentas); 5, 6 e 7 amostra amplificada com DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum Taq High Fidelity - Invitrogen). 8 CN: Controle negativo da reação.

Tabela 2. Reação padronizada de PCR para a amplificação dos insertos

Reagentes	Concentração (µL)
Platinum Taq High Fidelity - Invitrogen	25,0
Primer Foward	0,8
Primer Reverse	0,8
DNA	4,2
H2O	19,2

Tabela 3. Após a reação foi realizada a Purificação utilizando o Kit Zymoressearch e posterior quantificação em nanodrop

CB10-153.446	CB10 00347
342,8 ng/µL	296,0 ng/µL
Relação 260/280 1,9	Relação 260/280 1,9
Relação 260/230 2,1	Relação 260/230 2,1

Os clones positivos foram confirmados por sequenciamento e digestão enzimática. Após a validação, o clone mais promissor foi selecionado para ensaios de expressão.

Conforme ilustrado na **Figura 3**, um clone representativo de cada gene foi escolhido, e as tentativas de expressão enzimática foram conduzidas com o objetivo de obter a proteína em sua forma solúvel.

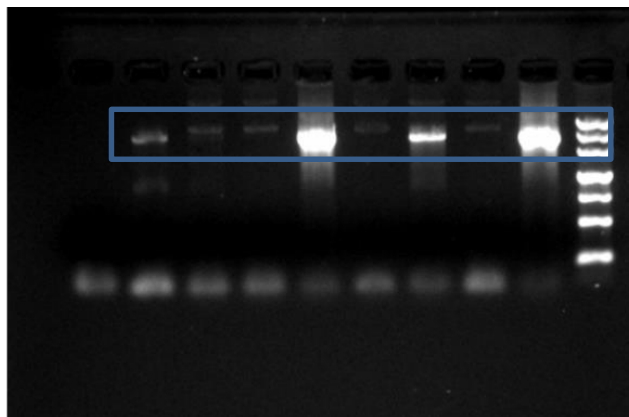


Figura 3. Clones positivos obtidos para os genes da β -manosidase (E.C. 3.2.1.25), Sendo (A) CB10-153.446 2 clones positivos; (B) CB10-00347 4 clones positivos e (C) Vetor pET28a. Utilizando Primers específicos foram projetados conforme descrito no item 1.1, com base na sequência gênica da proteína de interesse, previamente obtida do genoma de *Chitinophaga* sp.

3.3. Tentativas de Expressão e Purificação das hemicelulases

Para os ensaios de expressão, colônias contendo os clones com o vetor de expressão pET28a/BL21DE3 ligados ao gene da β -manosidase foram cultivadas em meio Luria-Bertani suplementado com canamicina. Após o pré-inóculo, as células foram cultivadas até atingirem uma D.O₆₀₀ de 0,5-0,6, garantindo a fase logarítmica de crescimento para uma expressão eficiente da proteína. A expressão da β -manosidase foi induzida com diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM, 0,5 mM e 1,0 mM) a 30°C por 6 horas.

O vetor recombinante pET28a foi introduzido nas células competentes de *Escherichia coli* nas cepas C43, Artic e LEMO 21 (New England Biolabs), selecionadas por sua especialização em clonagem e expressão de proteínas recombinantes, cada uma com características distintas que poderiam otimizar a expressão e solubilidade da proteína alvo. No entanto, as tentativas de indução da expressão da proteína na temperatura, 30°C, não resultaram em níveis detectáveis de expressão da proteína. Esse padrão foi observado em todas as linhagens, conforme mostrado na **Figura 3**, onde o controle sem indução não apresentou alterações em relação aos tratamentos induzidos. Essa falta de expressão persistiu mesmo após modificações nas condições de cultivo, tais como variação na concentração de IPTG e tempo de indução.

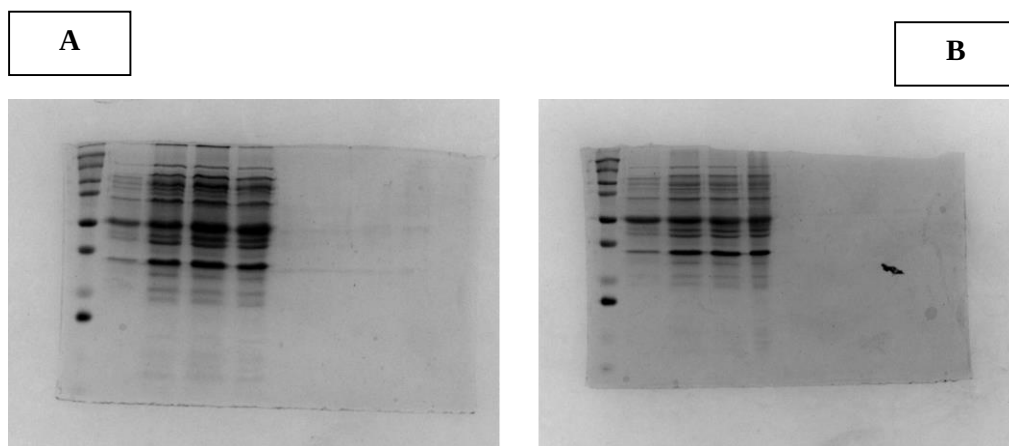


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) das análises realizadas em meio LB com 0,1 mM de IPTG a partir do clone C1. A: Ensaio de expressão a 30 °C com 0,1 mM , 0,5 mM e 1,0 mM de IPTG nos tempos T0, T2, T4 e T6 horas.

Esses resultados indicam que as cepas C43, Artic e LEMO 21 não foram eficazes na expressão da proteína alvo sob as condições testadas. A falta de expressão pode estar relacionada à incompatibilidade entre a proteína heteróloga e o sistema de expressão das cepas, ou à formação de corpos de inclusão que dificultam a solubilização da proteína. Diante disso, sugerimos que futuros estudos explorem outras linhagens de *E. coli* ou sistemas de expressão alternativos que possam ser mais adequados para a expressão da proteína alvo.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Após uma extensa série de estudos e experimentos, podemos inferir que as mananases apresentam um considerável potencial para diversas aplicações industriais. A produção predominante dessas enzimas por microrganismos, devido à sua estabilidade e manipulação genética acessível, é notável. Entretanto, os métodos convencionais para descoberta dessas enzimas são onerosos e demorados, impulsionando a busca por novas enzimas com propriedades específicas. Nossas investigações estão focadas na prospecção de enzimas de interesse biotecnológico, empregando abordagens como bioengenharia, genômica e metagenômica. Um destaque foi o isolamento da bactéria *Chinophaga* sp. CB10, que evidenciou habilidades para degradar biomassa lignocelulósica. Adicionalmente, nossas análises com consórcios de bactérias celulolíticas revelaram a presença de múltiplas enzimas com potencial biotecnológico. Os resultados iniciais apontaram para desafios na obtenção da enzima em forma solúvel, indicando possível acumulação em corpúsculos de inclusão. Esse cenário influenciou a purificação e obtenção das enzimas, demandando estratégias adicionais para solubilização e recuperação da atividade enzimática, incluindo otimização das condições de expressão (temperatura, pH, tempo de incubação) e uso de outras células competentes. Os resultados alcançados durante este período de pós-doutorado motivaram a continuidade do projeto como uma proposta futura de pós-doutorado financiada. Este projeto ressalta a importância de investigar a eficiência de diferentes células competentes, pHs e temperaturas na expressão da enzima, enfatizando a necessidade de futuras análises mais

abrangentes para melhor compreensão e aplicação prática desses resultados. Para o futuro, planejamos continuar explorando microrganismos de diversos ambientes, como solos e rizosfera, para identificar novas enzimas. Além disso, pretendemos integrar dados de outros estudos sobre prebióticos e fibras dietéticas, visando melhorar a saúde intestinal e a digestibilidade de alimentos. Com essas estratégias, esperamos obter novas enzimas com eficiências distintas, aplicáveis em processos biotecnológicos. Esperamos que nossos estudos resultem em patentes e publicações em periódicos científicos de alto impacto, contribuindo significativamente para o avanço da ciência e tecnologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, N.; GUPTA, K.; GOYAL, D. & GOYAL, A. Recent Advances in Pretreatment Technologies for Efficient Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, v. 35, n. 2, p. 489-511, 2015.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M. & IRSHAD, M. Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 7, p. 163-173, 2014.
- BADIA, Roger et al. Oligosaccharide structure determines prebiotic role of β -galactomannan against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium in vitro. **Gut microbes**, v. 4, n. 1, p. 72-75, 2013.
- BANERJEE, D. et al. Enhanced saccharification efficiency of lignocellulosic biomass of mustard stalk and straw by salt pretreatment. *Industrial Crops and Products*, v. 80, p. 42-49, 2016.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, v. 41, n. 5, p. 653, 1941.
- CARDONA, C.A, QUINTERO, J. A.; PAZ, L.C. Production of bioethanol from the sugarcane bagasse: Status and Perspectives. *Bioresource Technology*, Manizales, p.4754-4760, 2010.
- CARVALHEIRO, Florbela; DUARTE, Luís C.; GÍRIO, Francisco M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, p. 849-864, 2008.
- CARVALHO, S.A.D.; FURTADO, A.T. O Melhoramento genético de cana de açúcar no Brasil e o desafios das mudanças climáticas globais. *Gestão & Conexões=Management and connections Journal*, v.2, n.1, p22-46, 2013.
- CARVALHO, W. et al. A vision of wood structure, composition and biodegradation. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.
- 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.

D. J. DAROIT, A. SIMONETTI, P. F. HERTZ, AND A. BRANDELLI, “Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*.” *Journal of Microbiology Biotechnology*, vol. 18, no. 5, pp. 933–41, May 2008.

FINN RD, COGGILL P, EBERHARDT RY, et al. The Pfam protein families database : Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.*44(D1):D279–D285. doi:10.1093/nar/gkv1344 2016.

GHATAK, H. R. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.4042-4052, 2011.

GONÇALVES, C. C. S.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e tendências da biocatálise. *Química Nova*, v. 36, n. 10, p. 1587–1590, 2013.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAALJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, n. 4, p. 384–410, 2005.

KING, B. C.; DONNELLY, M. K.; BERGSTROM, G. C.; WALKER, L. P.; GIBSON, D. M. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 4, p. 1033–1044, 2009.

KISHI LT, LOPES EM, FERNANDES CC, et al. Draft Genome Sequence of a Chitinophaga Strain Isolated from a Lignocellulose Biomass-Degrading Consortium. *Genome Announc.*;5(3):1–2 2017.

LAEMMLI, U. K., BEGUIN, F., AND GUJER-KELLENBERGER. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4; *Nature* 227. doi:10.1038/227680a0, p. 680 – 685, 1970.

LEONEL, T. F., PEPE, E. S. G., CASTELLANE, T. C. L., VANTINI, J. D. S., FUNNICELLI, 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.

LARSBRINK, Johan et al. Proteomic data on enzyme secretion and activity in the bacterium *Chitinophaga pinensis*. *Data in brief*, v. 11, p. 484-490, 2017.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MACEDO, I.C., NOGUEIRA, L.A.H. Cadernos do Núcleo de Assuntos Estratégicos. Seção 2: Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil, p.141, 2005.

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.

PERCIVAL ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, v. 24, n. 5, p. 452–81, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690241>>. Acesso em: 28 fev. 2013.

- PETERSEN TN, BRUNAK S, VON HEIJNE G, NIELSEN H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 8 (10):785–786. doi:10.1038/nmeth.1701, 2011.
- PITARELO, A. et al. Effect of moisture content in the steam treatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.
- ROCHA, M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. *Industrial Crops and products*, v.64, p.52-58, 2015.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SANTOS, V.O.T., CANILHA, L; CASTRO., PF.; BARBOSA, L.D.D.F.O.; MILAGRES A.M.F; CARVALHO ., W Composição química do bagaço de cana de cana de açúcar IN:IX SIMPOSIO DE HIDROLISE ENZIMATICA DE BIOMASSA.9.,2009.Maringá PR.
- SHARMA, S.; SHARMA, V.; KUILA, A. Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, p. 139, 2016.
- TAILFORD, Louise E. et al. Mannose foraging by *Bacteroides thetaiotaomicron* structure and specificity of the β -mannosidase, BtMan2A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 15, p. 11291-11299, 2007.
- TAVARES, S.A.; PEREIRA, J.; GUERREIRO, M.C.; PIMENTA, C.J.; PEREIRA, L.; MISSAGIA, S.V. Caracterização físico-química da mucilagem de inhame liofilizada. **Ciência e Agrotecnologia.**, v. 35, p. 973-979, 2011.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res*. 22(22):4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673, 1994.
- THORNTON, Brenda; BASU, Chhandak. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145-154, 2011.
- VÁZQUEZ, JI, ALONSO J.L; DOMINGUEZ H., PARAJO, JC Xylooligassacharides manufacture and applications.. *Trends in Food Science and Technology*, v11; p.38-393, 2001.
- WOLF, L. D. Pré-Tratamento organossolve do Bagaço de Cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. 2011. Universidade Federal de São Carlos, 2011.
- ZHOU, Z. et al. Kraft GL-ethanol pretreatment on sugarcane bagasse for effective enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, v. 90, p. 100–109, 2016.

6. Supervisões e Coorientações

Durante o período de pós-doutorado (sem financiamento), atuei como bolsista TT3, exercendo atividades acadêmicas de extensão que contribuíram significativamente para o fomento da ciência. Nesse período, coorientei trabalhos de mestrado e de iniciação científica, oferecendo suporte e orientação técnica aos pesquisadores. Utilizei minha experiência e conhecimento na área para impulsionar o desenvolvimento

das pesquisas. Em anexo, encontram-se cópias de todos os trabalhos supervisionados, detalhando minha participação e as contribuições específicas para cada projeto.