



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Genética e Evolução  
Laboratório de Biologia Molecular**

**WESLEY CARDOSO GENERSO**

Expressão recombinante e caracterização de uma endoxilanase não descrita de  
*Trichoderma harzianum*

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

SÃO CARLOS  
2012

WESLEY CARDOSO GENEROSO

Expressão recombinante e caracterização de uma endoxilanase não descrita de  
*Trichoderma harzianum*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

SÃO CARLOS

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G326ec

Generoso, Wesley Cardoso.

Expressão recombinante e caracterização de uma endoxilanase não descrita de *Trichoderma harzianum* / Wesley Cardoso Generoso. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Enzimas. 2. Bioetanol. 3. *Trichoderma harzianum*. 4. Endoxilanase. I. Título.

CDD: 574.1925 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

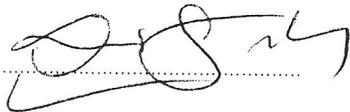
“Expressão recombinante e caracterização de uma endoxilanase  
não descrita de *Trichoderma harzianum*”

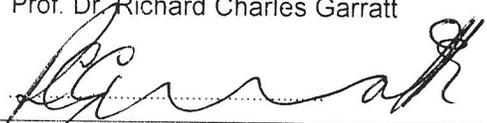
WESLEY CARDOSO GENEROSO

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Submetida à defesa pública no dia 29/06/2012, tendo sido  
aprovado

Presidente: Prof. Dr. Flavio Henrique Silva  

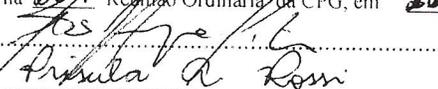

Membros: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto  


Prof. Dr. Richard Charles Garratt  


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Homologado na 264 Reunião Ordinária da CPG, em 16/07/2012

Presidente: 

Membros: Ivanilda de Romi  
.....  
.....  
.....

CONFERE COM O ORIGINAL

Data: 23/07/2012  


Ivanildes Regina de Menezes  
Assistente em Administração Programa de Pós-Graduação  
em Genética Evolutiva e Biologia Molecular / UFSCar

**Dedico este trabalho especialmente...**

aos meus pais, Antônio Carlos e Neide, e meu irmão Wellington, que sempre foram meus maiores amigos e educadores, e às suas maneiras foram os maiores responsáveis por tudo que sou. E também às minhas avós Maria e Adelina pelo carinho e positivismo incansável.

“Eu amo tudo o que foi  
Tudo o que já não é  
A dor que já não me dói  
A antiga e errônea fé  
O ontem que a dor deixou  
O que deixou alegria  
Só porque foi, e voou  
E hoje é já outro dia.”

(Fernando Pessoa)

## AGRADECIMENTOS

- ❖ À Deus, por ter me guiado e garantido paz e sabedoria por toda minha vida.
- ❖ Aos meus familiares pelo incentivo e compreensão em momentos difíceis durante este tempo que tenho estado longe de casa.
- ❖ Ao professor Dr. Flávio Henrique da Silva, pela amizade e pela orientação, que me tornou alguém mais responsável e maduro, além de me instigar a admiração pela ciência.
- ❖ À professora Dra. Andrea Soares Costa pela amizade e por todos esses anos de convivência e oportunidades.
- ❖ Ao doutorando e amigo Wilson Malagó Junior, por ter me apresentado conhecimentos técnicos e científicos durante o projeto e pela convivência.
- ❖ A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Kishi, Danilo, Taíse, Fernando, Kesser, Rafael, Rafaela, Danyelle, Daniela, Adelita, Ana Lígia, Mariana, Priscila, Gabriel, Augusto, Letícia, Darlan, Beth, Bruna e Francine, pela amizade e convivência durante estes anos.
- ❖ Aos colegas do Departamento de Genética e Evolução (DGE) e Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar, pela convivência.
- ❖ Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da UFSCar pelo apoio e a oportunidade.
- ❖ Aos professores do PPGGEv pela convivência e pelo conhecimento transmitido.
- ❖ À secretária do PPGGEv, Ivanildes, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.
- ❖ Aos amigos Danilo Borges, Tiago Bartz e Mustafa Severengiz que conviveram comigo neste tempo, possibilitando uma troca de experiências e aprendizado muito grande.
- ❖ À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.
- ❖ À FAPESP e CNPq pelos auxílios financeiros que possibilitaram a execução do projeto.

## RESUMO

A utilização de combustíveis alternativos e renováveis é vital para resolver os problemas derivados da dependência de combustíveis fósseis, e a biomassa vegetal é a única fonte renovável disponível em larga escala que pode ser convertida em energia. A produção de bioetanol tem demonstrado um enorme potencial para minimizar as alterações ambientais resultantes do consumo de combustíveis fósseis. No entanto, os custos de produção de complexos celulolíticos constituem um dos maiores obstáculos da viabilidade econômica do etanol de segunda geração. Portanto, a bioprospecção e a compreensão das enzimas envolvidas no processo podem melhorar a produtividade dos complexos. Xilanases são enzimas usadas em vários processos biotecnológicos, primordialmente para biopolpação e biobranqueamento nas indústrias de papel e celulose. No entanto, as pesquisas atuais têm buscado por estas enzimas devido a um papel acessório na produção de bioetanol. Neste estudo, uma endoxilanase (*xyn3*) de *Trichoderma harzianum* foi clonada em *Pichia pastoris*. O vetor de expressão constitutivo pGAPZ $\alpha$ A foi usado, alterando-se o factor- $\alpha$  pelo peptídeo sinal nativo da enzima, e com uma sequência 6xHisTag no C-terminal. A proteína recombinante foi expressa em duas formas majoritárias, uma com uma massa molecular de 35 kDa (não-glicosilada) e a outra com 60 kDa (glicosilada). Ambas as formas mostraram atividade xilanolítica em zimograma e foram analisadas bioquimicamente. As enzimas mostraram temperatura ótima de 40°C e pH 6,5, e com atividade estável até aproximadamente 30°C. A glicosilação apresentou um papel importante na cinética enzimática da enzima recombinante, que mostrou uma eficiência catalítica duas vezes mais elevada em sua forma glicosilada, em comparação com a atividade da forma não-glicosilada. Ainda neste estudo, foram investigados os efeitos de celulose e xilana na regulação da expressão dos genes *xyn2*, *xyn3* e *egl3* no *T. harzianum*. Todos os genes estudados foram superexpressos sob todas as condições de indução e os resultados indicaram uma expressão mais elevada e precoce destes genes utilizando-se uma mistura de celulose e xilana. Além disso, um avanço no período de indução foi observado quando o fungo foi cultivado com bagaço explodido suplementado com endoxilanase 3, quando comparado com a utilização do bagaço

puro. Estes resultados contribuem para o entendimento do mecanismo de ação do sistema enzimático envolvido na “desconstrução” da parede celular vegetal, o qual pode ser utilizado na produção do etanol de segunda geração.

Palavras-chaves: Bioetanol, *Trichoderma harzianum*, endoxilanase.

## ABSTRACT

The use of alternative and renewable fuels is vital to solve the problems derived from the dependence of fuels, and the vegetal biomass is the only renewable source available in large scale that can be converted in energy. The bioethanol production has demonstrated a huge potential to minimize the environmental changes resultant from fossil fuels consumption. Nevertheless, the production costs of cellulolytic complexes lays out one of the major obstacle of the economical viability of the second generation ethanol. Therefore, the bioprospection and the understanding of enzymes involved in the process can improve the complexes productivity. Xylanases are enzymes used in several biotechnological processes, primordially for biopulping and biobleaching in papel industries. However, current surveys have investigated these enzymes due to an accessory role for bioethanol production. In this study, an endoxylanase (*xyn3*) gene from *Trichoderma harzianum* was cloned into *Pichia pastoris*. The constitutive vector pGAPZ $\alpha$ A was used, changing the  $\alpha$ -factor by the native signal peptide of the enzyme, and with a 6xHisTag at C-terminus. The recombinant protein were expressed in two majority forms, one with a molecular mass of 35 kDa (non-glycosylated) and the other with 60 kDa (glycosylated). Both forms showed xylanolytic activity in zymogram and were biochemically analyzed. The enzymes present optimal temperature of 40°C and pH 6.5, and stable activity until 30°C. The glycosylation plays important role in the enzymatic kinetics of the recombinant enzyme, showing a catalytic efficiency twice higher of glycosylated form, in comparison with the activity of the non-glycosylated form. Even in this study, the effects of cellulose and xylan on the regulation of expression of the *xyn2*, *xyn3* and *egl3* genes were investigated to *T. harzianum*. All studied genes were overexpressed under all induction conditions and the results indicate a higher and earlier expression of these genes in fungus induction using a mixture of cellulose and xylan. Furthermore, an advance in the period of induction was observed while the fungus was cultivated with steam exploded bagasse supplemented with endoxylanase 3, when compared with the pure bagasse utilization. These findings enhance the

understanding of enzymatic mode of action involved in deconstruction of plant cellular wall, which can be used in the second generation ethanol production.

Keywords: Bioethanol, *Trichoderma harzianum*, endoxylanase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das fibras do tecido vegetal. (Modificado de Yarris, 1999). .....	4
Figura 2. Estrutura das ligações de hidrogênio inter e intracadeias da celulose (Festucci-Buselli <i>et al.</i> , 2007).....	5
Figura 3. Esquema geral apresentando os diferentes ligantes encontrados em xilanas de parede celular vegetal (Dodd <i>et al.</i> , 2009).....	6
Figura 4. Estrutura representativa de xilanases.....	8
Figura 5. Sequências de DNA e proteica da <i>Xyn3</i> de <i>T. harzianum</i> .....	27
Figura 6. Isoformas do mRNA da <i>Xyn3</i> de <i>T. harzianum</i> .....	28
Figura 7. Comparação entre sequências de xilanases da família 10 de <i>T. harzianum</i> com alguns fungos filamentosos já estudados.....	29
Figura 8. Vista superior da estrutura terciária predita da enzima <i>ThXyn3</i> , baseada em homologia.....	30
Figura 9. Vista lateral da superfície da estrutura terciária da enzima <i>Xyn3</i> . (A) Representação da superfície em meio aquoso; (B) Representação do potencial elétrico, cuja região azul representa campo negativo e região vermelha, campo positivo.....	30
Figura 10. Análise da indução do clone recombinante escolhido em YEPD não tamponado (A) e YEPD tamponado com purificação da proteína recombinante (B).....	32
Figura 11. Análise de atividade xilanolítica da rThXyn3.....	33
Figura 12. Análise por Western Blot de <i>Xyn3</i> em sobrenadante de <i>T. harzianum</i> IOC-3844 induzido com celulose e xilana.....	33

Figura 13. Análise em SDS-PAGE da fração glicosilada da enzima rThXyn3 tratada com glicosidases.....	34
Figura 14. Efeito da temperatura na atividade enzimática da rThXyn3.....	36
Figura 15. Efeito do pH na atividade enzimática da ThXyn3 recombinante.....	37
Figura 16. Termoestabilidade da ThXyn3 recombinante com uma hora de pré-incubação.....	38
Figura 17. Resistência térmica a 30°C da ThXyn3 recombinante.....	39
Figura 18. Efeitos de íons metálicos e EDTA na atividade da rThXyn3.....	40
Figura 19. Curva de degradação por ação de Proteinase K.....	40
Figura 20. Curva de Michaelis-Menten da ThXyn3 recombinante com substrato xilana birchwood.....	41
Figura 21. Curva de Michaelis-Menten da ThXyn3 recombinante com substrato xilana beechwood.....	41
Figura 22. RNA total extraído de micélio de <i>Trichoderma harzianum</i> IOC-3844, tratado com DNase I.....	51
Figura 23. Resultado de RT-PCR em micélio de <i>Trichoderma harzianum</i> IOC-3844 cultivado por 36 horas com Avicel e xilana.....	52
Figura 24. Valores de expressão de transcritos obtidos de cultura induzida com Avicel de <i>T. harzianum</i> IOC-3844 por 12, 24 e 36h.....	53
Figura 25. Valores de expressão de transcritos obtidos de cultura induzida com Xilana de <i>T. harzianum</i> IOC-3844 por 12, 24 e 36h.....	54
Figura 26. Valores de expressão de transcritos obtidos de cultura induzida com Avicel e Xilana de <i>T. harzianum</i> IOC-3844 por 12, 24 e 36h. Os valores foram normalizados pela	

expressão do transcrito de actina. Os alvos calibradores foram os transcritos de cultura induzida nos mesmo tempos. O eixo das ordenadas está apresentado em escala logarítmica.....55

Figura 27. Valores de expressão de transcritos de 6 a 36h, de *T. harzianum* IOC-3844 induzido com bagaço. ....58

Figura 28. Valores de expressão de transcritos de 6 a 36h, de *T. harzianum* IOC-3844 induzido com bagaço suplementado com rThXyn3.....59

Figura 29. Mapa geral do vetor pGAPZ $\alpha$ A.. ....74

Figura 30. Sequência do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vetor pGAPZ $\alpha$ A.....74

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Parâmetros cinético-enzimáticos da rThXyn3 para os substratos xilana <i>birchwood</i> e <i>beechwood</i> .....	42
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na PCR quantitativa. ....	48

**LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS**

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
Abs	absorbância
Ace	Ativador da expressão de celulases ( <i>Activator of Cellulase Expression</i> )
Act	actina
Aox	álcool oxidase
Atm	Atmosferas
Avicel	Celulose Microcristalina
Bgl	enzima β-glucosidase
BLAST	Ferramenta de busca por alinhamento ( <i>Basic Local Aligment Search Tool</i> )
Cbh	enzima celobiohidrolase
CBM	Módulo de ligação de carboidrato
cDNA	DNA complementar à fita de RNA
Cq	ciclo quantitativo, em que a intensidade de fluorescência ultrapassa a basal
Cre	Repressor catabólico ( <i>cAMP Response Element</i> )
D.O.	densidade óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNS	ácido 3,5-dinitrossalicílico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTT	ditiotreitól
E.C.	Classificação Enzimática ( <i>Enzyme Classification</i> )
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Egl	enzima endoglucanase
g	gramas
<i>g</i>	gravidades
GAPDH	glicerol-3-fosfato desidrogenase

h	hora
HCl	Ácido clorídrico
Kb	quilobase
Kcal	kilocalorias
$k_{cat}$	Constante catalítica da taxa de renovação da enzima
KCl	Cloreto de potássio
kDa	quilodalton
$K_m$	Constante catalítica de Michaelis-Menten
kV	kilovolts
L	litros
LB	meio Luria-Bertoni
LBM	Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Genética e Evolução,
UFSCar	
M	molar
mA	miliampéres
MCS	sítio múltiplo de clonagem ( <i>Multi Cloning Site</i> )
Me-GlcUA	ácido metil-glucurônico
mg	miligramas
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
Min	minuto
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
nM	nanomolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	base de dado do <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanogramas
Ni <sup>2+</sup>	Níquel na forma iônica
nm	nanômetros
ORF	Fase aberta de leitura ( <i>Open Reading Frame</i> )

Pb ou bp	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PDA	Agar de batata e dextrose ( <i>Potato Dextrose Agar</i> )
PFam	base de dado de <i>Protein families</i>
Pfu	relativo ao microrganismo <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
PVDF	fluoreto de polivinilideno
qRT-PCR	PCR em tempo-real utilizando RNA transcrito reversamente
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
rThXyn3	proteína recombinante <i>Xyn3</i> de <i>Trichoderma harzianum</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
Taq	relativo ao microrganismo <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	solução salina Tris-tamponada
ThXyn3	clone possuidor da ORF da <i>Xyn3</i> de <i>Trichoderma harzianum</i>
TT	terminador de transcrição
U	unidade enzimática
UTR	Região não traduzida ( <i>Untranslated Region</i> )
Xyn	enzima endoxilanase
Xyr	Regulador da expressão de xilanases
YEPD	meio dextrose, peptona e extrato de levedura ( <i>Yeast Extract Peptone Dextrose Agar</i> )
Δ	variação
μF	microfaraday
Ω	ohm

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	3
1.1 Estrutura Vegetal.....	3
1.2 Bioconversão de resíduos lignocelulósicos .....	6
1.2.1 Complexo xilanolítico.....	7
1.3.2 Produção de xilanases .....	9
1.3.3 Aplicação na indústria .....	9
1.3 Produção de Proteínas Recombinantes.....	12
1.4 <i>Trichoderma harzianum</i> .....	14
2. Objetivos .....	16
2.1 Objetivos Gerais.....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
2.3 Organização do trabalho apresentado .....	17
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>18</b>
3. Metodologia.....	19
3.1 Cepas, meios de cultura e reagentes empregados .....	19
3.2 Clonagem e expressão da endoxilanase recombinante .....	19
3.2.1 Caracterização do clone.....	19
3.2.2 Clonagem do gene da endoxilanase em <i>Pichia pastoris</i> .....	20
3.2.3 Expressão e purificação da proteína recombinante.....	22
3.2.4 Análises qualitativas e caracterização da proteína recombinante .....	23
3.3 Ensaio bioquímico.....	24
3.3.1 Análise de açúcares redutores pelo método de DNS .....	24
3.3.2 Caracterização de temperatura e pH ótimos .....	25
3.3.3 Caracterização da termoestabilidade e resistência térmica.....	25

3.3.4 Efeito de íons na atividade enzimática e resistência à ação de protease .....	25
3.3.5 Estabelecimento das constantes cinéticas enzimáticas .....	26
4. Resultados e Discussão.....	27
4.1 Caracterização e análise de sequência do clone ThXyn3. ....	27
4.2 Expressão, purificação e caracterização da endoxilanase recombinante. ...	30
4.3 Caracterização bioquímica e enzimática da xilanase recombinante. ....	35
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>44</b>
5. Metodologia.....	45
3.1 Cepas, meios de cultura e reagentes empregados .....	45
5.2 Cultivo do <i>Trichoderma harzianum</i> sob condições indutoras .....	45
5.3 Extração de RNA total.....	46
5.4 Síntese de cDNA.....	47
5.5 Padronização da PCR em tempo-real.....	48
3.6 PCR quantitativa .....	49
6. Resultados e Discussão.....	51
6.1 Extração e tratamentos do RNA total .....	51
6.2 Análise de expressão de <i>T. harzianum</i> induzidos Avicel e xilana .....	53
6.3 Análise de expressão de <i>T. harzianum</i> induzido com bagaço de cana-de-açúcar suplementado com rThXyn3 .....	57
7. Conclusões e perspectivas .....	61
Referências Bibliográficas .....	63
ANEXO I.....	71
ANEXO II.....	74
ANEXO III.....	75

## 1. INTRODUÇÃO

O emprego de matéria-prima vegetal em diversos processos industriais representa grande parte do mercado no país, por ser uma maneira sustentável de obtenção de material e pelo seu baixo custo de produção, quando comparado com produtos da indústria química ou extrativista. No Brasil, a maior parte dos processos industriais gira em torno da produção de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar (Lynd *et al.*, 2002; Ereno, 2007).

Nestes processos produtivos, parte dos resíduos gerados é material lignocelulósico resultante da parede celular vegetal, que muitas vezes, é queimado em caldeiras para produção de energia elétrica (Ereno, 2007). Entretanto, este resíduo lignocelulósico é ainda rico em polímeros de açúcares passíveis de utilização, podendo ser matéria-prima para outros processos industriais, como a produção de biodiesel, biogás, bioetanol e hidrocarbonetos (Lynd *et al.*, 2002; Wackett, 2008).

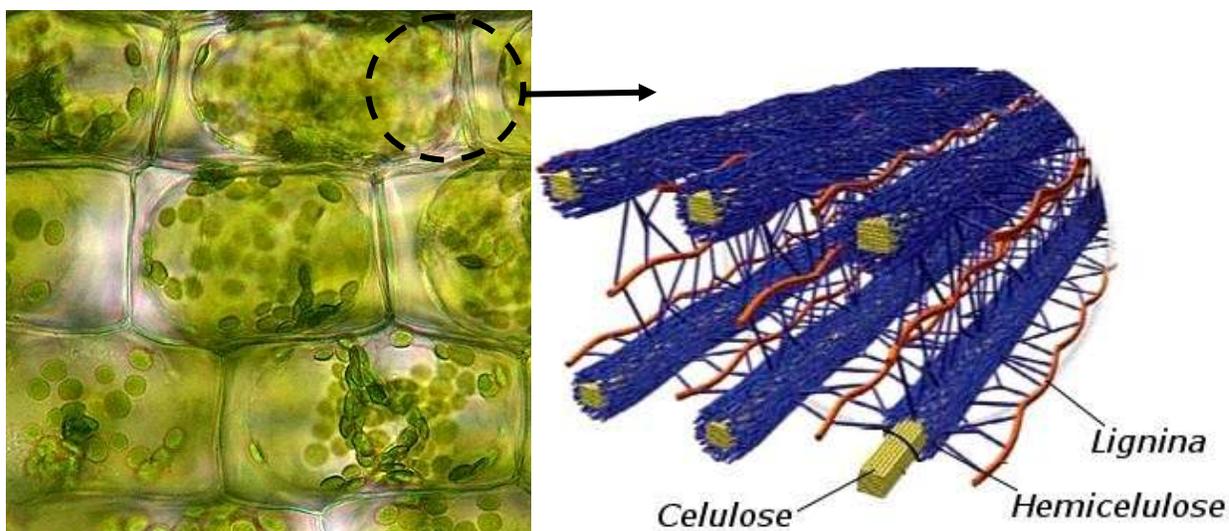
No entanto, a utilização destas cadeias de açúcares envolve uma fase de despolimerização, que pode ser realizada de forma química ou enzimática. A aplicação de enzimas em processos industriais tem sido uma alternativa atrativa em oposição à utilização de reagentes químicos, visto que muitas das vezes elimina procedimentos com altas temperaturas e pressão, o que reduz a produção de resíduos tóxicos e o custo.

Estas enzimas do complexo lignocelulolítico são, em grande parte, hidrolases. Industrialmente, três-quartos das enzimas comercializadas são hidrolases, devido ao seu amplo espectro de substratos e sua considerável estabilidade (Polaina *et al.*, 2007). Dentro do grupo das hidrolases, parte das enzimas mais comercializadas são as glicosidases, grupo onde se insere as enzimas dos complexos celulolítico e xilanolítico, relacionadas com a despolimerização do material lignocelulósico (Chery *et al.*, 2003).

### 1.1 Estrutura Vegetal

O material lignocelulósico da biomassa de plantas é oriundo da parede celular e, primordialmente, é formado pela combinação de 35-50% de celulose, 5-35%

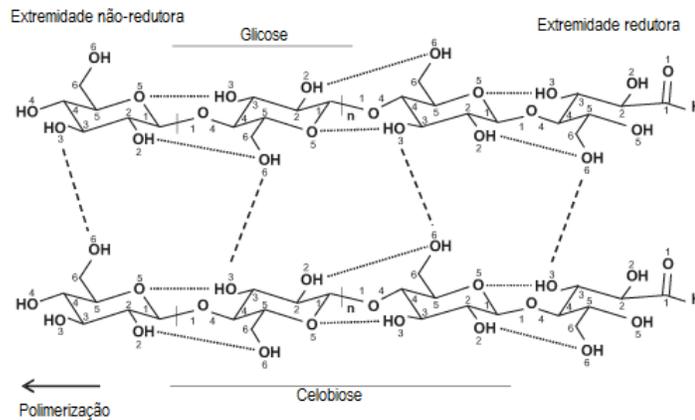
de lignina e 20-30% de hemicelulose (Lynd et al, 2002), interligados como mostrado na figura 1.



**Figura 1. Estrutura das fibras do tecido vegetal. (Modificado de Yarris, 1999).**

A celulose é constituída por moléculas de glicose, unidas entre si por meio de ligações tipo  $\beta$ -1,4. O dissacarídeo de glicose, a celobiose, é a unidade repetitiva da cadeia polissacarídica da celulose. Estas cadeias se dispõem de modo alinhado, formando um complexo cristalino de fibrilas organizadas. As fibras celulósicas não são puramente cristalinas e o grau de cristalinidade é variável formando um gradiente, desde o puramente cristalino até o puramente amorfo, com todos os graus de ordem entre os extremos (Marchessault *et al.*, 1957).

Sustentada por ligações de hidrogênio inter e intracadeias (Figura 2), a celulose é altamente coesiva e possui resistência excepcional permanecendo insolúvel em água, apesar da hidrofiliçidade das moléculas isoladamente (Festucci-Buselli *et al.*, 2007). As fibras de celulose cristalinas possuem uma maior quantidade destas ligações de hidrogênio quando comparada com a celulose amorfa. Desta forma, por possuir esta estrutura rígida, a celulose apresenta resistência ao ataque hidrolítico.

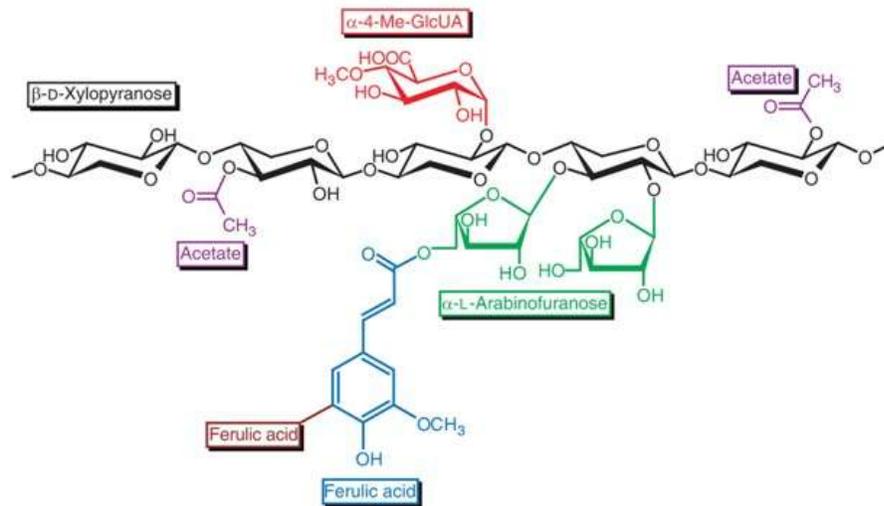


**Figura 2. Estrutura das ligações de hidrogênio inter e intracadeias da celulose (Festucci-Buselli *et al.*, 2007).** Linhas tracejadas representam ligações intercadeias. Linhas pontilhadas representam ligações intracadeias.

Depois da celulose, a hemicelulose é a fonte renovável mais abundante com potencial para utilização em bioprocessos, como exemplo a produção de etanol, furfural e o xilitol (Kulkarni *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2009).

A hemicelulose é formada por grupos distintos de heteropolímero constituídos em grande parte por açúcares pentoses (xilose e arabinose), e em menor quantidade por hexoses (glucose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila (Carvalho *et al.*, 2009). Os heteropolímeros desempenham papel importante na estrutura vegetal, pois interagem por ligações de hidrogênio à lignina e por forças de van der Waals às fibras de celulose (Ferreira-Filho, 1994). Com uma função adesiva, a hemicelulose garante a rigidez do vegetal e está distribuída na parede celular de forma organizada, assim como mostrado na figura 1.

A maior parte da hemicelulose é composta por xilana, um polímero heterogêneo formado por uma cadeia principal de D-xilose ligadas entre si por ligações xilopiranosídicas  $\beta$ -1,4, com vários radicais laterais (Carvalho *et al.*, 2009), como elucidada a figura 3. Os diferentes tipos de xilana possuem baixo peso molecular, tendo grau de polimerização de 50-250 monômeros, e ramificações resultantes de substituição no segundo ou terceiro oxigênio da xilose, geralmente por radicais acetil, ácido glicurônico e arabinofuranoses (Gorshkova *et al.*, 2010).



**Figura 3. Esquema geral apresentando os diferentes ligantes encontrados em xilanas de parede celular vegetal (Dodd *et al.*, 2009).**

As principais formas de xilana encontradas são as glicuranoxilanas, em vegetais de madeira dura, e as arabinoglicuranoxilanas, em vegetais de madeira mole. As glicuranoxilanas são ricas em ácido glicurônico, enquanto as arabinoglicuranoxilanas são ricas, não apenas em ácido glicurônico, como também arabinofuranoses (Dodd *et al.*, 2009; Gorshkova *et al.*, 2010). A xilana de madeiras moles são mais fortemente ligadas à lignina, pois as arabinofuranoses podem conter uma ligação adicional a um ácido ferúlico, o qual forma ligações covalentes com os ácido ferúlico da lignina (Dodd *et al.*, 2009). A hemicelulose das plantas da família das Poaceae é composta basicamente por arabinoglicuranoxilanas, o que pode ser um entrave à hidrólise da biomassa vegetal proveniente destes organismos, como a cana-de-açúcar.

## 1.2 Bioconversão de resíduos lignocelulósicos

Na natureza, a degradação de biomassa lignocelulósica é realizada por uma variedade de enzimas hidrolíticas que convertem as estruturas polissacarídicas em açúcares fermentescíveis. As celulasas são as enzimas mais estudadas e possuem a capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas tipo  $\beta$ -1,4 entre os resíduos glicosil. Elas são classificadas em três grupos: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases. As endoglucanases (EGL) clivam em sítios amorfos internos da cadeia polissacarídea da celulose, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e novas extremidades

reduzidas e não reduzidas. As exoglucanases agem na região cristalina da celulose processando as extremidades das fibras; elas são representadas pelas celobiohidrolases, que liberam como monômero a celobiose a partir da clivagem das extremidades reduzidas (CBHI) e não reduzidas (CBHII), descamando a celulose cristalina fibra a fibra. As  $\beta$ -glucosidases (BGL) hidrolisam as celobioses e liberam glicose solúvel (Lynd *et al.*, 2002; Dashtban *et al.*, 2009).

Por outro lado, um grande número de enzimas é necessário para hidrolisar a hemicelulose devido a sua tamanha heterogeneidade, sendo que cada enzima é responsável por remover radicais ou clivar as cadeias principais. No entanto, como grande parte da hemicelulose é composta por xilanas e mananas, o complexo hemicelulolítico se resume à ação das enzimas mananases e xilanases (Dashtban *et al.*, 2009).

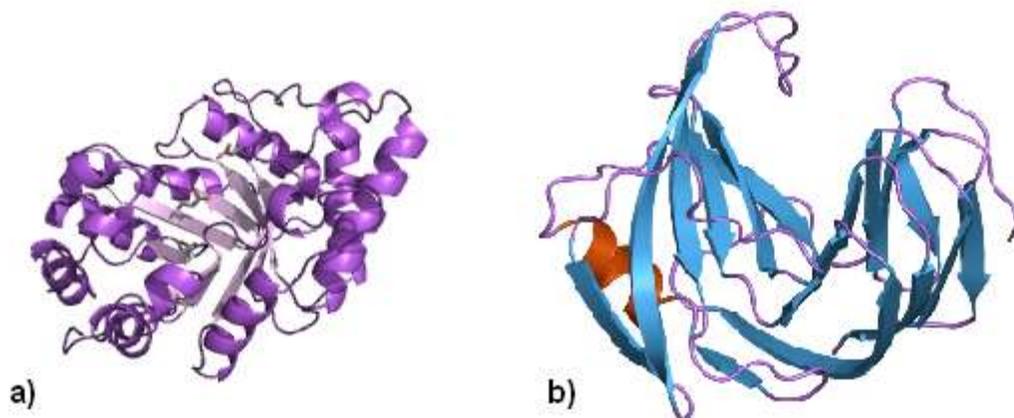
### 1.2.1 Complexo xilanolítico

Para a hidrólise total da xilana, é necessária a ação de várias enzimas: as endoxilanases,  $\beta$ -xilosidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -L-glucuranosidase, acetil-xilanoesterase, entre outras; isto devido à heterogeneidade e complexidade do polissacarídeo (Carvalho *et al.*, 2009).

Na natureza, as xilanases de microrganismos fitopatogênicos desempenham um papel fundamental na invasão de plantas. Pela hidrólise da parede celular, juntamente com as celulases, as xilanases ajudam na invasão do tecido do hospedeiro (Subramaniyan *et al.*, 2002).

As xilanases ou xilanohidrolases são divididas em dois grupos de acordo com a posição de ação sobre o substrato: as endoxilanases, que quebram as ligações  $\beta$ -1,4 internas da cadeia polissacarídica principal, e as exoxilanases, que agem nas extremidades e radicais da xilana (Kulkarni *et al.*, 1999). Estas enzimas são enquadradas na família das glicosil-hidrolases de acordo com a similaridade da sequência do domínio catalítico e, segundo Subramaniyan e Prema (2002), grande parte delas é pertencente às famílias 11 e 10, compondo 55% e 41% do total, respectivamente.

As xilanases da família 11 possuem baixa massa molecular (< 30 kDa), baixo ou alto ponto isoelétrico e uma topologia de *jelly-roll*, que consiste de folhas beta antiparalelas em forma de barril com uma hélice perpendicular, com aparência semelhante a uma mão direita semi fechada (Figura 4). As xilanases da família 10 têm como característica uma alta massa molecular (> 30 kDa), ponto isoelétrico neutro à baixo e uma topologia em forma de *TIM barril*, que consiste de oito hélices alfa e oito folhas beta paralelas alternadas (Figura 4). As diferentes estruturas tridimensionais das famílias correspondem a diferentes atividades catalíticas das enzimas. Nas xilanases da família 11, o grupo catalítico acomoda de cinco a sete resíduos xilopiranosídicos, enquanto na família 10, o substrato é ligado superficialmente à base do barril (Subramaniyan *et al.*, 2002; Dodd *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Estrutura representativa de xilanases. (a) Xilanase da família 10 de *Penicillium simplicissimum* (Schmidt *et al.*, 1999). (b) Xilanase da família 11 de *Trichoderma harzianum* (Campbell *et al.*, 1994).

Estudos de afinidade de cada família das endoxilanases demonstram que as enzimas pertencentes à família das glicosil-hidrolases 11 possuem pontos de clivagem específicos, de acordo com o tamanho da cadeia de xilose e as ramificações existentes, enquanto as glicosil-hidrolases da família 10 podem atacar desde pontos próximos às ramificações quanto xilooligossacarídeos ligados a outras cadeias polissacarídicas, como à celulose, o que avaliza uma maior flexibilidade de emprego desta enzima na indústria (Biely *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Produção de xilanases

Grande parte das xilanases estudadas advém de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Humicola*. A expressão de xilanases em bactérias e fungos raramente é constitutiva e sua indução no organismo é um fenômeno pouco esclarecido (Kulkarni *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005). Devido à massa molecular, as xilanas não ultrapassam a parede celular, deste modo os xilooligossacarídeos, desempenham papel importante na indução das xilanases (Kulkarni *et al.*, 1999; Mach *et al.*, 2003).

A celulose tem demonstrado influência na indução de xilanase em alguns organismos. Entretanto não é claro se a própria celulose induz a síntese de xilanase, se ínfimas frações de xilana são capazes de desencadear o processo ou se há um efeito sinérgico com a produção de celulasas (Sachslehner *et al.*, 1998; Mach *et al.*, 2003). Vários substratos se mostram eficientes na indução de xilanases, como sabugo de milho, farelo de aveia, farelo de arroz, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar. Contudo a utilização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* pode ser problemática, por conter resíduos de glicose que reprimem a síntese de enzimas xilanolíticas por um mecanismo de repressão catabólica em nível transcricional, sendo necessário, então, uma pré-lavagem cuidadosa do material com água para solubilização da glicose (Carvalho, 2008).

### 1.3.3 Aplicação na indústria

No setor alimentício, as xilanases são empregadas com o propósito de degradar resíduos de arabinoxilana, assim, diminuindo a viscosidade de vinhos e sucos. As xilanases também são utilizadas para decompor parte da hemicelulose de frutos e flores, facilitando a extração de sucos, óleos e essências (Polaina *et al.*, 2007). No setor animal as xilanases são adicionadas à ração para melhor absorção dos nutrientes pelo animal e auxiliar a fermentação ruminal (Van De Vyver *et al.*, 2004).

Entretanto, é no setor tecnológico que se encontra a maior utilização das xilanases. As principais indústrias que empregam as enzimas são a têxtil, no processo de maceração do linho; a sucroalcooleira, na sacarificação da hemicelulose, e a

indústria de papel e celulose (Kulkarni *et al.*, 1999; Polizeli *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011).

Na indústria de papel e celulose, a principal aplicação das xilanases está no branqueamento de polpa de celulose e papel, cuja função é eliminar, depois do processo de polpação, a lignina residual das fibras de celulose, a qual interfere na qualidade e alvura final do papel (Wong *et al.*, 1988). A polpação é o processamento prévio da polpa de celulose, que utiliza de um cozimento alcalino para promover a autólise da hemicelulose, resultando na separação de grande parte da lignina das fibras de celulose. A lignina residual é retirada posteriormente no processo de branqueamento, que é realizado com uso de reagentes a base de cloro ou pelo biobranqueamento que emprega xilanases para eliminar a hemicelulose, desprendendo a lignina da celulose (Subramaniyan *et al.*, 2002). Desta forma, como o objetivo é a retirada da hemicelulose que estabelece a ligação entre a lignina e a celulose, o emprego das xilanases podem ser tanto na biopolpação como no biobranqueamento. Entretanto, ambos os processos são realizados em alto pH e alta temperatura. Neste contexto o descobrimento de novas xilanases, assim como o desenvolvimento de xilanases modificadas através de evolução dirigida são importantes, no sentido de se obter enzimas que suportem altas temperaturas e sejam ativas em pH básico. Isto diminuiria os custos do processo, aumentaria a qualidade da polpa de celulose e diminuiria o descarte de resíduos clorados (De Araujo *et al.*, 1999; Valls *et al.*, 2009).

Com a busca pelo desenvolvimento do etanol de segunda geração no Brasil, se intensificaram os estudos voltados à bioprospecção de enzimas hidrolíticas do complexo celulolítico. Paralelamente, a procura por enzimas do complexo xilanolítico também tem aumentado, de modo a se aprimorar o processamento e alavancar a cadeia fermentativa de pentoses.

O passo primordial para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é a despolimerização da celulose. Conhecido desde 1819, o tratamento ácido é o método precursor da hidrólise da biomassa. Esta técnica envolve o uso, ou de ácidos concentrados combinados com temperaturas moderadamente altas, ou ácidos diluídos com altas temperaturas (Galbe *et al.*, 2002). A principal desvantagem da hidrólise ácida é a geração de inibidores de fermentação, aliado ao grande uso de energia (Galbe *et al.*, 2002). Desta forma, o uso de enzimas para a conversão da

biomassa, chamada de hidrólise enzimática, tem se tornado uma alternativa atrativa para a sacarificação da celulose, devido a uma maior especificidade, eficiência, uma hidrólise sem geração de inibidores e menor gasto energético (Arantes *et al.*, 2010; Banerjee *et al.*, 2010a). Contudo, antes da sacarificação da celulose faz-se necessário um processamento desta biomassa vegetal. Este pré-tratamento visa uma desorganização do complexo lignocelulósico, diminuindo a recalcitrância da estrutura e possibilitando um ataque enzimático mais eficiente.

Os pré-tratamentos físicos são mais promissores por serem capazes de dissolver a hemicelulose e a despolimerizar quase que totalmente por autólise. Desses, o principal é o *Steam explosion*, que consiste de um alto aquecimento (em média 200 °C) sob alta pressão em poucos segundos, seguido de uma rápida diminuição da pressão, o que desorganiza a estrutura dos polímeros coligado à liberação dos radicais acetil da xilana em forma de ácido acético, o que hidrolisa a hemicelulose. As principais vantagens deste processo são a rapidez e a isenção de agentes ácidos, o que resulta em uma menor geração de inibidores. Entretanto, esta metodologia é conduzida com grande dispêndio de energia e a necessidade de uma alta particularização da biomassa vegetal (Kaar *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2009).

Advindos da indústria de papel e celulose, os pré-tratamentos químicos são os mais estudados por possuírem uma maior eficiência com menor custo geral. O pré-tratamento alcalino foi o precursor das novas metodologias químicas e se caracteriza pelo emprego de hidróxido de sódio, o qual favorece a reação de saponificação dos ésteres que ligam as cadeias de xilana intermolecularmente ou com a lignina (Pinto *et al.*, 1996). Outras variantes deste processo são estudadas, como o alcalino-oxidativo, que combina a ação da base com peróxido de hidrogênio, e alcalino utilizando outras bases, como amônia ou hidróxidos de cálcio e potássio (Zheng *et al.*, 2009).

Independentemente do pré-tratamento utilizado, é necessária uma lavagem do material para aplicação na bioconversão da celulose. Geralmente utiliza-se água quente como solvente, para solubilizar a lignina, hemicelulose e açúcares simples. Entretanto, do material restante, uma maior quantia de lignina pode ser retirada por meio de solventes orgânicos, como o etanol ou acetona, permanecendo, então, a celulose, com digestibilidade aumentada e passível de ser transformada em glicose pelas

enzimas (Pereira Jr. *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2011). Contudo, estas formas de pré-tratamento são conduzidas sob pressão e alta temperatura, o que ainda beneficia a geração de inibidores.

Por outro lado, um pré-tratamento alternativo aos termoquímicos são aqueles que utilizam enzimas microbianas para hidrolisar a hemicelulose e expandir as cadeias polissacarídicas. Para isso, utilizam-se complexos enzimáticos ricos em xilanases, que garantem a solubilização da lignina, e enzimas não-hidrolíticas chamadas expansinas, que quebram as ligações de hidrogênio intermolecular (Zheng *et al.*, 2009). Esta alternativa se mostra interessante por ser conduzida em condições normais de temperatura e pressão. Porém existem problemas quanto ao custo destas enzimas e a velocidade de reação, o que ainda dificulta sua aplicação em escala industrial (PEREIRA JR. *et al.*, 2008). Entretanto, além do uso das xilanases para o pré-tratamento, estudos de Alvira *et al.* (2011) demonstraram que a suplementação destas enzimas aos complexos celulolítico pode aumentar a eficiência da sacarificação.

De forma geral, o processo de produção das celulasas e xilanases ainda é cara, portanto, as características destas enzimas devem ser exploradas, a fim de se obter enzimas com uma melhor atuação na indústria. Estas enzimas constituem um dos principais desafios para viabilizar a comercialização de Bioetanol (Wyman, 2007). O fungo *Trichoderma reesei* tem sido o principal objeto de estudo na produção de celulasas, porém, hoje se busca por alternativas para a produção em escala industrial, que vão desde o uso de outros microrganismos, proteínas recombinantes e até a utilização de celulasas de insetos (Gusakov, 2011).

### **1.3 Produção de Proteínas Recombinantes**

A possibilidade de produzir proteínas com a mesma função original por expressão heteróloga utilizando microrganismos permitiu uma produção mais fácil, barata e em larga escala. Vários microrganismos são empregados, principalmente as bactérias *Escherichia coli*, por serem bem conhecidas geneticamente e, especialmente, podem ter suas seqüências facilmente manipuladas para maximizar a expressão (Gellissen, 2005; Griffiths, 2008).

Nas últimas décadas, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um poderoso e barato sistema de expressão heteróloga para a produção altos níveis de proteínas recombinantes. Este sistema de expressão é único, pois combina as vantagens dos sistemas de expressão de procariotos (expressão em altos níveis, fácil aumento de escala e meios de crescimento baratos) e de eucariotos (modificações pós-traducionais e processamento de peptídeos sinais, principalmente) (Dai, 1997; Cereghino *et al.*, 2000).

Os principais fatores responsáveis por alavancar o uso da *P. pastoris* são: a simplicidade das técnicas para manipulação genética, a habilidade dessa levedura de produzir proteínas heterólogas extracelulares em altos níveis, o baixo nível de proteínas nativas extracelulares e a viabilidade de plasmídeos comerciais. Sobretudo, a principal vantagem do sistema de levedura em relação ao bacteriano é o seu potencial de realizar modificações pós-traducionais, tipicamente associadas com eucariotos, como processamento de peptídeos sinais, formação de pontes dissulfeto eficientemente, adição de lipídeos e glicosilações (Dai, 1997; Cereghino *et al.*, 2000).

Enzimas dos complexos celulolíticos e xilanolíticos tem sido satisfatoriamente expressas em sistema *Pichia pastoris*, podendo-se destacar a produção de xilanases da família 10 de *Aspergillus terreus* (Chantasingh *et al.*, 2006), *Cryptovalsa mangrovei* (Boonyapakron *et al.*, 2005) e *Penicillium citrinum* (Wakiyama *et al.*, 2008b). Das xilanases de *Trichoderma harzianum* apenas o gene da *xyn2* (família 10) foi heterologamente expresso, entretanto, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (Lee *et al.*, 2009). Quanto às xilanases da família 10 (*xyn3*) de *Trichoderma*, apenas é relatado à clonagem da enzima de *Trichoderma reesei* em *E. coli* (Ogasawara *et al.*, 2006). Entretanto vários trabalhos estudando o promotor de *xyn3* de *T. reesei* são encontrados, devido a expressão deste gene apenas quando o fungo é induzido na presença de indutores de celulasas (celulose ou sorbose), e não de xilanases (xilana e xilooligossacarídeos) (Xu *et al.*, 2000). A partir destes conhecimentos, Nakazawa *et al.* (2012) construiu uma cepa transgênica de *T. reesei* expressando a *bgII* de *Aspergillus* eficientemente sob controle da sequência promotora da *xyn3*.

A expressão heteróloga de xilanases muita das vezes não é tão eficiente quanto a produção pelo próprio organismo, no entanto, a pureza e a ausência de

celulases na expressão heteróloga permitem aplicações específicas da enzima, como na utilização na polpação da celulose (LEE *et al*, 2009).

#### **1.4 *Trichoderma harzianum***

*Trichoderma sp* são importantes fungos saprófitos do solo, e vários integrantes são antagonísticos a fitopatógenos, inclusive alguns com forte estrutura de resistência (Melo, 1996). O fungo *Trichoderma harzianum*, forma anamorfa do *Hypocrea lixii*, tem sido tradicionalmente utilizado no controle biológico de espécies fitopatogênicas importantes como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia* e *Botrytis*, sendo comercializado na forma de esporos, pronto para pulverizações foliares e de base (Faria, 2002; Almeida, 2009; NCIPM, 2009).

Segundo Kar *et al* (2006), os fungos filamentosos, particularmente *Trichoderma sp*, são considerados importantes como produtores de hidrolases para uso industrial, por não serem patogênicos, por sua produção de enzima extracelular em altos níveis e pelo seu fácil cultivo. Além da utilização para biocontrole, o fungo *T. harzianum* tem sido amplamente utilizado para a produção de xilanases e mananases, no entanto, grande parte dos trabalhos realizados utilizam diretamente o sobrenadante do cultivo, empregando diferentes fontes de carbono como indutores (Wong *et al.*, 1986; Torrie *et al.*, 1990; Rezende *et al.*, 2002; Polizeli *et al.*, 2005). Saddler *et al.* (1985) sugerem diferenças na regulação da expressão de celulases e xilanases entre *T. reesei* e *T. harzianum*, sendo que o fungo *T. reesei* RUT-C30 apresenta atividades xilanásicas mais altas quando induzido por xilano, e atividades celulolíticas mais altas em celulose, enquanto o fungo *T. harzianum* E58 apresenta atividades xilanásicas e celulolíticas superiores quando induzido por celulose. Maeda *et al.* (2011) reportaram significativa atividade xilanásica do *T. harzianum* IOC-3844 induzido por celulose.

Com o intuito de encontrar genes de interesse biotecnológicos de *Trichoderma harzianum* foi construída uma biblioteca de cDNA deste organismo em nosso laboratório. Para isto o fungo *T. harzianum* cepa IOC 3844 foi cultivado em condições indutoras com 2% de celulose microcristalina (Avicel) (Wilson Malagó Jr., Tese de Doutorado). Estudos recentes têm demonstrado um potencial deste fungo filamentoso para produção de celulases em larga escala e aplicação industrial (Ahmed

*et al.*, 2009; De Castro *et al.*, 2010a; 2010b). Não obstante, De Castro e colaboradores (2010a), estudando a cepa *T. harzianum* IOC-3844 encontraram um complexo enzimático balanceado, comparado a coquetéis comerciais e com maior atividade das enzimas do complexo celulolítico.

Na biblioteca de *T. harzianum* foram encontrados tanto genes relacionados ao complexo celulolítico quanto do complexo xilanolítico. Entre eles, foi reportado por nosso laboratório a expressão heteróloga de uma enzima endoglucanase em *Pichia pastoris* (Generoso *et al.*, 2012), apresentando atividade hidrolítica considerável e grande produção. Entre os genes encontrados, um clone contendo gene de uma xilanase foi empregado para busca por BlastX e BlastN, não encontrando seqüências similares em *T. harzianum*, entretanto, encontrou-se dois resultados para endoxilanase, um de *T. jecorina* e outro de *Trichoderma pseudokoningii*, ambos com identidade acima de 78% com o clone da biblioteca.

A seqüência de aminoácidos deduzida a partir do clone de trabalho foi alinhada ao banco de dados de famílias Pfam, e descobriu-se que a enzima pertencia à família das glicosil-hidrolases 10. Desta forma, o trabalho objetivou-se em caracterizar esta endoxilanase encontrada na biblioteca de cDNA de *T. harzianum*, devido ao seu potencial de aplicação para hidrólise de biomassa vegetal e pelo fato de não ser amplamente estudada para espécies do gênero *Trichoderma* assim como as xilanases da família 11.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivos a produção recombinante de uma endoxilanase pertencente à família glicosil hidrolase 10 de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 em *Pichia pastoris* e estudar as características bioquímicas e cinético-enzimáticas desta xilanase recombinante (Capítulo 1). Tem-se também por objetivo analisar o perfil de expressão da endoxilanase em *T. harzianum* quando submetido à indução com celulose, xilano e bagaço de cana-de-açúcar explodido, dado que estudos anteriores indicam que esta enzima não é induzida por xilano em *T. reesei* (Capítulo 2).

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Caracterização completa do clone identificado na biblioteca e realização de análises bioinformáticas para comparação com xilanases já descritas;
- ❖ Clonagem da fase aberta de leitura (ORF) em vetor para expressão em *Pichia pastoris*;
- ❖ Isolamento de transformantes hiperprodutores da enzima recombinante;
- ❖ Purificação da enzima recombinante;
- ❖ Realização de testes bioquímicos para caracterização de pH e temperatura ótimos, termoestabilidade, resistência térmica, resistência a proteólise e efeito de íons na atividade;
- ❖ Estabelecimento dos parâmetros cinéticos da enzima recombinante para substratos comerciais de endoxilanases.
  
- ❖ Indução de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 empregando-se diferentes fontes de carbono.
- ❖ Extração de RNA e síntese de cDNA.
- ❖ Padronização da reação de PCR em tempo-real.
- ❖ Análise dos transcritos por qRT-PCR.

## 2.3 Organização do trabalho apresentado

Com o objetivo de tornar mais clara as etapas desenvolvidas no trabalho, decidiu-se por dividi-lo em dois capítulos com seções individuais de **Metodologia** e **Resultados e Discussão**, assim como apresentado abaixo:

### ❖ **CAPÍTULO 1: “Produção recombinante e caracterização da endoxilanase recombinante de *Trichoderma harzianum*”**

Neste capítulo são apresentados resultados relativos à subclonagem e expressão heteróloga da endoxilanase da família glicosil-hidrolase 10 de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 em *Pichia pastoris*, assim como a caracterização bioquímica e enzimática da proteína recombinante.

### ❖ **CAPÍTULO 2: “Análise de expressão gênica de *Trichoderma harzianum* submetido a diferentes fontes indutoras”**

Neste capítulo são apresentados resultados relativos à análise de expressão em pequena escala de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 submetido à indução por celulose microcristalina e xilana, isoladamente, uma mistura de celulose microcristalina com xilana e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por *steam explosion*.

# CAPÍTULO 1

---

## **PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DA ENDOXILANASE RECOMBINANTE DE *TRICHODERMA HARZIANUM***

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Cepas, meios de cultura e reagentes empregados

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) foi empregada para propagação geral dos plasmídeos. As células bacterianas foram crescidas sob agitação de 250 RPM à 37°C em meio Luria-Bertani (LB) *low-salt* (Anexo I) com antibiótico adequado ao gene de seleção do plasmídeo. *Pichia pastoris* KM71H<sup>(Mut<sup>S</sup>)</sup> (Invitrogen) foi empregada como hospede de expressão. As culturas de leveduras foram mantidas em meio peptona, extrato de leveduras e glicose (YEPD) (Anexo I). O meio de crescimento e indução empregado foi o YEPD tamponado com tampão 100mM fosfato de potássio pH 6,0. O fungo *Trichoderma harzianum* foi mantido em meio batata-dextrose Agar (Himedia) e os meios de cultura e condições foram empregadas segundo Mandels *et al.* (1962) (Anexo I).

Todas as enzimas de restrição e polimerases utilizadas foram adquiridas pela empresa Fermentas, a enzima T4 ligase adquirida pela Invitrogen e as enzimas glicosidases foram adquiridas pela New England Biolabs. Todas as reações foram conduzidas segundo especificações do fabricante. Todos os oligonucleotídeos empregados foram adquiridos pela Invitrogen. Xilana *beechwood* and *birchwood* foram obtidas da empresa Sigma-Aldrich e reagentes químicos gerais das empresas J.T.Baker e Merck.

#### 3.2 Clonagem e expressão da endoxilanase recombinante

##### 3.2.1 Caracterização do clone.

A região codificadora da endoxilanase foi isolada de uma biblioteca de cDNA de *T. harzianum* IOC-3844 induzido com celulose microcristalina, já existente no laboratório (Wilson Malagó Jr., Tese de Doutorado). O clone, identificado como ThXyn3, foi encontrado por comparação utilizando o software de alinhamento BlastX (Altschul *et al.*, 1990).

O clone foi seqüenciado completamente, incluindo a fase aberta de leitura (ORF) e regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3', pela técnica de dideoxi (Sanger *et al.*, 1977) em seqüenciador automático MegaBACE 1000 Flex (GE Healthcare), com o uso do kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare).

A ORF foi analisada quanto à presença de peptídeo sinal com o software SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004), e sítios de glicosilação, com os softwares NetNGlyc (Gupta *et al.*, 2004) e NetOGlyc (Julenius *et al.*, 2005). A seqüência protéica foi modelada baseada em homologia com a plataforma Swiss-Model (Arnold *et al.*, 2006). A seqüência foi comparada por alinhamento com seqüência de xilanases GH10 já depositadas de fungos filamentosos, empregando o software Multialin (Corpet, 1988).

### 3.2.2 Clonagem do gene da endoxilanase em *Pichia pastoris*

A ORF do ThXyn3 foi subclonada em vetor pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen – Anexo II), substituindo-se o peptídeo sinal fator- $\alpha$  pelo provável peptídeo sinal nativo. A seqüência codificante foi amplificada utilizando os *primers* ThXyn3\_forward, 5'-CCTTCGAAATGAAAGCAAATATAATATTTTGC-3', e ThXyn3\_reverse, 5'-CCGTCGACTTGTAAAATGCTTACAATACTG-3' (bases sublinhadas indicam os sítios de restrição das enzimas *Bst*BI e *Sal*I, respectivamente, introduzidos para clonagem).

A reação de amplificação foi estabelecida com 10 ng do plasmídeo do clone ThXyn3, 0,2 mM de cada dNTP, 1  $\mu$ M de cada *primer*, 1,25 U de enzima *Pfu* DNA polimerase, 1x tampão da enzima, 2 mM de MgSO<sub>4</sub> e água para um volume final de 50  $\mu$ L. O programa utilizado iniciava-se com uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 58°C por 60 segundos e alongação de 68°C por 90 segundos. O material amplificado foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e posteriormente purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

O amplicom e o plasmídeo pGAPZ $\alpha$ A foram restringidos com as enzimas *Bst*BI e *Sal*I, utilizando-se 2x do tampão Tango, 20 U de cada endonuclease, 2  $\mu$ g de DNA e água para um volume final de 50  $\mu$ l. As reações foram incubadas a 37°C *overnight*, e posteriormente, as bandas foram purificadas de gel de agarose 1% com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up. Para a reação de ligação utilizou-se 1x do tampão de T4 ligase, 1 U de T4 ligase, 150 ng de plasmídeo e 180 ng de inserto, em

um volume final de 20  $\mu$ L. A reação ocorreu à temperatura ambiente por 2 horas. A mistura de ligação foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , que foram plaqueadas em meio LB *Low-Salt* contendo antibiótico zeocina a uma concentração final de 25  $\mu$ g/ml. Clones recombinantes foram identificados por PCR de colônia, realizada com 1x de tampão da enzima, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 1  $\mu$ M dos primers ThXyn3\_forward e Aox 3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') e uma pequena quantidade de células de cada colônia, em um volume final de 15  $\mu$ L. O programa utilizado iniciava com uma desnaturação de 95°C por 10 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 50°C por 60 segundos e alongação de 72°C por 60 segundos, e uma alongação final de 72°C por 7 minutos. Os resultados de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

O plasmídeo recombinante foi linearizado com endonuclease *Bsp*HI para a posterior transformação em *Pichia pastoris*. As células competentes foram produzidas de acordo com Cregg *et al* (2007). Para isso, uma quantidade de células foi pré-inoculada em 5 mL de YEPD e incubado a 250 RPM, 30°C por 16 horas. Posteriormente, 50  $\mu$ L do pré-inóculo foi inoculada em 50 mL de YEPD e incubada a 250 RPM, 30°C até densidade óptica a 600 nm de 1,3. Centrifugou-se 25 mL da suspensão celular a 1500 g por 5 minutos e 4°C e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se as células em 5 mL de YEPD, 1 mL de HEPES 1M pH 7,0 e 125  $\mu$ L de DTT 1M e incubou-se a 30°C por 15 minutos. Passado o tempo, completou-se o volume para 25 mL com água destilada deionizada gelada, centrifugou-se nas mesmas condições e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se as células em 12,5 mL de água destilada deionizada gelada e centrifugou-se novamente a suspensão celular, descartando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se as células em 1 mL de Sorbitol 1M e centrifugou-se, descartando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 50  $\mu$ L de Sorbitol 1M e alicotou-se em 40  $\mu$ L para realizar a transformação.

A transformação foi realizada por eletroporação (1.5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ) utilizando 40  $\mu$ L das células competentes e 1  $\mu$ g de plasmídeo linearizado. Os transformantes foram cultivados em meio YEPD sólido com 1 M de sorbitol e 100  $\mu$ g/ml zeocina até aparecimento das colônias (aproximadamente 4 dias). Os clones recombinantes foram identificados por PCR de colônia, realizada com 1x de tampão da

enzima, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 1 µM dos primers ThXyn3\_forward e Aox 3' e 1 µL de células de cada colônia previamente fervida por 5 minutos em SDS 0,2%, em um volume final de 25 µL. O programa utilizado iniciava com uma desnaturação de 95°C por 10 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 50°C por 1 minuto e 30 segundos e alongação de 72°C por 3 minutos. Os resultados de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Os recombinantes positivos foram avaliados quanto à produção da enzima recombinante em placa de cultura de 24 poços (Millipore). Para isso, uma quantidade de massa celular foi crescida em 3 mL de meio YEPD, sob agitação de 250 RPM à 30°C. Em intervalos de 24 h até 96 h, a placa foi centrifugada e 100 µL do sobrenadante foram retirados, do qual 15 µL foram misturados a tampão de amostra e analisado em SDS-PAGE corado com comassie blue (Sambrook *et al.*, 2001). O clone de *P. pastoris* recombinante com maior produção em menor tempo foi selecionado para produção da enzima recombinante em escala de purificação.

### 3.2.3 Expressão e purificação da proteína recombinante

Para a produção da proteína recombinante em maior escala, primeiramente uma quantidade de massa celular foi crescida por 16 h, em 5 mL de meio YEPD, sob agitação de 250 RPM à 30°C. Posteriormente, 200 µL da cultura celular foram transferidos para 200 mL de meio YEPD tamponado com 100mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0 e cultivados sob agitação de 250RPM à 30°C por 48h.

A purificação da enzima recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna contendo 5mL de resina Ni-NTA Agarose (Qiagen). Para equilíbrio da coluna, foram utilizados 25 mL de tampão de equilíbrio (Anexo I), e em seguida, todo sobrenadante do cultivo foi passado pela coluna. Para eluição da proteína recombinante, foram utilizados 10 mL de tampão de eluição (Anexo I). As frações contendo a enzima purificada foram misturadas, dializadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) , quantificada por kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific) e estocadas a -20°C.

### 3.2.4 Análises qualitativas e caracterização da proteína recombinante

A enzima purificada, o sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* recombinante e o sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* KM71H selvagem foram analisados em SDS-PAGE 12% e zimograma. A análise de zimograma foi realizada segundo descrito por Morales *et al.* (1993). Para isso, inicialmente 20 µL das amostras são separadas em SDS-PAGE contendo 1% de xilana *birchwood* (Sigma) e com tampão não desnaturante. Para detectar a atividade da xilanase, o gel foi, primeiramente, tratado com 1% de Triton X-100, e então incubado por 24 horas a 37°C em tampão 50 mM fosfato potássio (pH 6,5). Após a reação, o gel foi corado com 1% de vermelho de congo por 30 minutos e posterior descoramento com cloreto de sódio 1 M até o aparecimento dos halos de atividade.

Para análise por *Western Blot* (Sambrook *et al.*, 2001), primeiramente a enzima purificada foi utilizada para produção de anticorpo policlonal em camundongo. O anticorpo polyclonal Anti-Th-Xyn3 foi produzido em cobaias Swiss (*Mus musculus*) com 20 dias submetidos a duas injeções de 100 µg de proteína recombinante purificada. A primeira imunização foi realizada com 100 µL da solução da proteína combinada com 100 µL de adjuvante completo de Freund (Sigma). A segunda inoculação foi realizada após 45 dias, com 100 µL de proteína conjugada com 100 µL de adjuvante incompleto de Freund (Sigma). A cobaia sacrificada após 10 dias; o sangue coletado e centrifugado à 16.000 g por 5 minutos, a 4°C, para obtenção do soro contendo o anticorpo.

O anticorpo produzido foi utilizado para avaliar a forma da endoxilanase em sobrenadante do fungo *T. harzianum* IOC-3844 induzido com 0,62% de Avicel mais 0,48% de xilana *birchwood* (Metodologia Capítulo 2) por análise de *Western Blot*. Para isso, 20 µL de proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF – Pierce) utilizando o módulo submerso Mini-Trans-Blot (Mini-Protean Tetra Cell – Bio-Rad) por duas horas em tampão de transferência (Anexo I). Primeiramente, a membrana foi tratada com 2% de leite desnatado em tampão salino tris-tamponado (TBE – Anexo I), e então as proteínas foram detectadas pelo anticorpo primário anti-Th-Xyn3 e, após, anticorpo secundário anti-mouse-IgG conjugado com a enzima fosfatase alcalina, ambos diluídos 1:10.000 em TBS. O substrato BCIP/NBT-Blue (Sigma) foi utilizado para detecção da fosfatase alcalina.

Para analisar a existência e o tipo de glicosilação na proteína recombinante, a enzima purificada foi tratada com N- e O-glicosidases. Para análise de N-glicosilações, utilizou-se as enzimas Endoglicosidase-H e Peptídeo N-glicosidase F (PNGase F), e para O-glicosilações, a enzima Endo-N-acetil-galactominidase associada a Neuraminidase. Volumes de 20 µL das amostras tratadas foram analisadas em SDS-PAGE 12% corado com comassie blue.

### **3.3 Ensaios bioquímicos**

#### *3.3.1 Análise de açúcares redutores pelo método de DNS*

A atividade hidrolítica da enzima recombinante foi monitorada com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), fundamentada na metodologia descrita por Miller (1959). A metodologia é baseada na quantificação do conteúdo de açúcares redutores, utilizando uma curva de xilose como padrão de calibração.

A análise foi conduzida em microescala em microplaca de 96 poços em termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf). Para isso, 40 µL de uma solução tamponada com 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5, contendo o 2% de xilana *birchwood*, foi incubada à temperatura de análise por 10 minutos. Em seguida, 10 µL de enzima recombinante foram adicionadas ao substrato e mantida a temperatura constante. Passados 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL da solução de DNS (Anexo I) e o conteúdo foi incubado à 95 °C durante 5 minutos. A amostra foi resfriada em gelo à temperatura ambiente e diluída em 2 mL de água destilada para leitura da absorbância a um comprimento de onda de 540 nm.

Os açúcares redutores formados foram quantificados a partir de uma curva padrão construída variando-se xilose de 0,1 g/L a 1 g/L em intervalos de 0,1, pelo mesmo método descrito. As reações foram realizadas em triplicatas e foi realizada uma análise sem enzima como controle branco.

Os dados foram avaliados por análise estatística e as médias e os desvios padrão foram plotados. Todas as análises foram realizadas com o software estatístico Prism 5 (GraphPad).

### 3.3.2 Caracterização de temperatura e pH ótimos

Inicialmente, estabeleceu-se a temperatura ótima da endoxilânase, utilizando-se uma solução 2% de xilana *birchwood* em tampão fosfato potássio 100 mM (pH 6,0). Para isto, foram realizados os ensaios de atividade enzimática variando-se a temperatura de análise, assim como descrito no item 3.3.1. As temperaturas analisadas foram 21,1; 22,8; 25,1; 27,8; 30,6; 33,4; 35,3; 37,9; 40,7; 43,4; 46,0; 48,2; 49,8; 50,8°C.

Depois do estabelecimento da temperatura ótima da enzima, esta foi utilizada para avaliar a atividade enzimática com o substrato em soluções tamponantes variando de pH 2,5 a 10. Foram utilizadas soluções tamponantes de citrato de sódio 100 mM para os pH 2,5; 3,0 e 3,5, acetato de sódio 100 mM para pH 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5, fosfato de sódio 100 mM para pH 6,0; 6,5 e 7, Tris-HCl 100 mM para pH 7,5 e 8,5 e glicina-hidróxido de sódio 100 mM para pH 9,0; 9,5 e 10.

### 3.3.3 Caracterização da termoestabilidade e resistência térmica

A termoestabilidade foi examinada pela análise da atividade hidrolítica após uma hora de pré-incubação da enzima purificada, na ausência de substrato, em temperaturas variando de 0°C a 60°C. A resistência térmica da enzima foi realizada pelo monitoramento da atividade residual após cada 12 horas de pré-incubação, na última temperatura com 100% de atividade relativa na análise de termoestabilidade. A atividade foi aferida com 2% de xilana *birchwood*, nas condições ótimas de pH e temperatura estabelecidas.

### 3.3.4 Efeito de íons na atividade enzimática e resistência à ação de protease

Para avaliar o efeito de diferentes íons metálicos como cofatores, a atividade enzimática da proteína recombinante purificada foi determinada na presença de 1 mM dos sais cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de cobre II ( $\text{CuCl}_2$ ), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Para avaliar susceptibilidade à ação de proteases, a atividade enzimática da proteína recombinante purificada foi determinada na presença de diferentes concentrações de Proteinase-K (Sigma) por 15 min. As concentrações de Proteinase-K utilizadas foram 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2 mg/mL. Para ambos os casos a atividade foi

aferida com 2% de xilana *birchwood*, nas condições ótimas de pH e temperatura estabelecidas.

### 3.3.5 Estabelecimento das constantes cinéticas enzimáticas

As constantes cinéticas de afinidade da enzima pelo substrato ( $K_m$ ) e a taxa de renovação enzimática ( $k_{cat}$ ), foram derivadas de uma curva não-linear de Michaelis-Menten. A atividade hidrolítica da enzima foi mensurada variando-se a concentração dos substratos de 0,24% a 2,8%, nas condições ótimas de pH e temperatura estabelecidas. As concentrações de substrato utilizadas foram 0,24; 0,48; 0,72; 1,20; 1,68; 2,16; 2,40 e 2,80%, para os substratos xilana *birchwood* e xilana *beechwood*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização e análise de sequência do clone ThXyn3.

O cDNA do clone ThXyn3 continha uma ORF de 1.044 pb, a qual codifica uma proteína predita de 347 aminoácidos, apresentados na figura 5. Duas isoformas do mRNA codificante da *xyn3* de *T. harzianum* IOC-3844 foram observados, sugerindo a ocorrência de um processamento de éxons diferenciado, o que geraria uma proteína truncada, assim como elucida a figura 6.

```
1      CAATGCTTTTTTATA ATGCCAACTTTGTAC AAAAAAGTTGGATCA TAGCGCAAGACGGCT TGTGGAGTGTTCATTG
76     TTGTACGAAAATTTG AACAGAAACCAGAAC CAGTAAACATCAGCA AATATGAAAGCAAAT ATAATATTTTGCCTT
                                           M K A N I I F C L
151    CTGGCGCCTCTGGTA GCCGCTCTCCCGGCC GAATTCATTTCGATTG GAGCCTGAACTTGCC GCACGCCGCGTTAAAT
L A P L V A A L P A E F I R L E P E L A A R R V N
226    ATTACTGAGAGAATG GCTGATTTAGAGGAT CGACAAGCCTCCGTG AGCATTGATCAGCTC TTCAAAGGAAAGGC
I T E R M A D L E D R Q A S V S I D Q L F K R K G
301    AAAGTTTATTTTGGGA ACTGCAACTGACCGT GGCTTACTCCAACGA GAACGAAATGCAGCC ATTATCCAGGCTAAT
K V Y F G T A T D R G L L Q R E R N A A I I Q A N
376    CTTGGACAAGTGACG CCAGAGAATAGCATG AAATGGCAGTCACTT GAGCCTAACCAAGGC CAGTATAATTGGGGA
L G Q V T P E N S M K W Q S L E P N Q G Q Y N W G
451    GATGCAGATTACCTT GTTAACTTCGCCAA CAAAACGGCAAGACG ATACGTGGACATACT CTGATTTGGCACTCA
D A D Y L V N F A Q Q N G K T I R G H T L I W H S
526    CAACTACCTAATTGG GTCATAACATCAAT AATGCAGATACTTTG CGCCAGGCTATCCGT ACTCATGTTCTCACT
Q L P N W V N N I N N A D T L R Q A I R T H V L T
601    GTTGTGGAGATAT AAAGGAAAGATTCGC GCTTGGGATGTAGTA AACGAGATCCTCAAC GAGGATGGAACACTA
V V G R Y K G K I R A W D V V N E I F N E D G T L
676    CGCTCTTCTGTGTTT TCTAGACTGCTAGGC GAAGAGTTTGTCTCG ATTGCTTTCCGTGCT GCTCGAGAAGCTGAT
R S S V F S R L L G E E F V S I A F R A A R E A D
751    CCGTCTGCTCGTCTC TACATCAACGATTAC AATCTCGATGTTGCC GGGTCTAGTAAAGTC AACTTGATGAGATAC
P S A R L Y I N D Y N L D V A G S S K V N L M R Y
826    TATGTGGATAAATGG ATCTCTCAAGGAGTT CCCATTGACGGCATC GGAACTCAAACCCAC ATCGGTGCTGGAGGA
Y V D K W I S Q G V P I D G I G T Q T H I G A G G
901    GGTGCCTCTGTACAA GGTGCACTTCAGCAG CTAGCTACAGCACCA GTCACTGAATTGGCC ATTACTGAACTTGAC
G A S V Q G A L Q Q L A T A P V T E L A I T E L D
976    ATCGTGGGCGCACCG TCGAACGATTACAGC GCAGTTGTTTCGAGGA TGTTTGAACGTTCTT AAGTGCTTGGGGATC
I V G A P S N D Y S A V V R G C L N V P K C L G I
1051   ACTGTGTGGGGTATT AGCGACAAAGACTCG TGGCGTTCAGGCTCC AGTCCCCTTCTATTC GACAGCAACTTCAAT
T V W G I S D K D S W R S G S S P L L F D S N F N
1126   CCTAAAGCAGCTTAC AACAGTATTGTAAGC ATTTTACAATAAACT CTC
P K A A Y N S I V S I L Q *
```

**Figura 5. Sequências de DNA e proteíca da Xyn3 de *T. harzianum*. Sequência apresentando em itálico, peptídeo sinal putativo; sublinhado, sítio de N-glicosilação predito; realçado, ácidos glutâmicos do sítio catalítico.**

```

Gen      GGTATTAGCGACAAAGTAAGTACATGGCACTTTTACCCTGCTAAACAGAGAACCTTATTGACGTATTCATAGGACTCGT
Xyn3*   GGTATTAGCGACAAA-----TCA[TAG]GACTCGT
Xyn3    GGTATTAGCGACAAA-----GACTCGT

```

**Figura 6. Isoformas do mRNA da *Xyn3* de *T. harzianum*.** Gen, sequência genômica; Xyn3\*, mRNA com 1.050 pb; Xyn3, mRNA com 1.044 pb. Caixa, códon de terminação.

A ORF da *xyn3* apresentou 83% de identidade com a enzima correspondente em *T. reesei*, 64% com *Penicillium citrinum* e 62% com *Aspergillus terreus* e *Thermoascus aurantiacus* (figura 7). Segundo Kulkarni *et al.* (1999) as seqüências das endoxilanasas de uma mesma família (GH10 ou 11) são geralmente bastante similares, porém, apresentam características variadas.

O software SignalP identificou um provável peptídeo sinal de 16 aminoácidos, provavelmente com clivagem na seqüência VAA\*LP (Figura 5). Encontrou-se um sítio de N-glicosilação com 75% de probabilidade de ocorrência (figura 5). Este mesmo sítio de N-glicosilação pode ser encontrado na seqüência da xilanase de *T. reesei* e em outras xilanases da família 10 de *Trichoderma sp.*, no entanto o mesmo sítio não foi encontrado em nenhuma outra seqüência depositada advinda de fungos filamentosos (Figura 7). Em nenhum trabalho com enzimas xilanases da família GH10 de fungos filamentosos, a glicosilação foi observada e uma justificativa é o fato do peptídeo sinal da proteína *xyn3* possuir clivagem natural na seqüência EDR\*QAS, retirando a região com o sítio de N-glicosilação (Xu *et al.*, 1998).

Na realização da modelagem da estrutura terciária da proteína, a plataforma Swiss-Model baseou-se na endoxilanasase de *Thermoascus aurantiacus*, apresentando a conformação de *barril TIM*, conforme era esperado (Figura 8). Calculando-se o potencial eletroestático da proteína, observou-se uma região positivamente carregada aposta ao sítio catalítico e uma negativamente carregada próxima ao sítio catalítico (Figura 9). Nas xilanases da família GH10, o sítio catalítico é formado pela interação de dois ácidos glutâmicos em folhas  $\beta$  diferentes, realizando um modo de ação por ataque nucleofílico em que estes dois resíduos se alternam como nucleófilo e sítio ativo (Dodd *et al.*, 2009). Estas diferenças de polaridade reforçam a hipótese de que a ligação da enzima ao substrato ocorre externamente na base da estrutura de barril TIM, sabendo-se que resíduos laterais possuem cargas negativas, enquanto a cadeia de xilose é neutra, sendo assim, a enzima envolvida pelas fibras de xilana (Paananen *et al.*, 2003).

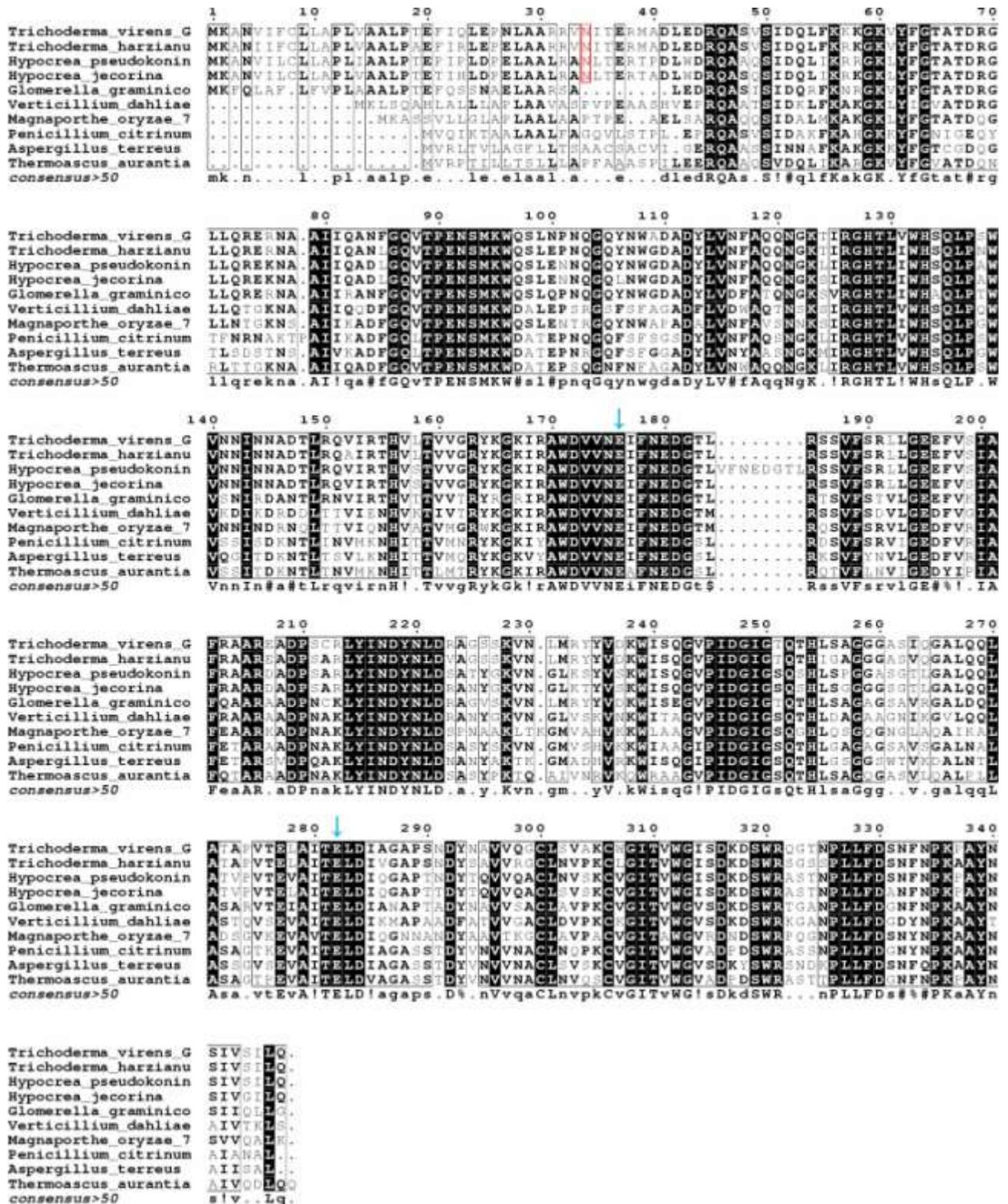
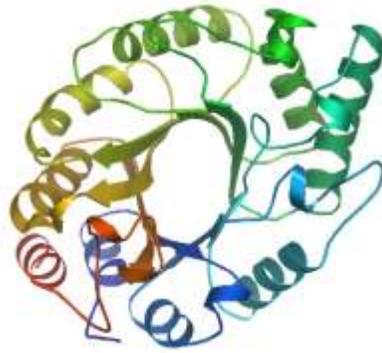
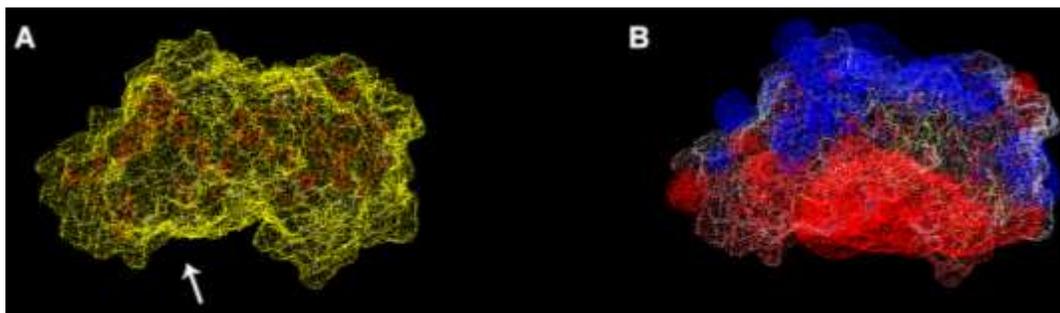


Figura 7. Comparação entre seqüências de xilanases da família 10 de *T. harzianum* com alguns fungos filamentosos já estudados. Caixas preenchidas indicam identidade acima de 90% entre as seqüências, caixas vazias indicam identidade entre 50% e 90%. Setas indicam ácidos glutâmicos do sítio catalítico e caixa em vermelho sítio de N-glicosilação predito. As seqüências utilizadas são apresentadas no anexo III.



**Figura 8. Vista superior da estrutura terciária predita da enzima *ThXyn3*, baseada em homologia.** As hélices representam estrutura secundária de hélices- $\alpha$ , e as setas estrutura de folhas- $\beta$ .



**Figura 9. Vista lateral da superfície da estrutura terciária da enzima *Xyn3*.** (A) Representação da superfície em meio aquoso; (B) Representação do potencial elétrico, cuja região azul representa campo positivo e região vermelha, campo negativo. Seta representa posição do sítio catalítico.

#### **4.2 Expressão, purificação e caracterização da endoxilanase recombinante.**

Neste estudo foi empregado o sistema recombinante de *Pichia pastoris* para a expressão da enzima endoxilanase de *T. harzianum*. O uso da levedura foi escolhido devido à simplicidade de manipulação genética e a uma maquinaria enzimática próxima a do fungo filamentoso. Deste modo, a enzima recombinante poderia apresentar características bastante similares à nativa, com modificações pós-traducionais próximas, como por exemplo, a ocorrência da glicosilação. Outra vantagem na utilização de *P. pastoris*, já visando a produção em larga escala, é a secreção da proteína recombinante em quantidade bastante superior às suas proteínas nativas

(Cereghino *et al.*, 2000), o que tornaria o passo de purificação desnecessário na aplicação da enzima recombinante na despolimerização da biomassa vegetal.

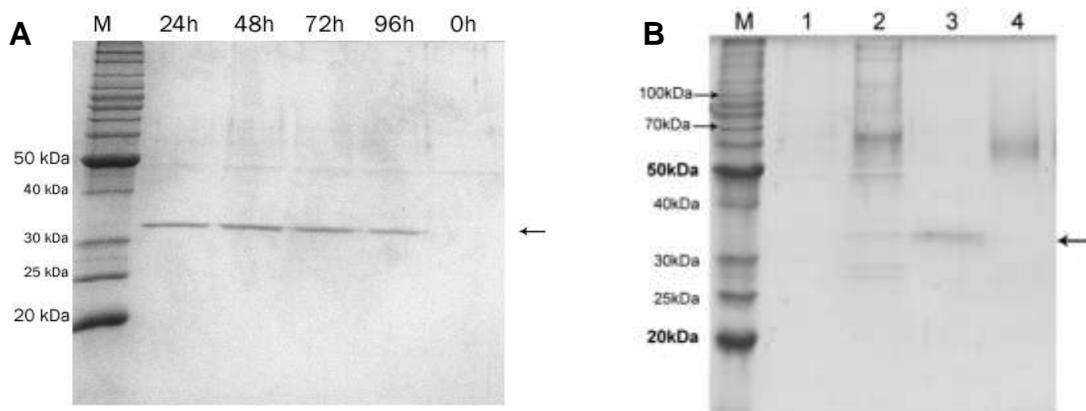
O vetor constitutivo pGAPZ foi escolhido por ser a forma mais simples e mais barata de produção de enzima recombinante em *P. pastoris*, já visando a aplicação da produção em escala de bancada. Para a indução neste vetor, não se faz necessária a utilização de meios de cultura especiais e nem a adição de uma fonte indutora, sendo preciso apenas um meio de cultura simples, com fontes de nitrogênio e um açúcar metabolizável, como o glicerol ou dextrose (Goodrick *et al.*, 2001).

Após a transformação do plasmídeo recombinante em *P. pastoris*, vários recombinantes foram analisados quanto à produção da enzima xilanase, em menor escala. Destes, o clone que apresentou a melhor expressão foi empregado para a produção e purificação da enzima recombinante, chamada de rThXyn3. O clone escolhido, ao ser induzido em meio YEPD não tamponado (pH ~ 5), apresentava a expressão predominante de uma proteína recombinante com aproximadamente 35 kDa (Figura 10A). Entretanto nos ensaios de purificação a proteína recombinante não aderiu à resina de níquel, mesmo dialisando-se o sobrenadante contra tampão de equilíbrio. Quando induzido com meio YEPD tamponado com 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, observou-se a produção predominante de duas isoformas da proteínas, a mesma de 35 kDa e outra de aproximadamente 60kDa (Figura 10B).

O rendimento total de enzima recombinante purificada foi 15 mg por litro de meio de cultura YEPD tamponado a pH 6,0. Desta enzima recombinante purificada, foi possível recuperar uma porção apenas com a enzima glicosilada e outra porção com a não-glicosilada (figura 10). Esta separação foi possível apenas utilizando-se resina de níquel em agarose, cujas formas foram eluídas em concentrações diferentes de imidazol. Ao se utilizar resina de níquel em sílica, houve uma mistura das formas da rThXyn3 nas concentrações de imidazol.

Este rendimento de produção pode ser aumentado empregando-se outras formas de cultivo, como a batelada alimentada. A batelada alimentada é a forma de cultivo mais indicada para este plasmídeo, podendo chegar a um rendimento 10 vezes maior que o cultivo em batelada (Goodrick *et al.*, 2001). Visando aumentar ainda mais a produtividade, outra possibilidade é a utilização de fermentadores industriais, dado que o cultivo de leveduras em grande escala é bastante estudado. Este aumento de escala,

aliado ao cultivo em batelada alimentada e a não necessidade de purificação pode tornar a produção mais barata e cada vez mais competitiva para a utilização no etanol de biomassa.

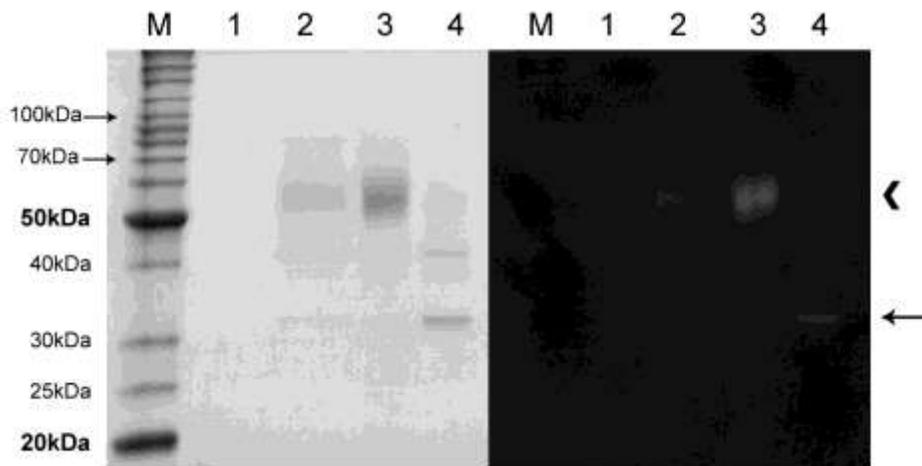


**Figura 10. Análise SDS-PAGE da indução do clone recombinante escolhido em YEPD não tamponado (A) e YEPD tamponado com purificação da proteína recombinante (B).** Figura A: SDS-PAGE mostrando em M, Padrão de massa molecular BenchMark (Invitrogen); e sobrenadante de *P. pastoris* recombinante dos tempos de cultivo. Figura B: SDS-PAGE mostrando em M, Padrão de massa molecular BenchMark; 1, Sobrenadante de *P. pastoris* KM71H; 2, Sobrenadante de *P. pastoris* recombinante após 48h de cultivo; 3, Fração não glicosilada da rThXyn3 purificada; 4, Fração glicosilada da rThXyn3 purificada. Seta indica a proteína com a massa molecular teórica.

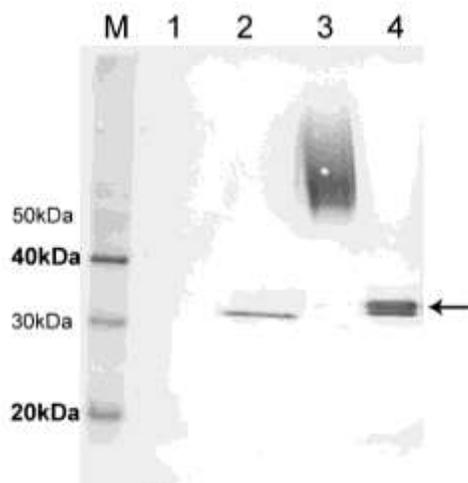
A enzima recombinante foi secretada em sua forma ativa pela levedura. Ambas as formas predominante da rThXyn3, assim como as formas com tamanho intermediário, apresentaram atividade xilanolítica, assim como demonstra a figura 11.

A partir da rThXyn3 de 35kDa, foram produzidos anticorpos utilizado contra o extrato bruto do fungo filamentoso induzido, encontrando apenas uma proteína, com tamanho próximo à proteína recombinante com 35 kDa, como demonstra a figura 12. Silveira *et al.* (1999), relatou a presença de algumas xilanases no extrato bruto de *T. harzianum* induzido com palha de arroz. Destas xilanases, foi isolada uma enzima com massa molecular de aproximadamente 35 kDa, porém esta proteína não foi estudada. Wong *et al.* (1986) isolou do sobrenadante de *T. harzianum* uma terceira xilanase, entretanto a massa molecular seria um pouco menor que a encontrada (29 kDa) e características bioquímicas diferentes. Há na literatura, vários trabalhos

estudando o complexo xilanolítico de *T. harzianum*, porém nenhum trabalho com uma xilanase da família GH10 foi encontrado.

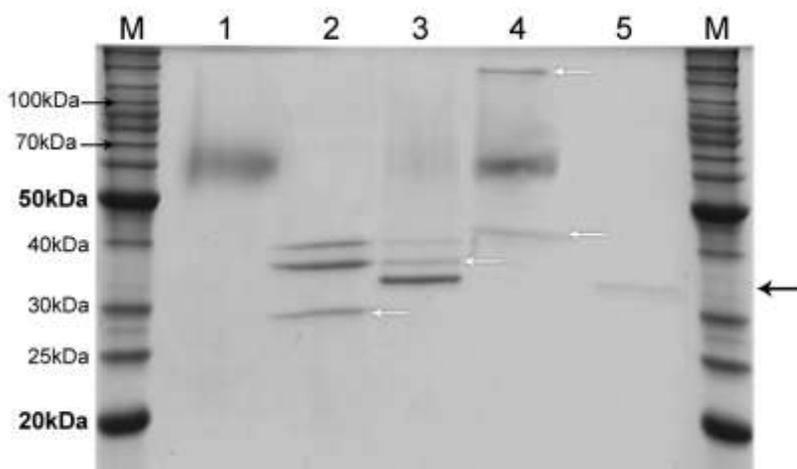


**Figura 11. Análise zimograma de atividade xilanolítica da rThXyn3.** SDS-PAGE espelho (esquerda) e zimograma (direita) mostrando em M, Padrão de massa molecular BenchMark (Invitrogen); 1, Sobrenadante de *P. pastoris* KM71H; 2, Sobrenadante de *P. pastoris* recombinante após 48h de cultivo; 3, Fração glicosilada da enzima rThXyn3 purificada; 4, Fração não glicosilada da enzima rThXyn3 purificada. Seta indica a proteína com a massa molecular teórica e cabeça de seta a proteína glicosilada.



**Figura 12. Análise por Western Blot de Xyn3 em sobrenadante de *T. harzianum* IOC-3844 induzido com celulose e xilana.** M, Padrão de massa molecular MagicMark XP Western (Invitrogen); 1, Sobrenadante de *T. harzianum* IOC-3844 não induzido; 2, Sobrenadante do fungo induzido com xilano e Avicel; 3, Fração da enzima rThXyn3 de 60kDa purificada; 4, Fração da enzima rThXyn3 de 35kDa purificada; Seta indica a proteína com a massa molecular teórica.

Para se averiguar se a diferença no tamanho das duas formas era realmente resultado de glicosilação, a enzima com massa molecular de 60 kDa foi submetida a tratamentos com N- e O-glicosidases. Foi observada a deglicosilação apenas nos tratamentos com as enzimas Endoglicosidase-H e PNGaseF, conforme observa-se na figura 13. Estas duas enzimas glicosidases clivam oligossacarídeos ligados ao aminoácido asparagina, diferenciando-se apenas no local e modo de ação. A PNGaseF quebra a ligação entre o aminoácido e a primeira N-acetilglicosamina, retirando o oligossacarídeo intacto, enquanto a Endoglicosidase-H quebra a ligação entre duas N-acetilglicosaminas apenas de oligossacarídeos não-complexos (Alberts *et al.*, 2008). Desta forma, pode-se comprovar que a rThXyn3 possui N-glicosilação com oligossacarídeos não-complexos, caso contrário, a Endoglicosidase-H seria incapaz de agir. Van De Vyver *et al.* (2004) relata que, geralmente, as N-glicosilações podem conferir maior resistência à degradação proteolíticas ou maior resistência a altas temperaturas em xilanases.



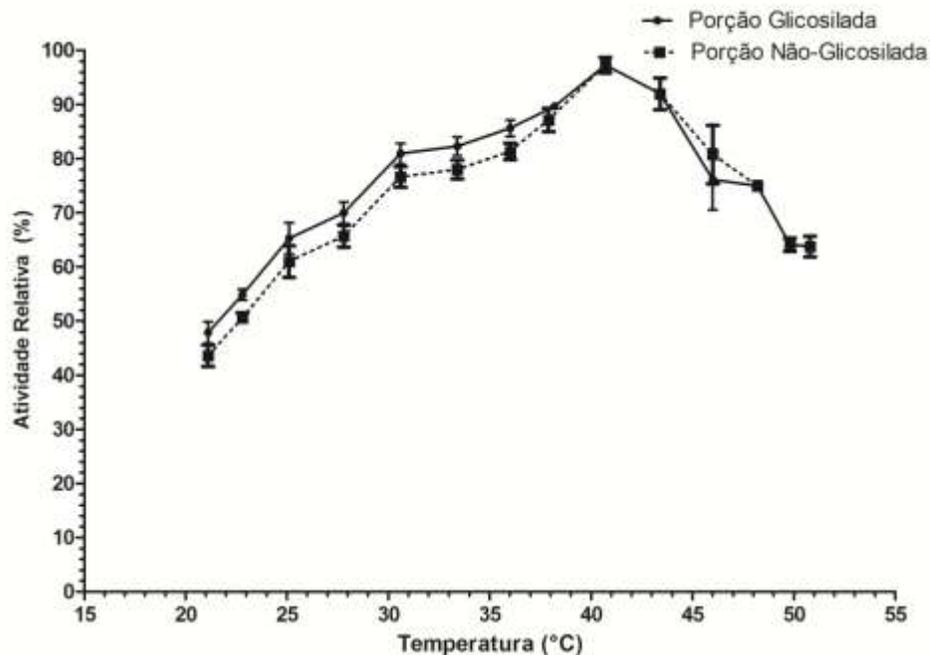
**Figura 13. Análise em SDS-PAGE da fração glicosilada da enzima rThXyn3 tratada com glicosidases.** M, Padrão de massa molecular BenchMark (Invitrogen); 1, Fração glicosilada da enzima rThXyn3 purificada; 2, Fração glicosilada da enzima rThXyn3 tratada com enzima Endoglicosidase-H; 3, Fração glicosilada da enzima rThXyn3 tratada com enzima PNGase F; 4, Fração glicosilada da enzima rThXyn3 tratada com enzimas Neuraminidase e Endo-N-acetil-galactominidase; 5, Fração não glicosilada da enzima rThXyn3 purificada. Seta preta indica a proteína com a massa molecular teórica e seta não preta indica as enzimas glicosidases empregadas.

As duas formas da rThXyn3 foram submetidas a seqüenciamento do N-terminal, realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (Departamento de Ciência Fisiológicas, UFSCar). O seqüenciamento da rThXyn3 de 60 kDa determinou que a proteína iniciava-se pela seqüência Ala-Glu-Phe-Ile-Arg-Leu, localizada antes do sítio de glicosilação contido na seqüência protéica (Figura 5). Entretanto, não foi possível realizar o seqüenciamento do N-terminal da rThXyn3 de 35 kDa até o momento, isto por que a proteína sempre apresenta uma pequena degradação, que deve ocorrer no N-terminal, assim como se observa nas figuras 10B e 12. Diante destes resultados, pode-se supor que a diferença de tamanho está relacionada ao sítio de clivagem do peptídeo sinal e à incorporação, ou não, do sítio de N-glicosilação à seqüência protéica madura. Isto por ser idealizado, porque a rThXyn3 de 35 kDa apresentou tamanho muito semelhante à nativa e a levedura *Pichia pastoris* possui alta eficiência na incorporação de N-glicosilação (Cregg *et al.*, 1993; Cereghino *et al.*, 2000), desta forma, pode-se admitir que na forma de 35 kDa há a clivagem do peptídeo sinal após o sítio de glicosilação, muito provavelmente na seqüência WDR\*QASVSI, como discutido anteriormente.

#### **4.3 Caracterização bioquímica e enzimática da xilanase recombinante.**

Após ser observada atividade catalítica das duas porções de enzima (glicosilada e não-glicosilada), partiu-se para a caracterização bioquímica das duas formas. Para as análises de atividade utilizou-se o método de DNS, com substratos comerciais da enzima. Realizando-se curvas com diferentes tempos e diluições, pode estabelecer que a velocidade inicial era alcançada ao utilizar as concentrações finais de 0,3  $\mu$ M (17,5  $\mu$ g/mL) para a enzima glicosilada, e 0,5  $\mu$ M (17,5  $\mu$ g/mL) para a não-glicosilada, em uma reação de 15 minutos.

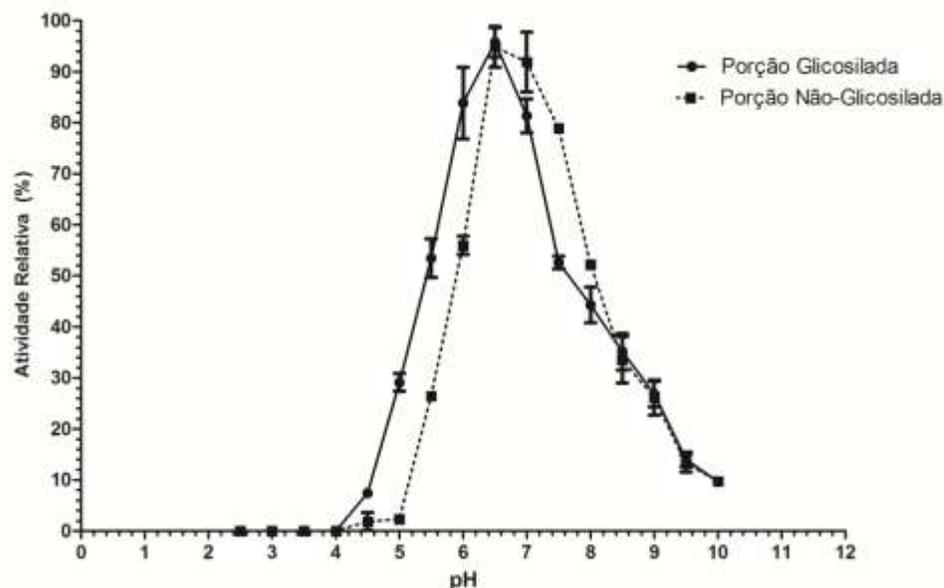
A temperatura ótima da rThXyn3 foi estimada variando-se a temperatura de análise. Para ambas as porções enzimáticas o maior consumo de xilana foi observado a 40,7°C, como demonstra a figura 14. Nota-se que praticamente não houve diferença entre as duas porções da rThXyn3, mostrando assim, que a glicosilação, neste caso, não influenciava na temperatura ótima da enzima recombinante.



**Figura 14. Efeito da temperatura na atividade enzimática da rThXyn3.** Ensaio de atividade foram realizados sob condições padronizadas, a pH 6,5 e temperaturas variando de 20 a 55°C.

Na literatura, uma grande variação de temperatura ótima das xilanases de fungos é encontrada, desde temperaturas moderadas (40-45°C) de *Cephalosporium* sp. e *T. reesei*, até altas temperaturas (>70°C) de *Humicola grisea* e *Termonascus aurantiacus* (Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005). Wong *et al.* (1986) encontrou uma temperatura ótima de 45-50°C para a xilanase de 29 kDa de *T. harzianum*. Contudo, visando uma aplicação na técnica de produção de etanol por fermentação e sacarificação simultânea, enzimas com temperatura ótima próxima a 30°C seriam mais apropriadas (Vasquez *et al.*, 2007).

O pH ótimo da rThXyn3 foi estimada variando-se tampões com diferentes pH. Para ambas as porções enzimáticas o maior consumo de xilana foi observado em pH 6,5, com tampão fosfato de sódio 100 mM, como demonstra a figura 15. Uma pequena diferença entre a atividade das duas porções da rThXyn3 foi observada. Esta diferença pode ser influenciada pela glicosilação da enzima. Todavia, esta alteração na atividade enzimática não limita a aplicação industrial da rThXyn3 não purificada, dado que as duas porções apresentaram similares influencias do pH na atividade.

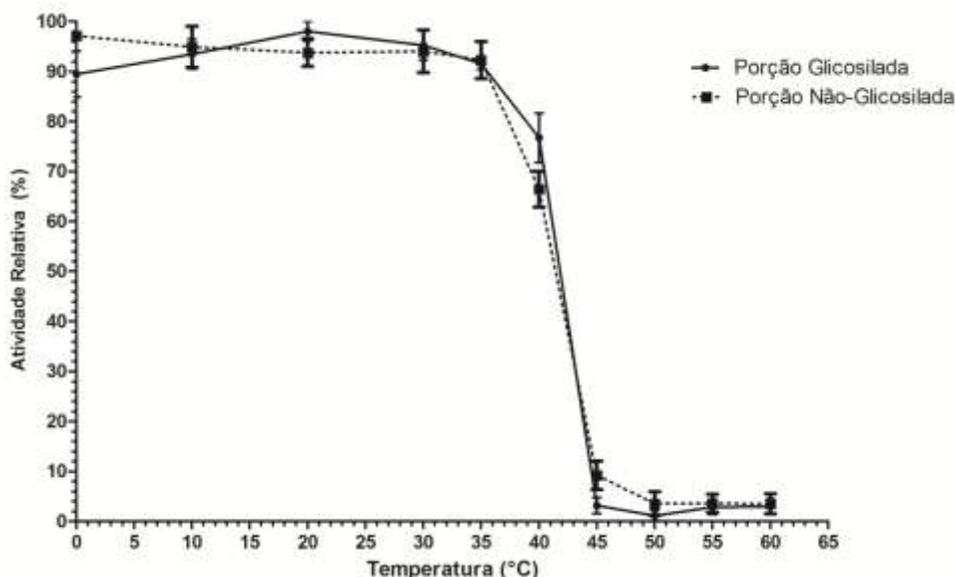


**Figura 15. Efeito do pH na atividade enzimática da ThXyn3 recombinante.** Ensaios de atividade realizados sob condições padronizadas, a temperatura de 40,7°, variando pH de 2,5 a 10,0.

As endoxilanasas de microrganismos possuem uma faixa de pH ótimo variando de 4 a 8, tendo as principais enzimas comercializadas atuantes em uma faixa de pH inferior a 5,5 (Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005). A aplicação de xilanases como aditivos na alimentação bovina se limita a enzimas capazes de atuar em pH ligeiramente ácidos (pH 5,5 – 7,0) (Huls *et al.*, 2009). Wong *et al.* (1986) encontrou um ótimo de atividade da xilanase de 29 kDa de *T. harzianum* em pH variando de 4,5 a 5,0. Na sacarificação de biomassa, o pH será dependente do tipo de pré-tratamento utilizado, sendo o pH próximo à neutralidade na explosão a vapor, e alcalino nos tratamentos conduzidos por oxidação ou hidróxido de sódio (Zheng *et al.*, 2009). Para biopolpação, busca-se por xilanases que suportem pH acima de 8,0, devido ao processamento conduzido com grande concentração de hidróxido de sódio (Beg *et al.*, 2001; Valls *et al.*, 2009). Desta forma a rThXyn3 se mostraria eficiente para aplicação tanto como aditivo de nutrição animal quanto em etanol de segunda geração e na indústria de papel e celulose, dado que a enzima ainda apresenta alguma atividade acima de pH 8,0.

Em ensaios de estabilidade térmica a enzima se mostrou estável até temperatura de 35°C, como mostra a figura 16. As endoxilanasas de fungos

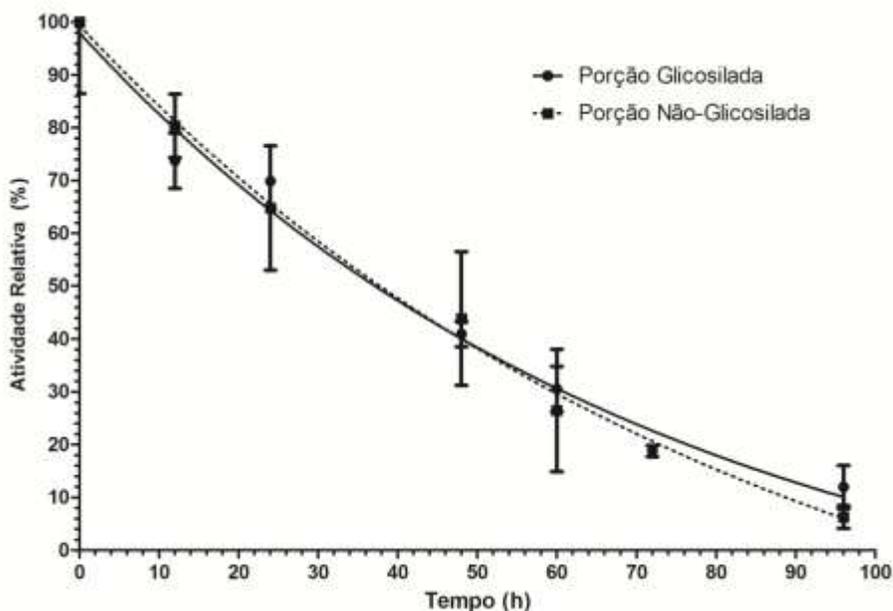
filamentosos tendem a uma termoestabilidade em temperaturas moderadas, como é o caso de *Aspergillus sojae* (35°C), *Trichoderma longibrachiatum* (45°C) e a *xyn2* de *T. harzianum* (40°C) (Silveira *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001; Subramaniyan *et al.*, 2002; Polizeli *et al.*, 2005). A estabilidade térmica das xilanases bacterianas tendem a temperaturas um pouco mais elevadas, como de *Bacillus* sp. (50°C) e *Streptomyces* sp. (55°C) (Morales *et al.*, 1993; Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005). Wong *et al.* (1986) relata uma baixa termoestabilidade para a xilanase de 29 kDa de *T. harzianum*, não condizente com o encontrado neste trabalho. Este valor de estabilidade térmica não se adequa perfeitamente às misturas enzimáticas voltadas para a sacarificação e fermentação separadas, dado que a hidrólise enzimática, neste caso, ocorre a temperaturas de 50-60°C. Entretanto, Bhardwaj *et al.* (2010), apresenta alguns aminoácidos responsáveis pela estabilidade das xilanases da família GH10, podendo assim, a rThXyn3, passar a ser objeto de estudos de evolução dirigida no futuro.



**Figura 16. Termoestabilidade da ThXyn3 recombinante com uma hora de pré-incubação.** Temperaturas de incubação da enzima purificada variando de 0 a 60°C. Ensaio de atividade foram realizados sob condições padronizadas, a pH 6,5 e temperatura de 40,7°C.

Com base no decaimento da termoestabilidade, avaliou-se a resistência térmica da enzima a 30°C em diferentes intervalos de tempo (figura 17). A rThXyn3 apresentou um tempo de meia vida de 59 horas, para a porção glicosilada, e 50 horas,

para a porção não glicosilada. Portanto, demonstra-se que a glicosilação não influenciou na resistência térmica da enzima. O resultado não descarta a possível incorporação desta enzima no processo de biodegradação de biomassa, dado que alguns procedimentos podem aumentar a resistência térmica das enzimas xilanases, como a imobilização de proteínas (Chen *et al.*, 2008).

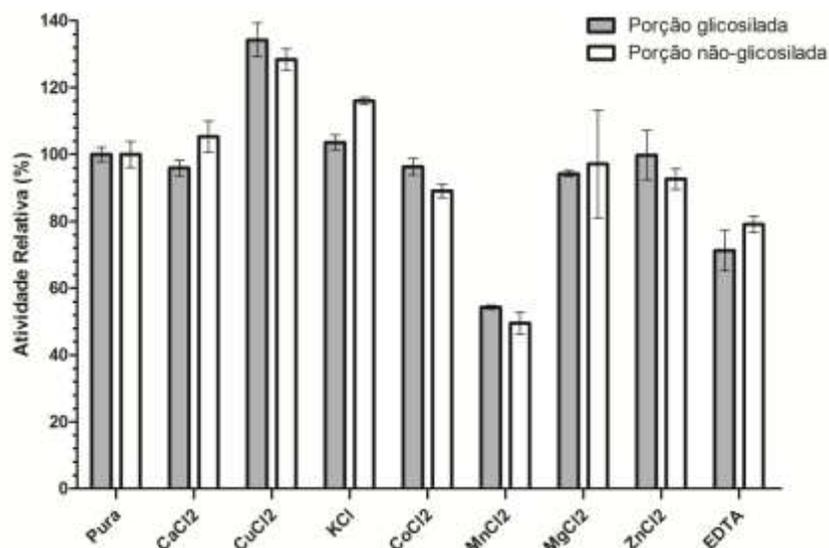


**Figura 17. Resistência térmica a 30°C da ThXyn3 recombinante.** Atividade enzimática residual até 100 horas pré-incubação da proteína pura. Ensaio de atividade foram realizados sob condições padronizadas, a pH 6,5 e temperatura de 40,7°C.

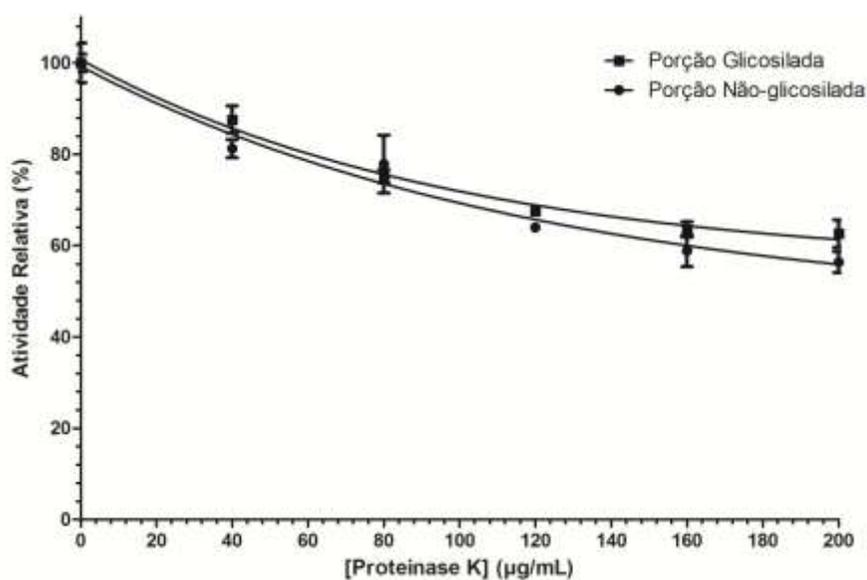
Analisando-se o efeito de diferentes íons na atividade da enzima, observou-se um aumento de atividade na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ , e uma redução quando se utiliza  $\text{Mn}^{2+}$  ou quando os íons estão quelados com EDTA, assim como demonstra a figura 18. Enzimas endoxilanases da família GH10 não apresentam especificidade a um determinado íon metálico na atividade catalítica, entretanto há um menor atividade na ausência de íons, observado em testes com EDTA. Esta inibição por íons  $\text{Mn}^{2+}$  foi relatada por Xu *et al.* (1998), cuja atividade da enzima *xyn3* de *Trichoderma reesei* apresentou 90% de inibição na presença de 5 mM de  $\text{Mn}^{2+}$ .

Analisando-se a resistência à proteólise da enzima rThXyn3, notou-se que a glicosilação não apresentou resistência significativa à ação de Proteinase K, como

demonstra a figura 19. Estudos corroboram que a N-glicosilação em proteínas podem apresentar papel importante na resistência à degradação proteolítica (Van De Vyver *et al.*, 2004). Entretanto, para rThXyn3 foi observado, por regressão não-linear, um platô da curva de atividade relativa de 55,2%, para a porção glicosilada, e 44,8%, para não-glicosilada.

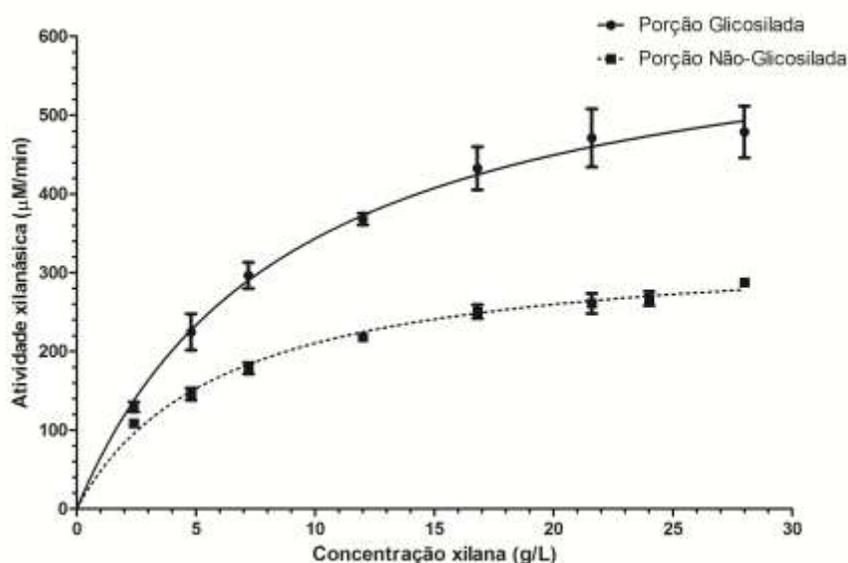


**Figura 18. Efeitos de íons metálicos e EDTA na atividade da rThXyn3.** Ensaio de atividade foram realizados sob condições padronizadas, a pH 6,5 e temperatura de 40,7°C, com a adição de 1 mM do sal.

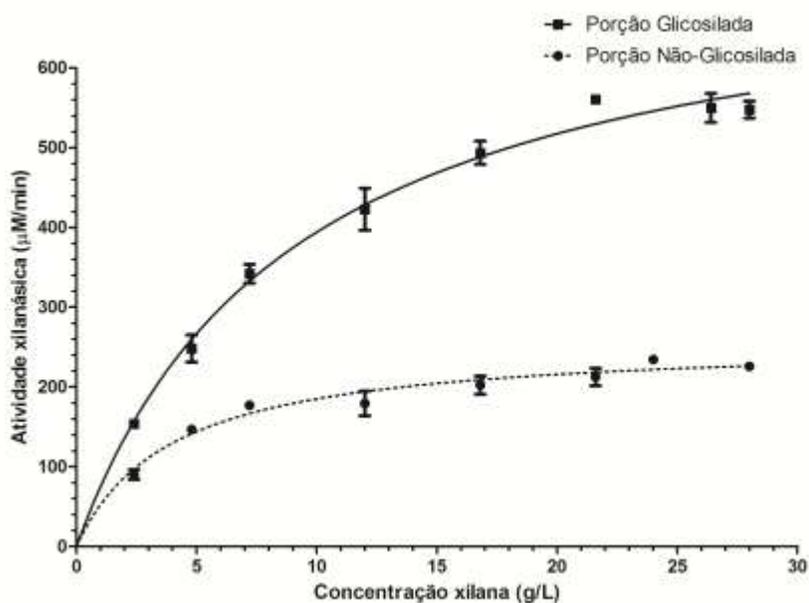


**Figura 19. Curva de degradação por ação de Proteinase K.** Ensaio de atividade foram realizados sob condições padronizadas, a pH 6,5 e temperatura de 40,7°C, com a adição de proteinase K à reação.

Para a caracterização cinética da rThXyn3, a concentração dos substratos xilana *birchwood* e *beechwood* foram variados até 2,8% (Figuras 20 e 21). A curva de Michaelis-Menten revelou valores de  $K_m$  e  $k_{cat}$  bastante contrastantes entre a enzima recombinante glicosilada e não-glicosilada. Os dados são apresentados na tabela 1.



**Figura 20. Curva de Michaelis-Menten da ThXyn3 recombinante com substrato xilana birchwood.** Ensaio de atividade foram realizados sob condições padronizadas, a pH 6,5 e temperatura de 40,7°C, com o substrato variando de 3 a 27 g/L.



**Figura 21. Curva de Michaelis-Menten da ThXyn3 recombinante com substrato xilana beechwood.** Ensaio de atividade foram realizados sob condições padronizadas, a pH 6,5 e temperatura de 40,7°C, com o substrato variando de 3 a 27 g/L.

**Tabela 1.** Parâmetros cinético-enzimáticos da rThXyn3 para os substratos xilana *birchwood* e *beechwood*.

	Porção Não-Glicosilada			Porção Glicosilada		
	$K_m$ (g/L)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$	$K_m$ (g/L)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$
<i>Birchwood</i>	6,12±0,60	678±20,6	110,8	8,9±1,50	2167±141,7	243,5
<i>Beechwood</i>	3,98±0,51	517±16,8	129,9	9,1±0,90	2510±93,6	275,8

Os valores de  $K_m$  da enzima foram muito semelhantes em cada porção da enzima rThXyn3, com pequena aumento na porção glicosilada, para os dois substratos testados. Isto pode estar relacionado com um bloqueio do sítio catalítico pela glicosilação, o que tornaria a ligação entre a enzima e o substrato menos eficiente. Por outro lado, a taxa de renovação da enzima glicosilada estava, aproximadamente, cinco vezes aumentada. Isto pode estar relacionado com um desbalanço na eletroestática na da enzima (figura 8), fazendo com que o substrato não seja fortemente ligado, desta forma, não permanecendo muito tempo em contato com a enzima após a reação. De forma geral, a glicosilação garantiu um poder catalítico aproximadamente 2,5 vezes maior do que a enzima rThXyn3 não-glicosilada.

Os valores de  $K_m$  encontrados para *xyn3* de *T. harzianum* neste trabalho é condizente aos valores relatados na literatura. Um amplo espectro de valores de  $K_m$  são relatados para endoxilanasas de fungos, desde enzimas muito específicas, como *Aspergillus nidulans* (0,97 g/L), até enzimas com  $K_m$  de 40,91 (*Acrophialophora nainiana*) (Fernández-Espinar *et al.*, 1994; Salles *et al.*, 2000). Quanto a valores de  $K_m$  para bactérias, uma menor variação entre os  $K_m$ , sendo em média 5 g/L (Subramaniyan *et al.*, 2002). Para *xyn3* de *T. reesei*, um valor de  $K_m$  de 2 g/L é encontrado, e para *xyn2* de *T. harzianum*, 1,6 g/L (Xu *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 1999).

Poucos valores de  $k_{cat}$  são encontrados na literatura, entretanto, a maior taxa de renovação observada foi para uma xilanase da família 10 de *Penicillium funiculosum* (aproximadamente 25.000 min<sup>-1</sup>) (Beg *et al.*, 2001; Subramaniyan *et al.*, 2002; Boonyapakron *et al.*, 2005; Polizeli *et al.*, 2005; Lafond *et al.*, 2011). De forma geral, as atividades específicas das outras xilanasas fúngicas são superiores ao valor encontrado (aproximadamente 20 U/mg). Entretanto, está menor atividade não seria problemática na utilização da endoxilanase como enzima acessória na biodegradação de biomassa vegetal, dado que os pré-tratamentos retiram grande parte da xilana não ligada à celulose. Desta forma, a utilização desta enzima seria interessante, pois as

endoxilanases da família 10 são conhecidas por clivarem eficientemente xilooligosacarídeos ligado à celulose (Biely *et al.*, 1997).

Portanto, com base nos resultados obtidos, as características bioquímicas e cinético-enzimáticas alavancam a possível aplicação desta endoxilanase em etanol de segunda geração como enzima acessória. Além disso, a heteróloga da endo- $\beta$ -1,4-xilanase da família GH10 de *T. harzianum* em *P. pastoris* se mostrou vantajosa pela ocorrência da N-glicosilação, que promoveu uma maior atividade, e a possibilidade de produzir a enzima em grandes quantidades, sem a necessidade de purificação. Pode-se concluir também que a glicosilação na rThXyn3 não influencia fortemente nenhum dos parâmetros bioquímicos estudados, exceto apresentando variações significativas na cinética da enzima. Entretanto outras averiguações são necessárias a fim de se mensurar a sinergia desta enzima com outras do complexo lignocelulolítico e também avaliar seu potencial uso em escala industrial para produção de etanol de segunda geração.

## CAPÍTULO 2

---

### **ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *TRICHODERMA HARZIANUM* SUBMETIDO A DIFERENTES FONTES INDUTORAS**

## 5. METODOLOGIA

### 3.1 Cepas, meios de cultura e reagentes empregados

O fungo *Trichoderma harzianum* IOC-3844 foi mantido em meio batata-dextrose Agar (Himedia) e os meios de cultura e condições foram empregadas segundo Mandels *et al.* (1962) (Anexo I).

Para os meios de indução, a xilana *birchwood* e celulose microcristalina 20 µm foram obtidas da empresa Sigma-Aldrich e reagentes químicos gerais das empresas J.T.Baker e Merck. O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por *Steam explosion*, também chamado de bagaço explodido, foi obtido do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocesso, do Departamento de Engenharia química, UFSCar. Para utilização no meio de cultura, o bagaço foi previamente lavado com água destilada fervente, até que o eluato estivesse incolor, e, então, secado em estufa a 80°C por 8h.

Todas as enzimas polimerases utilizadas foram adquiridas pela empresa Fermentas. Os oligonucleotídeos empregados e o Platinum SYBR Green qPCR UDG SuperMix para as reações de qPCR foram adquiridos pela Invitrogen. Todos os reagentes empregados para a extração de RNA foram obtidos pela Invitrogen e todos os reagentes para síntese de cDNA, pela Promega. Para as reações de qPCR foram utilizados os aparelhos Eco Real-Time PCR (Illumina) e Line Gene 9660 Real-Time PCR (Bioer).

### 5.2 Cultivo do *Trichoderma harzianum* sob condições indutoras

O cultivo para a indução do fungo filamentososo baseou-se na metodologia de crescimento em meio líquido descrito por Mandels *et al.* (1957). Inicialmente, obteve-se um pré-inóculo a partir de  $10^6$  esporos em 5 mL de meio Mandels e Reese (MR) (Anexo I) contendo 0,08% de glicerol incubado por 16h a 200 RPM, 28°C. Todo o volume foi, então, colocado em 250 mL do mesmo meio de cultura MR com 0,8% de glicerol e incubado nas mesmas condições por 20h. Depois do crescimento, o micélio

foi centrifugado a 12.000 RPM por 18 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 250 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,0) e centrifugado novamente. Realizou-se mais uma lavagem com tampão fosfato de potássio, sendo o pellet, posteriormente, ressuspendido em 100 mL do mesmo tampão e incubado por 1h a 200 RPM, 28°C. Centrifugou-se o micélio e ressuspendeu-se em 250 mL de meio de cultura MR contendo as fontes indutoras (Anexo I). As fontes de carbono utilizadas foram: 0,8% de glicerol, para o controle não induzido; 1% de celulose microcristalina; 1% de xilana *birchwood*; 1% de Avicel mais xilana *birchwood* (0,62% e 0,38%, respectivamente), para a indução mista; 1% de bagaço de cana-de-açúcar explodido e 1% de bagaço explodido suplementado com 0,5 U de endoxilanase 3 recombinante (rThXyn3, Capítulo 1).

Para as induções realizadas com Avicel, xilana e a mistura dos dois, foram coletadas amostras de 12, 24 e 36h de indução. Para as induções realizadas com bagaço de cana-de-açúcar, coletou-se amostras de 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24 e 36h. O micélio foi coletado por filtração a vácuo utilizando-se papel de filtro nº1 esterilizado, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C, para preservação do mRNA.

### **5.3 Extração de RNA total**

O RNA total foi extraído através do protocolo de extração do Trizol Reagent (Invitrogen) com modificações. Para a extração utilizou-se aproximadamente 90 mg de micélio, o qual foi adicionado em tubos de criogenia de 2 mL contendo 100 mg de esferas de vidro de 0,5 mm de diâmetro. Ao tubo, adicionou-se 1 mL de Trizol Reagent e a amostra foi submetida a dois ciclos de agitação a 6.500 RPM por 15 segundos, com 20 segundos de repouso entre os ciclos, no equipamento Precellys-24 (Bertin Technnology). Após a homogeneização, o material foi incubado por 5 min à temperatura ambiente, sendo então centrifugado por 10 min a 12.000 g, 4°C. O sobrenadante foi recuperado para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 200 µL de clorofórmio. A mistura foi agitada por 15 segundos e incubada a temperatura ambiente por 3 minutos. Realizou-se uma centrifugação a 14000 g por 15 minutos a 4°C e a fase superior foi recuperada em um novo tudo. Adicionou-se o mesmo volume de amostra de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se a

14000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi recuperada e adicionados 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. A amostra foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada, então, a 14.000 g por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e os ácidos nucleicos foram lavados com 1 mL de etanol 75%, vortexando-se e centrifugando-se a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco em estufa a 50°C por 5 min, sendo então ressuspendido em 50 µL de água com dietilpirocarbonato (DEPC).

A análise da integridade dos RNAs foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídio e a quantificação por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 1000 (NanoDrop). As amostras foram guardadas em -80°C.

Após a extração, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I *Amplification Grade*. Para isso, aproximadamente 2,5 µg de RNA total foi misturado a 1x de tampão de DNase I e 1 U de DNase I em um volume final de 30 µL. A reação foi incubada por 30 min a temperatura ambiente, e, após, inativada pela adição de 3 µL de EDTA (25 mM, pH 8.0) e aquecimento a 65°C por 10 min. Após o tratamento, as amostras foram novamente analisadas em gel de agarose, quantificadas por espectrofotometria e guardadas em -80°C.

#### **5.4 Síntese de cDNA**

As sínteses da primeira fita de cDNA foram realizadas a partir das amostras de RNA total tratadas, empregando-se o kit Improm II Reverse Transcription System. As reações são montadas em duas fases, uma primeira fase para hibridização dos *primers*, e uma segunda para a extensão. A primeira reação foi realizada com volume final de 5 µL contendo 500 ng de RNA total, 500 ng de oligo-dT e água livre de DNase e RNase. As reações foram incubadas a 70°C por 5 minutos e então imediatamente colocadas em gelo por 5 minutos.

A segunda reação foi montada em 15 µL, misturando-se 4 µL do tampão 5x Improm II; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 1 µL de dNTPs 10 mM; 0,5 µL de RNasin (40 u/µL), 1 µL da enzima transcriptase reversa em água. Esta solução foi adicionada aos 5 µL iniciais, resultando numa reação contendo 1X do tampão Improm II, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de RNasin e 1U de transcriptase reversa. As amostras

foram então incubadas a 25°C por 5 minutos; 42°C por 1 hora; 70°C por 15 minutos e, posteriormente, guardadas em -80°C.

### 5.5 Padronização da PCR em tempo-real

Os primers usados nos experimentos de PCR em tempo-real foram desenhados com auxílio do programa Primer 3 (Rozen *et al.*, 2000) e avaliados com o programa NetPrimer (Premier Biosoft). As seqüências dos oligonucleotídeos foram desenhadas almejando-se uma temperatura de hibridização de aproximadamente 56°C, uma estabilidade 3' de aproximadamente -8 kcal/mol e um amplicon com 80-100 pb. Os primers são apresentados na tabela 2. Todos os testes de padronização foram realizados com o cDNA advindo da amostra de 36h de *T. harzianum* induzido com celulose e xilana.

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na PCR quantitativa.

Gene	Primer forward (5' → 3')	Primer reverse (5' → 3')
<i>act</i>	rt-act-fw: agaagttgctgcctcgtc	rt-act-rv: ggaaaacagctcggggag
<i>egl3</i>	rt-egl-fw: cactgctcaaataccaac	rt-egl-rv: gggccaatgtctccgtatc
<i>xyn3</i>	rt-xyn3-fw: ttacagcgcagttgttcgag	rt-xyn3-rv: ctgaacgccacgagtcctttg
<i>xyn2</i>	rt-xyn2-fw: gggcaccaagaacaaggtc	rt-xyn2-rv: accaaccgtagatggagagg

O primeiro passo de padronização foi o estabelecimento da melhor temperatura de hibridização dos primers. Para isso, os pares de primers foram testados por PCR convencional, utilizando-se um gradiente de temperatura de pareamento. A reação de amplificação foi estabelecida com 2 µL de cDNA, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer, 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase, 1x tampão da enzima, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e água para um volume final de 10 µL. O programa utilizado compôs-se de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridizações à 54, 56, 58 e 60°C por 30 segundos e alongação de 72°C por 45 segundos. As amostras foram analisadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, escolhendo-se a temperatura de pareamento em que houve maior especificidade de amplificação.

O passo seguinte foi o estabelecimento da melhor concentração de primers. Para isso, os pares de primers foram testados por PCR convencional,

utilizando-se diferentes concentrações. A reação de amplificação foi estabelecida com 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase, 1x tampão da enzima, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5  $\mu\text{M}$  de cada primer e água para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . O programa utilizado compôs-se de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, melhor temperatura de hibridizações por 30 segundos e alongação de 72°C por 45 segundos. As amostras foram analisadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, escolhendo-se a mínima concentração em que houve especificidade de amplificação e menor resto de reação.

O próximo passo de padronização foi a avaliação da eficiência de amplificação. Para isso, utilizou-se 1  $\mu\text{L}$  de cDNA nas diluições 1x, 0,5x, 0,25x e 0,125x, numa reação de amplificação contendo a concentração ótima de oligonucleotídeos, 1x de SYBR Green SuperMix e água para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . Para as reações utilizou-se um programa iniciado por 50°C por 2 min e 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, melhor temperatura de hibridizações por 30 segundos e alongação de 72°C por 45 segundos. As análises foram realizadas no software Eco Real-time System 3.0, levando-se em consideração uma eficiência maior que 95%, slope variando de -3,6 a -3,0 e  $R^2$  superior a 95%.

Para se estabelecer a melhor diluição de cDNA para as reações de amplificação, escolheu-se a partir das curvas geradas a diluição em que todos os ciclos quantitativos ( $C_q$ ) estabeleciam-se entre 15 e 35 ciclos.

### **3.6 PCR quantitativa**

Todas as reações foram realizadas nas condições ótimas estabelecidas. Desta forma, utilizou-se uma reação contendo 1  $\mu\text{L}$  de cDNA diluído 0,5x, 1x de SYBR Green SuperMix, a concentração ótima dos pares de primers (0,4  $\mu\text{M}$  para os genes *act*, *xyn3* e *xyn2*, e 0,5  $\mu\text{M}$  para *egl3*) e água para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . Para as reações utilizou-se um programa iniciado por 50°C por 2 min e 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e alongação de 72°C por 45 segundos. Foram realizadas também reações controle sem cDNA e sem a enzima transcriptase reversa. Cada amostra de

RNA foi ensaiada com reações de PCR em tempo real em triplicata e as amostras com Cqs mais discrepantes foram desprezadas (uma de três).

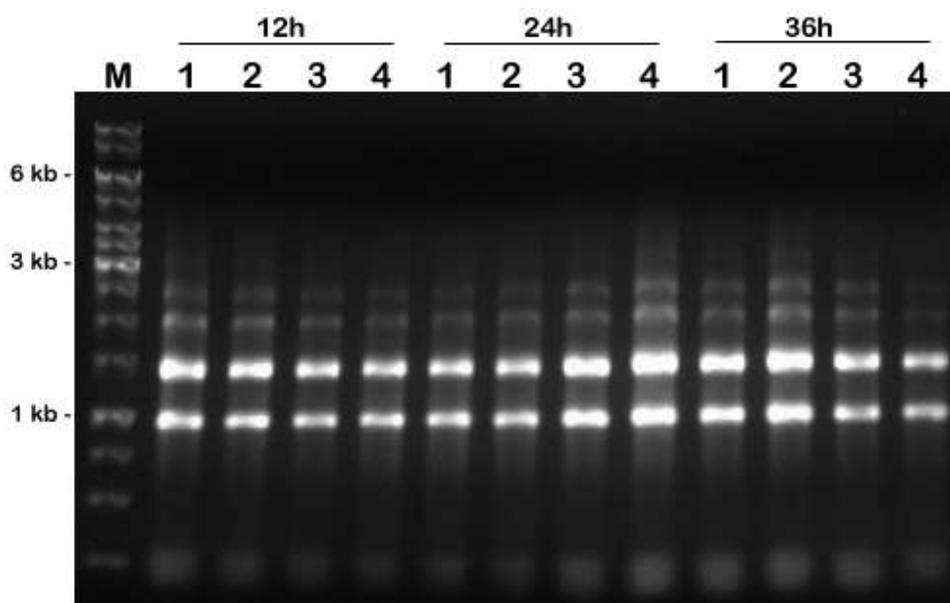
As análises de expressão foram feitas com uso do método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (Livak *et al.*, 2001), onde  $\Delta\Delta Cq$  é a diferença entre o Cq do gene alvo e o Cq da actina na amostra, subtraído da diferença entre o Cq do gene alvo e o Cq da actina na amostra não induzida. Estes genes alvos foram os genes da endoglucanase 3 (*egl3*), endoxilanase 2 (*xyn2*) e endoxilanase 3 (*xyn3*) e calibrador o gene da actina (*act*). Realizaram-se duas comparações entre amostras: (i) a comparação de *T. harzianum* IOC-3844 induzido com Avicel, xilana ou xilana mais Avicel com o não induzido (cultivado com glicerol), nos tempos de 12h, 24h e 36h; (ii) a comparação do fungo filamentoso induzido com bagaço tratado ou bagaço tratado suplementado com rThXyn3 nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24 e 36h, com o não induzido no tempo de 24h. Para a obtenção dos gráficos, as médias e os desvios padrão foram plotados utilizando-se o software estatístico Prism 5 (GraphPad).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Extração e tratamentos do RNA total

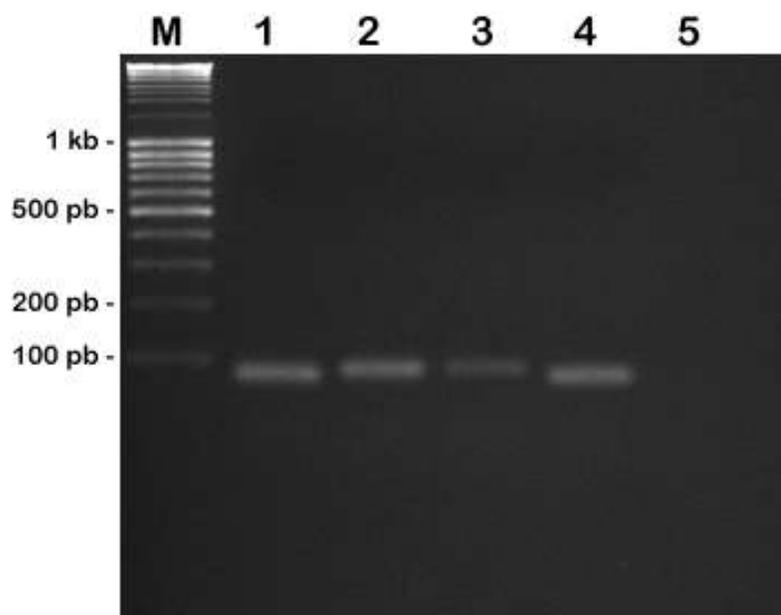
Foram realizadas extrações de RNA total, a partir dos micélios conservados na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise de qPCR de *Trichoderma harzianum* IOC-3844. Com esta metodologia empregada para a expressão foi possível obter grandes quantias de RNA a partir de pouco material (aproximadamente 90 mg) e menor degradação. A utilização de pérolas de vidro em substituição da maceração (forma anterior exercida no laboratório) foi vantajosa por diminuir a manipulação com o material, além de ser mais eficiente e prática.

As extrações renderam em média  $2\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , com boa qualidade, confirmada por meio de medidas de densidade óptica em espectrofotômetro, e pela análise de eletroforese em gel de agarose. De 1 a 2  $\mu\text{L}$  eram utilizados para tratamento com DNase I, para garantir a isenção de DNA nas amostras, e o RNA resultante apresentou quantidades de  $150\ \text{ng}/\mu\text{L}$  em média e boa qualidade, como demonstra a figura 22.



**Figura 22.** RNA total extraído de micélio de *Trichoderma harzianum* IOC-3844, tratado com DNase I. Gel de agarose 1% mostrando em M, Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb (Fermentas); 1, RNA de micélio não induzido; 2, RNA de micélio induzido com Avicel; 3, RNA de micélio induzido com xilana; 4, RNA de micélio induzido com Avicel e xilana.

A partir dos RNAs totais tratados, foram sintetizados cDNA que foram utilizados para as padronizações da PCR. As condições ótimas de concentração de primer foram: *act* = 0,4  $\mu$ M; *egl3* = 0,5  $\mu$ M; *xyn3* = 0,4  $\mu$ M e *xyn2* = 0,4  $\mu$ M. A reação ótima foi padronizada com uma temperatura de hibridização dos primers de 56°C. A figura 23 apresenta uma reação de amplificação com *Taq* DNA polimerase utilizando-se as condições ótimas.



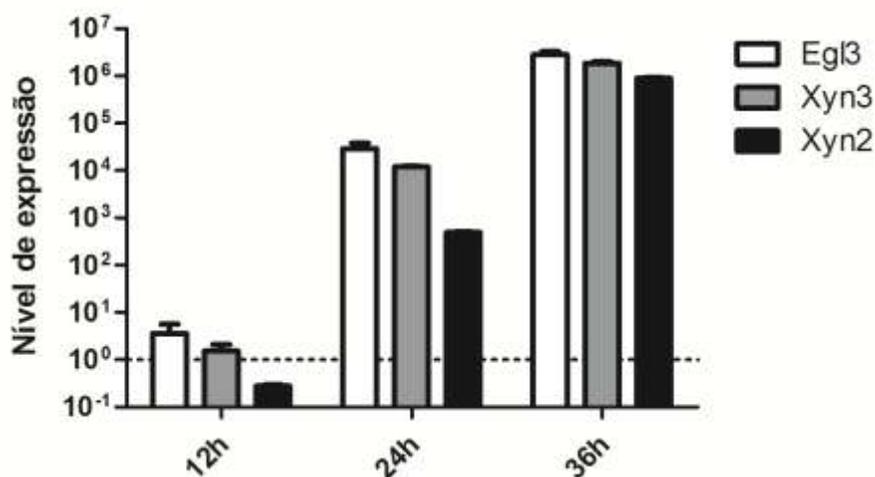
**Figura 23. Resultado de RT-PCR em micélio de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivado por 36 horas com Avicel e xilana.** Gel de agarose 2% mostrando em M, Marcador de peso molecular MassRuler (Fermentas); 1, gene actina (*Act*); 2, gene endoglucanase 3 (*Egl3*); 3, gene endoxilanase 3 (*Xyn3*); 4, gene endoxilanase 2 (*Xyn2*); 5, controle sem transcriptase reversa da amplificação do gene *act*.

Os genes *egl3*, *xyn3* e *xyn2* foram escolhidos para estudo, pois se pretendia estudar a expressão de uma xilanase que tinha característica de expressão de celulase, o gene da xilanase 3 (*xyn3*). Desta forma usou-se o gene da endoglucanase 3 (*egl3*) como controle da expressão de celulase e a endoxilanase 2 (*xyn2*) para controle da expressão de xilanase, pois o perfil de expressão de ambos genes já foram inicialmente estudados para *T. harzianum* (*Egl3* - Projeto de doutorado, Wilson Malagó Jr; *Xyn2* Ahmed *et al.* (2007)).

## 6.2 Análise de expressão de *T. harzianum* induzidos Avicel e xilana

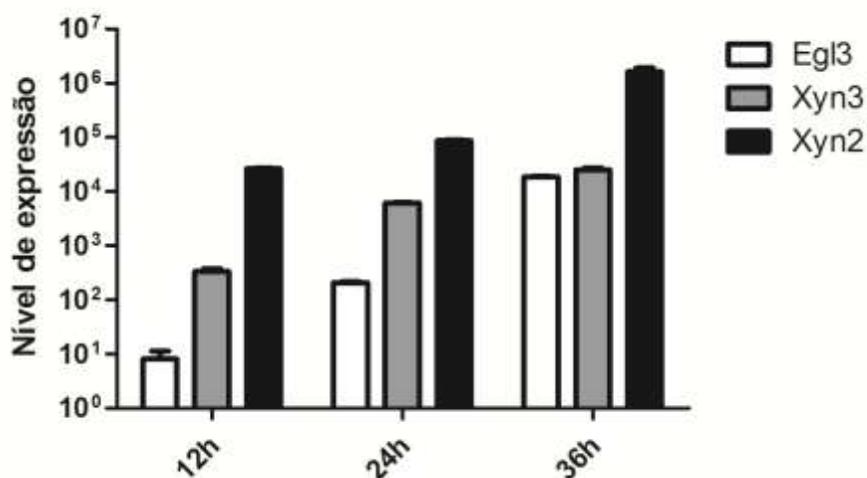
Os fungos do gênero *Trichoderma* são bastante estudados para a produção de enzimas degradadoras de celulose e hemiceluloses. Trabalhos com estirpes de *T. reesei* e *T. harzianum*, tem relatado a expressão destas enzimas em fontes de carbonos complexas (compostas por celulose e hemicelulose) ou celulose apenas (Hrmoval *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 2000). Entretanto, quando cultivado com xilana, o *T. reesei* apresenta apenas indução de enzimas degradadoras de xilana (Hrmoval *et al.*, 1986; Mach *et al.*, 2003). Além disso, também em *T. reesei*, o gene *xyn3* apresentou indução semelhante à de celulasas e não xilanases (Xu *et al.*, 2000). Desta forma, buscou-se estudar a expressão dos genes *egl3*, *xyn3* e *xyn2*, a fim de se avaliar se estas mesmas características ocorrem no fungo *T. harzianum* IOC-3844. Escolheu-se avaliar a expressão dos genes nos tempos de 12, 24 e 36h, pois estudos prévios em *T. reesei* (Abrahão-Neto *et al.*, 1995) reportaram alta e crescente expressão de celulasas entre esses tempos de indução.

Ao avaliar a expressão dos genes quando o fungo foi induzido por celulose microcristalina, observou-se um aumento geral e semelhante dos genes durante o tempo. Entretanto houve maior nível de expressão do gene da celulase (*Egl3*), assim como demonstra a figura 24.



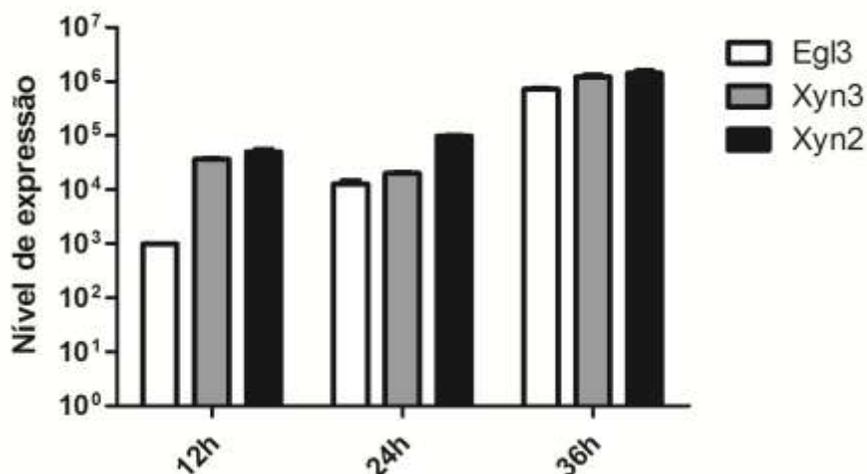
**Figura 24. Valores de expressão de transcritos obtidos de cultura induzida com Avicel de *T. harzianum* IOC-3844 por 12, 24 e 36h. Os valores foram normalizados pela expressão do transcrito de actina. Os alvos calibradores foram os transcritos de cultura induzida nos mesmos tempos. O eixo das ordenadas está apresentado em escala logarítmica.**

Quanto ao fungo induzido por xilana, observou-se a expressão dos três genes estudados (xilanasas e celulase), contraditoriamente ao relatado anteriormente para *T. reesei*, (Figura 25). Entretanto, nota-se uma menor expressão dos genes *egl3* e *xyn3* após 36h de expressão, quando comparado à indução com Avicel. Além disso, uma menor variação entre os níveis de expressão dos dois genes é observada durante o tempo. Os níveis do transcrito da *xyn2* elucidam uma antecipação da expressão deste gene, demonstrando a indução prioritária por xilana.



**Figura 25. Valores de expressão de transcritos obtidos de cultura induzida com Xilana de *T. harzianum* IOC-3844 por 12, 24 e 36h.** Os valores foram normalizados pela expressão do transcrito de actina. Os alvos calibradores foram os transcritos de cultura induzida nos mesmos tempos. O eixo das ordenadas está apresentado em escala logarítmica.

Ao induzir *T. harzianum* com Avicel combinada com xilana, observou-se uma maior indução da expressão dos três genes estudados (xilanasas e celulase), que nos outros casos apresentados (Figura 26). Nota-se também um efeito precipitador da indução dos genes *xyn3* e *egl3* por indutores hemicelulósicos, visto que no tempo de 12h já há uma alta indução das enzimas, quando comparado com os valores observados nas outras condições de indução. Entretanto, nota-se uma expressão um pouco menor do gene *egl3* ao final de 36h de indução, quando comparado à indução com Avicel. Interessantemente, ao final de 36h de expressão os três genes estudados apresentavam níveis próximos de expressão, diferentemente das induções com Avicel ou xilana apenas (Figuras 24 e 25).



**Figura 26.** Valores de expressão de transcritos obtidos de cultura induzida com Avicel e Xilana de *T. harzianum* IOC-3844 por 12, 24 e 36h. Os valores foram normalizados pela expressão do transcrito de actina. Os alvos calibradores foram os transcritos de cultura induzida nos mesmos tempos. O eixo das ordenadas está apresentado em escala logarítmica.

O gene *xyn3* tem sido relatado com regulação semelhante a genes de celulases, o que também pode ser comprovado nos resultados obtidos nestes experimentos para *Trichoderma harzianum*. Em geral, as diferenças entre a expressão do gene *xyn3* e *egl3* não são contrastantes, principalmente quando se compara com os níveis de expressão do gene *xyn2*. No caso, houve indução dos genes *xyn3* e *egl3* sob cultivo com xilana, resultado não condizente com os apresentados na literatura para *T. reesei* (Xu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000). Observa-se também que houve um adiantamento da indução dos genes quando se utilizou os substratos xilana e avicel concomitantemente, sugerindo, assim, uma forma de indução sinérgica na transcrição de genes do complexo holocelulolítico. Outro fato interessante observado foi uma expressão basal muito alta do gene *xyn2* em *T. harzianum*, capaz de apresentar atividade xilanolítica do sobrenadante do fungo cultivado com glicerol.

Xu *et al.* (2000), demonstrou que originalmente o gene da *xyn3* pode existir de forma latente em *T. reesei*, dado que tanto a estirpe selvagem QM9414, quanto a estirpe PC-3-7, obtida por evolução dirigida, possuem o gene da endoxilanase 3 incorporado no genoma, entretanto o *T. reesei* QM9414 não apresenta a indução deste gene nem utilizando-se indutores celulósicos quanto hemicelulósicos. Em outras famílias de fungos filamentosos, o gene análogo ao *xyn3* de *T. harzianum*, mostraram-

se induzíveis por xilana. Em *Penicillium citrinum*, a proteína *xynB*, assim como o cDNA correspondente, foram isolado a partir de fungo cultivado com xilana *birchwood* (Wakiyama *et al.*, 2008a). Estudando-se a regulação do gene *xynF3* de *Aspergillus oryzae*, Kimura *et al.* (2002) observaram uma baixa expressão do gene quando o fungo era cultivado com xilana, entretanto um valor muito superior de indução foi encontrado quando cultivado com farelo de trigo. A regulação gênica deste gene em diferentes famílias de fungos filamentosos não apresenta um padrão, desta maneira, grande parte de trabalhos com o gene desta xilanase (*xyn3*) se foca no estudo de seus promotores (Ogasawara *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2009; Nakazawa *et al.*, 2012).

Estudos com *T. reesei* demonstraram que o promotor do gene *xyn3* contém regiões controladas pelos fatores de transcrição *cre1*, *ace1*, *ace2* e *xyr1* (Furukawa *et al.*, 2008). O fator de transcrição *cre1* é um importante regulador de assimilação de carbono, sendo responsável por reprimir a expressão de celulases e hemicelulases em *T. reesei* na presença de glicose (Ilmen *et al.*, 1997; Portnoy *et al.*, 2011). Nakari-Setälä *et al.* (2009), utilizando *T. reesei* QM6a com o *cre1* truncado, observaram um aumento de atividade hidrolítica quando comparado ao fungo contendo o gene selvagem. Os fatores de transcrição *ace1* e *ace2* são chamados de ativadores da expressão de celulases, pois ambos foram caracterizados como responsáveis pela indução de genes celulolíticos e xilanolíticos. Entretanto o gene *ace1* é responsável por um modo de repressão da expressão enquanto o gene *ace2* é um ativador, propriamente dito (Saloheimo *et al.*, 2000). Além disso, estudos de Aro *et al.* (2003) demonstraram que diferentes estirpes do fungo *T. reesei* que tinham o gene *Ace1* truncado não se diferenciavam grandemente na expressão de celulases e xilanases quando possuíam o gene *Ace2* ativo ou não, elucidando a presença de outros fatores de transcrição na regulação destes genes. O fator de transcrição *xyr1* tem sido relatado como um fator de ativação transcricional geral e essencial para controle da expressão de não só xilanases, como celulases, independentemente do agente indutor (xilobiose ou sophorose) (Furukawa *et al.*, 2009).

O estudo de transcriptoma do fungo *T. harzianum* realizado em nosso laboratório revelou um alto nível de expressão do fator de transcrição *xyr1* e baixíssimo nível de *ace2*, quando comparado com *T. reesei* (Wilson Malago Jr., Tese de doutorado). Estes fatos indicam que esta diferença na expressão de *xyn3* entre *T.*

*harzianum* e *T. reesei*, pode ser resultado do alto envolvimento do fator *xyr1* e de um possível fator adicional. Furukawa *et al.* (2008) presumem a existência de um fator adicional que promove regulação via interação proteína-proteína com o *xyr1* e a RNA polimerase. Desta forma, a diferença entre as duas espécies de fungos pode estar neste fator adicional, que ou é expresso de forma diferente, ou é inexistente em *T. harzianum*, tornando o fator *xyr1* o principal regulador da expressão. Entretanto, para comprovar estas hipóteses, seria necessário o conhecimento da sequência do promotor do gene *xyn3*.

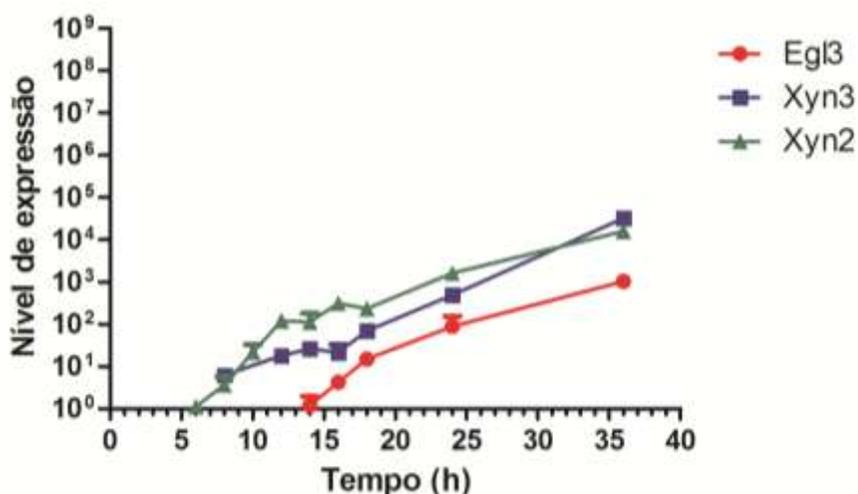
### **6.3 Análise de expressão de *T. harzianum* induzido com bagaço de cana-de-açúcar suplementado com rThXyn3**

Os trabalhos oriundos do estudo do fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* IOC-3844 tem demonstrado uma forte capacidade celulolítica, com produção comparável com a descrita na literatura para os principais produtores de celulasas e xilanases. Estudos de cinética de produção enzimática de *T. harzianum* estabelecem um período entre 96 e 120h de cultivo para alcance do pico de atividade de celulasas e xilanases, visando à utilização do sobrenadante como coquetel para hidrólise enzimática de biomassa vegetal (Ahmed *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2012). Ademais, Delabona *et al.* (2012) relatam que a eficiência de produção enzimática é maior ao utilizar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por *Steam explosion*, que outras fontes complexas e, até mesmo, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por condições de maior delignificação (como tratamento oxidativo ou alcalino).

A partir destes conhecimentos, somado aos resultados do perfil de expressão obtido, buscou-se avaliar a produção de celulasas e xilanases pelo fungo *T. harzianum* IOC-3844, quando induzido por bagaço de cana-de-açúcar explodido, puramente ou adicionado de endoxilanase 3 (rThXyn3). Optou-se por utilizar a enzima *xyn3*, fundamentalmente, por ser uma xilanase que demonstra características hidrolíticas favoráveis (atividade e estabilidade considerável em pH 6,0 e 28°C, Capítulo 1), e também por ser uma enzima capaz de hidrolisar pequenos xilooligossacarídeos ligados à celulose (Biely *et al.*, 1997). Escolheu-se por monitorar os três genes do

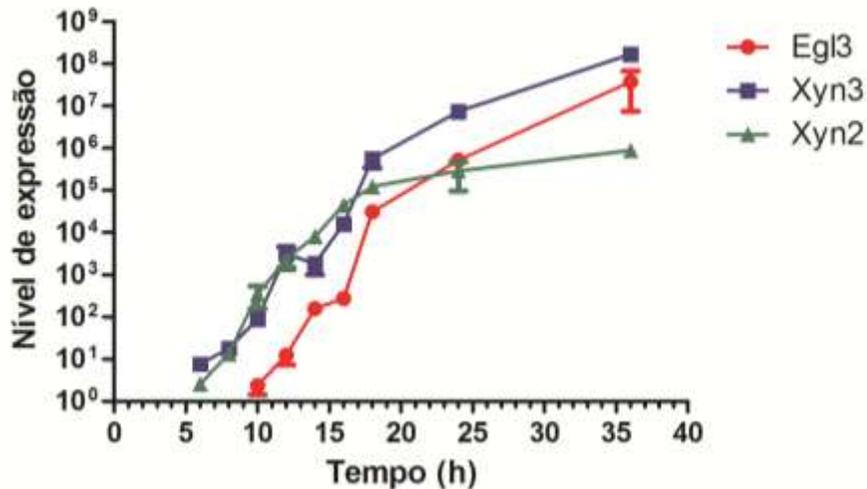
estudo anterior (*egl3*, *xyn3* e *xyn2*), nas duas condições de indução, no período de 6 à 36h.

Ao avaliar a expressão dos genes quando o fungo foi induzido por bagaço explodido, observou-se o nível de expressão basal (nível de expressão igual a 1) dos genes xilanolíticos com 6h de indução, enquanto para o gene *Egl3*, apenas com 14h de cultivo. Houve um aumento do nível de expressão constante dos três genes até 36h de indução, assim como demonstra a figura 27.



**Figura 27. Valores de expressão de transcritos de 6 a 36h, de *T. harzianum* IOC-3844 induzido com bagaço.** Os valores foram normalizados pela expressão do transcrito de actina. Os alvos calibradores foram os transcritos de cultura não-induzida no tempo de 24h. O eixo das ordenadas está apresentado em escala logarítmica e apenas os valores de superexpressão são apresentados (> 1,0).

Interessantemente, ao avaliar a expressão dos genes quando o fungo foi induzido por bagaço explodido suplementado com rThXyn3, com 6h de indução, os dois genes de xilanases já haviam ultrapassado o nível basal, e o gene *egl3*, após aproximadamente 9h de cultivo. Além disso, houve um aumento mais acentuado do nível de expressão dos três genes até 36h de indução, quando comparado com a indução não suplementada, assim como demonstra a figura 28.



**Figura 28.** Valores de expressão de transcritos de 6 a 36h, de *T. harzianum* IOC-3844 induzido com bagaço suplementado com rThXyn3. Os valores foram normalizados pela expressão do transcrito de actina. Os alvos calibradores foram os transcritos de cultura não-induzida no tempo de 24h. O eixo das ordenadas está apresentado em escala logarítmica e apenas os valores de superexpressão são apresentados (> 1,0).

Diante dos resultados obtidos, pode-se admitir que a ação da endoxilânase acelerou e antecipou a indução dos genes, não apenas xilanolíticos, como também celulolíticos. A escolha da utilização desta endoxilânase foi tomada mesmo considerando que a *xyn3* apresenta menor atividade que as outras xilanases, pois estudos relataram que o pré-tratamento por *Steam explosion*, mesmo retirando grande parte da xilana do material vegetal, ainda permanece com uma fração de xilooligossacarídeos intimamente ligados à celulose e à lignina (Garcia-Aparicio *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Alvira *et al.*, 2011). Assim, o uso de bagaço de cana-de-açúcar explodido adicionado de rThXyn3 seria viável, pois combinaria a grande quantidade de celulose (indutor para celulasas e xilanases) somado aos xilooligossacarídeos liberados pela ação da enzima. De acordo com o observado, foi possível adiantar a expressão em aproximadamente 5 horas, além de acelerar a expressão das enzimas, o que torna a produção mais vantajosa e com maior produtividade pela simples adição 2 U/L de indução (aproximadamente 100 µg/L). No caso, utilizou-se enzima purificada, o que no contexto industrial não seria necessário, pois no sobrenadante da expressão recombinante em *Pichia pastoris* é encontrada basicamente a proteína recombinante. Além disso, a utilização do sobrenadante de *P.*

*pastoris* recombinante seria vantajosa dado que a levedura apresenta a expressão de endoglucanases, mesmo que baixíssima concentração, o que poderia beneficiar a geração de indutores celulásicos.

A produção de enzimas é a peça chave para tornar a hidrólise enzimática do material lignocelulósico economicamente viável, devido a agentes indutores que representam papel econômico crucial no custo da produção das enzimas do complexo celulolítico de fungos filamentosos (Banerjee *et al.*, 2010b). A utilização de resíduos da indústria agrícola tem se mostrado de grande importância nas pesquisas envolvendo formas eficientes e menos onerosas de produção de celulases e xilanases em *T. harzianum*, pois muitos destes não só servem como fonte de carbono como também indutores necessários para disparar a maquinaria genética (Ahmed *et al.*, 2009; De Castro *et al.*, 2010a; 2010b; Delabona *et al.*, 2012). O principal gargalo da utilização de compostos complexos na produção de enzimas comercialmente é a longa fase de latência do fungo filamentoso, quando comparado às induções com indutores puros. Neste contexto, poder diminuir a fase de aclimatação e antecipar o desencadeamento da expressão destas enzimas, resultaria numa precocidade do pico ótimo de expressão de celulases e xilanases, que além de aumentar a produtividade também seria muito importante contra a ação de proteases extracelulares.

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se avaliar que as principais conclusões tomadas foram:

- ❖ O sistema heterólogo de *Pichia pastoris* foi bastante eficiente para a produção da endoxilânase 3 de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 ativa, além de apresentar um resultado inesperado, a incorporação de uma N-glicosilação não existente na proteína nativa.
- ❖ A proteína recombinante rThXyn3 apresentou resultados satisfatórios para a aplicação desta em misturas enzimáticas para bioconversão de resíduos lignocelulósicos. Entretanto, faz-se necessário a busca pelo aumento a eficiência catalítica ainda mais, assim como estudos relativos ao aumento da termostabilidade e resistência térmica.
- ❖ A N-glicosilação incorporada na rThXyn3 não apresentou diferenças significativas nas características bioquímicas da enzima. Por outro lado, a N-glicosilação influenciou nas características cinético-enzimáticas, fazendo com que a proteína glicosilada possuísse poder catalítico 2,5 vezes maior que a proteína recombinante não-glicosilada. Entretanto, estudos biofísicos seriam necessários para avaliar a forma com que esta glicosilação interage com o substrato, promovendo esta diferença na catálise.
- ❖ Os resultados de análise de expressão demonstraram que o fungo *Trichoderma harzianum* IOC-3844 possui uma regulação gênica que garante a expressão de genes celulolíticos e xilanolíticos, até mesmo quando induzidos com xilana apenas, além de apresentar um efeito sinérgico de indutores celulásicos e xilanásicos. Entretanto, seria necessário confirmar estes resultados para um maior número de genes do complexo celulolítico.
- ❖ A utilização de bagaço de cana-de-açúcar explodido se mostrou um bom ativador da expressão de celulasas e xilanas no fungo *Trichoderma harzianum* IOC-3844, apresentando expressão de enzimas a partir de 6h de indução.

- ❖ O resultado mais surpreendente foi que a utilização de bagaço de cana-de-açúcar explodido adicionado de rThXyn3 acelerou a indução das enzimas, não apenas xilanases, como também a celulase estudada, além de adiantar a ativação da endoglucanase 3 em aproximadamente 5 horas. Estes resultados são apenas iniciais, e novos estudos serão necessários para avaliar o escalonamento deste processo, entretanto é possível afirmar que estes frutos podem garantir um aumento da produtividade na produção de complexos enzimáticos, que é hoje o principal gargalo da consolidação do processo produtivo de etanol de segunda geração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S. *et al.* Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pak. J. Bot.*, v.43, n.3, p.1411-1419. 2009.
- AHMED, S. *et al.* Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2012.
- AHMED, S. *et al.* Xylanase from *Trichoderma harzianum*: Enzyme characterization and gene isolation. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, v.29, n.2, Apr, p.176-182. 2007.
- ALBERTS, B. *et al.* *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science. 2008. xxxiii, 1601, [90] p. p.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, v.215, n.3, Oct 5, p.403-10. 1990.
- ALVIRA, P. *et al.* Strategies of xylanase supplementation for an efficient saccharification and cofermentation process from pretreated wheat straw. *Biotechnol Prog*, Apr 20. 2011.
- ARANTES, V.; J. N. SADDLER. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels*, v.3, p.4. 2010.
- ARNOLD, K. *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, v.22, n.2, Jan 15, p.195-201. 2006.
- ARO, N. *et al.* ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, n.1, January, p.56-65. 2003.
- BANERJEE, G. *et al.* Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. *Biotechnol Biofuels*, v.3, p.22. 2010a.
- BANERJEE, G. *et al.* Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *Bioenergy reseach*, v.3, January 2010, p.82-92. 2010b.
- BEG, Q. K. *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.56, n.3-4, Aug, p.326-338. 2001.
- BENDTSEN, J. D. *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, v.340, n.4, Jul 16, p.783-95. 2004.

BHARDWAJ, A. *et al.* The Critical Role of N- and C-Terminal Contact in Protein Stability and Folding of a Family 10 Xylanase under Extreme Conditions. *Plos One*, v.5, n.6, Jun 28. 2010.

BIELY, P. *et al.* Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol*, v.57, n.1-3, Sep 16, p.151-66. 1997.

BOONYAPAKRON, K. *et al.* Cloning and expression of xylanase 10 from *Cryptovalsa mangrovei* (BCC7197) in *Pichia pastoris*. *DNA Seq*, v.16, n.5, Oct, p.372-8. 2005.

CAMPBELL, R. L. *et al.* High-resolution structures of xylanases from *B. circulans* and *T. harzianum* identify a new folding pattern and implications for the atomic basis of the catalysis. *Uniprot Data Base*. 1994.

CARVALHO, W. *et al.* Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, v.32, n.8, p.2191-2195. 2009.

CARVALHO, W. R. *Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico Humicola grisea var. thermoidea e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas*. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008. 121 p.

CEREGHINO, J. L.; J. M. CREGG. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, v.24, n.1, Jan, p.45-66. 2000.

CHANTASINGH, D. *et al.* Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, v.46, n.1, Mar, p.143-9. 2006.

CHEN, M. J. *et al.* Immobilization of *Neocallimastix patriciarum* xylanase on artificial oil bodies and statistical optimization of enzyme activity. *Bioresource Technology*, v.99, n.18, Dec, p.8662-8666. 2008.

CHERY, J. R.; A. L. FIDANTSEF. Directed evolution of industrial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, v.14, p.438-443. 2003.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, v.16, n.22, Nov 25, p.10881-90. 1988.

CREGG, J. M. *et al.* Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*, v.11, n.8, Aug, p.905-10. 1993.

DAI, X. Yeast *Pichia pastoris*: a notable heterologous gene expression system. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, v.37, n.6, Dec, p.483-5. 1997.

- DASHTBAN, M. *et al.* Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, v.5, n.6, p.578-595. 2009.
- DE ARAUJO, J. H. *et al.* Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases. *Appl Biochem Biotechnol*, v.77-79, Spring, p.713-22. 1999.
- DE CASTRO, A. M. *et al.* High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. *Enzyme Res*, v.2010, p.854526. 2010a.
- DE CASTRO, A. M. *et al.* *Trichoderma harzianum* IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant beta-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Appl Biochem Biotechnol*, v.162, n.7, Nov, p.2111-22. 2010b.
- DELABONA, P. D. S. *et al.* Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology*, v.107, n.0, p.517-521. 2012.
- DODD, D.; I. K. CANN. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob Change Biol Bioenergy*, v.1, n.1, Feb 18, p.2-17. 2009.
- ERENO, D. Álcool de celulose: Bagaço e palha da cana são cotados para aumentar a produção de etanol. Revista Fapesp Online. Ed. 133 2007.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. *et al.* Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.42, n.4, p.555-562. 1994.
- FERREIRA-FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system. *Braz J Med Biol Res*, v.27, n.5, May, p.1093-109. 1994.
- FESTUCCI-BUSELLI, R. A. *et al.* Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.19, n.1, p.1-13. 2007.
- FURUKAWA, T. *et al.* Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol*, v.46, n.8, Aug, p.564-74. 2009.
- FURUKAWA, T. *et al.* Identification of the cis-acting elements involved in regulation of xylanase III gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Fungal Genet Biol*, v.45, n.7, Jul, p.1094-102. 2008.
- GALBE, M.; G. ZACCHI. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.59, n.6, Sep, p.618-628. 2002.

GARCIA-APARICIO, M. P. *et al.* Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl Biochem Biotechnol*, v.137-140, n.1-12, Apr, p.353-65. 2007.

GELLISSSEN, G. *Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems*. Weinheim: Wiley-VCH. 2005. xxv, 404 p. p.

GENEROSO, W. C. *et al.* Recombinant expression and characterization of an endoglucanase III (cel12a) from *Trichoderma harzianum* (Hypocreaceae) in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet Mol Res*, v.11, n.2, p.1544-57. 2012.

GOODRICK, J. C. *et al.* High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bioeng*, v.74, n.6, Sep 20, p.492-7. 2001.

GORSHKOVA, T. A. *et al.* Specific type of secondary cell wall formed by plant fibers. *Russian Journal of Plant Physiology*, v.57, n.3, May, p.328-341. 2010.

GRIFFITHS, A. J. F. *Introduction to genetic analysis*. New York: W.H. Freeman and Co. 2008. xxiii, 838 p. p.

GUPTA, R. *et al.* Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*. 2004.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol*, May 24. 2011.

HRMOVA, M. *et al.* Specificity of Cellulase and Beta-Xylanase Induction in *Trichoderma reesei* Qm-9414. *Archives of Microbiology*, v.144, n.3, Apr, p.307-311. 1986.

HU, J. G. *et al.* The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels*, v.4, Oct 5. 2011.

HULS, T. *et al.* The Effects on Ruminant pH, Feed Intake and Digestibility When Using Wet Corn Gluten Feed to Adapt Cattle to Finishing Diets. *Nebraska Beef Cattle Report*, v.531. 2009.

ILMEN, M. *et al.* Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol*, v.63, n.4, Apr, p.1298-306. 1997.

JULENIUS, K. *et al.* Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, v.15, n.2, Feb, p.153-64. 2005.

KAAR, W. E. *et al.* Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v.14, n.3, p.277-287. 1998.

- KIMURA, T. *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression analysis of the xynF3 gene from *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, v.66, n.2, Feb, p.285-92. 2002.
- KULKARNI, N. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *Fems Microbiology Reviews*, v.23, n.4, Jul, p.411-456. 1999.
- KUMAR, R.; C. E. WYMAN. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol*, v.100, n.18, Sep, p.4203-13. 2009.
- LAFOND, M. *et al.* GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. *Microb Cell Fact*, v.10, p.20. 2011.
- LEE, J. M. *et al.* Molecular Cloning and Expression of the *Trichoderma harzianum* C4 Endo-beta-1,4-Xylanase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.19, n.8, Aug, p.823-828. 2009.
- LIVAK, K. J.; T. D. SCHMITTGEN. 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.
- LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.66, n.3, Sep, p.506-77, table of contents. 2002.
- MACH, R. L.; S. ZEILINGER. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.60, n.5, Jan, p.515-22. 2003.
- MAEDA, R. N. *et al.* Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, v.46, n.5, May, p.1196-1201. 2011.
- MANDELS, M. *et al.* Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J Bacteriol*, v.83, Feb, p.400-8. 1962.
- MANDELS, M.; E. T. REESE. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol*, v.73, n.2, Feb, p.269-78. 1957.
- MARCHESSAULT, R. H.; J. A. HOWSMON. Experimental Evaluation of the Lateral-Order Distribution in Cellulose. *Textile Research Journal*, v.27, n.1, p.30-41. 1957.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428. 1959.
- MORALES, P. *et al.* Purification and Characterization of Alkaline Xylanases from *Bacillus polymyxa*. *Appl Environ Microbiol*, v.59, n.5, May, p.1376-82. 1993.

NAKARI-SETÄLÄ, T. *et al.* Genetic Modification of Carbon Catabolite Repression in *Trichoderma reesei* for Improved Protein Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, n.14, July, p.4853-4860. 2009.

NAKAZAWA, H. *et al.* Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus*  $\beta$ -glucosidase 1 for efficient biomass conversion. *Biotechnology and Bioengineering*, v.109, n.1, p.92-99. 2012.

OGASAWARA, W. *et al.* Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.72, n.5, Oct, p.995-1003. 2006.

PAANANEN, A. *et al.* **Interaction between Cellulose and Xylan: An Atomic Force Microscope and Quartz Crystal Microbalance Study.** In: (Ed.). Hemicelluloses: Science and Technology: American Chemical Society, v.864, 2003. Interaction between Cellulose and Xylan: An Atomic Force Microscope and Quartz Crystal Microbalance Study, p.269-290. (ACS Symposium Series)

PEREIRA JR., N. *et al.* *Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery.* Rio de Janeiro: Biblioteca Nacional, v.2. 2008 (Series on Biotechnology)

PINTO, J. H.; D. P. KAMDEN. Comparison of pretreatment methods on the enzymatic saccharification of aspen wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.61, n.3, Dec, p.289-297. 1996.

POLAINA, J.; A. P. MACCABE. *Industrial enzymes: structure, function, and applications.* Dordrecht: Springer. 2007. xii, 641 p. p.

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

PORTNOY, T. *et al.* The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, v.12, p.269. 2011.

RAHMAN, Z. *et al.* Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.82, n.5, Apr, p.899-908. 2009.

REZENDE, M. I. *et al.* Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, n.1, Jan-Mar, p.67-72. 2002.

ROZEN, S.; H. SKALETISKY. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, v.132, p.365-86. 2000.

SACHSLEHNER, A. *et al.* Induction of Mannanase, Xylanase, and Endoglucanase Activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl Environ Microbiol*, v.64, n.2, Feb, p.594-600. 1998.

- SADDLER, J. N. *et al.* A Comparison between the Cellulase Systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.22, n.2, p.139-145. 1985.
- SALLES, B. C. *et al.* Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *J Biotechnol*, v.81, n.2-3, Aug 25, p.199-204. 2000.
- SALOHEIMO, A. *et al.* Isolation of the ace1 gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter cbh1 of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*, v.275, n.8, Feb 25, p.5817-25. 2000.
- SAMBROOK, J.; D. W. RUSSELL. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001
- SANGER, F. *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.
- SCHMIDT, A. *et al.* Xylan binding subsite mapping in the xylanase from *Penicillium simplicissimum* using xylooligosaccharides as cryo-protectant. *Biochemistry*, v.38, n.8, Feb 23, p.2403-2412. 1999.
- SILVEIRA, F. Q. D. *et al.* A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.23, n.1, Jul, p.682-685. 1999.
- SUBRAMANIYAN, S.; P. PREMA. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.22, n.1, p.33-64. 2002.
- TORRIE, J. P. *et al.* Production of Beta-Mannanases by *Trichoderma harzianum* E58. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.34, n.3, Dec, p.303-307. 1990.
- VALLS, C.; M. B. RONCERO. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresource Technology*, v.100, n.6, Mar, p.2032-2039. 2009.
- VAN DE VYVER, W. F. J. *et al.* Effect of glycosylation on the stability of fungal xylanase exposed to proteases or rumen fluid in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, v.116, n.3-4, Oct 15, p.259-269. 2004.
- VASQUEZ, M. P. *et al.* Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, v.137-140, n.1-12, Apr, p.141-53. 2007.
- WACKETT, L. P. Biomass to fuels via microbial transformations. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.12, n.2, Apr, p.187-193. 2008.
- WAKIYAMA, M. *et al.* Purification and properties of family-10 endo-1,4-beta-xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. *J Biosci Bioeng*, v.105, n.4, Apr, p.367-74. 2008a.

WAKIYAMA, M. *et al.* Purification and properties of family-10 endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.105, n.4, p.367-374. 2008b.

WONG, K. K. Y. *et al.* Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.32, n.7, 1986/07/01, p.570-576. 1986.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, v.25, n.4, Apr, p.153-157. 2007.

XU, J. *et al.* Regulation of xyn3 gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.54, n.3, Sep, p.370-5. 2000.

XU, J. *et al.* A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.49, n.6, Jun, p.718-724. 1998.

ZHANG, J. H. *et al.* Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, v.102, n.19, Oct, p.9090-9095. 2011.

ZHENG, Y. *et al.* Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric Biol Eng*, v.2, n.3, p.51-68. 2009.

## ANEXO I

### MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

#### *Meio Luria-Bertoni Low Salt*

O meio Luria-Bertoni (LB) *Low Salt* foi utilizado para a manutenção e propagação de bactérias. O meio é composto por 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio e, em caso de meio sólido, 1,5% de ágar em água destilada.

O meio de cultura foi esterilizado por autoclavagem à 121°C, 1 atm de pressão e 20 minutos, e mantidos a temperatura ambiente.

#### *Meio Extrato de levedura, Peptona e Dextrose (YEPD)*

O meio YEPD foi utilizado para a manutenção de leveduras *P. pastoris*. O meio é composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose e, em caso de meio sólido, 2% de ágar, em água destilada.

O meio de cultura será esterilizado por autoclavagem à 121°C, 1 atm de pressão e 20 minutos, e mantidos a temperatura ambiente.

#### *Meio YEPD tamponado*

O meio YEPD tamponado foi utilizado para a indução das leveduras *P. pastoris* recombinantes. O meio é composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose e 100 mM de tampão fosfato de potássio, em água destilada.

O meio de cultura será esterilizado por autoclavagem à 121°C, 1 atm de pressão e 20 minutos, e mantidos a temperatura ambiente.

#### *Meio de cultura Mandels e Reese*

O meio de cultura proposto por Mandels e Reese foi utilizado para o cultivo e indução do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*. O meio é composto por uma base 2x concentrada contendo 0,03% de uréia, 0,03% de sulfato de magnésio, 0,14% de sulfato de amônio, 0,2% de Tween 80 e 2% de peptona em água destilada.

Esta base foi esterilizado por autoclavagem à 121°C, 1 atm de pressão e 20 minutos, e mantidos a temperatura ambiente.

À parte, uma solução de metais traços 1.000x concentrada foi produzida, contendo 0,5% de sulfato de ferroso, 0,16% sulfato de manganês, 0,16% sulfato de zinco e 0,2% de sulfato de cobre em água destilada. Esta solução foi esterilizada por filtração e mantida a -20°C.

Para a montagem do meio de cultura, utilizou-se 500 mL da base 2x concentrada, 1 mL da solução de metais traços 1.000x concentrada, 10 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> 3%, 100 mL de tampão fosfato de potássio 1 M pH 6,0, a fonte de carbono utilizada nas concentrações desejadas e água destilada estéril suficiente para um volume final de 1 L de meio.

Todas as fontes de carbono foram diluídas em água e autoclavadas à 121°C, 1 atm de pressão e 15 min, com excessão da celulose microcristalina. A celulose passou por um pré-tratamento, para retirada de resíduos de açúcares simples, que consistiu de uma lavagem inicial com ácido clorídrico 1 mM, seguida por duas lavagens com água destilada e autoclavagem à 121°C, 1 atm de pressão e 20 minutos. Após à esterilização, a celulose foi novamente lavada com água destilada estéril e duas lavagens com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0.

#### *Tampão de equilíbrio e tampão de eluição*

Os tampões de equilíbrio e eluição foram utilizados para a cromatografia de afinidade. O tampão de equilíbrio foi constituído de 10 mM Tris-base, 50 mM fosfato de sódio, 100 mM cloreto de sódio, a pH 8.0. O tampão de eluição utilizado foi igual ao tampão de equilíbrio, com excessão da adição de imidazol de uma concentração de 5 a 250 mM.

#### *Solução de ácido-3,5-dinitrossalicílico (DNS)*

A solução de DNS foi empregada para a quantificação de açúcares redutores em solução. A solução de DNS foi constituída de 32,9 mM de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 350 mM de hidróxido de sódio, 76,6 mM de tartarato de sódio e potássio, 0,54% de fenol e 30 mM de metabissulfito de sódio em água destilada. A solução foi mantida em refrigeração e preservada de luz.

#### *Tampão de transferência*

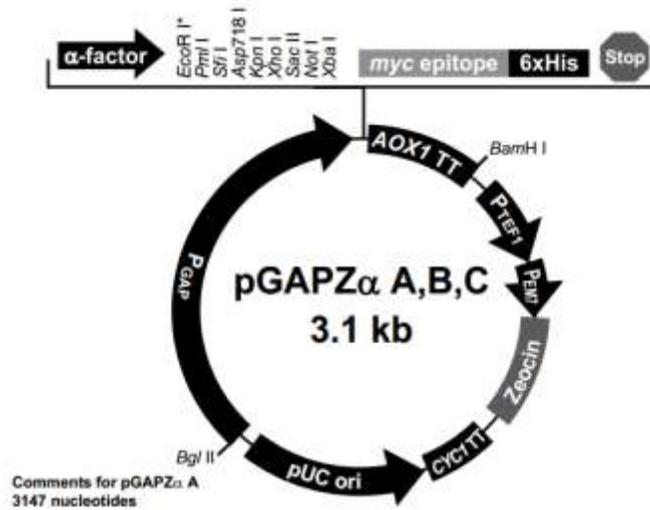
O tampão de transferência foi empregado para transferir as proteínas do SDS-PAGE para membrana de PVDF na análise de *Western Blot*. O tampão consistiu de 20 mM Tris base, 55 mM glicina e 16.5% (v/v) metanol em água destilada.

#### *Tampão salino tris-tamponado (TBS)*

O tampão TBS foi empregado nas soluções utilizadas na análise de *Western Blot*. O tampão consistiu de 50 mM Tris base e 150 mM cloreto de sódio em água destilada. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio.

## ANEXO II

### MAPA E CARACTERÍSTICAS DO VETOR PGAPZαA



**Figura 29.** Mapa geral do vetor pGAPZαA. PGAP, Promotor do gene da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH); 6xHis, Cauda de polihistidina; AOX1 TT, Terminador de transcrição do gene AOX1; Zeocin, Gene de resistência ao antibiótico zeocina.

```

481  TAT TTCGAAA CG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA
      BstBI          Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala

532  GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG
      Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr

      α-factor signal sequence

583  GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
      Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp

634  TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG
      Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

685  TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT
      Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser

736  CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTCAC GTGGCCCA GCCGGCCGTC TCGGATC
      Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala
      Xho I* Kex2 signal cleavage EcoR I Pml I Sfi I
      Ste13 signal cleavage Xba I myc epitope

793  GGTACCTCGA GCCGCGGCGG CCGCCAGCTT TCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
      Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

851  GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTTAGC CTTA
      Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***
  
```

**Figura 30.** Sequência do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vetor pGAPZαA. Caixa apresenta os sítios de restrição empregados no trabalho.

### ANEXO III

## SEQUÊNCIAS DE XILANASES DA FAMÍLIA GLICOSIL-HIDROLASE 10 UTILIZADAS PARA ALINHAMENTO GLOBAL

> EHK21815.1 - *Trichoderma virens* Gv29-8

MKANVIFCLLAPLVAALPTEFIQLEPNLAARRVNITERMADLEDRQASVSIQDLFKKKGVYFGTATDRG  
LLQREKNAAI IQANFGQVTPENSMKWQSLNPNQGQYNWADADYLVNFAQQNGKTIRGHTLVWHSQ LPSWV  
NNINNADTLRQVIRTHVLTVVGRYK GKIRAWDVVNEIFNEDGTLRSSFVSRLLGEEFVSI AFRAAREADP  
SCRLYINDYNLDRAGSSKVNLMRYVVDKWI SQGVPIDGIGTQTHLSAGGGASIQGALQQLATAPVTE LAI  
TELDIAGAPSN DYNNAVQGLSVAKCWGITVWGISDKDSWRQGTNPLLFDSNFNPKPAYNSIVSILQ

> ABY71931.1 - *Hypocrea pseudokoningii*

MKANVILCLLAPLIAALPTEPIPLDPELAALRANLTERTPDLWDRQAAQSIDQLIKRRGKLYFGTATDRG  
LLQREKNAAI IQADLGQVTPENSMKWQSLENNQGQYNWGDADYLVNFAQQNGKLIRGHTLIWHSQ LPAWV  
NNINNADTLRQVIRTHVSTVVGRYK GKIRAWDVVNEIFNEDGTLVFNEDGTLRSSFVSRLLGEEFVSI AF  
RAARDADPSARLYINDYNLDSATYKVNGLKSYVSKWISQGVPI D GIGSQSHLSPGGASGTLGALQQLAT  
VPVTEVAITELDIQGAPTNDYTQVVQACLNVSKCVGITVWGISDKDSWRASTNPLLFDSNFNPKPAYNSI  
VSILQ

> BAA89465.2 - *Hypocrea jecorina*

MKANVILCLLAPLVAALPTETIHLDPPELAALRANLTERTADLWDRQASQSIDQLIKRRGKLYFGTATDRG  
LLQREKNAAI IQADLGQVTPENSMKWQSLENNQGQLNWGDADYLVNFAQQNGKSIRGHTLIWHSQ LPAWV  
NNINNADTLRQVIRTHVSTVVGRYK GKIRAWDVVNEIFNEDGTLRSSFVSRLLGEEFVSI AFRAARDADP  
SARLYINDYNLDRANYKVNGLKTYVSKWISQGVPI D GIGSQSHLSSGGGSGTLGALQQLATVPVTE LAI  
TELDIQGAPTTDYTQVVQACLSVSKCVGITVWGISDKDSWRASTNPLLF DANFNPKPAYNSIVGILQ

> EGY23306.1 - *Verticillium dahliae* VdLs.17

MKLSQAHLALLLAPLA AVASPVPEAASHVEPRQAATSIDKLFKAKGKLYIGVATDRG L LQTGKNAAI IQQ  
DFGQVTPENSMKWDAL E P SRGSFSFAGADFLVDWAQTNSKSI R GHTLVWHSQ L P Q W V K D I K D R D D L T T V I  
ENHVKTIVTRYK GKIRAWDVVNEIFNEDGTMRSSVFS D V L G E D F V G I A F R A A R A A D P N A K L Y I N D Y N L D R  
ANYKVNGLVSKVNKWITAGVPIDGIGSQTHLDAGAAGNIKGV L Q Q L A S T Q V S E V A I T E L D I K M A P A A D F  
ATVVGACLDVPCKGITVWGVSDKDSWRKGANPLLF D G D Y N P K A A Y T A I V T K L S

> EFQ33770.1 - *Glomerella graminicola* M1.001

MKFMSLVCLLAPITVLAAPLEGGLEQRQAAQSVDRLIKAKGKLYFGTCS D Q G R L T S G K N A A I I N A D F G Q  
LTPENSMKWQIQPNNGQFNWAGADYLVNFAQQNGKLVRGHTLVWHSQ LASVYQNI RDKATLTKTIQDHI  
SAVVGRYK GKIYAWDVVNEIFDESGNLRSSFVFSQVLGEDFVGIAFRAARAADPNKLYINDYNLDQASYA  
KTQAMARKVKQWIGQGIPI D G I G S Q A H L Q A N Q G G N A L G A L Q T L A G S V K E V A I T E L D I V G A S S N D Y S A V T  
RACLQVPQCVGITVWGV R D P D S W R A Q N N P L L F D A N W N P K A A Y N A V V S A L Q

> XP\_363616.1 - *Magnaporthe oryzae* 70-15

MKASSVLLGLAPLAALAPTPEAELSARQAQSIDALMKAKGKLYFGTATDQGLLNTGKNSAI IKADFGQ  
VTPENSMKWQSL ENTRGQYNWAPADALVNFAVSNNKSI R GHTLIWHSQ L P G W V N N I N D R N Q L T T V I Q N H V  
ATVMGRWK GKIRAWDVVNEIFNEDGTMRSVFSRVLGEDFVRI AF EAARKADPNKLYINDYNLDS P N A A  
KLTKGMVAHVKKWLAAGVPIDGIGSQGHLQSGQGNGLAQAIKALADSGVKEVAVTELDIQGNNANDYAAV  
TKGCLAVPACVGITAWGVRDND SWRPQGNPLLFDSNYNPKAAYNSVVQALK

> BAG12101.1 - *Penicillium citrinum*

MVQIKTAALALFAGQVLSTPLEPRQASVSI DAKFKAHGKKYFGNIGE QYTFNRNAKTPAI IKADFGQLT  
PENSMKWDATEPNQGQFSFSGSDYLVNFAQSNGKLIRGHTLVWHSQ L P S W V S S I S D K N T L I N V M K N H I T T

VMNRYKGIYAWDVVNEIFNEDGSLRDSVFSRVIGEDFVRIAFETARAADPNKLYINDYNLDSASYSKV  
NGMVSHVKKWIAAGIPIDGIGSQTHLGAGAGSAVSGALNALASAGTKEVAITELDIAGASSTDYVNVVNA  
CLNQPKCVGITVWGVADPDSWRASSNPLLF DGNYNPKAAYNAIANAL

> Q4JHP5.1 - *Aspergillus terreus*

MVRLTVLAGFLLTSAACSACVIGERQAASSINNAFKAKGKKYFGTCGDQGTLS DSTNSAIVKADFGQLTP  
ENSMKWDATEPNRGQFSFGGADYLVNYAASNGKMIRGHTLVWHSQLPGWVQGITDKNTLTSVLKNHITTV  
MQRKYGKVIYAWDVVNEIFNEDGSLRKS VFYNVLGEDFVRIAFETARSVDPQAKLYINDYNL DNANYAKTK  
GMADHVRKWISQGIPIIDGIGSQTHLGSGGSWTVKDALNTLASSGVSEVAITELDIAGASSTDYVNVVNA  
LSVSKCVGITVWGVSDKYSWRSNDKPLLFDSNFQPKAAYNAIISAL

> AAF24127.1 - *Thermoascus aurantiacus*

MVRPTILLTSLLLAPFAAASPILEERQAAQSVDQLIKARGKVYFGVATDQNRLLTGKNAAI IQADFGQVT  
PENSMKWDATEPSQGNFNFA GADYLVNWAQQNGKLIRGHTLVWHSQLPSWVSSITDKNTLTNVMKNHITT  
LMTRYKGIKIRAWDVVNEAFNEDGSLRQTVFLNVI GEDYIPIAFQTARAADPNKLYINDYNLDSASYPKT  
QAIVNRVKQWRAAGVPIDGIGSQTHLSAGQGASVLQALPLLASAGTPEVAITELDVAGASSTDYVNVVNA  
CLNVQSCVGITVWGVADPDSWRASTTPLLF DGNFNPKPAYNAIVQDLQQ