



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

FERNANDA CRAVEIRO FRANCO

**Clonagem e expressão heteróloga do gene
de uma xilanase de *Thermoascus aurantiacus*
em *Pichia pastoris***

São José do Rio Preto

2011

FERNANDA CRAVEIRO FRANCO

**Clonagem e expressão heteróloga do gene
de uma xilanase de *Thermoascus aurantiacus*
em *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus São José do Rio Preto

Orientadora: Eleni Gomes

Co-orientador: Fernando Araripe G. Torres

São José do Rio Preto

2011

Franco, Fernanda Craveiro.

Clonagem e expressão heteróloga do gene de uma xilanase de
Thermoascus aurantiacus em *Pichia pastoris* / Fernanda Craveiro
Franco. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

75 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eleni Gomes

Co-orientador: Fernando Araripe Gonçalves Torres

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos. 3. Enzimas –
Aplicações industriais. 4. Xilanases. I. Gomes, Eleni. II. Torres,
Fernando Araripe Gonçalves. III. Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

FERNANDA CRAVEIRO FRANCO

**Clonagem e expressão heteróloga do gene
de uma xilanase de *Thermoascus aurantiacus*
em *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, campus São José do Rio Preto

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes
Professor Livre Docente
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Fabio Squina
Professor Doutor
Centro de Ciência e Biotecnologia do Bietanol – CTBE

Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

**São José do Rio Preto
2011**

*A meus pais e irmã que permitiram e
incentivaram que eu fosse até o fim
dessa jornada diante de todas as
dificuldades encontradas no caminho.*

Agradecimentos

Primeiramente aos meus orientadores, Profa. Dra. Eleni Gomes e Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, que com orientação e confiança permitiram a realização desse trabalho e nos meus momentos de maior desespero tiveram a calma e paciência de me mostrar o melhor caminho.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pelo incentivo e opiniões muito valiosas ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Werner Treptow pelo auxílio com a estrutura da proteína e à Profa. Dra. Janice Lisboa de Marco pelo apoio nas etapas de purificação.

A minha família pelo apoio e compreensão, minha mãe e irmã, Elizabeth e Andréia, que nos momentos de maior dificuldade estavam presentes me apoiando. E em especial ao meu pai, Célio, que com amor e carinho me mostrou que não se pode desistir diante das dificuldades e infelizmente não pode presenciar a conclusão de mais essa jornada.

Ao meu namorado, Fausto Nomura, pelo apoio, compreensão e paciência quando mais precisei.

A Aline “Fish” e Fanny pela grande amizade mesmo a distância e pelos maravilhosos momentos que vivemos.

A Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini, Dani, pelo auxílio e sugestões nos experimentos e mais do que isso, pela amizade.

Aos amigos Paula, Osmar e Viviane pela companhia e bons momentos vividos.

Aos amigos dos laboratórios de Rio Preto e de Brasília por permitirem uma rotina descontraída e divertida para a realização desse trabalho.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
Revisão Bibliográfica.....	5
Hemicelulose.....	5
Xilana.....	5
Enzimas de degradação da xilana – xilanases.....	7
Endo-1,4- β -xilanases.....	9
Fungo filamentoso <i>Thermoascus aurantiacus</i>	11
Expressão heteróloga.....	13
<i>Pichia pastoris</i>	14
Referências Bibliográficas.....	15
 Capítulo 1 - Clonagem, expressão e caracterização do gene da xilanase (xynA) de <i>Thermoascus aurantiacus</i> em <i>Pichia pastoris</i>.....	 20
Resumo.....	21
1. Introdução.....	21
2. Material e métodos.....	23
2.1. Linhagens de microrganismos e plasmídeos.....	23
2.2. Extração de RNA e obtenção de cDNA.....	23
2.3. Construção do plasmídeo de expressão.....	24

2.4. Transformação de <i>P. pastoris</i> e seleção dos clones produtores.....	25
2.5. Produção de xilanase pelo fungo filamentoso <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI756.....	26
2.6. Indução de <i>P. pastoris</i> em frascos.....	26
2.7. Determinação da atividade de xilanase.....	27
2.8. Caracterização físico-química da xilanase.....	27
2.8.1. Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade das enzimas.....	27
2.8.2. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade das enzimas.....	27
2.9. Análise em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	27
3. Resultados e discussão.....	28
3.1. Indução da produção de xilanase pelo <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, detecção e caracterização da enzima no extrato bruto.....	28
3.2. Extração do RNA e síntese do cDNA.....	32
3.3. Análise da sequência do gene da xilanase de <i>T. aurantiacus</i>	33
3.4. Construção do vetor de expressão induzida.....	36
3.5. Transformação de <i>P. pastoris</i> e detecção da atividade xilanolítica.....	39
3.6. Otimização da produção da xilanase recombinante.....	41
4. Conclusão.....	47
5. Referências Bibliográficas.....	48
 Capítulo 2 – Purificação parcial e caracterização da xilanase de <i>Thermoascus aurantiacus</i> expressa em <i>Pichia pastoris</i>.....	 51
Resumo.....	52
 1. Introdução.....	 52
2. Material e métodos.....	53
2.1. Microorganismos.....	53
2.2. Indução de <i>P. pastoris</i> em frascos.....	53
2.3. Purificação.....	54
2.4. Determinação da atividade de xilanase.....	54
2.5. Caracterização físico-química da xilanase.....	55
2.5.1. Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da enzima.....	55
2.5.2. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima.....	55

2.6. Análise em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	55
3. Resultados e discussão.....	56
3.1. Expressão e purificação da xilanase recombinante.....	56
3.2. Caracterização da enzima parcialmente purificada.....	57
4. Conclusão.....	60
5. Referências Bibliográficas.....	61
Considerações Finais.....	63
Anexos.....	64

Resumo

A xilanase de *Thermoascus aurantiacus* codificada pelo gene *xynA* é uma enzima termofílica com uma promissora aplicação industrial. Neste trabalho, foi realizada a clonagem desse gene, que foi isolado pela técnica de RT-PCR, seguido de expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. Realizada a caracterização da enzima nativa no extrato bruto do fungo filamentoso assim como da enzima recombinante antes e depois da purificação parcial, a qual foi realizada pelo processo de troca iônica. A atividade ótima das enzimas foi em pH 5,0 e as mesmas foram estáveis diante de ampla faixa de pH (3,5- 10,5, por 24h). Em relação à temperatura ótima e termoestabilidade houve algumas diferenças entre as três condições da xilanase. A xilanase nativa apresentou-se mais ativa a 75°C sendo estável na faixa de 35°C a 75°C após 1 hora de incubação, a xilanase recombinante antes e depois do processo de purificação apresentou temperatura ótima em 60°C, no entanto antes da purificação permaneceu estável entre 35°C e 80°C, e após a purificação entre 35°C e 65°C, em ambos os casos após a incubação por 1 hora. Esse foi o primeiro relato de expressão do gene *xynA* em *P. pastoris*. Com a purificação da enzima recombinante serão viabilizados estudos estruturais que requerem grandes quantidades da enzima. Além disso as características observadas de XynA em nossas análises mostraram-se bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico. Nossos dados permitirão então outros estudos para adequação a aplicação dessa xilanase em processos industriais.

Abstract

The *Thermoascus aurantiacus* xylanase which is coded by the *xynA* gene is a thermophilic enzyme with a promising use in industrial processes. In this study, we performed the cloning of the *xynA* gene, which was isolated by RT-PCR and subsequently heterologously expressed in *Pichia pastoris*. The native enzyme and recombinant versions of the enzyme were characterized before and after purification process. Both enzymes showed higher in pH 5,0 and were stable over a wide range of pH's (3,5-10,5, after 24h of incubation). Differences were observed in the optimum temperature and thermostability; native xylanase optimum temperature was 75°C being stable within the range 35°C-75°C after 1 hour incubation, whereas the recombinant enzyme showed higher at 60°C. Before the purification process the recombinant protein was stable at 35°C to 80°C, but after partial purification the stability was between 35°C to 65°C. To our knowledge, this is the first report of the expression of *xynA* in *P. pastoris*. The purification of recombinant XynA will contribute to structural studies which require large quantities of the enzyme. Furthermore, the biochemical features observed in our analysis shed light into the use of this enzyme in biotechnological processes which require thermophilic enzymes.

Introdução Geral

Atualmente, o grande potencial de aplicação das xilanases em processos industriais tem atraído grande interesse em estudos a respeito dessas enzimas. Estas enzimas podem ser utilizadas em vários processos, dentre eles existe grande interesse para sua aplicação nas indústrias de papel e alimentícia. Outra aplicação muito importante é na produção de energia a partir de biomassa lignocelulósica (HE et al., 2009; RUANGLEK et al., 2006; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; KATAHIRA et al., 2004).

As enzimas produzidas por microrganismos termofílicos, na maioria dos casos, são mais apropriadas no processamento industrial devido às suas propriedades catalíticas (atividade e estabilidade) em altas temperaturas (KALOGERIS et al., 1998). Uma linhagem do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* têm sido estudada como produtora de diversas enzimas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada/UNESP. Dentre elas destaca-se uma xilanase termoestável com alta atividade, portanto com grande potencial de aplicação industrial.

A levedura *Pichia pastoris* é sistema genético bem conhecido e caracterizado, sendo frequentemente utilizado para a produção de proteínas em grande escala. *P. pastoris* possui uma taxa de crescimento elevada e produz grande quantidade de proteína em meios simples e baratos. Pode crescer tanto em frascos agitados como em fermentadores e é capaz de realizar diversas modificações pós-traducionais como adição de pontes dissulfeto e glicosilações. Estas características a tornam um organismo de grande importância para expressão de enzimas e outras proteínas de valor comercial e industrial (CEREGHINO; CREGG, 2006; CREGG et al., 2000).

A clonagem e expressão em levedura do gene que codifica a xilanase de *T. aurantiacus* são desejáveis para viabilizar maiores estudos sobre a estrutura da enzima e para viabilizar a sua produção em larga escala. Neste estudo, contribuímos para esta etapa do conhecimento da xilanase de *T. aurantiacus*, apresentando nossos resultados sobre a expressão, caracterização da enzima recombinante e comparação com a enzima nativa no primeiro capítulo e a purificação parcial e caracterização da enzima após o processo de purificação no capítulo dois.

Revisão bibliográfica

Hemicelulose

A lignocelulose é o material estrutural da biomassa vegetal e consiste de três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (PEREZ et al., 2002). As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos que representam de 15-35% da biomassa vegetal. O termo foi introduzido por Schulze, em 1891, para denominar frações isoladas ou extraídas de material vegetal facilmente hidrolisável, quando as estruturas ainda não eram muito bem conhecidas. Hemiceluloses são componentes estruturais importantes que ocorrem em íntima associação com a lignina e a celulose, interagindo com ligações covalentes e não covalentes respectivamente (BEG et al., 2001; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; GÍRIO et al., 2010).

Os resíduos de açúcar encontrados em hemiceluloses incluem pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-galactose, L-galactose, D-manose, L-raminose, L-fucose) e ácidos urônicos (ácido D-galacturônico). Tais resíduos são diversamente modificados por acetilação e metilação (GLAZER; NIKAIDO, 1995). Os principais heteropolímeros desse grupo de polissacarídeos são xilanas, mananas, galactanas e arabinanas e a classificação dessas frações de hemicelulose depende da composição de açúcares presente (BEG et al., 2001).

Xilana

A xilana é o principal polissacarídeo estrutural nas células vegetais e o segundo mais abundante na natureza (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005), além disso, é o maior componente da hemicelulose nas paredes celulares de células vegetais correspondendo a 30-35% do peso seco total. Em madeiras duras (angiospermas) é a

hemicelulose mais encontrada, correspondendo a 15-30% do peso seco. Em madeiras macias (gimnospermas) não é tão abundante, correspondendo 7-10% de sua biomassa. É um importante polissacarídeo, que ligado covalentemente à lignina e não-covalentemente à celulose, atua na manutenção da integridade da celulose e na proteção das fibras da ação das celulasas (BEG et al., 2001).

A maioria das xilanas ocorre como heteropolissacarídeos composto por uma cadeia principal de resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, que apresentam diferentes grupos substituintes (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; BEG et al., 2001). As substituições mais comumente encontradas na cadeia principal das xilanas são resíduos acetil, arabinosil e glucuronosil (WHISTLER; RICHARDS, 1970). Por outro lado, as homoxilanas consistem exclusivamente de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4 e β -1,3 e não são encontradas com facilidade na natureza. Esse tipo de xilana foi isolada em grama de esparto, caule de tabaco, semente de guar e em algumas algas marinhas (BEG et al., 2001; DODD; CANN, 2009).

As xilanas encontradas em madeiras duras são 0-acetil-4-0-metilglucuroxilanas, que consistem de pelo menos 70 resíduos de xilopirranose unidos por ligações β -1,4, altamente acetiladas (Figura 1). A presença desses grupos acetil é responsável pela solubilidade parcial da xilana em água. Em madeiras macias são encontradas xilanas do tipo arabino-4-*O*-metilglucuronoxilanas, que apresentam unidades de α -L-arabinofuranosil ao invés de grupos acetil e maior quantidade de ácido metilglucurônico (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997) (Figura 2).

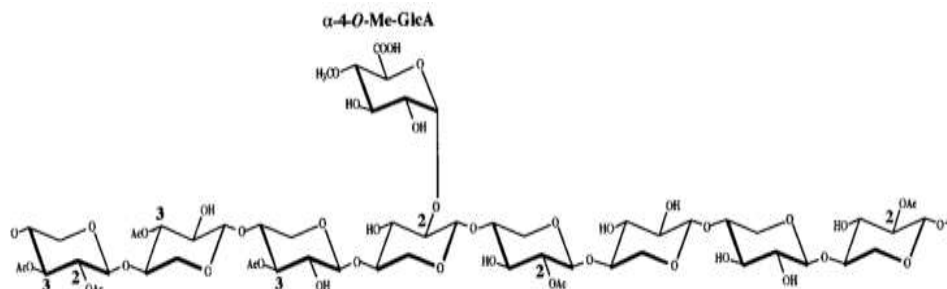


Figura 1: Esquema representativo da estrutura de 0-acetil-4-0-metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. Ac: grupo acetil; α -4-0-Me-GlcA: ácido α -4-0-metilglucurônico (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

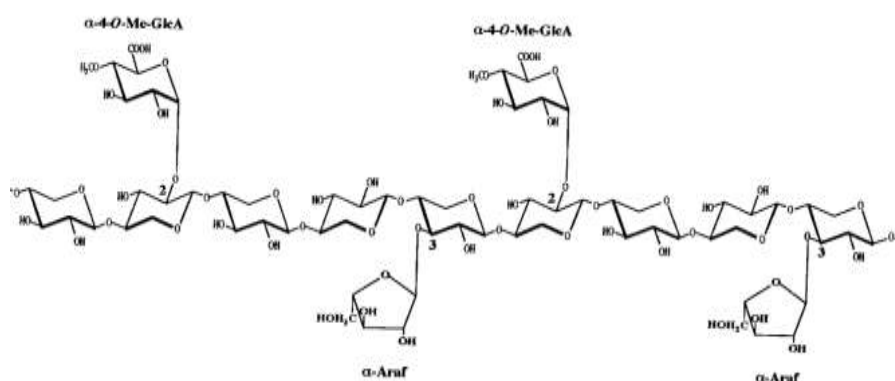


Figura 2: Estrutura de arabino 4-0-metilglucuronoxilana presente em madeiras macias. α -araf: arabinofuranose; α -4-0-Me-GlcA: ácido α -4-0-metilglucurônico (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

Enzimas de degradação da xilana – xilanases

Diante da heterogeneidade e complexidade da xilana, sua hidrólise completa requer uma grande variedade de enzimas atuando cooperativamente com diferentes especificidades e modos de ação (Fig. 3 a e b) (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2004).

As enzimas que compõem os sistemas xilanolíticos microbianos são:

- ✓ Endo-1,4- β -D-xilanases: hidrolisam randomicamente as ligações β -1,4 da cadeia principal de resíduos de xilose;

- ✓ β -D-xilosidases: hidrolisam 1,4- β -D-xilooligossacarídeos e xilobiose em monômeros de xilose a partir de uma extremidade não redutora;
- ✓ α -L-arabinofuranosidades: hidrolisam os grupos α -L-arabinofuranosil terminais;
- ✓ α -D-glucuronidasas: atuam na hidrólise das ligações α -1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glucurônico ou sua ligação 4-*O*-metil-éster;
- ✓ Acetilxilana esterases: hidrolisam as ligações entre xilose e ácido acético e ácido ferúlico;
- ✓ Ácido p-coumárico ou ferrúlico esterases: removem ácidos cumárico ou ferrúlico dos resíduos de arabinose das cadeias laterais.

Na conversão da xilana em monossacarídeos, todas essas enzimas atuam sinergisticamente. A presença desse sistema xilanolítico multifuncional foi observada em diversos fungos e bactérias, sendo os primeiros melhores produtores (BEG, 2001). Alguns dos produtores de enzimas xilanolíticas incluem espécies de: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Streptomyces*, *Phanerochaete*, *Clotridium* e *Bacillus* (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; CHAVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006).

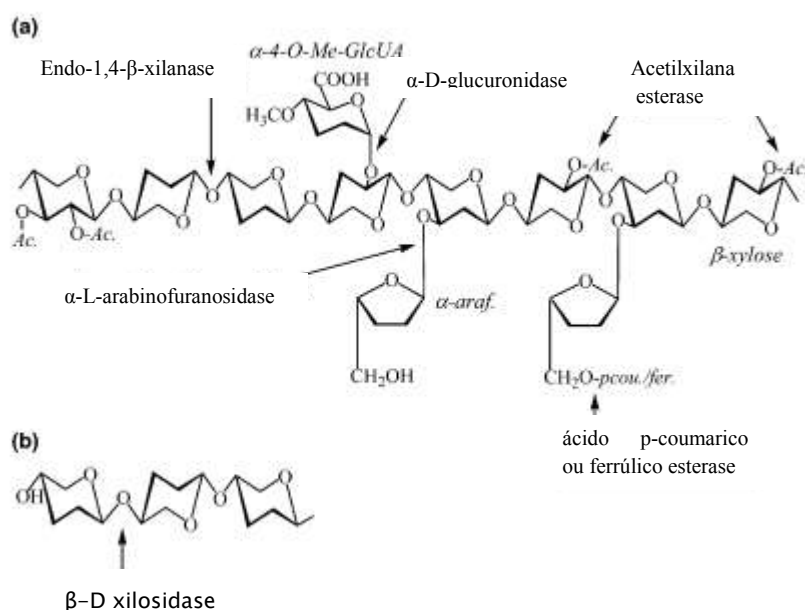


Figura 3: a) Estrutura da xilana e os locais de ataque pelas enzimas xilanolíticas. A cadeia principal é composta por resíduos de xilose. Ac: grupos acetil; α-araf: α-arabinofuranose; α-4-O-Me-GlcUA: ácido α-4-O metilglucurônico; pcou: ácido p-coumárico; fer: ácido ferrúlico. b) Hidrólise de xilooligossacarídeos pela β-xilosidase (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Endo-1,4-β-xilanases

Uma das atividades criticamente importantes requeridas para despolimerização da xilana é a da endo-1,4-β-xilanase (DODD; CANN, 2009). Essas endo-xilanases são produzidas principalmente por microrganismos, apesar de também serem produzidas por animais, como moluscos, e mesmo por plantas, entre os produtores microbianos, os fungos filamentosos são bem conhecidos como secretores de altos níveis de xilanase (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; CHANTASINGH et al., 2005).

A heterogeneidade da estrutura da xilana resultou em uma diversidade de xilanases que apresentam variações na especificidade e nas sequências primárias e secundárias, o que dificulta a classificação destas enzimas. As xilanases pertencem ao sistema de classificação das glicosídeohidrolases (GH), que se baseia em comparações

de estruturas primárias e sequências de domínio catalíticos, agrupando as enzimas em famílias. As endoxilanases normalmente são classificadas nas famílias 10 e 11 (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; VARDAKOU et al., 2005; FAULDS et al., 2006). As xilanases pertencem à família 10 (GH10), e tipicamente possuem alto peso molecular ($>30\text{kDa}$), baixo ponto isoelétrico e apresentam a estrutura de $(\alpha/\beta)_8$ na forma de barril, enquanto as da família 11 (GH11) consistem predominantemente de folhas β , possuem baixo peso molecular ($<30\text{kDa}$) e alto ponto isoelétrico. Apesar das diferenças estruturais, as xilanases da família 10 e da família 11 funcionam de maneira semelhante na hidrólise enzimática, (NATESH et al., 1999; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; CHANTASINH et al., 2006). Endoxilanases da família 10 são capazes de atacar ligações glicosídicas próximas às regiões de inserção de cadeias laterais e próximo às pontas não-redutoras diferente das endoxilanases da família 11 (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

As xilanases têm atraído um considerável interesse para pesquisa nos últimos anos devido ao potencial em várias aplicações biotecnológicas e em diversos processos industriais, incluindo clarificações em vinhos e sucos, produção de alimentos funcionais, alimentação animal, com destaque para a aplicação na indústria de papel e celulose atuando na redução do uso de cloro (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; SHARMA et al., 2008; HE et al., 2009). Outra característica importante é sua aplicabilidade na bioconversão de materiais lignocelulósicos e resíduos agrícolas em energia (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; KATAHIRA et al., 2004).

As xilanases são sintetizadas por microorganismos mesofílicos e termofílicos. Entre os fungos mesofílicos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são grandes produtores de xilanase (POLIZELI et al., 2005). Fungos termofílicos produzem

hidrolases com importantes características, como alta termoestabilidade, atividade ótima em temperaturas altas e altas taxas de hidrólise (KALOGERIS et al., 2003). O emprego de temperaturas mais elevadas aumenta a velocidade do processo e evita contaminação por microrganismos (DA SILVA et al., 2005). Devido à essas características grandes esforços têm sido feito para isolamento de microrganismos termofílicos e extremofílicos que produzem enzimas com grande estabilidade térmica. As xilanases de fungos termofílicos possuem temperatura ótima entre 60 e 80°C e são bastante estáveis nesse intervalo de temperatura (POLIZELI et al., 2005).

Fungo filamentosso *Thermoascus aurantiacus*

O fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* é um ascomiceto isolado em pilhas de feno autoaquecidas, por Hugo Miehe em 1907 e foi descrito por Cooney e Emerson (1964). Esse fungo foi também encontrado em outros ambientes como esterco de aves, tabaco, solo, cavacos de madeira, entre outros (MACHUCA, 1991). *T. aurantiacus* apresenta ascósporos elípticos de coloração alaranjada e não apresenta estágio assexuado (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008).

Esse fungo apresenta capacidade de crescer eficientemente e degradar uma grande variedade de substratos lignocelulósicos. Diferentes linhagens *T. aurantiacus* tem sido consideradas como boas produtoras de endoglucanases e/ou xilanases termoestáveis, produzindo taxas relativamente altas de xilanase, endoglucanase e β -glicosidases associada a baixas taxas de exocelulases e mananases. As enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelo *T. aurantiacus* são bastante estáveis a variações de temperatura e pH, além de apresentarem grande potencial de aplicações industriais (KALOGERIS et al., 1999; GOMES et al., 2000, DA SILVA et al., 2005; GOMES et al., 2007).

T. aurantiacus produz a maioria das enzimas hemicelulolíticas, sendo a xilanase a principal enzima encontrada na cultura. As diferentes linhagens desse fungo apresentam xilanases entre 33 a 39,7kDa, e estão otimamente ativas em temperaturas entre 70 e 75°C e pH 5. A xilanase produzida pelo *T. auranticus* (Figura 4) é considerada pertencente à família 10 na classificação das glicosil hidrolases, de acordo com as propriedades catalíticas (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008).

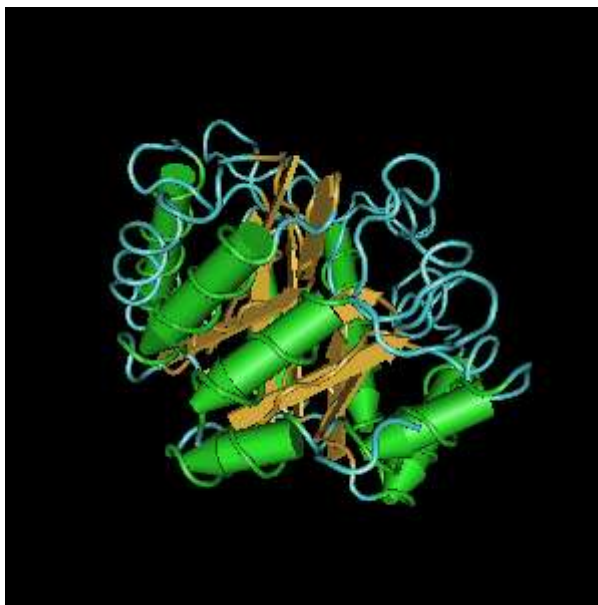


Figura 4: Estrutura tridimensional da β -1,4-endoxilanase de *T. aurantiacus* (NCBI, 2010).

O grande interesse nas enzimas termoestáveis produzidas por *T. aurantiacus* e sua aplicabilidade em processos biotecnológicos já resultou em alguns estudos de clonagem e expressão dos genes dessas enzimas em diferentes microrganismos. O gene da celobiohidrolase (*cbh1*) foi clonado e expresso com sucesso em *Saccharomyces cerevisiae* (HONG et al., 2003) assim com o gene da β -glucosidase (*bgl1*) que foi expresso em *P. pastoris*. Nesse caso, a expressão obteve sucesso quando o gene foi fundido com a sequência sinal fator α de *S. cerevisiae* (HONG et al., 2007).

Expressão heteróloga

Nas últimas décadas, geneticistas aprenderam como manipular o DNA para identificar e mudar o local dos genes em uma variedade de organismos diferentes do original. O maior uso para a maioria desses organismos recombinantes é a produção de proteínas, que em sua maioria apresentam grande valor comercial. Diante disso, muitos estudos têm focado em encontrar meios de produzi-las eficientemente em uma forma funcional (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). A expressão heteróloga é uma importante ferramenta para isolamento de novos genes e caracterização de proteínas (FROMMER; NINNEMANN, 1995).

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* tem sido extensivamente usada como hospedeiro para expressão proteica. O sucesso na expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* depende das características primárias, secundárias, terciárias e funcionais da proteína, por ser um procarioto a inabilidade de realizar os dobramentos corretos e outras modificações pós-transcricionais limita os tipos de enzima que podem ser expressos (DALY; HEARN, 2005).

Nos últimos anos, várias leveduras têm sido utilizadas como sistemas de expressão visando uso comercial devido ao crescimento robusto e algumas de suas características particulares (SREEKRISHNA et al., 1997). Esses microrganismos apresentam características tanto de procariotos (manipulação genética e características de crescimento) quanto de eucariotos (maquinaria celular para realizar modificações pos-transcricionais). *S. cerevisiae* foi selecionada primeiramente para atuar como hospedeiro em estudos de expressão heteróloga, devido ao vasto conhecimento a respeito de sua genética e fisiologia (BALAMURUGAN; REDDY; SURYANARAYANA, 2007). Outra levedura também importante para expressão

heteróloga é *P. pastoris*, que provou ser um excelente hospedeiro para produção de proteínas secretadas e produzidas intracelularmente (SREEKRISHNA et al., 1997).

Pichia pastoris

A habilidade de algumas espécies de leveduras em utilizar metanol como fonte de carbono, sendo *P. pastoris* uma delas, atraiu grande interesse para exploração desses microrganismos nos anos 70 como fonte de *single-cell protein* (SCP). Nesse período, a empresa Phillips Petroleum Company desenvolveu meios e métodos para o cultivo de *P. pastoris* utilizando metanol. No entanto, a produção de SCP dessa maneira tornou-se pouco atrativo devido ao aumento do custo do metanol (GREGG et al., 2000; COS et al., 2006).

P. pastoris surgiu como uma importante levedura para biotecnologia uma década depois quando a Phillips Petroleum Company associada ao Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc. utilizou essa levedura metilotrófica como um sistema de expressão de proteínas heterólogas, tornando-se uma possibilidade interessante para aplicações acadêmicas e industriais (COS et al., 2006).

Nos últimos anos, *P. pastoris* tem recebido grande aceitação como sistema de expressão para a produção de proteínas heterólogas (CEREHINO; CREGG, 2000). Sua ampla utilização deve-se a diversos fatores que incluem: o uso de um forte promotor indúzível derivado do gene *AOX1* (álcool oxidase I) que permite expressão controlada em meio com metanol; a similaridade das técnicas necessárias para a manipulação molecular com as técnicas utilizadas para *S. cerevisiae*; e a preferência de *P. pastoris* por crescimento aeróbio (CREGG et al, 2000).

A expressão de qualquer gene heterólogo em *P. pastoris* requer três passos básicos: a inserção do gene em um vetor de expressão; a introdução do vetor no genoma

da levedura e; exame do potencial de expressão do produto do gene inserido (CEREGHINO; CREGG, 2000). A maioria dos vetores de expressão possuem um cassete de expressão composto por um fragmento de 0,9 kb, constituído da sequência promotora *AOXI* e por um pequeno fragmento derivado de *AOXI* com as sequências requeridas para a terminação da transcrição. Entre essas duas sequências está o local para inserção do gene heterólogo (CEREGHINO, CREGG, 2000; CREGG et al, 2000). Além dos promotores induzíveis, como o *AOXI*, promotores constitutivos têm sido utilizados com sucesso em *P. pastoris* (ALMEIDA et al., 2005).

P. pastoris apresenta um grande potencial para realização de modificações pós-transcricionais, como processamento da sequência sinal, formação de pontes de dissulfeto e glicosilações, sendo uma das maiores vantagens diante da expressão em bactérias (CEREGHINO, CREGG, 2000). Outra vantagem é o fato de ser um organismo que cresce rapidamente em meios de baixo custo, como *E. coli*, sendo, então, uma forma viável, rápida e barata para estudo de proteínas mutantes, além de ser um grande produtor dessas proteínas (CREGG et al, 2000).

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, J. R. M.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGKI*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, p. 725-737, 2005.
- BALAMURUGAN, V.; REDDY, G. R.; SURYANARAYANA, V. V. S. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 175-186, 2007.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 120-130, 2008.

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

CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P. EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 143-149, 2006.

CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 413-433, 2006.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

COS, O.; RAMÓM, R.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 17, 2006.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 23-52, 2000.

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONI, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase e CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Mieh. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of molecular recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.

FAULDS, C. B.; MANDALARI, G.; LO CURTO, R. B.; BISIGNANO, G.; CHRISTAKOPOULOS, P.; WALDRON, K. W. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 71, p. 622-629, 2006.

FROMMER, W. B.; NINNEMANN, O. Heterologous expressions of genes in bacterial, fungal, animal and plants cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 419-444, 1995.

GÍRIO, F. M.; CAVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial Polysaccharides and Polyesters. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**, New York: W. H. Freeman, p.265-272, 1995.

GOMES, I.; GOMES, J.; GOMES, D. J.; STEINER, W. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 461-468, 2000.

GOMES, J.; TERLER, K.; KRATZER, R.; KAINZ, E.; STEINER, W. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: Isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 969–975, 2007.

HE, J.; YU, B.; ZHANG, K.; DING, X.; CHEN, D. Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 56, 2009.

HONG, J.; TAMAKI, H.; KUMAGAI, H. Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 7, p. 1331-1339, 2007.

HONG, J.; TAMAKI, H.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 63, p. 42-50, 2003.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 155-163, 1998.

KATAHIRA, S.; FUJITA, Y.; MIZUIKE,; FUKUDA, H.; KONDO, A. Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanotic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5407-5414, 2004.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

MACHUCA, A. *Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): aspectos de crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1991.

NATESH, R.; BHANUMOORTHY, P.; VITHAYATHIL, P. J.; SEKAR, K.; RAMAKUMAR, S.; VISWAMITRA, M. A. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 288, p. 999-1012, 1999.

NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> >. Acesso em: 15 de setembro de 2010.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SHARMA, M.; CHADHA, B. S.; KAUR, M.; GHATORA, S. K.; SAINI, H. S. Molecular characterization of multiple xylanase producing thermophilic/thermotolerant fungi isolated from composting materials. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 526-535, 2008.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D. T.; TSAY, J. T.; SMITH, P. L.; WIERSCHE, J. D.; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L. A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, p. 55-62, 1997.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi e bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 39-67, 1997.

VARDAKOU, M.; FLINT, J.; CHRISTAKOPOULOS, P.; LEWIS, R. J.; GILBERT, H. J.; MURRAY, J. W. A family 10 *Thermoascus aurantiacus* xylanase utilizes arabinose decorations of xylan as significant substrate specificity determinants. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, p. 1060-1067, 2005.

WHISTLER, R. L.; RICHARDS, E. L. In: Pigman, W. and Horton, D. (eds) **The Carbohydrates**, v. II, e. 2, Academic Press. New York, p. 447-469, 1970.

Capítulo 1

**Clonagem, expressão e caracterização do gene da
xilanase (*xynA*) de *Thermoascus auranticus* em *Pichia
pastoris***

Resumo

A levedura *P. pastoris* foi utilizada nesse trabalho como hospedeira do gene da xilanase (*xynA*) da linhagem de *T. aurantiacus* CMAI756. A xilanase recombinante foi caracterizada e comparada com a nativa. O gene *xynA* foi isolado por RT-PCR e a enzima nativa e recombinante foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótimos e estabilidade frente a variações de pH e temperatura. O pico de produção da enzima produzida por *T. aurantiacus* (433,67U/mL) foi observado em 216h de fermentação, e a caracterização físico-química indicou que essa enzima é mais ativa em pH 5,0 e a 75°C, sendo estável em ampla faixa de pH (3,5-10,5 por 24h) e temperatura (35-75°C, por 1h). A enzima recombinante apresentou pico de produção (641,16 U/mL) em 96h de fermentação, sendo mais ativa em pH 5,0 e a 60°C, também estável em ampla faixa de pH (3,5-10,5 por 24h) e temperatura (35-80°C, por 1h). Esse foi o primeiro relato de expressão do gene *xynA* em *P.pastoris*, além disso as características observadas em nossas análises mostraram-se bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico, permitindo então outros estudos para adequar a aplicação dessa enzima em processos industriais.

1. Introdução

Xilanas são polissacarídeos complexos compostos por uma cadeia principal de resíduos de xilose, representam os principais componentes hemicelulolíticos da parede celular, usualmente representando de 30 a 35% do peso seco total. A maioria das xilanas ocorre como heteropolissacarídeos composto por uma cadeia principal de resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, que apresentam diferentes grupos substituintes (BEG et al., 2001; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; HE et al., 2009).

Diante da heterogeneidade da xilana a sua hidrólise completa requer uma grande variedade de enzimas atuando cooperativamente, destacando-se as endo- β -1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) que atuam na hidrólise da cadeia principal (LIU;LIU, 2007; COLLIN; GERDAY; FELLER, 2005; HE et al., 2009). Nos últimos anos essas xilanases têm atraído grande interesse na pesquisa devido ao grande potencial de aplicação industrial, como no biobranqueamento na indústria de papel e celulose, indústria alimentícia, de alimentação animal e têxtil (HE et al., 2009; RUANGLEK et al., 2006). Outra importante aplicação dessa enzima é na bioconversão de materiais lignocelulósicos e resíduos agrícolas em energia (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; KATAHIRA et al., 2004). As xilanases são encontradas em plantas, algas, insetos, protozoários e microorganismos. Entre os produtores microbianos, os fungos filamentosos são conhecidos como produtores de altos níveis de xilanase (CHANTASINGH et al., 2005).

Fungos termofílicos produzem hidrolases com importantes características, como alta termoestabilidade e temperaturas ótimas altas (MERHEB et al., 2007). *Thermoascus aurantiacus* é um ascomiceto termofílico isolado por Hugo Miehe em

1907 (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008). Esse fungo apresenta a capacidade de degradar uma grande variedade de substratos celulósicos e lignocelulósicos e produz relativamente grandes níveis de xilanase, endoglucanase e β -glicosidase.

Pichia pastoris ultimamente tem recebido grande aceitação como sistema de expressão para a produção de proteínas heterólogas (CEREGHINO; CREGG, 2000). Como eucarioto essa levedura apresenta muitas vantagens na expressão heteróloga, como processamento protéico, modificações pós-traducionais, técnicas semelhantes a *Saccharomyces cerevisiae*, além da capacidade de crescer em altas densidades celulares (CREGG et al, 2000; HE et al., 2009). Nesse trabalho utilizamos a levedura *P. pastoris* como hospedeira do gene da xilanase (*xynA*) da linhagem de *T. aurantiacus* CMAI756. A xilanase do extrato bruto produzido pela levedura mutante foi caracterizada e comparada com a do extrato bruto nativo.

2. Material e métodos

2.1 Linhagens de microorganismos e plasmídeos

Thermoascus aurantiacus CBMAI756 foi isolado de troncos de árvores em decomposição em Manaus, AM, identificado no laboratório de micologia CPQBA, Unicamp, Campinas, SP e depositado na Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria. A linhagem de *Escherichia coli* DH5 α (Gibco BRL) foi utilizada para propagação dos plasmídeos (Tabela 1 e Anexos 1 e 2) e a linhagem de *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen) para expressão da xilanase.

Tabela 1: Vetores utilizados em *E. coli* e *P. pastoris*.

Vetor	Tipo de vetor	Tamanho	Característica principal	Origem
pGEMT	Vetor de clonagem	3 Kb	Vetor de clonagem de produto de pCR	Promega
pPIC9	Vetor de integração	8 Kb	Resistência a ampicilina Gene de seleção <i>HIS4</i>	Invitrogen

2.2 Extração de RNA e obtenção do cDNA

O RNA mensageiro do gene *xynA* foi extraído com o uso do kit *–RNeasy Mini Kit*” (Qiagen) e tratado com DNase I, de acordo com as recomendações dos produtores. Os RNAs foram analisados em gel de agarose 1%.

O cDNA desse gene foi obtido através da técnica de PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) com o kit *–Superscript III first-strand synthesis system for RT-PCR*” (Invitrogen) de acordo com as recomendações do produtor. Os primers usados para a PCR foram baseados na sequência do gene *xynA T. aurantiacus* depositada no NCBI (número de acesso AF127529.1). As reações de PCR foram constituídas de 1X tampão de reação, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de *primer foward* e de *reverse* (Tabela 2), e 1 unidade *Platinum Taq* DNA polimerase. As condições utilizadas foram 94°C por 1 minuto e 72° por 2 minutos em 30 ciclos.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene da xilanase.

Primer	Sequência
XYN-F	5'-CGAATTCCAAGCTGCACAGAGTGTCGAC
XYN-R	5'-TGCGGCCGCTCACTGCTGCAGGTCCTGCA

O produto de PCR foi purificado com o kit *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen), segundo as recomendações do produtor. O DNA foi analisado em gel de agarose 1%.

2.3 Construção do plasmídeo de expressão

O produto de PCR, que consiste do gene da xilanase de *T. aurantiacus* na ausência do peptídeo sinal nativo, foi clonado no pGEMT (Anexo 1), esse mesmo material foi sequenciado para confirmação com a sequência depositada no NCBI. O plasmídeo pGEMTxyn foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α e mutantes positivos foram identificados em meio LB-ágar (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% e ágar 2%) contendo X-gal e transferidos para meio LB líquido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) para isolamento do plasmídeo através da preparação de DNA plasmidial em pequena escala (*miniprep*) (adaptado de SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 2001)

O inserto da xilanase clonado em pGEMT foi excisado utilizando as enzimas *EcoRI* e *NotI* e posteriormente clonado no vetor pPIC9 (Anexo 2) previamente digerido com as mesmas enzimas, resultando no pPIC9xyn. As ligações foram feitas utilizando a T4 ligase sob as condições do produtor. O plasmídeo de expressão gerado foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α e os mutantes positivos foram selecionados em meio LB líquido com ampicilina (50 mg/mL). Plasmídeo dos clones selecionados foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição *SacI*, *EcoRI* e *NotI* para confirmação.

2.4 Transformação de *P. pastoris* e seleção dos clones produtores

Para integração em *P. pastoris*, 10 μ g de plasmídeo recombinante, pPIC9xyn (Anexo 3), foi linearizado com *BglII* e transformado em *P. pastoris* GS115 por eletroporação a 2500V, 400 Ω e 25 μ F. Os transformantes foram selecionados em placas com meio mínimo com glicose e sem histidina (YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵%, ágar 2% e glicose 2%). O *screening* dos transformantes em meio mínimo com xilana (YNB

1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, ágar 2%, xilana *birchwood* 1% e metanol 0,5%), para observação de halos de hidrólise com coloração de *Congo Red*.

2.5 Produção de xilanase pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756

O fungo filamentoso foi cultivado em meio nutriente conforme descrito por Mandels e Sternberg (1976) com pequena modificação (xilana 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, extrato de levedura 0,5%, peptona 0,2%, K_2HPO_4 0,1%, KH_2PO_4 0,7% e solução micronutriente 0,05%), em 12 frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio em cada, nos quais foram inoculados 5 mL de suspensão de massa micelial (equivalente a 30 mg massa seca/mL), a 50°C e 100 rpm. O fungo foi cultivado por 48 horas para extração do RNA total e por 288 horas para testes enzimáticos. Neste último caso a cada 24 horas 50 mL de cultura foi retirado e filtrado a vácuo. As hifas foram secas em estufas e utilizadas para peso seco, e o filtrado foi centrifugado e o sobrenadante utilizado na caracterização do extrato bruto.

2.6 Indução de *P. pastoris* em frascos

Uma colônia isolada foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato pH 6,0 100 mM, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$ e glicerol 1%) em frasco de 250mL e incubada a 37°C sob agitação (200rpm) até atingir uma OD_{600} de 2 a 6 (em torno de 16 a 18 horas). As células foram então coletadas por centrifugação a $1500 \times g$ por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspensas em 100 mL e 250 mL de meio BMMY (BMGY trocando glicerol 1% por metanol 0,5%) em Erlenmeyer haletado de 1L, obtendo uma OD_{600} 0,4 e incubadas por 96 horas sob as mesmas condições. Metanol 100% foi adicionado a cada 24 horas a uma concentração final de 0,5%, para manter a

indução dos transformantes. Nesse mesmo intervalo foi retirado 5 mL de cultura, que foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para atividade enzimática e perfil proteico em gel SDS-PAGE.

2.7 Determinação da atividade de xilanase

A atividade da xilanase foi determinada por ensaio de detecção de açúcares redutores gerados pela hidrólise do substrato xilana *birchwood* (Sigma). O ácido dinitrosalicílico (DNS) foi utilizado para detecção dos açúcares redutores. Os ensaios foram realizados da seguinte maneira: 0,1 mL do extrato enzimático e 0,9 mL de solução de substrato (xilana *birchwood* 1%, em solução tampão acetato 0,1M, pH 5,0). A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de xilose por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

2.8 Caracterização físicoquímica da xilanase

2.8.1 Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade das enzimas

Para a determinação do pH ótimo, as atividades enzimáticas foram realizadas em uma ampla faixa de pH (3,5 - 10,5). A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, as mesmas foram incubadas, por 24 h, em soluções tampão de diferentes valores de pH e, após este período, a atividade residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação. Para essas análises foram utilizadas os seguintes tampões: tampão Glicina-Ac. clorídrico 0,1M (pH 2,0 a 3,0), tampão Acetato de sódio

0,1M (pH 3,0 a 5,0), tampão Tris-aminometano 0,1M (pH 5,5 a 8,0), tampão fosfato 0,1M (pH 6,0 a 8,0) e tampão Glicina 0,1M (pH 8,5 a 10,5).

2.8.2 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade das enzimas

A temperatura ótima de atividade foi avaliada mantendo-se a mistura de reação em diferentes temperaturas (30 – 80°C), no pH ótimo de atividade. A termoestabilidade foi avaliada incubando-se as enzimas, por 1 h, a temperaturas de 30 a 80°C, seguida da determinação da atividade residual, sob as condições ótimas.

2.9 Análise em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel de poliacrilamida desnaturante segundo a descrição de Laemmli (1970). Antes da aplicação no gel as amostras foram precipitadas com TCA e acetona, posteriormente fervidas por 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X a uma voltagem constante de 100V. As bandas proteicas foram visualizadas com a solução corante *Comassie Blue*.

3. Resultados e Discussão

3.1 Indução da produção de xilanase pelo *T. aurantiacus* CBMAI 756, detecção e caracterização da enzima no extrato bruto

A linhagem utilizada de *T. aurantiacus* foi inicialmente cultivada em meio Saboraud e, posteriormente, inoculada em meio nutriente para fungo filamentoso. A cada 24 horas um Erlenmeyer contendo 50 mL de extrato bruto foi retirado e seu conteúdo filtrado a vácuo. A massa micelial foi utilizada para determinação do peso seco e o sobrenadante para medida da atividade de xilanase. Durante a fase de indução,

o pico de produção do extrato bruto (433,67 U/mL) foi observado em 216 horas de fermentação. Os perfis de produção enzimática e crescimento celular observados nas 288 horas de fermentação submersa são mostrados na figura 1.

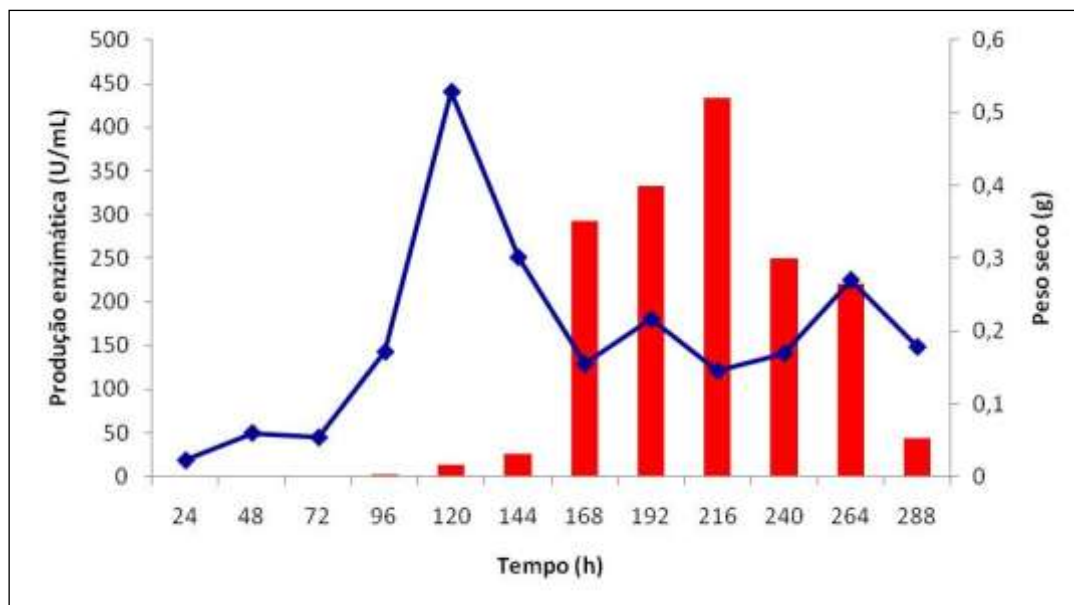


Figura 1: Perfis de Produção de xilanase (U/mL), barras vermelhas, e crescimento (g), azul, medido nas 288h de fermentação do *T. aurantiacus*.

Os níveis de xilanase produzido por *T. aurantiacus* em fermentação submersa foram bastante superiores ao observado por Nascimento e col. (2002) em trabalho com *Streptomyces sp.* AMT-3, cujo pico de produção foi 70 U/mL em 10 dias de cultivo em fermentação submersa utilizando xilana do tipo *larchwood* como substrato. O cultivo de *T. aurantiacus* em FES (Fermentação em Estado Sólido) também apresentou produções relativamente mais baixas do que as obtivemos, de 107 U/mL, 102 U/mL e 97 U/mL, em meios contendo sabugo de milho, grama e palha de milho respectivamente (DA SILVA et al., 2005).

A xilanase produzida pela linhagem *T. aurantiacus* CBMAI 756, em 216 horas de cultivo foi caracterizado quanto a pH e temperatura ótimos e estabilidade frente a

variações de pH e temperatura. A xilanase foi mais ativa em pH 5,0 (Figura 2) e 75°C (Figura 3), sendo estável em ampla faixa de pH (Figura 4), 2,5 a 10,5 após incubação por 24 horas, e de temperatura (Figura 5), 35°C a 75°C após incubação de 1 hora.

Trabalhos realizados por Da Silva e col. (2005) na xilanase de *T. aurantiacus* da mesma linhagem mostraram dados de temperatura e pH ótimos bastante similares aos que obtivemos, apesar dos diferentes tipos de fermentação, sendo a temperatura ótima em 75°C e pH ótimo entre 5,0 e 5,5. Gomes, Gomes e Steiner (1994) utilizando outra linhagem de *T. aurantiacus* encontraram valores ótimos de temperatura maior e de pH menor, 80°C e 4,5, respectivamente. A xilanase de *T. aurantiacus* utilizada nesse estudo, comparada a dados disponíveis na literatura, apresenta temperatura ótima superior a de outros fungos, como 70°C para *T. terrestris* e *S. cellulophilum*, 55°C para *Penicillium sp.* e *T. reesei* (DURAND; SOUCAILLE.; TIRABY, 1984), 60°C para *N. spinosa* (ALVES-PRADO et al., 2010) e 55°C para *R. oryzae* (BAKIR et al., 2001).

A estabilidade da xilanase de *T. aurantiacus* diante de variações de pH observada por Da Silva e col. (2005) foi bastante similar às encontradas em nossas análises, a enzima apresentou grande estabilidade após incubação por 24 horas em tampões com pH entre 2,5 e 10,0.

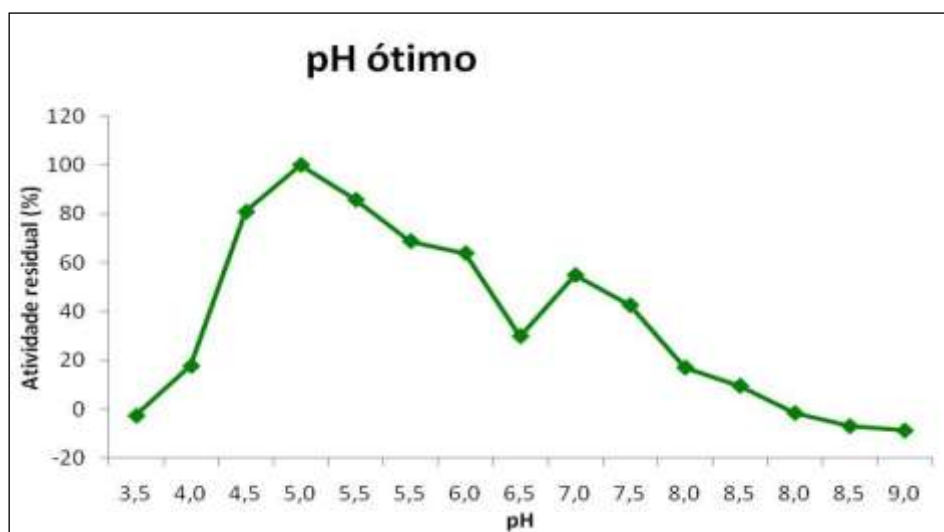


Figura 2: Efeito do pH sobre a xilanase no extrato bruto de *T. aurantiacus*.

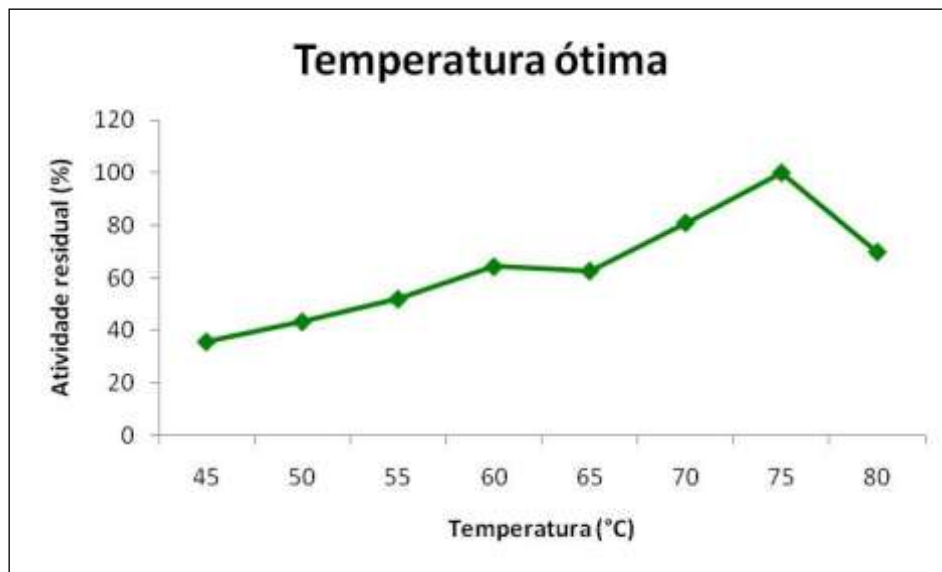


Figura 3: Efeito da temperatura sobre a xilanase no extrato bruto de *T. aurantiacus*.

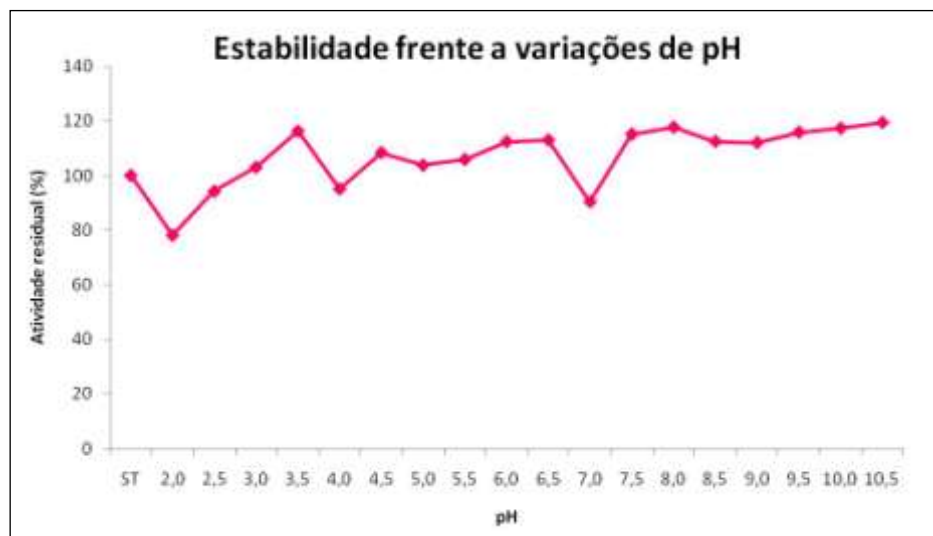


Figura 4: Estabilidade frente a variações de pH da xilanase no extrato bruto de *T. aurantiacus*. ST: sem tratamento.

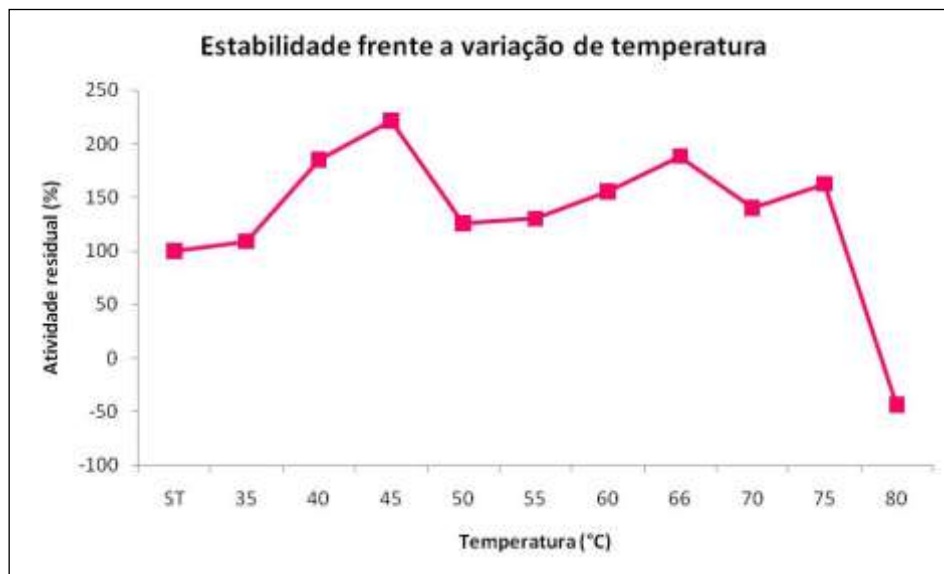


Figura 5: Estabilidade frente a variações de temperatura da xilanase no extrato bruto de *T. aurantiacus*. ST: sem tratamento.

3.2 Extração do RNA e síntese do cDNA

O RNA do gene da xilanase de *T. aurantiacus* extraído foi analisado em gel de agarose, onde foi detectado a contaminação com DNA genômico (Fig. 6 a). O RNA foi, então, tratado com DNaseI e novamente analisado em gel, no qual observamos o RNA intacto sem contaminação (Fig. 6 b).

Após a síntese da primeira fita de cDNA e a reação de PCR, o produto com ~900 pb foi analisado em gel de agarose 1% (Figura 7). O DNA foi purificado com o e observado em gel de agarose 1% e sua concentração foi estimada em 100 ng/μL.

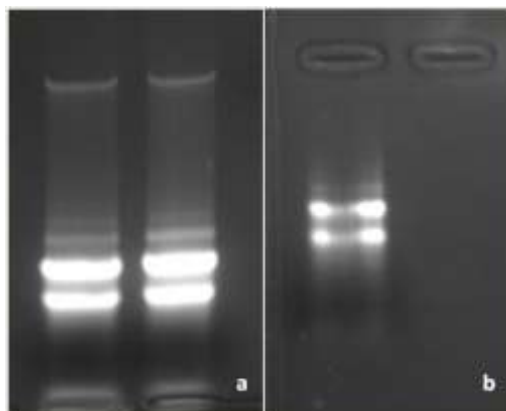


Figura 6: a) RNA contaminado com DNA genômico. b) RNA após o tratamento com a DNaseI, intacto e sem contaminação.

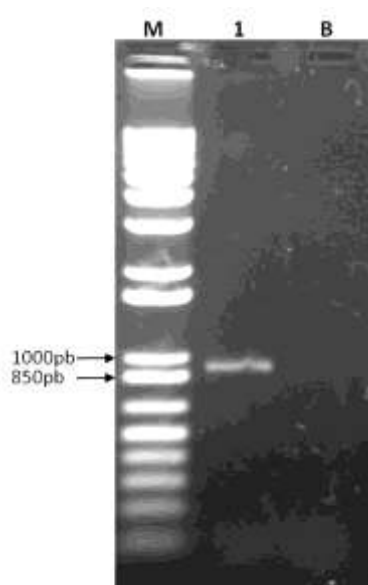


Figura 7: Amplificação do gene da xilanase por PCR. M: marcador 1000pb (Invitrogen); 1: material para amplificação; B: controle da reação de PCR.

3.3 Análise da sequência do gene da xilanase de *T. aurantiacus*

O cDNA do gene da xilanase de *T. aurantiacus* (*xynA*) foi amplificado por PCR. O desenho dos primers permitiu a amplificação do cDNA sem as sequências do peptídeo sinal nativo para que o gene fosse clonado em fase com sinal de secreção do fator α de *S. cerevisiae* presente no vetor pPIC9. A sequência de nucleotídeos

apresentou 912 pb e 99% de identidade (Anexo 4) como sequência existente no banco dados NCBI (AF127529.1). A sequência protéica foi predita com auxílio da ferramenta de bioinformática Molecular Toolkit (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/index.html>), apresentando 303 resíduos de aminoácidos e 99% de identidade com a sequência existente no banco de dados (Figura 8). Foram identificadas 3 mutações, 2 eram silenciosas e apenas uma chamou bastante a atenção ao substituir uma leucina por uma prolina no resíduo 91. No entanto, esta alteração está localizada em uma região de “loop” e não-conservada das xilanases da família 10 das glicosil hidrolases (NATESH et al., 1999). Analisamos a estrutura da proteína na presença da prolina e comparamos com a estrutura da sequência já descrita no NCBI, a identidade foi de 99,669% não gerando diferença na estrutura tridimensional (Figura 9 e 10).

Seq	1	QAAQSV	DQLIKARGKVYFGVATDQNRLTTGKNA	IIQADFGQVTPENSMKWDATEPSQGN	60
xynA	1	QAAQSV	DQLIKARGKVYFGVATDQNRLTTGKNA	IIQADFGQVTPENSMKWDATEPSQGN	60
Seq	61	FNFAGADYLVNWAQQNGKLIRGHTLVVHSQ	P	PSWVSSITDKNTLTNVMKNHITTLTRYK	120
xynA	61	FNFAGADYLVNWAQQNGKLIRGHTLVVHSQ	P	PSWVSSITDKNTLTNVMKNHITTLTRYK	120
Seq	121	GKIRAWDVVNEAFNEDGSLRQTVFLNVIGEDYIPIAFQTARAADPN	AKLYINDYNLDSAS	180	
xynA	121	GKIRAWDVVNEAFNEDGSLRQTVFLNVIGEDYIPIAFQTARAADPN	AKLYINDYNLDSAS	180	
Seq	181	YPKTQAIVNRVKQWRAAGVPIDGIGSQTHLSAGQGASVLQALPLL	SAGTPEVAITELDV	240	
xynA	181	YPKTQAIVNRVKQWRAAGVPIDGIGSQTHLSAGQGASVLQALPLL	SAGTPEVAITELDV	240	
Seq	241	AGASSTDYVNVVNACLVQSCVGITVWGVADPDSWRASTTPLL	FDGNFNP	KPAYNAIVQD	300
xynA	241	AGASSTDYVNVVNACLVQSCVGITVWGVADPDSWRASTTPLL	FDGNFNP	KPAYNAIVQD	300
Seq	301	LQQ	303		
xynA	301	LQQ	303		

Figura 8: Alinhamento da sequência primária predita da xilanase clonada nesse trabalho (Seq) com a proteína XynA. A mutação L→P está destacada em vermelho.

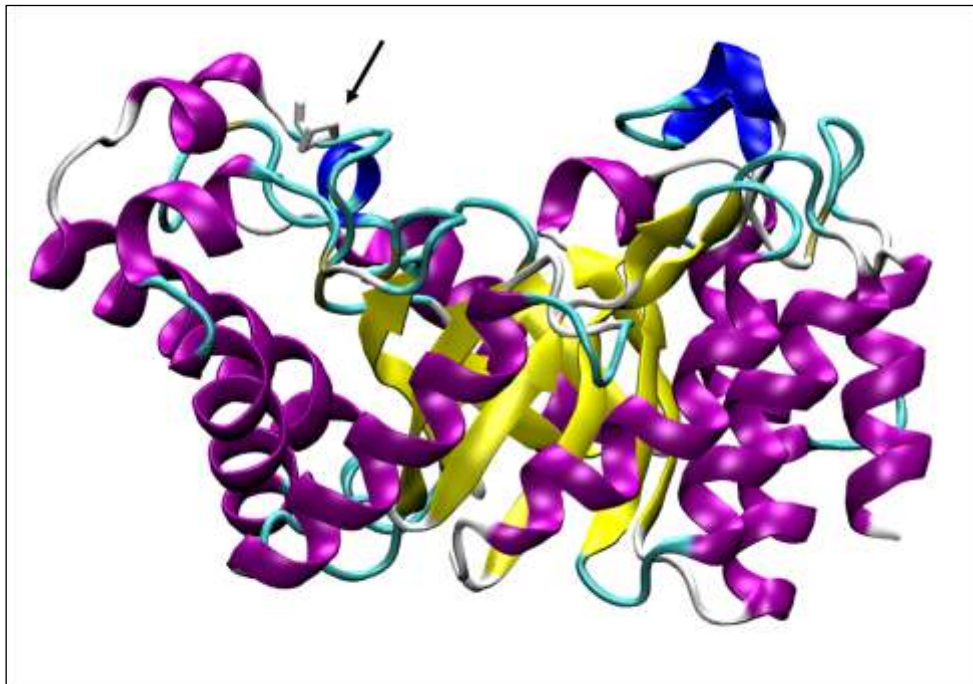


Figura 9: Estrutura da proteína recombinante sob a vista lateral com a prolina destacada com a seta.

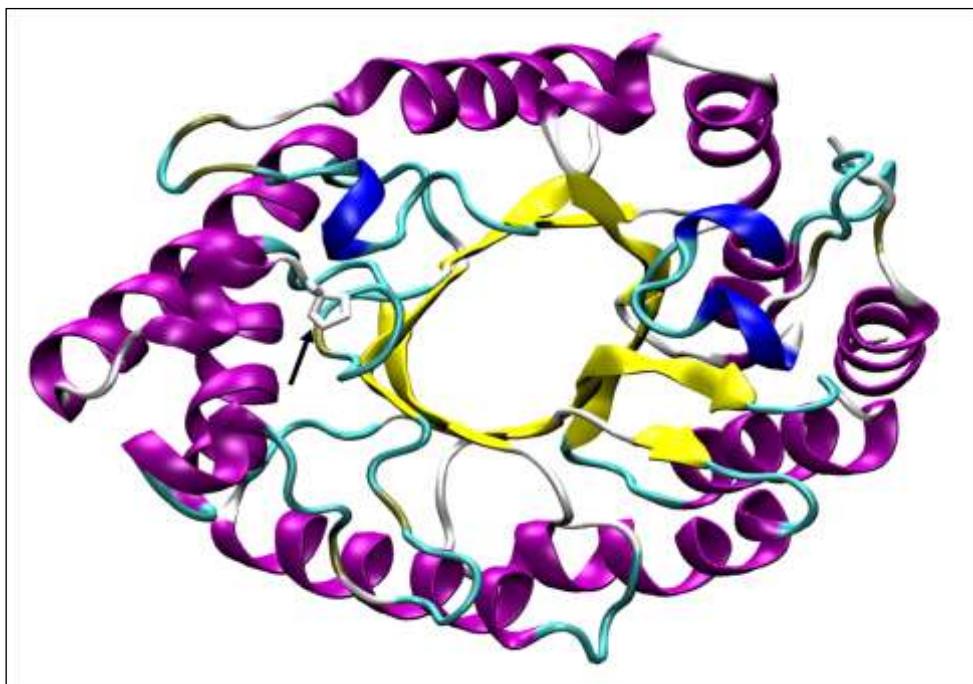


Figura 10: Estrutura da proteína recombinante sob a vista superior com a prolina destacada com a seta.

3.4 Construção do vetor de expressão induzida

A fim de analisar a expressão do gene da xilanase de *T. aurantiacus* em *P. pastoris* foi construído o vetor de expressão pPIC9xyn. A estratégia utilizada foi ligar o inserto correspondente ao gene da xilanase (926pb) ao vetor pGEM-T, posteriormente liberá-lo com as enzimas *EcoRI* e *NotI* e então ligá-lo ao vetor pPIC9 digerido com as mesmas enzimas. O vetor resultante foi utilizado para a transformação de *P. pastoris* GS115.

O amplicon purificado após a PCR foi clonado no vetor pGEM-T.. Após a transformação de *E. coli*, os clones obtidos foram submetidos ao procedimento de extração de DNA plasmidial e o material resultante foi digerido com a enzima de restrição *SaII* para seleção de um clone contendo inserto. Nessa digestão era esperado um fragmento de ~3000 pb e outro de ~920 pb. Um clone selecionado (pGEMTxyn) foi então digerido com *EcoRI* e *NotI* para liberação do inserto da xilanase (Figura 11), que posteriormente foi purificado utilizando o *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen).

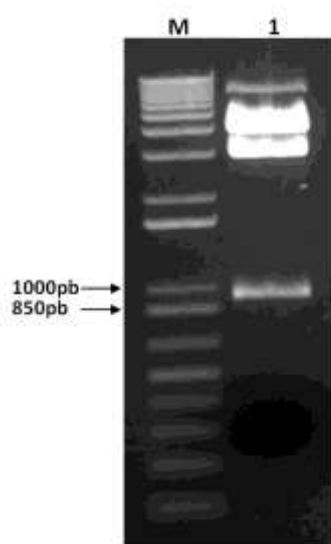


Figura 11: Gel de agarose da digestão *EcoRI* e *NotI*. M: marcador 1000 pb ladder (Invitrogen); 1: pGEMTxyn digerido com *EcoRI* e *NotI*.

O vetor pPIC9 digerido com as enzimas *EcoRI* e *NotI* foi purificado e ligado ao inserto da xilanase seguindo-se transformação bacteriana. Após a transformação, 12 clones foram submetidos ao procedimento de extração de DNA plasmidial. O material resultante foi digerido com a enzima *SacI* (Figura 12) para seleção de um clone. Os fragmentos esperados dessa digestão eram de aproximadamente 1300 pb e 7600 pb. Todos os clones, com exceção do 1 e 3, apresentaram perfil de bandas esperado. Os clones 2, 5 e 12 foram selecionados para dupla digestão *EcoRI* e *NotI* para a liberação do inserto de aproximadamente 900 pb correspondente à xilanase. A análise de restrição confirmou a presença do inserto no vetor de expressão (Figura 13). O vetor resultante de 8928pb foi denominado pPIC9xyn.

Para integração no genoma de *P. pastoris*, o vetor pPIC9xyn (clones 2 e 5) foram digeridos com a enzima de restrição *BglII* (Fig. 14) para a liberação do cassete de integração (~6,6 kb). Após a digestão, o fragmento liberado, que contém o cassete de expressão e sítio de *HIS4*, expõe nas extremidades a sequência do *locus AOX1* para direcionar a integração, que pode ocorrer no *locus AOX1* ou no *locus HIS4*. O vetor pPIC9 original foi também digerido com *BglII* e usado para transformação *P. pastoris*, para controle negativo da expressão. O vetor do clone 2 e do pPIC9 após linearizados foram utilizados na transformação de *P. pastoris*.

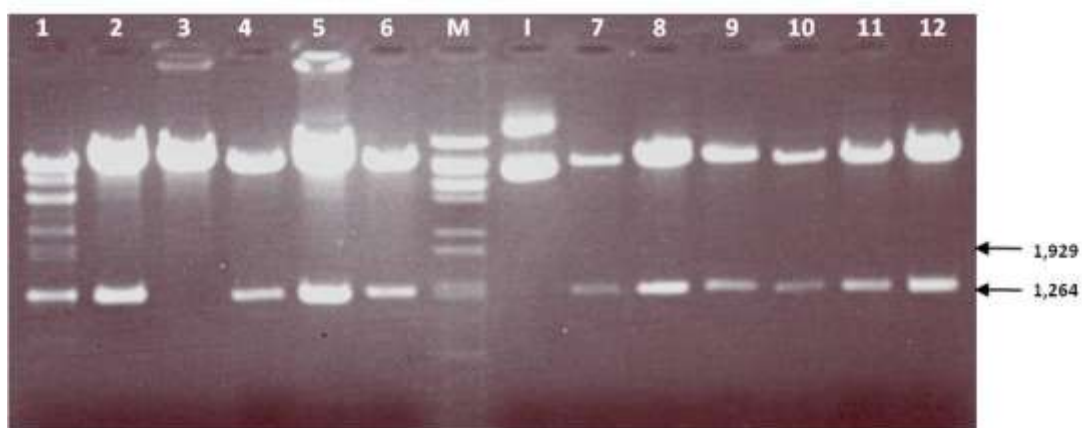


Figura 12: Gel de agarose das digestões com *SalI*. M: marcador λ BstEII; I: pPIC9xyn intacto; e 1 a 12 clones pPIC9 digeridos com *SacI*.

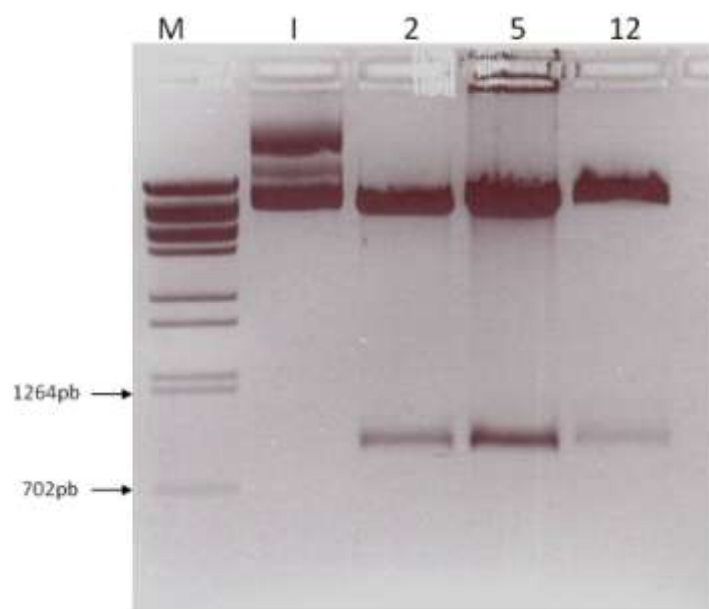


Figura 13: Gel de agarose das digestões com *EcoRI/NotI*. M: marcador λ BstEII; I: pPIC9xyn intacto; e 2, 5 e 12 clones pPIC9 digeridos com *EcoRI/NotI*.

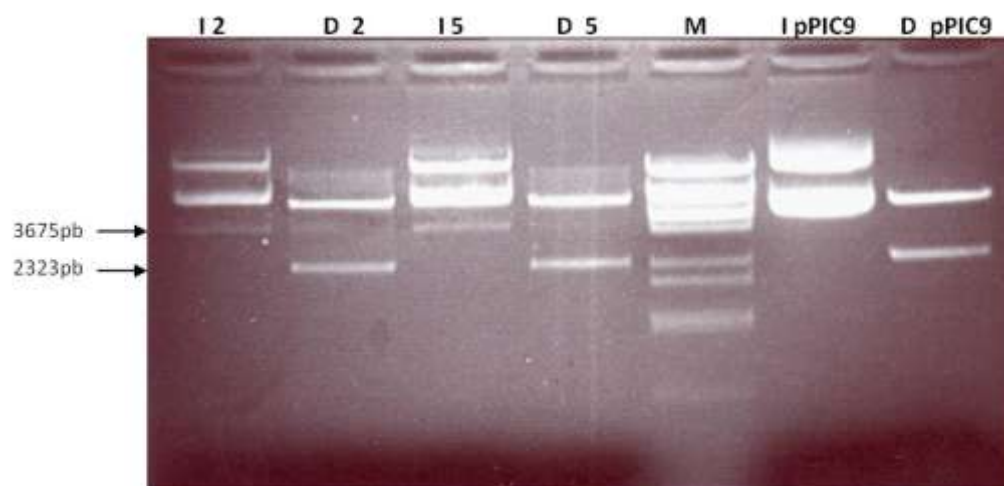


Figura 14: Gel de agarose das digestões com *Bg*/II. M: marcador λ *Bst*EII; I 2, I 5 e I pPIC9: vetor intacto dos clones 2, 5 e do pPIC9 ; e 2, 5 e pPIC9: vetor dos clones 2, 5 e pPIC9 digeridos com *Bg*/II.

3.5 Transformação de *P. pastoris* e detecção da atividade xilanolítica

A linhagem GS115 de *P. pastoris* foi transformada com os vetores de expressão induzida construídos, pPIC9xyn e pPIC9, devidamente linearizado como descrito acima. Os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo (MD-ágar), pois a presença do gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) nos vetores complementa a mutação auxotrófica *his4* presente na linhagem GS115 de *P. pastoris*.

A transformação resultou em aproximadamente 200 clones. Para o *screening* dos clones expressando a xilanase de *T. aurantiacus* os transformantes com pPIC9xyn e 4 transformantes com pPIC9 foram cultivados em meio mínimo com xilana (MM-xilana) e halos de hidrólise de diferentes tamanhos foram observados após coloração com *Congo Red* em 60 clones. Desses clones, 24 foram selecionados aleatoriamente para um novo cultivo em MM-xilana para observação dos halos de hidrólise (Fig. 15). Os controles negativos não apresentaram halos de hidrólise.

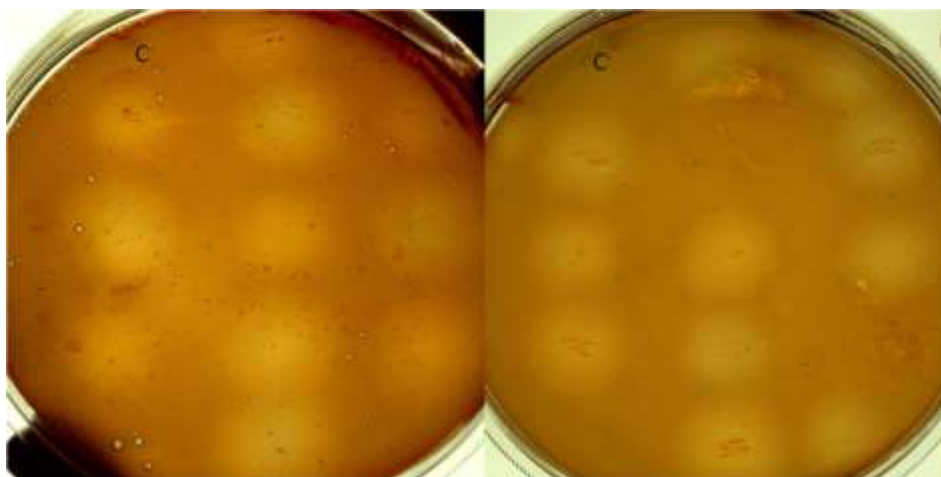


Figura 15: Placas de MM-xilana coradas com *Congo Red*, mostrando os halos de hidrólise dos clones selecionados, e a ausência de halo nos controles negativos.

Dois clones (20 e 26), com halos maiores, e um controle negativo foram selecionados para indução em frasco por 96 horas em meio BMMY, sendo a OD inicial do inóculo de 0,4. A cada 24 horas foram retirados 5 mL do sobrenadante para avaliação do crescimento (OD_{600}), atividade enzimática e perfil proteico em SDS-PAGE. A atividade enzimática (U/mL) foi quantificada utilizando DNS, que quantifica a quantidade de açúcar redutor resultante na reação enzimática. Os clones produtores e o controle negativo apresentaram o mesmo perfil de crescimento. Foi observada uma baixa atividade xilanolítica constitutiva no controle negativo e nos clones positivos antes da adição de metanol, que induz a expressão da xilanase clonada. No entanto, com a mudança de glicerol por metanol como fonte de carbono o promotor *AOXI* foi induzido, sendo então possível observar o aumento na atividade xilanolítica nas primeiras 24 horas de crescimento. Durante o cultivo houve um aumento gradual até o pico de produção observado em 72 horas (371,26 U/mL) e 48 horas (146,96 U/mL), nos clones 20 e 26, respectivamente. Na figura 16 está o perfil de crescimento e produção enzimática dos dois clones selecionados.

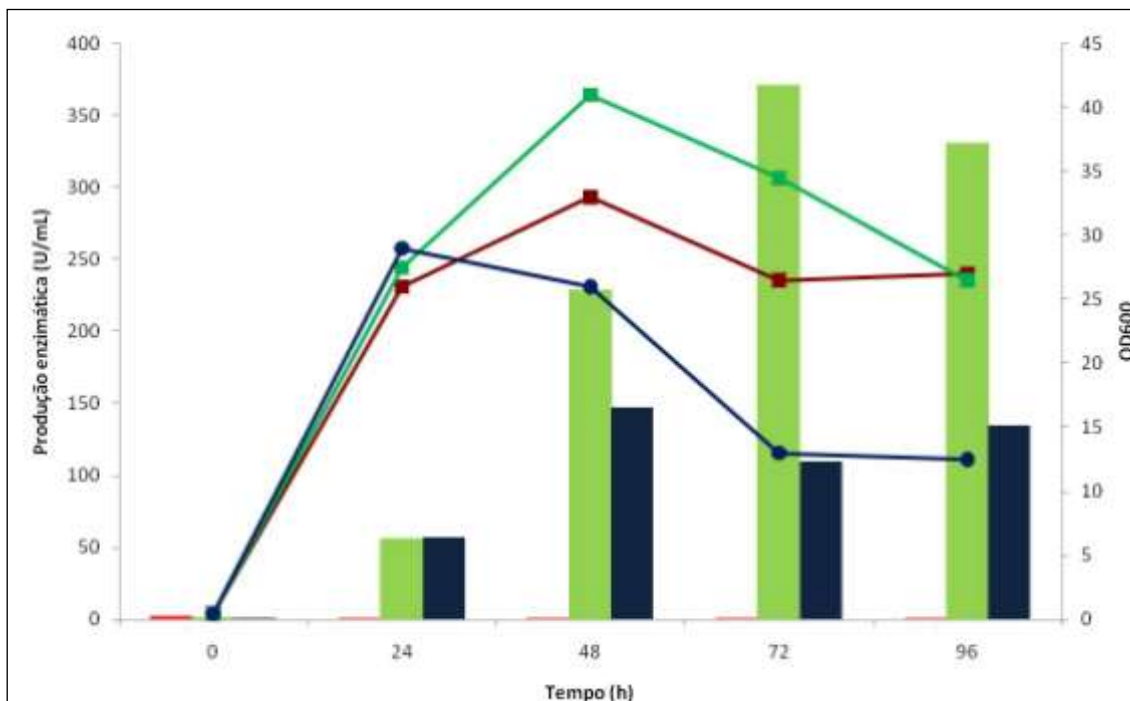


Figura 16: Perfil de crescimento (linhas) e produção de xilana (barras) dos clones 20 (verde) e 26 (azul) e do controle negativo (vermelho).

3.6 Otimização da produção da xilanase recombinante

Após a seleção do clone com maior produção, algumas modificações na indução foram realizadas a fim de aumentar a produção da xilanase recombinante. A indução em meio BMMY foi iniciada com OD_{600} de 0,2 e o volume do inóculo foi aumentado para 250 mL em frascos de 1L aletados. Durante as 96 horas de indução, a cada 24 horas foram novamente coletados 5 mL do sobrenadante para análise do perfil de crescimento (OD_{600}), produção enzimática e perfil proteico em gel desnaturante. O pico de produção nesse caso foi observado em 96 horas com (641,16 U/mL) (Figura 17).

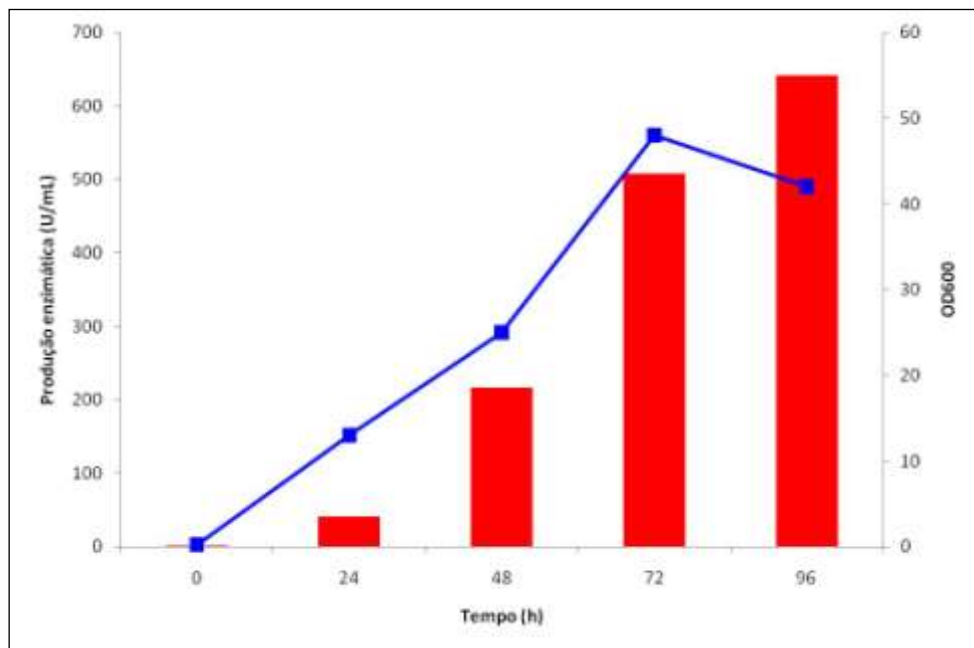


Figura 17: Perfis de Produção de xilanase (U/mL), barras vermelhas, e OD600, azul, medido nas 96h de fermentação do clone 20 de *P. pastoris*.

As proteínas do sobrenadante do pico de produção do clone 20 foram precipitadas e submetidas à análise em eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 18) a fim de detectar a enzima recombinante e determinar sua massa molecular. A partir do perfil de migração no gel foi possível identificar uma banda correspondente à enzima recombinante no sobrenadante dos dois clones e que não estava presente no perfil do controle negativo. A massa molecular foi estimada em ~33 kDa, estando bem próxima dos dados encontrados na literatura a respeito das xilanases de *T. aurantiacus* - 33 a 39,7 kDa (BRIENZO; ARANTE; MILAGRES, 2008).

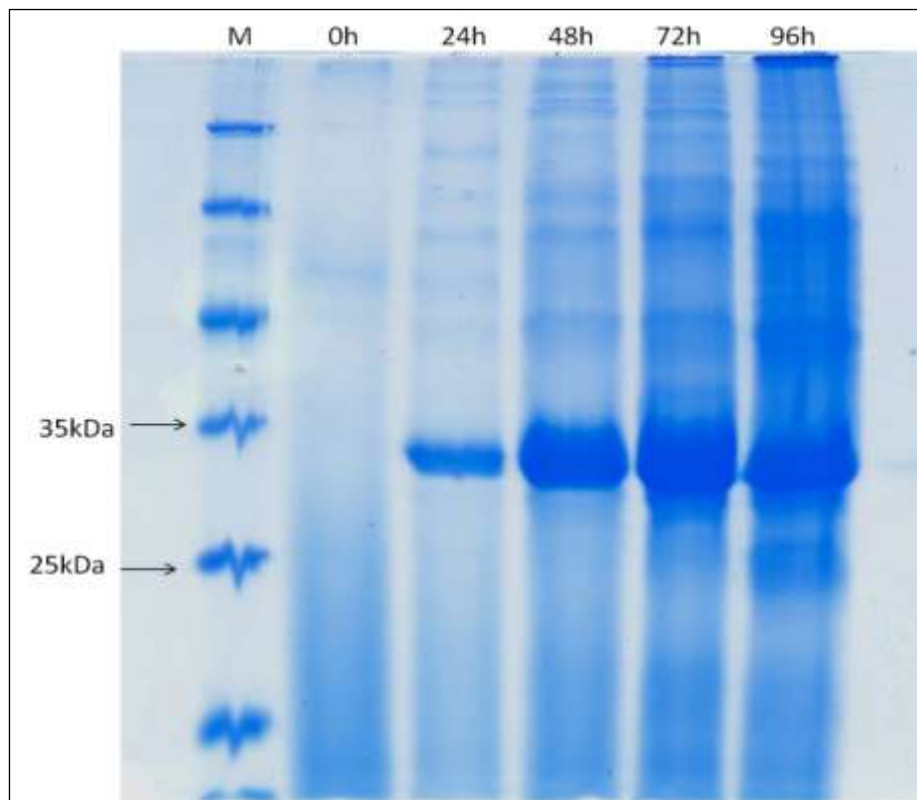


Figura 18: SDS-PAGE do sobrenadante do clone 20 das amostras retiradas a cada 24 horas ao longo das 96 horas de indução. M: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

O pico de produção da xilanase recombinante obtido com a indução em 250 mL de meio foi superior ao apresentado pelo *T. auranticaus* (433,67 U/mL), sendo esse um grande atrativo na produção da xilanase de *T. aurantiacus* pela levedura *P. pastoris*. Além disso, a produção pelo fungo pode apresentar o inconveniente de produzir inúmeras outras proteínas e enzimas que dificultam a obtenção da forma pura e até mesmo o uso em processos onde a presença de outras enzimas é indesejável. Assim, a expressão heteróloga se apresenta como uma importante ferramenta para produção de enzimas industriais, sendo a *P. pastoris* um dos hospedeiros preferidos para esse fim (CHANTASINGH et al., 2006).

Os dados obtidos pelo cultivo de *P. pastoris* em nossos experimentos mostraram uma boa produção de xilanase recombinante ao compararmos com dados encontrados

na literatura. Korona, Korona e Bielecki (2006) utilizaram duas xilanases de *Aspergillus niger* utilizando dois tipos de peptídeo sinal e obtiveram 37 U/mL e 38 U/mL quando utilizaram o peptídeo nativo e 27 U/mL e 34 U/mL com o peptídeo de *S. cerevisiae*. A produção heteróloga de xilanase de *T. fusca* obteve um pico de produção de 82, 29 U/mL ao expressar a enzima em *P. pastoris* com o vetor constitutivo pPICZαA (CHENG, YANG, LIU, 2005). Bastante similar aos nossos dados do clone 20 antes da otimização da indução (371,26U/mL) foi observado o pico de produção da xilanase recombinante de *P. cucumerina* em 72 horas de cultivo, 362 U/mL (ZHANG et al., 2006) e de *Thermomyces lanuginosus* em 96 horas de cultivo em 250mL de meio otimizado, 360 U/mL (DAMASO et al., 2003). Os dados obtidos após a otimização a atividade de xilanase observada no extrato bruto foram similares, mas ainda superiores, que a produção da xilanase de *Trichoderma reesei* obtida por He e col. (2010) em fermentador de 15L, 556 U/mL. A produção de xilanase que obtivemos foi inferior à produção obtida na expressão de xilanase de *Aspergillus usamii*, 1760 U/mL, por Zhou e col. (2009), no entanto eles utilizaram 2% a concentração final de metanol adicionado a cada 24 horas, enquanto no nosso experimento a concentração final foi de 0,5%.

A xilanase heteróloga produzida pelo clone mutante de *P. pastoris*, em 96 horas de cultivo, foi caracterizada quanto a pH e temperatura ótimos e estabilidade frente a variações de pH e temperatura. O pH ótimo observado foi 5,0 (Figura 19) assim como observado no extrato bruto, no entanto a temperatura ótima, 60°C (Figura 20), foi 15°C abaixo da xilanase nativa. Existem alguns possíveis motivos para explicar essa diferença, como o diferente padrão de glicosilação da proteína recombinante e nativa e a existência de alguns componentes no extrato bruto do fungo que permitiriam que essa enzima mantivesse sua atividade ótima em 75°C.

A estabilidade diante da variação de pH foi observado entre os pHs 3,5 a 10,5 e a xilanase recombinante manteve-se estável após incubação por 24 horas (Figura 21). Em relação à termoestabilidade, a enzima recombinante permaneceu estável após incubação por 1 hora na variação de temperatura entre 35 e 80°C (Figura 22). Após a incubação a 80°C a enzima no extrato bruto do *T. aurantiacus* perdeu toda sua atividade enquanto que a enzima recombinante manteve em torno de 40% da atividade.

Uma característica interessante foi observada após a incubação entre 35°C e 75°C por 1 hora provocou um aumento na atividade enzimática da enzima nativa, e ainda após a incubação a 45 °C, a atividade residual dobrou em relação à enzima que não passou pelo tratamento térmico, enquanto que a enzima recombinante manteve-se estável, mas não houve aumento em relação ao não tratado. A estabilidade térmica constitui uma propriedade muito importante quando há interesse de aplicação industrial, sendo assim a xilanase em questão mostra características bastante interessantes para esse fim. A xilanase utilizada nesse estudo parece ser tão estável quanto a de outras linhagens.

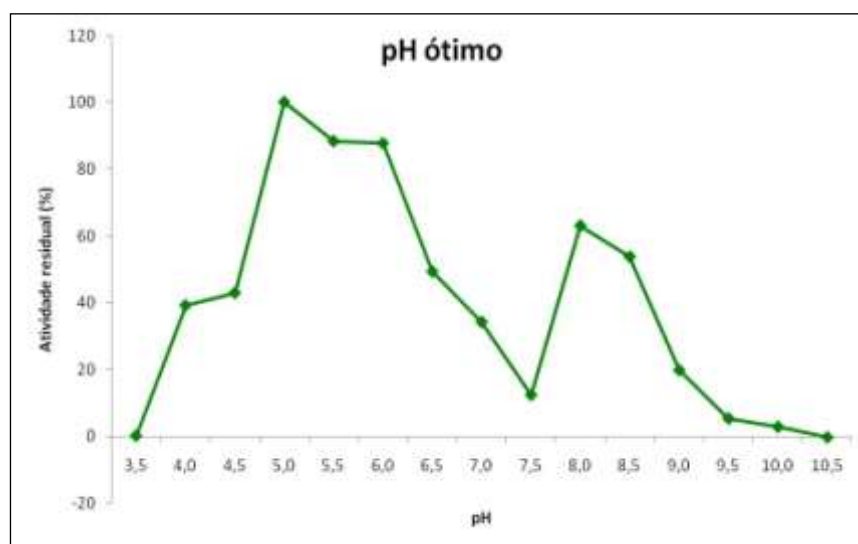


Figura 19: Efeito do pH sobre a xilanase recombinante no extrato bruto de *P. pastoris*.

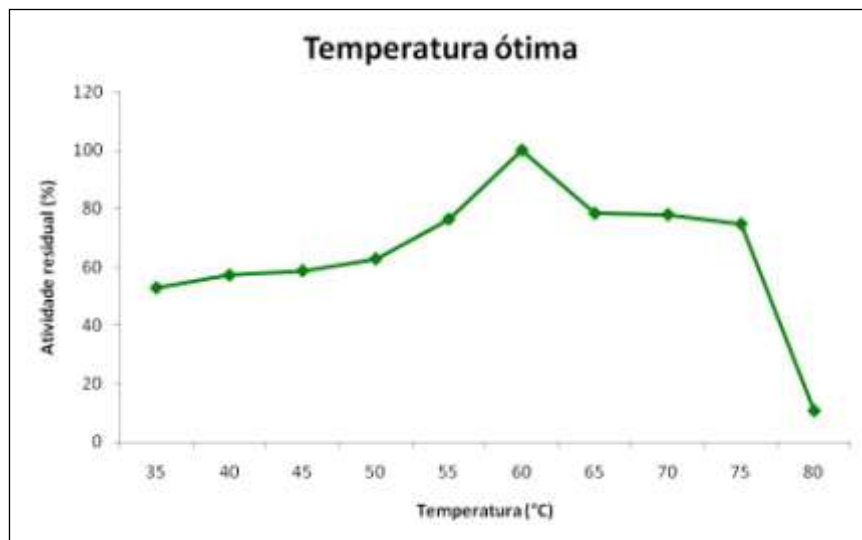


Figura 20: Efeito da temperatura sobre a xilanase recombinante no extrato bruto de *P. pastoris*.

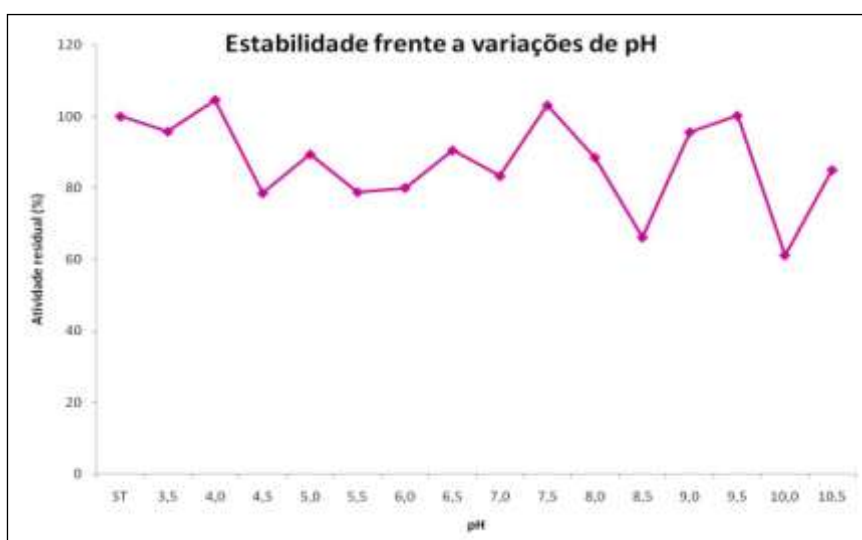


Figura 21: Estabilidade frente a variações de pH da xilanase recombinante no extrato bruto de *P. pastoris*. ST: sem tratamento

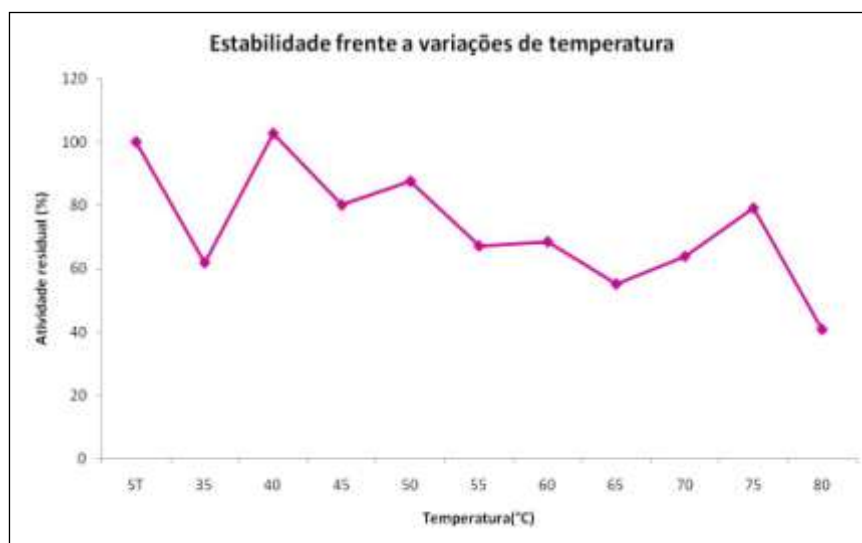


Figura 22: Estabilidade frente a variações de temperatura da xilanase recombinante no extrato bruto de *P. pastoris*. ST: sem tratamento

4. Conclusão

O gene *xynA* de *T. auranticaus* CBMAI756 foi clonado e expresso com sucesso em *P. pastoris*, sendo esse o primeiro relato de expressão heteróloga dessa xilanase. Outras enzimas desse fungo já haviam sido expressas em *P. pastoris*, como β -glucosidases (*bglI*) por Hong e col (2007). As análises mostraram características bastante interessantes no extrato bruto e na enzima recombinante indicando grande potencial de aplicação e a expressão heteróloga permitirá ainda maiores estudos a respeito da enzima para adequar o uso da mesma em processos industriais.

5. Referências Bibliográficas

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010.

- BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 328-334, 2001.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 120-130, 2008.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.
- CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P. EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 143-149, 2006.
- CHENG, Y. F.; YANG, C. H.; LIU, W. H. Cloning and expression of *Thermobifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 541-546, 2005.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 23-52, 2000.
- DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONI, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase e CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.
- DAMASO, M. C.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA Jr, N.; ANDRADE, C. M. M. C.; ALBANO, R. M. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied Environmental Microbiology** v. 69, n. 10, p. 6064-6072, 2003.
- DURAND, H.; SOUCAILLE, P.; TIRABY, G. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 175-180, 1984.

GOMES, D. J.; GOMES, J.; STEINER, W. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme.. **Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 11-22, 1994.

HE, J.; CHEN, D.; YU, B.; ZHANG, K. Optimization of the *Trichoderma reesei* endo-1,4-xylanase production by recombinant *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal** v. 52, p. 1-6, 2010.

HE, J.; YU, B.; ZHANG, K.; DING, X.; CHEN, D. Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 56, 2009.

HONG, J.; TAMAKI, H.; KUMAGAI, H. Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 7, p. 1331-1339, 2007.

KATAHIRA, S.; FUJITA, Y.; MIZUIKE,; FUKUDA, H.; KONDO, A. Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanotic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5407-5414, 2004.

KORONA, B.; KORONA, D.; BIELECKI, S. Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* directed by their native signal peptides and the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 683–689, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LIU, M. Q.; LIU, G. F. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. **Protein Expression and Purification**, v. 57, p. 101–107, 2008.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Partial characterization of protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2007.

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

NATESH, R.; BHANUMOORTHY, P.; VITHAYATHIL, P. J.; SEKAR, K.; RAMAKUMAR, S.; VISWAMITRA, M. A. Crystal Structure at 1.8 Å^o Resolution and Proposed Amino Acid Sequence of a Thermostable Xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 288, p. 999-1012, 1999.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BOM, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces sp.* strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 549-555, 2002.

RUANGLEK, V.; SRIPRANG, R.; RATANAPHAN, N.; TIRAWONGSAROJ, P.; CHANTASIGH, D.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p.19-25, 2007.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

ZHANG, G. M.; HUANG, J.; HUANG, G. R.; MA, L. X.; ZHANG, X. E. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 339-346, 2007.

ZHOU, C.; WANG, Y.; WU, M.; WANG, W.; LI, D. Heterologous Expression of xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris*. **Food Technology and Biotechnology** v. 47, n. 1, p. 90-95, 2009.

Capítulo 2

Purificação parcial e caracterização da xilanase

***Thermoascus aurantiacus* expressa em *Pichia pastoris*.**

Resumo

A xilanase expressa pela *Pichia pastoris* mutante foi parcialmente purificada e caracterizada. A purificação parcial foi realizada pelo método de troca iônica e na caracterização físico-química foi determinada pH e temperatura ótimos e estabilidade quanto a variações de pH e temperatura. A enzima parcialmente purificada apresentou maior atividade em pH 5,0 e temperatura de 60°C e estável uma ampla faixa de pH (3,5-10,5 por 24h) e temperatura (35-65°C, por 1h). Essas características foram semelhantes e até mesmo superiores a de outras xilanases recombinantes descritas na literatura, apresentando o grande potencial biotecnológico dessa enzima recombinante.

1. Introdução

Xilana é o principal constituinte da hemicelulose e ocorre na natureza como heteropolissacarídeos composto por uma cadeia principal de resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, que apresentam diferentes grupos substituintes (BEG et al., 2001; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; HE et al., 2009; LI et al., 2010). Devido a heterogeneidade desse polissacarídeo a hidrólise completa necessita da atuação sinérgica de várias enzimas, sendo as endo- β -1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) uma enzima chave, atuando nas ligações internas da cadeia principal (LIU; LIU, 2007; COLLIN; GERDAY; FELLER, 2004; HE et al., 2009; ZHOU et al., 2009). As xilanases são encontradas em plantas, algas, insetos, protozoários e microorganismos. Entre os produtores microbianos, os fungos filamentosos são conhecidos como produtores de altos níveis de xilanase (CHANTASINGH et al., 2005).

As xilanases apresentam grande potencial de aplicação industrial, como no biobranqueamento na indústria de papel e celulose, nas indústrias alimentícias, de alimentação animal e têxteis, e isso gerou um grande interesse na pesquisa dessas enzimas (HE et al., 2009; RUANGLEK et al., 2006). Outra importante aplicação dessa enzima é na bioconversão de materiais lignocelulósicos e resíduos agrícolas em energia (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; KATAHIRA et al., 2004)

Nos últimos anos, várias linhagens de levedura industriais têm sido desenvolvidas como sistemas de expressão recombinante. *Pichia pastoris* é um dos sistemas mais comumente utilizados, pois como eucarioto apresenta muitas vantagens na expressão heteróloga, como processamento protéico, modificações pós-traducionais, técnicas semelhantes a *Saccharomyces cerevisiae*, além da capacidade de crescer em

altas densidades celulares. (CREGG et al, 2000; DAMASO et al., 2003; HE et al., 2009). Essas características tornam esse hospedeiro atrativo para expressão de proteínas heterólogas para pesquisa e até mesmo para aplicação industrial (LIU; LIU, 2008). Nesse trabalho a xilanase recombinante de *T. auranticaus* expressa por *P. pastoris* foi parcialmente purificada e caracterizada.

2. Material e métodos

2.1.Microrganismos

Linhagem de *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen) recombinante com o gene da xilanase de *Thermoascus aurantiacus* foi para expressão da enzima heteróloga.

2.2. Indução de *P. pastoris* em frascos

Uma colônia isolada foi inoculada em 25mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato pH 6,0 100 mM, YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵% e glicerol 1%) em frasco de 250 mL e incubada a 37°C sob agitação (200rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 2 a 6 (em torno de 16 a 18 horas). As células foram então coletadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspendidas em 250 mL de meio BMMY (BMGY trocando glicerol 1% por metanol 0,5%) em Erlenmeyer aletado de 1L, obtendo uma OD₆₀₀ 0,2 e incubadas por 96 horas sob as mesmas condições. Metanol 100% foi adicionado a cada 24 horas a uma concentração final de 0,5%, para manter a indução dos transformantes.

2.3. Purificação

As células de *P. pastoris* recombinante foram retiradas do meio de cultura após centrifugação a 5000g por 5 minutos. O sobrenadante livre de células foi então

dialisado, concentrado e liofilizado. Em seguida esse material foi ressuspendido em 5 mL de tampão fosfato de sódio, e então passado pela coluna Q-Sepharose (GE Healthcare) de acordo com as instruções do produtor.

2.4. Determinação da atividade de xilanase

A atividade da xilanase foi determinada por ensaio de detecção de açúcares redutores gerados pela hidrólise do substrato xilana *birchwood* (Sigma). O ácido dinitrosalicílico (DNS) foi utilizado para detecção dos açúcares redutores. Os ensaios foram realizados da seguinte maneira: 0,1 mL do extrato enzimático e 0,9 mL de solução de substrato (xilana *birchwood* 1%, em solução tampão acetato 0,1M, pH 5,0). A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de xilose por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

2.5. Caracterização físico-química da xilanase

2.5.1. Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da enzima

Para a determinação do pH ótimo, as atividades enzimáticas foram realizadas em uma ampla faixa de pH (3,5 – 10,5). A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, as mesmas foram incubadas, por 24 h, em soluções tampão de diferentes valores de pH e, após este período, a atividade residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação. Para essas análises foram utilizadas os seguintes

tampões: tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3,0-5,0), tampão fosfato 0,1M (pH 6,0 a 8,0) e tampão glicina 0,1M (pH 8,5 a 10,5).

2.5.2. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima

A temperatura ótima de atividade foi avaliada mantendo-se a mistura de reação em diferentes temperaturas (30 – 80°C), no pH ótimo de atividade. A termoestabilidade foi avaliada incubando-se as enzimas, por 1 h, a temperaturas de 30 a 80°C, seguida da determinação da atividade residual, sob as condições ótimas.

2.6. Análise em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel de poliacrilamida desnaturante segundo a descrição de Laemmli (1970). Antes da aplicação no gel as amostras foram precipitadas com TCA e acetona, posteriormente fervidas por 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X a uma voltagem constante de 100V. As bandas proteicas foram visualizadas após coloração com prata.

3. Resultados e discussão

3.1. Expressão e purificação da xilanase recombinante

O clone transformante que já havia sido selecionado (Capítulo 2), foi induzido sob as mesmas condições otimizadas, 250 mL e OD₆₀₀ inicial de 0,2, no qual foi observado um pico de produção em 96 horas com 641,16 U/mL.

Após as 96 horas de indução o meio de cultura foi separado das células através de centrifugação. O extrato produzido pela *P. pastoris*, aproximadamente 250 mL, sem as células foi então dialisado e concentrado para 50mL, que foi liofilizado. Após a liofilização o material foi eluído em 5 mL de tampão fosfato. A purificação parcial foi realizada ao passar a amostra pela coluna Q-Sepharose (GE Healthcare). O material

recolhido como “flow through” foi analisado em gel de acrilamida SDS-PAGE corado com prata, no qual podemos observar que poucas enzimas restaram após o processo de purificação. Boa parte das enzimas produzidas durante a indução ficaram retidas na coluna e foram retiradas após com diferentes concentrações de sal. (Figura 1).

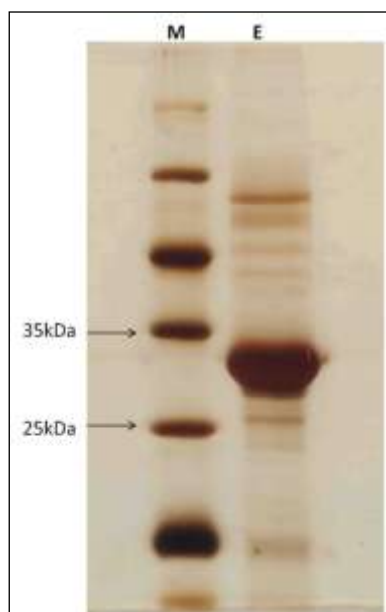


Figura 1: Análise por SDS-PAGE do “flow through”. M: Unstained Protein Molecular Weight Maker (Fermentas).

3.2. Caracterização da enzima parcialmente purificada

A xilanase recombinante parcialmente pura foi caracterizada quanto a pH e temperatura ótimos e estabilidade frente a variações de pH e temperatura. A atividade máxima foi em pH 5,0 (Figura 2) e a 60°C (Figura 3), assim como foi observado com a enzima antes da purificação. Em relação enzima nativa, no extrato bruto, o pH ótimo observado foi o mesmo, no entanto a temperatura ótima ficou 15°C abaixo da nativa, esse evento ocorre possivelmente pela presença de algum componente no extrato bruto do *T. aurantiacus* que permitam que a temperatura ótima seja mais alta.

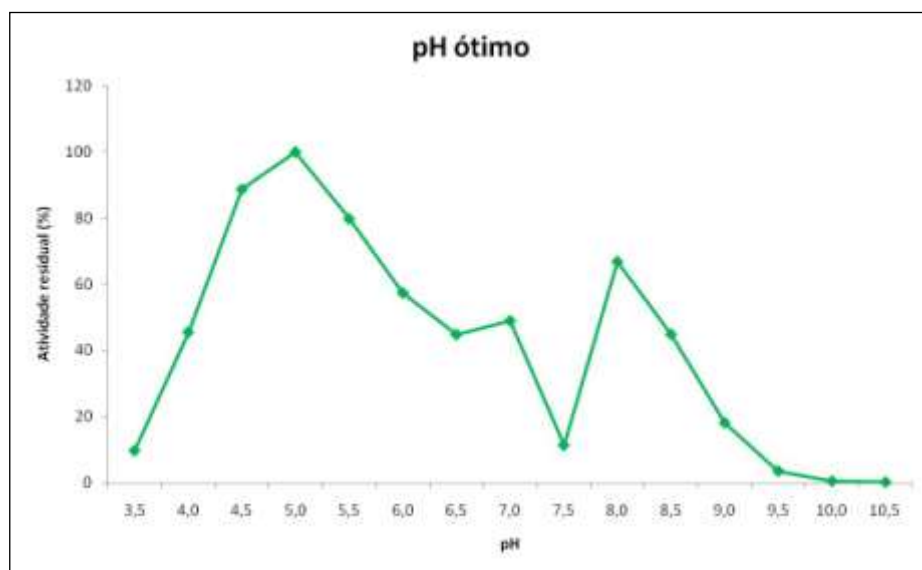


Figura 2: Efeito do pH sobre a xilanase recombinante parcialmente purificada.

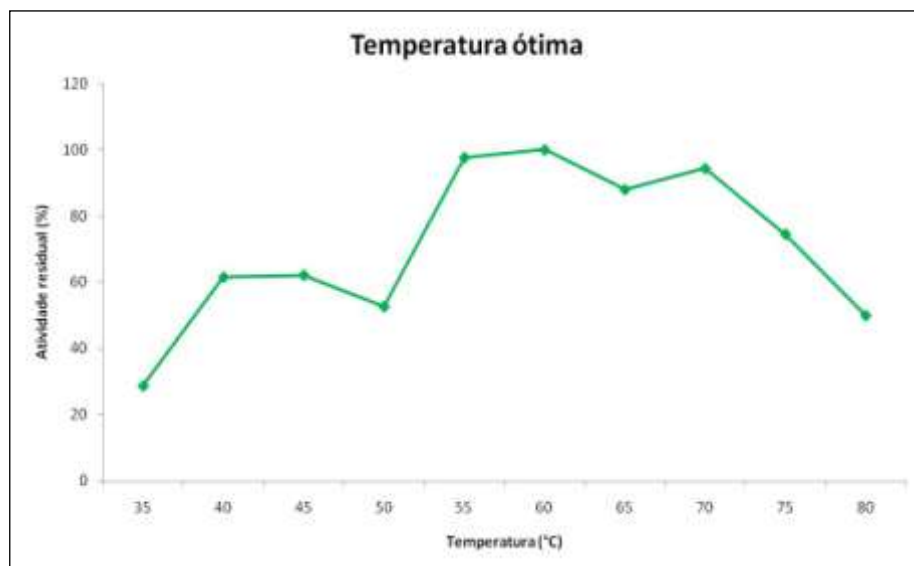


Figura 3: Efeito da temperatura sobre a xilanase recombinante parcialmente purificada.

A enzima permaneceu estável entre os pH 3,5 e 10,5 (Figura 4), é interessante notar que em todo intervalo de pHs houve um aumento na atividade da enzima, chegando a aumentar mais que o dobro entre 4,5 e 7,5. A enzima antes da purificação permaneceu estável na faixa de pH 3,5 a 10,5, no entanto não houve aumento tão significativo quanto ao observado com a parcialmente purificada. A termoestabilidade foi bastante diferente entre a enzima no extrato bruto da *P. pastoris* e a enzima

parcialmente purificada, na qual a estabilidade manteve-se entre 35°C e 65°C (Figura 5) após 1 hora de incubação.

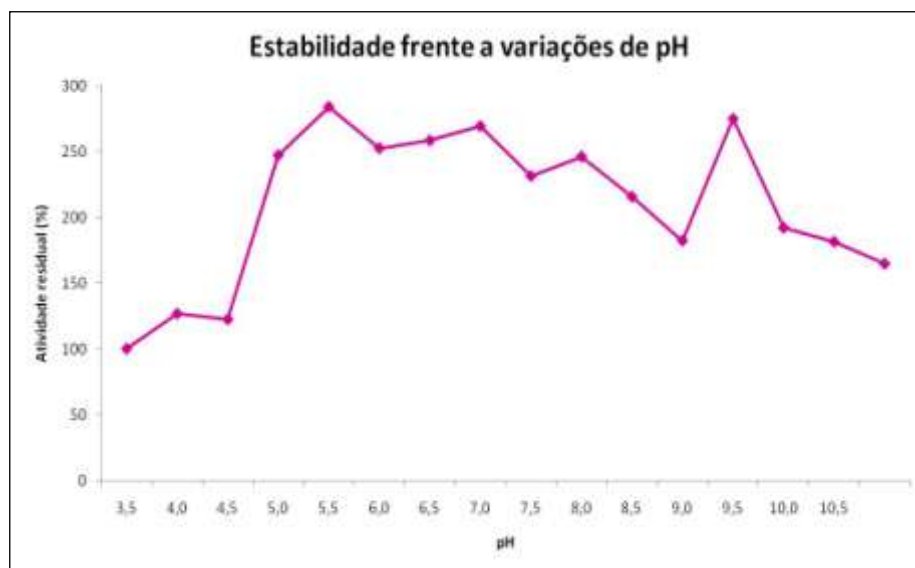


Figura 4: Estabilidade frente a variações de pH da xilanase recombinante no parcialmente purificada. ST: sem tratamento

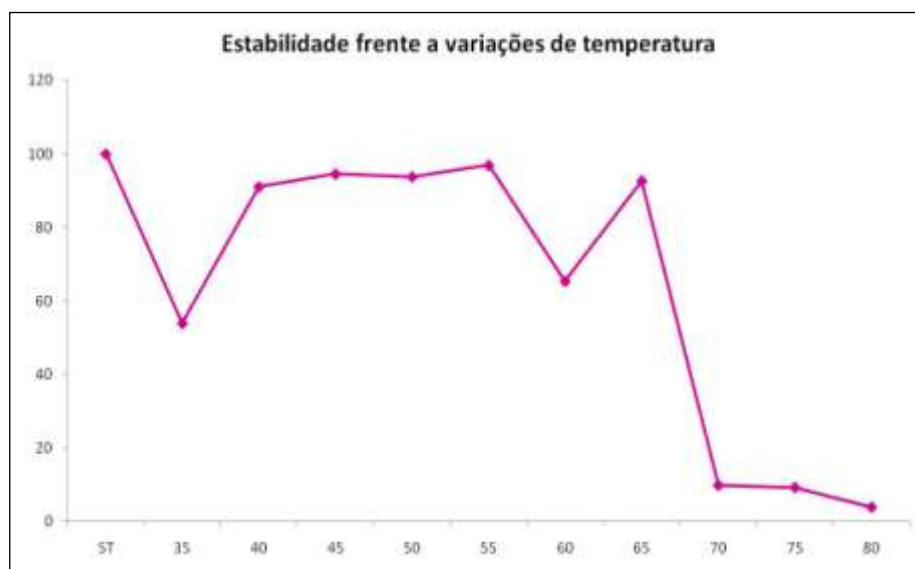


Figura 5: Estabilidade frente a variações de temperatura da xilanase recombinante parcialmente purificada. ST: sem tratamento

Os dados obtidos em nossos experimentos foram bastante interessantes em relação à atividade ótima e estabilidade da xilanase parcialmente purificada. Algumas xilanases recombinantes apresentaram características bastante semelhantes àquelas

observadas com a xilanase de *T. aurantiacus*, como a de *Aspergillus sulphureus* pH 5,0 a 50°C (LI et al., 2010), de *A. niger* pH 5,0 a 55°C (RUANGLEK et al., 2007), de *A. terreus* pH 5,0 a 60°C (CHANTASINGH et al., 2006). A estabilidade frente às variações de pH observado em nossos testes foi bastante superior à observada, , por Ruanglek e col. (2007) cuja estabilidade foi observada entre os pHs 3,5 e 6,0. Sriyapai e col. (2011) em estudos com xilanase de *Actinomadura sp.* produzida por *P. pastoris* em pH 4,0 observou que a enzima manteve 50% da atividade após a incubação por 30 minutos, bastante inferior ao que obtivemos, em que após 1 hora de incubação a esse pH a atividade aumentou cerca de 22%.

A termoestabilidade da enzima após o processo de purificação reduziu quando comparada aos dados da enzima no extrato bruto da *P. pastoris* (Capítulo 2), que permaneceu estável entre 35°C e 80°C, nas temperaturas 70°C, 75°C e 80°C manteve-se mais que 40% da atividade, a primeira em temperaturas maiores, 70°C, 75°C e 80°C menos que 10% da atividade foi mantida. Chantasingh e col. (2006) observou que após incubação por 30 minutos da xilanase recombinante a 60°C a atividade reduziu a 50% e a xilanase de *Trichoderma reesei* com essa mesma incubação manteve 40% (HE et al., 2010), enquanto em nossos experimentos foi mantido cerca de 65% após 1 hora de incubação. A enzima recombinante de *A. terreus* não foi estável a temperaturas de 70°C e 80°C, perdendo rapidamente a atividade após 10 minutos de incubação (CHANTASINGH et al., 2006), a de *Bacillus licheniformis* permaneceu estável até 70°C em temperaturas superiores perdeu rapidamente a atividade (LIU; LIU, 2008), similar ao que observamos em nossos experimentos.

4. Conclusão

A xilanase de *T. aurantiacus* CBMAI756 foi expressa com sucesso por *P. pastoris*, sendo o primeiro relato da expressão e purificação parcial. Os dados que obtivemos a respeito das características da enzima parcialmente purificada e anterior a purificação foram bastante interessantes, mostrando grande potencial biotecnológico dessa enzima recombinante, assim a partir deles novos estudos poderão ser realizados para adequação da aplicação dessa enzima em processos industriais.

5. Referências Bibliográficas

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P. EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 143-149, 2006.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 23-52, 2000.

DAMASO, M. C.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA Jr, N.; ANDRADE, C. M. M. C.; ALBANO, R. M. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6064-6072, 2003.

HE, J.; CHEN, D.; YU, B.; ZHANG, K. Optimization of the *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase production by recombinant *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 52, p. 1-6, 2010.

HE, J.; YU, B.; ZHANG, K.; DING, X.; CHEN, D. Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 56, 2009.

KATAHIRA, S.; FUJITA, Y.; MIZUIKE,; FUKUDA, H.; KONDO, A. Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanotic enzymes on the surface

of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5407-5414, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, Y.; ZHANG, B.; CHENG, X.; CHEN, Y.; CAO, Y. Improvement of *Aspergillus sulphureus* endo- β -1,4-xylanase expression in *Pichia pastoris* by codon optimization and analysis of the enzymic characterization. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 160, p.1321-1331, 2010.

LIU, M. Q.; LIU, G. F. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. **Protein Expression and Purification**, v. 57, p. 101–107, 2008.

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

RUANGLEK, V.; SRIPRANG, R.; RATANAPHAN, N.; TIRAWONGSAROJ, P.; CHANTASIGH, D.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p.19-25, 2007.

SRIYAPAI, T.; SOMYOONSAP, P.; MATSUI, K.; KAWAI, F.; CHANSIRI, K. Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering In press**, 2011.

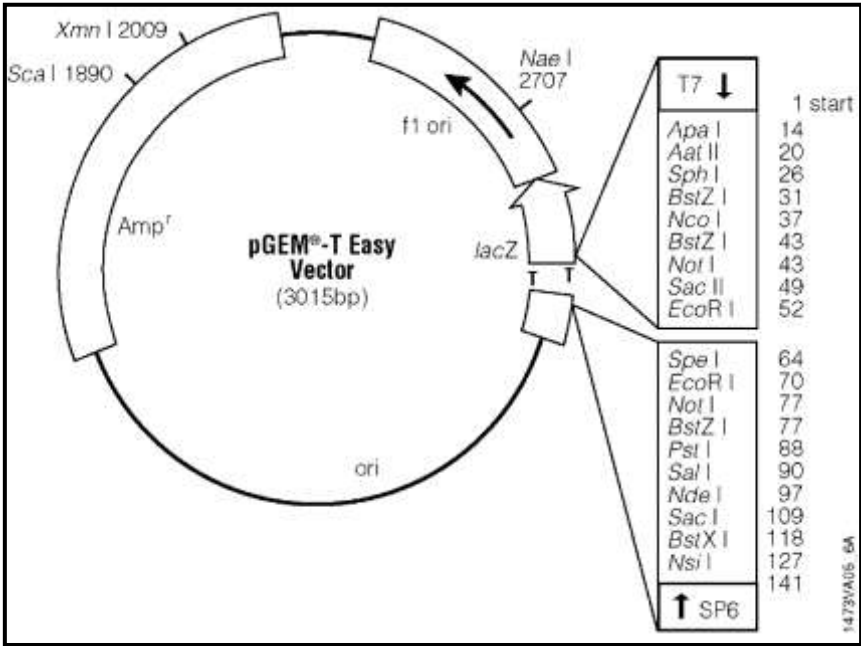
SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

ZHOU, C.; WANG, Y.; WU, M.; WANG, W.; LI, D. Heterologous Expression of xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris*. **Food Technology and Biotechnology** v. 47, n. 1, p. 90-95, 2009.

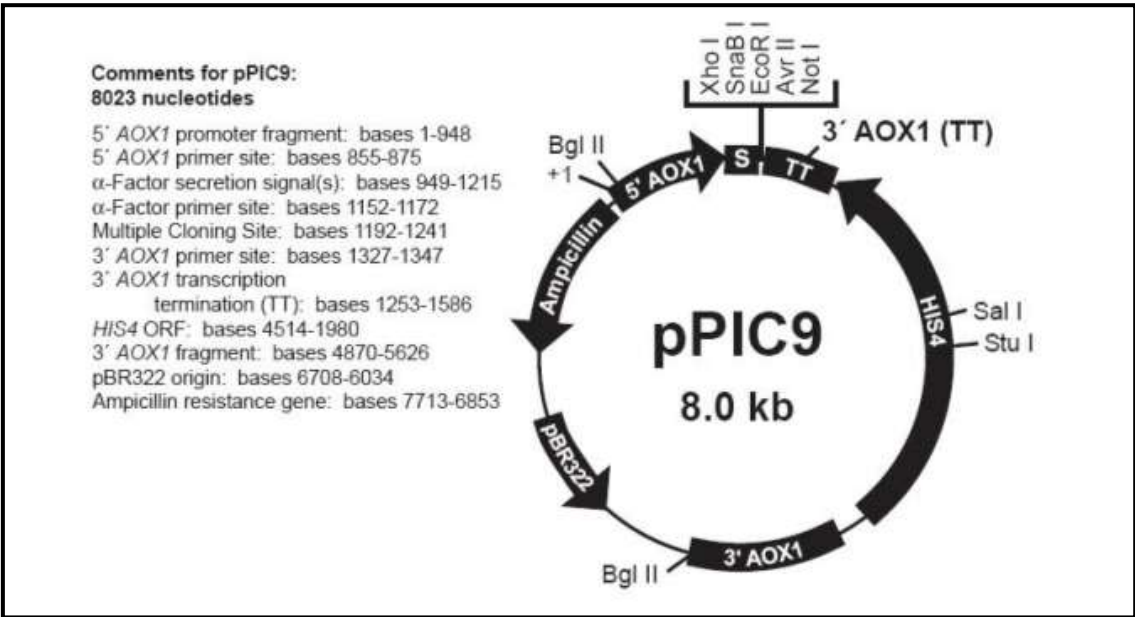
Considerações finais

Esse foi o primeiro relato da clonagem e expressão do gene *xynA* em *P. pastoris*, sendo um passo importante para originar outros estudos sobre esta enzima em *T. aurantiacus*. Além disso, as características observadas na enzima recombinante antes e depois da purificação parcial e também da enzima nativa sugerem um grande potencial biotecnológico para essa xilanase. A partir de nossos dados, novos estudos permitirão a adequação desta enzima para aplicação em processos industriais associados à produção de energia a partir de biomassa lignocelulósica, indústria alimentícia, de papel e celulose. Essa enzima já está sendo testada no processo de clareamento de polpa Kraft (indústria de papel e celulose) pela empresa Verdartis (Ribeirão Preto/SP). No futuro, realizaremos a purificação completa e análises da glicosilação e rendimento da enzima recombinante.

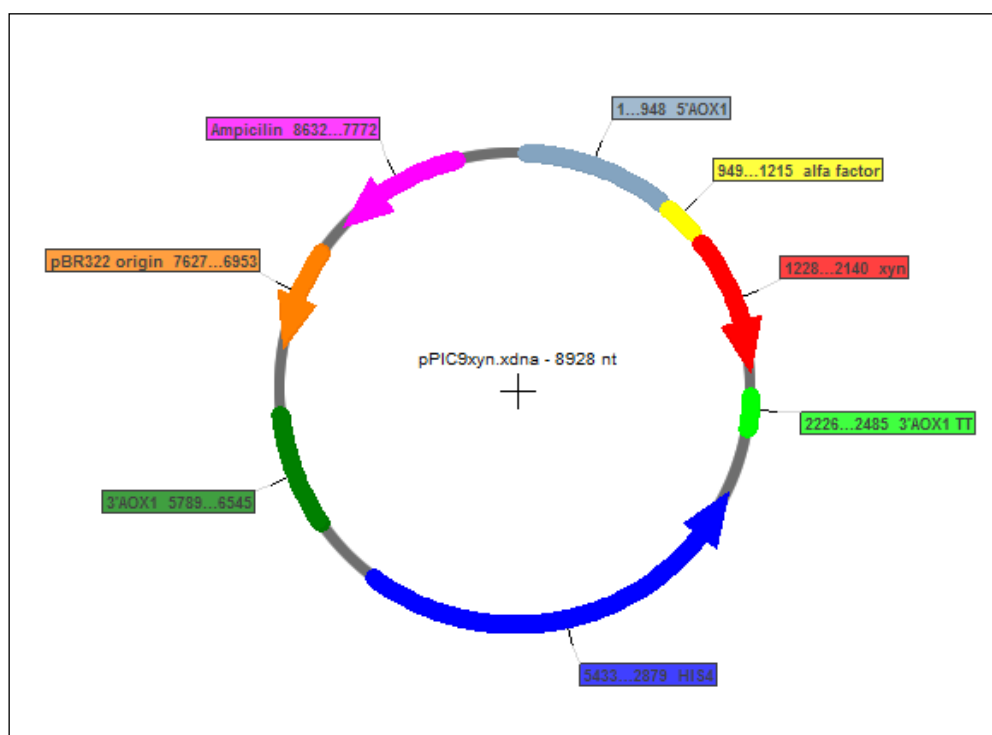
Anexos



Anexo 1: Diagrama esquemático do vetor pGEM-T (Promega).



Anexo 2: Diagrama esquemático do vetor pPIC9 (Invitrogen).



Anexo 3: Diagrama esquemático do vetor utilizado para expressão do gene *xynA* pPIC9xyn.

Seq	1	CAAGCTGCACAGAGTGTGACCAACTGATCAAGGCTCGCGGCAAGGTGTACTTTGGCGTC	60
<i>xynA</i>	1	CAAGCTGCACAGAGTGTGACCAACTGATCAAGGCTCGCGGCAAGGTGTACTTTGGCGTC	60
Seq	61	GCCACGGACCAAAACCGGCTGACGACCGGCAAGAATGCGGCTATCATCCAGGCTGATTTTC	120
<i>xynA</i>	61	GCCACGGACCAAAACCGGCTGACGACCGGCAAGAATGCGGCTATCATCCAGGCTGATTTTC	120
Seq	121	GGCCAGGTCAAGCCGGAGAATAGTATGAAATGGGACGCTACTGAACCTTCTCAAGGAAAC	180
<i>xynA</i>	121	GGCCAGGTCAAGCCGGAGAATAGTATGAAATGGGACGCTACTGAACCTTCTCAAGGAAAC	180
Seq	181	TTCAACTTTTGCCGGTGTGATTACCTTGTCAAATGGGCCCAGCAAAATGGAAAGCTGATC	240
<i>xynA</i>	181	TTTAACTTTGCCGGTGTGATTACCTTGTCAAATGGGCCCAGCAAAATGGAAAGCTGATC	240
Seq	241	CGTGGCCATACTCTTGATGGCACTCGCAGCCGCCCTCGTGGGTGAGCTCCATCACCAGAC	300
<i>xynA</i>	241	CGTGGCCATACTCTTGATGGCACTCGCAGCTGCCCTCGTGGGTGAGCTCCATCACCAGAC	300
Seq	301	AAGAATACGCTGACCAACGTGATGAAAAATCACAATCACCACCTTGATGACCCGGTACAAG	360
<i>xynA</i>	301	AAGAATACGCTGACCAACGTGATGAAAAATCACAATCACCACCTTGATGACCCGGTACAAG	360
Seq	361	GGCAAGATCCGTGCATGGGACGTGGTGAACGAGGCAATCAACGAGGATGGCTCCCTCCGC	420
<i>xynA</i>	361	GGCAAGATCCGTGCATGGGACGTGGTGAACGAGGCAATCAACGAGGATGGCTCCCTCCGC	420
Seq	421	CAGACTGTCTTCTCAACGTCAATCGGGGAGGATTACATCCCGATTGCTTTCCAGACCGCC	480
<i>xynA</i>	421	CAGACTGTCTTCTCAACGTCAATCGGGGAGGATTACATCCCGATTGCTTTCCAGACCGCC	480
Seq	481	CGCGCCGCTGACCCGAATGCCAAGCTGTACATCAACGATTACAACCTCGACAGTGCCCTCG	540
<i>xynA</i>	481	CGCGCCGCTGACCCGAATGCCAAGCTGTACATCAACGATTACAACCTCGACAGTGCCCTCG	540
Seq	541	TACCCCAAGACGCAGGCCATTGTCAACCGCGTCAAGCAATGGCGTGCAGCTGGAGTCCCG	600
<i>xynA</i>	541	TACCCCAAGACGCAGGCCATTGTCAACCGCGTCAAGCAATGGCGTGCAGCTGGAGTCCCG	600
Seq	601	ATTGACGGCATAGGATCGCAAACGCACCTCAGCGCTGGTCAGGGAGCCAGTGTCTACAG	660
<i>xynA</i>	601	ATTGACGGCATAGGATCGCAAACGCACCTCAGCGCTGGTCAGGGAGCCAGTGTCTACAA	660
Seq	661	GCTCTTCGCTCCTTGCTAGTCCGGAACTCCCGAGGTCGCTATCACGGAACGGACGTG	720
<i>xynA</i>	661	GCTCTTCGCTCCTTGCTAGTCCGGAACTCCCGAGGTCGCTATCACGGAACGGACGTG	720
Seq	721	GCTGGTGTAGCTCGACGGATTACGTCAATGTCGTGAACGCTTGCCCTCAACGTGCAGTCC	780
<i>xynA</i>	721	GCTGGTGTAGCTCGACGGATTACGTCAATGTCGTGAACGCTTGCCCTCAACGTGCAGTCC	780
Seq	781	TGCGTGGGCATCACCCTCTGGGGCGTGGCAGATCCGGACTCATGGCGTGTAGCAGACG	840
<i>xynA</i>	781	TGCGTGGGCATCACCCTCTGGGGCGTGGCAGATCCGGACTCATGGCGTGTAGCAGACG	840
Seq	841	CCTCTCCTCTTCGACGGCAACTTCAACCCGAAGCCGGCGTACAACGCCATTGTGCAGGAC	900
<i>xynA</i>	841	CCTCTCCTCTTCGACGGCAACTTCAACCCGAAGCCGGCGTACAACGCCATTGTGCAGGAC	900
Seq	901	CTGCAGCAGTGA 912	
<i>xynA</i>	901	CTGCAGCAGTGA 912	

Anexo 4: Alinhamento da sequência de nucleotídeos utilizada nesse trabalho (Seq) com a sequência do gene *xynA*.