



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA  $\beta$  - GLUCOSIDASE RECOMBINANTE  
DO FUNGO *Aspergillus niger* EM *Pichia pastoris***

**SANDRO FERREIRA RABELO**

**MANAUS - AM  
2015**

**SANDRO FERREIRA RABELO**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA  $\beta$  - GLUCOSIDASE RECOMBINANTE  
DO FUNGO *Aspergillus niger* EM *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

**MANAUS-AM  
2015**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R114c Rabelo, Sandro Ferreira  
Clonagem e expressão da enzima beta - glucosidase  
recombinante do fungo *Aspergillus niger* em *Pichia pastoris* /  
Sandro Ferreira Rabelo. 2015  
101 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade  
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. Síntese química. 2. Beta-glucosidase. 3. *Aspergillus niger*. 4.  
*Pichia pastoris*. 5. Expressão heteróloga. I. Andrade, Edmar Vaz de  
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



### 83ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 18 de junho de 2015 às 14:30h, na Sala de Aula do Bloco "G"- Setor Sul-UFAM. Sandro Ferreira Rabelo defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: "Clonagem e expressão da enzima  $\beta$ -glucosidase recombinante do fungo *Aspergillus niger* em *Pichia pastoris*".

#### Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Edmar Vaz de Andrade – Orientador	Aprovado (x) Reprovado ( )	
Dr. Hugo Valério Corrêa de Oliveira – (UEA)	Aprovado (x) Reprovado ( )	
Dra. Márcia Neiva – (UFAM)	Aprovado (x) Reprovado ( )	

Manaus, 18 de junho de 2015.

**Resultado Final:** Aprovado (a) (x)  
Reprovado (a) ( )

\_\_\_\_\_  
Coordenador do PPGBIOTEC-UFAM

*Epígrafe*

*"Ninguém educa ninguém, ninguém educa a si mesmo, os homens se educam entre si, mediatizados pelo mundo"*

*Autor: Paulo Freire - Pedagogia do Oprimido*

*Dedico:*

*Com muito amor e carinho dedico este trabalho aos meus queridos pais, José Braga Rabelo (in memoriam) e Francisca Ferreira Rabelo, causa absoluta da alegria e da força que sempre tive, minhas grandes referências e fortaleza; aos meus irmãos Setemberg, Francisca Sindrônia, Sônia, Cilton e Heeky; aos meus queridos sobrinhos; ao meu amigo e companheiro Luiz Carlos Dias, e a todas as pessoas que sempre me apoiaram, no decorrer dessa trajetória.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, saúde e força para prosseguir sempre com entusiasmo nos desafios da vida humana.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio constante e incondicional.

Agradeço aos grandes mestres que me conduziram nesta trabalhosa e honrosa etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, por ter aceitado a minha inserção no grupo de pesquisa no período do desenvolvimento desse trabalho. Assim como, por compartilhar de sua brilhante experiência profissional.

Ao Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, pela excelente orientação, sempre me acompanhou nos experimentos desenvolvidos nos laboratórios de Tecnologias do DNA Recombinante e Proteoma. Muito obrigado pela amizade e incentivo.

Ao Dr. Edson Júnior e ao Dr. Marcos Cezar Pessoa, por todos os ensinamentos compartilhados de “Engenharia Genética”. Acredito se não fossem vocês, tudo teria ficado muito mais difícil.

Ao grupo da Biotecnologia da UFAM e ao pessoal do laboratório de Tecnologia de DNA e Proteoma, pessoas com quem convivi profissionalmente durante o mestrado e que foram de fundamental importância neste período.

A todos os docentes do PPGBIOTEC, que me conduziram a incríveis horizontes de conhecimentos, imprescindíveis a minha caminhada profissional.

Aos amigos do CAM (Centro de Apoio Multidisciplinar), agradeço pelas trocas de experiências e aprendizagem.

Também agradeço:

A FAPEAM, pelo incentivo financeiro.

A UFAM, pela oportunidade de avançar nos estudos.

Ao PPGBIOTEC e todos seus servidores.

## RESUMO

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma diversidade de microrganismos. Contudo, a grande maioria apresenta grandes restrições que dificultam ou que oneram o processo de produção das enzimas. Além disso, grande parte dos consórcios enzimáticos comerciais disponíveis, apesar de apresentarem os três grupos de celulases (Endoglucanases, Celobiohidrolase,  $\beta$ -glucosidase) para a completa degradação da celulose, possuem uma baixa atividade  $\beta$ -glucosidásica. Deste modo, gera necessidade de suplementação desta enzima a estes preparados enzimáticos. Para resolver estas restrições, a biologia molecular aliada à tecnologia do DNA recombinante se configura como uma ferramenta favorável na produção enzimática, viabilizando a expressão apenas das enzimas de interesse, minimizando ou eliminando a produção de proteínas interferentes. Neste contexto, a produção de  $\beta$ -glucosidase recombinante por microrganismo geneticamente modificado *Pichia pastoris*, se configura como um grande passo para obtenção dessa enzima com uma produção economicamente viável e com grande potencial para aplicação na industrial. Portanto,  $\beta$ -glucosidases recombinantes são potenciais ferramentas na produção de bioetanol, e no futuro próximo, pode ser bem-sucedida no cumprimento dos requisitos de fontes alternativas e renováveis de energia. De acordo com a crescente importância da  $\beta$ -glucosidase em diversas aplicações, o presente trabalho teve como objetivo clonar e expressar a enzima  $\beta$ -glucosidase recombinante de *Aspergillus niger* na levedura metilotrófica *P. pastoris*. Conforme os resultados obtidos, foi possível demonstrar que a enzima  $\beta$ -glucosidase de *A. niger* foi expressa eficientemente na levedura *P. pastoris*, assim como, a sua secreção no sobrenadante da cultura celular conforme análise de imunodeteção *Colony Blotting*. Baseado no perfil eletroforético em gel SDS-PAGE dos tempos de indução da produção de  $\beta$ -glucosidase dos clones recombinantes Mut<sup>+</sup> (46) e clone Mut<sup>s</sup> (22), a indução em meio líquido dos clones recombinantes foi realizada com sucesso devido à apresentação da banda correspondente a enzima  $\beta$ -glucosidase com massa molecular de aproximadamente 103 kDa. No clone Mut<sup>+</sup> o melhor tempo de indução para expressão da proteína recombinante foi o tempo de 72 horas, no clone Mut<sup>s</sup> os melhores tempos foram 72 horas e 96 horas. Portanto, a atividade  $\beta$ -glucosidásica do clone recombinante Mut<sup>s</sup> foi de 12.517,33 U. L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chaves:** Síntese química,  $\beta$ -glucosidase, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, expressão heteróloga.

## ABSTRACT

Cellulolytic enzymes are produced by a variety of microorganisms. However the great majority have major constraints that hamper or hinder the process of enzyme production. In addition, most of the available commercial enzymatic consortia, although presenting the three groups of cellulases (Endoglucanases, Celobiohidrolase,  $\beta$ -glucosidase) for the complete degradation of the cellulose, have a low  $\beta$ -glucosidásica activity. Thus, it is necessary to supplement this enzyme with these enzyme preparations. To solve these constraints, the molecular biology allied to recombinant DNA technology is configured as a favorable tool in the enzymatic production, allowing the expression of only the enzymes of interest, minimizing or eliminating the production of interfering proteins. In this context, the production of recombinant  $\beta$ -glucosidase by the genetically modified microorganism *Pichia pastoris*, constitutes a great step to obtain this enzyme with an economically viable production and with great potential for industrial application. Therefore, recombinant  $\beta$ -glucosidases are potential tools in the production of bioethanol, and in the near future, can be successful in meeting the requirements of alternative and renewable energy sources. According to the growing importance of  $\beta$ -glucosidase in several applications, the present work aimed to clone and express the recombinant  $\beta$ -glucosidase enzyme of *Aspergillus niger* in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. According to the results obtained, it was possible to demonstrate that the enzyme  $\beta$ -glucosidase of *A. niger* was efficiently expressed in yeast *P. pastoris*, as well as its secretion in the supernatant of the cell culture according to the analysis of immunodetection Colony Blotting. Based on the SDS-PAGE gel electrophoretic profile of the induction times of the  $\beta$ -glucosidase production of recombinant clones Mut<sup>+</sup> (46) and clone Mut<sup>s</sup> (22), the induction in liquid medium of the recombinant clones was successfully performed due to the presentation of the band corresponding to the  $\beta$ -glucosidase enzyme with molecular mass of approximately 103 kDa. In the Mut<sup>+</sup> clone the best induction time for expression of the recombinant protein was 72 hours, in the Mut<sup>s</sup> clone the best times were 72 hours and 96 hours. Therefore, the  $\beta$ -glucosidase activity of the recombinant Mut<sup>s</sup> clone was 12,517.33 U. L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Chemical synthesis,  $\beta$ -glucosidase, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, Heterologous expression.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificações das enzimas celulolíticas segundo <i>Enzyme Comissione</i> a IUBMB <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> .....	25
Tabela 2 – Aplicação de celulasas em diversos setores.....	30
Tabela 3 – Bactérias produtoras de celulasas.....	33
Tabela 4 – Fungos produtoras de celulasas.....	34
Tabela 5 – Linhagens mais utilizadas de <i>P. pastoris</i> .....	40
Tabela 06 - Atividade $\beta$ -glucosidásica dos clones recombinantes Mut <sup>s</sup> e Mut <sup>+</sup> .....	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura e composição da fibra de celulose apresentando as ligações $\beta$ 1,4 entre os monômeros de glicose .....	22
Figura 2 - Estrutura da Celobiose .....	23
Figura 3 - Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra) .....	23
Figura 4 - Representação da molécula de celulose, dando destaque aos terminais redutores e não redutores .....	27
Figura 5 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose .....	28
Figura 6 - Ação sinérgica das celulases .....	29
Figura 7 - Via metabólica do metanol em <i>P. pastoris</i> . 1- Álcool oxidase (AOX); 2- Catalase; 3- Formaldeído desidrogenase; 4-Formato desidrogenase; 5- Dihidroxicetona sintase; 6-Dihidroxicetona quinase; 7-Frutose; 1,6-Bifosfatase.....	39
Figura 8 - Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no <i>locus HIS4</i> . A figura mostra o resultado de uma inserção do plasmídeo entre as cópias duplicadas dos genes <i>HIS4/his4</i> .....	43
Figura 9 - Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no <i>locus AOX1</i> .....	43
Figura 10 - Esquema da forma de integração por substituição gênica do gene <i>aox1</i> acarretando mudança no fenótipo da levedura hospedeira .....	44
Figura 11 - Mapa físico do vetor pBKS-BGL e suas principais regiões. Mapa físico obtido utilizando o programa SnapGene®Viewer version 2.7 .....	51
Figura 12 - Mapa circular do vetor de expressão e secreção pPIC9 e suas principais regiões .....	52
Figura 13 - Representação esquemática do gene sintético da enzima $\beta$ -glucosidase (2568 pb) para a síntese química .....	53
Figura 14 - Múltiplos sítios de clonagem do vetor pPIC9 e as regiões circundantes .....	54
Figura 15 - Perfil eletroforético em gel 0,8 % de agarose da dupla digestão do vetor pBSK-BGL com as endonucleases <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> . M-marcador Molecular de 1kb; 1- Vetor pBSK-BGL digerido com <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> ; 2- Vetor pBSK-BGL digerido com <i>EcoRI</i> ; 3-Vetor pBSK-BGL digerido com <i>NotI</i> ; 4-Vetor pBSK-BGL intacto .....	69

Figura 16 - Perfil eletroforético em gel 0,8 % de agarose da dupla digestão do vetor pPIC9 com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M- Marcador molecular de 1kb 1-Vetor pPIC9 digerido com *EcoRI* e *NotI*. 2-Vetor pPIC9 digerido com *EcoRI*; 3-Vetor pPIC9 digerido com *NotI*. 4-Vetor pPIC9 intacto .....70

Figura 17 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da purificação do inserto *bgl* e do vetor pPIC9 digeridos com *EcoRI* e *NotI*. M - Marcador molecular O' *geneRuler* 1Kb DNA ladder, ready-to-use (*Thermo Scientific*). 1- Inserto *bgl*; 2- pPIC9 linearizado .....70

Figura 18 - Mapa físico do plasmídeo recombinante pPIC-BGL construído pela ligação do gene da beta glucosidase (*bgl*) ao vetor pPIC9, situado após a região codificadora do peptídeo sinal de secreção fator  $\alpha$ . Mapa físico obtido utilizando o programa SnapGene®Viewer version 2.7 .....71

Figura 19 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos recombinantes extraídos dos clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformados geneticamente. 1- Vetor pPIC9 intacto; 2-Vetor pPIC9 linearizado sem inserto; 3-Clone 1 pPIC-BGL; 4- Clone 2 pPIC-BGL .....72

Figura 20 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando a digestão dupla bem-sucedida para a confirmação da correta construção vetor recombinante pPIC-BGL. M - marcador molecular O' *geneRuler*® 1Kb DNA ladder, ready-to-use (*Thermoscientific*); 1 - clone do pPIC-BGL intacto; 2 - clone do pPIC-BGL digerido com *EcoRI* e *NotI*; 3- pBSK-BGL intacto; 4- pPBSK-BGL digerido com *EcoRI* e *NotI*; 5 - pPIC9 intacto; 6 - pPIC9 digerido com *EcoRI* e *NotI* .....73

Figura 21 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % da análise da reação de PCR do vetor recombinante pPIC-BGL. M - Marcador molecular O' *geneRuler*® 1Kb DNA ladder, ready-to-use (*Thermoscientific*); 1 - Vetor pPIC-BGL (amostra1); 2 - Vetor pPIC-BGL (amostra 2); 3 - Vetor pPIC-BGL (amostra 3); 4 - Vetor pPIC-BGL (amostra 4); 5 - Vetor PPIC-BGL (amostra 5); 6 - Vetor pPIC9 (amostra 1); 7 - Vetor pPIC9 (amostra 2); 8 - Vetor pPIC-gla (amostra 1); 9 - Vetor pPIC-gla (amostra 2) e (10) controle negativo da reação (somente o mix) .....74

Figura 22 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % do produto da digestão do vetor recombinante pPIC-BGL com a enzima de restrição *bglII* (*biolabs*) .M- Marcador molecular 1 kb; 1-Vetor pPIC-BGL intacto; 2- pPIC-BGL digerido com *BglII*; 3- pPIC9 intacto; 4- pPIC9 digerido com *BglII* .....76

Figura 23 - Fotografia da placa com meio mínimo sem histidina (MD) dos clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 pós 72 h de cultivo a 30°C livres de contaminação .....77

Figura 24 - Fotografia da membrana de nitrocelulose utilizada na reação de imunodeteção de cauda de poli-histidina na porção C-terminal dos possíveis clones transformantes de *P. pastoris* GS115 que expressaram e secretaram a proteína recombinante  $\beta$ -glucosidase .....78

Figura 25 - Fotografia da placa dos clones transformantes de <i>P. pastoris</i> GS115 crescidos em meio MM após 60 horas de cultivo a 30 °C, com adição de metanol 0,5% a cada 24 horas e seus respectivos fenótipos .....	79
Figura 26 - Curva de crescimento celular dos clones 46 (Mut+) e 22 (Muts) crescidos em meio BMMY. O crescimento celular obtido foi convertido para g/L utilizando a fórmula (g/L)=0,22 x D.O. 600 nm (NAKANO et al., 2006) .....	81
Figura 27 - Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 10 % dos tempos de indução da produção de $\beta$ -glucosidase dos clones recombinantes Mut <sup>+</sup> (46) e Mut <sup>s</sup> (22) corados com azul brilhante de Coomassie G250. <b>A</b> - Clone Mut <sup>+</sup> (46): M - marcador <i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i> 1Kb; 1- 24 h; 2 - 48 h; 3 - 72 h; 4 - 96 h; 5 - 120 h; 6 - controle negativo GS115 com vetor pPIC9. <b>B</b> - Clone Mut <sup>s</sup> (22): M - marcador <i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i> 1Kb; 1 - 24 h; 2 - 48 h; 3 - 72 h; 4 - 96 h; 5 - 120 h; 6 - controle negativo GS115 com vetor pPIC9.....	82
Figura 28 - Curva padrão de glicose, obtida pelo método enzimático glicose oxidase (kit Glucose Liquicolor da In Vitro) .....	84

## LISTA DE SIGLAS

- aox** – Gene Codificador da Enzima Álcool Oxidase
- AOX1** – Promotor do Gene da Enzima Álcool Oxidase 1
- BG** – Enzima  $\beta$  - glucosidase
- bgl** – Gene  $\beta$ -glucosidase
- BMGY-U** – Meio Complexo de Glicina Tamponado
- BMMY-U** – Meio Complexo de Metanol Tamponado
- CBH** – Celobiohidrolase
- cDNA** – Ácido Desoxirribonucleico Complementar
- CG** – Cromatografia Gasosa
- CMC** – Carboximetil celulose
- D.O.<sub>600</sub>** – Densidade Ótica a 600 nanômetros
- DC** – Domínio catalítico
- DHAS** – Dihidroxiacetona Sintase
- DLS** – Domínio de Ligação ao Substrato
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- EC** – Comissão de Enzimas
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- g** – Gravidade
- GH** – Glucana Hidrolases
- GOD** – Glicose Oxidase
- GRAS** – Organismo Geralmente Considerado Seguro (generally regarded as safe)
- HEC** – Hidroxetilcelulose
- His<sup>-</sup>** – Fenótipo de *P. pastoris* incapaz de sintetizar o aminoácido histidina
- His<sup>+</sup>** – Fenótipo de *P. pastoris* que tem a capacidade de sintetizar o aminoácido histidina
- his4** – Gene que codifica para a enzima histidinol desidrogenase
- HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- IUBMB** – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
- KDa** – Quilodalton (unidade de massa molecular)
- Km<sup>2</sup>** – Quilometro quadrado
- L** – Litro
- M** – Molar

**mA** – Miliamperes ( $10^{-3}$  Unidade de corrente elétrica)

**MD** – Meio Mínimo de Dextrose

**MM** – Meio Mínimo de Metanol

**mM** – Milimolar

**mRNA** – Acido Ribonucleico Mensageiro

**Mut<sup>+</sup>** – Máxima Utilização de Metanol (methanol utilization plus)

**Muts<sup>-</sup>** – Lenta Utilização do Metanol (methanol utilization slow)

**NCBI** – Centro nacional de Informação Biotecnologia (national center for biotechnology information)

**nm** – Nanometro

**pb** – Pares de Bases Nitrogenadas

**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase (polymerase chain reaction)

**pI** – Ponto Isoelétrico

**rBGL** –  $\beta$ -glucosidase Recombinante

**rDNA** – Ácido Desoxirribonucleico Recombinante

**RNA** – Acido Ribonucleico

**rpm** – Rotação por minuto

**SA** – Sítio Ativo

**SCP** – Proteína de Célula Única

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**SDS-PAGE** – Dodecil Sulfato de Sódio – Gel de Poliacrilamida (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

**TT** – Terminador de transcrição

**U** – Unidade enzimática: quantidade de enzima necessária para digerir um  $\mu$ g (micrograma)

**UFAM** – Universidade Federal do Amazonas

**UV** – Ultravioleta

**W** – Watt (Unidade de potência)

**YNB** – Meio de cultura de Levedura de Base Nitrogenada

**YPD** – Meio de Cultura de Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
<b>2.1 Estruturas da Celulose</b> .....	22
<b>2.2 Enzimas Celulolíticas</b> .....	24
<b>2.3 Classificações das Enzimas Celulolíticas</b> .....	25
2.3.1 Endoglucanases.....	26
2.3.2 Exoglucanases .....	27
2.3.3 $\beta$ -glucosidases .....	28
<b>2.4 Sinergismo entre as Celulases</b> .....	28
<b>2.5 Aplicações Industrial das Celulases</b> .....	30
<b>2.6 Microrganismos Celulolíticos</b> .....	32
<b>2.7 Sistema de Expressão Heteróloga</b> .....	35
2.7.1 <i>Pichia pastoris</i> como Sistema de Expressão Heteróloga .....	35
2.7.2 Metabolismo do Metanol .....	38
2.7.3 Linhagens de <i>Pichia pastoris</i> .....	40
2.7.4 Vetores de expressão.....	41
2.7.5 Fenótipos da levedura e sistema de integração no genoma .....	42
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	45
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	47
4.1 Objetivo Geral.....	47
4.2 Objetivos Específicos .....	47
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
5.1 Estratégia Utilizada .....	48
5.2 Linhagens de Hospedeiras.....	48
5.3 Meios de Cultivos .....	49
5.3.1 Meios de cultivo bacteriano .....	49
5.3.2 Meios de cultivo de leveduras <i>P. Pastoris</i> .....	49
5.4 Vetores Utilizados .....	51
5.5 Análise <i>in silico</i> e Síntese Química do Gene Codificador para Enzima: glucosidase de <i>Aspergillus Niger</i> para Expressão em Levedura <i>Pichia pastoris</i> GS115 .....	52
5.6 Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL para Expressão de $\beta$ - glucosidase <i>Aspergillus niger</i> em Levedura <i>Pichia pastoris</i> GS115.....	53

5.6.1	Transformação de células de <i>Echerichia coli</i> DH5 $\alpha$ F'1q com o vetor recombinante pPIC-BGL por eletroporação .....	55
5.6.2	Extração de DNA plasmidial pPIC-BGL.....	55
<b>5.7</b>	<b>Análises para Confirmação da Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL</b> .....	<b>56</b>
5.7.1	Análise de restrição do vetor recombinante pPIC-BGL com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> .....	56
5.7.2	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do plasmídeo recombinante pPIC-BGL .....	57
5.7.3	Sequenciamento do plasmídeo recombinante pPIC-BGL .....	57
<b>5.8</b>	<b>Transformação de Levedura <i>Pichia pastoris</i> GS115 com o Vetor pPIC-BGL</b> .....	<b>59</b>
5.8.1	Linearização dos vetores de expressão pPIC-BGL e pPIC9 com a enzima <i>BglII</i> .....	59
5.8.2	Precipitação com acetato de amônio dos vetores pPIC-BGL e pPIC9 .....	60
5.8.3	Transformação da levedura <i>Pichia pastoris</i> GS115 .....	60
5.8.4	Integração no locus <i>AOX1</i> por substituição gênica .....	61
<b>5.9</b>	<b>Expressão da <math>\beta</math>-glucosidase de <i>Aspergillus niger</i> Recombinante</b> .....	<b>61</b>
5.9.1	Indução em meio sólido dos clones recombinantes pPIC-BGL.....	61
5.9.2	<i>Colony Blotting</i> – imunodeteccção de cauda de poli-histidina na porção C-terminal .....	62
5.9.3	Determinação dos recombinantes com de fenótipos Mut <sup>+</sup> e Mut <sup>s</sup> .....	63
5.9.4	Cinética de indução enzimática .....	63
5.9.4.1	Indução em meio líquido para clones recombinantes com fenótipos Mut <sup>+</sup> e Mut <sup>s</sup> .....	64
<b>5.10</b>	<b>Análise do Produto Expresso em Gel Desnaturante SDS-PAGE</b> .....	<b>65</b>
<b>5.11</b>	<b>Quantificação de Proteínas Totais</b> .....	<b>65</b>
<b>5.12</b>	<b>Ensaio Enzimáticos para a Determinação da Atividade do Produto Gênico</b> .....	<b>66</b>
5.12.1	Ensaio quantitativo para atividade $\beta$ -glucosidásica .....	66
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>6.1</b>	<b>Análise <i>in silico</i> e Síntese Química do Gene Codificador para Enzima <math>\beta</math>-glucosidase <i>Aspergillus niger</i> para Expressão em Levedura <i>Pichia pastoris</i> ..</b>	
<b>6.2</b>	<b>Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL para Expressão de <math>\beta</math>-glucosidase <i>Aspergillus niger</i> em Levedura <i>Pichia pastoris</i> GS115.....</b>	<b>68</b>
<b>6.3</b>	<b>Análises para Confirmação da Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL</b> .....	<b>72</b>

<b>6.4 Transformação de Levedura <i>Pichia pastoris</i> GS115 com o Vetor pPIC-BGL</b>	75
<b>6.5 Expressão da <math>\beta</math>-glucosidase de <i>A. niger</i> Recombinante</b>	77
6.5.1 <i>Colony Blotting</i> – imunodeteção de cauda de poli-histidina na porção c-terminal e determinação dos recombinantes possuidores de fenótipos Mut <sup>+</sup> e Mut <sup>s</sup>	78
<b>6.6 Cinética de Indução Enzimática</b>	79
6.6.1 Seleção e obtenção das curvas de crescimento	80
<b>6.7. Análise do Produto Expresso em Gel Desnaturante SDS-PAGE</b>	81
<b>7 CONCLUSÕES</b>	86
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	87
<b>REFERÊNCIAS</b>	88
<b>ANEXO 1: Protocolo de purificação de DNA do gel de agarose com o kit comercial <i>Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i> (GE Healthcare)</b>	95
<b>ANEXO 2: Protocolo de Preparo das células de <i>Escherichia coli</i> DH5<math>\alpha</math> eletrocompetentes</b>	96
<b>ANEXO 3: Protocolo de extração de DNA plasmidial do kit <i>Illustra PlasmidPrep Mini Spin kit</i> (GE Healthcare)</b>	97
<b>ANEXO 4: Protocolo de preparação de células eletrocompetentes de <i>P. pastoris</i> GS115</b>	98
<b>ANEXO 5: Protocolo de imunodeteção Cromogênico Western Breeze da Invitrogen Life Technologies (<i>WesternBreeze<sup>®</sup> Cromogenic western Blot Immunodetection kit</i>)</b>	99
<b>ANEXO 6: Alinhamento múltiplo usando Clustal W da sequência do gene <i>bgl</i> com a sequência reversa complementar gerada durante o sequenciamento do plasmídeo recombinante pPIC-BGL. O * representam regiões de similaridade entre os nucleotídeos.</b>	100

## 1 INTRODUÇÃO

Celulases, pertencente à classe das hidrolases, são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Essas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol. De acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico, as enzimas celulolíticas são classificadas (segundo a IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) em três classes: endoglucanase - inicia o processo de hidrólise internamente de forma aleatória na molécula de celulose, exoglucanase – atua na região redutora e não redutora e  $\beta$ -glucosidase – hidrolisam celobiose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas solúveis.

As enzimas  $\beta$ -glucosidases, ou  $\beta$ -glicosídeo gluco-hidrolases (E.C 3.2.1.21), tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Assim como a exoglucanase, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise. Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase) apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia.

Complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm demonstrado capacidade de catalisar a hidrólise de celulose em açúcares solúveis de baixas massas moleculares. Dentre todos os microrganismos produtores de enzimas celulolíticas, os fungos filamentosos são os mais utilizados no processo industrial, sendo considerados os melhores produtores de enzimas celulolíticas por produzirem naturalmente as celulases necessárias para a sacarificação completa de lignocelulose. Entre os microrganismos capazes de secretar estas enzimas, destaca-se o fungo filamentoso *Aspergillus niger* por produzir eficientemente grande quantidade de  $\beta$ -glucosidases.

Os avanços das pesquisas sobre celulases ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Ao longo dos anos, contribuições científicas vêm sendo geradas continuamente, no que tange ao isolamento de microrganismos produtores de celulases, ao aumento da expressão de celulases por mutações gênicas, à purificação

e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, à clonagem e expressão de genes, à determinação de estruturas tridimensionais das celulasas e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante na década de 70, novos procedimentos foram desenvolvidos permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado clonagem gênica. A tecnologia do DNA recombinante também é uma potente alternativa que permite o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico. A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. O processo geral baseia-se em três enfoques experimentais principais. A produção de fragmentos de DNA de fontes diferentes que contenham as sequências gênicas de interesse, seguido da reunião desses segmentos em uma molécula de DNA capaz de se replicar, normalmente um plasmídeo bacteriano chamado vetor, e a transformação de células bacterianas com a molécula recombinante de modo que elas se repliquem e então se expressem. Como consequência do desenvolvimento desta tecnologia, ampliou-se a possibilidade de explorarmos um número de variantes enzimáticas geradas por evolução *in vitro* para uma determinada aplicação.

O emprego de organismos modificados por engenharia genética tem permitido o desenvolvimento de tecnologias aplicadas na obtenção de diversos compostos de elevado interesse industrial. Entretanto, a síntese química de ácidos nucleicos, associada à otimização de códons preferenciais, é uma alternativa atraente na clonagem de genes em que possibilita para o organismo de expressão proposto favorecendo assim, elevados rendimentos das proteínas de interesse.

A levedura *Pichia pastoris* é uma poderosa ferramenta para a expressão heteróloga de proteínas. A crescente popularidade deste sistema de expressão pode ser atribuída a vários fatores, tais como a simplicidade de técnicas necessárias para a manipulação genética molecular de *P. pastoris*, muitas modificações pós-tradução eucarióticas e de alto nível a expressão do gene. Um benefício adicional do sistema de *P. pastoris* é que os promotores fortes estão disponíveis para conduzir a expressão de um gene heterólogo de interesse, permitindo a produção de grandes quantidades da proteína-alvo com relativa facilidade técnica e menor custo do que a maioria dos

outros sistemas eucarióticos. A mais notável característica fisiológica dessa levedura é o fato de ela ser metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. Assim como, a presença de promotor forte induzível derivado do gene da proteína álcool oxidase 1 (AOXI) de *P. pastoris* que dirige a expressão das proteínas heterólogas, aumentando sua expressão de proteínas em até 100 vezes quando na presença de metanol.

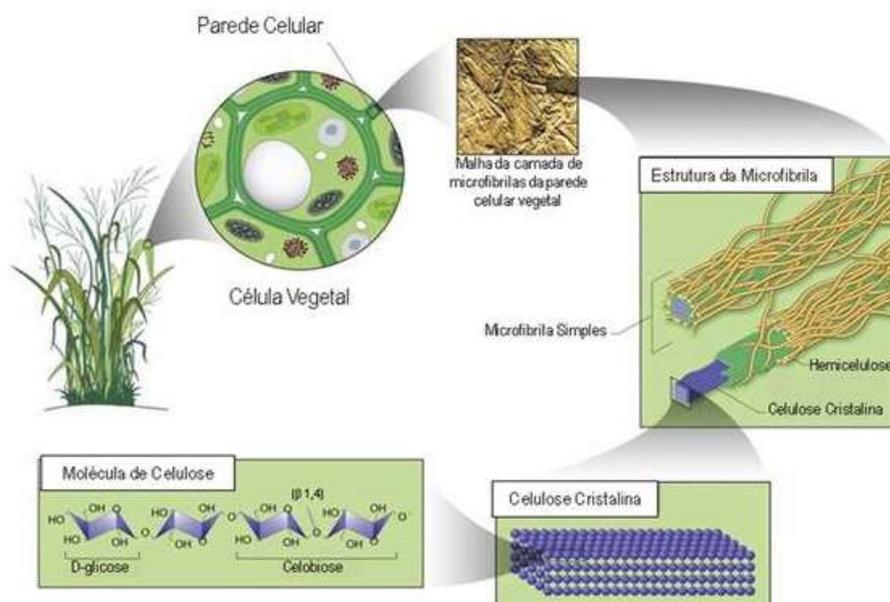
Diversas celulasas já foram expressas e caracterizadas utilizando este organismo como sistema de expressão heteróloga, uma das razões é pelo fato da levedura *P. pastoris* não apresentar atividade celulolítica. A expressão dessas enzimas nessas hospedeiras tem por objetivo obter a enzima em grandes quantidades e posteriormente sua purificação principalmente para aplicação industrial nos mais diferentes setores.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estruturas da Celulose

A celulose, dentre os materiais naturais é o biopolímero renovável mais abundante do mundo, insolúvel em água e altamente resistente a despolimerização. É um homopolissacarídeo linear, não ramificado, contendo apenas um único tipo de unidade monomérica, cerca de 10 a 15 mil unidades de D-glicose. As unidades de glicose na celulose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ), e cada par dessa hexose é definida como celobiose, unidade conformacional mínima da celulose e, a glicose a unidade fundamental da cadeia homopolimérica. Cadeias de celulose são agregadas paralelamente em estruturas cristalinas chamadas microfibrilas (BECKHAM, 2011; NELSON e COX, 2011; RAVEN et al., 2001) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura e composição da fibra de celulose apresentando as ligações  $\beta 1,4$  entre os monômeros de glicose.



Fonte: Modificado de DOE, 2005.

A celulose pode ser encontrada na forma pura, como no algodão, ou associado à hemicelulose e lignina, presentes na parede celular de diversos vegetais, tendo como principais funções fornecer rigidez e proteção (SANDGREN et al., 2005). Durante os estágios iniciais do crescimento do vegetal o conteúdo de celulose pode variar 35 a 50%, hemicelulose 25 a 35% e lignina 5 a 30%, de seu peso seco (LYND et al., 2002).

Para a formação da celulose, polímeros adjacentes interagem por pontes de hidrogênio e organizam-se formando estruturas conhecidas com microfibrilas, as quais se reúnem em estruturas maiores, denominadas por fibras de celulose (macrofibrilas) (LYNDY et al., 2002). As microfibrilas cristalinas e não-solúveis da celulose fazem com que a sacarificação (hidrólise do polissacarídeo em monossacarídeos como os monômeros de glicose) enzimática seja um desafio. As unidades monossacarídicas de D-glicose unidas por ligação  $\beta$ 1,4 ao longo de cadeias da celulose cristalina podem girar uma em relação a outra ( $180^\circ$ ), o que significa que a celobiose (figura 2) é a unidade de repetição (HORN et al., 2012).

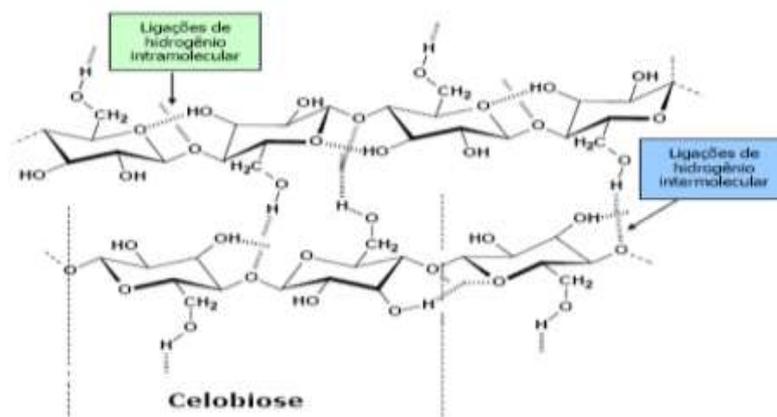
Figura 2 - Estrutura da Celobiose



Fonte: Lehninger, (2002)

Moléculas de celulose possuem duas regiões, uma cristalina e outra amorfa. A região cristalina apresenta um maior número de interações intra e intermoleculares, como pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, o que torna a celulose insolúvel e mais resistente à ação enzimática, à tração e à agentes químicos (PERCIVAL et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra).



Fonte: Adaptado de Radford et al., 1996.

A região amorfa, é mais facilmente hidrolisável, por apresentar menor grau de compactação dos polímeros, possui menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (LYNDY et al., 2002). Além das regiões amorfas as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato, favorecendo o acesso de moléculas de água e outras moléculas maiores tais como as enzimas celulolíticas (BÉGUIN et al., 1994).

Diversas formas estruturais de celulose têm sido descritas e existem pelo menos sete formas cristalinas de celulose identificadas, designadas como  $\alpha$ ,  $\beta$ , II, III, IIII, VI e VII. Cada uma destas formas cristalinas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas (KADLA e GILBERT, 1997). As formas  $\alpha$ ,  $\beta$  são as mais abundantes na natureza e por isso são chamadas de celulose nativa, e as outras formas são alomorfas produzidos por processamento das formas  $\alpha$  e  $\beta$  (O'SULLIVAN, 1997).

No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm demonstrado capacidade de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis de baixas massas moleculares como a celobiose e glicose (BHAT, 1997). O valor da celulose como uma fonte renovável torna sua hidrólise um assunto de grande interesse industrial e de pesquisa intensa, uma vez que ela pode ser convertida em produtos de valor comercial como glicose e etanol (BHAT, 2000).

## **2.2 Enzimas Celulolíticas**

As enzimas são catalisadores biológicos muito eficientes. Apresentam diversas características notáveis quando comparadas com catalisadores químicos dentre as quais: especificidade pelo substrato e a especificidade em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato. Como catalisadores, as enzimas atuam em pequena quantidade, não são degradadas no momento da catálise, podendo ser recuperadas, dependendo das condições de tratamento utilizados. Elas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam (SANTOS, 2007).

Conforme Rocha, (2010) a tecnologia das enzimas é hoje um dos campos mais

promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais que utilizam os catalisadores biológicos apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas.

As enzimas celulasas fazem parte da classe das hidrolases (enzimas que se associam a moléculas de água para promoverem a quebra das ligações covalentes), um complexo enzimático cujas enzimas atuam sinergicamente sobre materiais celulósicos promovendo sua hidrólise, são naturalmente secretadas por um espectro de bactérias, fungos aeróbios e anaeróbios e protozoários (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; POLIZELI et al., 2005). E também, no sistema digestório de algumas espécies de gastrópodes, que apresentam a capacidade de hidrolisar celulose e pequenos oligossacarídeos e a molécula de glicose (KUBICEK, et al., 2003).

### 2.3 Classificações das Enzimas Celulolíticas

Segundo a *Enzyme Commission* (E.C.), as enzimas do complexo celulolítico são pertencentes à família das hidrolases glicosídicas por realizarem clivagens das ligações O-glicosídicas, apresentando a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia de acordo com a celulase avaliada (HENRISSAT et al., 1991). De acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico, as enzimas celulolíticas são classificadas (segundo a IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) em três classes: I- endo- 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucano-hidrolases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; II- exo-1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucanases, responsáveis pela ação originando a celobiose e III- $\beta$ -glicosídeo glucohidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis (celobiose) gerando a glicose, que em conjunto, essas enzimas constituem um complexo de enzimas celulasas (tabela 1).

Tabela 1 - Classificações das enzimas celulolíticas segundo *Enzyme Commission* e a IUBMB *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*.

Celulasas	Comissão de Enzima	IUBMB
Endoglucanases	E.C. 3.2.1.4	Endo 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucanohidrolases
Exoglucanases	E.C. 3.2.1.91	Exo 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucanoidrolases
$\beta$ -glucosidase	E.C. 3.2.1.21	B-glicosídeo glucohidrolases

Fonte: IUBMB: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

Muitas celulasas são compostas por dois domínios distintos: o domínio de ligação ao substrato (DLS) e domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo (SA). O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de hidrólise de ligações localizadas em regiões diferentes do substrato, com ligações terminais localizadas nas extremidades das cadeias e ligações internas. O domínio de ligação ao substrato está associado à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulasas na superfície da celulose através de interações não-covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio, forças eletroestáticas e interações hidrofóbicas (MARTINS, 2005).

De acordo com Suto e Tonita (2001), as enzimas celulolíticas são reguladas por repressão catabólica, ou seja, o produto final da via enzimática, a glicose, inibe a expressão dos genes. Esse fenômeno não é universal, sendo outros sacarídeos capazes de atuar na repressão, tais como frutose, galactose e sacarose (dissacarídeos). Entretanto, segundo Camassola e Dillon (2006), existem evidências que sugerem que a repressão pode ser minimizada com a suplementação de metilxantinas, aumentando o produto de secreção.

### 2.3.1 Endoglucanases

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) também são conhecidas como carboximetil celulase, são responsáveis por iniciar a hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$  (1 4) da molécula de celulose e seus derivados. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável em carboximetil celulose (CMC), avicel (celulose cristalina),  $\beta$ -glicana e xilana. Elas atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade é diminuída conforme o encurtamento da cadeia de celulose (LYND et al., 2002; PERCIVAL ZHANG et al, 2006).

As endoglucanases atacam internamente a molécula de forma aleatória na parte amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (LYND et al., 2002; CASTRO et al., 2010).

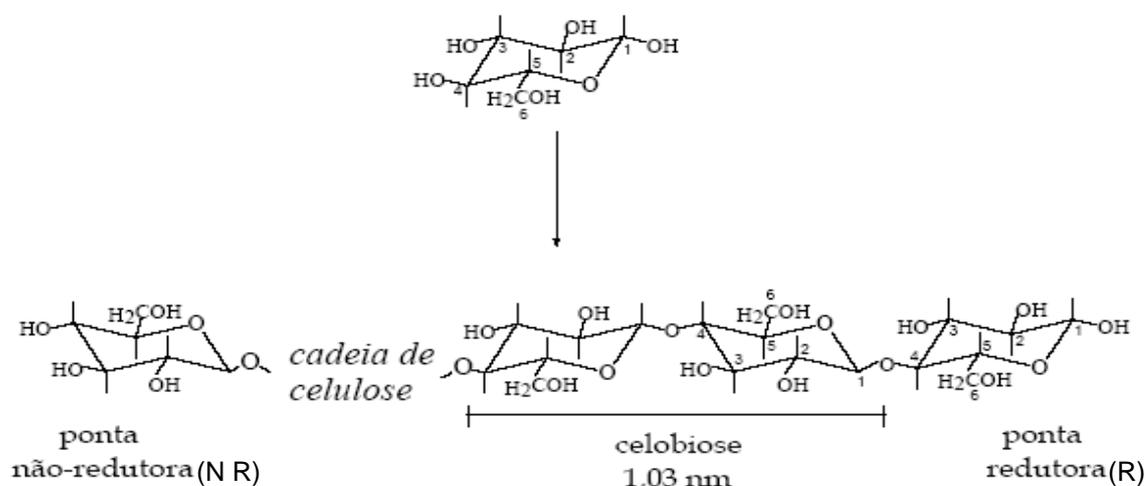
Conforme os estudos de Lynd et al. (1999), a atividade catalítica das endoglucanases pode ser medida a partir da diminuição da viscosidade do meio decorrente da diminuição de massa molar média de celulose ou derivados de celulose.

### 2.3.2 Exoglucanases

As exoglucanases atuam em porções redutoras e não redutoras sendo capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando cadeias do polissacarídeo. Duas classificações são utilizadas para definir este tipo de atividade enzimática: 1,4- $\beta$ -D glucana-hidrolases e celobiohidrolases.

As 1,4- $\beta$ -D-glucana-hidrolases (GH), também conhecidas como exo- $\beta$ -glucosidase (EC. 3.2.1.74), são responsáveis pela hidrólise da fibra celulósica, liberando glicose diretamente do polímero. Celobiohidrolase (CBH) (EC 3.2.1.91), denominadas também como exo-glucanase ou celobiohidrolases, pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (NR) (figura 4). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose), por isso é de grande importância à atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as  $\beta$ -glucosidases possuem ação limitada sobre substratos de carboximetil celulose e hidroxetilcelulose (HEC) (BON et al., 2008; CASTRO et al, 2010).

Figura 4 - Representação da molécula de celulose, dando destaque aos terminais redutores e não redutores.



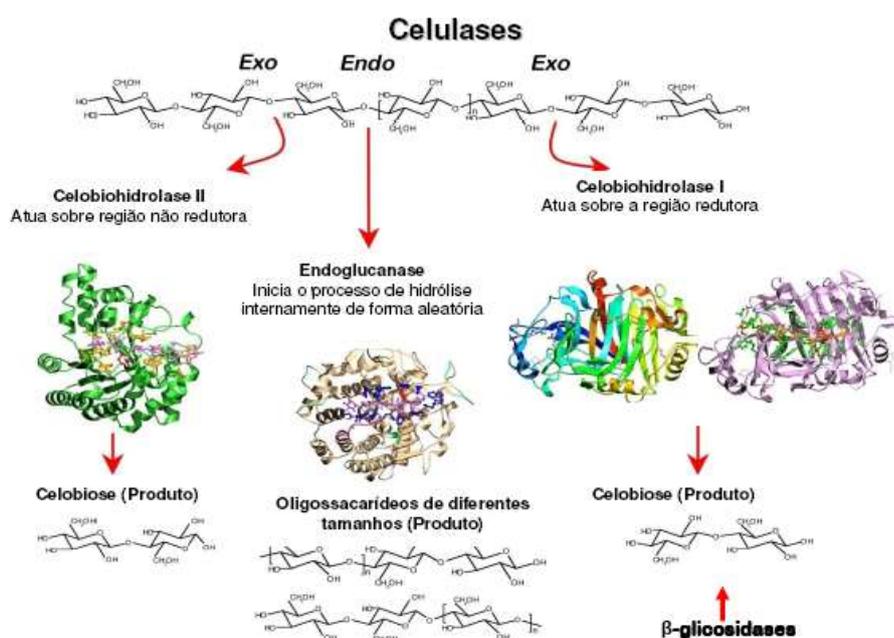
Fonte: Adaptado Ramos (2003)

### 2.3.3 $\beta$ -glucosidases

As  $\beta$ -glucosidases (3.2.1.21) hidrolisam celbiose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas solúveis (BHAT e BHAT, 1997). Sua atividade catalítica pode ser medida através da análise dos produtos por HPLC ou CG, ou mesmo por espectrofotometria (BON et al., 2005).

As  $\beta$ -glucosidases tem um papel importante na hidrólise de materiais lignocelulolíticos. A celbiose, principal substrato para a  $\beta$ -glucosidase é um potente inibidor de exocelulases e sua ausência diminui o processo de sacarificação das biomassas (ALMEIDA, 2009; LYNDY et al., 2002) (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.



Fonte: Adaptado de Lynd et al., 2002.

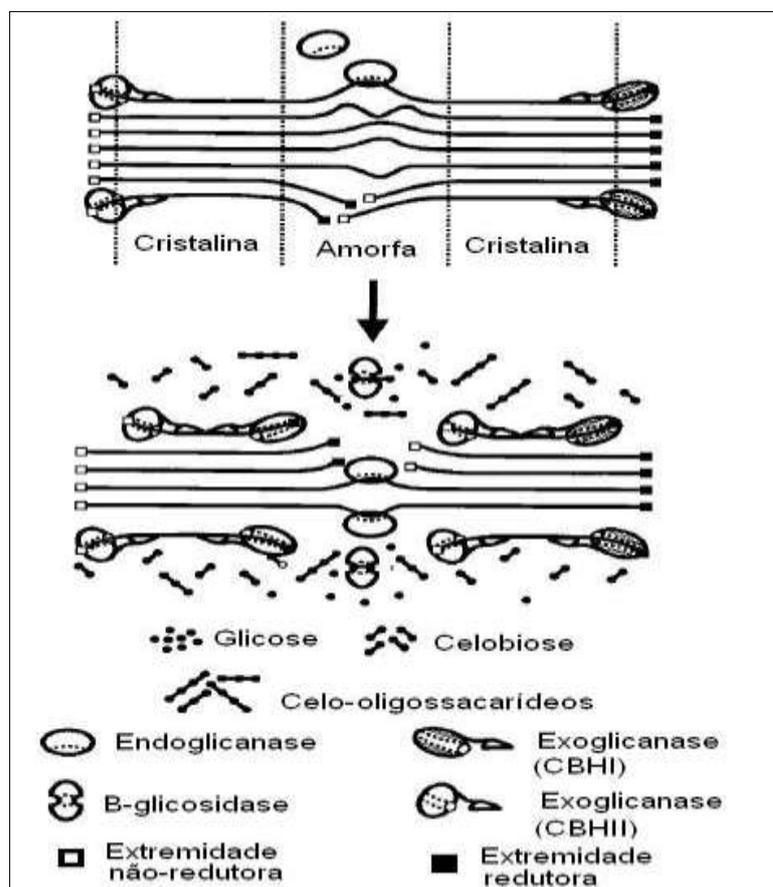
### 2.4 Sinergismo entre as Celulases

A eficiência da hidrólise enzimática da celulose está ligada com sua atuação em conjunto. As enzimas do complexo celulolítico tem um rendimento maior quando atuam juntas do que quando atuam isoladamente, essa ação conjunta é chamada de sinergismo enzimático. Esse sinergismo faz com que a velocidade de formação de

produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (GAN et al., 2003; SANDGREN et al., 2005).

A ação sinérgica das celulasas tem sido alvo de muitos estudos de forma que se possa entender melhor o modo de ação dessas enzimas (HU et al., 2013; HU et al., 2015; JALAK, et al., 2012; JEOH, et al., 2006). Têm sido reportados pelo menos três tipos de sinergismo das enzimas celulolíticas (Figura 6).

Figura 06 - Ação sinérgica das celulasas.



Fonte: Adaptado de Lynd et al., 2002.

O sinergismo endo-exo, que é conceituado pela ação das endoglucanases nas regiões amorfas da fibra celulósica gerando terminais redutores (com carbonila livre) e não redutores (sem carbonila livre) que servem como substrato para ação das CBH I e CBH II. De um modo geral, as endoglucanases produzem cortes nos filamentos de celulose e essas extremidades livres são direcionadas para as exoglucanase (HENRISSAT, 1985; JALAK et al, 2012; XU et al., 2007).

Sinergismo exo-exo, caracterizado pela ação simultânea das duas celobiohidrolases nos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglucanases, ou seja, as CBH I atuando nos terminais redutores e as CBH II nos terminais não redutores (XU et al, 2007).

O sinergismo exo-BG e Endo-BG é demonstrado pela ação das  $\beta$ -glicosidases sobre os produtos das exoglucanases e endoglucanases, que são celobiose e oligossacarídeos respectivamente, os quais servem como substrato para a  $\beta$ -glicosidase (CASTRO, 2010).

## 2.5 Aplicações Industrial das Celulases

Os aspectos biológicos de processamento da biomassa celulósica tornaram-se o cerne da investigação futura envolvendo celulases e microrganismos celulolíticos. Celulases estão sendo produzidas comercialmente por diversas indústrias a nível mundial e estão sendo vastamente utilizadas em aplicações de alimentos, ração animal, fermentação, agricultura, papel e celulose e têxtil e dentre outras (tabela 2).

Tabela 2 - Aplicação de celulases em diversos setores.

<b>Setores Industriais</b>	<b>Aplicações</b>
<b>Agricultura</b>	Controle de doenças e patógenos de plantas; melhoramento da germinação e do sistema radicular, maior crescimento e florescimento da planta; melhoramento da qualidade do solo e redução da dependência de fertilizantes minerais.
<b>Bioconversão – Pecuária</b>	Conversão de materiais celulósicos em etanol, outros solventes, ácidos orgânicos, lipídios, produção de alimentos rico em energia para animais, melhora do desempenho de ruminantes, melhoria da digestão e absorção alimentar e preservação de forragens de alta qualidade.
<b>Detergente</b>	Detergentes à base de celulases; ação de limpeza superior sem danificar as fibras; melhora o brilho da cor e a remoção de sujeira e remove protuberâncias ásperas em tecidos de algodão.
<b>Fermentação</b>	Melhoria na prensagem e extração da cor de uvas; melhoria do aroma de vinhos; melhoria na fermentação primária e qualidade da cerveja, e melhora na taxa de filtração e estabilidade do vinho.

<b>Alimentação</b>	Liberação de antioxidantes do bagaço de frutas e legumes; melhoria de rendimentos na extração de amido e proteínas; melhoria na maceração e extração de cores de frutas e legumes; clarificação de sucos de frutas; melhoria da textura e qualidade dos produtos de padaria; melhoria na viscosidade de purês de frutas; melhoria da textura, sabor, aroma e propriedades voláteis de frutas e verduras e controle do sabor amargo de frutas cítricas.
<b>Polpa de papel e celulose</b>	Co-aditivo no branqueamento de celulose; destintagem enzimática; consumo de energia e cloro reduzido, melhoramento do brilho da fibra, propriedades de resistência e grau de refinação de celulose e limpeza e melhoramento da drenagem em fábricas de papel, produção de papelão biodegradáveis, toalhas de papel e papel higiênico.
<b>Têxtil</b>	Biopolimento de jeans; biopolimento de fibras têxteis; melhora da qualidade de tecidos; melhora da propriedade de absorção de fibras; suavização de peças de vestuário; melhor estabilidade de tecidos celulósicos; remoção do excesso de corantes dos tecidos e restauração do brilho da cor.
<b>Outros</b>	Melhora a extração de carotenoides; melhora a oxidação e a estabilidade da cor de carotenoides; melhora a extração de óleo de oliva; melhoria da qualidade do azeite e redução dos riscos de resíduos de biomassa.

Fonte: Adaptado de Gupta et al., 2013.

Com as ferramentas da biotecnologia moderna, especialmente na área da genética de microrganismos, novas enzimas e novas aplicações enzimáticas ficarão disponíveis para as várias indústrias. Melhorias nas atividades de celulase ou utilizando de características desejadas para as enzimas de engenharia de proteínas são, provavelmente, outras áreas onde a investigação das celulasas tem de avançar (GUPTA et al. 2013).

Conforme Castro e Pereira Jr. (2010), grandes avanços das pesquisas sobre celulasas ocorrem em diversas áreas do conhecimento. Ao longo dos anos e até a atualidade, contribuições científicas vêm sendo geradas continuamente no que tange: ao isolamento de microrganismos produtores de celulasas, aumento da expressão de celulasas por expressão gênica, à purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre o mecanismo de ataque a

celulose, à clonagem e expressão de genes, à determinação tridimensional das celulasas e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas.

## 2.6 Microrganismos Celulolíticos

As enzimas celulolíticas podem ser produzidas por um grande espectro de microrganismos, que inclui bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Romnococcus*, etc.) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida*, etc.), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, etc.), plantas (*Fragaria*) e animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002; PALOMER et al., 2004). Além disso, o material genético recuperado diretamente a partir de amostras ambientais, também tem mostrado o potencial para explorar novas celulasas presente nos genomas dos microrganismos (KUHAD e SINGH, 2007). Na tabela 3 é apresentada uma relação de bactérias produtoras de celulasas.

Segundo Soccol et al. (1994), dentre todos os microrganismos produtores de enzimas celulolíticas, os fungos filamentosos são os mais utilizados no processo industrial (Tabela 4). Suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas permitem seu crescimento em substratos sólidos e a bioconversão dos mesmos, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes microrganismos.

Os fungos são considerados os melhores produtores de enzimas celulolíticas por produzirem naturalmente as celulasas necessárias para a sacarificação completa de lignocelulose pré-tratada (cerca de 30 a 50 mg de enzima por g de celulose cristalina). Por exemplo, o fungo *Trichoderma reesei* tem sido reportado como capaz de produzir mais de 100g de celulasas por litro de cultura submersa, enquanto as bactérias celulolíticas mais produtivas conseguem produzir apenas alguns gramas por litro (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010).

Conforme Amorea e Faraco (2012), o desempenho dos fungos na produção de celulasas e secreção de enzimas complexas pode ser devido à presença de seu sistema de secreção ser muito eficiente, o qual as bactérias não possuem esse tipo de sistema excretor, o que as torna difíceis ou inviáveis para serem projetadas para produção de enzimas celulolíticas em grandes quantidades.

Tabela 3 - Bactérias produtoras de celulasas.

<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>	<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>
<i>Acinetobacter junii</i>	Lo et al. (2010)	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Hazlewood et al. (1990)
<i>Anoxybacillus</i> sp.	Liang et al. (2009)	<i>Cellulomonas</i>	Lo et al. (2009)
<i>Acinetobacter anitratus</i>	Ekperigin, (2007)	<i>Cellulomonas biazotea</i>	Rajoka e Malik (1997)
<i>Bacillus subtilis</i>	Heck et al.(2002) Kim et al. ( 2009)	<i>Clostridium thermocellum</i>	Chinn et al. (2008) Dharmagadda et al. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	Krishna, (1999)	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Desvaux et al. (2000)
<i>Bacillus pumilus</i>	Ariffin et al. (2008)	<i>Clostridium acetobutylium</i>	Sabathe et al. (2002)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Lee et al. (2008)	<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Thirumale et al. (2001)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bischoff et al. (2006)	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	Moon e Anderson (2001)
<i>Bacillus</i> sp.	Li et al. (2008)	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Bera-Maillet et al. (2009)
<i>Bacillus</i> sp.	Rastogi et al. (2010)	<i>Geobacillus</i> sp.	Rastogi et al. (2010)
<i>Bacillus circulans</i>	Hakamada et al. (2002)	<i>Paenibacilluscurdolanolyticus</i>	Waeonukul et al. (2009)
<i>Bacillus flexus</i>	Trivedi et al. (2011)	<i>Salinivibrio</i> sp.	Wang et al. (2009)
<i>Bacteroides</i> sp.	Ponpium et al. (2000)	<i>Ruminococcus albus</i>	Ohara et al. (2000)

Fonte: Gupta et al. (2013).

Tabela 4 - Fungos produtores de celulases.

<b>Microrganismo</b>	<b>Referências</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Referências</b>
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Fang et al. (2008)	<i>Paecilomyces in flatus</i>	Kluczek-Turpeinen et al. (2007)
<i>Agaricus arvensis</i>	Jeya et al. (2010)	<i>Penicillium echinulatum</i>	Camassola e Dillon (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Hanif et al. (2004)	<i>Penicillium decumbens</i>	Sun et al. (2008)
<i>Aspergillus terreus</i>	Gao et al. (2008)	<i>Penicillium brasilianum</i>	Jorgensen e Olsson (2006)
<i>Daldinia eschscholzii</i>	Karnchanatat et al. (2008)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Membrillo et al. (2008)
<i>Humicola grisea</i>	Mello-De-Sousa et al. (2011)	<i>Phlebia gigantea</i>	Niranjane et al. (2007)
<i>Lentinus tigrinus</i>	Lechner e Papinutti (2006)	<i>Piromyces communis</i>	Kim et al. (2008)
<i>Melanocarpus</i> sp.	Kaur et al. (2006)	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Ludwig e Haltrich (2003)
<i>Monascus purpureus</i>	Daroit et al. (2007)	<i>Scytalidium thermophilum</i>	Kaur et al. (2006)
<i>Myceliophthora</i> sp.	Badhan et al. (2007)	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Leite et al. (2008)
<i>Mucor circinelloides</i>	Saha (2004)	<i>Trichoderma atroviride</i>	Kovacs et al. (2008)
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Srinivasan et al. (2001)	<i>Trichoderma reesei</i>	Juhasz et al. (2005)
<i>Orpinomyces</i> sp.	Hodrova et al. (1998)		

Fonte: Gupta et al. (2013).

## 2.7 Sistema de Expressão Heteróloga

O sistema de expressão heteróloga de enzimas ou proteínas e peptídeos são indicados quando os microrganismos produtores secretam de forma limitada seus produtos, acarretando a inviabilidade de sua aplicação na indústria biotecnológica. A expressão heteróloga tem sido empregada para potencializar a obtenção desses produtos de interesse biotecnológico. Nesse sentido, diversos sistemas de expressão de genes heterólogos foram desenvolvidos para procariontes como *Escherichia coli* (BANEYX, 1999; LADERMAN et al., 1993; VAZ, 2008) e *Bacillus sp.* (MARQUES, 2013; YANG et al., 2001) e mais eficientemente para leveduras (ARAUJO, 2012; FINGER et al., 2016; SREEKRISHNA et al., 1997).

Conforme os estudos de Rodrigo (2004) e Finger et al. (2016), os sistemas de expressão heteróloga procarióticos são bastante utilizados na produção de proteínas recombinantes a partir de genes de origem procarióticos ou eucarióticos. Porém, em muitos casos, esses sistemas apresentam inúmeras limitações, principalmente quando as proteínas eucarióticas sintetizadas por bactérias são instáveis, não possuem atividade biológica ou podem ser contaminadas com toxinas bacterianas.

Segundo Vaz (2008), a expressão da proteína recombinante em *E. coli* pode ser considerada um processo estranho à célula, principalmente quando se trata de genes eucariotos, ou seja, não fazendo parte do seu conjunto metabólito natural e geralmente acaba ocasionando problemas à célula hospedeira que reage as condições adversas de várias formas, dificultando a obtenção da proteína de interesse. Para evitar esses e outros problemas na obtenção de produtos como proteínas, enzimas e hormônios, sistemas de expressão heteróloga eucarióticos utilizando leveduras foram desenvolvidos e são mais atrativos quanto a sua eficiência na elaboração final dos produtos expressos e secretados.

### 2.7.1 *Pichia pastoris* como Sistema de Expressão Heteróloga

A *Pichia pastoris* é uma levedura classificada como pertencente ao Reino *Fungi*, divisão *Eucomycota*, Subdivisão *Ascomycota*, Classe *Hemoascomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Sacharomycetaceae* e Subfamília *Sacharomycetoideae*. Essa levedura foi reclassificada no novo gênero *Komagataella* e dividida em três espécies: *K. pastoris*, *K. pseudopastoris* (KURTZMAN, 2009).

Apresenta-se predominantemente na forma unicelular, frequentemente permanece haploide no estado vegetativo a não ser que seja forçado o cruzamento, como em cultivos com limitação de nitrogênio, multiplica-se assexuadamente por gemulação e brotamento multilateral. Devido apresentar uma simplicidade celular, crescem e se reproduzem muito rapidamente e pode ser manipulada por métodos genéticos clássicos (CEREGHINO, CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).

O fato de crescer até alta densidade celular em um meio de baixo custo levou a empresa *Phillips Petroleum Company* juntamente com *Salk Institute Biotechnology Industrial Associates Inc.* (SIBIA, La Jolla, CA, USA) propor o uso dessa levedura como fonte de proteínas (*single cell protein - SCP*). Após constatar que o processo de produção de *SCP* era inviável economicamente devido ao aumento do cultivo da soja e com a crise do petróleo na década de 70, foi possível propor a utilização da *P. pastoris* como um sistema de produção de proteínas heteróloga, devido as suas características favoráveis para tal fim (CEREGHINO e CREGG, 2000).

A mais notável característica fisiológica dessa levedura é o fato de ela ser metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono, que pode ser geneticamente modificada para produzir um grande número de proteínas tanto a nível experimental como industrial (CEREGHINO e CREGG, 1999; SREEKRISHNA et al., 1997; SUNGA et al., 2008; TUIE et al., 1999).

Dentre as características observadas e desejadas de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga destacam-se (TORRES e MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002; DALY e HEAM, 2005; SCHUTTER et al., 2009):

- O fato de esta levedura ter o status GRAS (Generally Regarded As Safe) e converter de 30 a 40% do seu peso em proteínas;
- Facilidade de manipulação genética, devido ao sequenciamento de seu genoma;
- Apresenta crescimento a alta densidade celular (>500 OD600);
- Expressão de proteínas em altos níveis tanto intracelular como extracelular;
- Após estabelecidas as condições de cultivo em pequena escala, o escalonamento não necessita de grandes modificações;
- Existência de linhagens deficientes de protease que secretam baixas quantidades de proteínas endógenas no meio de crescimento facilitando as etapas seguintes de purificação;
- A viabilidade do sistema de expressão como Kits comercialmente disponíveis;

- Apresenta uma via de secreção eucariótica capaz de promover modificações pós-traducionais como formação de pontes dissulfeto, O- e N- glicosilação e processamento proteolítico.

Segundo Torres e Moraes (2000), a maioria das proteínas expressas por essa levedura sofre glicosilação (modificação pós-traducional que ocorre, primeiramente, no retículo endoplasmático e, posteriormente, no aparelho de *Golgi*), e o tamanho da cadeia de carboidratos adicionados por ela é bem menor que aquela adicionada por *S. cerevisiae*. A estrutura destes oligossacarídeos é muito similar à adicionada em mamíferos e, por não ser capaz de adicionar manoses terminais com ligações alfa-1,3, como *S. cerevisiae*, em geral as proteínas produzidas em *P. pastoris* são menos imunogênicas. Todavia, se a glicosilação não é desejada, as proteínas de interesse devem ser produzidas intracelularmente. Diferentemente das outras leveduras utilizadas para expressão de genes exógenos *P. pastoris* normalmente não realiza hiperglicosilação da proteína secretada, não interferindo, portanto, nos processos de enovelamento e dobramento finais da proteína madura (CREGG et al., 1989; GUO et al., 2008).

Um benefício adicional do sistema de *P. pastoris* que a torna muito eficiente para a expressão de proteínas heterólogas é a presença de promotor forte induzível derivado do gene da proteína álcool oxidase 1 (*AOX1*) de *P. pastoris* que dirige a expressão das proteínas heterólogas, aumentando sua expressão de proteínas em até 100 vezes quando na presença de metanol. Conseqüentemente, desencadeando a produção da enzima álcool oxidase que por apresentar uma baixa afinidade por oxigênio, a álcool oxidase é hiper expressada chegando a 35% do total de proteínas do meio de cultura (SREEKRISHNA et al., 1997).

Outra importante característica de *P. pastoris* é que essa levedura não é considerada uma forte fermentadora, como *S. cerevisiae*. A fermentação realizada por leveduras gera etanol, o qual, em culturas de alta densidade, pode rapidamente atingir níveis tóxicos. Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células. É necessário, pois, atingir níveis de alta densidade celular os quais não são facilmente obtidos com *S. cerevisiae*. Em contraste, as linhagens produtoras de *P. pastoris* são facilmente cultivadas a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de peso seco, ou até maiores (TORRES e MORAES, 2000).

Muitas celulasas já foram expressas e caracterizadas utilizando este organismo como sistema de expressão heteróloga, uma das razões é pelo fato da levedura *P. pastoris* não apresentar atividade celulolítica. A expressão dessas enzimas nessas hospedeiras tem por objetivo obter a enzima em grandes quantidades e com elevado grau de pureza principalmente para aplicação industrial nos mais diferentes setores. Genes de celulasas dos mais diversos organismos têm sido clonados e expressos com sucesso em *P. pastoris* (ARAUJO, 2012; HARNPICHARNCHAI et al., 2009; HONG et al., 2007; LI et al., 2008; MOLHOJ et al., 2001; RUBINI et al., 2009; SAMANTA et al., 2012; SHIBUYA e KIKUCHI, 2008).

### 2.7.2 Metabolismo do Metanol

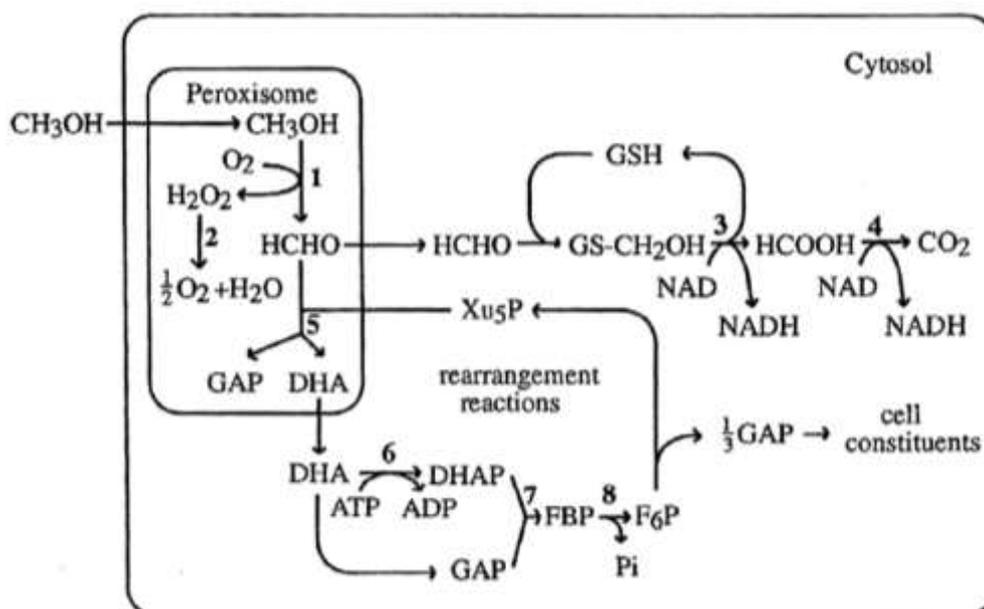
A levedura metilotrófica *P. pastoris* é capaz de crescer utilizando metanol como única fonte de carbono e energia na ausência de uma fonte de carbono que seja de assimilação mais rápida. O conceito base para o sistema de expressão em *P. pastoris* originou-se da observação de que algumas das enzimas requeridas para o metabolismo do metanol estão presentes em níveis substanciais apenas quando as células estão crescendo em metanol (CREGG et al., 1993).

As primeiras reações ocorrem em organelas especializadas, os peroxissomos, seguido por reações metabólicas subsequentes no citoplasma. Os peroxissomos têm um papel indispensável durante o crescimento, uma vez que neles estão presentes as três enzimas fundamentais para o metabolismo do metanol: a álcool oxidase (que é fortemente reprimida por diversas fontes de carbono, como glicose e glicerol, e é induzida pela falta de fonte de carbono), catalase e a dihidroxiacetona sintase. As reações subsequentes de assimilação e deassimilação de metanol estão localizadas no citosol (COUDERC et al., 1980; HARTNER e GLIEDER, 2006).

Na presença de metanol como fonte de carbono, a via metabólica se inicia pela oxidação do metanol para formar formaldeído e peróxido de hidrogênio, reação catalisada pela enzima álcool oxidase (AOX), em que constitui mais de 30% do total de proteínas solúveis da levedura. A enzima está presente dentro de uma organela chamada peroxissomo junto com outra enzima, a catalase que degrada o peróxido de hidrogênio (tóxico para célula) em oxigênio e água (CREGG et al., 1989). Uma parte do formaldeído gerado pela enzima (AOX) deixa o peroxissomo e é metabolizado no citoplasma para formação de dióxido de carbono por duas desidrogenases, reações

que serão a base para a obtenção de energia e para o crescimento da levedura na presença de metanol. O formaldeído que resta na célula é assimilado para formar constituintes celulares por um caminho cíclico que se inicia com a condensação do formaldeído com xilulose 5-monofosfato, reação catalisada pela ação da enzima dihidroxiacetona sintase (DHAS) (CEREGHINO e CREGG, 2000; COUDERC et al., 1980; HARTNER e GLIEDER, 2006). As vias de processamento do metanol são mostradas na figura 7.

Figura 7 - Via metabólica do metanol em *P. pastoris*. 1- Álcool oxidase (AOX); 2- Catalase; 3- Formaldeído desidrogenase; 4-Formato desidrogenase; 5- Dihidroxiacetona sintase; 6-Dihidroxiacetona quinase; 7- Frutose; 1,6- Bifosfatase.



Fonte: Cereghino e Cregg, 2000.

Existem dois genes em *P. pastoris* para a enzima álcool oxidase, o gene *aox1* e o gene *aox2*. Embora os produtos destes genes sejam bastante similares quanto suas sequências e funções, mais de 95% da atividade enzimática álcool oxidase (AOX) é atribuída à expressão do gene *aox1* em presença de metanol (CREGG et al., 1993). Isso é resultado da maior força do promotor do gene *aox1* comparado ao seu similar *aox2* quando induzidos, onde é vista uma porcentagem em torno de 5% para o RNA mensageiro do gene *aox1* entre todos os tipos de RNAs (CREGG e MADDEN, 1989).

Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor *AOX1* é altamente eficiente comparável aos promotores

derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. No entanto, ao contrário dos promotores glicolíticos, o promotor *AOX1* é firmemente regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol. Uma vez que a maioria das proteínas heterólogas é de alguma forma estranha para a célula hospedeira, quando expressas em altos níveis, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável. Trata-se de uma importante precaução para minimizar a seleção de mutantes que não expressam o produto heterólogo durante o crescimento da cultura (TORRES e MORAES, 2000).

Para ser ativado, o promotor *AOX1* requer a presença de metanol e, na ausência desse indutor, ele se torna reprimido. Além de metanol, o sistema *AOX1* necessita da ausência de glicose para ser inteiramente ativado. Uma vez que o promotor *AOX1* é controlado pela manipulação da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris*, que expressam proteínas heterólogas, são facilmente obtidos em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores (TORRES e MORAES, 200).

Baseado nesses processos foi possível propor uma variedade de vetores para *P. pastoris* que utilizam o promotor *AOX1* para a expressão em grande quantidade de proteínas recombinantes secretadas ou intracelulares (SEARS et al., 1998).

### 2.7.3 Linhagens de *Pichia pastoris*

Baseado na eficiência das características da levedura metilotrófica como sistema de expressão heteróloga, algumas linhagens mutantes de *P. pastoris* foram desenvolvidas derivadas do organismo tipo selvagem NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories*, Peoria, IL) (CREGG et al., 1989) (Tabela 5).

Tabela 5 - Linhagens mais utilizadas de *P. Pastoris*.

<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fenótipo</b>
X-33	Selvagem	Selvagem
GS115	<i>His4</i>	<i>Mut<sup>+</sup> , His<sup>-</sup></i>
KM71	<i>His4, aox1::ARG4 arg4</i>	<i>Mut<sup>s</sup> , His<sup>-</sup></i>
SMD1165	<i>His4 , Prb4</i>	<i>Mut<sup>+</sup> , His<sup>-</sup> , protease deficiente</i>
SMD1168	<i>His4 , Pep4</i>	<i>Mut<sup>+</sup> , His<sup>-</sup> , Pep<sup>4-</sup></i>
MC100-3	<i>Arg4 his4 ooax1:: ARG4 aox2:: his4</i>	<i>Mut<sup>+</sup> , His<sup>-</sup></i>

As linhagens foram desenvolvidas com mutações auxotróficas para proporcionar a seleção de transformantes. Há também mutantes com os genes da enzima álcool oxidase nocauteados determinando fenótipos diferenciados quanto à assimilação de metanol. Em outro caso, para minimizar os problemas de liberação de proteases no meio de cultivo foram desenvolvidas linhagens que não possuem genes que codificam alguma protease, garantindo melhor qualidade do produto secretado no meio de cultivo. Outras linhagens foram projetadas para expressar genes de proteínas específicas integrando no genoma da hospedeira e podem ser utilizadas como controle de expressão extra e intracelular (INVITROGEN, 2010).

#### 2.7.4 Vetores de expressão

Quanto aos vetores para expressão heteróloga em *P. pastoris* existe uma variedade de vetores disponíveis comercialmente para expressão de proteínas heterólogas. A estrutura básica de todos os vetores comercializados é a mesma, sendo que nenhuma conta com origem de replicação para levedura.

Os vetores de expressão são geralmente do tipo integrativos, os quais possuem um cassete de expressão formado pelo promotor que dirige a expressão da proteína heteróloga e pela região terminadora de transcrição do gene *aox1* que proporciona uma eficiente terminação da transcrição. Além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada o gene histidinol desidrogenase (*his4*). Um sítio múltiplo de clonagem para inserção do gene e ainda em alguns vetores, há o fator alfa de *S. cerevisiae* como sinal de secreção do peptídeo (CEREGHINO e CREGG, 2000; DE PAULA, 2006).

Esses vetores são caracterizados como bifuncionais (*shuttle vectors*), motivos pelos quais são utilizados para se propagar tanto em leveduras como também na bactéria *E. coli*. As marcas de seleção para vetores de expressão podem ser auxotróficas para *P. pastoris* (quando deleções ou mutações gênicas impedem a síntese de aminoácidos essenciais para a nutrição da levedura) e seleção dominante para seleção bacteriana (no caso de genes que conferem resistência a algum antibacteriano) (BOM et al., 2008).

Alguns vetores do sistema de expressão são projetados para permitir a secreção de proteínas heterólogas dirigidas por uma sequência sinal introduzida logo após a região promotora. Entre as sequências sinais de secreções mais utilizadas há

o peptídeo sinal do fator sexual  $\alpha$  ( $\alpha$ -MF) de *S. cerevisiae*, mas podem ser substituídas por sequências sinais da proteína nativa a ser expressa. Várias abordagens têm sido feitas para lançar mão de novos vetores para levedura sob ação de outros promotores que não o *AOX1* (ALMEIDA et al., 2005).

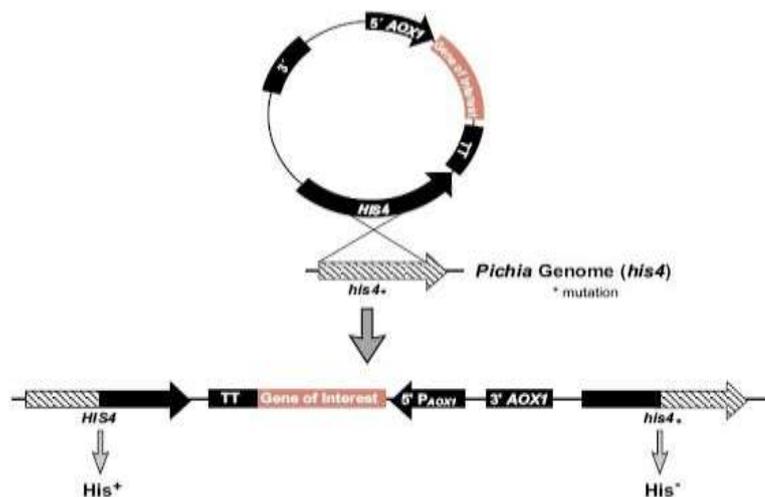
#### 2.7.5 Fenótipos da levedura e sistema de integração no genoma

O processo de integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* possibilita a caracterização de três fenótipos diferentes, que estão relacionados com a disposição da levedura em metabolizar o metanol. Os fenótipos classificados como Mut+ (*Methanol Utilization Plus*), caracteriza as linhagens de leveduras que possuem os genes *aox1* e *aox2* funcionais no seu genoma e possuem crescimento que aproxima daquele apresentado pela levedura selvagem, no fenótipo MutS (*Methanol Utilization Slow*) as linhagens hospedeiras são dependentes da fraca transcrição do gene *aox2*, uma vez que possui o gene *aox1* não funcional. O fenótipo Mut- (*Methanol Utilization Minus*) possui os dois genes *aox* inativos impossibilitando a metabolização de metanol (CREGG et al., 1985).

Segundo Cregg et al. (1993), existem dois mecanismos pelos quais a levedura metilotrófica utiliza para integrar o cassete de expressão ao seu genoma: adição e substituição gênica:

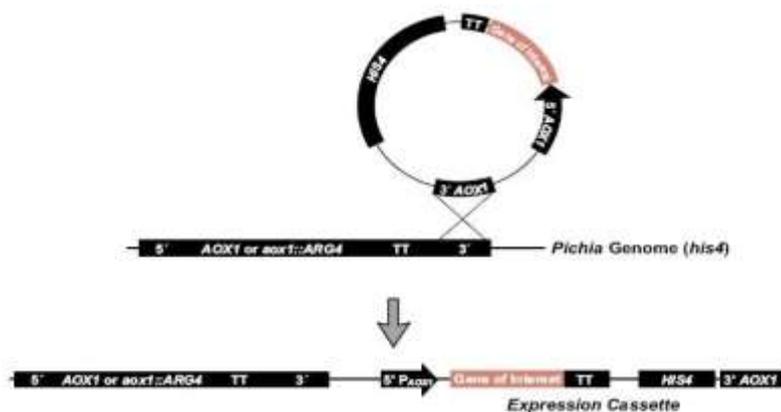
A integração por adição segundo Daly e Hearn (2005), pode ocorrer com vetores circulares ou linearizados no *locus his4* (Figura 8) ou na região homóloga *AOX1*(Figura 9). Essas recombinações homólogas entre o vetor e o genoma da célula hospedeira, ocorrem por um evento conhecido como *Crossing-over* simples e também podendo ocorrer inserções em *tandem* gerando transformantes multicópias. Sendo assim, o número de cópias integradas dos vetores de expressão conforme Romanos, (1995) afeta a produtividade da proteína, podendo ser um dos pontos determinantes da produção. Um alto número de cópias do gene heterólogo pode levar a um aumento na produção da proteína heteróloga, o que desperta o interesse na geração de transformantes com multicópias integradas no genoma da levedura.

Figura 8 - Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no *locus HIS4*. A figura mostra o resultado de uma inserção do plasmídeo entre as cópias duplicadas dos genes *HIS4/his4*.



Fonte: Invitrogen (2010).

Figura 9 - Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no *locus AOX1*.

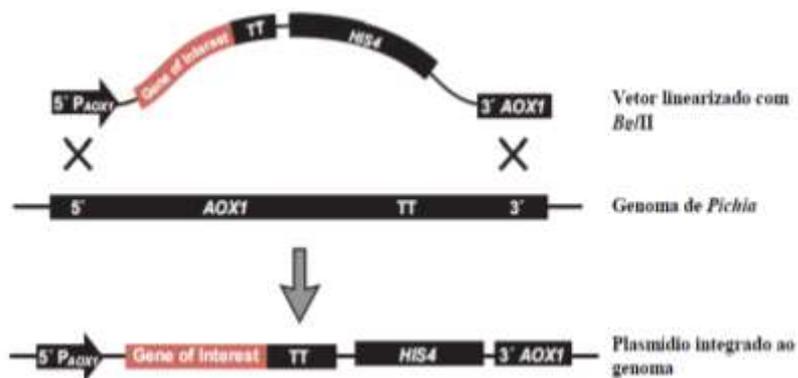


Fonte: Invitrogen (2010).

Existem disponíveis diversas estratégias para a produção de clones multicópias. Dentre estes, inclui o uso de técnicas de transformação com esferoplastos, a construção de múltiplos dos cassetes de expressão *in vitro*, a seleção de transformantes em altas concentrações de antibiótico, a amplificação pós-transformacional do vetor, a integração direcionada para *loci* de DNA repetitivo, como o rDNA, a utilização de marcas auxotróficas com genes defectivos, além da seleção com substâncias inibidoras de determinada via metabólica, como o 3-amino-1,2,4 triazol (3-AT) (CLARE et al., 1991, DALY e HEARN, 2005; ERHART e HOLLENBERG, 1983; MARX et al., 2009; MENÉNDEZ et al, 2000; ROMANOS et al, 1998).

A integração por substituição gênica ocorre através por duplo *crossing-over* entre o vetor e o genoma da hospedeira. Esse evento ocorre entre o promotor *AOX1* e a região 3' *AOX1*. Resultando na remoção completa da região codificadora do gene *AOX1* (Figura 10).

Figura 10 - Esquema da forma de integração por substituição gênica do gene *aox1* acarretando mudança no fenótipo da levedura hospedeira.



Fonte: Invitrogen (2010).

### 3 JUSTIFICATIVA

As enzimas celulolíticas de origem microbiana têm potencial aplicação em diversos processos industriais. Além disso, a manipulação genética de alguns microorganismos possibilita a produção de enzimas com alto valor biotecnológico e também algumas vantagens como a produção de enzimas para escala industrial, condições de cultivo a baixo custo e flexibilidade nas condições de uso para determinados processos industriais. Neste contexto, os fungos têm sido os microrganismos mais reportados como fontes de novas enzimas celulolíticas.

O fungo filamentoso *A. niger*, tem se destacado como o melhor produtor de celulases. No gênero *Aspergillus* encontram-se várias espécies das quais tem sido possível isolar, purificar e caracterizar enzimas celulolíticas com atividades específicas como a  $\beta$ -glucosidases.

Dentre os setores que mais tem motivado as pesquisas com enzimas celulolíticas tem sido o da indústria do bioetanol. A aplicação de celulases na conversão de biomassa celulolíticas em açúcares para a fermentação de etanol e outros produtos pode prover grandes benefícios ambientais e econômicos. Combustíveis alternativos aos derivados de petróleo são de grande interesse para reduzir a dependência mundial de recursos não renováveis.

Um dos grandes desafios para a produção do bioetanol utilizando a hidrólise enzimática é o custo das enzimas utilizadas atualmente no processo de hidrólise (aplicadas em escala industrial), que no Brasil é obtida em sua grande maioria pela importação, elevando o custo do tratamento enzimático. Estas enzimas precisam promover a transformação de açúcares muito mais rápida e eficientemente do que é feito no atual cenário. Além disso, devem permanecer estáveis por longo tempo (em condições adversas de pH e temperaturas variadas) e não podem ser inibidas pelos agentes formados pela sua própria atividade durante sua ação (glicose e celobiose).

Devido à forte dependência do setor de produção de proteínas brasileiro ao mercado internacional, faz-se necessário o desenvolvimento de processos e formas variadas de produção interna. Para tanto, o emprego da biotecnologia é indispensável na tentativa de se desenvolver meios modernos e satisfatórios que potencialize o desenvolvimento e a consolidação do mercado de produção de enzimas no Brasil.

Neste sentido, projetos que envolvam a biotecnologia do desenvolvimento de enzimas específicas para otimização do processo tornando-o mais rápido e eficiente

são muito promissores. Uma destas abordagens da biotecnologia enzimática é a expressão heteróloga de enzimas microbianas. Neste contexto, a produção de  $\beta$ -glucosidase por microrganismo geneticamente modificado, *P. pastoris*, se configura como um grande passo para obtenção dessa enzima com uma produção economicamente viável e com grande potencial para aplicação industrial. Ademais, os consórcios enzimáticos comerciais, apesar de apresentar os três grupos de celulases, endoglucanases, celobiohidrolase,  $\beta$ -glucosidase, possuem uma baixa atividade  $\beta$ -glucosidásica, o que gera uma necessidade de suplementação desta enzima a estes preparados.

Portanto, esse trabalho propõe a utilização da vantajosa e padronizada metodologia de expressão heteróloga em *P. pastoris* para a produção da  $\beta$ -glucosidase de *A. niger* recombinante.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Clonar e expressar em sistema de expressão heteróloga o gene codificador da enzima  $\beta$ -glucosidase de *Aspergillus niger* na levedura *Pichia pastoris*.

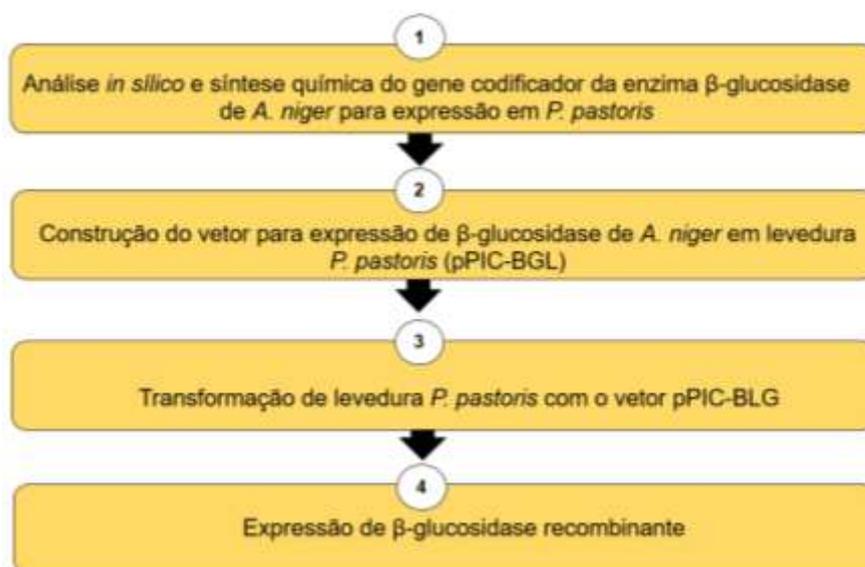
### 4.2 Objetivos Específicos

- I. Otimizar a sequência codificadora da enzima da  $\beta$ -glucosidase baseados nos códons preferenciais da levedura metilotrófica *P. pastoris*
- II. Construir um vetor recombinante para expressão e secreção da  $\beta$ -glucosidase recombinante (rBGL) de *Aspergillus niger* em *P. pastoris*.
- III. Selecionar clones positivos de *P. pastoris* para expressão da rBGL de *Aspergillus niger* e determinar quanto aos fenótipos prováveis.
- IV. Induzir a expressão e secreção do gene de interesse em *P. pastoris*.
- V. Analisar o produto recombinante.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Estratégia Utilizada

O fluxograma a seguir descreve resumidamente todas as etapas realizadas no desenvolvimento da dissertação:



### 5.2 Linhagens de Hospedeiras

- *Escherichia coli* DH5αF'1q: Genótipos *F'* *proAB+* *lacIqZΔM15* *zzf::Tn5* (*KmR*) *φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)* *U169* *recA1* *endA1* *hsdR17* (*rk-*, *mk+*) *phoA* *supE44* *λ-thi-1* *gyr96* *relA1*.

- *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen®), genótipo: *his4* (deleção do gene que sintetiza a quarta enzima que participa da síntese de histidina) e fenótipo *Mut+* e *His-* (Incapacidade de produzir histidina). Esta linhagem possui um alelo mutante (*his4*) do gene que codifica para histidinol desidrogenase (*his4*) para permitir a seleção de transformantes por complementação auxotrófica em meio mínimo sem histidina. Esta linhagem será utilizada para expressão da enzima recombinante β-glucosidase.

Estas linhagens compõem o acervo de células hospedeiras do Centro de Apoio Multidisciplinar, Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

### 5.3 Meios de Cultivos

Para cultivar os organismos foram utilizados os seguintes meios de cultivo.

#### 5.3.1 Meios de cultivo bacteriano

- Meio LB (Luria Bertani): cultivo da cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ F'1q

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ágar	15 g/L

Os meios foram autoclavados a 120°C por 15 minutos. Em seguida adicionou-se o agente antimicrobiano apropriado: ampicilina, na concentração final de 100  $\mu$ g/mL, quando necessário.

#### 5.3.2 Meios de cultivo de leveduras *P. Pastoris*

- Meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*): manutenção da linhagem *P. pastoris* GS115

Ágar	20 g/L
Extrato de levedura	10 g/L
Glicose	2 %
Peptona	20 g/L

Este meio foi esterilizado por autoclavagem e adicionadas posteriormente a solução de glicose previamente filtrada e ampicilina na concentração de 100  $\mu$ g/mL.

- Meio MD (*Minimal Dextrose Medium*): meio mínimo com glicoses e histidina para seleção de células transformantes de *P. pastoris*

Ágar	20 g/L
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Glicose	2 %
YNB	1,34 %

O volume da mistura foi completado com água e ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e adicionados 100  $\mu$ g/mL de ampicilina.

- Meio MM (*Minimal Methanol Medium*): meio mínimo com metanol sem histidina para seleção de clones com fenótipos Mut<sup>s</sup>

YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Metanol	0,5 %
Ágar	20 g/L

A mistura foi completada para o volume final com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e recebeu ampicilina na concentração 100 µg/mL.

- Meio BMGY-U (*Buffered Glycerol Complex Medium*): meio complexo tamponado, com glicerol e ureia para o aumento massa celular de *P. pastoris*.

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão fosfato pH6,0	10 mM
YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Glicerol	1 %

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100 µg/mL de ampicilina.

- Meio BMMY-U (*Buffered Methanol Complex Medium*): meio complexo tamponado, com metanol para indução da expressão da proteína heteróloga.

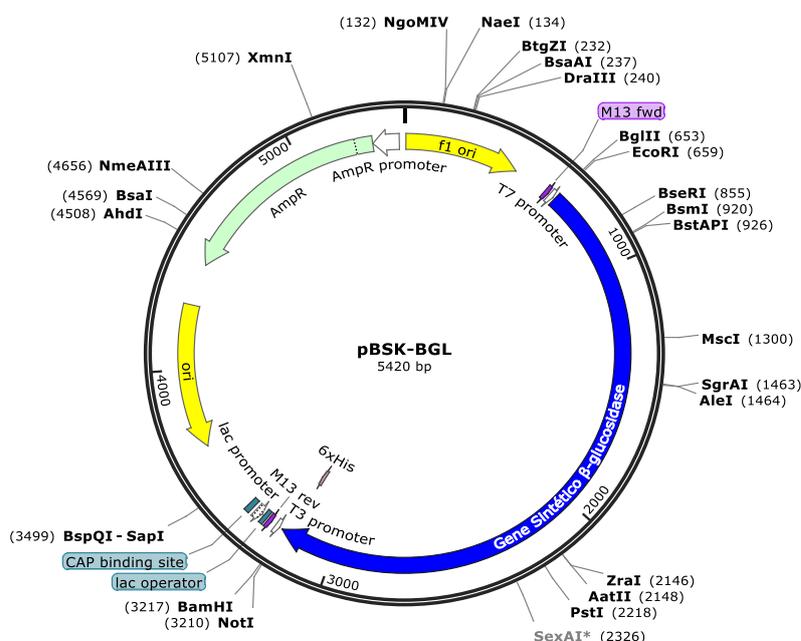
Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0	10 mM
YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Metanol	0,5 %

A mistura foi completada com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100 µg/mL de ampicilina. As soluções utilizadas na preparação de meios de culturas e todas outras suspensões ou soluções utilizadas ao longo dos experimentos foram esterilizadas por autoclavagem e filtração.

## 5.4 Vetores Utilizados

- pBSK-BGL (*GenOne*): vetor que foi usado na síntese química pela empresa *GenOne* para abrigar o gene sintético  $\beta$ -glucosidase (*bgl*), apropriado para ser empregado em clonagem e sequenciamento; apresenta gene de resistência ao antibiótico ampicilina e flanqueando o gene sintético *bgl* estão os promotores da RNA polimerase T3 e T7 que podem ser usados para sintetizar RNA *in vitro*. Os promotores T3 e T7 estão presentes na porção N-terminal do fragmento gênico LacZ. O mapa físico do vetor pBSK-BGL é ilustrado na figura 11.

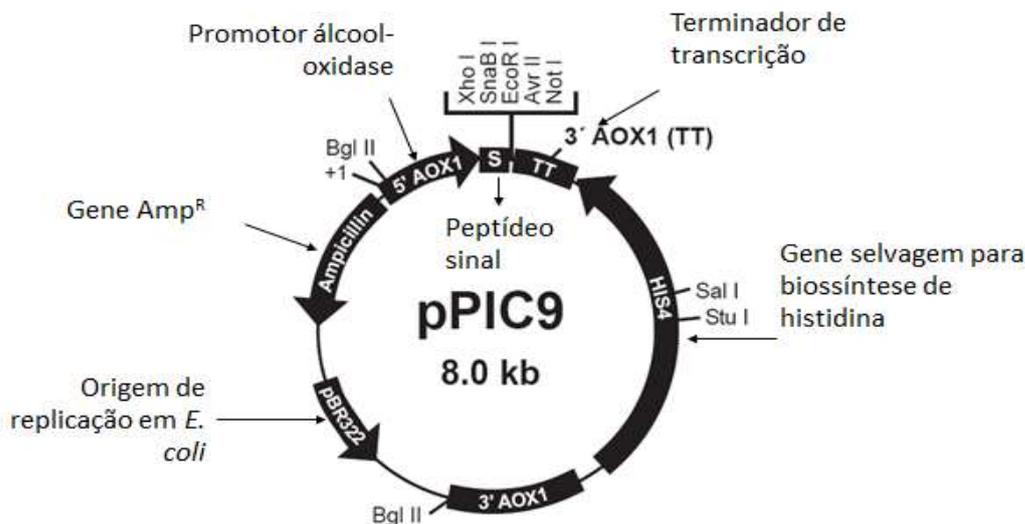
Figura 11 - Mapa físico do vetor pBSK-BGL e suas principais regiões. Mapa físico obtido utilizando o programa SnapGene®Viewer version 2.7.



- pPIC9 (Invitrogen): vetor apropriado para expressão e secreção de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, com tamanho de 8023 pb; possui o promotor do gene do gene codificador da enzima Álcool Oxidase I (AOX), fortemente induzível por metanol; sequência codificadora do peptídeo sinal de secreção fator- $\alpha$  de *S. cerevisiae* (S); origem de replicação funcional de *E. coli* (pBR322); região de múltiplos sítios de clonagem com sítios de reconhecimento por endonucleases de clivagem *stick end* (extremidade colante) e *blunt end* (extremidade abrupta); terminador de transcrição próprio (TT); sítios para integração no genoma de *P. pastoris* nas regiões *HIS4* ou

AOX1; marca de seleção auxotrófica *HIS4* e gene de resistência a ampicilina (INVITROGEN, 2010), conforme ilustrado na figura 12 abaixo.

Figura 12 - Mapa circular do vetor de expressão e secreção pPIC9 e suas principais regiões.



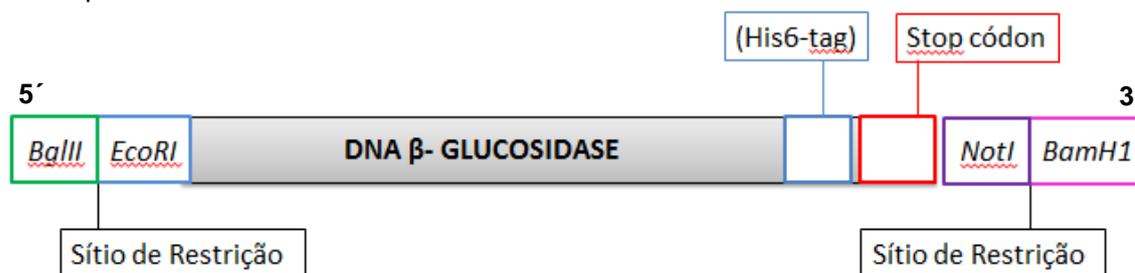
Fonte: Invitrogen (2010).

### 5.5 Análise *in silico* e Síntese Química do Gene Codificador para Enzima $\beta$ -glucosidase de *Aspergillus Niger* para Expressão em Levedura *Pichia pastoris* GS115

A sequência nucleotídica da enzima hidrolítica  $\beta$ -glucosidase foi predita a partir da sequência peptídica (860 aminoácidos) depositada no banco de dados UNIPROT com número de registro B0YIR9 pertencente ao fungo *Aspergillus Níger*. Para a otimização da sequência (realizada manualmente) utilizada para expressão da enzima  $\beta$ -glucosidase em *P. pastoris* levou-se em consideração os códons preferenciais das leveduras *P. pastoris* e o equilíbrio proporcional entre o conteúdo de bases nitrogenadas citosina (C) com guanina (G) e adenina (A) com timina (T). O gene foi flanqueado em 5' por sítios de restrição para reconhecimento específico das endonucleases *Bgl*II e *Eco*RI, e na região 3' pelos sítios de restrição para reconhecimento específico das endonucleases *Not*I e *Bam*H1. Todas as endonucleases de restrição geram extremidades *sticky ends*. O que permitiu a subclonagem no vetor de expressão e secreção pPIC9 de *P. pastoris*. Na extremidade 3', antecedendo o *stop códon*, foi inserida uma sequência codificadora para cauda de

seis resíduos de histidina (His6-tag) para detecção/confirmação da proteína expressa por meio de ensaios imunológicos, como forma de viabilizar sua purificação por métodos cromatográficos (cromatografia de afinidade em coluna de níquel) (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática do gene sintético da enzima  $\beta$ -glucosidase (2568 pb) para a síntese química.



Esta construção gênica foi quimicamente sintetizada pela empresa *GenOne*, assim como, a clonagem do gene sintético da enzima  $\beta$ -glucosidase (*bgl*) no vetor pBSK. Este vetor carregando o gene sintético *bgl* passou a ser denominado pBSK-BGL com 5,420 Kb.

Durante a construção da sequência do gene *bgl* otimizado para expressão em *P. pastoris* foram utilizadas as ferramentas de bioinformática Oligocalc, molecular toolkit, NEBcutter V4.1, ClustalW2 e Blast disponíveis na internet. A determinação das propriedades teóricas como a massa molecular, sítios de glicosilação, ponto isoelétrico (pI) e meia-vida da proteína recombinante, traduzida a partir do gene *bgl*, foi realizada com o auxílio das ferramentas de bioinformática ExPASy, ProtParam, NetNGlyc 1.0 Server e NetOGlyc 3.1 Server.

## 5.6 Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL para Expressão de $\beta$ -glucosidase *Aspergillus niger* em Levedura *Pichia pastoris* GS115

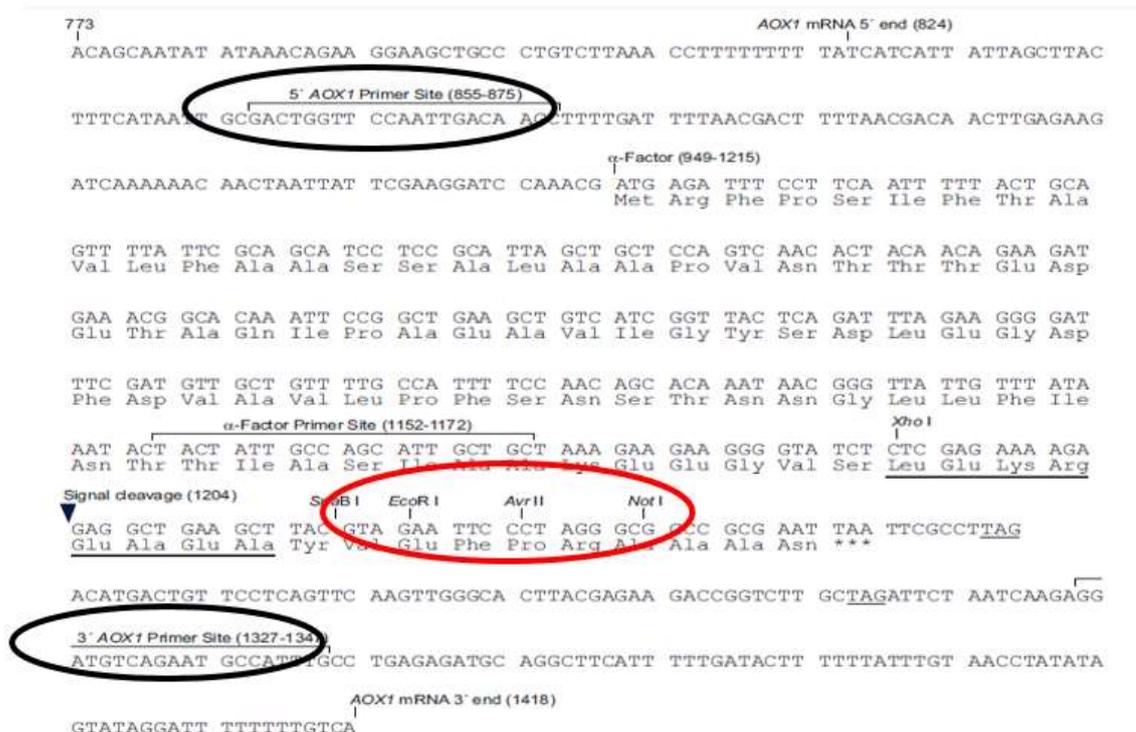
Para construção do vetor de expressão e secreção da enzima BGL em *P. pastoris*, o gene sintético *bgl* com 2568 pb foi primeiramente liberado do vetor de clonagem pBSK-BGL por digestão dupla com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* (*New England Biolabs*). Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio na concentração

de 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta (UV) para confirmação dos produtos da digestão.

Em seguida, o fragmento correspondente ao gene sintético *bgl* foi purificado do gel de agarose conforme o protocolo do fabricante (Anexo 1) com o kit *comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)* e ligado ao vetor de expressão e secreção pPIC9, previamente linearizado e purificado com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* (*New England Biolabs*).

A reação de ligação foi catalisada por ação da enzima T4-DNA ligase (*New England BioLabs*) conforme as condições recomendadas pelo fabricante, e o sistema foi incubado por 16 horas a 16°C respeitando as proporções de 3-5 moléculas de inserto para 1 molécula de vetor. O plasmídeo recombinante resultante da ligação do vetor pPIC9 com o gene sintético *bgl* foi denominado pPIC-BGL, constituído por 10578 pb. Este plasmídeo foi utilizado para transformar células de *E. coli*/DH5αF'1q eletrocompetentes. A figura 14 mostra o múltiplo sitio de clonagem do vetor pPIC9 e as suas sequencias circundantes.

Figura 14 - Múltiplos sítios de clonagem do vetor pPIC9 e as regiões circundantes.



Fonte: Invitrogen (2010)

No círculo vermelho observam-se sítios *EcoRI* e *NotI* que foram usados para subclonagem direcional do inserto *bgl* no vetor pPIC9. Nos círculos pretos evidenciam-

se os sítios de anelamento dos iniciadores que foram usados na PCR (método descrito no item 7.7.2) para seleção dos transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$ F'1q carregando vetor recombinante pPIC-BGL. A seta indica o códon de iniciação da tradução (ATG) a partir do fator  $\alpha$  do peptídeo sinal e a sequência de clivagem proteolítica do peptídeo sinal após o endereçamento da proteína.

#### 5.6.1 Transformação de células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F'1q com o vetor recombinante pPIC-BGL por eletroporação

As bactérias que se tornaram eletrocompetentes (anexo 2) foram retiradas do freezer - 80°C e deixadas descongelando em banho de gelo, foram transferidos 37,5 ng do DNA plasmidial para o tubo contendo as células bacterianas, repassando a mistura para uma cubeta de 1mm e incubou-se no gelo por 5 minutos. Foi aplicado um pulso elétrico de 1900 Volts em aparelho de eletroporação (Mod. *Eletroporator 2510 Eppendorf*, cubeta com passagem de 1,0 mm e capacidade de 80  $\mu$ L de células competentes). Imediatamente após o pulso elétrico, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido, transferido o conteúdo para um microtubo de 1,5 mL e incubou-se a 37°C por 1 hora, com agitação lenta seguido de semeadura em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 100  $\mu$ g/mL e mantida em estufa bacteriológica a 37° C por 20 horas. Os clones foram selecionados por apresentarem resistência ao antibiótico ampicilina, que apenas é conferida se o plasmídeo foi inserido na hospedeira.

#### 5.6.2 Extração de DNA plasmidial pPIC-BGL

Para a extração do DNA plasmidial dos clones que apresentaram habilidades em crescer em meio LB com ampicilina na concentração 100  $\mu$ g/mL, foi preparado um pré-inóculo de células transformadas (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) com a transferência de uma colônia isolada da placa de transformantes para cada tubo contendo 5 mL de meio LB e ampicilina 100 $\mu$ g/mL com o auxílio de palitos de dentes estéreis, incubou-se em estufa bacteriológica a 37°C, 1800 rpm por 16 horas.

Em seguida, todos os procedimentos foram obedecidos conforme o manual (anexo 3) do kit *Illustra PlasmidPrep Mini Spin kit (GE Healthcare)*. O qual possui soluções que atua nas fases de lise celular, desproteinização, lavagem e eluição do

DNA plasmidial. O perfil eletroforético dos produtos da extração plasmidial foram visualizados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

Amostras provenientes da extração plasmidial foram avaliadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Nessa metodologia, as amostras foram diluídas com água deionizada (1/100). Posteriormente, selecionou-se o método que melhor absorvemos DNA e proteínas, procedeu-se com a leitura do branco (água deionizada), em seguida, procedeu-se com a leitura das amostras de DNA plasmidial nos dois comprimentos de onda definidos (260 e 280 nm) e finalmente, a anotação dos valores das absorbâncias nos dois comprimentos de onda para a obtenção da pureza e a quantificação das amostras de DNA plasmidial.

## **5.7 Análises para Confirmação da Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL**

### 5.7.1 Análise de restrição do vetor recombinante pPIC-BGL com as enzimas *EcoRI* e *NotI*

O DNA plasmidial extraído da hospedeira foi submetido à análise de restrição por endonucleases para confirmação da correta construção do plasmídeo recombinante (pPIC-BGL). Para isto, foram realizados dois sistemas de digestão: digestão analítica (verificar a eficiência e funcionalidade das enzimas de restrição) e digestão preparativa (digestão em volumes maiores para obtenção de grandes volumes de DNA digerido). Na digestão analítica, o DNA plasmidial foi submetido à dupla digestão com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* (*New England Biolabs*), apresentando as seguintes condições de reação: NEB 3 10X, BSA 100 µg/mL, 5 U/µL das enzimas e 37,5 ng de DNA totalizando um volume final de 10 µL de reação. Na digestão preparativa, o DNA plasmidial foi digerido com as mesmas enzimas de restrição da digestão anterior. Apresentando as seguintes condições de reação: NEB 3 10x, BSA 100µg/mL, 5 U/µL das enzimas e aproximadamente 10 µg de DNA totalizando um volume final de 500µL. A análise das digestões e confirmação da correta construção do vetor recombinante pPIC-BGL foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e visualizado sob luz UV.

### 5.7.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do plasmídeo recombinante pPIC-BGL

Para a confirmação da presença do inserto no DNA plasmidial extraído da hospedeira, foi necessário a realização da Reação da Cadeia de Polimerase (PCR). Na reação de PCR, os *primers Forward 5'AOX1* e *Reverse 3'AOX1* foram previamente sintetizados possuindo sequências específicas de anelamento dentro das regiões promotora *5'AOX1* e *3'AOX1* do vetor recombinante pPIC-BGL. Isso permitiu amplificar somente a região em que o gene de interesse (*bgl*) está localizado. Em cada reação foram utilizados:

Reagentes	Vol. p/ 1 reação
H <sub>2</sub> O Mili-Q	12,45 µL
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,75 µL
Tampão da enzima10X	2,5 µL
dNTPs 2,5 Mm	5 µL
Primer F (5.0 pMol/µL)	1,5 µL
Primer R (5.0 pMol/µL)	1,5 µL
Taq. DNA polimerase ( <i>invitrogen</i> )	0,3 µL
DNA plasmidial	1 µL
Volume final	<b>25 µL</b>

As reações foram elaboradas em termociclador Veriti Thermal Cycler (*Applied Biosystems*), e o programa para as amplificações consistiu de uma etapa desnaturação de 3 minutos a 94°C, seguido de 34 ciclos compostos de 40 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos a 55°C para anelamento dos *primers*, com temperatura de extensão a 72°C por 2 minutos, e mais 10 minutos de alongação final a 72 °C. Os produtos resultantes da PCR foram verificados quanto sua qualidade e concentração em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

### 5.7.3 Sequenciamento do plasmídeo recombinante pPIC-BGL

Para a confirmação da presença do inserto *bgl* nos clones transformantes e sua integridade gênica, foi necessário a realização do sequenciamento dos plasmídeos

recombinantes pPIC-BGL. As reações de sequenciamento foram elaboradas no sequenciador ABI3500 da *Life Technologies* em que se utiliza o método Sanger de sequenciamento.

Para a realização do sequenciamento, foi necessário a realização do preparo do pré-mix nas seguintes condições de reação: ABI BigDye v.3.1; 5,0 pmol/ $\mu$ L do *Primer Forward* ou *Reverse*; replacement Buffer 5X; 500 ng do DNA plasmidial e água deionizada até que completasse um volume final de reação de 10  $\mu$ L. Seguidamente foi distribuído o mix para cada poço da microplaca para a extensão do fragmento correspondente ao gene *bgl* obedecendo as seguintes condições:

- Etapa 1: um ciclo de desnaturação de 1 minutos a 96°C.
- Etapa 2: 15 ciclos compostos de 10 segundos de desnaturação a 96°C, 30 segundos a 50°C para anelamento dos *primers* iniciadores, com temperatura de extensão a 60°C por 1 minuto e 15 segundos.
- Etapa 3: um ciclo de desnaturação de 1 minutos a 96°C,
- Etapa 4: 5 ciclos compostos de 10 segundos de desnaturação a 96°C, 15 segundos a 50°C para anelamento dos primers iniciadores, com temperatura de extensão a 60°C por 2 minutos.

Posteriormente, os produtos da reação de amplificação foram submetidos à precipitação de placa em sequenciador ABI, adicionando em cada placa 2,5  $\mu$ L de EDTA; 30 $\mu$ L de álcool etílico absoluto; agitou-se as placas em vórtex; seguido de repouso das placas por 15 minutos; centrifugou-se a 2500 rpm a 4°C por 30 segundos; após a centrifugação as placas foram descobertas e invertidas em papel toalha seguida de centrifugação a 100 rpm a 4°C por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se em cada poço 30 $\mu$ L de álcool etílico diluído a 70%, centrifugou-se a 1650 rpm a 15 minutos; novamente a placa foi invertida em papel toalha, seguida de centrifugação invertida da placa a 100 rpm por 1 minuto. Após isto, a placa foi secada por 15 minutos em fluxo de ar e ressuspendeu-se as amostras em 10  $\mu$ L de formamida HiDi com agitação lenta em vórtex; amostras foram levadas ao termociclador para a realização da desnaturação a 95°C por 2 minutos e finalmente, a injeção das amostras precipitadas para seu sequenciamento.

## 5.8 Transformação de Levedura *Pichia pastoris* GS115 com o Vetor pPIC-BGL

### 5.8.1 Linearização dos vetores de expressão pPIC-BGL e pPIC9 com a enzima *Bgl*II

O objetivo deste ensaio, foi linearizar os vetores pPIC-BGL e pPIC9 para transformação da hospedeira e integração dos cassetes de expressão no genoma de *P. pastoris*. Para isto, houve a necessidade de se realizar um ensaio piloto (digestão analítica) para verificar a eficiência e funcionalidade da digestão para posterior elaboração de uma digestão em volumes maiores (digestão preparativa). Na digestão analítica prepararam-se quatro sistemas de digestão com a enzima *Bgl*II (*Biolabs*):

<b>SISTEMA I</b>		<b>SISTEMA II</b>	
DNA (pPIC-BGL)	-----187,5 ng	DNA (pPIC9)	----- 125 ng
Tampão NEB 3 10x	-----1 µL	Tampão NEB 3 10x	----- 1 µL
Enzima <i>Bgl</i> II	----- 0,5µL (10U/µL)	Enzima <i>Bgl</i> II	-----0,5µL (10U/µL)
H <sub>2</sub> O	-----3,5µL	H <sub>2</sub> O	-----3,5 µL
<b>Volume final</b>	<b>-----10 µL</b>	<b>Volume final</b>	<b>-----10 µL</b>

Após a montagem dos sistemas, as amostras foram incubadas em banho seco a 37 °C por três horas. A análise da digestão para verificar a eficiência e funcionalidade da digestão dos vetores pPIC-BGL e pPIC9 foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e visualizado sob luz UV. Confirmada a eficiência da digestão analítica, foi necessário preparar dois sistemas de digestão preparativa com a enzima *Bgl*II (*Biolabs*):

<b>SISTEMA I</b>		<b>SISTEMA II</b>	
DNA ( pPIC-BGL)	----- 21µg	DNA ( pPIC9)	-----14µg
Tampão NEB 3 10x	----- 50 µL	Tampão NEB 3 10x	----- 50 µL
Enzima <i>Bgl</i> II	----- 2,5µL (10U/ µL)	Enzima <i>Bgl</i> II	----- 2,5µL (10U/ µL)
H <sub>2</sub> O	-----197,5µL	H <sub>2</sub> O	-----197,5µL
<b>Volume final</b>	<b>----- 500 µL</b>	<b>Volume final</b>	<b>----- 500 µL</b>

Após a montagem dos sistemas, incubou-se em banho seco a 37°C por quatro horas. A análise da digestão de linearização dos vetores pPIC-BGL e pPIC9 foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio 5,0 µg/mL e visualizado sob luz UV.

### 5.8.2 Precipitação com acetato de amônio dos vetores pPIC-BGL e pPIC9

O objetivo deste método foi precipitar os produtos da digestão preparativa (sistema I pPIC-BGL e sistema II pPIC9) linearizados com *Bgl*II para concentrar o DNA, utilizados na transformação da levedura metilotrófica *P. pastoris* para facilitar a integração do cassete de expressão no genoma da hospedeira.

Nesse método, foram utilizados aproximadamente 21 µg de DNA do sistema I (pPIC-BGL) e aproximadamente 14µg de DNA do sistema II (pPIC9). Adicionou-se em cada microtubo das amostras 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5 M, 2,5 volumes de etanol 100% gelado e 1 µL de glicogênio (10 mg/ml) para aumentar a eficiência da precipitação. Incubou-se a -20°C em *over night*, centrifugou-se em centrífuga refrigerada a 12000 rpm por 40 min a 40°C, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente e lavou-se o sedimento com 1 mL de etanol 70% gelado (sem ressuspender o sedimento), novamente foi centrifugado nas mesmas condições anteriores, seguido do descarte dos sobrenadantes. As amostras foram secadas em câmara de fluxo laminar à temperatura ambiente por cerca de 20 minutos e posteriormente, ressuspendeu-se cuidadosamente com 10 µL de água deionizada seguida de sua armazenagem em freezer -20°C. A análise da precipitação dos vetores pPIC-BGL e pPIC9 foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e visualizado sob luz UV.

### 5.8.3 Transformação da levedura *Pichia pastoris* GS115

Para a transformação da levedura metilotrófica foi realizada a preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115 (anexo 4), as quais após o impulso elétrico tiveram o cassete de expressão do gene da β-glucosidase integrado em seu genoma.

Na estratégia de transformação, foi preparado dois sistemas de transformação: No primeiro sistema, 80 µL de células de *P. pastoris* eletrocompetentes foram homogeneizadas com aproximadamente 17 µg do DNA linearizado (pPIC-BGL). No segundo sistema 80 µL de células de *P. pastoris* eletrocompetentes foram homogeneizadas com aproximadamente 10 µg do DNA linearizado (pPIC9). Cada mistura foi transferida para uma cubeta de 2 mm e incubada em gelo por 5 minutos. A eletroporação ocorreu em aparelho do tipo *Eletroporator 2510 (Eppendorf)*, utilizou-

se uma voltagem de 1500 V, sendo imediatamente adicionado as cubetas 1 mL de sorbitol 1 M gelado, transferiu-se cada conteúdo para um microtubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL estéril. Volumes de 200–500  $\mu$ L das células recém transformadas foram semeados em placas de Petri contendo o meio MD e incubadas por 3 dias em estufa bacteriológica a 30°C.

#### 5.8.4 Integração no locus *AOX1* por substituição gênica

A integração do cassete de expressão no genoma da hospedeira ocorreu por recombinação homóloga dupla, devido o vetor de expressão ser linearizado com a enzima de restrição *Bgl*II. Nesse tipo de recombinação, ocorreu a substituição do gene *aox1* pelo cassete de expressão contendo o gene de interesse, modificando o fenótipo das células hospedeiras para Mut<sup>s</sup>. Nessa estratégia de integração, poderão ser obtidos dois fenótipos de levedura *P. pastoris*: o fenótipo Mut<sup>s</sup> que apresentará a substituição do gene *aox1* e o fenótipo Mut<sup>+</sup>, apresentados por leveduras onde não ocorreu a substituição do gene *aox1*, mas sim a integração do cassete de expressão. A seleção dos clones recombinantes foi realizada pelas suas habilidades de crescerem em meio sem o aminoácido histidina (MD), utilizado como marca de seleção auxotrófica.

### 5.9 Expressão da $\beta$ -glucosidase de *Aspergillus niger* Recombinante

#### 5.9.1 Indução em meio sólido dos clones recombinantes pPIC-BGL

Os clones de *P. pastoris* que apresentaram habilidades de crescer em meio mínimo sem histidina foram selecionados para realização do *screening*, para verificação da sua capacidade de expressar e secretar a enzima  $\beta$ -glucosidase em placas de Petri. Para tanto, todos os clones foram semeados em sistema *réplica-plating* em placas de Petri contendo o meio MD juntamente com clones de *P. pastoris* transformadas com o vetor pPIC9 (controle negativo), e clones que serviram de controle positivo transformados com o vetor pPIC-tGH para expressão de proteína recombinante apresentando cauda de histidina em sua sequência peptídica (SADALA et. al., 2014). Foram incubadas a 30°C por 72 horas. Seguidamente, os clones foram transferidos para o meio BMGY-U para o crescimento de massa celular e as culturas

foram incubadas a 30°C por 72 horas. Após, os clones foram transferidos para o meio BMMY-U contendo metanol 0,5% para induzir a expressão e incubadas a 30°C por 120 horas. A cada 12 horas foram adicionados 0,5 mL de metanol 0,5% nas tampas das placas das culturas a fim de manter a indução da expressão gênica da  $\beta$ -glucosidase controlada pelo promotor AOX integrado no genoma da levedura.

#### 5.9.2 *Colony Blotting* – imunodeteção de cauda de poli-histidina na porção C-terminal

Nesse experimento, foi selecionada uma placa da indução em meio sólido (item 5.9.1) para o ensaio de imunodeteção da cauda de poli-histidina localizada na porção C-terminal da sequência polipeptídica das proteínas.

Primeiramente recortou-se a membrana de nitrocelulose de acordo com diâmetro da placa dos clones de forma que ela se encaixasse perfeitamente dentro da placa. A membrana foi posta sobre a cultura dos clones celulares cobrindo toda extensão dos clones, colocou-se diversas camadas de papel filtro e papel toalha e juntamente com um peso sobre a placa para facilitar a transferência por capilaridade das proteínas marcadas com cauda de histidina para a membrana de nitrocelulose em intervalo de 4 horas. Posteriormente, retirou-se as camadas de papel filtro, e identificou-se o lado da membrana que esteve em contato com os clones e colocou-se a membrana de nitrocelulose em uma placa estéril com o lado das colônias voltadas para cima.

Após a transferência das colônias para a membrana de nitro celulose (que possui uma alta afinidade por proteínas) por um período de 4 horas, foi necessário bloqueá-la para evitar que os anticorpos se ligassem a toda a superfície da membrana e não, como desejado, especificamente a cauda de poli-histidina das proteínas recombinante. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com a solução de lavagem a fim de retirar todos os restos celulares e a solução bloqueadora. Depois de lavada, foi adicionada a membrana o anticorpo primário (desenvolvido em camundongo), que se ligou especificamente a cauda de poli-histidina das proteínas recombinantes imobilizadas na membrana. Por se tratar de um anticorpo monoclonal são mais específicos na detecção de moléculas marcadas do que os anticorpos poli clonais que são mais sensíveis, porém menos específicos, e, portanto, suscetíveis a resultados falso positivos.

Depois de sucessivas lavagens para remoção das moléculas de anticorpo primário que não se ligaram a cauda de poli-histidina, foi realizado um tratamento com o anticorpo secundário (conjugado) que pode ser definido como moléculas de antígenos (com afinidade de se ligar especificamente ao anticorpo primário desenvolvido em camundongo) ligados covalentemente à enzima fosfatase alcalina, de modo a conservar as duas funções das duas moléculas conjugadas: atividade enzimática da enzima e antigenicidade do antígeno. E finalmente, a membrana foi tratada com o substrato cromogênico sob ação enzimática da fosfatase alcalina do anticorpo secundário revelou produtos coloridos.

Ao término desta etapa, seguiram-se os procedimentos de detecção e revelação da cauda de histidina C-terminal conforme o protocolo de Imunodeteção Cromogênica Western Breeze da Invitrogen Life Technologies (*WesternBreeze® Cromogenic western Blot Immunodetection kit*) descrito no anexo 5. Após a revelação da membrana, clones recombinantes positivos para  $\beta$ -glucosidase foram selecionados para os experimentos posteriores.

### 5.9.3 Determinação dos recombinantes com de fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>

Para determinação dos fenótipos dos clones recombinantes capazes de expressar e secretar o gene de interesse, os mesmos foram plaqueados no sistema de réplica-*plating* em meio MD e MM e incubados a 30°C por 72 horas com adição de 0,5 mL de metanol 0,5% a cada 24h de na tampa das placas com MM. A diferença na velocidade de crescimento dos clones no meio MM revelou seus respectivos fenótipos. Células com crescimento mais rápido foram caracterizadas como Mut<sup>+</sup>, diferentemente das Mut<sup>s</sup> que cresceram mais lentamente quando metanol é a única fonte de carbono (INVITROGEN, 2010).

### 5.9.4 Cinética de indução enzimática

Esses procedimentos permitirão análises da atividade enzimática e a construção de uma curva de crescimento das células de *P. pastoris* GS115 recombinantes.

#### 5.9.4.1 Indução em meio líquido para clones recombinantes com fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>

Após a caracterização fenotípica dos clones recombinantes de *P. pastoris*, foi possível selecionar um clone pPIC-BGL Mut<sup>+</sup> (clone 46); um clone pPIC-BGL Mut<sup>s</sup> (clone 22) e um clone pPIC9 sem inserto (controle negativo) para a realização do ensaio de indução da expressão heteróloga em frascos agitados.

A indução da expressão gênica foi realizada a partir de repiques em placas contendo o meio MD com ampicilina na concentração de 100 µg/mL. Após o crescimento, os clones obtidos foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGY-U em frascos de 250 mL, os quais foram incubados a 30°C sob agitação de 200 rpm/minuto, até a cultura atingir D.O.<sub>600</sub> entre 2-6, por tempo de aproximadamente 18 a 24 horas.

Ao atingir a D.O.<sub>600</sub> nm necessária, as culturas foram centrifugadas 3000 rpm/10 minuto a 4°C e ressuspensas em 50 mL de meio BMMY-U em frascos de 500 mL de modo que a D.O.<sub>600</sub> nm inicial ficasse próximo de 1, as quais foram incubadas a 30°C sob agitação de 200 rpm/minuto. A indução do promotor *AOX1* o qual sintetiza a transcrição de gene *bgl* integrado no genoma da hospedeira, foi realizado por adição de 0,5% (v/v) de metanol PA a cada 12 horas nas culturas celulares. Após o início da indução, que teve duração de 120 horas, alíquotas de 1 mL foram retiradas em duplicata nos tempos 0h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 horas de indução.

Um dos grupos das alíquotas que foram retirados nos tempos de indução, foi imediatamente lido em espectrofotômetro em comprimento de onda 600 nm para a construção da curva de crescimento dos clones induzidos. A curva de crescimento da levedura foi determinada medindo-se a absorbância do comprimento de onda 600 nm em cada tempo. O crescimento celular obtido foi convertido para g/L utilizando a fórmula (g/L) = 0,22 x D.O.<sub>600</sub> nm, conforme descrito por Nakano et al., 2006.

Outro grupo da duplicata das amostras retiradas foi centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram recuperados e estocados em freezer -20°C para posterior análise de expressão da proteína recombinante em gel SDS-PAGE e quantificação de proteínas totais.

## 5.10 Análise do Produto Expresso em Gel Desnaturante SDS-PAGE

A análise da proteína recombinante secretada pela levedura *P. pastoris* foi realizada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme descrito por (SAMBROOK et al., 1989). Os sobrenadantes dos clones Mut<sup>+</sup> (clone 46) e Mut<sup>s</sup> (clone 22) obtidos durante a cinética de indução foram precipitados na presença de acetona P.A. e TCA (10%). O precipitado foi ressuspenso em 50 µL de tampão de amostra de eletroforese 1X para SDS-PAGE (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% azul de bromofenol p/v; 4% SDS v/v; β-mercaptoetanol 4%; 20% glicerol v/v). Em seguida as amostras foram fervidas em banho Maria por 5 minutos, e incubadas imediatamente em gelo até aplicação no gel.

Nessa metodologia, foram preparados dois géis de poliacrilamida para a corrida eletroforética, cada gel foi composto por gel separador na concentração de 10% e o gel concentrador 5%. A corrida eletroforética foi realizada em sistema Mini PROTEAN® Tetra Sistem (*BioRad*) em tampão de corrida Tris-glicina 1X pH 8,3 por 40 minutos em voltagem de 250V. Tendo como marcador de massa molecular o marcador *Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder* que mede uma faixa de 250 a 10 kDa.

Após a corrida, os géis foram corados com a solução de azul brilhante de *Coomassie* G250. Esta coloração consistiu de 0,1% de *Coomassie* G250 p/v, ácido fosfórico 2% v/v, sulfato de amônio 10% p/v e metanol 20% v/v. Inicialmente incubou-se o gel por 30 minutos na solução fixadora (Ácido acético 10%; metanol 40%; H<sub>2</sub>O *mili-Q*) seguido de uma incubação *over-night* em uma solução de *Coomassie* coloidal para a detecção das proteínas. Finalmente, a descoloração do gel em água destilada, solução descorante e a captura da imagem do gel corado via *scanner*.

## 5.11 Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação das proteínas totais solúveis foi realizada utilizando o kit de Ensaio de Proteínas BCA (*Thermo*) que é baseado na metodologia descrita por Smith et al., 1985. A reação foi realizada conforme especificações do fabricante. A curva padrão foi efetuada utilizando uma massa de proteína da albumina do soro bovino variando de 0 a 12µg. O método combina a redução do Cobre (Cu<sup>+2</sup> para Cu<sup>+1</sup>) pela proteína em um meio alcalino, com a alta sensibilidade e seletividade da detecção

colorimétrica do cátion de cobre ( $\text{Cu}^{+1}$ ) utilizando um reagente único contendo ácido bicinconínico.

A coloração púrpura resultante da reação é formada pela interação de duas moléculas do reagente BCA com um íon de cobre ( $\text{Cu}^{+1}$ ). Este complexo solúvel em água exibe uma alta absorvância a 562 nm com resultados aproximadamente lineares, permitindo a quantificação de proteínas na faixa de 20 - 2.000  $\mu\text{g/mL}$  quando medidas em um espectrofotômetro.

## 5.12 Ensaio Enzimáticos para a Determinação da Atividade do Produto Gênico

### 5.12.1 Ensaio quantitativo para atividade $\beta$ -glucosidásica

A quantificação da atividade sacarificante da  $\beta$ -glucosidase foi procedida após a obtenção dos sobrenadantes da fase de indução de 120 horas de indução dos clones recombinantes  $\text{Mut}^+$  (clone 46) e  $\text{Mut}^s$  (clone 22). A determinação da atividade  $\beta$ -glucosidásica em celobiose, foi realizada em microtubos Eppendorff com capacidade de 2,0 mL, em banho de gelo, onde ocorreu a transferência de 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático extracelular, previamente diluídos em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5,0, e 50  $\mu\text{L}$  de solução de celobiose 15 mM pH 5,0 por 30 minutos a 50°C em banho termostatizado. Após o tempo reacional, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 10 minutos, de forma a promover a inativação das enzimas. Posteriormente foi adicionado 1 mL do reativo enzimático para dosagem de glicose (*kit Glucose Liquicolor da In Vitro*) para cada microtubo, e novamente levado para incubação à 37°C por mais 15 minutos. No branco foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de solução tampão e, no padrão, 10  $\mu\text{L}$  de glicose. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e adicionados ao sistema um volume de 910  $\mu\text{L}$  de água destilada, com exceção do padrão (1 mL). A leitura da absorvância foi realizada no comprimento de onda de 505 nm (*Spectrumlab*, 22pc) com posterior correlação com curva padrão da glicose (adaptado de GHOSE, 1987). As análises foram realizadas em triplicata, utilizando glicose como padrão.

A atividade foi medida por meio do reativo enzimático para dosagem de glicose (*kit Glucose Liquicolor da In Vitro*) que se baseia na ação da glicose oxidase (GOD) que catalisa a oxidação da glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD),

o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 505nm é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra (MIRÓN et al., 2008; SCHMIDELL et al., 2001).

A quantificação da glicose liberada foi baseada em uma curva padrão de glicose de concentração máxima de 5,0 mg/mL de glicose. A partir da concentração de glicose foi determinada a atividade enzimática (U/L). Uma unidade de atividade  $\beta$ -glucosidásica (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 $\mu$ mol de glicose por minuto, sob as condições de ensaio padrão (50°C por 30 minutos).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Análise *in silico* e Síntese Química do Gene Codificador para Enzima $\beta$ -glucosidase *Aspergillus niger* para Expressão em Levedura *Pichia pastoris*

Os motivos pelos quais levaram a escolha da enzima  $\beta$ -glucosidase de *A. Níger* para clonagem e expressão na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* se deu devido o *A. niger* ser um fungo filamentosos e segundo Soccol et al. (1994) são considerados os melhores produtores de enzimas celulolíticas por produzirem naturalmente as celulases necessárias para a sacarificação completa de lignocelulose. Outro motivo, segundo Schuster e Schmoll (2010), esses microrganismos são capazes de produzir eficientemente grandes quantidades de  $\beta$ -glucosidase. Desta forma, foi possível a realização de busca da sequência peptídica enzima  $\beta$ -glucosidases de *A. Níger* no banco de dados UNIPROT com número de registro B0YIR9.

A sequência nucleotídica de  $\beta$ -glucosidase de *A. niger* foi confirmada com aproximadamente 2580 pares de bases e identificada como um polipeptídeo com 860 resíduos de aminoácidos e designada, segundo o servidor CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*) como uma  $\beta$ -glucosidase glicosilhidrolase família 3. De acordo com o banco de dados ExPASy, a sequência nucleotídica do gene *bgl* otimizada com os códons preferenciais da levedura *P. pastoris* possui um peso molecular 103,42 kDa e ponto isoelétrico de 4,61. Para verificar possíveis sítios de N- e O- glicosilações da proteína, foram realizadas predições pelos servidores NetNGlyc 1.0 Server e NetOGlyc 3.1 Server, respectivamente, nos quais foram encontrados 14 sítios N- glicosilação e 6 sítios de O- glicosilações na proteína.

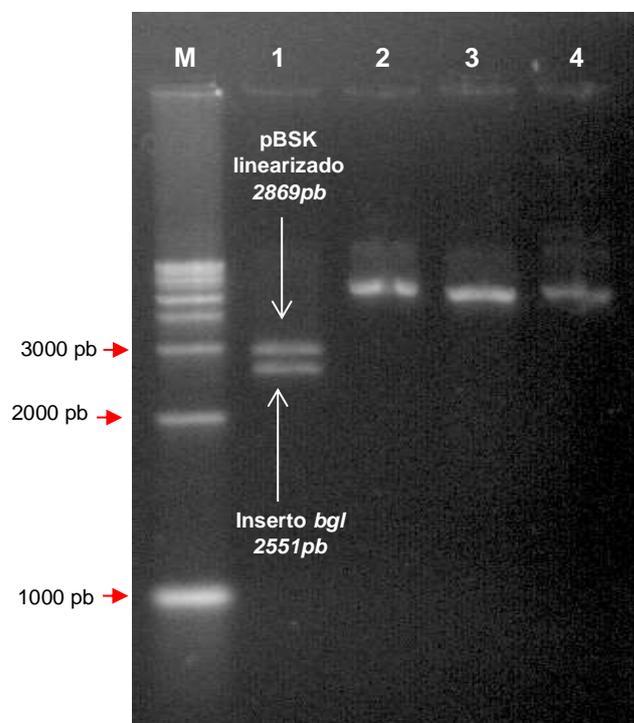
### 6.2 Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL para Expressão de $\beta$ -glucosidase *Aspergillus niger* em Levedura *Pichia pastoris* GS115

Para a construção do vetor recombinantes pPIC-BGL, houve a necessidade da liberação do inserto correspondente ao gene sintético *bgl* do vetor de clonagem pBSK-BGL (previamente clonado em *E. coli* DH5 $\alpha$ ) e a linearização do vetor de expressão e secreção pPIC9 intacto, clivados com as mesmas endonucleases (*EcoRI* e *NotI*) afim

de se obter extremidades coesivas semelhantes para o direcionamento da clonagem do gene *bgl* neste vetor de bifuncional.

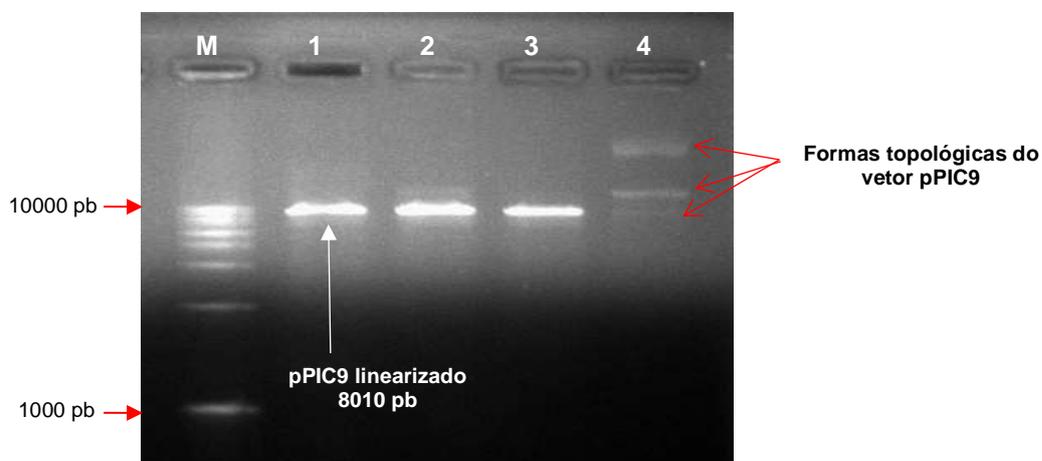
Na figura 15 é demonstrado o perfil eletroforético da digestão do vetor de clonagem pBSK-BGL com endonucleases *EcoRI* e *NotI*, possibilitando a liberação de um inserto esperado com tamanho de 2551 pb correspondente ao gene sintético *bgl* (indicado pela seta simples inferior), e a digestão do vetor pBSK-BGL com as endonucleases de restrição separadamente e o vetor intacto.

Figura 15 - Perfil eletroforético em gel 0,8 % de agarose da dupla digestão do vetor pBSK-BGL com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M-marcador Molecular de 1kb; 1-Vetor pBSK-BGL digerido com *EcoRI* e *NotI*; 2- Vetor pBSK-BGL digerido com *EcoRI*; 3-Vetor pBSK-BGL digerido com *NotI*; 4-Vetor pBSK-BGL intacto.



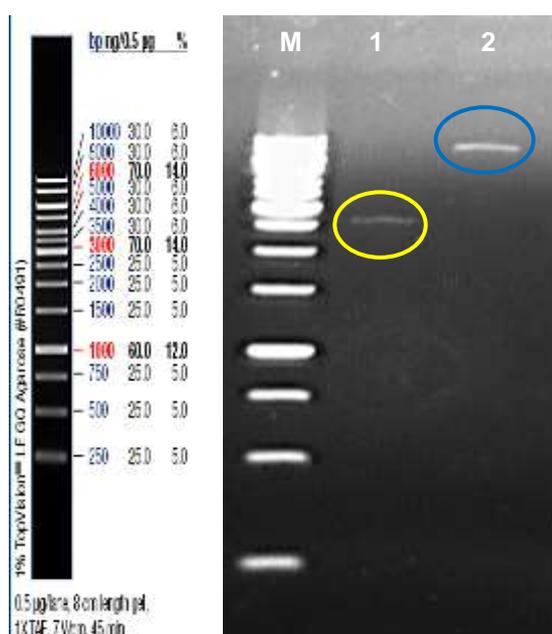
Na figura 16 é possível observar a linearização do vetor pPIC9 com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* (coluna 1) por apresentar uma única banda bem intensa, diferentemente do vetor pPIC9 intacto que apresenta pelo menos três bandas correspondente as formas topológicas do vetor e também, um tamanho diferenciado de 8010 pb.

Figura 16 - Perfil eletroforético em gel 0,8 % de agarose da dupla digestão do vetor pPIC9 com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M- Marcador molecular de 1kb 1-Vetor pPIC9 digerido com *EcoRI* e *NotI*. 2-Vetor pPIC9 digerido com *EcoRI*; 3-Vetor pPIC9 digerido com *NotI*. 4-Vetor pPIC9 intacto.



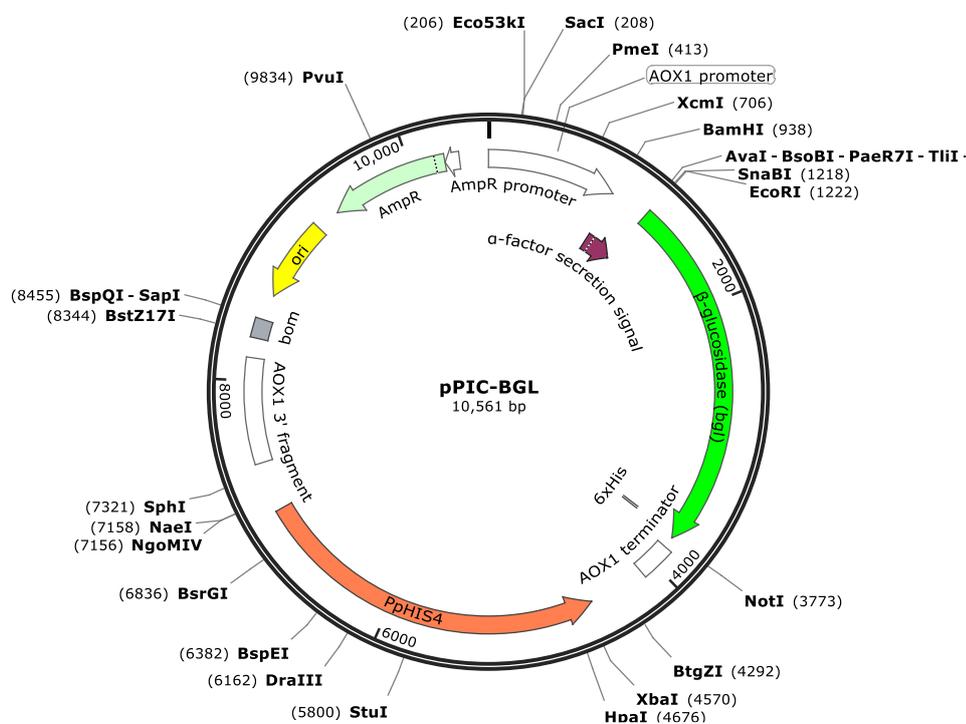
Na figura 17 é apresentado o resultado da purificação do fragmento *bgl* e do vetor pPIC9, ambos digeridos com *EcoRI* e *NotI*. O inserto correspondente ao gene *bgl* (círculo amarelo) juntamente com o vetor pPIC9 linearizado (círculo vermelho) foram purificados do gel de agarose para a construção do vetor recombinante pPIC-BGL. A ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase e o produto dessa reação foi usada para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Figura 17 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da purificação do inserto *bgl* e do vetor pPIC9 digeridos com *EcoRI* e *NotI*. M - Marcador molecular O' *geneRuler* 1Kb DNA ladder, ready-to-use (Thermo Scientific). 1- Inseto *bgl*; 2- pPIC9 linearizado.



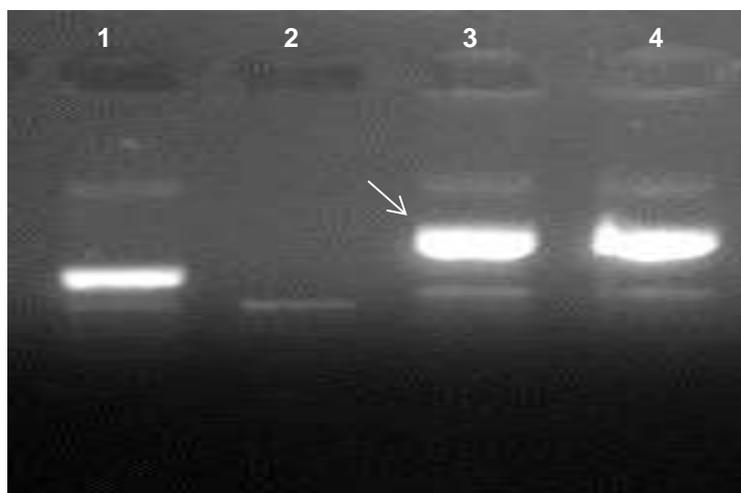
Na figura 18 é demonstrado o mapa físico do plasmídeo recombinante pPIC-BGL após a purificação e inserção do gene *bgl*, que foi clonado após a sequência promotora do gene *AOX1* seguida da sequência sinal do fator-alfa de *S. cerevisiae*, que funciona como um peptídeo de sinalização de secreção da proteína recombinante em sistemas de expressão e anteriormente à região de término de transcrição (TT) do gene *AOX1*, sendo flanqueado pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Este novo vetor de expressão foi denominado pPIC-BGL.

Figura 18 - Mapa físico do plasmídeo recombinante pPIC-BGL construído pela ligação do gene da beta glucosidase (*bgl*) ao vetor pPIC9, situado após a região codificadora do peptídeo sinal de secreção fator  $\alpha$ . Mapa físico obtido utilizando o programa SnapGene®Viewer version 2.7.



Após a transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  com o produto da ligação do gene *bgl* ao vetor pPIC9 (pPIC-BGL) foi possível identificar cerca de 18 clones transformantes que possivelmente carregava o gene *bgl*. Para verificar a ligação do inserto ao vetor foi selecionado dois clones crescidos em placa, e somente um clone (indicado pela seta) foi selecionado para a análise de restrição dupla por apresentar uma maior intensidade da banda e conseqüentemente uma maior concentração (aproximadamente 37,5 ng/ $\mu$ L) de DNA plasmidial. onforme é demonstrado na figura 19.

Figura 19 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos recombinantes extraídos dos clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformados geneticamente. 1-Vetor pPIC9 intacto; 2-Vetor pPIC9 linearizado sem inserto; 3-Clone 1 pPIC-BGL; 4-Clone 2 pPIC-BGL.

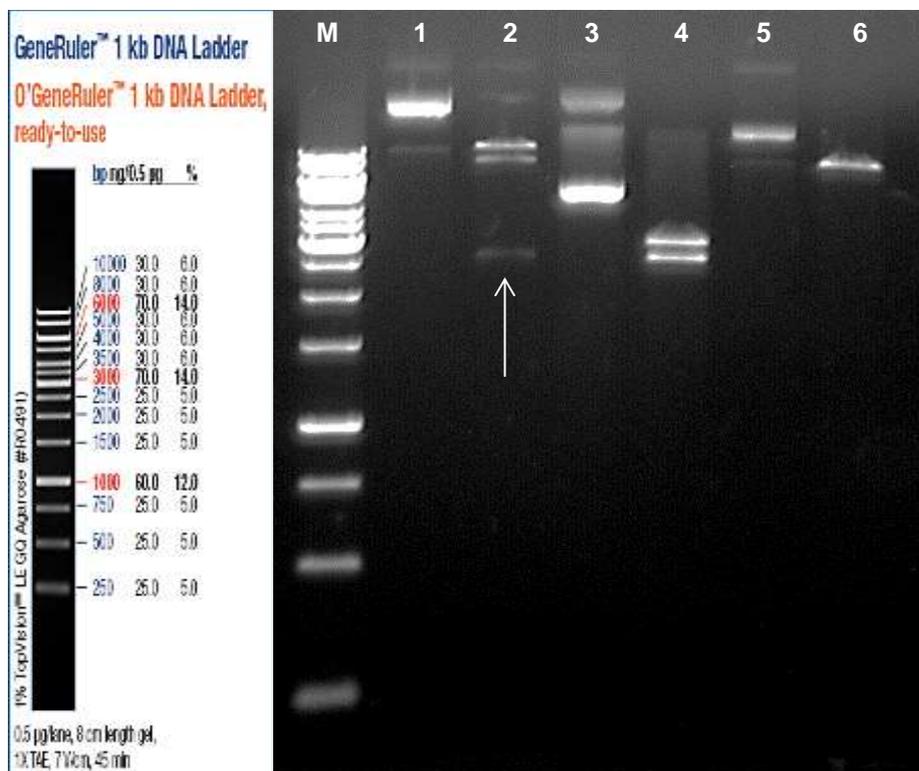


### 6.3 Análises para Confirmação da Construção do Vetor Recombinante pPIC-BGL

O clone selecionado foi submetido à transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes, extração plasmidial e à análise de restrição endonucleásica, reação de PCR e sequenciamento para a confirmação da correta construção do vetor recombinante pPIC-BGL.

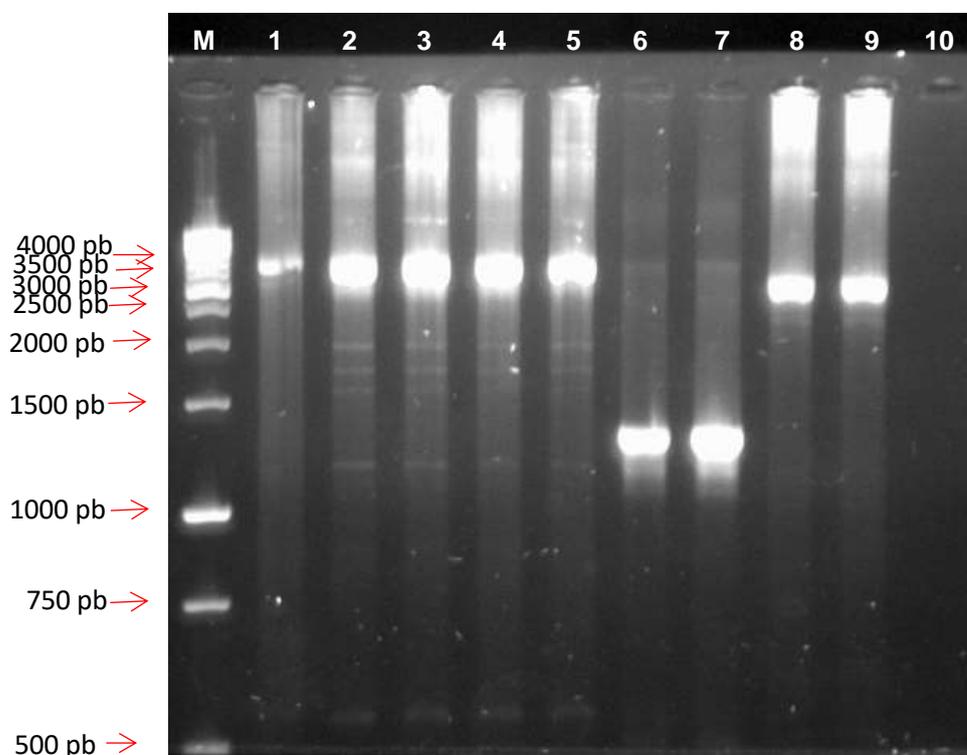
Na figura 20, é apresentado o perfil eletroforético da digestão dupla do vetor recombinante pPIC-BGL. Desta forma, confirmou-se a correta construção com a consequente liberação de um fragmento de esperado de 2551pb correspondente ao gene da enzima  $\beta$ -glucosidase (indicado pela seta) e um fragmento com tamanho aproximado ao tamanho do vetor pPIC9 com 8010 pb (coluna 2). Após essa confirmação, os plasmídeos recombinantes foram utilizados na Reação da Cadeia de Polimerase, reação de sequenciamento e transformação da levedura *P. pastoris* GS115 por eletroporação.

Figura 20 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando a digestão dupla bem-sucedida para a confirmação da correta construção vetor recombinante pPIC-BGL. M - marcador molecular O' geneRuler® 1Kb DNA ladder, ready-to-use (Thermoscientific); 1 - clone do pPIC-BGL intacto; 2 - clone do pPIC-BGL digerido com *EcoRI* e *NotI*; 3- pBSK-BGL intacto; 4- pPBSK-BGL digerido com *EcoRI* e *NotI*; 5 - pPIC9 intacto; 6 - pPIC9 digerido com *EcoRI* e *NotI*.



O objetivo da realização da reação de PCR foi para que tivéssemos outra confirmação da correta construção do vetor recombinante pPIC-BGL. Na figura 21 é demonstrado o produto da reação de PCR do plasmídeo recombinante pPIC-BGL. Nessa reação, foi preparado quatro amostras do mesmo plasmídeo pPIC-BGL, duas amostras do vetor pPIC9 sem o inserto, duas amostras do vetor pPIC-gla (glucoamilase) disponível no laboratório de tecnologia de DNA recombinante da UFAM para servir de controle positivo da reação (CARMO, 2010).

Figura 21 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % da análise da reação de PCR do vetor recombinante pPIC-BGL. M - Marcador molecular *O' geneRuler® 1Kb DNA ladder, ready-to-use* (Thermoscientific); 1 - Vetor pPIC-BGL (amostra 1); 2 - Vetor pPIC-BGL (amostra 2); 3 - Vetor pPIC-BGL (amostra 3); 4 - Vetor pPIC-BGL (amostra 4); 5 - Vetor pPIC-BGL (amostra 5); 6 - Vetor pPIC9 (amostra 1); 7 - Vetor pPIC9 (amostra 2); 8 - Vetor pPIC-gla (amostra 1); 9 - Vetor pPIC-gla (amostra 2) e (10) controle negativo da reação (somente o mix).



Conforme os resultados da reação de PCR, não foi possível obter uma confiabilidade neste ensaio devido ter apresentado mais de um fragmento amplificado (*amplicons*) nas alíquotas do vetor pPIC-BGL (colunas 1, 2, 3, 4 e 5), o que não era esperado. O que esperávamos era que fosse amplificado somente um *amplicon* correspondente ao gene *bgl* com aproximadamente 3047 pb (fragmentos mais intensos das colunas 1 a 5). Deste modo, possivelmente houve inespecificidade do anelamento dos *primers* que possibilitou seu anelamento em sítios inespecíficos. Nas demais amostras, foi amplificado somente um *amplicon* correspondente aos fragmentos esperados. Como por exemplo, as amostras de vetor pPIC-gla (colunas 8 e 9) com a amplificação somente do fragmento esperado de aproximadamente 2500 pb. Por esses motivos, foi realizada a reação de sequenciamento do vetor pPIC-BGL para verificar a sua integridade genética.

Os resultados do sequenciamento automático das amostras do vetor recombinante pPIC-BGL mostraram que somente duas amostras apresentaram boa

qualidade em suas sequências. Levando em consideração as bases com qualidade maior que 20 e bases com qualidade maior que 30. Destas, a amostra A02.ab1 apresentou um total de 990 bases sequenciadas, sendo que somente 653 (66%) bases com qualidade maior que 20 e 510 (60%) bases com qualidade maior que 30. A amostra B02.ab1 apresentou um total 1002 bases sequenciadas, somente 586 (58%) destas bases apresentaram qualidade maior que 20 e 470 (47%) bases com qualidade maior que 30. Isso implica que somente essas amostras foram analisadas por apresentar uma qualidade confiável em suas sequências.

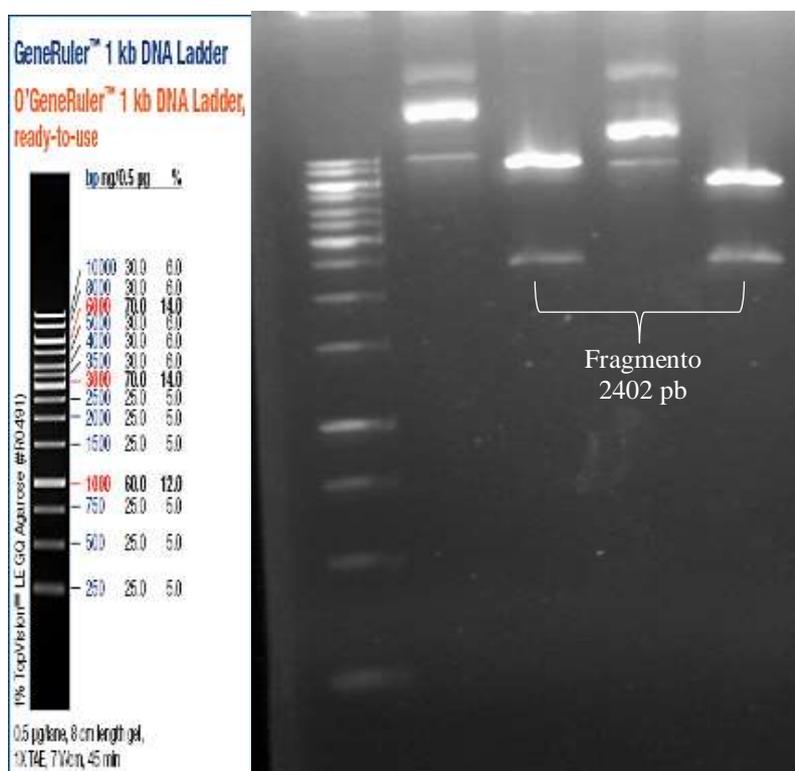
A confirmação da identidade dos fragmentos gerados no sequenciamento foi realizada comparando com a sequencias de nucleotídeos do gene sintético *bgl* utilizando-se o programa Clustal W. Nessa comparação, foi possível verificar que somente a sequência reversa complementar da amostra analisada apresentou identidade com parte da sequência do gene sintético *bgl* (anexo 6). Provavelmente pelo funcionamento somente do iniciador reverso no momento da amplificação dos fragmentos para posterior sequenciamento. Baseados nesses dados pode-se concluir que o plasmídeo usado na reação de sequenciamento é o pPIC-BGL que possivelmente está com a construção correta por apresentar a sequência do gene *bgl* em sua constituição.

#### **6.4 Transformação de Levedura *Pichia pastoris* GS115 com o Vetor pPIC-BGL**

Na transformação da levedura metilotrófica *P. pastoris* GS115, cerca de 21 µg do vetor recombinante pPIC-BGL foi linearizado com a enzima *Bgl*II (*Biolabs*) que cliva o vetor em duas posições flanqueando a região promotora 5' *AOX1* e a região 3' *AOX1* do vetor, que por identidade com o genoma de *P. pastoris* possibilita a recombinação homóloga dupla entre estas sequências e o seu genoma. Logo, a integração ocorre por uma substituição gênica no genoma da levedura. De modo que, a região codificadora do gene *AOX1* é removida completamente do genoma da levedura e substituída pelo fragmento de interesse que se encontra o gene da enzima β-glucosidase. Essa estratégia é viável devido o favorecimento da transformação com o DNA exógeno para melhor integração do cassete de expressão no genoma hospedeiro, uma vez que a levedura *P. pastoris* não apresenta vetores epissomais na constituição do seu material genético, sendo o material exógeno incorporado no seu genoma em sítios específicos tais como *HIS4* e *AOX1* (CREGG, et al. 1993).

A figura 22 demonstra o perfil eletroforético do produto da digestão do vetor recombinante pPIC-BGL linearizado com a enzima *Bgl*II (*biolabs*). Conforme os resultados, a digestão ocorreu eficientemente, com completa digestão em todos os dois sistemas (coluna 2 e 4) sem indícios de digestão parcial, com a liberação de um fragmento esperado que possui a origem de replicação de *E. coli*, o gene de resistência a ampicilina e outras sequências totalizando aproximadamente 2402 pb (banda inferior) e uma banda (superior) correspondente ao cassete expressão com extremidades *AOX1* com o tamanho de aproximadamente 8159 pb.

Figura 22 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % do produto da digestão do vetor recombinante pPIC-BGL com a enzima de restrição *bg*II (*biolabs*) .M- Marcador molecular 1 kb; 1-Vetor pPIC-BGL intacto; 2- pPIC-BGL digerido com *Bgl*II; 3- pPIC9 intacto; 4- pPIC9 digerido com *Bgl*II.

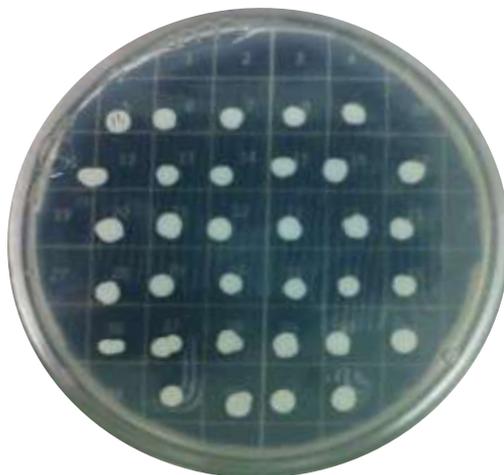


A precipitação do DNA plasmidial pPIC-BGL (utilizados para transformar a levedura metilotrófica *P. pastoris* GS115 por eletroporação) na presença de acetato de amônio e etanol, foi possível obter aproximadamente 17 µg de DNA plasmidial (pPIC-BGL).

Para a seleção dos clones cujos cassetes de expressão foram integrados no genoma da levedura, o produto da transformação foi semeado em meio mínimo sem histidina (MD) com ampicilina na concentração de 100 µg/mL e após 72 horas de

cultivo a 30°C, foi possível identificar cerca de 33 clones recombinantes (His<sup>+</sup>) livres de contaminações (figura 23).

Figura 23 - Fotografia da placa com meio mínimo sem histidina (MD) dos clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 pós 72 h de cultivo a 30 °C livres de contaminação.



### 6.5. Expressão da $\beta$ -glucosidase de *A. niger* Recombinante

Todos os 33 clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 que apresentaram habilidades de crescer em meio sem histidina, foram selecionados para verificar a sua capacidade de expressar e secretar a enzima  $\beta$ -glucosidase em placas de Petri. Os clones foram transferidos com auxílio de palitos estéreis para uma placa com meio BMGY, com objetivo de obter um aumento da massa celular, devido esse meio apresentar os nutrientes essenciais para o crescimento da levedura, diferentemente do meio MD que é útil apenas para seleção de células transformantes de *P. pastoris* por se tratar de um meio mínimo com glicose sem histidina.

Todos os clones crescidos obtiveram um aumento da massa celular significativa após sua incubação por 72 horas a 30°C. Seguidamente, foram transferidos para uma placa contendo meio BMMY suplementado com 0,5% de metanol, sendo que a cada 12 horas foram adicionados 0,5% de metanol na tampa das placas, a fim de manter a expressão da proteína recombinante. O meio BMMY é de extrema importância para a expressão da proteína recombinante devido ao promotor *AOX* de *P. pastoris* ser regulado transcricionalmente por metanol. Entretanto, para ser ativado, o promotor *AOX1* requer a presença de metanol e na ausência desse indutor, o promotor torna-se reprimido e conseqüentemente sem a expressão da proteína recombinante.

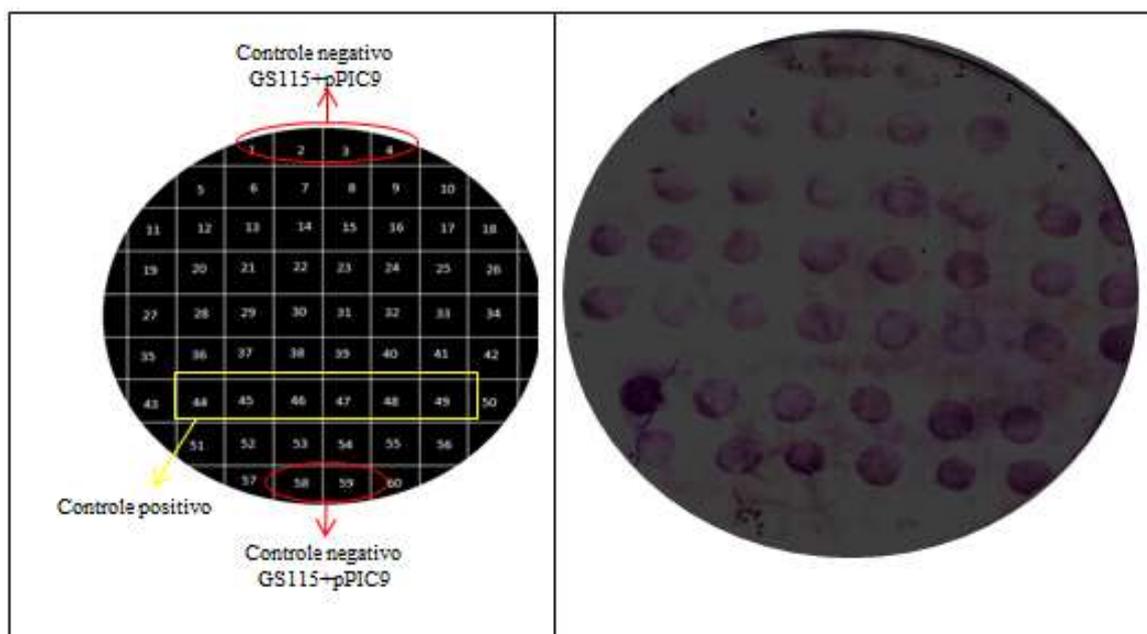
Durante todo tempo de indução (120 horas) foi observado que os clones recombinantes de *P. pastoris* cresceram continuamente. Isso nos indica que as células metabolizaram o metanol para geração e de energia e constituintes células.

### 6.5.1 Colony Blotting – imunodeteccção de cauda de poli-histidina na porção c-terminal e determinação dos recombinantes possuidores de fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>

Uma das placas de indução com metanol 0,5% foi submetida ao ensaio de imunodeteccção a fim de verificar quais os possíveis clones recombinantes expressaram e secretaram a proteína recombinante  $\beta$ -glucosidase. A escolha da técnica se deu devido a análise por imunodeteccção ser altamente específica na deteccção de proteínas marcadas com cauda de poli-histidina.

A figura 24 mostra o resultado da reação de imunodeteccção de cauda de poli-histidina na porção C-terminal dos possíveis clones de *P. pastoris* GS115 que expressaram e secretaram a proteína recombinante  $\beta$ -glucosidase induzidas por 120 horas.

Figura 24 - Fotografia da membrana de nitrocelulose utilizada na reação de imunodeteccção de cauda de poli-histidina na porção C-terminal dos possíveis clones transformantes de *P. pastoris* GS115 que expressaram e secretaram a proteína recombinante  $\beta$ -glucosidase.



Conforme os resultados obtidos no ensaio de Imunodeteccção cromogênica, conclui-se que todos 34 clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 foram positivos no ensaio de imunodeteccção de cauda de poli-histidina na porção C-terminal da

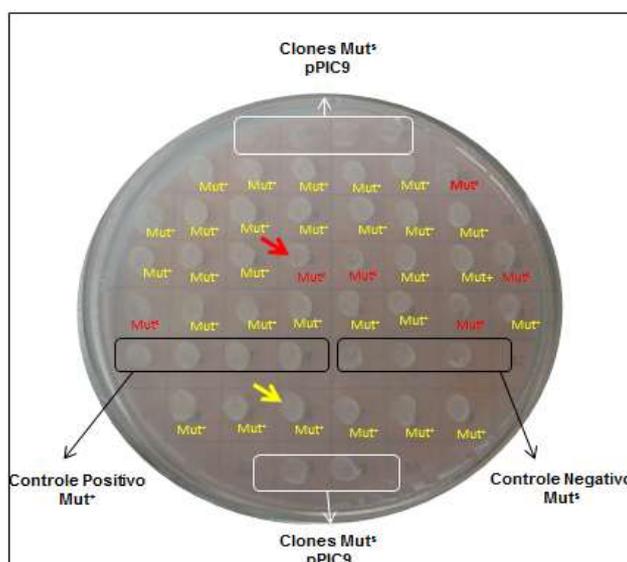
proteína recombinante por apresentarem uma marcação de coloração azul sobre as colônias. Isso indica que os clones recombinantes demonstraram que a clonagem, a expressão e secreção da proteína heteróloga  $\beta$ -glucosidase foram bem-sucedidas.

Já os clones de *P. pastoris* que foram transformados com o vetor pPIC9 utilizados como controle negativo nesse ensaio (clone 1, 2, 3, 4, 53 e 54), não foi verificado nenhuma marcação sobre as colônias devido eles não expressarem nenhuma proteína com cauda de poli-histidina, conseqüentemente, foram negativos no referido ensaio. O que já era previsto. Todos os clones utilizados como controle positivo (clones 36, 37, 38, 39, 40 e 41) apresentaram marcação sobre as colônias confirmando que a reação foi bem-sucedida para detecção de cauda poli-histidina.

## 6.6 Cinética de Indução Enzimática

Todos os clones submetidos ao ensaio de imunodeteção tiveram seus fenótipos determinados. A figura 25 demonstra os clones de *P. pastoris* crescidos em placa com meio MM após 60 horas de cultivo a 30°C e seus respectivos fenótipos determinados. Colônias não circuladas são clones recombinantes da enzima  $\beta$ -glucosidase, colônias circuladas em preto são clones transformantes com o vetor pPIC-tGH que serviram de controle positivo para a determinação dos fenótipos e colônias identificadas com círculo branco são clones transformantes com o vetor pPIC9.

Figura 25 - Fotografia da placa dos clones transformantes de *P. pastoris* GS115 crescidos em meio MM após 60 horas de cultivo a 30°C, com adição de metanol 0,5% a cada 24 horas e seus respectivos fenótipos.



A integração do cassete de expressão no genoma da levedura possibilitou a seleção de 29 clones recombinantes com fenótipos Mut<sup>+</sup> devido a alta utilização de metanol, justamente por manter os dois genes ativos que codificam para AOX e 06 clones recombinantes com fenótipos Mut<sup>s</sup>, tendo em vista que a linearização do vetor de expressão pela enzima *Bgl*II favoreceu a mudança de fenótipo da hospedeira GS115 His<sup>-</sup> de Mut<sup>+</sup> para Mut<sup>s</sup>, devido eventos de dupla recombinação e a perda do gene *AOX1* que codifica a enzima álcool oxidase mais ativa em processos metabólicos. A quantidade de clones com cópias inseridas por adição (clones Mut<sup>+</sup>) é explicada pela maior possibilidade de ocorrer um único evento de *crossover* que eventos duplos do qual gera transformantes Mut<sup>s</sup> pela substituição gênica (SREEKRISHNA et al., 1997).

Essa determinação fenotípica foi baseada na velocidade de crescimento dos clones em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Transformantes que receberam o cassete de expressão via substituição do gene *AOX1* (Mut<sup>s</sup>) cresceram muito lentamente em comparação com aqueles onde houve integração por adição (Mut<sup>+</sup>) quando metanol é a única fonte de carbono disponível.

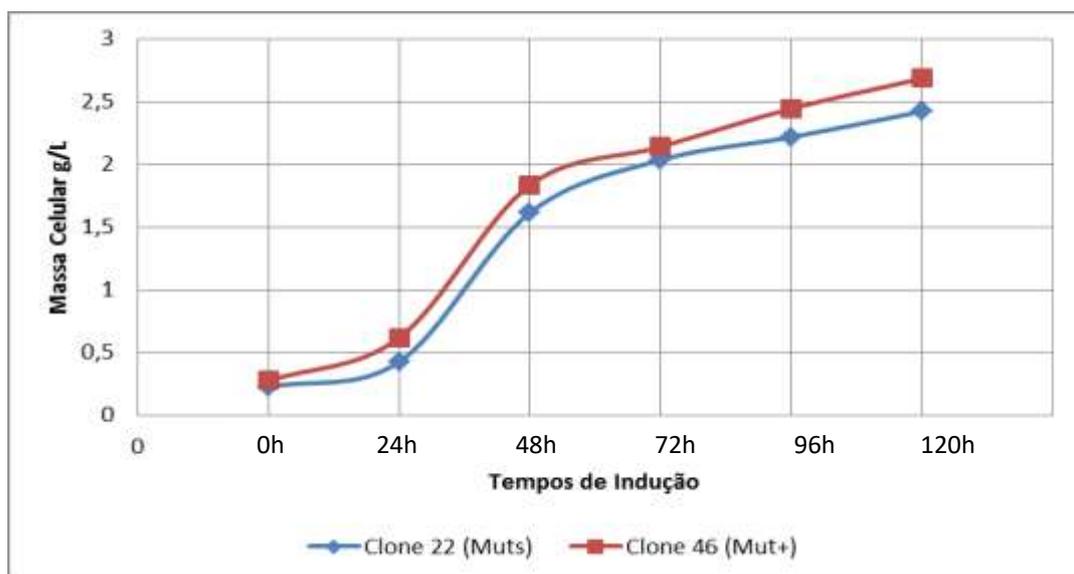
#### 6.6.1 Seleção e obtenção das curvas de crescimento

Os clones recombinantes 22 (Mut<sup>+</sup>) e clone 46 (Mut<sup>s</sup>) (indicados pelas setas na figura 25) foram selecionados para o ensaio de cinética de indução, baseados na intensidade de sua coloração obtida nos experimentos de *colony blotting*. Observa-se que clones com uma maior intensidade na coloração tendem a ter uma expressão e secreção da proteína recombinante mais acentuada. Isto está relacionado com expressão e secreção da enzima  $\beta$ -glucosidase. A partir desse pressuposto, foram selecionados os clones com maior intensidade na coloração.

A figura 26 demonstra a curva de crescimento celular de *P. pastoris* GS115 recombinantes do clone 46 (Mut<sup>+</sup>) e clone 22 (Mut<sup>s</sup>) crescidos em meio BMMY durante a indução de 120 horas com adição de 0,5% de metanol a cada 24 horas. Conforme os dados, o clone com fenótipo Mut<sup>+</sup> apresentou maior crescimento celular em relação ao clone com fenótipo Mut<sup>s</sup> a partir de 24 horas de indução. Isso é confirmado pelo fato da levedura com fenótipo Mut<sup>+</sup> apresentar o gene *AOX1* que codifica a enzima álcool oxidase mais ativa na degradação do metanol para produção de energia e outros constituintes celulares. Já a levedura com fenótipo Mut<sup>s</sup> não apresenta o gene

AOX1 ativo, conseqüentemente não haverá uma degradação eficiente do metanol, ocasionando um crescimento inferior em comparação com a levedura com fenótipo Mut<sup>+</sup> (CREGG et al. 1993). No período entre 24 a 48 horas houve um grande aumento da massa celular nos dois clones recombinantes, nos demais tempos o crescimento permaneceu constante.

Figura 26 - Curva de crescimento celular dos clones 46 (Mut<sup>+</sup>) e 22 (Mut<sup>s</sup>) crescidos em meio BMMY. O crescimento celular obtido foi convertido para g/L utilizando a fórmula  $(g/L)=0,22 \times D.O. 600 \text{ nm}$  (NAKANO et al., 2006).



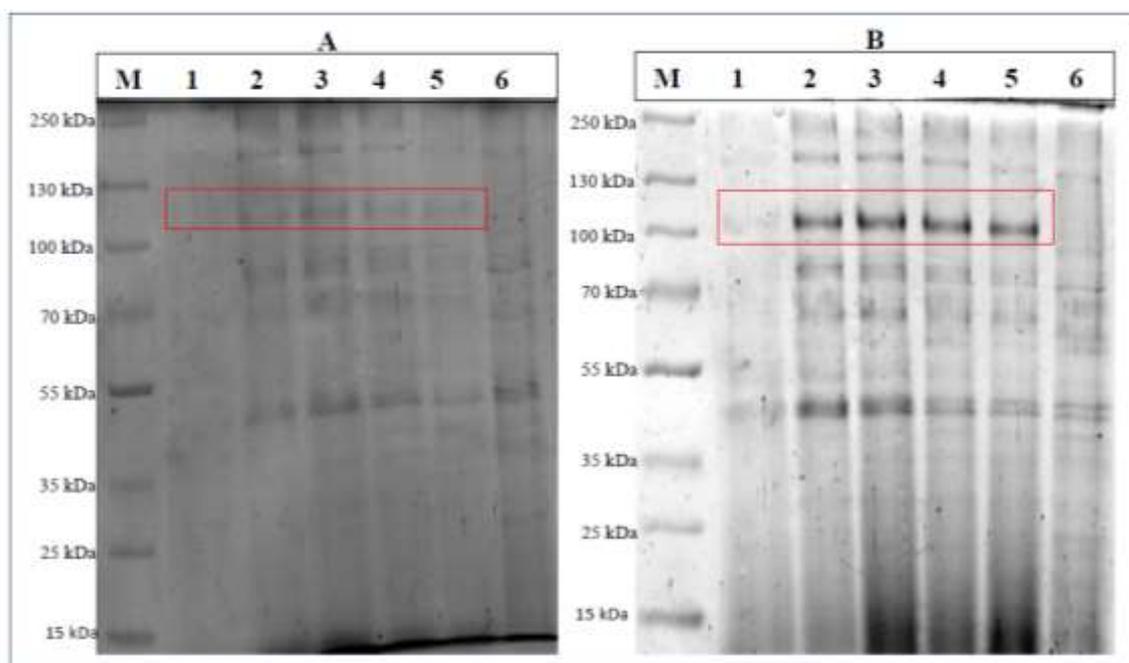
## 6.7. Análise do Produto Expresso em Gel Desnaturante SDS-PAGE

A análise da expressão e secreção da proteína recombinante foi realizada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos sobrenadantes dos clones Mut<sup>+</sup> (clone 46) e Mut<sup>s</sup> (clone 22) obtidos durante a cinética de indução. Conforme Ferreira (2010), a precisão do tamanho da enzima só pode acontecer em condições desnaturantes.

A figura 27 demonstra o perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 10 % dos tempos de indução da produção de  $\beta$ -glucosidase dos clones recombinantes Mut<sup>+</sup> (46) e clone Mut<sup>s</sup> (22). Conforme os resultados, a indução em meio líquido dos clones recombinantes foi realizada com sucesso devido à apresentação da banda correspondente a enzima  $\beta$ - glucosidase (bandas circuladas).

A suposta banda característica da enzima  $\beta$ -glucosidase é confirmada quando é comparado nos dois géis o perfil eletroforético dos tempos de indução (colunas 1, 2, 3, 4 e 5) com o controle negativo (coluna 6), em que no controle negativo não está presente a banda correspondente a massa molecular de 103 kDa devido a levedura ter sido transformada com o vetor pPIC9 intacto.

Figura 27 - Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 10 % dos tempos de indução da produção de  $\beta$ -glucosidase dos clones recombinantes Mut<sup>+</sup> (46) e Mut<sup>s</sup> (22) corados com azul brilhante de Coomassie G250. **A** - Clone Mut<sup>+</sup> (46): M - marcador *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* 1Kb; 1- 24 h; 2 - 48 h; 3 - 72 h; 4 - 96 h; 5 - 120 h; 6 - controle negativo GS115 com vetor pPIC9. **B** - Clone Mut<sup>s</sup> (22): M - marcador *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* 1Kb; 1 - 24 h; 2 - 48 h; 3 - 72 h; 4 - 96 h; 5 - 120 h; 6 - controle negativo GS115 com vetor pPIC9.



Em análise de bioinformática usando os portais *ExPaSy* e *ProtParam* massa molecular teórica de  $\beta$ -glucosidase não glicosilada foi de 103 kDa. Com base no SDS-PAGE de proteínas, a banda correspondente à  $\beta$ -glucosidase recombinante teve a migração eletroforética equivalente à massa teórica, prevista na análise de bioinformática, nos dois clones analisados. Dessa forma, é possível inferir que não houve nenhum tipo de glicosilação na via de secreção (N-glicosilação e O-glicosilação) em nenhum dos clones analisados, caso contrário, acarretaria mudança na migração eletroforética das proteínas no gel SDS-PAGE por apresentar um aumento na massa das proteínas.

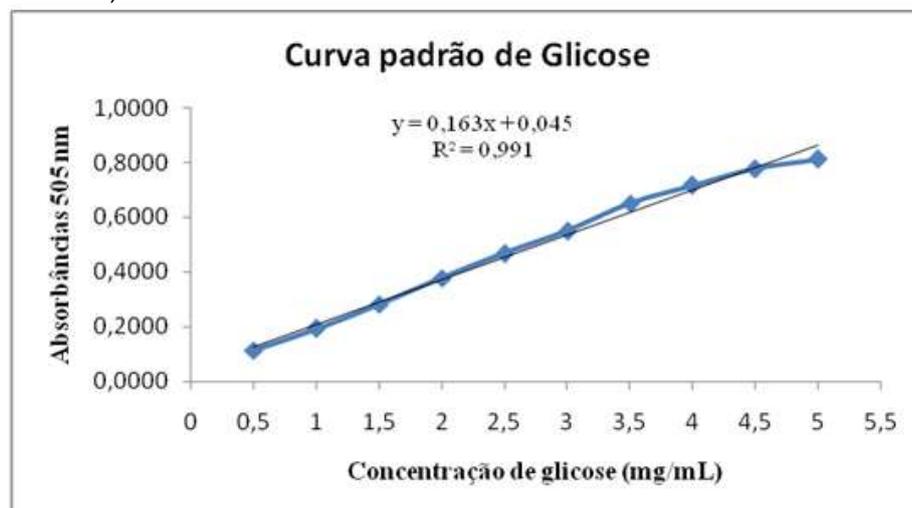
Estudos de Dias (2011) que avaliaram o potencial de *A. niger* para a produção natural de  $\beta$ -glucosidases demonstram que, as massas moleculares das  $\beta$ -glucosidases produzidas foram estimadas em 167,9 e 119,0 KDa, através de zimograma e SDS-PAGE. Entretanto, não se exclui a possibilidade possuir massas moleculares de 94,5, 77,5, 72,0 ou 67,1KDa. Nos estudos de Joo et al. (2010) que avaliaram a produção e caracterização de  $\beta$ -glucosidase extraída do *Penicillium pinophilum*, demonstram que a massa molecular estimada de  $\beta$ -glucosidase foi 120 KDa. Outros estudos também estimaram a massa molecular de  $\beta$ -glucosidase em análise SDS-PAGE e foi verificado que a estimativa varia de 50 a 135 KDa (COUGHLAN e MCHALE 1988; KWON et al. 1994; YAN e LIN 1997). Portanto, a massa molecular estimada da  $\beta$ -glucosidases recombinante de *A. niger* do referido estudo está acordo com a faixa obtida por outros pesquisadores.

Comparando a intensidade das bandas da suposta proteína recombinante nos clones Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>, pode-se inferir que no clone Mut<sup>+</sup> o tempo de 48 horas é o tempo em que a suposta banda está mais intensa, já no clone Mut<sup>s</sup> os tempos que apresentaram uma maior intensidade foram 48 horas e 72 horas. Isso implica que, esses tempos de indução em que há presença da maior intensidade nas bandas pode estar relacionado com o melhor tempo de indução para a expressão da proteína recombinante por apresentar uma maior expressão da suposta proteína recombinante.

A banda característica da enzima beta glucosidase foi confirmada por meio do ensaio quantitativo para determinação da atividade  $\beta$ -glucosidásica em celobiose dos sobrenadantes de indução dos clones Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> após 120 horas de indução. As condições reacionais, tais como pH e temperatura, foram baseadas nos estudos de Mekoo et al. (2010), que analisaram a atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase recombinante sobre a celobiose em diferentes temperaturas e diferentes pH. Estudos mostraram que a temperatura de 50°C e pH 5,0 foram as condições ideais para atividade  $\beta$ -glucosidásica.

A quantificação da glicose liberada foi baseada por meio curva padrão de glicose de concentração máxima de 5,0 mg/mL de glicose. A figura 28 demonstra a curva padrão da glicose e os valores das médias das absorbâncias a 505 nm em função da concentração de glicose e sua respectiva equação da reta.

Figura 28 - Curva padrão de glicose, obtida pelo método enzimático glicose oxidase (kit Glucose Liquicolor da In Vitro).



Somente o clone Mut<sup>s</sup> apresentou atividade β-glicosidásica sobre a celbiose por apresentar o valor da absorbância superior à soma das absorbâncias do controle do substrato com o controle da enzima. Diferentemente do clone Mut<sup>+</sup>, que o valor da absorbância está muito próximo ao valor da soma das absorbâncias do controle do substrato com o controle da enzima, isso indica que não houve atividade β-glicosidásica sobre a celbiose (tabela 6).

Tabela 6 - Atividade β-glicosidásica dos clones recombinantes Mut<sup>s</sup> e Mut<sup>+</sup>

Amostras	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média das absorbâncias	Controle da Enzima	Absorbância Real*
Clone Mut <sup>+</sup> (46)	0,050	0,049	0,049	0,049	0,003	0,006
Clone Mut <sup>s</sup> (22)	0,222	0,231	0,225	0,226	0,003	0,183
Controle (CELIC 50X)**	0,908	0,907	0,909	0,908	0,830	0,038
Padrão (100µl)	0,835					
Controle substrato	0,040					

\*Absorbância real = Soma da Absorbância do Controle do substrato e Controle da Enzima subtraídos dos valores das médias das absorbâncias

\*\*Controle (CELIC) = Preparado enzimático de celulasas comercial diluído 50 vezes

A partir da equação da reta, foi determinada a concentração em *micromolar* (µM) de glicose liberada da reação do sobrenadante da indução somente do clone Mut<sup>s</sup> sobre a celbiose, pelo fato deste clone ter apresentado atividade β-

glucosidásica considerável. Portanto, conforme os cálculos, conclui-se que em 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático do clone Mut<sup>s</sup> foi obtido 4,694  $\mu\text{M}$  de glicose liberada durante a reação da enzima  $\beta$ -glucosidase no tempo de 15 minutos de reação a 50°C. A partir da concentração de glicose ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada que a atividade enzimática do clone Mut<sup>+</sup> é 12.517,33 U/L<sup>-1</sup>.

## 7 CONCLUSÕES

- No presente trabalho foi possível demonstrar que a construção do vetor recombinante pPIC-BGL foi realizada com sucesso;
- A enzima  $\beta$ -glucosidase de *A. niger* pode ser expressa na levedura *P. pastoris* eficientemente na sua forma ativa;
- Com base nas análises de bioinformática da sequência polipeptídica  $\beta$ -glucosidase, a massa estimada não glicosilada seria de 103 kDa. No entanto, o perfil eletroforético em gel SDS-PAGE revelou que a  $\beta$ -glucosidase recombinante expressa por *P. pastoris* tem massa molecular de aproximadamente 103 kDa. Isso implica que a proteína expressão não foi glicosilada no momento da sua secreção.
- Com base na análise do gel SDS-PAGE houve diferenças aparentes nos níveis de expressão da  $\beta$ -glucosidase recombinante entre os clones com fenótipos Mut<sup>+</sup> (46) e Mut<sup>s</sup> (22). Onde o clone Mut<sup>s</sup> apresentou uma intensidade maior nas bandas correspondentes à enzima  $\beta$ -glucosidase a partir de 24 horas de indução prosseguindo até às 120 horas.
- O melhor tempo de indução para a expressão da proteína recombinante do clone Mut<sup>+</sup> foi de 48 horas, do clone Mut<sup>s</sup> foi entre 48 a 72 horas.
- A expressão da  $\beta$ -glucosidase recombinante em *P. pastoris* foi confirmada por meio do ensaio de atividade  $\beta$ -glucosidásica utilizando como substrato enzimático a celobiose, onde somente o clone Mut<sup>s</sup> (22) apresentou atividade  $\beta$ -glucosidásica.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar a espectrometria de massa para confirmação e caracterização da  $\beta$ -glucosidase recombinante expressa em *P. pastoris*;
- Aperfeiçoar a expressão de  $\beta$ -glucosidase em *P. pastoris* em biorreator;
- Purificar  $\beta$ -glucosidase recombinante em coluna de níquel e analisar a sua atividade  $\beta$ -glucosidásica;
- Realizar a expressão intracelular  $\beta$ -glucosidase em *P. pastoris*;
- Analisar os demais clones recombinantes que foram positivos no ensaio de imunodeteção para verificar os níveis de expressão e a atividade  $\beta$ -glucosidásica.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R.M.; MORAES, L.M.P., TORRES, F.A.G. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK 1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**. v.22, p. 725-737. 2005.
- AMOREA, A., FARACO, V. Potential of fungi as category I Consolidated Bioprocessing Organisms for cellulosic ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 16, p. 3286-3301. 2012.
- ASTOLFI FILHO, S., AZEVEDO, M. O.; PEREIRA, J. O.; XAVIER, M. A. S. **Noções Básicas de Tecnologia do DNA Recombinante**. Ed. ADUA, Manaus, Amazonas. 62 pp. 2005
- BANEYX, F. Recombinant Protein Expression in *Echerichia Coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. v.10, p. 411-421. 1999.
- BECKHAM, G. T.; MATTHEWS, J. F.; PETERS, B.; BOMBLY, Y. J.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M.F. Molecular-level origins of biomass recalcitrance: decrystallization free energies for four common cellulose polymorphs. **J. Phys Chem B**. v.115, p. 4118-4127. 2011.
- BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol rev**. v.13, p. 25-58. 1994.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**. v.18, p. 355-383. 2000.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**. v.155, p. 583-620. 1997.
- BOM, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA-JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia. Produções, Aplicações e Mercado**. 1ª Ed. Rio de Janeiro. Interciência. Rio de Janeiro, Brasil, 241-271. 2008.
- BURNS, G. W. e BOTTINO, P. J. **Genética 6ª Edição**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 728pp. 1991.
- CAMASSOLA, M., A. J.P. Effect of methoxanthines on production of cellulases *Penicillium echinulatum*. **J. Appl. Microbiol**. v.102, p. 485-578. 2006.
- CARMO, E. J.; CARVALHO, S. M. S.; ASTOLFI-FILHO, S. Differentiated expression of the enzyme glucoamylase for recombinant phenotype Mut<sup>+</sup> and Mut<sup>s</sup> *Pichia pastoris*. In: **3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia**. Fortaleza. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia. Fortaleza, 2010. v. 1. p. 217-217. 2010.
- CASTRO, A. M. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos filamentosos obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-açúcar (*Saccharum spp*)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do rio de Janeiro. 2006.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, Propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. v. 33, p. 1-12. 2010.

CAVALCANTE, R. C. M. **Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga para *Bacillus subtilis***. Tese de Doutorado. USP. Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. São Paulo, 2013.

CEREGHINO, G. P. L.; CREEG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. **Current opinion in Biotechnology** . v. 10, p. 422-427. 1999.

CEREGHINO, G.P.; CEREGHINO, J.L.; ILGEN, C.; CREGG, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. . **Current opinion in Biotechnology**. v.13, p. 329-332. 2002.

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

CLARE, J. J. et al. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Review**. v. 24, p. 45-66. 1991.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agric. Biol. Chem.** v. 44, p. 2279-2289. 1980.

COUGHLAN, M. P.; MCHALE, A. Purification of  $\beta$ -D-glucosidase glucohydrolases of *Talaromyces emersonii*. **Methods in Enzymology**. Amsterdam. v. 160, n. 3, p. 437-443, 1988.

CREGG, J. M. et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia Pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**. v. 9, n. 3, p. 1316-1323. 1989.

CREGG, J. M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Hoeffler, J. & Fernandez, J. **Nature: The palette for the art of expression**, Ed. *Academic Press*, San Diego, CA, p. 157-191. 1999.

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

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

DAN, S. et al. Cloning, Expression, Characterization and Nucleophile Identification of family 3, *Aspergillus niger*  $\beta$ - glucosidase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 4973-4980. 2000.

DE PAULA, J. N. L. M. **O uso potencial do inibidor de alfa-amilase de trigo 0.53 no controle de Bruquídeos**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília DF. 87 pp. 2006.

DIAS, D. S. B. **Produção, caracterização parcial e aplicação de  $\beta$ -glucosidases de *Aspergillus niger***. Dissertação e mestrado. Programa de pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos. Rio de Janeiro, 2011.

DILLON, A. J. P., ZORGI, C.; CAMASSOLA, M., HENRIQUES J. A. P. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and  $\beta$ -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 70, p. 740-746. 2005.

ERHART, E.; HOLLENBER, G, C. P. The presence of a defective LEU2 gene on mitochondrial DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. **Journal of Bacteriology.** v. 156, p 625–635, 1983.

FINGER, P. F. et al. Metodologia para expressão da glicoproteína s1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em sistemas procaríoto e eucaríoto. **Science and Animal Health.** v.4, n.1, p. 81-90. JAN/ABR 2016.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic Dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. **Process Biochemistry.** V.38, p. 1003-1018. 2003.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry,** v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GILLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 54, p. 741-750. 2000.

glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC31494. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** Tokyo. v. 61, n. 6, p. 965-970, 1997.

GUO, M.; HANG, H.; ZHU, T.; ZHUANG, J. C.; ZHANG, S. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 42, p. 34-345. 2008.

GUPTA, R.; MEHTA, G.; DESWAL, D. SHARMA, S.; JAIN, K.K. Cellulases and their Biotechnological Applications. **Biotechnology for Environmental Management and resource recovery,** DOI 10.1007/978-81322-0876-1\_6. 2013.

HARTNER, F. S., GLIEDER, A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories,** Review. London, v. 5, n. 39, 2006.

HASLACHER, M. et al. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *hevea brasiliensis* in microbial hosts. **Protein Expr. Purif.** V.11, p. 61-71. 1997.

HENRISAT, B. **The carbohydrate-Active enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** Nucleic Acids Res 37: D233-238 (PMID: 18838391). Carbohydrate Active Enzymes database. 2009.

HENRISSAT, B. et al. Conserved catalytic machinery and the prediction of a fold for several families of glycosyl hydrolases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 92, n.15, p. 7090-7094. 1995.

HENRISSAT, B., M.; CLAEYSSENS, P.; TOMME, L.; LEMESLE, J.P. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. **Gene**. v.81, p. 83-95. 1989.

HOLLENBERG, C. P.; GELLISSENT, G. Production of recombinant proteins by methylotropic yeast. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 8, n. 5, p. 554-560. 1997.

HONG, J.; TAMAKI, H. Cloning and functional expression of thermostable  $\beta$ -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 73, p. 1331-1339. 2006.

HORN, S. J.; VAAJE-KOSLATED, G., WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G.H. Novel Enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**. 4:45. 2012.

HUANG, A. A. Kinetic studies on insoluble cellulose–cellulase system. **Biotechnol Bioeng**. v.17, p. 1421–1433. 1975.

Invitrogen. **For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris***. [S.l]. User Manual. 2010.

JOO, A.; JEYA, M.; LEE, K, MOON, H.; KIM, Y.; LEE, J. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. **Process Biochemistry**. Barking. v. 45, n. 6, p. 851-858, 2010.

KADLA, J. K. et al. Lignin-sased carbon fibers for composite fiber applications. **Carbon**. V.40, p. 2913. 2002.

KUBICEK, C. P. et al. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian Isolates. **Fungal Genet. Biol.** v. 28, n. 30, p. 310-317. 2003.

KUHAD, R. C, SINGH, A. Lignolellulose biotechnology: future prospects. **IK International Publication**. New Delhi. 2007.

KURTZMAN, C, P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia pastoris)* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 36, p. 1435-1438. 2009.

KWON, K-S.; LEE, J.; KANG, H. G.; HAH, Y. C. Detection of  $\beta$ -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington. v. 60, n. 12, p. 4584-4586, 1994.

LADERMAN, K. A. et al. The purification and characterization of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, p. 24394-24401. 1993.

LI, P. et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia Pastoris*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 142, p. 105-124. 2007.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** v. 66, p. 506-577, 2002.

- MARTINS, L. F. **Caracterização de complexo celulolítico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Paraná. 2005.
- MARX, H., MECKLENBRÄUKER, A., GASSER, B., SAUER, M. MATTANOVICH, D. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. **FEMS Yeast Research**. v. 9, p. 1260–1270. 2009.
- MECKOO, J. D. L.; YANG, Y.; LI, T. SAO, R., LIU, J. Molecular cloning and expression of a synthetic gene encoding a  $\beta$ -glucosidase of *Aspergillus niger* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Int. J. Biol. Sci.** v. 5, p. 500-516. 2010.
- MENÉNDEZ, J., GARCÍA, B., HIDALGO, Y. New method for the selection of multicopy transformants of *Pichia pastoris* using 3-Amino-1,2,4 Triazol. **BioTechniques**, v. 29, p. 1094-1099. 2000.
- MOLHOJ, M.; et al. Characterization of a functional soluble form of a *Brassica napus* membrane-anchored endo-1,4-beta-glucanase heterologously expressed in *Pichia pastoris*. **Plant Physiol, Oct.** v. 127, n. 2, p. 674-84. 2001.
- MOLHOJ, M.; JORGENSEN, B.; ULVSKOV, P.; BORKHARDT, B. Two *Arabidopsis thaliana* genes, KOR2 and KOR3, which encode membrane-anchored endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, are differentially expressed in developing leaf trichomes and their support cells. **Plant Mol Biol.** v. 46, p. 263–275. 2001.
- MORETTI, M. M.S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e feruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis**. 2010. 112 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.
- NAKANO, A. et al. Effects of methanol feeding methods on chimeric alpha-amylase expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 101, p. 227-231. 2006.
- NASCIMENTO, A. A. C. et al. **Tecnologia do DNA Recombinante**. São Paulo: faculdade de Medicina de ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 2003.
- NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5a. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2011.
- O’SULLIVAN, A. C. **Cellulose: the structure slowly unveils**. Cellulose 4, p. 173-207. 0969-0239 . 1997. Blackie Academic 7 Professional. 1997.
- PALOMER, X. et al. Study of the strawberry Cel1 endo- $\beta$ -(1,4)- glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Plant Science**. v. 167, p. 509-518. 2004.
- PERCIVAL ZHANG, Y. H; HIMMEL, M. E; MIELENZ, F; MUTJE, P. Enzyme deinking of old newspapers with cellulose. **Process Biochemistry**. v.24, p.452-481. 2006.
- POLIZELI, M. L. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Microbial Biotechnology**. v. 67, p. 577-591. 2005.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the treatment of lignocellulosic materials. **Química Nov.** v. 26, n. 6, p. 863-871. 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. e EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6ª. Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – Brasil. 2010.

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 6, p. 527-533. 1995.

RUBINI, M.R. et al. Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulase gene. **J. Appl. Microbiol.** v. 37, p. 1365-2672. 2009.

SADALLA-PINTO, E. A. et al. Cloning and expression of cDNA encoding growth hormone tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the yeast *Pichia pastoris*. **BMC proceedings**. 5th Congress of the Brazilian Biotechnology Society (SBBIOTEC) Florianópolis, Brazil. 10-14 November 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659pp. 1989.

SANDGREN, M., SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Prog. Bioph. Mol. Biol.** V.89, p.246-291. 2005.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2007.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v, 87, p. 787-799. 2010

SCHUTTER, K. et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nat Biotechnol.** v. 27, p. 561–566. 2009.

SEARS, I.B.; O'CONNOR, J.; ROSSANESE, O.W., GLICK, B.S. A versatile set of vector for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**,v.14.p.783-790. 1998.

SINGHANIA, R.R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.03.010. 2010.

SOCCOL, C.R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, J-M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.41, p.330-336. 1994.

SREEKRISHNA, K. et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**. v. 190, p. 55-62. 1997.

SUNGA, A. J.; TOLSTORUKOV, I.; CREGG, J. M. Posttransformation vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Res**. v. 8, p. 870-876. 2008.

SUTO, M. TONITA, F. Introduction and catabolite repression mechanisms of cellulose in fungi. **J. Biosci. Bioeng**. v. 92, p. 305-311. 2001.

TOLAN, J. S. Logen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. **Clean Techn. Environ Policy**. v. 3, p. 339-345. 2002.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 20-22. 2001.

TUITE, M. F.; CLARE, J. J.; ROMANOS, M. A. **Expressing cloned genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris***. In: HIGGINS, S. J.; HAMES, B. D. (Eds). **Protein expression – A practical approach**. University Press, Oxford, United States, New York. p. 61-100. 1999.

VAZ, M. R. F. **Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes (eIF, LACK) para a expressão de antígenos da *Leishmania chagasi***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte. 79pp. 2008.

XU, Q.; ADNEY, W.S.; DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. Cellulases for Biomass Conversion. In: Polaina J.; MacCabe A. P. (Eds.). **Industrial Enzyme**. P. 35-50. 2007.

YAN, T. R.; LIN, C. L. Purification and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -

YANG, L.; DAI, X.; HOU, J.; MA, C.; WANG, C.; WU, Z.; LI, M. Construction of *Rhizopus arrhizus* glucoamylase gene suitable for expression in distinct host: introns spliced artificially by PCR. **Mol. Biol. Rep**. v. 35, p. 9-15. 2008.

## ANEXO 1

Protocolo de purificação de DNA do gel de agarose com o kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare)

### Quick Reference Protocol Card

Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit

28-9034-70 (100 purifications)

28-9034-71 (250 purifications)

#### B. Protocol for purification of DNA from TAE and TBE agarose gels

- Check appropriate volume of ethanol added to Wash buffer type 1

⊕ :Add   ⌚ :Spin   🕒 :Incubate

##### 1. Sample capture

- Weigh a DNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube
- Excise band of interest and place in microcentrifuge tube
- Weigh microcentrifuge tube plus agarose gel band
- Calculate weight of agarose gel slice
- ⊕ 🍷 10 µl Capture buffer type 3 for each 10 mg agarose gel slice
- Mix by inversion
- 🕒 60°C until agarose is completely dissolved
- Check color of Capture buffer type 3-sample mix is yellow or pale orange



##### 2. Sample binding

- ⊕ 🍷 600 µl Capture buffer type 3-sample mix to assembled GFX MicroSpin™ column and Collection tube
- 🕒 60 s room temperature
- ⌚ 30 s 16 000 × g. Discard flow through
- Place GFX MicroSpin column inside the same Collection tube
- Repeat Sample Binding step until all sample is loaded



##### 3. Wash & dry

- ⊕ 🍷 500 µl Wash buffer type 1
- ⌚ 30 s 16 000 × g
- Discard Collection tube. Transfer GFX MicroSpin column to a clean 1.5ml DNase-free microcentrifuge tube.



##### 4. Elution

- ⊕ 🍷 OR 🍷 10–50 µl Elution buffer type 4 OR type 6
- 🕒 60 s room temperature
- ⌚ 60 s 16 000 × g
- Retain flow through
- Store purified sample DNA at -20°C



imagination at work

## ANEXO 2

### Protocolo de Preparo das células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F'1q eletrocompetentes

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$ F'1q foram cultivadas e tornadas eletrocompetentes após sucessivas lavagens com glicerol 10 %. Para isso, uma única colônia da bactéria foi inoculada em 25 mL de meio LB e incubada em agitador de bancada (tipo *shaker*) a 37°C por uma noite (overnight). Um mililitro dessa cultura foi inoculado em 200 mL de meio LB sem antibióticos. O inóculo foi mantido sob agitação de 180 rpm até a cultura atingir densidade óptica em 600 nm (D.O.600) igual a 0,5. Após isso, a cultura foi levada em banho de gelo por 1 hora para ser resfriada, a cultura foi dividida em tubos tipo *falcon*, cada um com 50 mL de volume. Posteriormente os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado imediatamente e as células ressuspensas com glicerol 10 % estéril e gelado. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C seguida do descarte do sobrenadante e novamente a ressuspensão de cada pellet em glicerol 10 % gelado e estéril. Essas lavagens foram repetidas por mais quatro vezes com subsequente centrifugação das células nas mesmas condições. Na última lavagem, o *pellet* finalmente foi ressuspendido em 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril. As células eletrocompetentes foram alíquotadas em volumes de 80  $\mu$ L e imediatamente estocadas em freezer na temperatura de -80°C.

## ANEXO 3

Protocolo de extração de DNA plasmidial do kit *Ilustra PlasmidPrep Mini Spin kit* (GE Healthcare)

**Quick Reference Protocol Card** 28-9042-69 (50 purifications)  
28-9042-70 (250 purifications)

Ilustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit

Protocol for 1.5 & 3 ml culture volumes

- Check appropriate volume of ethanol added to Wash buffer type 1

➕ Add   ⌚ Spin   ⌚ Incubate

- 1. Harvesting of bacterial culture**
  - ➕ 1.5 ml bacterial culture
  - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
    - Pour off and discard supernatant
    - Repeat for 3 ml culture volume
  - ⌚ 30 seconds 16 000 × g (for all culture volumes)
    - Remove residual supernatant
- 2. Lysis**
  - ➕ 175 µl Lysis buffer type 7; re-suspend pellet
  - ➕ 175 µl Lysis buffer type 8; gently invert
  - ➕ 350 µl Lysis buffer type 9; gently invert
  - ⌚ 4 minutes 16 000 × g
- 3. Plasmid binding**
  - Transfer supernatant to plasmid mini column inside Collection tube
  - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
  - Discard flowthrough
- 4. Wash (optional -stain dependent)**
  - ➕ 400 µl Lysis buffer type 9
  - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
  - Discard flowthrough
- 5. Wash & Dry**
  - ➕ 400 µl Wash buffer type 1
  - ⌚ 1 minute 16 000 × g
  - Discard flow-through and Collection tube
- 6. Elution**
  - Transfer plasmid mini column to a new DNase-free microcentrifuge tube
  - ➕ 100 µl Elution buffer type 4
  - ⌚ 30 seconds at room temperature
  - ⌚ 30 seconds 16 000 × g
  - Retain eluant
  - Store purified plasmid DNA at -20°C



 28-9042-70A Rev F 20220228

## ANEXO 4

### **Protocolo de preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115**

(Seguindo especificações do Manual de Expressão em *P. pastoris* da INVITROGEM).

Células da linhagem GS115 da levedura metilotrófica foram inoculadas em 50 mL de meio YPD líquido, em frascos *erlenmeyer* de 120 mL, e incubadas a 30°C em agitador com 200 rpm por aproximadamente 24 horas. Realizaram-se leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm até atingir a densidade ótica (D.O) aproximadamente 1. Um mililitro deste pré-inóculo foi adicionado a 200 mL do meio YPD em frascos *erlenmeyer* de 1 L, e incubados a 30°C em agitador com 200 rpm/min com sucessivas leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm até a densidade ótica (D.O) entre 1,3 e 1,5. As células foram coletadas por centrifugação a 250 g por 5 minutos a 4°C e ressuspendeu-se em 500 mL de água deionizada esterilizada gelada. Foi realizada uma segunda centrifugação nas mesmas condições citadas acima e as células foram ressuspendidas em 250 mL de água deionizada esterilizada e gelada. Foi realizada outra centrifugação a 250 g por 5 minutos, as células depositadas foram ressuspendidas em 25 mL de sorbitol 1 M gelado e novamente centrifugadas e ressuspendidas em 2 mL de sorbitol gelado a 1 M. As células da levedura de linhagem GS115 que tornaram-se competentes foram aliqüotadas em volumes de 80 µL e imediatamente estocadas em freezer na temperatura de -80°C.

## ANEXO 5

### **Protocolo de imunodeteção Cromogênico Western Breeze da Invitrogen Life Technologies (*WesternBreeze®Cromogenic western Blot Immunodetection kit*)**

- 1- Aplicar 20 mL da solução bloqueadora sobre a membrana de nitrocelulose disposta em placa de acrílico fornecida no kit. Incubar por 30 minutos em shaker de rotação. Descartar a solução bloqueadora.
- 2- Rinsar a membrana com 20 mL de água por 5 min, descartar a água e repetir mais uma vez este procedimento.
- 3- Incubar a membrana com 10 mL de solução de anticorpo primário por 1 hora em shaker de rotação. Descartar a solução.
- 4- Lavar a membrana por 5 minutos com 20 mL de solução de lavagem. Repetir o procedimento por mais 3 vezes.
- 5- Incubar a membrana em 10 mL de solução de anticorpo secundário por 30 minutos. Descartar a solução.
- 6- Lavar a membrana por 5 minutos com 20 mL de anticorpo de lavagem. Repetir por mais 3 vezes.
- 7- Rinsar a membrana com 20 mL de água mili-Q por 2 minutos. Repetir por mais 2 vezes.
- 8- Incubar a membrana em 5 mL de substrato cromogênico até que apareça as bandas ou spots na membrana no tempo de 1-60 minutos.
- 9- Rinsar a membrana com 20 mL de água mili-Q a fim de bloquear a ação do substrato cromogênico.
- 10- Secar a membrana com pape filtro ou papel toalha e, se possível, fotodocumentar e escanear. Guardar a membrana com as bandas reveladas.

## ANEXO 6

Alinhamento múltiplo usando Clustal W da sequência do gene *bgl* com a sequência reversa complementar gerada durante o sequenciamento do plasmídeo recombinante pPIC-BGL. O \* representam regiões de similaridade entre os nucleotídeos.

```

18/05/2015                               Alignments < ClustalW2 < EMBL-EBI

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          AGATCTGAATTCGATGAATTAGCATATTTCCACCTTACTATCCATCACC 50

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          TTGGGCTAATGGACAGGGAGATTGGSCAGAAGCTTACCAGAGGGCAGTCG 100

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          ACATTGTCTCACAGATGACACTAGCTGAGAAGSTCAATTTAACAACCGSA 150

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          ACAGGATGGGAAGCTAGAGTTATGTGCTGGACAGACAGGAGGAGTCCCAAG 200

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          GCTAGGAATCCCTGGAAATGTGTGCTCAGGATTCCTATTAGGAGTCAGGG 250

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          ACTCAGATTATAAATTCGCATTCCCTGCTGGAGTCAACGTCGCTGCAACA 300

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          TGGGACAAGAATCTAGCTTATTTAAGGGGACAGGCAATGGGACAGGAGTT 350

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          CTCTGATAAGGGAGCTGACATTCAGCTAGSACCAGCAGCTGGACCTTTAG 400

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          GAAGGTCACCCAGATGGCGGAAGGAATTGGGAAGGATTTTCTCCTGACCCA 450

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          GCACTATCAGGAGTCTTATTCGCTGAAACAATTAAGGGAAATCCAGGATGC 500

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          AGGAGTCGTCGCTACAGCAAAGCATTATATTGCTTACGAACAGGAGCACT 550

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          TCAGGCAGGCACAGAAGCTCAGGGATATGGATTCAATATTACAGAGTCT 600

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          GGATCAGCAAACCTAGATGACAAGACAATGCATGAATTATATTATGGCC 650

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          ATTCGCTGATGCAATTAGGGCTGGAGCAGSAGCTGTCATGTGTTCTTATA 700

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          ATCAGATTAACAATTCATACGGATGCCAGTCTTCATATACACTAAACAAG 750

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          TTAATAAAGGCTGAATTAGGATTCAGGGATTCGTCATGTCGATTGGGC 800

Contig_reverse_complement                -----
GENE_SINTETICO                          AGCTCATCACGCCGGTGTCTCAGGAGCACTAGCTG6TTTAGACATGTCTA 850

```

data:text/html;charset=utf-8,%3Cpre%20id%3D%22alignmentContent%22%20ml%3A%5Bspace%3D%22preserve%22%20style%3D%22display%3A

18052015

Alignments • ClustalW2 • EMBL-EBI

```

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
TGCCAGGAGATGTCGACTATGATTCAGGTACATCTTACTGGGSAACAAAT 900

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
CTAACAAATTCAGTCTTAACGGTACAGTCCACAGTGGAGGGTCGATGA 950

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
CATGGCTGTCAGGATTATGGCAGCTTATTACAAGGTCGGTAGGGATAGGC 1000

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
TATGGACACCACCTAATTTCTTCATGGACAAGGGATGAATATGGTTTC 1050

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
AAGTACTATTACGTCTCTGAGGGACCATATGAAAAGGTCAATCAGTTCGT 1100

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
CAACGTCAGAGGAATCATTCTGAGCTAATTAGGAGGATCGGTGCTGATT 1150

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
CAACAGTCTTACTAAGAATGACGGAGCATTACCACTAACAGGTAAGGAA 1200

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
AGGTTAGTCGCTCTAATTGGAGAGGATGCAGGTTCTAATCCATATGGAGC 1250

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
TAACGGTTGTTTCAGACAGGGGATGCGATAATGGTACACTAGCAATGGGAT 1300

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
GGGGTTCTGGAACAGCTAACTTCCCATATTTAGTCACACCTGAACAGGCA 1350

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
ATTCTAATGAGGTCCTAANGAACAGAARTGGTGTCTTCACAGCTACAGA 1400

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
TAACTGGGCAATTGACCAGATCGAAGCTCTAGCAAGACAGCTTCTGTCT 1450

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
CATTAGTCTTCGTCATGCGATTTCTGGTGAAGGATATATTGACGTCGAT 1500

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
GGTAACCTAGGAGACAGGAGGAATTAACACTATGGAGGAAACGGTGATAA 1550

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
TGTCAATTAGGGCTGCAGCCTCTAACTGTAATAACACAATTGTCATCATTC 1600

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
ATTCAGTCGGTCCAGTCCTAGTCAATGAATGGTATGATAACCCCTAATGTC 1650

Contig_reverse_complement
GENE_SINTETICO
-----
ACAGCTATTCTATGGGGTGGATTACCAGGTCAGGAATCTGGAAATTCACT 1700

Contig_reverse_complement
-----

```

data:text/html;charset=utf-8,%3Cpre%20id%3D%22alignments%20center%22%20ml%3A%5B%3D%22%20viewer%22%20style%3D%22display%3A%20block