

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BÁRBARA FERNANDES FERREIRA

Clonagem e expressão heteróloga do gene da xilanase VI (GH30) de *Trichoderma reesei* para hidrólise de xilanas do bagaço de cana pré-tratado quimio-termomecanicamente.

Lorena - SP

2017

BÁRBARA FERNANDES FERREIRA

Clonagem e expressão heteróloga do gene da xilanase VI (GH30) de *Trichoderma reesei* para hidrólise de xilanas do bagaço de cana pré-tratado quimio-termomecanicamente.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Ferreira Milagres

Versão Corrigida

Lorena – SP

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Bárbara Fernandes

Clonagem e expressão heteróloga do gene da xilanase VI (GH30) de *Trichoderma reesei* para hidrólise de xilanas do bagaço de cana pré-tratado quimio-termomecânicamente. / Bárbara Fernandes Ferreira; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres – Versão Corrigida – Lorena, 2017.

128 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017.

Orientador: Adriane Ferreira Milagres

1. Xilanases. 2. *Trichoderma reesei*. 3. Clonagem. 4. Ácido glucurônico. 5. Hidrólise enzimática. I. Título. II. Milagres, Adriane Ferreira, orient.

*Dedico este trabalho a minha mãe e agradeço por
toda dedicação, amor e ensinamentos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e iluminação para chegar até aqui.

À minha mãe, Virgínia, pelo amor, carinho, dedicação, força e conselhos nos momentos mais difíceis e por estar sempre ao meu lado quando mais precisei.

À minha irmã Marina, pelo amor, carinho, compreensão e amizade nos momentos de alegria e de dificuldades.

Ao meu pai, “*in memoriam*”, pelo amor eterno, lições morais e ensinamentos.

Ao meu marido Tiago, pelo companheirismo, paciência e por me dar motivos para seguir sempre em frente, evoluindo cada vez mais.

A quem sempre esteve comigo, torcendo e acreditando em mim muitas vezes mais do que eu mesma, como uma luz iluminando meu caminho.

À minha orientadora, Prof^a. Adriane Milagres, pela orientação, paciência, incentivo, confiança e por tudo que pude aprender com você, o meu muito obrigada!

Aos meus grandes e eternos amigos, Carol, Nanda, Lala, Juliana e Fred, por terem permanecidos sempre presentes, mesmo com toda a distância!

Aos amigos de laboratório, Maiara, Felipe, Dani, Bianca, Lisa, Fernanda, Angela, Isabela, Daiana, Wilian, Germano, Andres, Larissa, por ajudar a conduzir as atividades de pesquisa, pelos momentos de diversão e alegria durante o trabalho.

À aluna de doutorado, Rafaela Ventorim e à Prof^a Valéria Monteze Guimarães do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, por ter me recebido em seu laboratório, por toda ajuda e pelos conhecimentos que adquiri.

Aos demais companheiros do Departamento, pelos momentos de descontração.

Ao Zé Moreira e Zé Cobrinha pela enorme disposição em ajudar sempre.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos e, em especial ao Prof. Fernando Segato, pelo acompanhamento e dedicação durante diversas etapas do meu trabalho.

À CAPES e CNPq, pela bolsa de mestrado.

À EEL-USP, pela oportunidade de realizar meu mestrado.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

FERREIRA, B.F. **Clonagem e expressão heteróloga do gene da xilanase VI (GH30) de *Trichoderma reesei* para hidrólise de xilanas do bagaço de cana pré-tratado quimio-termomecanicamente.** 2017. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2017.

Um dos desafios relacionados à utilização de xilana para a fabricação de biofilmes, aditivos para fabricação de papéis, medicamentos e alimentos é a sua extração na forma polimérica e com alta pureza. Neste trabalho o material de partida para a obtenção de xilana foi o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimio-termomecanicamente com álcali e sulfito, visando aproveitar esta fração, que corresponde a aproximadamente 25% (m/m). A composição química das xilanas no material original foi determinada, bem como o tipo e a proporção dos grupos pendentes. A extração de xilanas do bagaço de cana pré-tratado foi feita utilizando uma endoxilanase recombinante da família GH30, denominada xilanase VI, com mecanismo de ação dependente da presença de ácidos urônicos para a clivagem da cadeia principal de xilana. Partindo-se do DNA genômico de *Trichoderma reesei* QM6a, que contém o gene da xilanase VI, foi feita a clonagem em um vetor e este foi inserido em *Escherichia coli* Rosetta-gami, *Pichia pastoris* e *Aspergillus nidulans* A773. Os melhores resultados de expressão da xilanase VI foram obtidos em *E. coli*, porém os estudos com este sistema serão conduzidos em outro trabalho. A xilanase VI expressa em *A. nidulans* A773 foi parcialmente purificada e exibiu ótimos de atividade em pH 4-5 à 50 °C. Esta xilanase apresentou maior ação em glucuronoxilana de *beechwood* e em arabinoglucuronoxilana extraída de bagaço de cana, quando comparado à xilana de *oat spelts* e à medula de cana. Os dados de Km e Vmax em xilana *beechwood* exibiram valores de 0,783 mg/ml e 0,4675 UI/ml, respectivamente, em 10 min de reação. A extração enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino solubilizou 14% das xilanas e após uma extração alcalina o rendimento aumentou para 32%. A massa molar média das xilanas extraídas na etapa enzimática foi de 4000 Da, produzindo oligossacarídeos em vez de xilobiose ou xilose, mesmo após longos tempos de reação. Esta enzima se mostrou eficaz para a extração de xilanas de cadeias longas quando se comparada às xilanas extraídas por xilanases de outras famílias.

Palavras chave: Xilanases. *Trichoderma reesei*. Clonagem. Ácido glucurônico. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

FERREIRA, B. F. **Cloning and heterologous expression of the xylanase VI (GH30) gene from *Trichoderma reesei* for hydrolysis of xylans from the chemothermomechanical pretreated sugarcane bagasse.** 2017. 128p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

One of the challenges related to the use of xylan for the manufacture of biofilms, papermaking additives, drugs and food is its extraction in polymer form with high purity. In this project, the starting material for xylan isolation was the sugarcane bagasse pretreated with alkali-sulfite chemothermomechanical process, to recover this fraction, which corresponds to approximately 25% (w/w). The chemical composition of original xylans was determined, as well as the type and proportion of the pendant groups. Xylan extraction from pre-treated sugarcane bagasse was performed using a recombinant endoxylanase from the GH30 family, named xylanase VI, with an appendage-dependent mechanism of action for the xylan backbone cleavage. Starting from the genomic DNA of *Trichoderma reesei* QM6a, which contains the xylanase VI gene, cloning was done in a vector that was inserted into *Escherichia coli* Rosetta-gami, *Pichia pastoris* and *Aspergillus nidulans* A773. The highest xylanase VI expression results were obtained in *E. coli*, but studies with this system it will be conducted in future works. Xylanase VI expressed in *A. nidulans* A773 was purified and showed the higher activity at pH 4-5 at 50 °C. This xylanase present higher activities on beechwood glucuronoxylan and on arabinoglucuronoxylan extracted from sugarcane bagasse than on oat spelts xylan and sugarcane pith. Data for Km and Vmax in xylan beechwood showed values of 0.783 mg / ml and 0.4675 IU / ml, respectively, in 10 min of reaction. The enzymatic extraction of alkaline sulphite pretreated sugarcane bagasse solubilized 14% of the xylans followed by an alkaline extraction with yield of 32%. The average molar mass of xylans extracted in the enzymatic step was 4000 Da, producing oligosaccharides instead of xylobiose or xylose, even after long reaction periods. This enzyme proved effective for xylan extraction of long chains when compared to xylan hydrolysates by xylanases from other families.

Keywords: Xylanases. *Trichoderma reesei*. Cloning. Glucuronic acid. Enzymatic hydrolysis.