

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular  
Departamento de Genética e Evolução  
Laboratório de Biologia Molecular

RAFAELA FRANCINI CORRÊA

**“PRODUÇÃO RECOMBINANTE E  
CARACTERIZAÇÃO DA ENDOGLUCANASE  
IV De *Trichoderma harzianum*”**

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

SÃO CARLOS – SP  
2014

RAFAELA FRANCINI CORRÊA

**“PRODUÇÃO RECOMBINANTE E  
CARACTERIZAÇÃO DA ENDOGLUCANASE  
IV 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 – SP

2014

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

C824pr      Corrêa, Rafaela Francini.  
Produção recombinante e caracterização da  
endoglucanase IV de *Trichoderma harzianum* / Rafaela  
Francini Corrêa. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
46 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2014.

1. Genética. 2. Etanol. 3. *Trichoderma harzianum*. 4.  
Celulase. 5. Endoglucanase IV. I. Título.

CDD: 575.1 (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

“PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DA  
ENDOGLUCANASE IV De *Trichoderma harzianum*”

Dissertação de Mestrado de

**RAFAELA FRANCINI CORRÊA**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva



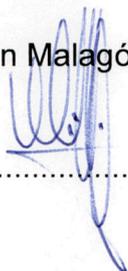
.....

Profa. Dra. Daniela Morilha Néó Justino



.....

Dr. Wilson Malagó Junior



.....

*“Valeu a pena?  
Tudo vale a pena se a alma não é pequena!”  
(Fernando Pessoa)*

À minha família,  
Em especial meu pai Aparecido, meu herói, meu guerreiro,

Com Carinho, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por manter minha fé e me amparar nos momentos de dificuldade;

À minha família, pelo apoio, carinho e incentivo;

Ao meu pai Aparecido, pelo amor e incentivo mesmo diante das dificuldades;

Ao professor Flávio, pela oportunidade e pelos ensinamentos;

Ao Msc. Wesley Cardoso Generoso, pela contribuição fundamental no desenvolvimento do sistema de expressão em *Pichia pastoris*;

À Msc. Adelita Carolina Santiago, pelas dicas no desenvolvimento do trabalho;

Ao professor Igor Polikarpov, do Instituto de Física da USP de São Carlos, pela colaboração;

Ao Dr. Marco Antônio Seiki Kadowaki, do Instituto de Física da USP de São Carlos, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Dr. Roberto Ruller, pela colaboração e contribuição fundamental no desenvolvimento de ensaios de atividade e realização do CD;

À Dr. Carla Botelho Machado, pela contribuição fundamental no desenvolvimento de ensaios de atividade e realização do CD;

Às amigas Taíse, Vanessa, Marina, Andressa, Karina e Vanessa Schneider, pela amizade dentro e fora do ambiente acadêmico, por toda ajuda e por todas as risadas;

À todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, pela convivência;

À Ivanildes, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Genética Evolutiva (PPGGEv), pela dedicação e por sempre estar disposta à ajudar;

À todos os professores PPGGEv, pelo conhecimento transmitido;

À todos os colegas do Departamento de Genética e Evolução (DGE), pela convivência;

Ao PPGGEv, pela oportunidade;

À CAPES, pela concessão da bolsa;

E à todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A atual situação do cenário energético e ambiental do mundo tem favorecido o desenvolvimento de fontes alternativas de energia, e como opção tem surgido a utilização de biocombustíveis, como o bioetanol. Além do etanol produzido a partir do caldo de cana, há a alternativa de utilizar a biomassa vegetal para obter o chamado etanol de segunda geração. No Brasil o principal material lignocelulósico utilizado para produção de bioetanol é o bagaço de cana-de-açúcar, e este etanol é obtido por meio da fermentação do hidrolisado dos polissacarídeos da parede celular dos vegetais, sendo esta hidrólise, realizada, normalmente, por enzimas celulolíticas. Microrganismos, como os fungos do gênero *Trichoderma*, que são fungos filamentosos presentes no solo, possuem uma variedade dessas enzimas capazes de converter a celulose em glicose. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi a produção recombinante da enzima endoglucanase IV de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 e sua caracterização bioquímica. Esta Endo IV, que apresenta alta similaridade com as Endo IV de outras espécies de *Trichoderma*, foi expressa utilizando-se o sistema de expressão heteróloga da levedura *Pichia pastoris* e, após ser purificada, foram realizados ensaios para testar sua atividade. A enzima recombinante não demonstrou sinal de degradação em nenhum dos substratos utilizados, não podendo ser comprovada sua ação hidrolítica. Porém, na literatura consta que essas enzimas têm a capacidade de aumentar a quebra de lignocelulose por celulases (ou uma mistura delas). Com base nesses dados, um teste foi realizado para avaliar a capacidade da endo IV de suplementar a atividade do coquetel Acellerase 1500 (Genencor) na hidrólise de biomassa. No experimento, foi adicionado cobre como doador de elétrons e apesar do aumento na hidrólise do bagaço-de-cana os resultados mostraram que o cobre sozinho melhora a performance do coquetel. Uma análise de dicroísmo circular foi realizada e revelou que a Endo IV recombinante se encontra corretamente enovelada. O estudo mostrou que a enzima produzida em laboratório possui alto nível de expressão, porém sua atividade não pôde ser constatada. Pretende-se agora realizar testes com coquetéis que não contêm expansinas e com enzimas isoladas, a fim de verificar se a Endo IV possui efeito sobre elas.

Palavras-chave: Etanol, *Trichoderma harzianum*, celulase, Endoglucanase IV

## ABSTRACT

The present situation of energy and environmental setting in the world has favored the development of alternative energy sources, and has emerged as an option the use of biofuels, such as bioethanol. Besides ethanol produced from sugarcane, there is the alternative of to use plant biomass to get called second-generation ethanol. In Brazil, the major lignocellulosic material used to produce bioethanol is sugarcane bagasse, and this ethanol is obtained by fermentation of the hydrolyzate of the plant cell wall polysaccharides, this hydrolysis is performed normally by enzymes cellulolytic. Microorganisms, such as fungi of the genus *Trichoderma*, which are filamentous fungi present in the soil, have a variety of these enzymes that convert cellulose into glucose. In this context, the aim of this study was the recombinant production of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 endoglucanase IV and its biochemical characterization. This Endo IV, which presents high similarity with Endo IV of other *Thichoderma* species, was expressed using the heterologous expression system of the yeast *Pichia pastoris*, and after be purified, assays were performed to test their activity. The recombinant enzyme hasn't show sign of degradation in any of the substrates used and can't be confirmed its hydrolytic action. However, the literature has been showed that these enzymes have capacity to increase the breaking of lignocellulose by cellulases (or a mix of them). Based on these data, a test was performed to evaluate the ability of endo IV supplemental activity in the cocktail Acellerase 1500 (Genencor) in the hydrolysis of biomass. In the experiment, copper was added as an electron donor and despite the increase in the hydrolysis of sugarcane bagasse the results showed that copper alone improves the cocktail performance. A circular dichroism analysis was performed and showed that the recombinant Endo IV is correctly coiled. The study showed that the enzyme produced at the laboratory has a high level of expression, but its activity couldn't be detected. The intention now is to perform tests with cocktails that don't contain expansins and isolated enzymes in order to verify that the Endo IV has effect upon them.

Keywords: Ethanol, *Trichoderma harzianum*, cellulase, Endoglucanase IV

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Esquema da associação entre os polissacarídeos que formam a parede celular vegetal. (Fonte: FERREIRA, V. 2010).....	17
Figura 2. Esquema de como as enzimas do complexo celulolítico agem nas moléculas de celulose (Fonte: OGEDA, PETRI, 2010).....	19
Figura 3. Mapa do vetor de expressão pGAPZ $\alpha$ A, B, C ( Invitrogen).....	23
Figura 4. ORF da Endo IV .....	28
Figura 5. Alinhamento da Endo IV de <i>Trichoderma harzianum</i> com a Endo IV de <i>Trichoderma reesei</i> (Clustal).....	29
Figura 6. Amplificação da ORF da Endo IV.....	30
Figura 7. Sequência nucléica da Endo IV.....	31
Figura 8. Sequência de aminoácidos da Endo IV.....	31
Figura 9. PCR de colônia dos transformantes em <i>E. coli</i> com pGAPZ $\alpha$ A.....	32
Figura 10. Screening dos clones positivos transformados em <i>P. pastoris</i> .....	33
Figura 11. SDS-PAGE do sobrenadante das horas de indução da Endo IV recombinante.....	34
Figura 12. Análise da sequência da Endo IV recombinante no programa NetOGlyc.....	35
Figura 13. SDS-PAGE da purificação da Endo IV com diferentes concentrações de imidazol.....	36

Figura 14. Teste qualitativo de atividade da Endo IV em placa de CMC.....	37
Figura 15. Açúcares redutores liberados a partir dos polissacarídeos de bagaço tratado com ácido fosfórico (BASC).....	38
Figura 16. Espectro de dicroísmo circular (CD) realizado com Endo IV pura (GH61) e Endo IV + cobre (GH61+Cu <sup>+2</sup> ).....	40

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Deconvolução realizada no programa Dichroweb-K2d web-interface com a Endo IV e com a Endo IV + Cu <sup>+2</sup> .....	40
---	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

°C	Graus Celsius
Avicel	Celulose microcristalina
CBD	Módulo de Ligação à Celulose (celulose-binding module)
CD	Dicroísmo Circular
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
Cu <sup>+2</sup>	Cobre
DNA	Ácido dinitrossalicílico
Endo III	Endoglucanase III
Endo IV	Endoglucanase IV
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
GH	Glicosil-hidrolase
GH61	Glicosil-hidrolase da família 61 (Endo IV)
kDa	Kilodalton
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
ORF	Fase aberta de leitura (Open Reading Frame)
pb	Pares de base
pI	Ponto isoelétrico
rpm	Rotação por minuto
s	segundo
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Etanol de segunda geração.....	15
1.2 Parede celular vegetal.....	16
1.3 Enzimas hidrolíticas.....	18
1.4 <i>Trichoderma harzianum</i> e Endoglucanase IV.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	22
3.1 Clonagem e expressão da Endoglucanase recombinante.....	22
3.1.1 Obtenção dos clones, caracterização bioinformática e construção do plasmídeo.....	22
3.1.2 Transformação em <i>Pichia pastoris</i> .....	24
3.1.3 Expressão e purificação da enzima recombinante.....	24
3.2 Ensaio de atividade enzimática da Endo IV.....	25
3.2.1 Testes qualitativos de atividade.....	25
3.2.2 Ensaio bioquímico.....	25
3.2.3. Endoglucanase IV + Coquetel Acellerase 1500 (Genencor).....	26
3.3 Caracterização biofísica: Dicroísmo Circular.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1 Caracterização da Endo IV e clonagem da região codificadora.....	28
4.2 Expressão e purificação da Endo IV recombinante.....	31
4.3 Análise da atividade hidrolítica da Endo IV recombinante.....	36

4.4 Análise do Dicroísmo Circular.....	39
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>42</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Etanol de segunda geração

A atual situação do cenário energético e ambiental do mundo tem favorecido o desenvolvimento de fontes alternativas de energia, em especial para substituir a utilização de combustíveis fósseis, principalmente o petróleo. Como opção para esse problema tem surgido a utilização de biocombustíveis. (CARVALHO, 2008). A utilização de biocombustíveis é uma forma muito efetiva para reduzir as emissões de gases de efeito estufa em associação ao consumo energético no setor de transporte (MACEDO, 2007). Exemplos de biocombustíveis são o biodiesel e o etanol.

O etanol pode ser obtido de várias matérias primas, como o açúcar da cana-de-açúcar, celulose e resíduos de produção agrícola (SANTOS & GOUVEIA, 2009). Tradicionalmente, a produção de etanol se dá por meio da fermentação da sacarose presente em produtos vegetais (cereais, beterraba, cana-de-açúcar), o qual é chamado de etanol de primeira geração. A produção de etanol de segunda geração, a partir dos polissacarídeos da parede celular vegetal, o qual é obtido por meio da hidrólise química ou enzimática desta parede, tem se mostrado uma boa alternativa para suprir a demanda por biocombustíveis (BALAT & BALAT, 2009; BASTOS, 2007; BUCKERIDGE et al, 2007; MAICHE & HUBER, 2010).

O novo conceito de etanol, ou bioetanol, se refere à sua produção a partir de materiais lignocelulósicos, que são provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais, como sabugo e palha de milho, bagaço, pontas e palhas de cana-de-açúcar (BASTOS, 2007). Material celulósico ou lignocelulósico é um termo usado para indicar os principais componentes da maioria dos vegetais, que são a celulose, a hemicelulose e a lignina (OGEDA & PETRI, 2010).

O principal material lignocelulósico ou biomassa, utilizado para produção de bioetanol é o bagaço de cana-de-açúcar (SANTOS & GOUVEIA, 2009). Mas outras fontes também são utilizadas, como sementes (cevada, aveia, arroz, trigo, sorgo), beterraba e outras fontes de celulose (CARVALHO, 2008). No Brasil, o etanol é produzido em maior escala, a partir da cana-de-açúcar, desde 1975, devido ao incentivo do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) (LUZ JR. et al. 2009).

A produção de bioetanol a partir de biomassa ainda apresenta um desenvolvimento insatisfatório no mundo (SERVICE, 2010). Os maiores desafios para concretizar os benefícios do etanol celulósico são desenvolver políticas para acelerar sua comercialização e aumentar o conhecimento sobre sistemas de conversão celulósica a fim de identificar oportunidades para avanços em tecnologias visando à redução de custos para a produção (WYMAN, 2007).

O Brasil possui condições para assumir a liderança mundial no aproveitamento total da biomassa por possuir grande disponibilidade de matérias-primas renováveis oriundas de culturas agrícolas em grande extensão, destacando-se a indústria de cana de açúcar. Além disso, possui condições climáticas favoráveis, abundância de recursos hídricos e vasta experiência na produção de etanol (PEREIRA, COUTO, ANNA, 2008).

A principal vantagem da produção de bioetanol no Brasil é que tal produção se dá a partir do bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo que normalmente é rejeitado e pode causar problemas ambientais. Desta forma, seu uso também evita problemas com a produção de alimentos. Porém, apesar da hidrólise química do bagaço de cana-de-açúcar ser uma metodologia consolidada em condições de laboratório, sua aplicação em grande escala é ainda economicamente inviável no Brasil (SOCCOL et al., 2010).

## **1.2 Parede celular vegetal**

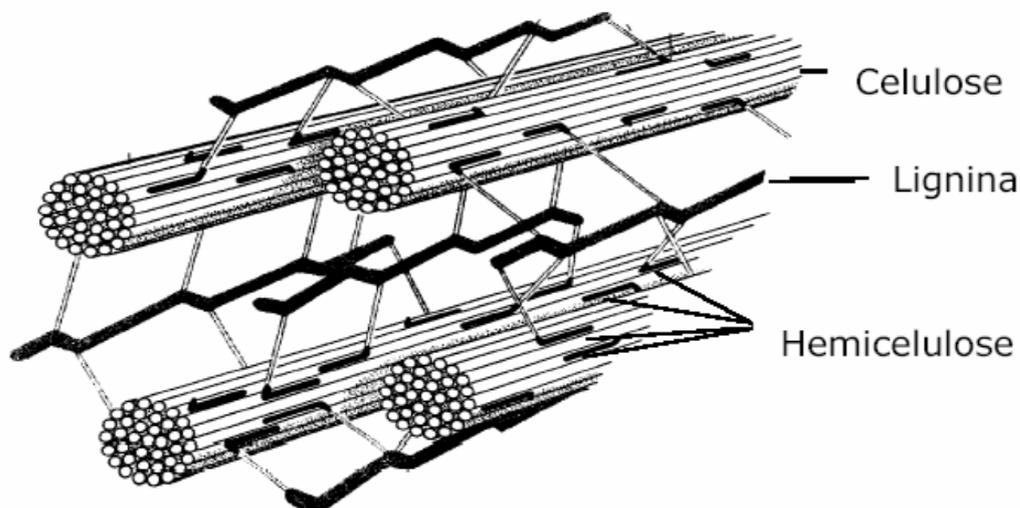
Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera. A vantagem de utilizá-los como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, além da sua grande abundância, é o fato de que não servem como alimento para a grande maioria dos animais e humanos, como serve, por exemplo, o amido. Esses materiais formam a parede celular vegetal, composta por estruturas fibrosas constituídas por polissacarídeos (celulose, hemicelulose), lignina e também por algumas substâncias pécnicas e algumas proteínas estruturais. O polissacarídeo mais abundante na parede é a celulose (40,6 – 51,2%), a segunda maior fração corresponde às hemiceluloses (28,5 – 37,2%) e a lignina representa uma porcentagem inferior (13,6 – 28,1). (PAULY & KEEGSTR, 2008; PEREIRA, COUTO, ANNA, 2008).

Apesar de ocorrer diferenças na composição e estrutura das paredes celulares em diferentes grupos de plantas, em todos, o principal polissacarídeo é a celulose, constituída por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura

linear e cristalina. Celobiose, um dissacarídeo, é a unidade repetitiva da cadeia. Cerca de 30 moléculas de celulose se unem por ligações de hidrogênio, inter e intra-cadeias, para formar as fibrilas elementares, que são montadas em unidades maiores chamadas microfibrilas, que juntas formam fibras de celulose. As ligações de hidrogênio individualmente são fracas, porém juntas resultam em uma grande força de ligação, dando à celulose alta resistência à hidrólise. A celulose é comumente encontrada associada à hemicelulose e à lignina e sua principal função é garantir a rigidez da parede celular da planta (Figura 1) (LYND et al. 2002; PEREIRA, COUTO, ANNA, 2008; VRIES & VISSER, 2001).

A hemicelulose, que está intimamente associada à celulose, é um polissacarídeo mais heterogêneo e é a segunda estrutura orgânica mais abundante na parede celular. É constituída basicamente por monômeros de D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, D-ácido glucorônico e acetatos, sendo que seu principal polímero é o xilano. Ao contrário da celulose, essas macromoléculas apresentam considerável grau de ramificações e, conseqüentemente, não apresentam regiões cristalinas. Juntamente com a lignina e os polissacarídeos pécicos, interagem com as fibrilas de celulose e criam uma estrutura rígida, fortalecendo a parede celular. (PEREIRA, COUTO, ANNA, 2008; VRIES, VISSER, 2001).

A lignina é um composto fenólico com uma estrutura altamente complexa, sendo também responsável pela rigidez da parede celular e importante para suporte mecânico, transporte de água e possui importante função na defesa da planta, pois devido à alta complexidade e insolubilidade de seu polímero, a planta se torna resistente à degradação por muitos microrganismos. (CAMPBELL & SEDEROFF, 1996).



**Figura 1. Esquema da associação entre os polissacarídeos que formam a parede celular vegetal.** (Fonte: FERREIRA, V. 2010).

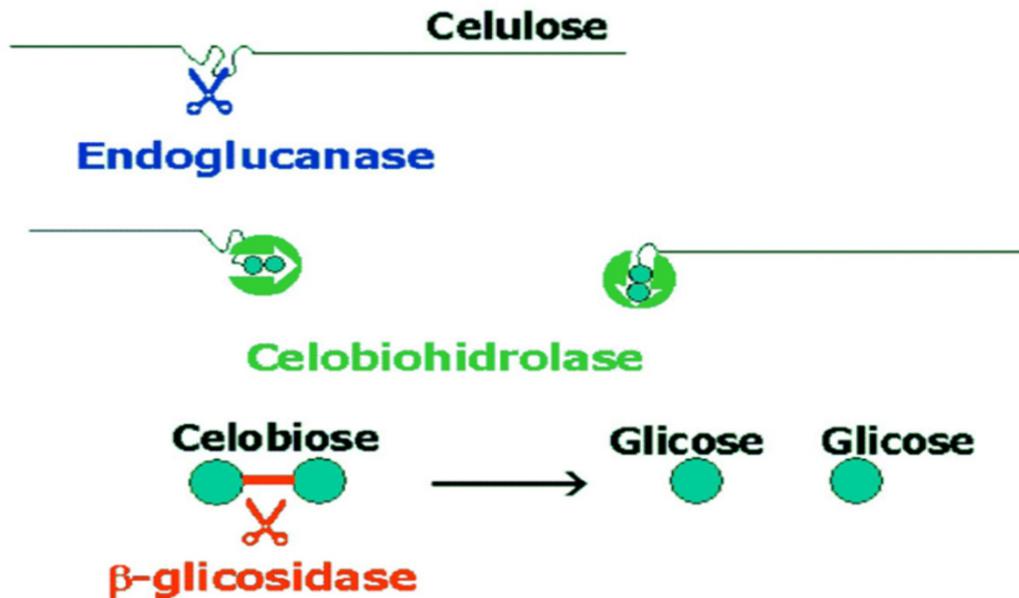
### **1.3 Enzimas hidrolíticas**

A hidrólise faz parte do processo de obtenção de bioetanol e o conhecimento de como ela ocorre e de como funcionam as celulases se faz importante (DE PAULA et al. 2009). Existem dois tipos de hidrólise, a ácida e a enzimática. A hidrólise ácida consiste na conversão de celulose e hemicelulose a açúcares simples utilizando uma solução ácida (diluída ou concentrada). Já na hidrólise enzimática tal conversão se dá por um conjunto de enzimas. Estudos indicam que a hidrólise enzimática é melhor e bastante adequada, visto que há uma menor produção de toxinas (LORA et al. 2008).

A utilização da maquinaria bioquímica de microrganismos, como fungos e bactérias, para desmontar a parede celular vegetal, apresenta grandes expectativas para a produção de etanol em grande escala. Fungos, como aqueles dos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*, são capazes de produzir grandes quantidades de glicosidades, celulases, proteases e outras hidrolases, e a produção de enzimas hidrolíticas é a “chave” para o sucesso da produção de bioetanol por rotas bioquímicas (BUCKERIDGE et al. 2007; MAICHE, HUBER, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas celulases, que formam complexos enzimáticos e possuem grande especificidade. As enzimas destes complexos estão subdivididas em três grupos: endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou endoglucanases, que quebram ligações glicosídicas das moléculas de celulose, exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou celobio-hidrolases, que extraem as unidades de celobiose dos terminais da cadeia de celulose, e 1,4- $\beta$ -D-glicosidases, que hidrolisam a celobiose em unidades de glicose (SANTOS & GOUVEIA, 2009; OGEDA & PETRI, 2010).

As celulases trabalham de maneira coletiva e coordenada para que a hidrólise da celulose seja eficiente, esquematizada na figura 2. A atividade sinérgica das celulases é muito mais eficiente do que a atividade individual de cada uma (DIN et al., 1994).



**Figura 2.** Esquema de como as enzimas do complexo celulolítico agem nas moléculas de celulose. Endoglucanases quebram ligações glicosídicas das moléculas de celulose, celobiohidrolases extraem as unidades de celobiose dos terminais da cadeia de celulose, e  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose em unidades de glicose (Fonte: OGEDA & PETRI, 2010).

#### 1.4 *Trichoderma harzianum* e Endoglucanase IV

As celulases são representadas por grupos de enzimas que podem ser utilizadas em vários processos biotecnológicos, como produção de etanol combustível. Celulases fúngicas são produzidas em larga escala e agem em conjunto para a hidrólise completa da celulose (DAS, BENERJEE, BAL, 2008; LIU et al. 2010).

Microrganismos celulolíticos, como os do gênero *Trichoderma*, possuem uma variedade de enzimas celulolíticas capazes de converter a celulose em glicose (KLEMAN-LEYER, 1996).

*Thichoderma* spp são fungos filamentosos presentes no solo e que podem ser usados como agentes de controle biológico, e sua eficácia e tal função é atribuída a sua capacidade de secreção de enzimas que conseguem degradar a parede celular dos vegetais (LIU et al. 2010).

Pela grande produção enzimática dos fungos da espécie *Trichoderma* ocorrer extracelularmente e por serem considerados de fácil cultivo e não patogênicos, eles podem ser utilizados facilmente em processos industriais (KAR et al. 2006).

Devido à esta capacidade, *Trichoderma harzianum* e outras espécies, principalmente *Trichoderma reesei*, são considerados os mais promissores produtores de enzimas celulolíticas, como  $\beta$ -1,4-glucanases, quitinases,  $\beta$ -1, 3 glucanases,  $\beta$ -1, 6 glucanases, proteases e xilanases (CASSIOLATO & MELO 1999).

Existem 126 famílias das glicosil-hidrolases de acordo com a classificação disponível no CAZy (Carbohydrate - Active Enzymes - <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>).

A endoglucanase IV pertence à família 61 das glicosil-hidrolases. É conhecida também como Cel61A e é uma das enzimas que fazem parte do complexo celulolítico que cliva as cadeias de celulose. Esta enzima possui um domínio de ligação à celulose (CBM), uma região “linker” e um domínio catalítico, sendo que o CBM foi identificado por sua homologia com o CBMs de outras celulasas (KARLSSON et al. 2001). Porém, a atividade e função de Cel61A ainda não foram determinadas, pois, apesar de apresentar atividade endoglucanase, tal atividade é bem menor do que em outras endoglucanases, como por exemplo na endoglucanase I (LIU et al. 2006).

De acordo com informações contidas no CAZy mesmo a atividade da endo IV sendo fraca, ela é mantida na classificação como sendo da família 61 devido à sua capacidade de aumentar a quebra de lignocelulose quando utilizada em conjunto com uma outra celulase ou uma mistura de celulasas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Produção recombinante da enzima endoglucanase IV de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 e sua caracterização bioquímica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar do clone identificado na biblioteca de cDNA de *Trichoderma harzianum* IOC-3844 já existente no Laboratório de Biologia Molecular e realizar de análises bioinformáticas para comparação com endoglucanases já descritas;
- Clonar da fase aberta de leitura (ORF) em vetor para expressão em *Pichia pastoris*;
- Isolar de transformantes hiperprodutores da enzima recombinante;
- Purificar da enzima;
- Realizar de testes bioquímicos para caracterização da atividade enzimática.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Clonagem e expressão da Endoglucanase recombinante

##### 3.1.1 Obtenção dos clones, caracterização bioinformática e construção do plasmídeo.

A região codificadora da Endo IV foi obtida da biblioteca cDNA do fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* IOC-3844 já existente no Laboratório de Biologia Molecular (MALAGÓ-JR, 2012).

O crescimento do clone foi feito em 10 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB), com 25 µg/mL kanamicina, com agitação de 250 RPM a 37°C por 16h. Após o crescimento, foram reservados 500 µL do inóculo, para manutenção em glicerol 15% em freezer -80°C, e com o restante foi realizado a extração do plasmídeo pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), segundo as instruções do fabricante.

Para o sequenciamento, as amostras foram preparadas utilizando-se o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare), seguindo as instruções do kit. As amostras foram sequenciadas no MegaBACE 1000 Flex (GE Healthcare) com os primers M13-Forward (TGTAACGACGGCCAGT) e M13-Reverse (AGCGGATAACAATTTTCACAC).

Utilizando a ferramenta para análise bioinformática ORF Finder (Open Reading Frame Finder) disponível no NCBI foi identificado a ORF do cDNA e utilizando alinhamento por BLAST, também no NCBI, foi realizada a comparação da Endo IV com endoglucanases já descritas.

A ORF de Endo IV foi clonada no vetor pGAPZαA – Invitrogen (Figura 3) e amplificada por PCR com os primers EGIV\_Th\_pGAP\_Fw: CCTTCGAAATGGCTCAAAGCTTTCC e EGIV\_Th\_pGAP\_Rv: CGTCTAGAAATCTGGAAACGCACTGAGC.

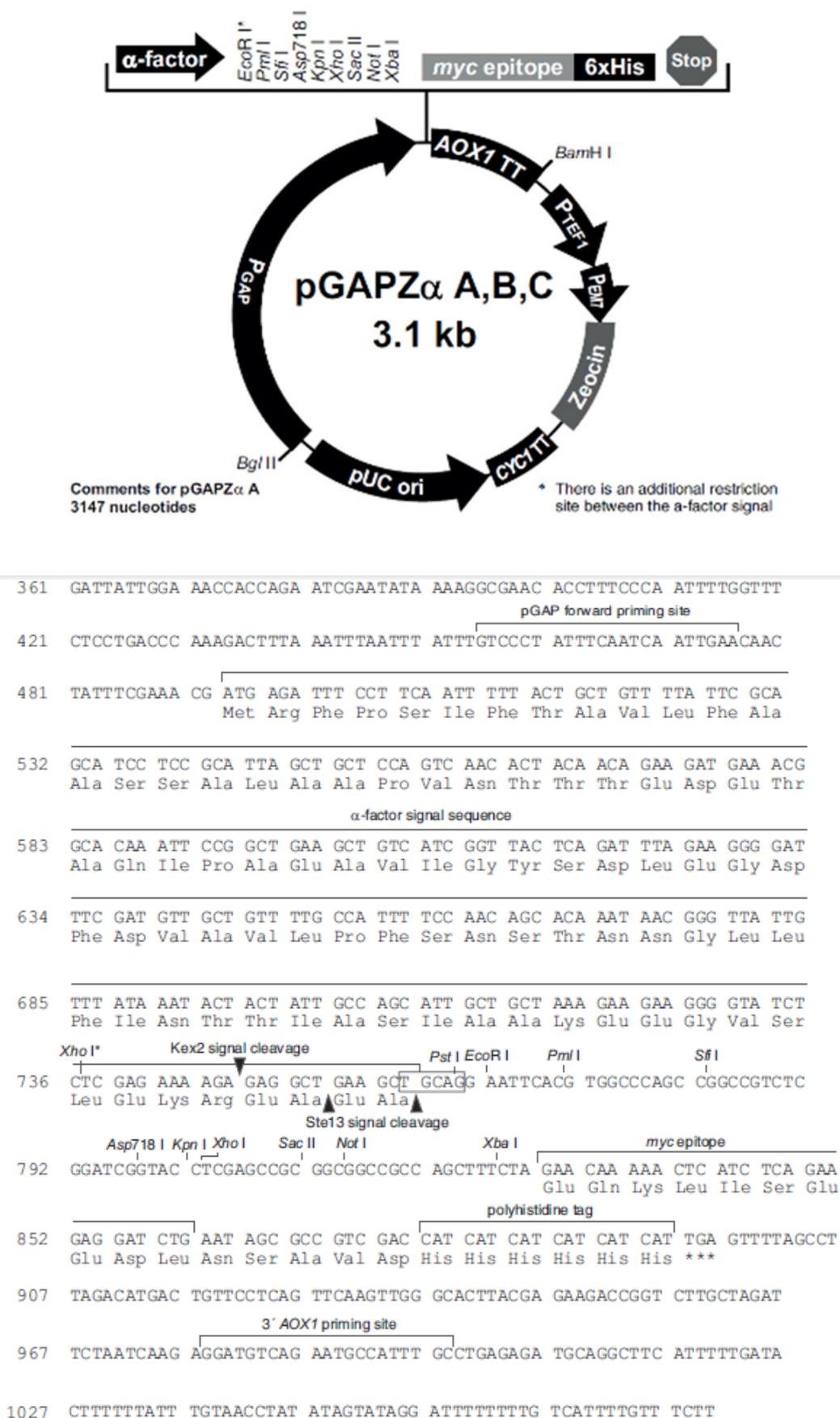


Figura 3. Mapa do vetor de expressão pGAPZαA, B, C (Invitrogen)

O amplicon e o vetor pGAPZ $\alpha$ A foram, ambos, restringidos com as enzimas BstBI e XbaI e foram ligados, originando o plasmídeo recombinante contendo o peptídeo sinal nativo da proteína e a cauda de poli-histidina.

### 3.1.2 Transformação em *Pichia pastoris*

A transformação foi realizada de acordo com recomendações do manual “pGAPZ A, B, and C pGAPZ $\alpha$  A, B, and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins” – Invitrogen.

Primeiramente, mistura de ligação foi transformada em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Os transformantes foram cultivados em placas com meio LB Low Salt contendo o antibiótico zeocina (25 $\mu$ g/ml) e os clones positivos foram identificados por PCR de colônia.

Os clones positivos foram linearizados com a enzima BspHI e transformados por eletroporação em células competentes de *Pichia pastoris* da linhagem KM71H. Para selecionar os recombinantes, foram utilizadas placas com meio YPD ágar contendo o antibiótico zeocina (25 $\mu$ g/ml) e realizado um screening dos clones positivos.

### 3.1.3 Expressão e purificação da enzima recombinante

O protocolo de indução também realizado conforme com recomendações do manual “pGAPZ A, B, and C pGAPZ $\alpha$  A, B, and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins” – Invitrogen.

As leveduras transformadas foram selecionadas em placa 24-well (24 poços), com adaptações ao descrito por Boettner et al (2002). Foi utilizado meio de extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) com glicose e tamponado com tampão fosfato K pH 6.0, para propagação celular e indução da proteína recombinante.

Inicialmente, uma pequena quantidade de massa celular (pega com a ponta do palito de dente) foi crescida em 3 mL do meio incubado a 30°C por 96h sob agitação constante de 250 rpm. A expressão dos clones foi analisada em SDS-PAGE 12% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

O clone que apresentou maior expressão da enzima foi induzido em 100 mL de meio YPD, nas mesmas condições anteriormente citadas. A cada 24 h foi retirada uma

amostra de 100  $\mu$ L da cultura em crescimento, para análise do sobrenadante também em SDS-PAGE 12%.

Identificado o tempo ideal para a indução, a endo IV foi induzida em 200 mL de meio YPD tamponado à 30°C e purificada por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de resina de níquel. Na coluna contendo 5 ml de resina, que havia sido mantida em etanol 20%, previamente lavada com 3 volumes de água destilada e equilibrada com 5 volumes de tampão de lise sem imidazol, foi vertido o sobrenadante da cultura de *Pichia pastoris* transformante e o eluato foi recolhido para análise. Posteriormente a coluna foi novamente lavada com 3 ml de tampão de lise sem imidazol e a proteína recombinante foi eluída da coluna com tampões com diferentes concentrações de imidazol (10 à 250mM). A concentração de proteína foi determinada com base na absorbância de UV à 562 nm, usando Pierce® BCA – Protein Assay Kit.

### **3.2 Ensaios de atividade enzimática da Endo IV**

#### **3.2.1 Testes qualitativos de atividade**

Primeiramente foi realizado um zimograma, com a adição de 1% de carboxi-metilcelulose (CMC) em SDS-PAGE. Para a análise, foram utilizados o sobrenadante do cultivo de Endo IV, a enzima purificada e a enzima Endoglucanase III (endo III) de *Trichoderma harzianum* (GENEROSO et. al. 2012), como controle positivo.

Em seguida, foi realizado o teste com placas de CMC (ágar, CMC e H<sub>2</sub>O). A placa de Petri foi dividida em quatro e aplicados o sobrenadante do cultivo de Endo IV, a enzima purificada, a enzima Endo III, como controle positivo, e o sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* KM71H, como controle negativo.

#### **3.2.2 Ensaios bioquímicos**

A atividade enzimática foi determinada pela formação de açúcares redutores, com o uso do reagente DNS, como proposto por Miller (1959), com modificações. A solução aquosa de DNS contém 7,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 14 g de hidróxido de sódio, 216,1g de tartarato de sódio e potássio, 5,4 mL de fenol e 5,8 g de metabissulfito de sódio em um litro.

Nas análises de açúcares redutores por DNS foram utilizados como substratos CMC, papel de filtro, pó de serra, Avicel e bagaço de cana-de-açúcar.

Para a quantificação do açúcar redutor, baseou-se na metodologia adotada por Ruller (2006). Inicialmente o substrato foi incubado à uma determinada temperatura, que variou de 37°C à 60°C, durante 10 minutos e, em seguida, foi adicionada a enzima. A reação foi incubada nas diferentes temperaturas com tempos de 15 minutos, 1 hora e 4 horas. Decorrido o tempo proposto, foram adicionados 100 µL da solução de DNS, as amostras foram fervidas por 5 minutos e resfriadas em gelo. As amostras foram diluídas em água destilada e leu-se a absorbância a um comprimento de onda de 540 nm.

As reações foram realizadas em triplicata e foi utilizada uma amostra sem a adição da enzima como controle negativo.

### **3.2.3. Endoglucanase IV + Coquetel Acellerase 1500 (Genencor)**

A fim de avaliar a capacidade da endo IV de suplementar a atividade do coquetel Acellerase 1500 (Genencor) na hidrólise de biomassa, foi realizado no Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em Campinas, um teste com 50 mg de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico (BASC), que foram pesados em microtubos de 2mL. O volume de reação de hidrólise foi de 1 mL composto por 500 µL tampão fosfato 100 mM pH 6,0, 10µL do coquetel acelerase, seguindo as recomendações do fabricante (200µL/ g biomassa), e enzimas na diluição 200ng. Após 24 horas de hidrólise à 50°C, a reação foi centrifugada por 10 min a 14 000 g e o sobrenadante foi apropriadamente diluído (1:10) para quantificação dos açúcares redutores pelo método de DNS.

### **3.3 Caracterização biofísica: Dicroísmo Circular**

Os experimentos de Dicroísmo Circular foram também realizados no CTBE. Para tais experimentos utilizou-se um espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco International Co. Ltd) equipado com uma unidade Peltier de controle de temperatura, usando intervalo de comprimento de onda entre 195-250 nm, em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, e o espectro dos solventes foram subtraídos em todos os experimentos para evitar efeitos de fundo.

Os espectros de CD foram a média de 8 acumulações, usando uma velocidade de escaneamento de 100 nmmin<sup>-1</sup>, largura de banda espectral de 1nm e tempo de resposta de 0.5 s. A concentração proteica foi de 0,18 mg/mL em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 50 mM e para estudar a interação entre o cobre e a proteína foi usado 500 µM de CuCl<sub>2</sub>.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da Endo IV e clonagem da região codificadora

Após sequenciamento no MegaBACE 1000 Flex (GE Healthcare), a sequência resultante foi analisada por ferramentas de bioinformática disponíveis no NCBI, um portal desenvolvido pela National Library of Medicine (NLM) e pelo National Institutes of Health (NIH) que contempla várias ferramentas de busca e possui dados textuais e referências em vários assuntos da área da saúde e ciências biológicas.

A análise da ORF (Open Reading Frame) na sequência da Endo IV, utilizando a ferramenta ORF Finder, demonstrou que ela contém 1047 pb, codificando uma proteína de 348 aminoácidos com aproximadamente 38 kDa, como é mostrado na figura 4.

```
TGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACA
AAAAAGTTGGATTTTTATTCCGTGCTATTTACAAACATGGCTCAAAGCTTTCCAACCTC
CTTGCCACCGCACTAACGGTAGCCACTGGCGTTGTTCGGACATGGACATGTCAACAACATT
ATCGTCAATGGGGTGTACTATCAGGGCTATGATCCGACATCATTTCCATACATGCCAAAC
CCGCCATTGTGATAGGCTGGACGGCTGCGGATCTTGACAATGGTTTTGTTGCACCTGAC
GCATATCAAGCCCCGATATCGTCTGCCACAAGAATGCTACCAATGCTAAGGGGCATGCA
TCTGTCAAGGCCGGAGATTCTATTCTACTCCAGTGGCTGCCGCTTCCGTGGCCACACCCA
GGCCCCATCGTCTGACTACTTAGCTAACTGCAACGGCGATTGCGAGACTGTGGATAAGACG
ACGCTTGAATTCCTCAAGATTGATGGCGTTGGTCTCATCAGCGGGGCGGACCCGGGCAAC
TGGGCCCAGAACGTGCTCGTTACCAACAACAATACCTGGgTTGTGCAGATCCCCAAGAT
CTACAGACGGGCAATTACGTGCTACGCCACGAGCTCATCGCCTTACACAGCTCTGGACAG
CCGGACGGCGCCAGAACTACCCCAGTGCTTCAACCTCGCCGTCACAGGCACTGGATCA
CTGCAGCCTACCGGCGTCTTAGCCACCGACCTTTACCACGAATCTGACCCTGGTATTCTC
GTCAACATCTACACCAGCTCTCTTGCCTATACCATGCCCGGTCCAGTTTGGTAGCAGGC
CTCCCTTCAAGTGTGCCCAGGGTAACTCCGCGGCAACGGCTACAAGCAGCGCCACCATT
CCTGGCGGTGGAGGTTTCATCAAGCAGCAGAGCTTCATCTGCATCTGCTACGAAAACCTCG
TCGGGGGCTACATCCAGGCCACCTCTTCTCTATTCGCACAACGTCTGCACCCGCTGGC
GGCCCAACTCAGACTTTATACGGCCAGTGCGGTGGCAGTGGCTACTCTGGCCCGACTATC
TGCGCCTCGCCCGCGTTTTGCACTACCTTGAATCCCTACTATGCTCAGTGCGTTTTCCAGA
TAGTCAAATGGCCGGTACATCTACGAAGACCCACGGAACCTCCATTAAAGA
```

**Figura 4. ORF da Endo IV.** A ORF, representada em vermelho, contém 1047 pb, codificando uma proteína de 348 aminoácidos, aproximadamente 38kDa (NCBI).

Por meio de uma comparação utilizando alinhamento por BLAST, no NCBI, a Endo IV de *Trichodema harzianum* apresentou 79% de identidade com a enzima

correspondente de *Trichoderma reesei* e com a da linhagem AS 3.3711 de *Hypocrea rufa*, 78% com a de *Trichoderma saturnisporum*, 75% com a da linhagem AS 3.3711 de *Trichoderma viride* e 82% com a da linhagem EU7-22 de *Hypocrea orientalis*. A figura 5 mostra o alinhamento da Endo IV de *Trichoderma harzianum* com a Endo IV de *Trichoderma reesei* realizado na ferramenta Clustal.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

EndoIVTr      MIQKLSNLLVITLAVATGVVGHGHINDIVINGVWYQAYDPTTFPYESNPPIVVGTAAADL 60
EndoIVTh      MAQKLSNLLATALTVATGVVGHGHVNNIIVNGVYYQGYDPTSFYMPNPPIVIGWTAADL 60
* *****.***:*****:*.:.***:*.***:***.*****:*****

EndoIVTr      DNGFVSPDAYQNPDIICHKNATNAKGHASVKAGDTILFQWVPVWPHPGPIVDYLANCNG 120
EndoIVTh      DNGFVAPDAYQGPDIVCHKNATNAKGHASVKAGDSILLQWLPLPWPHPGPIVDYLANCNG 120
*****.*****.***:*****:*****:*.:.***:*.***:*****:*****

EndoIVTr      DCETVDKTTLEFFKIDGVGLLSGGDPGTWASDVLIENNNTWVVKIPDNLAPGNYVLRHEI 180
EndoIVTh      DCETVDKTTLEFFKIDGVGLISGADPGNWAQNVLVINNTWVWQIPKDLQGTGNYVLRHEL 180
*****:*****:*.:.***:*.***:*.:.***:*.***:*****:*.:.***:*****:

EndoIVTr      IALHSAGQANGAQNYPQCFNIAVSGSGSLQPSGVLGTDLYHATDPGVLINIYTSPLNYII 240
EndoIVTh      IALHSSGQPDGAQNYPQCFNLAVTGTGSLQPTGVLATDLYHESDPGILVNIYTSLAYTM 240
*****:*.:.***:*****:*.:.***:*.***:*****:*.***:*****.***:*****.***:

EndoIVTr      PGPTVVSGLPTSVAQSSAATATASATVPGGGSGPSTRITTTARITQAS---SRPSSSTPP 297
EndoIVTh      PGPSLVAGLPSSVAQNSAATATSSATIPGGGSSSRASSASATKTSSGATSRPTSSSI 300
***:*.***:*****.*****:***:***:..:***:..:*.:.***:*****:

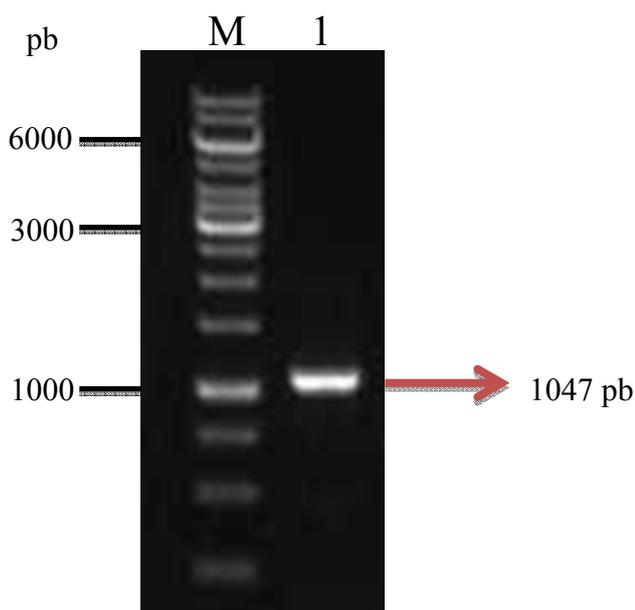
EndoIVTr      AITSAPAGGPTQTLYGQCGSGYSGPTRCAPPATCSTLNPYYAQCIN- 344
EndoIVTh      RITSAPAGGPTQTLYGQCGSGYSGPTICASPAVCTTLNPYYAQCVR 348
*****:*****.***:*.***:*****:

```

**Figura 5. Alinhamento da Endo IV de *Trichoderma harzianum* com a Endo IV de *Trichoderma reesei* (Clustal).** Onde \* representa combinações idênticas de aminoácidos; : e . representam combinações semelhantes e – representa gaps.

A ORF de Endo IV foi então clonada no vetor pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen). O vetor pGAPZ $\alpha$ A é chamado de bifuncional (shuttle vector), pois é utilizado para transformar tanto leveduras como bactérias. Possui o promotor do gene (GAP) que codifica a enzima GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) que é constitutivamente expressa em níveis elevados em muitos organismos, incluindo *Pichia pastoris*, além de um fator- $\alpha$  de secreção, sítios para várias enzimas de restrição e marca seletiva para o antibiótico zeocina, funcional em eucariotos e procariotos. Este vetor foi escolhido por apresentar um método mais rápido de expressão e por ser necessário somente um meio de cultura

simples para sua indução, não sendo preciso a adição de uma fonte indutora, como o metanol, adicionado quando são utilizados os vetores pPIC. A amplificação da ORF foi feita através de PCR, utilizando os primers EGIV\_Th\_pGAP\_Fw: CCTTCGAAATGGCTCAAAGCTTTCC e EGIV\_Th\_pGAP\_Rv: CGTCTAGAAATCTGGAAACGCACTGAGC (Figura 6). O amplicon e o vetor pGAPZ $\alpha$ A foram restringidos com as enzimas BstBI e XbaI e foram ligados, originando o plasmídeo recombinante.



**Figura 6. Amplificação da ORF da Endo IV.** M- Marcador; 1- ORF amplificada, apresentando 1047 pb.

A estratégia adotada para a construção do plasmídeo foi bem sucedida e resultou na construção de uma proteína recombinante cuja sequência codificadora de nucleotídeos é mostrada na figura 7 e a de aminoácidos na figura 8. Na construção, a sequência total da Endo IV possui 1116 pb, contendo o peptídeo sinal nativo da proteína e a cauda de poli-histidina. A proteína a ser secretada possui 371 aminoácidos, massa molecular teórica de 38572.9 Daltons e pI igual a 5.69.

ATGGCTCAAAGCTTTCCAACCTCCTTGCCACCGCACTAACGGTAGCCACTGGCGTTGTC  
 GGACATGGACATGTCAACAACATTATCGTCAATGGGGTGTACTATCAGGGCTATGATCCG  
 ACATCATTTCCATACATGCCAAACCCGCCATTGTGATAGGCTGGACGGCTGCGGATCTT  
 GACAATGGTTTTGTTGCACCTGACGCATATCAAGCCCCGATATCGTCTGCCACAAGAAT

GCTACCAATGCTAAGGGGCATGCATCTGTCAAGGCCGGAGATTCTATTCTACTCCAGTGG  
 CTGCCGCTTCCGTGGCCACACCCAGGCCCCATCGTCGACTACTTAGCTAACTGCAACGGC  
 GATTGCGAGACTGTGGATAAGACGACGCTTGAATTCTTCAAGATTGATGGCGTTGGTCTC  
 ATCAGCGGGGCGGACCCGGGCAACTGGGCCAGAACGTGCTCGTTACCAACAACAATACC  
 TGGgTTGTGCAGATCCCCAAAGATCTACAGACGGGCAATTACGTGCTACGCCACGAGCTC  
 ATCGCCTTACACAGCTCTGGACAGCCGGACGGCGCCAGAACTACCCCAGTGCTTCAAC  
 CTCGCCGTACAGGCACTGGATCACTGCAGCCTACGGCGTCTAGCCACCGACCTTTAC  
 CACGAATCTGACCCTGGTATTCTCGTCAACATCTACACCAGCTCTCTTGCCTATACCATG  
 CCCGGTCCCAGTTTGGTAGCAGGCCTCCCTTCAAGTGTGCCCAGGGTAACTCCGCGGCA  
 ACGGCTACAAGCAGCGCCACCATTCCCTGGCGGTGGAGGTTTCATCAAGCAGCAGAGCTTCA  
 TCTGCATCTGCTACGAAAACCTCGTCGGGGGCTACATCCAGGCCACCTCTTCCCTCTATT  
 CGCACAAACGTCTGCACCCGCTGGCGGCCCAACTCAGACTTTATACGGCCAGTGCGGTGGC  
 AGTGGCTACTCTGGCCCGACTATCTGCGCCTCGCCCGCGTTTGCCTACCTTGAATCCC  
TACTATGCTCAGTGCGTTTCCAGATTTCTAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG  
 AATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA

**Figura 7. Sequência nucléica da Endo IV.** A região referente à Endo IV encontra-se em vermelho.

MAQKLSNLLATALTVATGVVGHGHVNNIIVNGVYYQGYDPTSFPYMPNPPIVIGWTAADL  
 DNGFVAPDAYQGPDI VCHKNATNAKGHASVKAGDSILLQWLPLPWPHPGPIVDYLANCNG  
 DCETVDKTTLEFFKIDGVGLISGADPGNWAQNVLVTNNNTWVVQIPKDLQTNVLRHEL  
 IALHSSGQPDGAQNYPQCFNLAVTGTGSLQPTGVLATDLYHESDPGILVNIYTSSLAYTM  
 PGPSLVAGLPSSVAQGNSAATATSSATIPGGGGSSSRASSASATKTSSGATSRPTSSSI  
 RTTSAPAGGPTQTLYGQC GSGYSGPTICASPAVCTTLNPYYAQCVSRFLEQKLISEEDL  
 NSAVDHHHHHH

**Figura 8. Sequência de aminoácidos da Endo IV.** A cauda de histidinas encontra-se em vermelho.

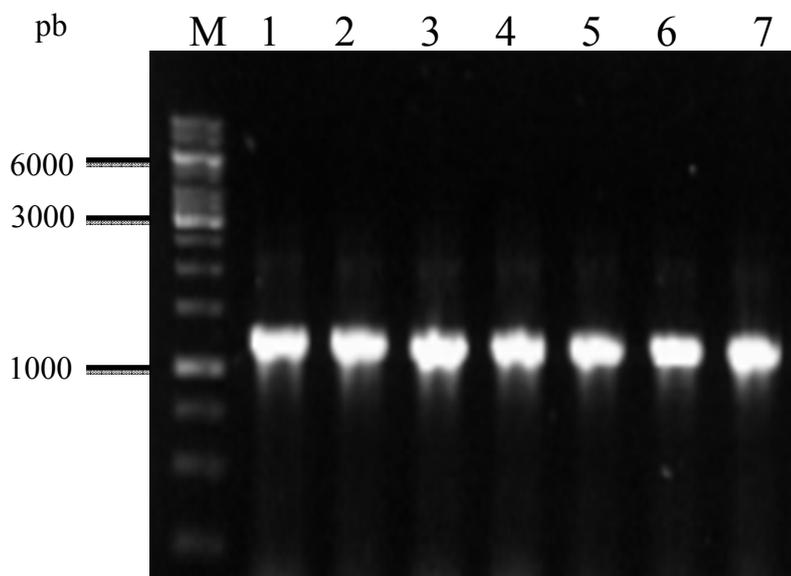
## 4.2 Expressão e purificação da Endo IV recombinante

Para expressar a Endo IV recombinante foi utilizado o sistema de expressão heteróloga da levedura *Pichia pastoris*. Esta levedura tem sido amplamente utilizada na produção de proteínas de interesse acadêmico e biotecnológico por possuir as vantagens da expressão em procariotos e em eucariotos, sendo que é de fácil manipulação, produz e

secreta altos níveis da proteína desejada e faz as modificações necessárias no polipeptídeo nascente, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (CREGG et al., 1993; CEREGHINO & CREGG, 2000).

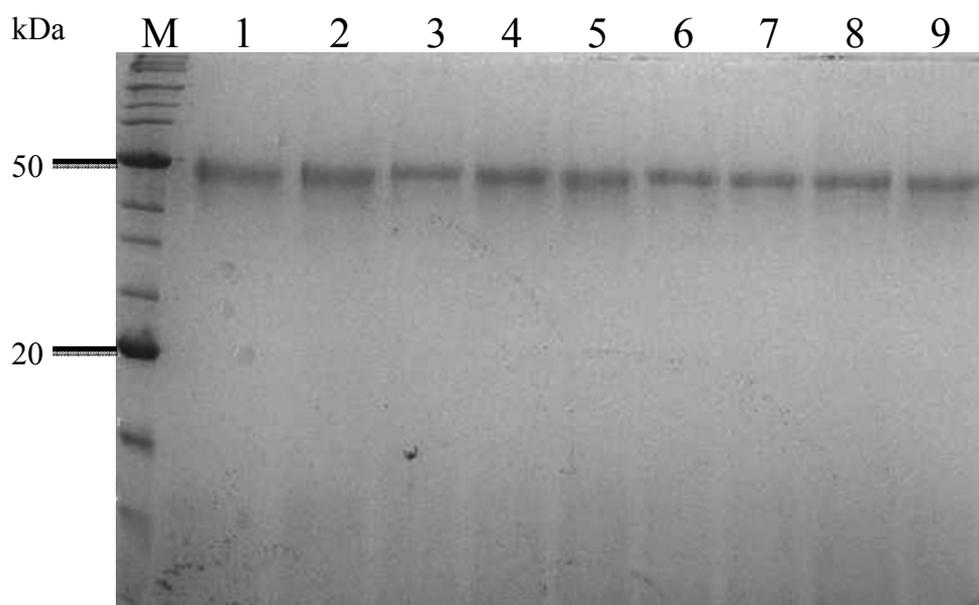
O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformação em *E. coli* e em *P. pastoris* seguindo-se o manual “pGAPZ A, B, and C pGAPZ $\alpha$  A, B, and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins” – Invitrogen.

Primeiramente, o plasmídeo recombinante foi transformado em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Os transformantes foram cultivados em placas com meio LB Low Salt contendo o antibiótico zeocina (25 $\mu$ g/ml) e os clones positivos foram identificados por PCR de colônia (Figura 9).



**Figura 9.** PCR de colônia dos transformantes em *E. coli* com pGAPZ $\alpha$ A. M- Marcador; 1-7- Clones positivos.

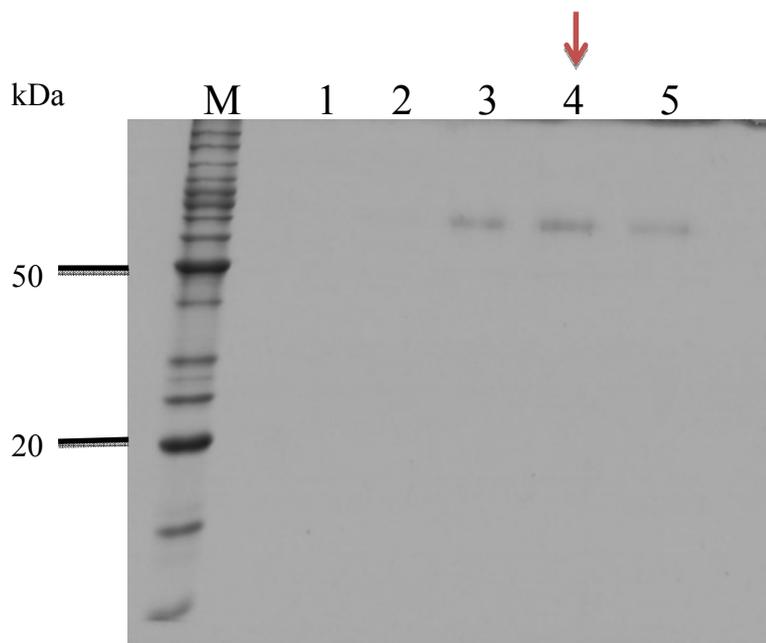
Em seguida, os clones positivos foram linearizados com a enzima *BspHI* e transformados por eletroporação em células competentes de *Pichia pastoris* da linhagem KM71H. Para selecionar os recombinantes, foram utilizadas placas com meio YPD ágar contendo o antibiótico zeocina (25 $\mu$ g/ml) e realizado um screening dos clones positivos. O screening foi realizado em placa 24-well (24 poços) contendo meio YEPD, glicose e tampão fosfato K pH 6.0. Após incubação dos recombinantes a 30°C por 96 h sob agitação constante de 250 rpm, os sobrenadantes dos clones foram analisados em SDS-PAGE 12% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Os resultados são mostrados na figura 10.



**Figura 10. Screening dos clones positivos transformados em *P. pastoris*.** Recombinantes incubados à 30°C por 96 h sob agitação constante de 250 rpm e análise dos sobrenadantes. M- Marcador; 1-9- Clones positivos. Todos os clones apresentaram bom nível de expressão da proteína recombinante.

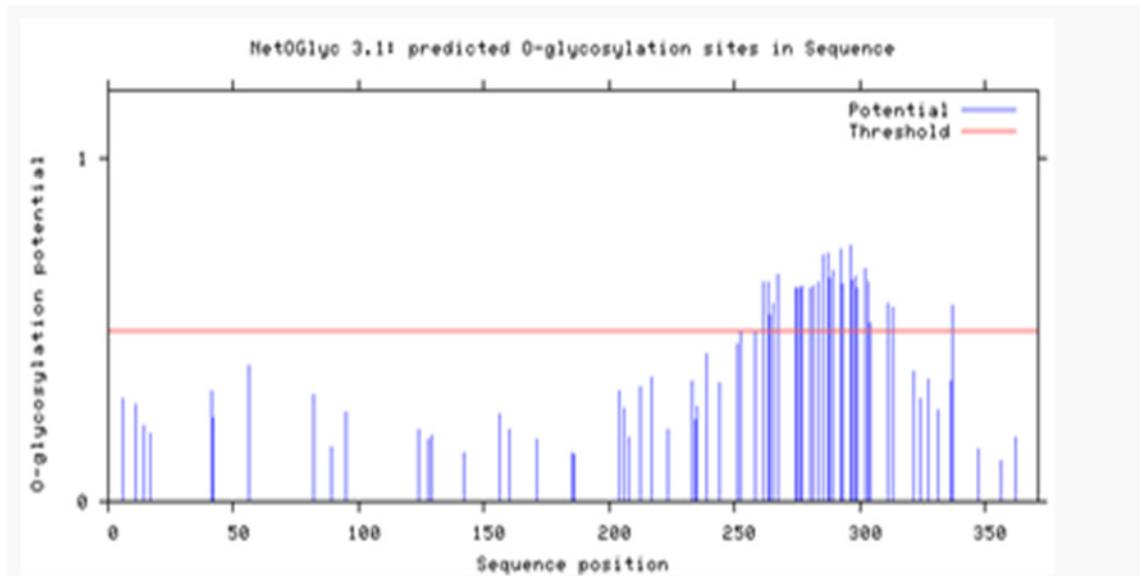
A análise mostrou que a transformação em *P. pastoris* foi bem sucedida e que todos os clones positivos apresentaram basicamente o mesmo nível de expressão da proteína recombinante. Sendo assim, a colônia 2 foi escolhida para realização da expressão e purificação da Endo IV recombinante.

O clone pGAPZ $\alpha$ A+EndoIV escolhido para a expressão foi induzido nas mesmas condições do screening, porém desta vez em uma quantidade de 100 mL. A cada 24 h, durante 96 horas, foi retirada uma amostra da cultura em crescimento, que foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para análise em SDS-PAGE 12%. O clone mostrou quantidade suficiente de expressão em 72 h, como mostra a figura 12.



**Figura 11. SDS-PAGE do sobrenadante das horas de indução da Endo IV recombinante.** A seta vermelha indica o tempo ideal para indução da Endo IV. M- Marcador; 1- Não induzido; 2- Induzido 24h; 3- Induzido 48h; 4- Induzido 72h; 5- Induzido 96h.

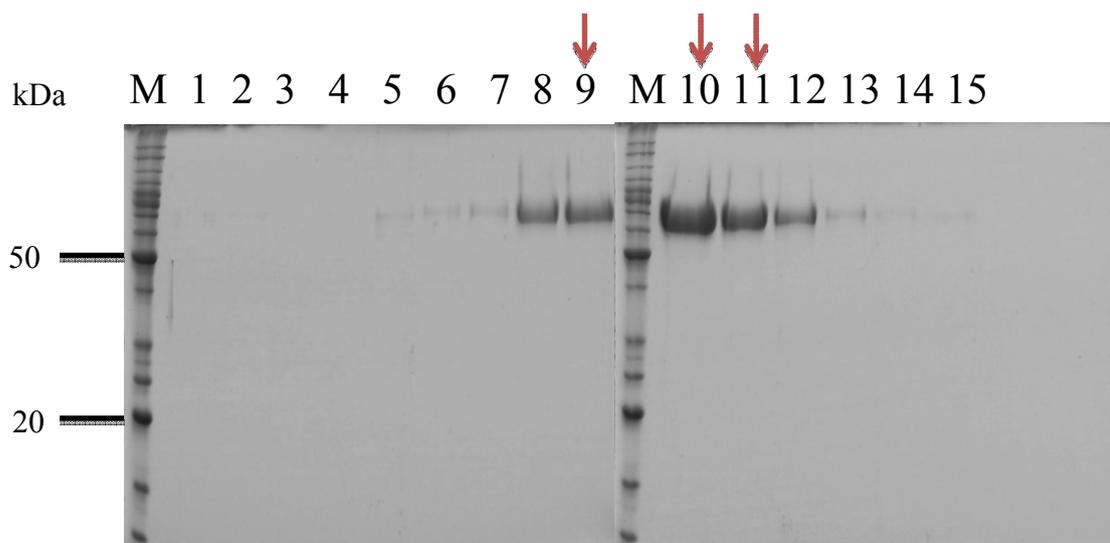
A figura 11 mostra bandas de expressão da Endo IV recombinante com massa molecular em torno de 70 kDa, o que não era esperado, pois sua massa seria aproximadamente 38kDa. A explicação é que podem ter ocorrido glicosilações nos sítios de O-glicosilação na sequência da proteína. A figura 12 apresenta uma predição de tais sítios realizada na ferramenta NetOGlyc, que revela que sequência possui vários sítios para O-glicosilação. Nenhum teste foi realizado para comprovar tal hipótese.



**Figura 12. Análise da sequência da Endo IV recombinante no programa NetOGlyc.** O programa disponível online realiza uma análise da sequência da proteína e prediz os sítios para O-glicosilação. Todos os pontos acima do limiar (vermelho) são prováveis sítios.

Após o tempo ideal para a indução ser determinado, a colônia escolhida foi induzida em 200 mL de meio YPD tamponado (pH 6.0), nas mesmas condições anteriores, durante 72h.

Decorrido o tempo de indução, o processo de purificação da enzima recombinante foi realizado por cromatografia de afinidade, utilizando-se uma coluna de resina de níquel. A figura 13 mostra as frações com diferentes concentrações de imidazol utilizadas para a eluição da proteína recombinante. Como nota-se, a maior parte da proteína foi eluída quando utilizadas as concentrações de 75 e 100 mM de imidazol e o rendimento total da enzima recombinante purificada foi de 2 mg/L.

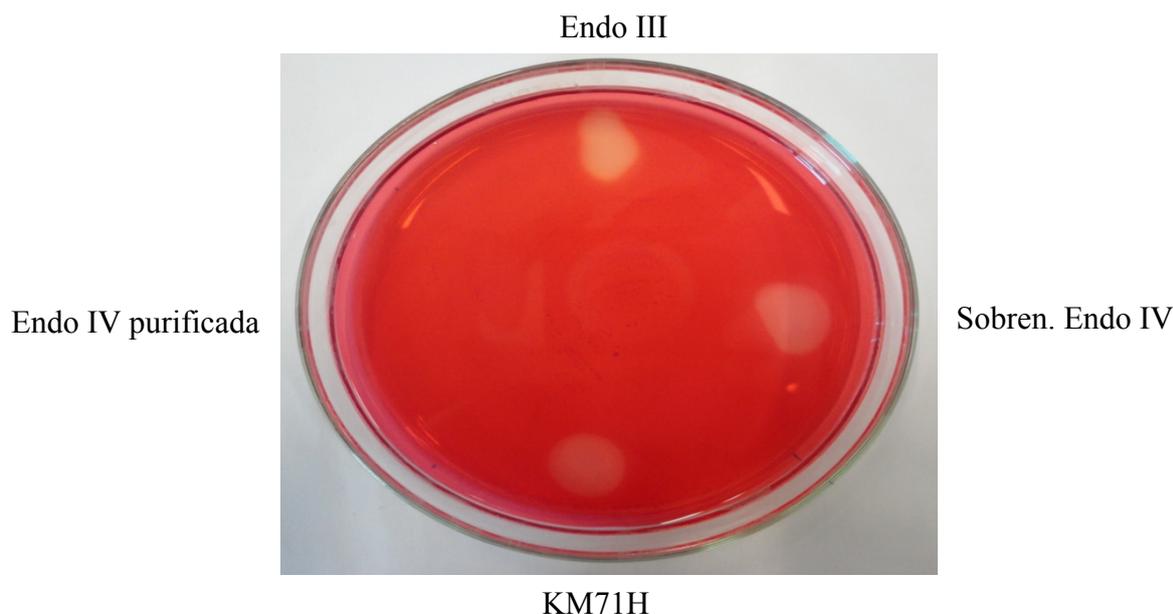


**Figura 13. SDS-PAGE da purificação da Endo IV com diferentes concentrações de imidazol.** As setas vermelhas indicam as frações em que houve maior quantidade de proteína eluída. M- Marcador; 1- Eluato; 2- Lavagem; 3,4- 10mM; 5,6- 25mM; 7,8- 50mM; 9,10- 75mM; 11,12- 100mM; 13,14,15- 250mM. A maior parte da proteína foi eluída quando utilizadas as concentrações de 75 e 100 mM de imidazol.

#### 4.3 Análise da atividade hidrolítica da Endo IV recombinante.

Com a proteína purificada foram realizados testes qualitativos de atividade, a fim de verificar inicialmente se a proteína recombinante era capaz de degradar o substrato. Primeiramente foi realizado um zimograma, com a adição de 1% de CMC em SDS-PAGE 12%. Para a análise, foram utilizados o sobrenadante do cultivo de Endo IV, a enzima purificada e a enzima Endo III de *Trichoderma harzianum*, que apresenta degradação positiva nesse tipo de zimograma (GENEROSO et. al. 2012), como controle positivo. Nem o sobrenadante de Endo IV, nem a enzima purificada degradaram o substrato no zimograma.

Em seguida, foi realizado o teste com placas de CMC (ágar, CMC e H<sub>2</sub>O). A placa de Petri foi dividida em quatro e aplicados o sobrenadante do cultivo de Endo IV, a enzima purificada, a enzima Endo III, como controle positivo, e o sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* KM71H, como controle negativo. A enzima Endo IV purificada não apresentou sinal de degradação do substrato, já o sobrenadante da cultura apresentou um pequeno sinal, porém o controle negativo também o apresentou, sugerindo que a degradação possa ser devido à algum constituinte da linhagem KM71H de *P. pastoris* (Figura 14)



**Figura 14. Teste qualitativo de atividade da Endo IV em placa de CMC.** Endo III- controle positivo; Linhagem KM71H de *P. pastoris*- controle negativo.

A análise da atividade hidrolítica utilizando DNS consiste na quantificação dos açúcares redutores formados, ou seja, os açúcares resultantes da ação da enzima (MILLER, 1959). O teste foi realizado, inicialmente, incubando-se os substratos CMC, papel de filtro, pó de serra, Avicel e bagaço de cana-de-açúcar a uma temperatura de 37°C por 10 minutos e, após a EndoIV recombinante ser adicionada, o tempo de reação foi de 15 minutos, e então o DNS foi adicionado e leu-se a absorvância. Como não houve formação de açúcares redutores, o tempo de reação foi aumentado para 1 hora e 4 horas, não apresentando também nenhum açúcar redutor.

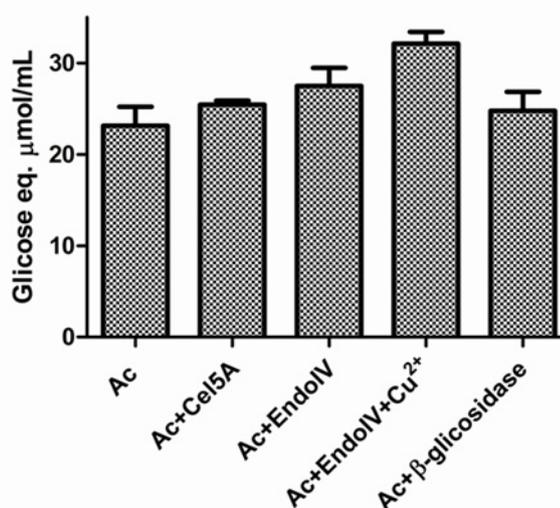
Em estudos realizados para expressar e caracterizar a Endo IV de *Trichoderma reesei*, Karlsson et. al. (2001) utilizaram em seus testes de atividade enzimática a temperatura de 40°C, obtendo ótimos resultados. Huang et. al. (2012) caracterizaram a Endo IV de *Trichoderma viride* e descobriram em testes de atividade CMCcase que a temperatura ideal para a reação é de 55°C. Com base nesses estudos, a temperatura de reação para os testes com a Endo IV recombinante foi aumentada, sendo a atividade testada às temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60°C. Porém em nenhuma das temperaturas, testadas por 15 minutos, 1 hora e 4 horas foi observada a formação de açúcares redutores.

Tendo em vista que vários autores relatam que a atividade endoglucanase das Cel61A é bem menor do que em outras endoglucanases e, em alguns casos, pode ser até nula (KARLSSON et. al. 2001; LIU et al. 2006), e que de acordo com informações

contidas no CAZy, essas enzimas têm a capacidade de aumentar a quebra de lignocelulose quando utilizada em conjunto com uma outra celulase ou uma mistura de celulases, foram realizados testes para avaliar a capacidade da endo IV de suplementar a atividade do coquetel Acellerase 1500 (Genencor) na hidrólise de biomassa.

A capacidade da enzima endoglucanase IV de *Trichoderma harzianum* foi avaliada na hidrólise da biomassa da cana-de-açúcar. Adotou-se como estratégia a suplementação do coquetel comercial accellerase 1500, pois esse coquetel é rico em celulases e a suplementação com xilanases em outro trabalho apresentou resultados positivos (SONG et al., 2012). A Figura 16 traz os dados de açúcares redutores liberados a partir dos polissacarídeos de bagaço tratado com ácido fosfórico (BASC). Como controle utilizou-se uma endoglucanase de *Bacillus subtilis* (cel5A) e uma  $\beta$ -glicosidase, ambas adicionadas ao coquetel Accelerase para comparação com a Endo IV na mesma condição. A quantidade de açúcares redutores proveniente da hidrólise com Ac+EndoIV não mostrou aumento significativo, quando comparada com Ac+Cel5A e Ac+ $\beta$ -glicosidase.

Já é descrito na literatura que a enzima em estudo é uma oxi-redutase pertencente à família GH61, portanto é necessário um doador de elétrons. Na presença de 250mM de  $\text{CuCl}^{2+}$  foi obtido um aumento de 39% na hidrólise do bagaço em relação ao experimento apenas com Ac+EndoIV (Figura 15).



**Figura 15.** Açúcares redutores liberados a partir dos polissacarídeos de bagaço tratado com ácido fosfórico (BASC). Reação de hidrólise com duração de 24h à 50°C. **Ac:** coquetel acellerase, **Ac+Cel5A:** coquetel acellerase + endoglucanase de *Bacillus subtilis*, **Ac+EndoIV:** coquetel acellerase + Endoglucanase IV de *Trichoderma*

*harzianum*, **Ac+EndoIV+CU<sup>2+</sup>**: coquetel acellerase + Endoglucanase IV de *Trichoderma harzianum* + cobre, **Ac+ $\beta$ -glicosidase**: coquetel acellerase +  $\beta$ -glicosidase. A quantidade de açúcares redutores proveniente da hidrólise com Ac+EndoIV não mostrou aumento significativo, quando comparada com Ac+Cel5A e Ac+  $\beta$ -glicosidase. Na presença de cobre foi obtido um aumento de 39% na hidrólise do bagaço.

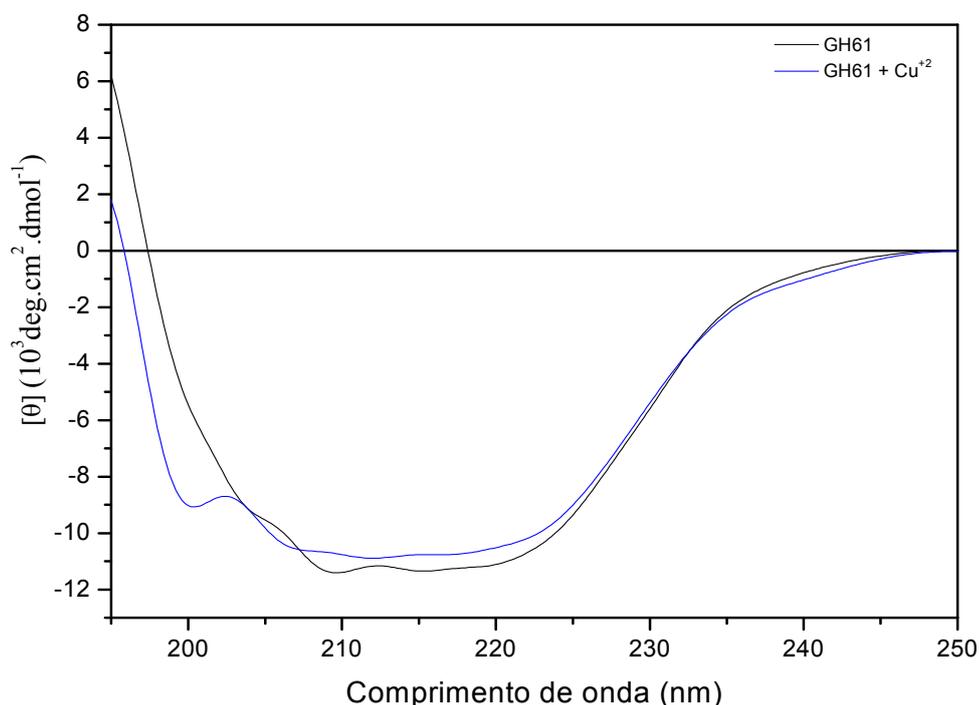
Apesar do aumento na hidrólise do bagaço de cana na presença de cobre junto à Endo IV, foi-se questionado se tal aumento não se deu apenas por causa do cobre adicionado à reação, o que influenciaria enzimas já presentes no coquetel. Um novo experimento foi então realizado para testar tal hipótese, no qual adicionou-se somente cobre ao coquetel. Os resultados mostraram que o cobre sozinho melhora a performance do coquetel.

Tal evento pode ser explicado pelo fato de talvez o coquetel Acellerase já conter expansinas, as quais foram influenciadas pelo cobre. O aumento da hidrólise seria então devido ao aumento de atividade de enzimas já presentes no coquetel. Por outro lado, poder-se-ia questionar a razão de não ter aumentado a atividade com a inclusão de Endo IV, ou seja, mais uma provável expansiva. A explicação seria que o coquetel já é otimizado, ou seja, já conter as quantidades ideais de enzimas necessárias para exercer sua função. Sendo assim, não adianta adicionar mais enzimas com capacidade de suplementação da atividade hidrolítica que não terão efeito no coquetel. Assim, não é excluída a possibilidade de que a Endo IV tenha atividade. No entanto, teria que ser testada em um coquetel sem expansinas, ou com enzimas isoladas.

#### **4.4 Análise do Dicroísmo Circular**

O resultado do espectro de CD da Endo IV (GH61) à 20°C, apresenta dois mínimos, um à 220 nm e outro à 209 nm, e um máximo à 195 nm (Figura 17). O mínimo à 220 nm é relacionado com a presença de estruturas  $\alpha$ -helice. O mínimo de 209 nm apresentou a contribuição de pelo menos três valores mínimos, um à 208 nm característico de  $\alpha$ -helice, outro à 210 nm, característico de  $\beta$ -estrutura e o último à 200 nm característico de espiral aleatória. O máximo à 195 nm é explicado pela contribuição  $\beta$ -estrutura. Todos estes dados em conjunto indicam que a estrutura secundária da Endo IV é composta por  $\alpha$ -helice e  $\beta$ -estruturas.

Para estudar o efeito do cobre quando ligado à proteína, também foi realizado experimento deicroísmo circular. O espectro de GH61 com cobre mostra características semelhantes quando comparado com o espectro de GH61 sem cobre, indicando, assim, que a composição da estrutura secundária da enzima não é significativamente alterada pela ligação de cobre (Tabelas 1 e 2). No entanto, algumas diferenças espectrais puderam ser detectadas, por exemplo, a variação entre as intensidades das curvas, observada na figura 16, o que é devido ao rearranjo estrutural da enzima pela presença de cobre.



**Figura 16.** Espectro de dicroísmo circular (CD) realizado com Endo IV pura (GH61) e Endo IV + cobre (GH61+Cu<sup>2+</sup>).

**Tabela 1.** Deconvolução realizada no programa Dichroweb-K2d web-interface com a Endo IV e Endo IV + Cu<sup>2+</sup>.

	$\alpha$ -hélice	$\beta$ -estrutura	Espiral aleatória
<b>Endo IV</b>	0.25	0.15	0.59
<b>Endo IV + Cu<sup>2+</sup></b>	0.26	0.16	0.59

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A Endo IV de *Trichoderma harzianum* possui grande similaridade em sua sequência com as mesmas enzimas de outros organismos, principalmente *Thichoderma reesei*;
- O uso do sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* se mostrou eficiente, gerando grande quantidade de Endo IV recombinante após purificação;
- Testes de atividade não indicaram a atividade hidrolítica da Endo IV recombinante;
- Os resultados do CD indicam que a estrutura secundária da Endo IV é composta por  $\alpha$ -helice e  $\beta$ -estruturas e está corretamente enovelada;
- A composição da estrutura secundária da enzima não é significativamente alterada pela ligação de cobre.
- A adição da Endo IV recombinante a um coquetel de enzimas hidrolíticas não aumentou a capacidade deste de hidrolisar bagaço de cana de açúcar.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar da bem sucedida produção recombinante da Endo IV de *Trichoderma harzianum*, não foi possível realizar sua caracterização, pois nos inúmeros testes de atividade enzimática realizados, sua função não pôde ser constatada.

A questão a ser levantada é: A Endo IV de *Trichoderma harzianum* não tem mesmo efeito? De acordo com o teste realizado com o coquetel Acellerase 1500 (Genencor) sua capacidade de suplementação de atividade não foi vista, porém isso pode ter ocorrido por causa de uma provável otimização do coquetel. Pretende-se agora realizar testes em coquetéis sem expansinas e com enzimas isoladas, a fim de verificar se a Endo IV possui efeito sobre elas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**. v. 86, p. 2273-2282, 2009.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial** (Rio de Janeiro). n. 25, p. 5-38, 2007.

BOETTNER, M. High throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal Biotechnology**. v. 99, p.51-62, 2002.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. **FAPESP PPP Etanol**, 2007.

CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in Lignin Content and Composition: Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants. **Plant Physiol**. v. 110, p. 3-13, 1996.

CARVALHO, A. L. O papel do bioetanol no contexto económico e ambiental a partir do caso brasileiro. **Universidade de Coimbra** – Faculdade de Economia (Dissertação de Mestrado). 93 p. 2008.

CASSIOLATO, A. M. R.; MELO, I. S. Filtration enrichment method for isolation of auxotrophic mutants of *Trichoderma harzianum* rifai. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 43-46, 1999.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**. v.24, p. 45-66, 2000.

CREGG, J.M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**. v.11, n. 8, p. 905-910, 1993.

DAS, M.; BENERJEE, R. BAL, S. Multivariable Parameter Optimization for the Endoglucanase Production by *Trichoderma reesei* Rut C30 from *Ocimum gratissimum* seed. **Brazilian Archives of Biology And Technology: an international journal**. v. 51, n. 1, p. 35-41, 2008.

DE PAULA, M. P. et al. Hidrólise ácida de celulose de sisal: estudos visando obtenção de nanofibras e de bioetanol. **Anais**. Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR, 2009.

DIN, N. et al. C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulose. **PNAS**. V. 91, p. 11383-11387, 1994.

GENEROSO, W. C. et al. Recombinant expression and characterization of an endoglucanase III (cel12a) from *Trichoderma harzianum* (Hypocreaceae) in the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics and Molecular Research*. v.11, n. 2, p. 1544-1557, 2012.

HUANG, X. et al. Cloning, Expression, and Characterization of Endoglucanase Gene egIV from *Trichoderma viride* AS 3.3711. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, n. 3, p. 390–399, 2012.

KAR, S. et al. Production of cellulose-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n. 4, p. 462-464, 2006.

KARLSSON, J. et al. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**. v. 268, p. 6498–6507, 2001.

KLEMAN-LEYER, K. M. et al. The Cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not do decrease its molecular size. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 8, p. 2883–2887, 1996.

LIU, G. et al. Improvement of the cellulolytic activity of *Trichoderma reesei* endoglucanase IV with an additional catalytic domain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, p.1301–1305, 2006.

LIU, S. Y. et al. Purification and Characterization of Novel Glucanases from *Trichoderma harzianum* ETS 323. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 58, p. 10309–10314, 2010.

LORA, E. E. S.; CORAL, D. S. O.; ROCHA, M. H. Rotas termoquímica e bioquímica para biocombustíveis: estado-da-arte, oportunidades e desafios para o Brasil. **AGRENER GD**, 2008

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LUZ JR., F. L. L. et al. Bioetanol, biodiesel e biocombustíveis: perspectivas para o futuro. **Boletim regional, urbano e ambiental**. v. 3, 2009.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos avançados**. v. 21, n. 59, 2007.

MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**. v. 7, n. 2, 2010.

MALAGÓ-JR, W. **Clonagem e estudos de expressão de enzimas do fungo filamentoso *Trichodema harzianum* ioc-3844 envolvidas na degradação de biomassa**. São Carlos, 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, p.426-428. 1959.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**. v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**. v. 54, p. 559-568, 2008.

PEREIRA, N. J.; COUTO, M. A. P. G.; ANNA, L.M. M. S. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Biblioteca Nacional, 2008, 45p. (Series on Biotechnology, v.2)

RULLER, R. **Criação de uma endo-xilanase termoestável através da evolução molecular “in vitro”**, 2006. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 203p.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W. **Molecular cloning**. p. 9.16-9.17. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.

SERVICE, R. F. Is there a road ahead for cellulosic ethanol? **Science**. v. 329, p. 784-785, 2010.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SONG, L.; et al. Engineering better biomass-degrading ability into a GH11 xylanase using a directed evolution strategy. **Biotechnology for Biofuels**. v. 5, n. 1, p. 3, 2012.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

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