



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Química – IQ**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica –**  
**PPGTQB**

**Produção da proteína expansina BsEXLX1**  
*com *Komagataella pastoris**

**Renan Stefanini Lopes**

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.**  
**Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

**Brasília, fevereiro de 2017**

---

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Renan Stefanini Lopes**, matrícula nº **15/0102691**, intitulada ***“Produção da proteína expansiva BsEXLX1 com Komagataella pastoris”***, apresentada no (a) Auditório Lauro Morhy do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 17 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva  
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Talita Souza Carmo Membro Titular  
(IB/UnB)

Dr. Léia Cecília de Lima Fávaro  
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida  
Membro Suplente (Embrapa Agroenergia)

Em 17 de fevereiro de 2017.

**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Química – IQ**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica –**  
**PPGTQB**

# **Produção da proteína expansina BsEXLX1** **com *Komagataella pastoris***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologias Química e Biológica.

**Renan Stefanini Lopes**

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.**

**Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

**Brasília, fevereiro de 2017**

# Dedicatória

Nós podemos tornar mestres de nosso próprio destino através da prática da auto-disciplina e através do estabelecimento de metas dignas que vão nos levar a níveis mais altos para que possamos nos tornar o que nosso Pai Celestial quer que nos tornemos.

M. Russel Ballard

# Agradecimentos

Ao meu Mestre e Salvador, Jesus Cristo, pelo dom da vida, do intelecto e por ter deixado o exemplo de vida perfeito a ser seguido.

Ao meu pai Edmundo, por ter sido um grande exemplo em minha vida, que sempre me ajudou a aspirar por caminhos mais altos. Pelo sacrifício que sempre fez para garantir meus estudos e experiência profissional que me trouxeram até aqui.

A minha mãe Fátima pelo seu sacrifício, dedicação e orientação ética que sempre me deu. Por ter sempre sido um exemplo em minha vida em todos os aspectos, principalmente no espiritual.

A minha querida esposa Thânia pela sua dedicação, apoio, sacrifício e iniciativa que permitiu eu ingressar e terminar este programa. Pelo seu amor e dedicação a mim, a nossa filha e o bebê a caminho. Em especial pela sua determinação em me apoiar em todos os momentos e por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

A Universidade de Brasília, ao Instituto de Química e a Embrapa Agroenergia, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro permitindo a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Fabricio Machado Silva pela orientação, ensino, sugestão, apoio e encorajamento.

A Pesquisadora Dra. Sílvia Belém Gonçalves pela orientação, paciência, ensino, carinho e conselhos que têm me ajudado no meu amadurecimento profissional.

Aos analistas do laboratório, Thályta, Thaís e Agenor, pela ajuda e treinamento de uso dos equipamentos.

A meus amigos do laboratório LPB da Embrapa que ajudaram e me apoiaram durante os experimentos em especial a Kelly e a Fernanda na discussão de experimentos bem sucedidos relacionados a esse projeto.

A todos os meus amigos e familiares, que de alguma forma torceram e oraram por mim e aqueles que contribuíram para a conclusão desse mestrado.

# Resumo

O Brasil apresenta-se como um lugar favorável para a implementação de uma economia onde as principais fontes de energia e matérias-primas sejam de origem de processos renováveis. Para isso é necessário o melhor aproveitamento do chamado material lignocelulósico, que consiste na maior parte do material das plantas e que não é utilizado para a produção de alimento. A produção industrial de combustíveis vindo desse material tem se demonstrado um desafio por conta da estrutura complexa do material lignocelulósico. Nesse contexto as enzimas acessórias, como as expansinas, tem demonstrado grande potencial por apresentarem sinergismo com as enzimas celulasas usadas na conversão da celulose e hemicelulose em açúcares simples. Este trabalho tem como intuito o estudo da produção da proteína expansina de origem bacteriana BsEXLX1 usando o organismo hospedeiro *Komagataella pastoris* em biorreator de bancada. Inicialmente foram realizados experimentos com a *Pichia* para estudar o comportamento da levedura em um sistema fechado de biorreator, e observou-se os efeitos que a agitação, quantidade de inóculo e pH têm sobre o consumo de glicose e produção de biomassa e etanol. Com esse estudo ficou claro a relação do pH mais ácido com a alta produção de etanol e alto consumo de glicose, a relação entre a quantidade de inóculo e a produção de etanol mostrou-se diretamente proporcional. Com base nesses resultados foram elaborados dois planejamentos fatoriais completos  $2^5$  em Erlenmeyers com *Komagataella pastoris* para a produção da proteína expansina BsEXLX1. Mediu-se as quantidades de proteínas solúveis produzidas, assim como as taxas de crescimento em variadas concentrações de glicose, glicerol e metanol. Concluiu-se que a condição que promove a maior áreação em glicerol, com baixas concentrações de inoculo e metanol foram as ideais para a maior produção da proteína, chegando a 36% acima da média da produção.

# Abstract

Brazil is a favorable place for the implementation of an economy where its main energy and feedstock source originates from renewable sources. For this to be accomplished it needs to make better use of lignocellulosic materials that makes up most of plant matter and it is not used as food production. The industrial production of fuel that comes from this feedstock has been a challenge due to the complex structure of the lignocellulosic material. In this scenario, the accessory enzymes, such as expansins, have shown great potential for having synergism with cellulase enzymes used for the conversion of cellulose and hemicellulose into simple sugars. The goal of this dissertation is to study the production of the bacterial expansin protein BsEXLX1 using as host organism *Komagataella pastoris* in a benchtop bioreactor. Initially it was performed experiments with *Pichia* to study the behavior of the yeast in a closed bioreactor system, and it was monitored the effects of agitation, inoculum concentration and pH in the consumption of glucose, and production of biomass and ethanol. This study shows a connection between the higher acidic conditions and higher ethanol production. It also shows the connection between the amount of inoculum and the production of ethanol, which demonstrated to be directly proportional. From this data, two  $2^5$  complete factorial analysis were performed in Erlenmeyers with *K. pastoris* for the production of expansin protein BsEXLX1. The soluble proteins concentrations were measured alongside with yeast growth in various concentrations of glucose, glycerol and methanol. It was concluded that the condition with most aeration in glycerol, with low methanol and inoculum concentrations were the ideal for greater protein productions, reaching up to 36% higher production than the average.

# Sumário

<b>1 - Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contextualização.....	1
1.2 Objetivos gerais .....	2
1.2.1 Objetivos específicos .....	2
1.3 Estrutura da dissertação .....	2
<b>2 - Revisão bibliográfica</b> .....	<b>4</b>
2.1 Bioeconomia e o Proálcool .....	4
2.2 A biomassa lignocelulósica .....	5
2.2.1 Celulose.....	7
2.2.2 Hemicelulose .....	8
2.2.3 Pectina.....	8
2.2.4 Lignina .....	8
2.3 O etanol lignocelulósico .....	9
2.3.1 Pré-tratamento .....	10
2.3.2 Hidrólise.....	11
2.3.2.1 Hidrólise química .....	11
2.3.2.2 Hidrólise enzimática .....	12
2.4 As proteínas expansinas.....	15
2.5 Sistema recombinante .....	18
<b>3 - Materiais e métodos</b> .....	<b>21</b>
3.1 Materiais .....	21
3.1.1 Meios .....	21
3.1.2 Linhagem de levedura .....	22
3.1.3 Equipamentos.....	22
3.2 Métodos .....	23
3.2.1 Tabelas dos planejamentos fatoriais com as matrizes dos experimentos .....	23
3.2.2 Avaliação da influência dos principais parâmetros no crescimento da <i>Pichia</i> (Planejamento Fatorial 1).....	26
3.2.2.1 Correlação da massa de levedura com a densidade ótica. ....	26
3.2.2.2 Crescimento de pré-inóculo.....	27
3.2.2.3 Fermentação no biorreator com <i>Pichia stipitis</i> .....	27
3.2.3 Avaliação da influência dos principais parâmetros no crescimento da <i>K. pastoris</i> .....	28
3.2.3.1 Viabilidade dos clones da <i>K. pastoris</i> .....	28
3.2.3.1.1 Crescimento de pré-inóculo .....	28

3.2.3.1.2 Crescimento de biomassa.....	28
3.2.3.1.3 Indução .....	29
3.2.3.2 Planejamentos Experimentais 2 e 3 .....	30
3.2.3.2.1 Crescimento de pré-inóculo .....	30
3.2.3.2.2 Crescimento de biomassa.....	30
3.2.3.2.3 Indução.....	31
3.2.4 Determinação da concentração de produtos e substratos.....	31
3.2.4.1 Análise de HPLC .....	31
3.2.4.2 Precipitação proteica com TCA .....	32
3.2.4.3 Determinação de proteínas solúveis por Bradford.....	33
3.2.3.4 Eletroforese .....	34
<b>4 - Resultados e discussões .....</b>	<b>36</b>
4.1 Avaliação da influência dos principais parâmetros no crescimento da <i>Pichia</i> .....	36
4.1.2 Curva de crescimento para o planejamento experimental 1 .....	37
4.1.2.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na formação da biomassa .....	38
4.1.3 Análise do consumo da glicose via HPLC .....	40
4.1.4.1 Normalização dos dados do etanol .....	45
4.2 Viabilidade dos clones de <i>Komagataella pastoris</i> .....	52
4.2.1 Curva de crescimento do clone 13 da <i>K. pastoris</i> .....	52
4.2.2 Curva de crescimento do clone 18 da <i>K. pastoris</i> .....	53
4.2.3 Determinação das proteínas solúveis por Bradford .....	54
4.2.4 Avaliação das proteínas solúveis presentes no sobrenadante dos clones 13 e 18.....	55
4.3 Planejamento experimental com <i>Komagataella (Pichia) pastoris</i> .....	56
4.3.1 Planejamento experimental 2 com glicerol .....	56
4.3.1.1 Determinação das proteínas por Bradford nas fermentações com glicerol/metanol .....	65
4.3.1.2 Eletroforese das condições 2,3,6 e 7 .....	66
4.3.2 Planejamento experimental 3 com glicose.....	67
4.3.2.1 Determinação das proteínas por Bradford nas fermentações com glicose/metanol.....	76
4.3.2.2 Eletroforese das condições 2, 3, 4 e 5 .....	77
<b>5 - Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>79</b>
<b>6 -Referências.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo A- Gráficos da fase de indução do Planejamento 2 .....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo B- Gráficos da fase de indução do Planejamento 3 .....</b>	<b>88</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação artística da parede celular primaria baseado no observado nas escamas da cebola. (Adaptado de Cosgrove <sup>22</sup> ) .....	6
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediadas pelo Módulo de ligação ao carboidrato (CBM-sigla em inglês). (Adaptada de Zeng et al. <sup>30</sup> ). .....	13
<b>Figura 3:</b> Esquema da ação sinérgica das proteínas na hidrólise da celulose (Adaptada de Milanez et al. <sup>10</sup> ). .....	15
<b>Figura 4:</b> Estrutura da BsEXLX1 ligada a microfibrila de celulose. As regiões que controlam as interações com celulose e pectina estão em lados opostos do domínio D2. (Adaptada de Georgelis et al. <sup>55</sup> ) .....	17
<b>Figura 5:</b> Representação simplificada da metabolização do metanol dentro do peroxissoma da levedura <i>K. pastoris</i> . (Adaptada de Bawa et al. <sup>62</sup> ) .....	19
<b>Figura 6:</b> Gráfico de correlação do peso seco da levedura com a densidade Curva padrão para determinação da concentração de levedura. ....	26
<b>Figura 7:</b> Gráfico de correlação da absorbância com reagente de Bradford em relação concentração de BSA.....	33
<b>Figura 8:</b> Concentração de biomassa durante as fermentações realizadas por 40 horas em biorreator com <i>Pichia stipitis</i> .....	37
<b>Figura 9:</b> Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação ao consumo da biomassa (A) e Predição do modelo de regressão (B) para 40 horas de fermentação. ....	40
<b>Figura 10:</b> Gráfico do consumo de glicose ao longo das 40 horas de fermentação de todas as condições do planejamento experimental 1 com <i>Pichia stipitis</i> . ....	41
<b>Figura 11:</b> Diagramas de Pareto para efeitos normalizados com relação ao consumo de glicose das 12, 16, 28 e 40 horas de fermentação.....	42
<b>Figura 12:</b> Predição do modelo de regressão linear múltipla para consumo de glicose ao longo do tempo de fermentação.....	44
<b>Figura 13:</b> Produção normalizada de etanol das condições de fermentação do planejamento experimental 1 no biorreator organizadas em rotação de 70 rpm (A) e 330 rpm (B). ....	46
<b>Figura 14:</b> Produção normalizada de etanol das condições de fermentação do planejamento experimental 1 organizadas em pH = 4 (A) e pH = 6 (B). ....	47
<b>Figura 15:</b> Gráfico da produção normalizada de etanol em triplicata do ponto central do planejamento experimental 1. ....	48
<b>Figura 16:</b> Diagramas de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de etanol normalizado das 20, 24 36 e 40 horas de fermentação.....	49
<b>Figura 17:</b> Predição do modelo de regressão linear múltipla para a produção de etanol ao longo do tempo de fermentação.....	50
<b>Figura 18:</b> Medição de oxigênio dissolvido do meio YPD 5% em função de frequência de agitação específica do agitador ao longo de 40 horas. ....	51
<b>Figura 19:</b> Relação linear da dissolução do oxigênio em função da agitação durante a décima hora de medição. ....	52

<b>Figura 20:</b> Curva de crescimento das fermentações do clone 13. G1 representa glicerol 1%; G5 glicerol 5%; S glicose a 5% e posteriormente sorbitol a 1%. M representa metanol a 1% ou a 0,5%. .....	53
<b>Figura 21:</b> Curva de crescimento das fermentações do clone 18. G1 representa glicerol 1%; G5 glicerol 5%; S glicose a 5% e posteriormente sorbitol a 1%. M representa metanol a 1% ou a 0,5%. .....	54
<b>Figura 22:</b> Concentração de proteínas solúveis. Os números em frente referem-se ao clones 13 ou 18. G1 refere-se a glicerol 1%; G5 refere-se a glicerol 5%; S refere-se a glicose 5%. M1 refere-se a metanol 1%; M% refere-se a metanol 0,5%. .....	55
<b>Figura 23:</b> Gel SDS-PAGE das proteínas solúveis. Os números em frente referem-se ao clone. G1 refere-se a glicerol 1%; G5 refere-se a glicerol 5%; S refere-se a glicose 5%. M1 refere-se a metanol 1%; M% refere-se a metanol 0,5%. .....	56
<b>Figura 24:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase de crescimento em glicerol a 25 °C. O Gráfico (A) representa as condições com 3% de glicerol. O Gráfico (B) representa as condições com 7% de glicerol. ....	59
<b>Figura 25:</b> Concentrações de biomassa da <i>K. pastoris</i> em 30 °C durante a fase de crescimento em glicerol.....	62
<b>Figura 26:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> em 30 °C durante a fase de indução em metanol. ....	63
<b>Figura 27:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase crescimento com glicerol a 35 °C. O Gráfico (A) representa as condições com 3% de glicerol. O Gráfico (B) representa as condições com 7% de glicerol. ....	64
<b>Figura 28:</b> Concentração de proteínas solúveis das fermentações com glicerol durante a fase de crescimento. Os dados das condições centrais estão representados como “Cen” e os das demais condições como “C” numerado de acordo com a matriz de planejamento.....	66
<b>Figura 29:</b> Gel SDS-PAGE concentrado em 5X usando-se TCA. Foram analisadas as condições 2, 3, 6 e 7 da matriz de planejamento do experimento com glicerol. ....	67
<b>Figura 30:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase crescimento em glicose a 25°C.O Gráfico (A) representa as condições com 3% de glicose. O gráfico (B) representas as condições com 7% de glicose.....	69
<b>Figura 31:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase de crescimento do ponto central do Planejamento 3 feito em triplicata a 30°C com glicose a 5%. .....	73
<b>Figura 32:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase de indução na condição do ponto central do Planejamento 3.....	74
<b>Figura 33:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante as 24 horas da fase de crescimento com glicose em 35 °C. ....	75
<b>Figura 34:</b> Concentração de proteínas solúveis das fermentações com glicose durante a fase de crescimento. Os dados das condições centrais estão representados como “Cen” e os das demais condições como “C” numerado de acordo com a matriz de planejamento.....	77
<b>Figura 35:</b> Gel SDS-PAGE concentrado com TCA em 5X da condição 2, 3, 4 e 5 de glicerol. Condição 3 teve a maior expressão entre todas as condições. ....	78
<b>Figura 36:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase de indução por metanol a 25°C.....	86
<b>Figura 37:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante fase de indução por metanol a 35°C.....	87

<b>Figura 38:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase de indução por metanol a 25°C.....	88
<b>Figura 39:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase de indução por metanol a 25°C.....	89

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Planejamento fatorial completo das fermentações realizadas em biorreator com <i>Pichia stipitis</i> a 30°C .....	23
<b>Tabela 2:</b> Planejamento Experimental 2 com <i>K. pastoris</i> usando glicerol como fonte de carbono na fase de crescimento da levedura e metanol na fase de indução. ....	23
<b>Tabela 3:</b> Planejamento experimental 3 com <i>K. pastoris</i> usando glicose como fonte de carbono na fase de crescimento da levedura e metanol na fase de indução. ....	24
<b>Tabela 4:</b> Matriz de planejamento fatorial completo com cinco fatores dos planejamentos experimentais 2 e 3 com <i>K. pastoris</i> .....	25
<b>Tabela 5:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante indução por metanol após crescimento em glicose. ....	61
<b>Tabela 6:</b> Concentração de biomassa da <i>K. pastoris</i> durante a fase de indução por metanol após crescimento em glicerol. ....	71

## Lista de Abreviações e Acrônimos

ABS	Absorbância
AOX1	Álcool oxidase I
AOX2	Álcool oxidase II
atm	Atmosfera
BMGY	Tampão fosfato de potássio, YNB, Biotina e Glicerol
BMMY	Tampão fosfato de potássio, YNB, Biotina e Metanol
CB	Consumo de biomassa
CBM	Módulo de Ligação ao Carboidrato
CG	Concentração de glicose
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CH <sub>2</sub> O	Formaldeído
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSC	Complexo de síntese de celulose
DHA	Diidroxiacetona
DO	Oxigênio Dissolvido
EUA	Estados Unidos da América
G	Grama
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
<i>K. pastoris</i>	<i>Komagataella pastoris</i>
L	Litro
Mg	Milligrama
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OD	Densidade ótica
PE	Produção de etanol
<i>P. stipitis</i>	<i>Pichia Stipitis</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Eletroforese de gel de doecil-sulfato de sódio de poli(acrilamida)
TCA	Ácido tricloroacético
YNB	Base nitrogenada de levedura
YPD	Extrato de levedura, Peptona bacteriológica, Dextrose
YPG	Extrato de levedura, Peptona bacteriológica, Glicerol

# 1 - Introdução

## 1.1 Contextualização

O sistema de expressão *Komagataella (Pichia) pastoris* vem sendo comumente usado para a produção de vários tipos de proteínas recombinantes. Esse sistema de expressão é capaz de produzir grandes quantidades de proteínas com conformação adequada, fazendo as modificações pós-traducionais necessárias típicas das proteínas de origem eucarióticas. Essas modificações são possíveis por conta da maquinaria celular dessa levedura que, inclui a capacidade de glicosilação e formação de ligações dissulfídicas. A *K. pastoris* também combina a habilidade de crescer em meio mínimo com alta densidade celular e secretar prontamente a proteína de interesse, simplificando a sua purificação.<sup>1</sup>

No entanto a propriedade mais atrativa da *K. pastoris*, como organismo hospedeiro, é a existência de um promotor forte e com grau alto de regulação conhecido como Álcool Oxidase 1, ou PAOX1.<sup>2</sup> Álcool Oxidase é a primeira enzima responsável pela metabolização do metanol, transformando-o em formaldeído. Essa reação usa o oxigênio como receptor final de elétrons com a formação de peróxido de hidrogênio. A assimilação de carbono ocorre com o formaldeído formado pela oxidação do metanol, que é oxidado novamente até a formação de dióxido de carbono.<sup>3</sup>

Com essas características, a *K. pastoris* torna-se extremamente atrativa para a implementação na cadeia de produção de enzimas em nível industrial. Um dos mercados com maior potencial é o das proteínas acessórias para melhoramento da hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos para ampliação da produção do chamado Etanol 2G.

O etanol 2G tem sido uma das maiores promessas para a implementação da bioeconomia no Brasil, com a capacidade de dobrar a produção de álcool etílico no país. A tecnologia consiste na capacidade de transformar a matéria lignocelulósica em açúcar para a fermentação.

## 1.2 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo avaliar a produção da enzima expansina BsEXLX1 em biorreator de bancada usando como organismo hospedeiro *Komagataella pastoris*.

### 1.2.1 Objetivos específicos

- Determinar quais as melhores condições de agitação, pH, quantidade de substrato e de indutor obtém-se as maiores quantidades de proteínas recombinantes;
- Replicar a melhor condição observada no reator;
- Quantificar a taxa de crescimento, as taxas de conversão de substrato em células e em produto, e o rendimento dos processos fermentativos nos meios usados;
- Determinar a viabilidade das células após o término da fermentação para reciclo

## 1.3 Estrutura da dissertação

Essa dissertação está estruturada em 5 capítulos, incluindo este capítulo introdutório.

O Capítulo 2 é reservado à revisão bibliográfica, que descreve sobre a importância do etanol lignocelulósico para a economia brasileira, abordando o potencial que a produção alcoólica dessa fonte oferece. A revisão também descreve as propriedades e características dessa fonte de energia, e os desafios que existem para transformar a matéria lignocelulósica em açúcar. Em seguida, o capítulo de revisão explica sobre o papel que as enzimas acessórias, em especial as expansinas, têm na melhoria da eficiência na produção do etanol lignocelulósico. O texto de revisão foca em especial a proteína expansina BsEXLX1, e seu modo de ação que facilita o desempenho das enzimas celulasas.

No terceiro capítulo apresenta-se a parte experimental, o qual foi dividido

em 4 partes. A primeira parte constituiu-se em um planejamento experimental  $2^3$  no biorreator usando *Pichia* nativa para determinar seu comportamento em diversas condições de fermentação. Usou-se esses dados como parâmetros para a fermentação da *K. pastoris* que foi realizado na etapa seguinte.

Na segunda parte do experimento realizou-se fermentações para determinação dos melhores clones da *K. pastoris* transformada para expressão da proteína BsEXLX1 em Erlenmeyers. Os experimentos seguiram 2 planejamentos fatoriais completos  $2^5$  sendo cada um com uma fonte de carbono diferente. Este capítulo ainda contempla todas as metodologias empregadas para análise dos produtos obtidos em todos os experimentos realizados.

Ao final desse capítulo está descrito a metodologia empregada para os experimentos de produção da proteína BsEXLX1 em biorreator de bancada com condições baseadas nos resultados dos 2 planejamentos experimentais dos experimentos anteriores.

O quarto capítulo consiste na apresentação e discussão dos resultados observados nos experimentos. Neste capítulo exibem-se os gráficos com as respectivas curvas de crescimento e discute-se os efeitos que as variáveis estudadas exerceram sobre o crescimento das leveduras. No planejamento experimental 1 analisa-se também a produção de etanol e o consumo de glicose. Nos planejamentos experimentais 2 e 3, além do crescimento microbiano, quantifica-se também a produção da proteína expansina BsEXLX1. No experimento final, compara-se o crescimento e a produção de proteínas pela *K. pastoris* entre duas reações na mesma condição, sendo a segunda realizada com reciclo de células da primeira.

Por fim, no capítulo 5, analisou-se os dados para a conclusão final e elaboração de perspectivas futuras de pesquisa do trabalho.

## 2 - Revisão bibliográfica

### 2.1 Bioeconomia e o Proálcool

Nosso planeta está enfrentando um incrível desafio energético. O petróleo ainda é a principal fonte de energia e de matéria-prima para diversos setores da sociedade. No entanto, é continuamente explorado em regiões de conflitos políticos e militares, fazendo com que seu preço e oferta esteja sujeito a grandes variações trazendo instabilidade a economia mundial. Ainda há o agravante do aquecimento global, em que o CO<sub>2</sub> produzido durante a sua queima tem sido o principal responsável pelo aumento médio da temperatura global.<sup>4</sup>

Esse cenário criou uma espécie de corrida energética para a implementação de fontes alternativas de energia e matéria-prima que sejam renováveis, limpas e abundantes que possam substituir o petróleo com a principal fonte energética, de matéria-prima e de insumos.<sup>5</sup>

Uma das grandes promessas para alcançar esse objetivo, é a implementação da bioeconomia, a qual consiste em uma economia onde uma grande gama de produtos e serviços produzidos são derivados de fontes biológicas.<sup>6</sup> A bioeconomia engloba alternativas para tudo o que o petróleo é usado. Portanto plásticos, fármacos, combustíveis e variados tipos de manufaturas seriam provenientes de fontes biológicas.

O desenvolvimento da bioeconomia tem sido visto como fundamental para a transição para uma economia sustentável. Várias economias mundiais, incluindo os EUA e o Brasil, têm investindo em programas para a sua implementação.<sup>7</sup> No Brasil, pode-se dizer que a implementação da bioeconomia começou com o programa Proálcool, que buscou um combustível alternativo, que não fosse de origem fóssil, para enfrentar a alta do preço do petróleo e seus derivados, que na década de 80 chegava a ser 80% de origem estrangeira.<sup>8</sup> A partir da implementação do Proálcool, a produção de etanol saltou de 0,555 bilhões de litros no começo do programa para um pico de 30,1 bilhões de litros em 2015. Porém isso ainda representa menos da metade do combustível consumido por veículos leves, e em torno de 12% do total da matriz energética brasileira.<sup>9, 10</sup>

A mudança para uma bioeconomia requer uma participação muito maior do etanol na matriz energética, e para atingir isto, sem aumentar drasticamente a área cultivada, é necessária melhor utilização da biomassa produzida. As maiores mudanças tecnológicas estão ocorrendo através do desenvolvimento de novas linhagens através do melhoramento clássico, e mais recentemente da transgenia, que tem o potencial de melhorar o rendimento de produção da tonelada cana por hectare em até 56%.<sup>11</sup> Outra frente de inovação para o aumento da produtividade é o aproveitamento do bagaço e palhas, conhecido por biomassa lignocelulósica, para produção de açúcar, que pode ser usado para fermentação.<sup>12, 13</sup>

## 2.2 A biomassa lignocelulósica

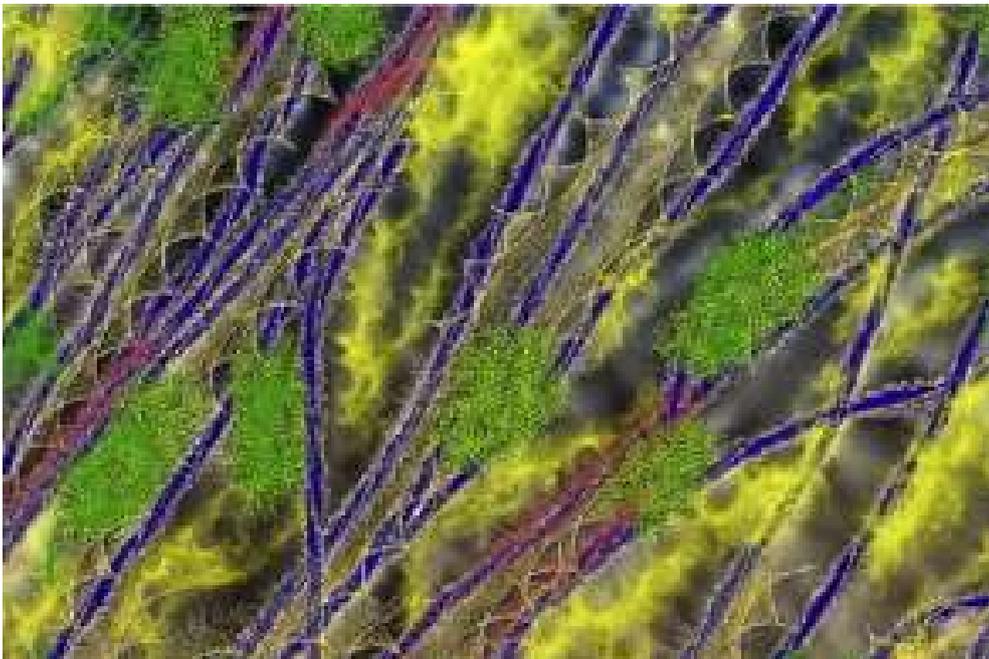
As plantas são formadas por cerca de 35 tipos de células, sendo cada tipo distinta em tamanho e forma.<sup>14</sup> Todas essas células ficam envoltas em uma parede celular, cuja a função é resistir ao estresse mecânico provocado pela pressão de turgor, e pelas interações com as células vizinhas, pois estas crescem diferentemente devido as suas peculiaridades.<sup>15</sup> Ao mesmo tempo em que a parede celular é extremamente forte, ela também tem que ser capaz de permitir o crescimento do vegetal e, portanto, se alargar.<sup>12, 15, 16</sup>

Por se estender por todo o tecido vegetal, a parede celular é o material mais abundante da planta, e portanto o principal constituinte da biomassa lignocelulósica.<sup>15</sup> Pela profusão e composição desse material, torna-se indispensável a sua inserção na cadeia produtiva da bioeconomia. A sua estrutura varia entre as diversas espécies de plantas, e até mesmo entre tecidos de um mesmo organismo. Contudo, em todas as suas formas, a celulose é um de seus principais componentes. A celulose encontra-se geralmente envolta numa matriz, que forma uma extensa cadeia que cerca e protege todas as células do tecido vegetal formando um estrutura extremamente complexa que dão a biomassa lignocelulósica propriedades recalcitrantes, tornando o material lignocelulósico resistente a degradação tanto química como biológica.<sup>17, 18</sup>

Por estar presente ao redor das células, a parede celular determina o seu tamanho e formato, funcionando como uma barreira mecânica que precisa ser vencida durante certas fases do ciclo de vida do vegetal, como o

crescimento celular e reprodução. Por causa disso a composição dessa parede é modulada de acordo com as necessidades fisiológicas do vegetal.<sup>19, 20</sup> No entanto, quando se é necessário uma mudança mais rápida em sua estrutura, existem um conjunto de proteínas que juntamente com alterações químicas no pH são capazes de alterar os padrões de ligação e interação dos componentes da parede celular.<sup>21</sup>

Existem duas principais variações da parede celular na planta conhecidas como parede celular primária e parede celular secundária. A parede celular primária encobre todas as células do tecido vegetal, sendo sintetizada assim que a divisão celular acontece. Esta constitui-se principalmente de celulose, que se encontra envolta de uma matriz de hemicelulose e pectina. A Figura 1 representa a matriz lignocelulósica da parede celular primária com as microfibras da celulose representadas em azul, com regiões em vermelho mostrando os lugares onde há interação entre as microfibras. Nessa figura a pectina está representada em amarelo e a hemicelulose em estruturas verdes ancoradas a sítios específicos nas microfibras.<sup>22</sup> Apesar dos principais componentes da parede celular primária serem bem compreendidos, a interação entre esses componentes durante sua extensão enquanto mantem sua rigidez física, ainda é um mistério, sendo alvo de várias pesquisas.<sup>22</sup>



**Figura 1:** Representação artística da parede celular primária baseado no observado nas escamas da cebola. (Adaptado de Cosgrove<sup>22</sup>)

Dependendo do tecido vegetal pode ocorrer a formação de uma parede celular secundária dentro da parede celular primária, através de uma grande deposição de celulose e hemicelulose e da secreção de monolignóis, que são precursores da lignina. A parede celular secundária é mais rígida por conta da substituição da pectina por lignina. É essa parede que forma o principal material oriundo da planta para a produção de energia, o chamado material lignocelulósico.<sup>20</sup>

O material lignocelulósico é composto de 35 a 50% de seu peso seco por celulose. A lignina chega a corresponder de 5 a mais de 40% do peso seco da planta, e a hemicelulose entre 20 a 35%.<sup>16</sup>

### 2.2.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo composto de monômeros de glicose ligados por uma ligação covalente  $\beta$ 1-4, formando um polímero. Esse polímero está entrelaçado de forma compacta e organizada para formar uma estrutura de microfibras cristalina em espiral que garantem força e flexibilidade ao material. Uma importante característica da celulose, quase que única entre os polissacarídeos, é a presença de regiões cristalinas, que corresponde a 80-95%, sendo o restante constituído por regiões amorfas.<sup>23</sup>

A celulose é sintetizada na natureza como cadeias lineares de resíduos glicosídicos pela enzima celulose-sintase. Esta enzima encontra-se na membrana celular formando complexos de síntese de celulose (CSC-sigla em inglês). Cada CSC é responsável pela síntese de uma microfibras de celulose, a qual é formada por aproximadamente 30 moléculas de celuloses individuais. Os conjuntos dessas microfibras formam as fibras de celulose.<sup>24-26</sup>

Essas fibras celulósicas são enrijecidas por ligações de hidrogênio, tanto entre a mesma fibra, como entre fibras adjacentes. Interações de van der Waals também contribuem para o aumento da estabilidade das microfibras, que embora individualmente tais interações sejam fracas, se tornam significativas pela dimensão das fibras.<sup>23, 24</sup> As propriedades recalcitrantes também são influenciadas pela interação das superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas com a matriz em volta que pode ser formadas por xiloglicanas, xilanas e lignina.<sup>22</sup>

## 2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos sintetizados dentro das células vegetais pelo complexo de Golgi, e secretados do citoplasma para integrar-se e associar-se com a superfície das microfibras da celulose através das interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio, formando uma matriz. Possuem alto grau de ramificação formando uma rede de interações que fortalecem e dão força mecânica as paredes celulares das plantas.<sup>27</sup>

As hemiceluloses pertencem a diversos grupos de polissacarídeos que são classificadas de acordo com os principais monossacarídeos que as formam. Os três principais tipos são: xilana (com ligação covalente  $\beta$ -1,4 D-xilose), manana (com ligação covalente  $\beta$ -1,4 D-manose) ou xiloglicanas (com ligação covalente  $\beta$ , 1-4 D-glicose).<sup>28</sup> As cadeias principais são ramificadas com cadeias curtas, podendo ser formadas por monômeros de D-galactose, D-xilose, L-arabinose e D-ácido glicurônico.<sup>19, 28</sup>

## 2.2.3 Pectina

As pectinas são polissacarídeos ácidos muito complexos, com estruturas principais ricas em ácido galacturônico. Elas são as macromoléculas mais abundante encontradas na matriz da parede celular primária, e também são abundantes na lamela entre as paredes celulares primárias, tendo função adesiva das células. No entanto, são praticamente inexistentes na parede celular secundária, sendo a única classe de polissacarídeos restritos a parede celular primária.<sup>29</sup>

## 2.2.4 Lignina

A lignina é um dos compostos mais abundantes na natureza, atrás somente da celulose. É constituído principalmente por 3 precursores monoméricos: Guaiacila, Siringila e *p*-hidroxibenzil unidas por um conjunto de ligações, principalmente ésteres e C-C.<sup>30</sup> Ela está presente nas paredes celulares secundárias, sendo responsável pelo apoio estrutural da planta, impermeabilidade e resistência a ataques de organismos.<sup>31</sup> No geral as gramíneas apresentam um dos conteúdos de lignina mais baixo, enquanto que

as coníferas possuem os mais altos.<sup>31</sup>

## 2.3 O etanol lignocelulósico

Atualmente, o maior uso para aproveitamento energético do material lignocelulósico tem sido a sua queima para produção de energia termoelétrica. No Brasil, estima-se que somente no caso da lavoura da cana-de-açúcar, a cada tonelada de cana processada, se obtém 280 quilos de biomassa lignocelulósica.<sup>32</sup> Considerando que para a safra de 2016/2017 tem-se a estimativa de 0,685 bilhões de toneladas de cana colhidas,<sup>33</sup> a quantidade de material lignocelulósico proveniente do bagaço da cana-de-açúcar foi em torno de 0,191 bilhões de toneladas. Além da grande oferta e pouca demanda, este é um material que não compete diretamente com a indústria de alimentos, não afetando o preço dos alimentos.<sup>34</sup>

No último relatório de acompanhamento da safra de cana-de-açúcar feito pela Conab em Agosto de 2016 estimou que a produção de etanol no Brasil será um pouco acima de 27,5 bilhões de litros até o final do primeiro trimestre de 2017.<sup>33</sup> Se o Brasil aproveitasse todo esse material lignocelulósico para a produção de etanol através da quebra de moléculas de celulose em moléculas de açúcar, atualmente a capacidade de produção seria de 0,140 bilhões de litros por safra e estima-se que até 2025 o Brasil teria capacidade de produzir até 10 bilhões de litros de etanol lignocelulósico.<sup>35</sup>

Esse cenário demonstra a importância e potencial que a implementação em escala industrial da próxima geração de produção do etanol, o chamado etanol 2G, possui. No entanto a tecnologia do etanol de segunda geração para tornar esse potencial em realidade ainda está sendo aprimorada, especialmente em nível industrial, o qual tem tido dificuldades em atingir níveis de produtividade aceitável.<sup>35</sup>

Para a produção do etanol 2G, o açúcar usado na fermentação é oriundo da biomassa lignocelulósica, um processo também conhecido como despolimerização ou sacarificação. Esse processo se dá por 2 etapas: pré-tratamento e hidrólise.

### 2.3.1 Pré-tratamento

O propósito do pré-tratamento é fazer a biomassa suscetível a hidrólise dos polissacarídeos para açúcar fermentáveis. Isso se dá através da desconstrução das barreiras químicas e físicas do material através da quebra da estrutura da lignina e do arranjo cristalino da celulose, a fim de diminuir a recalcitrância da biomassa. Existem três abordagens empregadas para a realização da desconstrução do material lignocelulósico: física, química e biológica e a combinação entre eles.<sup>30, 36</sup>

As operações físicas são baseadas na redução do tamanho das partículas através de moagem e a redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose. Porém, o conteúdo de hemicelulose e lignina da biomassa permanece o mesmo após o tratamento.<sup>36</sup>

Os principais métodos aplicados são os químicos, que envolvem tratamentos ácidos, básicos ou oxidativos. Em tratamentos com ácidos concentrado, a hemicelulose é hidrolisada. Pode-se também usar ácidos diluídos com temperaturas variando entre 160 a 180°C.<sup>37</sup> A lignina porém não é removida, embora ela sofra uma mudança estrutural. Esse método requer equipamentos resistentes à corrosão, o que eleva o custo de operação desse processo.

Existe também os tratamentos básicos com hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio. Em ambos os métodos a lignina é removida e a hemicelulose é significativamente hidrolisada. A maior desvantagem ocorre na dificuldade da recuperação dos reagentes básicos usados.

Outro método muito utilizado é a explosão a vapor, o qual consiste em aquecer a biomassa a uma temperatura de até 290°C por um curto período de tempo e depois libera-se a pressão de forma explosiva.<sup>38</sup> A eficiência desse método depende de vários fatores como temperatura, tempo de residência do material no reator, tamanho das partículas e teor de umidade.<sup>39</sup>

*Organosolv* é o processo de extração da lignina usando solventes orgânicos ou suas soluções aquosas. Algumas de suas vantagens incluem: Fácil recuperação de solvente por destilação e reciclagem; lignina é isolada como material sólido e os carboidratos como melaço. No entanto este método ainda é muito caro para sua implementação industrial.<sup>40</sup>

Por fim, existem os métodos biológicos de pré-tratamento, os quais se baseiam em reações biológicas catalisadas por enzimas. Esse método possui alta especificidade com o substrato, baixo consumo de energia por utilizar condições brandas de temperatura e pressão e pouca emissão de poluentes. A grande desvantagem são longos períodos de residência no reator e o alto custo das enzimas.<sup>41</sup> Alguns dos organismos promissores para este tipo de pré-tratamento são os fungos lignolíticos, actinomicetos e bactérias.<sup>42</sup>

### 2.3.2 Hidrólise

O processo de hidrólise consiste na despolimerização da fração da celulose em açúcares simples, que então podem ser fermentados por microrganismos e o etanol possa ser produzido. As duas principais formas de se hidrolisar a biomassa são através dos métodos químicos ou biológicos.

#### 2.3.2.1 Hidrólise química

Muitos dos pré-tratamentos químicos utilizados no material lignocelulósico tem a capacidade de hidrolisar com certo grau a celulose e a hemicelulose. Alguns exemplos são os pré-tratamentos ácidos e básicos que hidrolisam a hemicelulose significativamente. Porém, a celulose com sua estrutura cristalina tem baixo grau de despolimerização durante os tratamentos.<sup>36</sup> Para se atingir níveis de sacarificação da celulose aceitáveis usando métodos químicos é necessário o uso de condições mais extremas.<sup>31</sup> A hidrólise química da celulose com ácido diluído, cuja concentração varia de 2 a 5%, ocorre em temperatura entre 160 a 230 °C com uma pressão em torno de 10 atm. Mesmo assim a maioria dos processos com ácido diluído não conseguem superar 50% de eficiência quando considerados a subsequente fermentação para a conversão do produto final, o etanol. Isso se deve ao fato de após a formação de açúcar, ocorrem reações secundárias com as moléculas de açúcar formado. Estes compostos químicos formados, furfural em sua maior parte, além de diminuir o total de açúcar recuperado, também inibem a fermentação alcoólica.<sup>13</sup>

Uma alternativa é o uso de ácido concentrado em temperaturas mais

brandas de até 100 °C, fazendo com que a degradação dos açúcares formados seja minimizada, resultando em uma eficiência de até 90% tanto para a hemicelulose quanto para a celulose. No entanto, este método é mais lento em relação a hidrólise com ácido diluído e a recuperação ácida ainda não é eficiente, fazendo que sua operação seja cara.<sup>13</sup>

### 2.3.2.2 Hidrólise enzimática

Outra forma de se realizar a hidrólise da celulose é através do uso de enzimas capazes de degradá-la. A esse processo dá-se o nome de hidrólise enzimática, e ocorre em condições muito mais brandas que as condições de hidrólise ácida, além de não requerer o uso de equipamentos caros capazes de suportar os efeitos de corrosão dos ácidos.<sup>38</sup> A hidrólise enzimática também tem a vantagem de não produzir inibidores da fermentação.

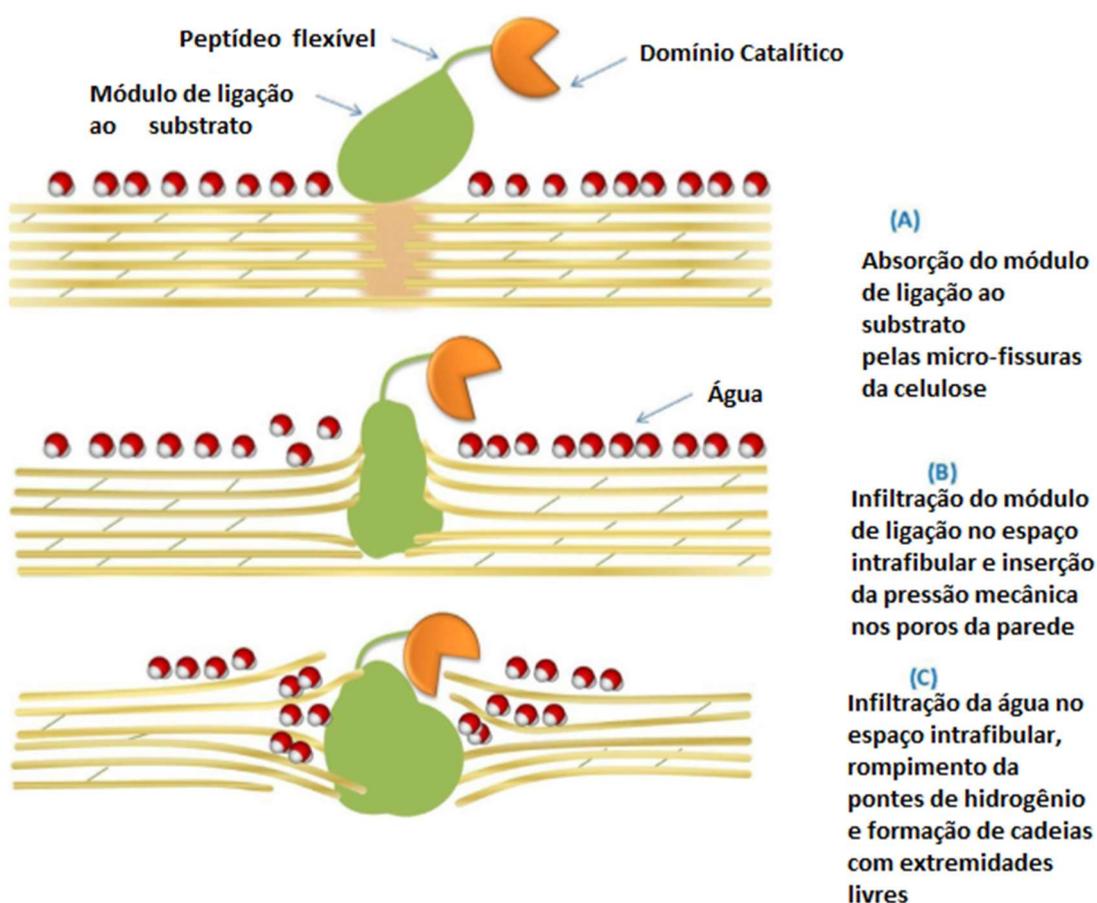
Existem diversos microrganismos na natureza que são capazes de produzir as enzimas que hidrolisam o material lignocelulósico. Normalmente, estes microrganismos atuam de forma conjunta, produzindo um coquetel de enzimas para a hidrólise completa da biomassa.<sup>43</sup>

O fungo filamentosso *Trichoderma reesei* é amplamente empregado para a produção de enzimas capazes de hidrolisar a celulose, as quais são denominadas de celulases. O potencial que esse fungo tem para a degradação da celulose é conhecido desde a Segunda Guerra Mundial, quando descobriu-se que ele era responsável pela degradação do algodão presente no uniforme do exército dos EUA.<sup>44</sup>

Nos fungos, a conversão da celulose nativa para glicólise e outros açúcares simples se dá principalmente por meio de diferentes tipos de enzimas celulases das famílias endoglicanase, celobiohidrolase e  $\beta$ -glicosidase.<sup>16, 44</sup>

As celobiohidrolases (CBH), também conhecidas por exoglicanases ou exocelulases, hidrolisam as fibras cristalinas de celulose a partir das extremidades redutoras e não-redutoras, liberando celobiose e em menor grau glicose.<sup>44</sup> As endoglicanases são responsáveis pela quebra das ligações  $\beta$ -glicosídicas de forma aleatória nas regiões amorfas da celulose, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas extremidades para serem hidrolisadas.<sup>45</sup>

Muitas das enzimas que atuam sobre as fibras de celulose possuem dois módulos distintos denominados de módulo catalítico e módulo de ligação ao carboidrato. Estes são ligados um no outro por meio de uma cadeia peptídica flexível. O módulo de ligação ao substrato interage com as fibras de celulose agindo de modo seletivo, permitindo que o domínio catalítico tenha maior interatividade com a celulose. O módulo de ligação pode também interagir com fibras causando mudanças estruturais através do rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibras, como mostrado na Figura 2. Esse processo é conhecido como amorfogênese.<sup>46</sup>



**Figura 2:** Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediadas pelo Módulo de ligação ao carboidrato (CBM-sigla em inglês). (Adaptada de Zeng et al.<sup>30</sup>).

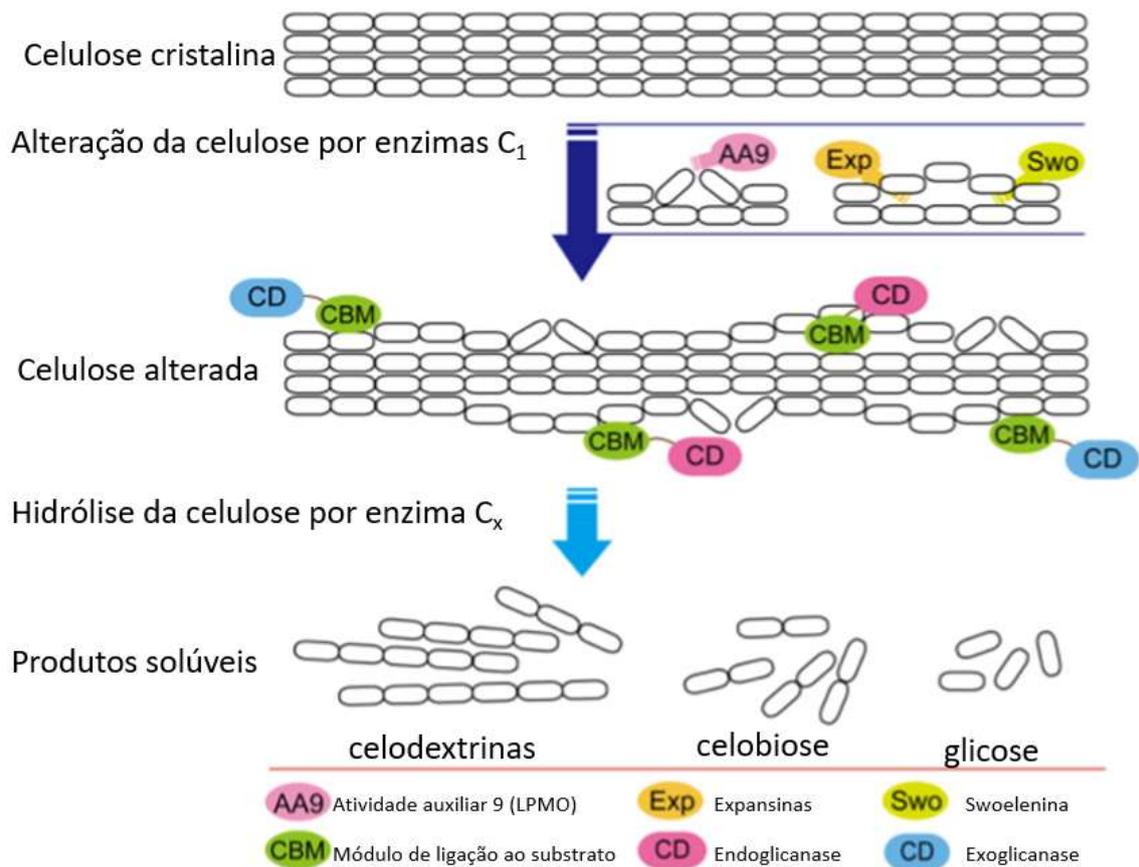
Por fim as  $\beta$ -glicosidase são responsáveis por hidrolisar a celobiose e outros oligossacarídeos de cadeias curtas em glicose.<sup>44, 45</sup>

A atuação conjunta das celobiohidrolase e endoglicanase caracteriza-se por ser uma interação sinérgica, onde a soma das atividades enzimáticas

individuais das enzimas é menor do que quando elas atuam juntas em um mesmo substrato.<sup>47</sup>

De fato, o sinergismo existente entre enzimas, principalmente no coquetel vindo do fungo *Trichoderma reesei*, vem sendo observado há algum tempo. Gillian *et al.*<sup>48</sup> foi um dos primeiros a observar esta interação sinérgica que os coquetéis enzimáticos possuem. Embora ele desconhecesse as enzimas e a maneira pela qual elas atuavam, conseguiu-se descrever um modelo que ficou conhecido com C<sub>1</sub>-C<sub>x</sub>. A Figura 3 apresenta um esquema dessa interação sinérgica, de acordo com pesquisas mais recentes. C<sub>x</sub> se refere às enzimas responsáveis pela hidrólise da ligação glicosídica presente na celulose. O fator C<sub>1</sub> refere-se às enzimas acessórias que facilitam para que a hidrólise da celulose ocorra, as chamadas enzimas acessórias.<sup>48, 49</sup> Desde a sua concepção, o fator C<sub>1</sub> tem sido elucidado por meio da descoberta de novas enzimas acessórias que atuam de forma semelhante, mas que não necessariamente fazem parte do coquetel vindo do fungo *Trichoderma reesei*. Dentre essas proteínas, as expansinas têm sido uma das classes mais proeminentes.<sup>50</sup>

As expansinas foram descobertas nas plantas durante o estudo do crescimento ácido. Elas são responsáveis pelo afrouxamento e expansão da parede celular durante o aumento da parede celular.<sup>51</sup>



**Figura 3:** Esquema da ação sinérgica das proteínas na hidrólise da celulose (Adaptada de Milanez et al.<sup>10</sup>).

## 2.4 As proteínas expansinas

As expansinas são proteínas extracelulares encontradas na parede celular de quase todas as plantas terrestres com tamanho aproximado de 26 kDa.<sup>52</sup> Elas são responsáveis pela indução da extensão das paredes celulares primárias durante o crescimento ácido, resultando em um afrouxamento da matriz lignocelulósica.<sup>17, 53</sup>

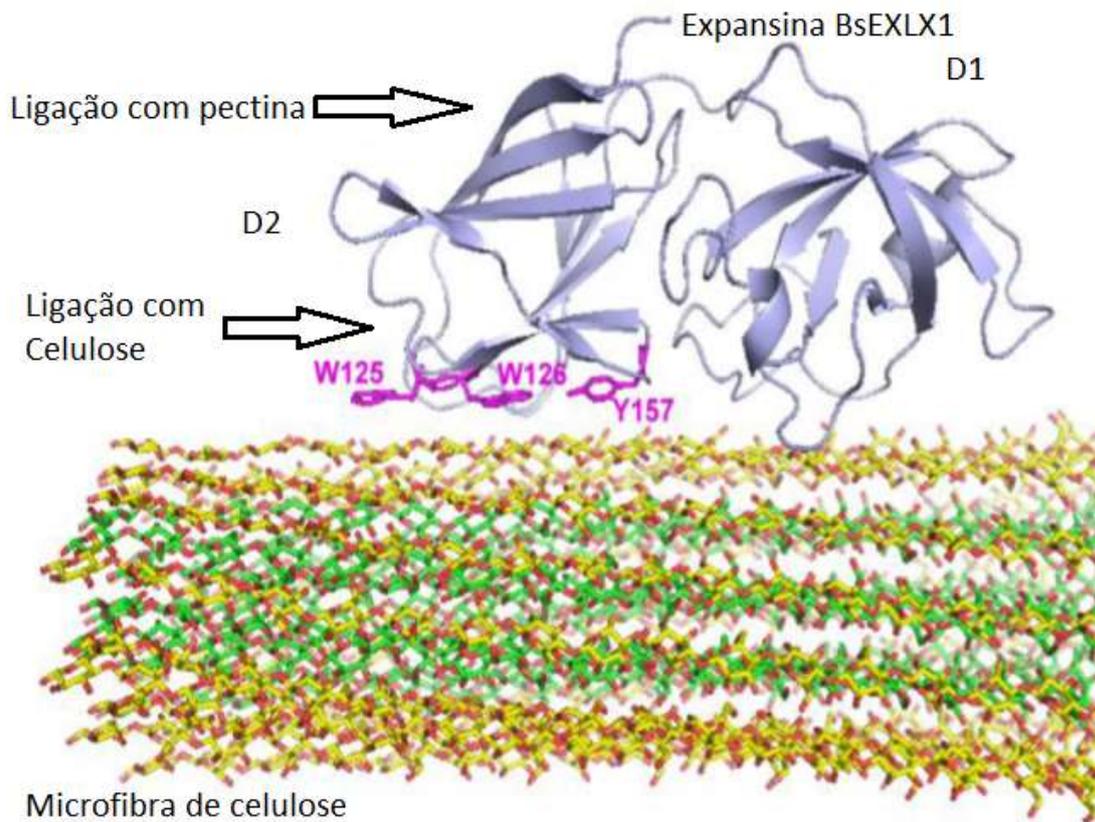
Foi em tecidos de sementes vegetais presentes durante o crescimento de plantas dicotiledóneas que observou-se a presença dessas enzimas não catalíticas que induziam a expansão da parede celular durante o crescimento vegetal.<sup>51</sup> Além do crescimento elas também atuam no amadurecimento das frutas, desenvolvimento de folhas, reprodução da planta e desconstrução da parede celular, sendo portanto de presença universal no reino vegetal.<sup>54</sup>

Elas estão classificadas baseadas na sua sequência filogenética e

atualmente, a família das proteínas expansinas está bem definida e se constitui nas superfamílias  $\alpha$ -expansinas e  $\beta$ -expansinas. As  $\alpha$ -expansinas são mediadoras do afrouxamento da parede celular durante o crescimento ácido das plantas, enquanto que a família das  $\beta$ -expansinas estão relacionadas ao grupo 1 de proteínas alérgicas do pólen da grama, os quais são responsáveis por facilitar a penetração do pólen no estigma através da dissolução da laméla média, que são constituídas por hemicelulose e pectina.<sup>55, 56</sup>

As expansinas oriundas das plantas tipicamente possuem dois domínios. O domínio N-terminal, denominado de D1, possui certa semelhança com as endoglicanases de origem bacteriana, com estrutura semelhante ao da família 45 das hidrolases de glicosídeos.<sup>55</sup> No entanto esse domínio não possui atividade catalítica característica dessa família de hidrolases.

O domínio C-terminal presente nas expansinas, denominado D2, possui forma de sanduíche  $\beta$ , semelhante a família 26 dos módulos de ligação a carboidratos.<sup>57</sup> A superfície aberta dos dois domínios é ideal para interações com polissacarídeos, porém essa interação acontece predominantemente com o domínio D2, como pode-se observar na Figura 4.



**Figura 4:** Estrutura da BsEXLX1 ligada a microfibrila de celulose. As regiões que controlam as interações com celulose e pectina estão em lados opostos do domínio D2. (Adaptada de Georgelis et al.<sup>55</sup>)

As plantas também possuem no genoma proteínas homólogas as expansinas e a essas foram classificadas como expansina-like A, expansina-like B de acordo com a família com que se assemelham.<sup>58</sup>

Petrella *et al.* descreveu a existência de uma proteína expansina vinda da bactéria *Bacillus subtilis*, nomeada de BsEXLX1. Esta enzima possui uma estrutura semelhante aos das expansinas encontradas em plantas com os dois domínios característicos das expansinas. A estrutura dessa enzima forma uma superfície aberta ideal para interação com polissacarídeos lineares, como a celulose, sendo estruturalmente homóloga ao das expansinas encontradas no pólen do milho e na grama *Phelum pratense*, ambas pertencentes a família  $\beta$ -expansina as quais possuem maior seletividade na expansão do material lignocelulósico encontrados nas gramíneas.<sup>58, 59</sup>

A enzima expansina mostrou-se essencial para a capacidade que bactéria *Bacillus subtilis* tem de colonizar as raízes das plantas, e portanto, acredita-se que uma das funções da proteína expansina seja de facilitar a

interação bactéria-planta.<sup>59</sup>

No final da década de 90 descobriu-se que as expansinas possuíam sinergismo com as celulasas, e a partir daí percebeu-se o imenso potencial que essas classes de proteínas tinham na desconstrução das matérias lignocelulósicas.<sup>60</sup> Porém a produção das enzimas tem se demonstrado um grande desafio pelo fato das enzimas oriundas de plantas não serem expressas facilmente em sistemas recombinantes. Por isso, o descobrimento das expansinas que não eram de origem botânica foi um grande divisor de águas nas pesquisas das mesmas, pelo fato delas serem expressas com menor dificuldade.<sup>55</sup>

## 2.5 Sistema recombinante

A levedura *Komagataella pastoris* é um dos sistemas de expressão mais proeminentes sendo empregado na produção de proteína heterólogas. Algumas de suas principais vantagens são:

- Simplicidade para sua manipulação genética com protocolos bem estabelecidos<sup>61</sup>
- Forte promotor induzível para controle da produção da proteína recombinante<sup>61; 62</sup>
- Capacidade da levedura de crescer em altas concentrações de densidade na cultura, chegando a passar dos 150 g de peso seco por litro<sup>61</sup>
- Grande capacidade excretória de proteínas heterólogas<sup>61</sup>
- Capacidade de crescer em meios minerais salinos com excreção de poucas proteínas endógenas<sup>61</sup>

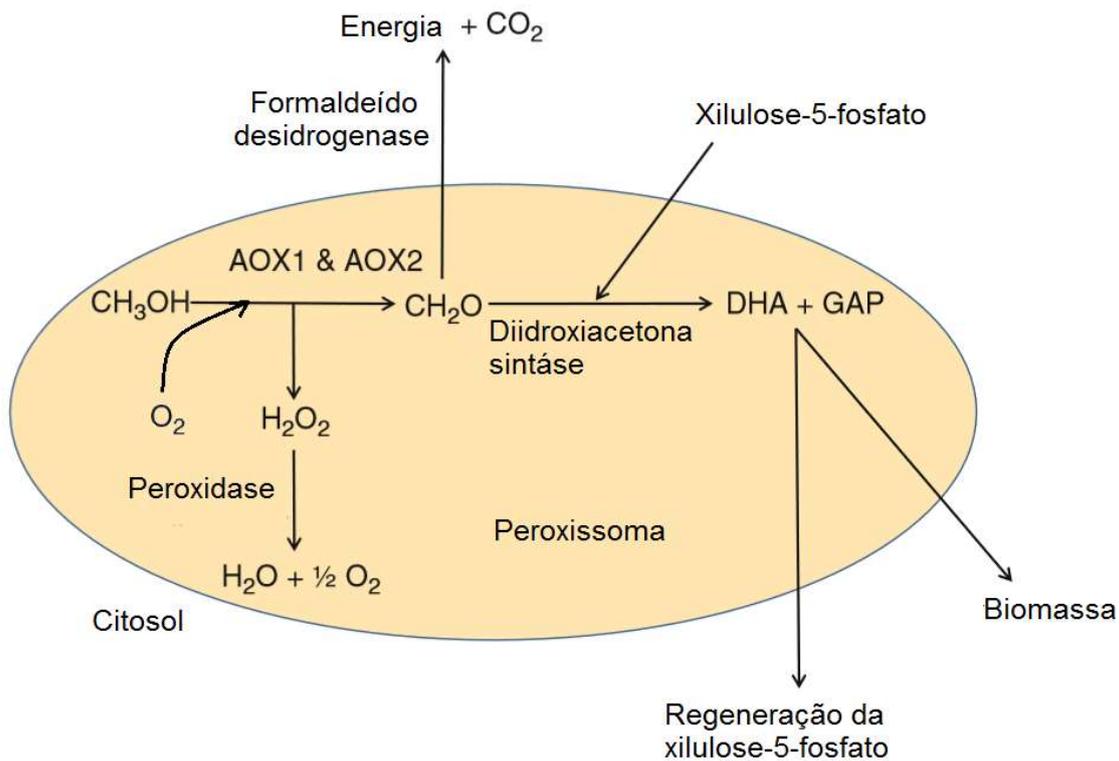
As técnicas e protocolos da *K. pastoris* para manipulação genética são derivadas da *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é um dos sistemas de expressão mais bem caracterizados. As linhagens da *K. pastoris* estão disponíveis como kits comerciais, portanto, sua implementação como sistema de expressão tende a ser mais direta e simples.<sup>61</sup>

Esse sistema de expressão é constituído principalmente pela expressão

de um conjunto de enzimas responsáveis pela metabolização do metanol. A maioria dessas enzimas só são atuantes na presença do metanol, incluindo a principal enzima responsável pela oxidação do metanol em formaldeído, conhecida como álcool oxidase.

Existem dois genes que codificam para proteína álcool oxidase, o gene AOX1 e o AOX2. O AOX1 é responsável pela maior parte da atividade da enzima álcool oxidase, chegando a ser responsável por mais de 90% da produção da enzima. Esses genes são fortemente regulados por um sistema de repressão e indução, no qual depende da presença de metanol e ausência de qualquer forma repressora de carbono, notavelmente glicose ou glicerol.<sup>3</sup>

A reação ocorre dentro de uma organela conhecida por peroxissoma e gera peróxido de hidrogênio, que é tóxica a levedura e rapidamente catalisada pelas enzimas catalases em água e oxigênio molecular, como representado na Figura 5.<sup>62</sup>



**Figura 5:** Representação simplificada da metabolização do metanol dentro do peroxissoma da levedura *K. pastoris*. (Adaptada de Bawa et al.<sup>62</sup>)

O formaldeído gerado entra em uma rota dissimilatória para gerar energia através da oxidação até formiato e dióxido de carbono, gerando NADH. O formaldeído restante é condensado com xilulose-5-fosfato para a formação de

gliceraldeído-3-fosfato e diidróxidoacetona que deixam a peroxissoma para a rota cíclica citoplasmática responsável pela formação de gliceraldeído-3-fosfato, que é um composto central em muitas rotas metabólicas responsáveis pelo crescimento celular.<sup>3</sup>

*K. pastoris* é geralmente cultivada em meio com concentrações não limitantes de glicerol ou glicose para ganho de biomassa enquanto que reprime a expressão do gene recombinante. Essa fase é seguida por uma fase de indução com quantidades limitantes de metanol. Glicerol é geralmente o substrato escolhido por não reprimir a expressão do promotor e pela não expressão dos genes AOX1, enquanto que a glicose reprime essa expressão, mesmo na presença de metanol.<sup>62</sup>

Algumas das desvantagens em se usar esse sistema de expressão é o fato de metanol não ser facilmente mensurável durante a fermentação, por ser inflamável dificultando o armazenamento de grandes quantidades para alimentação na fermentação.<sup>63</sup>

## 3 - Materiais e métodos

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Meios

##### Preparo do meio YPD 5%:

Para o crescimento de biomassa utilizou-se o meio YPD com 1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica e 5% de glicose.

##### Preparo do meio BYPD 3%, 5% e 7%:

Para o crescimento de biomassa utilizou-se o meio BYPD com 1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica e 3%, 5% ou 7% de glicose em tampão de citrato/ácido cítrico 0,1M com os pHs de acordo a condição estudada no planejamento experimental.

##### Preparo do meio YPG 5%:

Para o crescimento de biomassa utilizou-se o meio BYPD com 1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotina e 5% de glicerol em água destilada.

##### Preparo do meio BYPG 3%, 5% e 7%:

Para o crescimento de biomassa utilizou-se o meio BYPD com 1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotina e 3%, 5% ou 7% de glicerol em tampão de citrato/ácido cítrico 0,1M com os pHs de acordo a condição estudada no planejamento experimental.

##### Preparo do meio BMMY 0,5%, 0,75% e 1,0%:

Para a fase de indução utilizou-se o meio BMMY com 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotina e metanol (0,5%; 0,75% ou 1,0%) em tampão 0,1 M de citrato e ácido cítrico com os respectivos pHs das condições.

### 3.1.2 Linhagem de levedura

A linhagem X-33 da levedura *Komagataella pastoris* foi clonada com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A com gene heterólogo BsEXLX1 pelos colaboradores da Embrapa Agroenergia.

### 3.1.3 Equipamentos

Equipamentos utilizados nas análises e procedimentos:

- ✓ Espectrofotômetro Multimodal com absorvância UV/VIS, marca Molecular Devices, modelo Spectramax.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, marca Agilent, modelo 1260 Infinity. Coluna Aminex HPX-87H e detector índice de refração. Fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M, vazão de 0,6 mL/min, e temperatura de 45 °C.
- ✓ Shaker orbital de bancada com incubação e refrigeração, marca Thermo Scientific, modelo Max 4000.
- ✓ Biorreator de bancada, marca New Brunswick, modelo Bioflo/Celligen 115 Benchtop 1,3 L.
- ✓ Capela de fluxo laminar, marca FilterFLux, modelo FLV960/4.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para frascos de 250 mL, marca ThermoScientific, modelo Megafuge40R.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para tubos Eppendorf, marca Herme Labortechnik, modelo Z326K.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para tubos Falcon, marca MPW MED Instruments, modelo MPW-352R.
- ✓ Microscópio Trinocular, marca BelPhotonics.
- ✓ Autoclave Vertical, marca Primatec, modelo CS capacidade 100 L.
- ✓ Estufa Incubadora, marca Quimis, modelo Q315M25.
- ✓ Sistema de eletroforese, marca GE Life Sciences, modelo Amersham ECL Gel Box.
- ✓ pHmetro, marca MetroHM, modelo 827 pH Lab.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Tabelas dos planejamentos fatoriais com as matrizes dos experimentos

As condições das fermentações foram executadas seguindo planejamentos experimentais para a análise de significância dos efeitos estudados.

**Tabela 1:** Planejamento fatorial completo das fermentações realizadas em biorreator com *Pichia stipitis* a 30°C

Fatores	(-)	(0)	(+)
<b>X<sub>1</sub>: Frequência de Agitação (rpm)</b>	70	200	330
<b>X<sub>2</sub>: Concentração Inóculo/Açúcar (%)</b>	5	12,5	20
<b>X<sub>3</sub>: pH</b>	4	5	6
<b>Experimento</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	+	-	-
<b>3</b>	-	+	-
<b>4</b>	+	+	-
<b>5</b>	-	-	+
<b>6</b>	+	-	+
<b>7</b>	-	+	+
<b>8</b>	+	+	+
<b>9</b>	0	0	0
<b>10</b>	0	0	0
<b>11</b>	0	0	0

**Tabela 2:** Planejamento Experimental 2 com *K. pastoris* usando glicerol como fonte de carbono na fase de crescimento da levedura e metanol na fase de indução.

Fatores	(-)	(0)	(+)
<b>X<sub>1</sub>: pH</b>	4	5	6
<b>X<sub>2</sub>: Concentração da Fonte de Carbono (%)</b>	3	5	7
<b>X<sub>3</sub>: Volume (mL)</b>	25	50	75
<b>X<sub>4</sub>: Met-OH (%)</b>	0,5	0,75	1,0
<b>X<sub>5</sub>: Temperatura (C)</b>	25	30	35

**Tabela 3:** Planejamento experimental 3 com *K. pastoris* usando glicose como fonte de carbono na fase de crescimento da levedura e metanol na fase de indução.

<b>Fatores</b>	<b>(-)</b>	<b>(0)</b>	<b>(+)</b>
<b>X<sub>1</sub>: pH</b>	4	5	6
<b>X<sub>2</sub>: Concentração da Fonte de Carbono (%)</b>	3	5	7
<b>X<sub>3</sub>: Volume (mL)</b>	25	50	75
<b>X<sub>4</sub>: Met-OH (%)</b>	0,5	0,75	1,0
<b>X<sub>5</sub>: Temperatura (°C)</b>	25	30	35

**Tabela 4:** Matriz de planejamento fatorial completo com cinco fatores dos planejamentos experimentais 2 e 3 com *K. pastoris*

Condições	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	-
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	-
11	-	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	-
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	-
17	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	+
19	-	+	-	-	+
20	+	+	-	-	+
21	-	-	+	-	+
22	+	-	+	-	+
23	-	+	+	-	+
24	+	+	+	-	+
25	-	-	-	+	+
26	+	-	-	+	+
27	-	+	-	+	+
28	+	+	-	+	+
29	-	-	+	+	+
30	+	-	+	+	+
31	-	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
Cen1	0	0	0	0	0
Cen2	0	0	0	0	0
Cen3	0	0	0	0	0

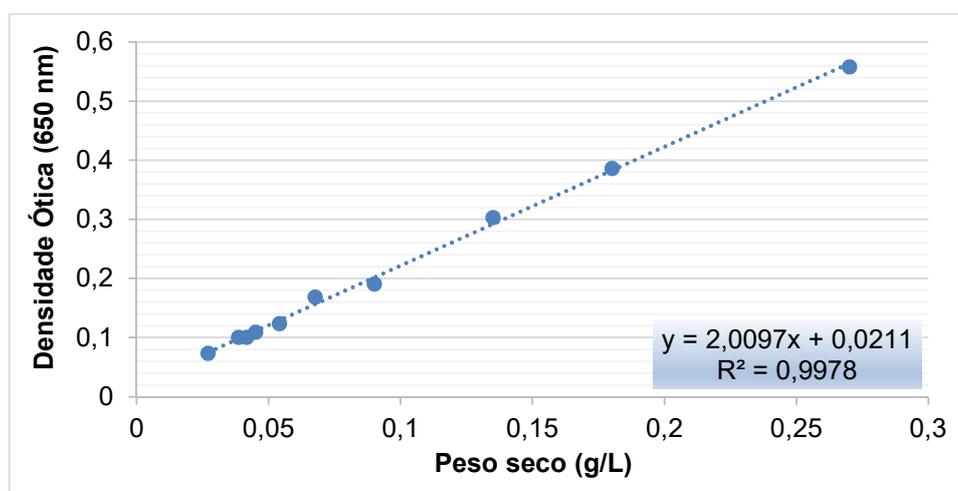
### 3.2.2 Avaliação da influência dos principais parâmetros no crescimento da *Pichia* (Planejamento Fatorial 1)

#### 3.2.2.1 Correlação da massa de levedura com a densidade ótica.

Com o objetivo de poder determinar a concentração de levedura durante a fermentação, e dessa forma medir as taxas de crescimento, fez-se uma curva de calibração entre a leitura ótica do espectrofotômetro e a concentração de leveduras na cultura, através da medição do peso seco.

Para o cálculo do peso seco retirou-se 30 mL da cultura do pré-inóculo e centrifugou-se a 10000 RPM a 4°C por 5 minutos. Ao término da centrifugação, suspendeu-se as leveduras em água destilada e repetiu-se a centrifugação por mais 2 vezes. Ao término da última centrifugação, colocou-se 10 mL da cultura com levedura e água em um prato Petri de vidro. Fez-se isso em triplicata e deixou-os secando a 70°C até obtenção de peso constante. A Figura 6 mostra a relação obtida entre a medição peso seco medido e a densidade ótica medida em diferentes concentrações.

Ao longo da realização dos experimentos a curva de calibração era feita novamente para verificar eventuais mudanças significativas no comportamento da correlação entre a biomassa de levedura e a densidade ótica, observando-se que a relação permanecia constante, uma vez que a equação da reta apresentava o coeficiente angular e a constante de valores com pequenas variações na terceira casa decimal (dados não apresentados).



**Figura 6:** Gráfico de correlação do peso seco da levedura com a densidade Curva padrão para determinação da concentração de levedura.

### 3.2.2.2 Crescimento de pré-inóculo

Pesou-se na balança, em um béquer de 250 mL as concentrações a quantidade necessária de extrato de levedura para concentração de 1% e de peptona bacteriológica de 2% nos meios YPD. A solução foi dissolvida em água destilada e homogeneizada com barra magnética e transferida para uma proveta de 1 L onde se completou para o volume desejado com glicose dissolvidos para YPD 5%. Completou-se o volume da proveta com água destilada até 400 mL. Se fez 4 alíquotas de 100 mL em 4 Erlenmeyers de 500 ml e depois colocado para autoclavar por 20 min juntamente com uma alça de inoculação.

Os Erlenmeyers contendo o meio autoclavado, foram inoculados dentro do fluxo laminar usando *Pichia stipitis* para o planejamento experimental 1 ou *Komagataella pastoris* geneticamente modificada para os demais experimentos, todos mantidos em Agar. Os frascos foram então colocados para incubar no shaker a 170 rpm e 30 °C por 24 horas para cultura com YPD.

Após o crescimento do inóculo fez-se a viabilidade de cada uma das culturas em duplicata, utilizando um fator de diluição 1:100. Quantificou-se no mínimo 200 células em cada uma das contagens feitas na Câmara de Neubauer, dividindo-se o número de células vivas sobre o total de células contadas. A determinação da viabilidade da célula foi feita baseada na coloração rosada das células mortas em solução de eritrosina.

### 3.2.2.3 Fermentação no biorreator com *Pichia stipitis*

Com a OD medida, calculou-se através do uso da curva de calibração a quantidade de inóculo para as diferentes concentrações em relação a 5% de taxa de fonte de carbono em 500 mL de meio. Transferiu-se então essa quantidade para frascos de centrifugação de 250 mL e os centrifugou a 4700 RPM por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e suspendeu em, 500 mL no meio YP preparado com metanol. Dentro do fluxo laminar transferiu a cultura para o biorreator.

Programou o biorreator para 30 °C e rotação de acordo com a condição a ser analisada do planejamento 1. Manteve-se registro de pH e controle do pH

com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio a 1M. Foram ao todo 40 horas de fermentação, recolhendo pontos para amostra a cada 4 horas e em seguida adicionando.

### 3.2.3 Avaliação da influência dos principais parâmetros no crescimento da *K. pastoris*

#### 3.2.3.1 Viabilidade dos clones da *K. pastoris*

A primeira etapa constituiu em averiguar os resultados de expressão do clone recebido, para se ter certeza de que estes tinham a capacidade de expressar a proteína recombinante BsEXLX1. Realizou-se a fermentação seguindo o manual do kit EasySelect Pichia Expression. Foram entregues dois clones (13 e 18) que obtiveram as melhores taxas de expressão da proteína recombinante. Além do meio usado para a expressão na clonagem, fez-se a fermentação usando YPD.

Para determinar a viabilidade desses clones, foi executada 6 fermentações com cada um dos clones entregues pela equipe do LGB da Embrapa Agroenergia. Ao todo foram executadas 12 fermentações nesse experimento.

Cada fermentação foi executada em três partes: crescimento do pré-inóculo, crescimento da biomassa e indução por metanol. Para o crescimento do pré-inóculo usou-se YPD 5%, já relatado o modo de preparo. Para o crescimento de biomassa utilizou-se um dos seguintes meios: YPD 5%, BMGY 1% ou BMGY 5%. A etapa da indução foi realizada com 2 diferentes concentrações de metanol em BMMY: 0,5% ou 1,0%.

##### 3.2.3.1.1 Crescimento de pré-inóculo

Repetiu-se o preparo de pré-inóculo feito anteriormente, adaptando o volume do pré-inóculo para 1,5 L suficiente para 12 fermentações em Erlenmeyers.

##### 3.2.3.1.2 Crescimento de biomassa

O crescimento foi realizado em 6 frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo em 30 °C e 250 rpm. Para o Crescimento foram utilizados 3 meios diferentes: BMGY 1%, BMGY 5% e YPD 5%, sendo que esse último também teve um período de condicionamento de 12 horas com sorbitol 1% devido à forte ação repressora que a glicose tem na metabolização do metanol.

A quantidade de biomassa inoculada foi fixa para todas as três condições, sendo 5% de levedura em relação a fonte de carbono de 5% no meio. Em seguida calculou-se a quantidade de inóculo necessária através da leitura de OD a 650 nm e a curva padrão do peso seco.

Em seguida centrifugou-se a quantidade necessária de cada inóculo a 4700 rpm por 10 minutos em tubos Falcon de 50 mL. Descartou-se o sobrenadante e suspendeu os pellets em 50 mL do meio a ser fermentado. Frascos foram colados no shaker que já estava condicionado em 30 °C sob uma rotação de 250 rpm.

### 3.2.3.1.3 Indução

Após 24 horas de crescimento, as 6 culturas de cada clone foram transferidas, dentro da capela, para frascos de centrifuga estéreis de 250 mL e centrifugados a 4700 rpm por 10 minutos. Na capela, descartou-se o sobrenadante e suspendeu os pellets em meio fresco.

Os 4 frascos contendo BMGY foram suspensos em BMMY com concentrações de 0,5% ou de 1%. Ou seja, um dos frascos com BMGY 1% foi suspenso com BMMY 0,5% e o outro com BMMY 1%. O mesmo fez-se com BMGY 5% para ambos os clones.

Para as culturas que cresceram com YPD 5%, a suspensão foi feita com 50 mL de YP Sorbitol 1%, em ambos os clones, e deixadas fermentando por 12 horas. Só então adicionou-se a essas culturas, dentro da capela, as respectivas concentrações de metanol de 0,5% ou de 1%. Amostras foram coletadas a cada 24 h após a adição de metanol, com total de 48 horas de indução para cada cultura.

### 3.2.3.2 Planejamentos Experimentais 2 e 3

#### 3.2.3.2.1 Crescimento de pré-inóculo

Repetiu-se o modo de preparo do pré-inóculo feito anteriormente, mudando apenas para YPG 5% as condições com glicerol. No meio YPG adicionou-se biotina 1,34% de YNB sem aminoácidos e  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina.

#### 3.2.3.2.2 Crescimento de biomassa

Após o crescimento do inóculo fez-se a viabilidade de cada uma das culturas em duplicata, utilizando um fator de diluição 1:100. Quantificou-se no mínimo 200 células em cada uma das contagens feitas na Câmara de Neubauer, dividindo-se o número de células vivas sobre o total de células contadas. A determinação da viabilidade da célula foi feita baseada na coloração rosada das células mortas em solução de eritrosina.

Para o inóculo, primeiramente calculou-se a quantidade de leveduras nas culturas via espectrofotometria. Retirou-se, dentro do fluxo laminar, 3 amostras de 1 mL do pré-inoculo, e diluiu-as em 5 mL de água cada uma, obtendo-se uma triplicata de diluição 1:6. Fez-se uma diluição em série de 1:6 dessas amostras em outros 3 tubos de ensaio, obtendo-se no final 3 amostras diluídas a 1:36.

Fez-se a análise da OD dessas 3 amostras a 650 nm no espectrofotômetro. Substituiu a média obtida dessas 3 leituras na equação da curva de calibração do peso seco para obtenção da concentração de leveduras. Multiplicou-se esse valor pela taxa de diluição e pela quantidade em litros do pré-inoculo para obtenção da concentração de leveduras no meio em gramas por litro. Multiplicou-se essa concentração pela taxa de viabilidade calculas anteriormente para determinar a concentração de células viáveis.

A quantidade de inóculo era baseada na concentração da fonte de carbono no meio. Esse cálculo era feito através de uma regra de 3 simples, sendo a concentração do inóculo 12,5% em relação a quantidade da fonte de carbono, que variava entre 3%, 5% e 7% do volume do meio.

Dentro do fluxo laminar, distribui-se a quantidade de inóculo necessária em tubos Falcon de 50 mL estéreis, e os centrifugava a 4700 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante, e suspendeu os

pellets no meio a ser fermentado, transferindo-os a frascos Erlenmeyers de 250 mL previamente autoclavados. Retirou-se aproximadamente 1 ml de amostra na 0, 2, 4 e 24 horas para medição de OD e quantidade de proteínas solúveis no sobrenadante.

Após 24 horas de fermentação, dentro do fluxo laminar, transferiu-se a cultura para um tubo de centrifugação de 250 mL e a centrifugou a 4700 rpm. Descartou-se o sobrenadante e suspendeu o pellet em BMMY 0,5% ou 1%, de acordo com a condição do planejamento.

### 3.2.3.2.3 Indução

As condições de temperatura, pH, agitação e volume do meio eram idênticas as realizadas durante a fase de crescimento de biomassa. Retirou-se aproximadamente 1 mL de amostras a cada 24 horas a partir do início da Indução, que foi realizada por 48 horas no total.

### 3.2.4 Determinação da concentração de produtos e substratos

Para todos os experimentos utilizou-se os métodos de precipitação proteica, Bradford e SDS-PAGE para a quantificação e qualificação das proteínas expansina expressa.

#### 3.2.4.1 Análise de HPLC

Preparou-se as amostras das condições para serem analisadas em HPLC a fim de determinar a concentração exata de Etanol e Glicose nos sobrenadantes congelados.

Para a curva padrão (dado não mostrado) pesou-se em um béquer de 10 mL, uma solução padrão de Etanol e Glicose. Foram pesados 0,132 g de Glicose Padrão na balança. Dilui-se a Glicose em aproximadamente 10 mL de água Milli-Q e transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 25 mL. Para a obtenção da quantidade de Etanol necessária para a concentração de 5 g/L, assumiu-se a densidade do etanol em  $0,790 \text{ g/cm}^3$  a 99,5% de pureza. Dividindo o peso de interesse 0,125g de Etanol pela densidade obtém-se o volume necessário, que é de 158  $\mu\text{L}$ . Na capela, adicionou-se então 158  $\mu\text{L}$ ,

usando uma micropipeta P200, de Etanol Padrão a 99,5% de pureza e adicionou à solução de glicose no balão. Completou-se o volume do balão em 25 mL com água Milli-Q.

Separou-se 6 tubos de ensaios para diluição em série, enfileirando-os em um suporte para tubos de ensaio. A partir do segundo tubo de ensaio adicionou-se 2 mL de água Milli-Q. Colocou-se 2 mL da solução padrão no primeiro tubo vazio, e 2 mL de solução padrão no segundo tubo que continha 2 mL de água Milli-Q. A partir desse segundo tubo, tirou-se 2 mL da solução e colocou-a no tubo adjacente, onde se homogeneizou com a água presente. Então, 2 mL da solução no tubo homogeneizado era transferido para o tubo adjacente seguinte e o processo era repetido até o último tubo, onde esse terminava com 4 mL de solução.

Descongelou-se as amostras dos sobrenadantes das condições 9 e 12 a serem analisadas e adicionou-se 100 µL para os respectivos vials de HPLC. Em cada vial adicionou-se 900 µL de água Milli-Q, tendo dessa forma diluído cada amostra em 10 vezes, afim de que as concentrações de leitura no HPLC estejam dentro dos parâmetros medidos na curva de calibração.

#### 3.2.4.2 Precipitação proteica com TCA

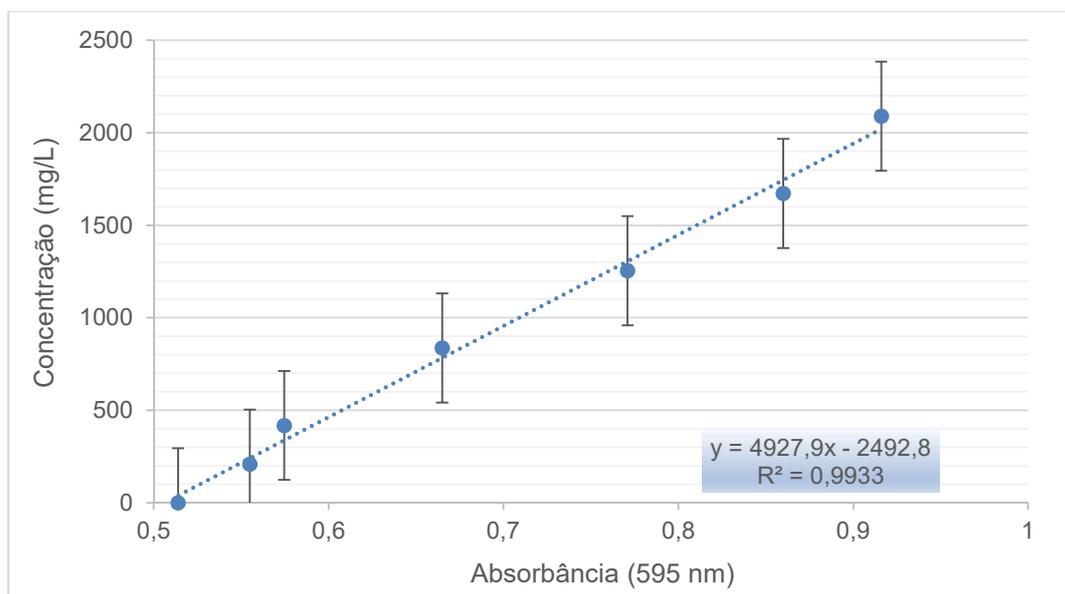
Adicionou solução TCA em amostra equivalente a 10% nas amostras. Para isso, transferiu-se 300 µL das amostras em um tubo Eppendorf diferente e adicionou-se 33,3 µL de TCA.

Homogeneizou-se amostras invertendo com vortex de bancada e colocou amostras no banho de gelo por 1 hora. Após o banho, centrifugou-as por 15 minutos a 14000 rpm na centrífuga a 4 °C.

Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de Acetona PA. Homogeneizou-se as amostras invertendo 3 vezes e centrifugou as novamente na centrífuga por 15 minutos a 14000 rpm. Repetiu essa etapa por mais 2 vezes. Deixou amostras secando por 30 minutos e suspendeu em 100 µL em tampão citrato preparado para análise por Bradford.

### 3.2.4.3 Determinação de proteínas solúveis por Bradford

Utilizou-se a curva padrão da Figura 7 para a determinação da concentração proteica.



**Figura 7:** Gráfico de correlação da absorbância com reagente de Bradford em relação concentração de BSA.

#### Preparo solução citrato de sódio 0,1 mol/L:

Em um béquer de 250 mL, na balança pesou-se 14,705 g de Citrato de sódio e dilui-se em aproximadamente 200 ml de água Milli-Q. Transferiu-se solução para uma proveta de 500 mL e completou-se o volume em 500 mL com água Milli-Q.

#### Preparo solução de ácido cítrico 0,1 mol/L:

Em um béquer de 250 mL, na balança pesou-se 10,507 g de ácido cítrico. Dilui-se em aproximadamente 200 mL de água Milli-Q sob agitação magnética. Transferiu-se a solução para uma proveta de 500 mL e completou-se o volume para 500 mL com água Milli-Q.

#### Preparo tampão citrato de sódio/ ácido cítrico pH 5,0:

Transferiu-se toda a solução de citrato de sódio para um béquer de 1 L e sob agitação magnética foi-se adicionando ácido cítrico até obter-se leitura do

pH = 5,00 usando o pHmetro. Transferiu-se solução para um frasco reagente de 1 L e armazenou-se a 4 °C.

Em uma placa de ELISA adicionou-se em triplicata 5 µL de amostras com tampão de citrato e 250 µL de reagente Bradford da marca Sigma Life Sciences. Após 10 minutos da adição do reagente, mediu-se a OD de cada pocinho a 595 nm no espectrofotômetro.

### 3.2.3.4 Eletroforese

#### Preparo de Tampão de amostra:

Pesou-se na balança analítica 0,02 g de azul de bromofenol. Adicionou-se 1 mL do tampão Tris-Base, 4 mL de SDS 10% e 2,5 mL de glicerol 80%, 160 µL de β-mercaptoetanol.

#### Preparo de solução corante Coomassie R-250:

Em um béquer de 50 mL pesou-se 1 g de azul de coomassie R-250 na balança. Dissolveu, usando uma barra magnética, em 50 mL de água. Dentro da capela, transferiu-se para uma proveta de 100 mL e completou o volume em 100 mL com água destilada.

#### Preparo de solução de fixação:

Em uma proveta de 500 mL adicionou-se 200 mL de etanol 98%; 50 mL de ácido acético e completou-se o volume a 500 mL com água destilada e transferiu-se para um frasco reagente de 500 mL.

#### Preparo de solução de descoloração:

Em uma proveta de 500 mL adicionou-se 125 mL de etanol 98% 40 mL de ácido acético e completou-se o volume a 500 mL com água destilada e transferiu-se para um frasco reagente de 500 mL.

Retirou-se o gel da marca GE de 15 poços e gradiente 4-12% da geladeira e lavou-o com água destilada para a remoção do excesso de tampão.

Com os 25 µL de amostras restantes, fez-se a análise qualitativa da expressão das proteínas via SDS-PAGE. Adicionou-se 25 µL de tampão de amostra contendo azul de Coomassie e colocou amostra em banho com água fervente por 5 minutos. Adicionou 20 µL de cada amostra no gel de eletroforese. Ajustou caixa de força para 160 Volts por aproximadamente 70 minutos.

Após o término da eletroforese, lavou-se o gel para tirar o excesso de tampão com água destilada e submergiu-o na solução fixadora dentro de um Tupperware e deixou 30 min sob agitação de 50 rpm. Descartou-se solução fixadora, e adicionou-se solução corante azul de Coomassie por 10 min sob agitação de 50 rpm no shaker. Em seguida, descartou-se solução corante e adicionou-se solução de descoloração e deixou no shaker a 50 rpm até a atingir descoloração ideal do gel.

## 4 - Resultados e discussões

### 4.1 Avaliação da influência dos principais parâmetros no crescimento da *Pichia*

O planejamento experimental 1 foi feito utilizando variáveis que podem ser expressivas para a determinação tanto do crescimento da *Pichia* como da produção de biomoléculas. O planejamento fatorial completo  $2^3$  com réplicas no ponto central é empregado para a determinação de quais fatores afetam de forma significativa o crescimento e a fermentação como um todo.

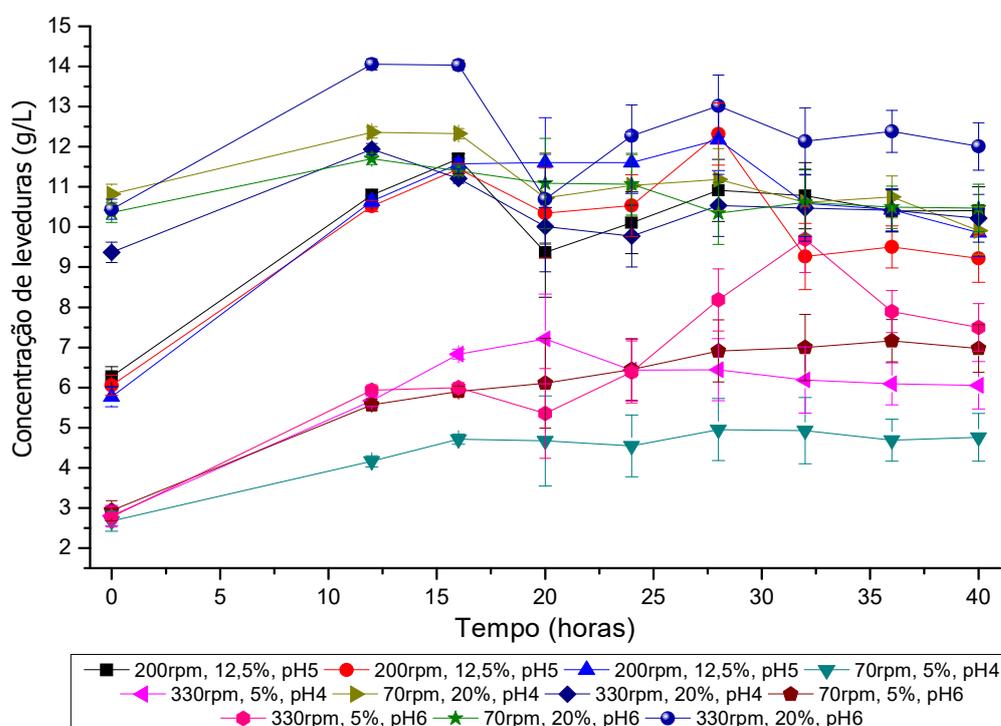
Os resultados dos experimentos realizados com base neste planejamento de experimentos serão utilizados para subsidiar as tomadas de decisões em relação as condições de fermentação para a produção da proteína expansina que será sintetizada pelo microrganismo hospedeiro. Os ensaios foram conduzidos com *Pichia stipitis* devido a indisponibilidade da *Komagataella pastoris* (N. B. a transformação da *Komagataella pastoris* ocorria ao mesmo tempo em que estes experimentos foram realizados).

Os 3 fatores estudados foram pH, oxigenação/agitação e concentração de inóculo, e as condições experimentais com as respectivas interações dos fatores são encontradas na Tabela 1. Esses fatores foram escolhidos de acordo com o observado e são os mais propícios a afetarem o crescimento e a viabilidade da *Pichia* em um sistema fechado de fermentação.<sup>64</sup> Apesar de temperatura ser um fator importante, este fator será estudado com outras interações já na linhagem da *K. pastoris* X-33 posteriormente.

As fermentações foram realizadas em um biorreator utilizando-se 500 mL de YPD 10% como meio de cultura, seguindo o procedimento experimental descrito no Capítulo 3. Este planejamento contempla também uma triplicata no ponto central para a determinação do erro experimental e avaliação do efeito não-linear de curvatura (contribuição quadrática no ponto central do plano experimental).

#### 4.1.2 Curva de crescimento para o planejamento experimental 1

Os resultados obtidos para o crescimento celular, que estão apresentados na Figura 8, apresentaram seu maior crescimento até as 12 horas de fermentação, possivelmente devido a limitação de .



**Figura 8:** Concentração de biomassa durante as fermentações realizadas por 40 horas em biorreator com *Pichia stipitis*.

Pode-se observar que as culturas com as condições centrais com 12,5% de inóculo atingiram a mesma concentração de levedura que as condições que foram inoculadas com 20%. Houve também um declínio menor da concentração ao longo do tempo após essas culturas terem atingido o pico, que foi em torno de 16 horas de fermentação. Esse declínio pode ser devido a morte celular

acontecendo após o consumo total da glicose, significando que as culturas do ponto central têm o potencial de estarem mais viáveis ao reciclo.<sup>2</sup> O reciclo é uma técnica amplamente usada em processos industriais de fermentação para obtenção de maiores concentrações celulares e maiores quantidades de biomoléculas. Esse processo, também conhecido na indústria como Melle-Boinot, consiste na recuperação das leveduras através da centrifugação e reuso como inóculo da próxima fermentação.<sup>65</sup>

#### 4.1.2.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na formação da biomassa

A avaliação da significância dos efeitos (pH, oxigenação/agitação e concentração de inóculo) foi realizada com base em análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa da StatSoft Statistica 10. A Figura 9A apresenta o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à biomassa, considerando o ponto equivalente a 40 h de fermentação. Todos os valores a direita de “p” (critério de significância estatística que indica a magnitude mínima para que um efeito seja considerado significativo) são maiores que o erro padrão, ou seja, significativos. O teste ANOVA mostrou 96,7% de confiabilidade que somente o efeito 2 (concentração de inóculo) é significativo para a concentração de biomassa. O nível de confiança para essas análises foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

Durante toda a fermentação, a única variável que apareceu como significativa, ou seja, aquele que influencia mais na concentração de biomassa, foi a concentração de inóculo. Esse fator apresenta um valor positivo, que significa que quanto maior a concentração inicial de inóculo, maior foi a concentração final de leveduras.

Os dados experimentais obtidos com base no planejamento fatorial podem ser descritos por um modelo de regressão linear múltipla que leva em consideração as variáveis de processo, representado genericamente pela Equação 1.

$$y_j = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_{ji} + \varepsilon_j \quad j = 1, 2, \dots, n \quad (1)$$

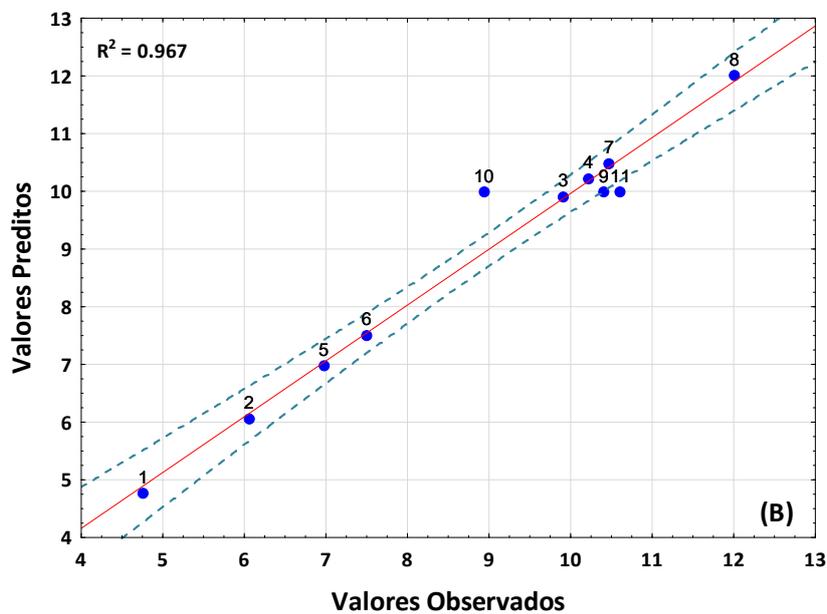
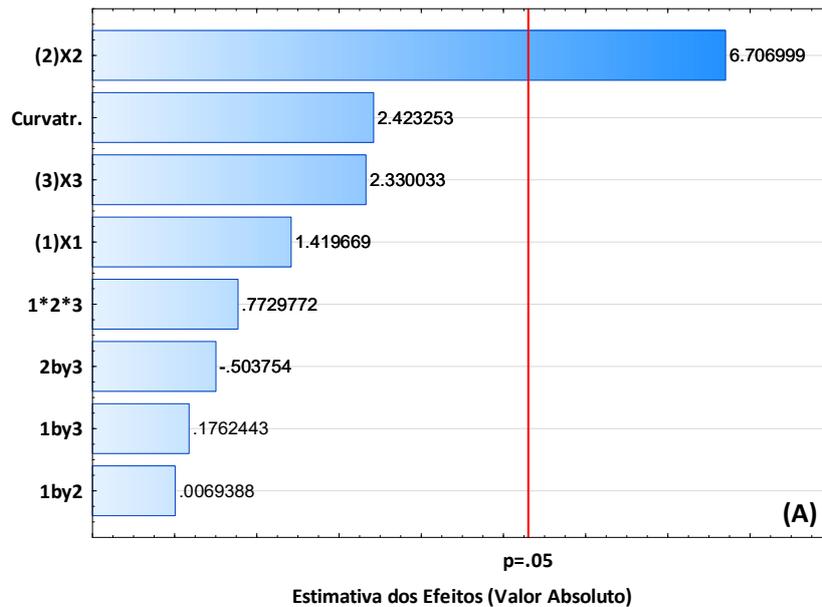
onde,  $y_j$  representa as variáveis dependentes (resposta) na condição experimental  $j$ ,  $b_i$  ( $i = 0, 1, \dots, k$ ) são os coeficientes de regressão linear,  $x_{ji}$  são as variáveis independentes onde  $\varepsilon_i$  é o erro associado a cada condição experimental  $j$ .

Desta forma, os coeficientes de regressão  $b_i$  foram estimados com base no método dos mínimos quadrados, cuja função objetivo a ser minimizada pode ser expressa de acordo com a Equação 2.

$$\mathfrak{S} = \sum_{i=1}^n \varepsilon^2 = \sum_{i=1}^n \left( y_j - b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_{ji} \right)^2 \quad (2)$$

A Figura 9B mostra a capacidade de predição do modelo com relação ao consumo de biomassa (CB). Observa-se que o modelo linear descreve bem os dados experimentais. Se considerarmos apenas o efeito dominante (concentração de inóculo), o modelo de regressão pode ser expresso como:

$$CB = 8.49 + 2.16 \cdot X_2 \quad (3)$$

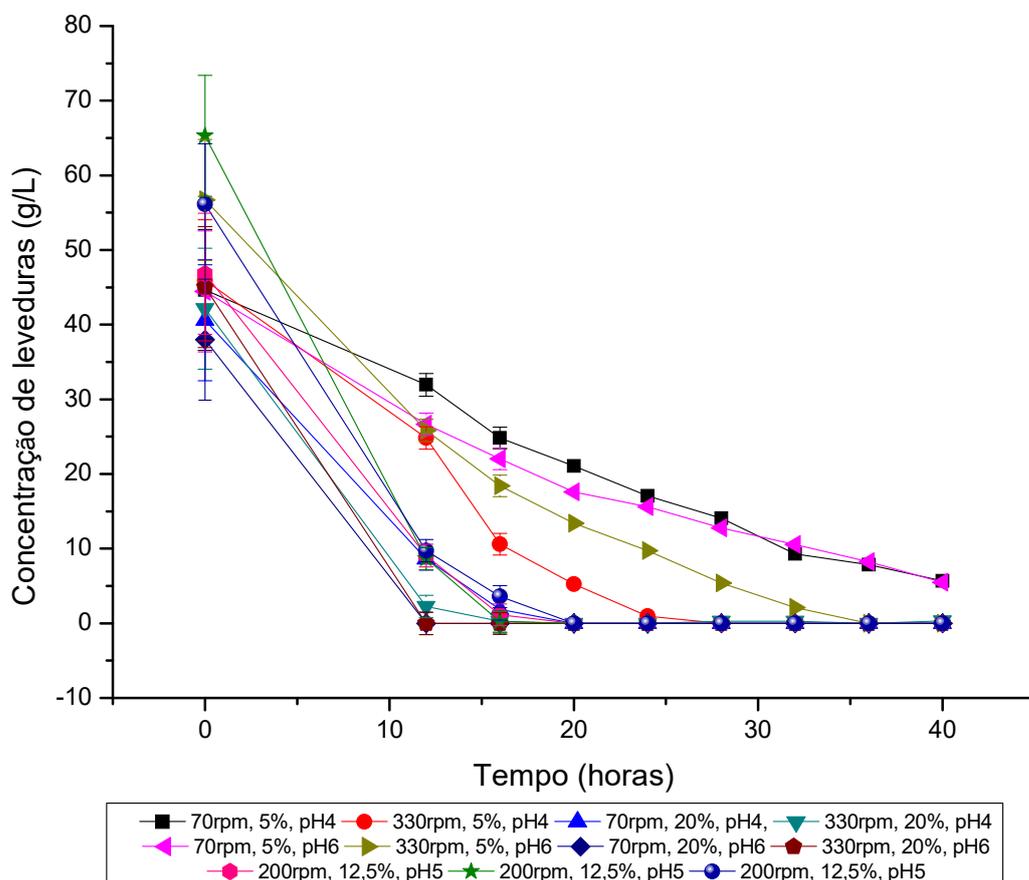


**Figura 9:** Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação ao consumo da biomassa (A) e Predição do modelo de regressão (B) para 40 horas de fermentação.

#### 4.1.3 Análise do consumo da glicose via HPLC

O consumo da glicose para as fermentações realizadas no planejamento experimental 1 estão representadas na Figura 10. Como pode-se observar, as fermentações relativas aos experimentos 7 e 8 (20% de inóculo inicial e pH igual a 6) apresentam consumo total de glicose com 12 horas reação. Os experimentos 3 e 4, que tinha 20% de inóculo inicial e pH = 4 levaram em torno de 16 horas para o consumo total, que foi o mesmo tempo requerido para as

condições do ponto central, indicando que o pH mais ácido desfavorece o consumo mais rápido da glicose. No entanto observa-se que nas 12 horas, a fermentação referente ao experimento 4, ainda apresentava níveis de glicose consideravelmente abaixo do experimento 3, sugerindo que a frequência de agitação mais alta favoreceu o consumo mais rápido de glicose.



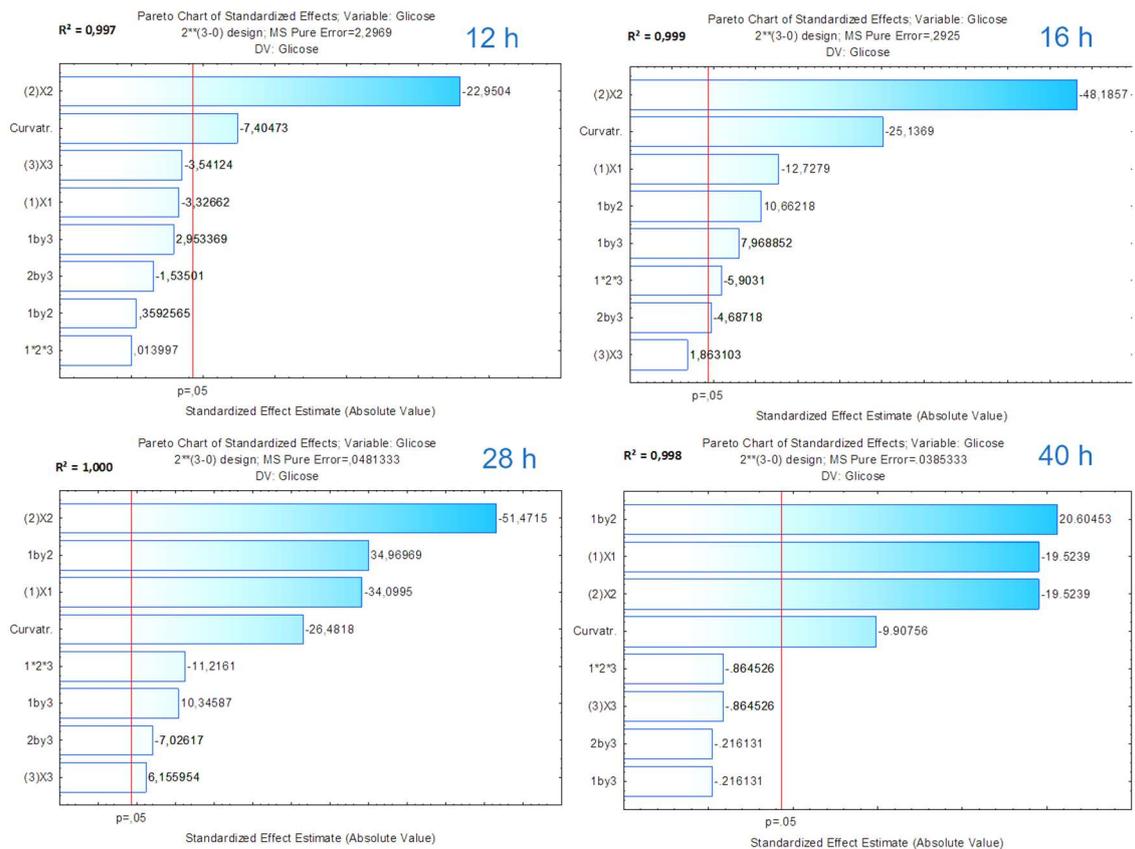
**Figura 10:** Gráfico do consumo de glicose ao longo das 40 horas de fermentação de todas as condições do planejamento experimental 1 com *Pichia stipitis*.

Também se observa que todos os experimentos com 5% de inóculo inicial demoraram mais de 20 horas para consumir toda a glicose, sendo que nos dois experimentos com rotação a 70 rpm, condições 1 e 5, a glicose não foi consumida totalmente, mostrando que a concentração inicial de inóculo e rotação baixas são condições ineficazes quanto ao aproveitamento do substrato glicose. Entre os experimentos com 5% os 2 experimentos com rotação de 330 rpm, condições 2 e 6, se destacaram no maior consumo de glicose. Na comparação entre as condições com 20% de inóculo, a rotação pareceu não surtir muito efeito sobre o consumo de glicose, pois todas já tinham

praticamente consumido por completo as 12 horas de fermentação.

#### 4.1.3.1 Análise da significância dos fatores e suas interações no consumo da glicose

Fez-se o diagrama de Pareto de efeitos padronizados e ANOVA para as concentrações de glicose medida ao longo da fermentação, apresentado na Figura 11.



**Figura 11:** Diagramas de Pareto para efeitos normalizados com relação ao consumo de glicose das 12, 16, 28 e 40 horas de fermentação.

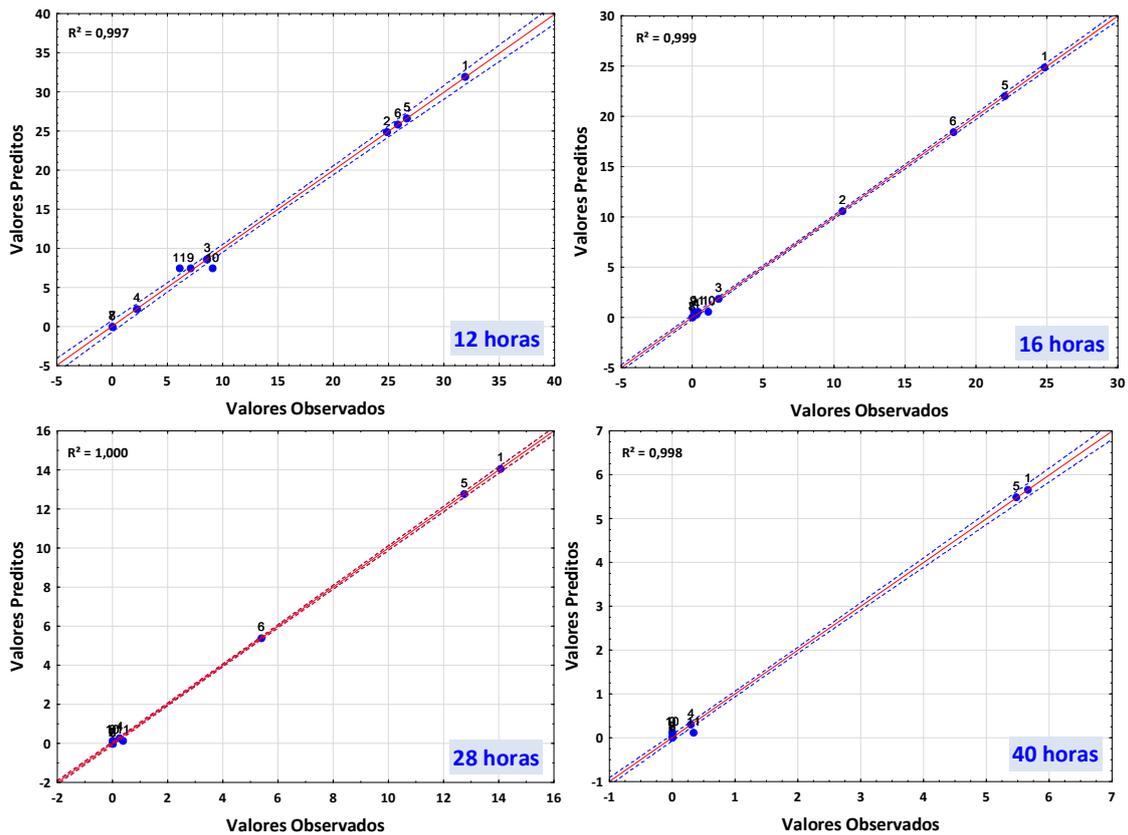
Existe uma grande dinâmica das significâncias das variáveis durante a fermentação. O fator dominante nas primeiras 12 horas foi concentração de inóculo ( $X_2$ ), mostrando quanto maior a concentração menor a concentração de glicose no meio. Destaca-se também que no tempo de 12 h o regressor curvatura ( $\delta_{curv}$ ) também contribui para descrição do processo.

A partir das 16 horas de fermentação todos os fatores e suas interações, com exceção do pH ( $X_3$ ), mostram significância estatística. Embora a concentração inóculo (resposta negativa) corresponda ao regressor de maior

contribuição, a frequência de agitação (rotação,  $X_1$ ) e a curvatura apresentam efeitos, também com resposta negativa. Já a interação binária de  $X_1$  e  $X_2$ , além de  $X_1$  e  $X_3$  apresentam resposta positiva. Por fim, observa-se que interações do tipo binária (entre  $X_2$  e  $X_3$ ) e ternária (entre  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ) também são significativas, cujos regressores exibem resposta negativa. Embora o pH não apresente significância estatística, considerando um nível de confiança de 95%, sua contribuição no modelo de regressão não pode ser negligenciada, dado a significância do seu efeito combinado as demais variáveis de processo  $X_1$  e  $X_2$ . Desta forma, é razoável considerar que quanto menor o pH, menor a taxa de consumo da glicose.

Observa-se que no tempo de fermentação equivalente a 28 h todas as variáveis de processo são significativas estatisticamente, além de todas as interações binárias e da interação ternária. Já no tempo de 40 h, o regressor mais importante diz respeito ao efeito combinado entre  $X_1$  e  $X_2$ , apresentando resposta positiva. Por outro lado, destacam-se os regressores com resposta negativa e significância estatística  $X_1$ ,  $X_2$  e  $\delta_{curv}$ .

A Figura 12 mostra as predições do modelo de regressão com relação ao consumo de glicose (CG) ao longo do tempo. Em todos os casos analisados, os dados experimentais são bem preditos pelo modelo.



**Figura 12:** Predição do modelo de regressão linear múltipla para consumo de glicose ao longo do tempo de fermentação

Apenas como exemplo ilustrativo a condição de 28 h é tomada como exemplo, dado que todas as variáveis e suas interações binárias e ternária apresentaram efeito significativos para um intervalo de confiança de 95%. Desta forma, consumo de glicose é dado por:

$$CG = 4.06 - 5.29 \cdot X_1 - 7.99 \cdot X_2 + 0.96 \cdot X_3 + 5.43 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1.61 \cdot X_1 \cdot X_3 - 1.09 \cdot X_2 \cdot X_3 - 1.74 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 - 7.86 \cdot \delta_{curv} \quad (4)$$

onde

$$\delta_{curv} = \begin{cases} 1 & \text{se o ponto corresponde ao ponto central} \\ 0 & \text{demais pontos experimentais} \end{cases} \quad (5)$$

## 4.1.4 Análise da produção do etanol via HPLC

### 4.1.4.1 Normalização dos dados do etanol

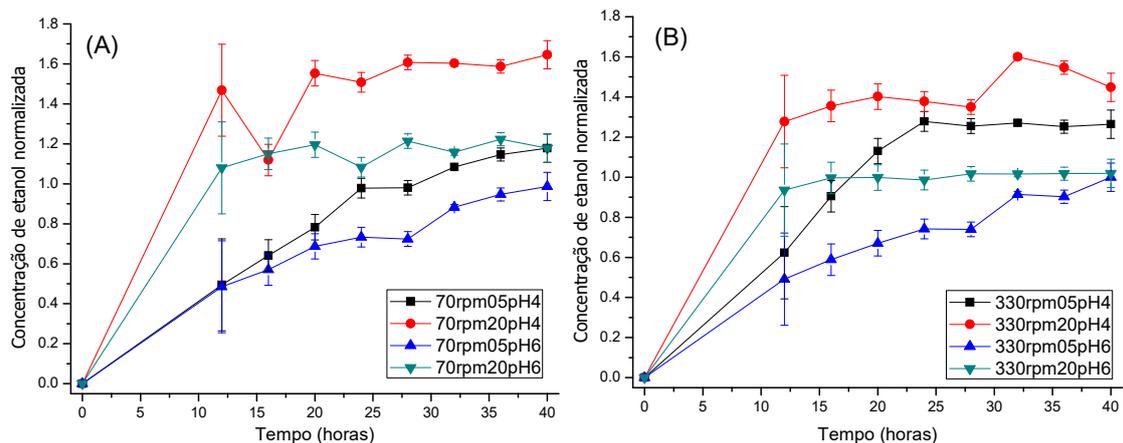
Para a análise estatística dos resultados fez-se necessário a normalização dos dados. Usou-se a fórmula com o potencial máximo de glicose de acordo com o que foi medido pelo HPLC, representada por:

$$\bar{E} = \frac{E_M - E_I}{0,51 \cdot G_I - E_I} \quad (6)$$

Onde,  $\bar{E}$  corresponde a concentração de etanol normalizada,  $E_M$  e  $E_I$  são as concentrações de etanol medida (ao longo do tempo) e inicial, respectivamente, e  $G_I$  diz respeito à concentração de glicose inicial.

Os dados foram contrastados com a condições de mesma agitação e de mesmo pH, como apresentado nas Figura 13 a 15.

A Figura 13 foi construída fixando-se o pH e variando-se as rotações e concentração inicial de inóculo, assim espera-se observar de forma mais clara a relação entre a variação de rotação e concentração inicial de inóculo com a produção de etanol. Nota-se na Figura 13A que o fator com maior significância para a produção de etanol foi a concentração do inóculo, sendo os de pH igual a 4 com maior produção se comparado aos da mesma concentração com pH igual a 6. Na Figura 13B, nota-se que nos experimentos com alta rotação a produção de etanol em relação a quantidade de açúcar foi maior com pH = 4. Resultado semelhante ao encontrado para a rotação de 70 rpm, sendo que para uma rotação maior a quantidade de etanol produzida parece ser mais influenciada pela variação de pH do que pela concentração inicial do inóculo.



**Figura 13:** Produção normalizada de etanol das condições de fermentação do planejamento experimental 1 no biorreator organizadas em rotação de 70 rpm (A) e 330 rpm (B).

Observa-se que as leveduras nas condições da Figura 13(A), que apresentaram menor produção de etanol, não consumiram por completo a glicose após as 40 horas de fermentação, como demonstra a Figura 10. Conclui-se, portanto, que a menor produção de etanol das condições com inóculo inicial de 5%, observado na Figura 13(A), é atribuído a insuficiente concentração de leveduras para se fermentar todo a glicose disponível.

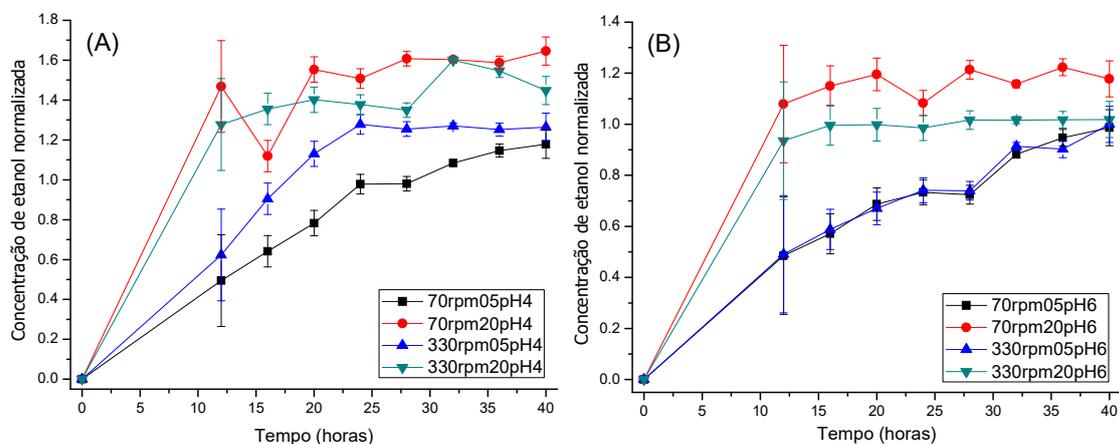
A Figura 14A mostra uma inversão da significância da rotação quando comparados os experimentos de mesma concentração. Em concentrações a 20%, o experimento com 70 rpm produziu mais etanol. Já nos experimentos 5%, houve maior produção no experimento a 330 rpm. No entanto, se considerarmos o crescimento da biomassa, veremos que existe uma grande diferença entre as reações com 5%, o que não ocorre com os outros 2 experimentos.

Esse comportamento deve-se provavelmente ao fato da *Pichia* ser Crabtree-negativa, ou seja, a fermentação alcoólica só acontece quando não há oxigênio suficiente no meio. A maior concentração de leveduras diminui a disponibilidade de oxigênio, levando a levedura a produzir mais etanol. Como foi observado na Figura 8, uma maior rotação promoveu um maior crescimento das leveduras, o que pode ter diminuído a disponibilidade de oxigênio no meio.

Em contraste, a Figura 14B mostra o perfil da produção de etanol praticamente idêntica quando comparadas as fermentações a 5%. Se compararmos as curvas de crescimento dessas duas fermentações, veremos que seu crescimento ocorreu de forma semelhante, nos levando a conclusão

de que a essas condições (pH = 6 e inóculo a 5%) a diferença de rotação parece não influenciar nem o crescimento de biomassa e nem a produção de etanol.

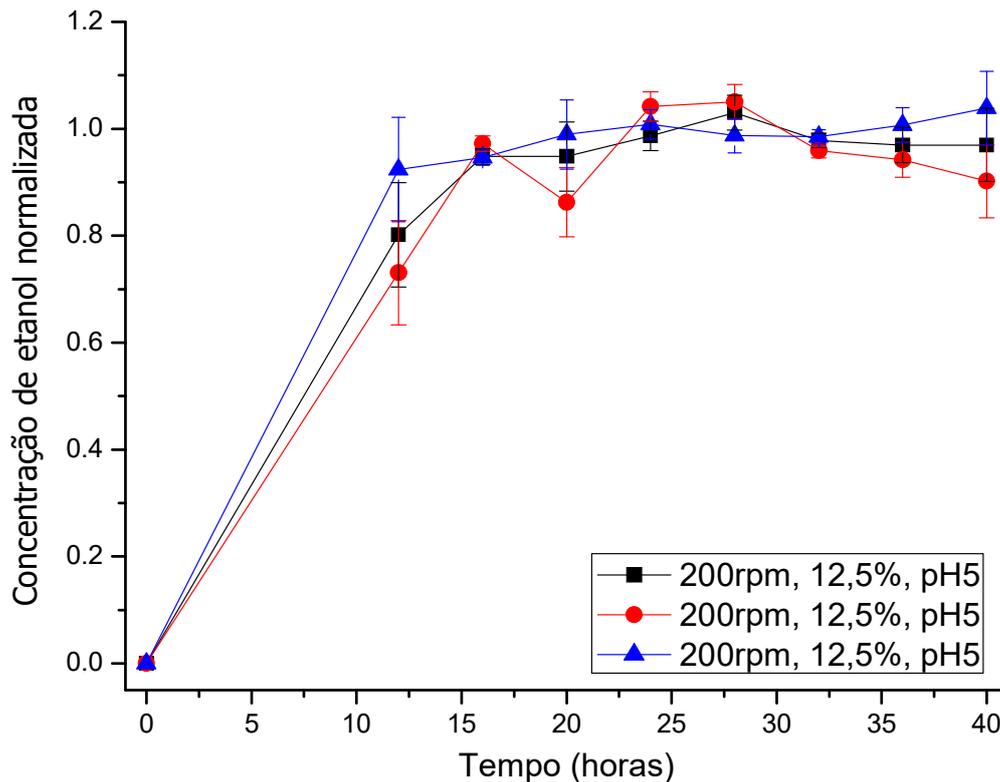
De forma geral, o pH mais ácido proporcionou as maiores taxas de produção de álcool, levando em conta a quantidade inicial de glicose medida.



**Figura 14:** Produção normalizada de etanol das condições de fermentação do planejamento experimental 1 organizadas em pH = 4 (A) e pH = 6 (B).

Por fim a Figura 15 mostra a comparação entre os pontos centrais realizados em triplicata para a determinação do erro padrão das curvas de concentração mostradas. Também buscou-se comparar a produção de etanol nessas condições com as outras do planejamento 1.

De modo geral, as concentrações normalizadas de etanol seguiram o perfil dos respectivos gráficos de crescimento de biomassa. Os gráficos com maior concentração de inóculo, incluindo os pontos centrais, obtiveram uma taxa de produção alta nas primeiras 12 horas, vindo a se estabilizar com pouco aumento após as 12 horas. As condições com baixa concentração de inóculo, a 5%, obtiveram uma taxa de produção quase que constante durante todo o curso da fermentação, a única exceção foi a condição 2 (330 rpm, 5%, pH = 4), onde o pico de produção aconteceu as 24 horas, se estabilizando após isso.



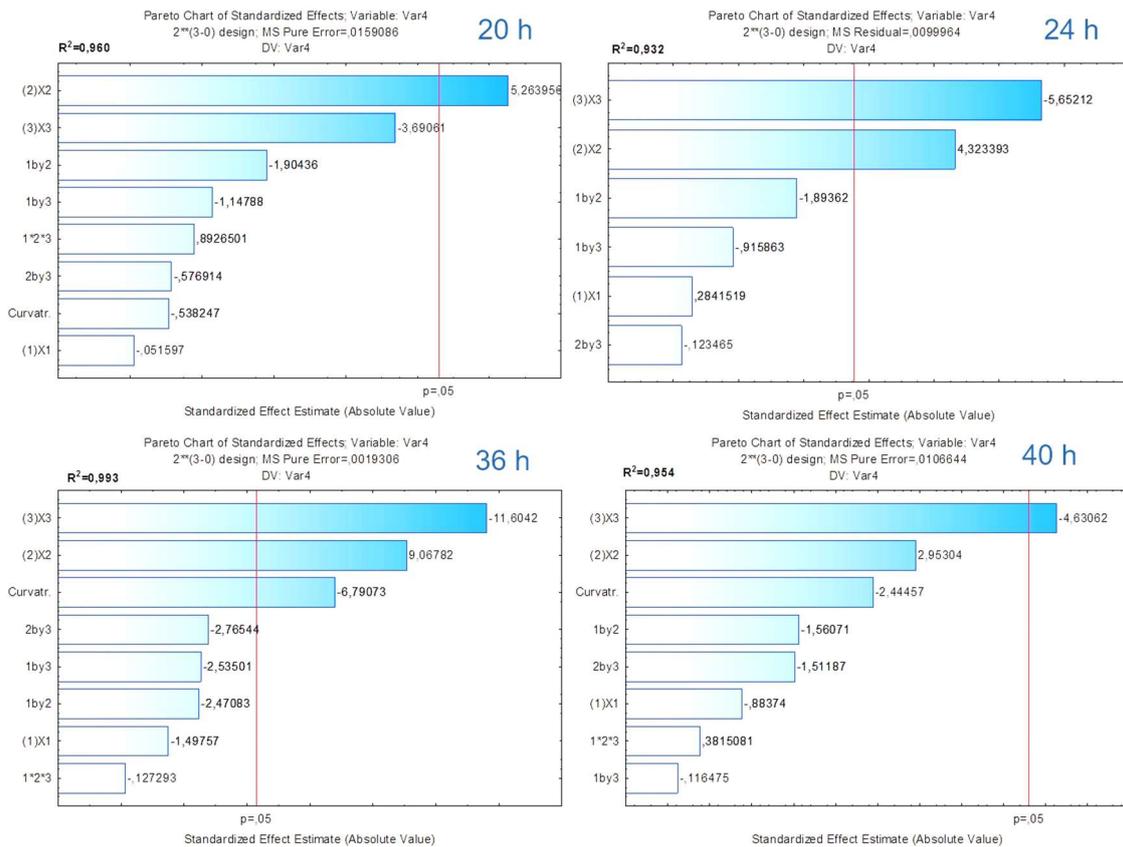
**Figura 15:** Gráfico da produção normalizada de etanol em triplicata do ponto central do planejamento experimental 1.

#### 4.1.4.2 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção do etanol

No software StatSoft Statistica 10 fez-se a análise estatística das variáveis significantes do planejamento quanto a produção de etanol, cujos dados foram normalizados anteriormente.

Como pode-se ver na Figura 16, o único fator significativo para a produção de etanol até as 20 horas de fermentação foi a concentração de inóculo inicial, sendo quanto maior a concentração, maior a produção de etanol. A partir das 24 horas, o pH mais ácido passou a ser o fator determinante. Nenhuma das interações das variáveis estudadas demonstrou-se significativa em nenhum momento das fermentações.

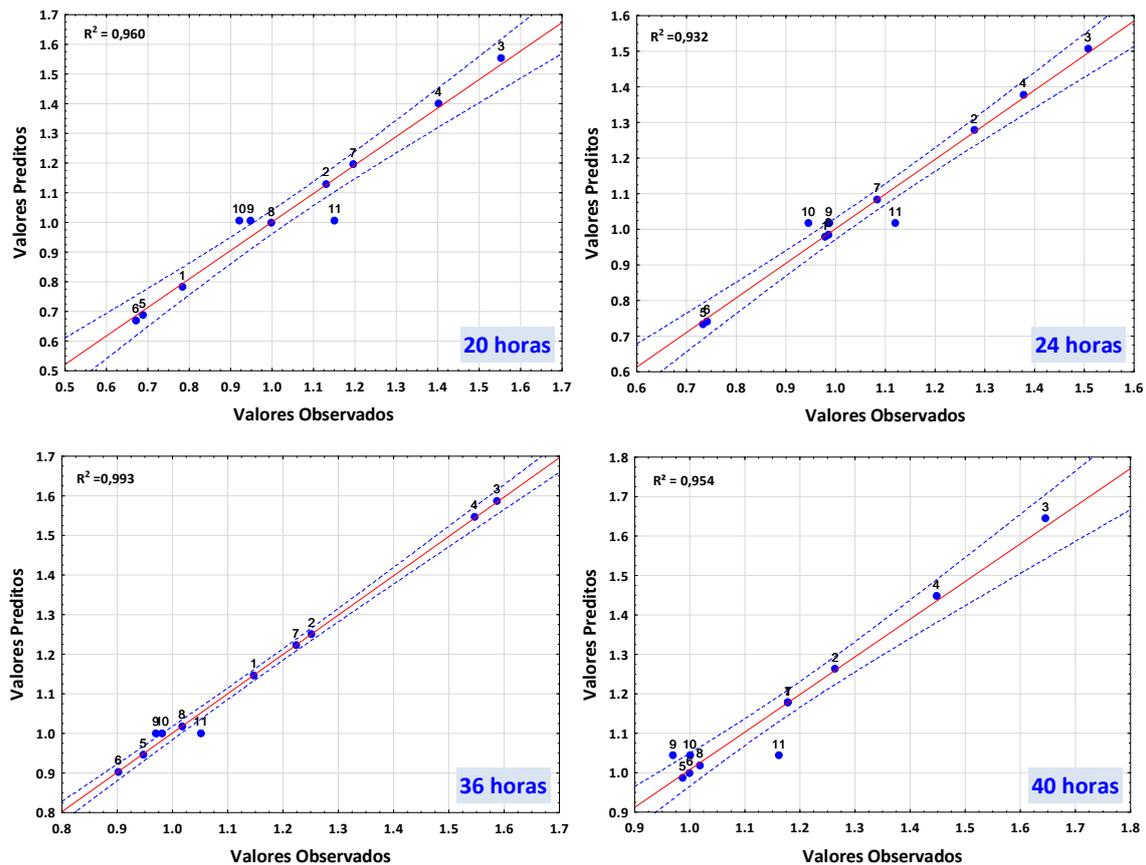
Este resultado está de acordo com as observações feitas com a análise de Pareto com a glicose, que mostrou que com pH ácido há maior consumo de glicose.



**Figura 16:** Diagramas de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de etanol normalizado das 20, 24 36 e 40 horas de fermentação.

A capacidade de predição do modelo de regressão linear é apresentada na Figura 17. Embora os coeficientes de correlação ( $0.93 < R^2 < 0.99$ ) sejam menores do que aqueles apresentados na Figura 12, o modelo descreve relativamente bem a produção de etanol (PE) ao longo do tempo. A Equação 7 exemplifica a forma do modelo, considerando o tempo de 36 h e apenas os efeitos significativos determinados com base em um intervalo de confiança de 95%.

$$PE = 1.20 + 0.28 \cdot X_2 - 0.36 \cdot X_3 - 0.40 \cdot \delta_{curv} \quad (7)$$

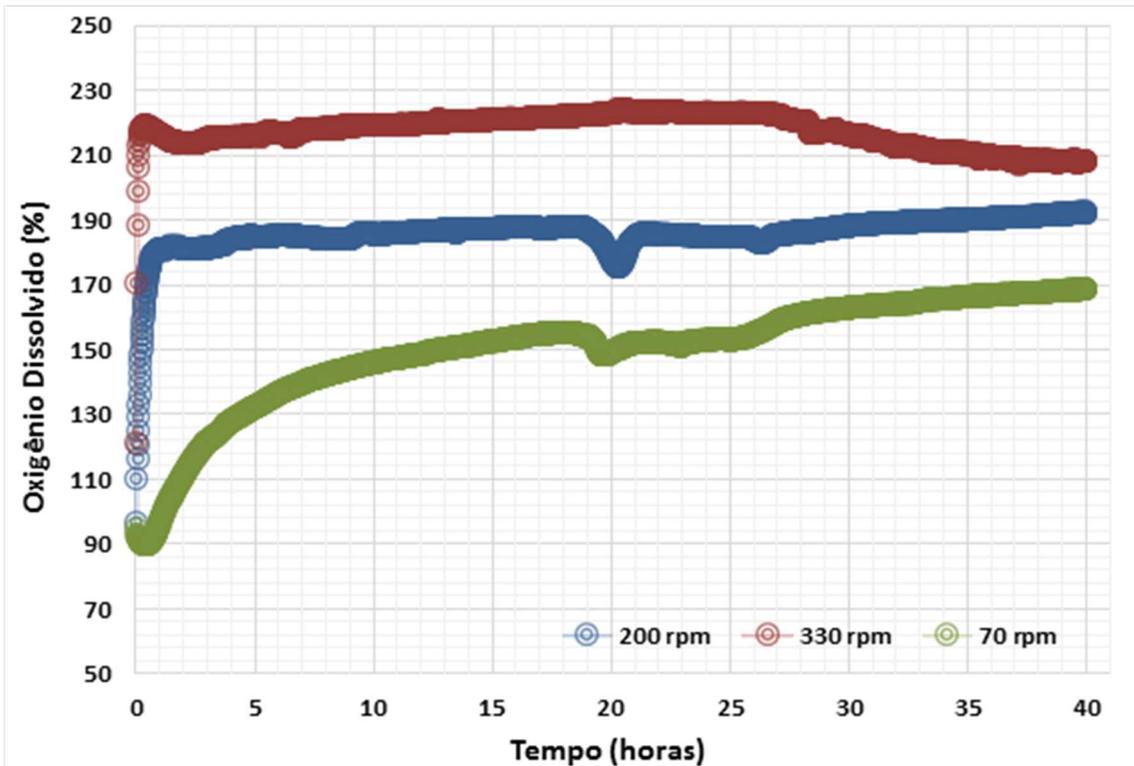


**Figura 17:** Predição do modelo de regressão linear múltipla para a produção de etanol ao longo do tempo de fermentação.

#### 4.1.5 Avaliação do oxigênio dissolvido

Fez-se uma avaliação do efeito que a mudança de agitação tem no oxigênio dissolvido no meio devido ao perfil semelhante de crescimento e produção de etanol que algumas condições com diferente agitação obtiveram, principalmente as apresentadas na Figura 10. Fez-se, portanto, uma reação com meio YPD 5% estéril com as mesmas agitações previstas no planejamento experimental.

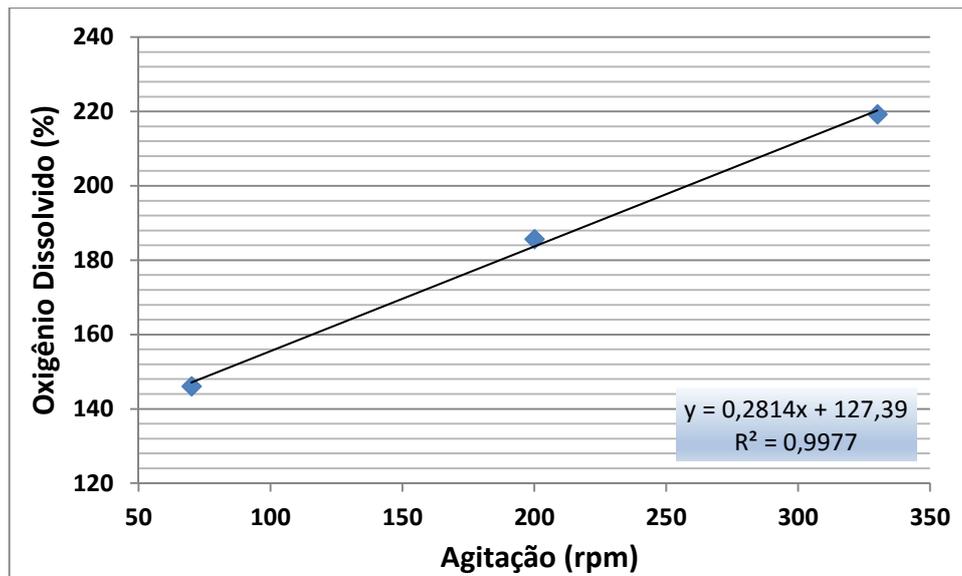
A Figura 18 mostra o perfil do oxigênio dissolvido nos ensaios realizados. Fez-se o registro de pH, frequência de agitação e oxigênio dissolvido a cada minuto em 3 corridas corrida de 40 horas, nas 3 agitações avaliadas de acordo com o planejamento experimental. Após a primeira corrida de 40 h a 70 rpm, esperou-se o nível de oxigênio voltar para a medição inicial, e iniciou-se a segunda corrida a 200 rpm de frequência de agitação. Repetiu-se o procedimento e iniciou-se o monitoramento de oxigênio dissolvido a 330 rpm.



**Figura 18:** Medição de oxigênio dissolvido do meio YPD 5% em função de frequência de agitação específica do agitador ao longo de 40 horas.

Para saber se existe uma relação linear entre o nível de oxigênio dissolvido e a agitação, obteve-se a equação da reta das três velocidades no tempo de 10 h, considerando que o sistema se encontrava em estado estacionário para a concentração de oxigênio dissolvido. A relação linear pôde ser constatada com alto grau de confiabilidade como mostra a Figura 19.

Essa relação linear com alto coeficiente de determinação nos permite concluir que os aumentos de agitação no meio realizados no planejamento experimental anterior teriam sido suficientes para aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido no meio. As aparentes limitações de crescimento e aumento de produção de etanol, indicando condições anaeróbicas, em alta rotação podem então ser atribuídas a elevada concentração de leveduras no meio.



**Figura 19:** Relação linear da dissolução do oxigênio em função da agitação durante a décima hora de medição.

## 4.2 Viabilidade dos clones de *Komagataella pastoris*

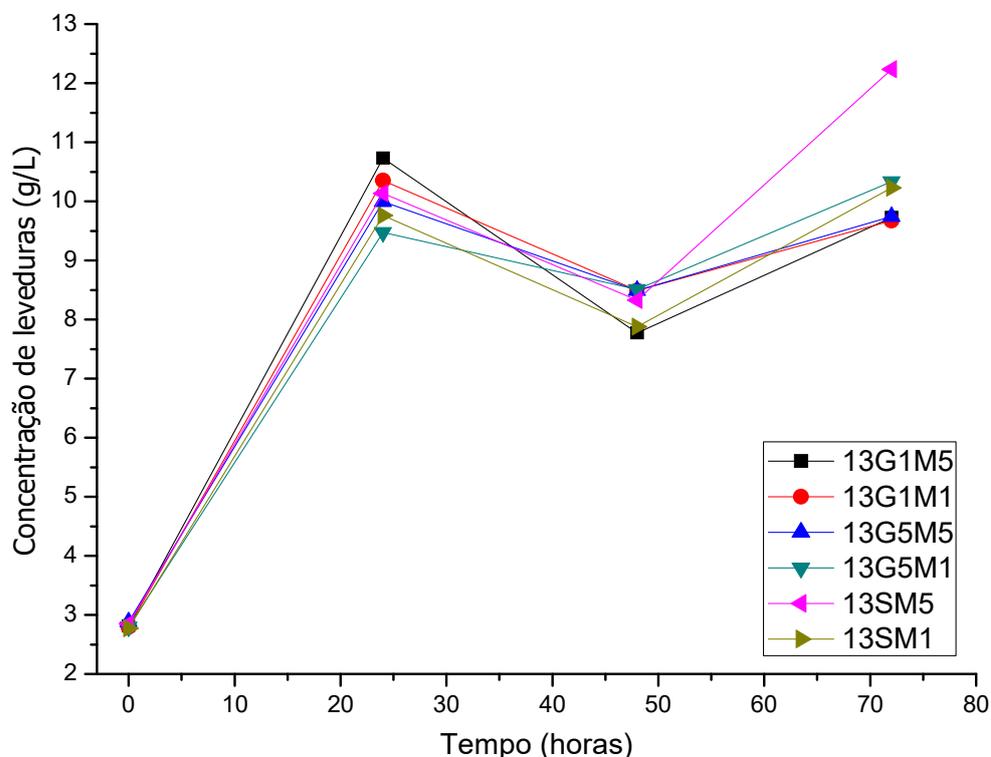
A produção da proteína expansina foi realizada utilizando a linhagem X-33 com o vetor *pPICZαA* contendo o gene heterólogo da expansina *BsEXLX1*. Com essa linhagem, realizou-se um experimento utilizando glicose, pois esta fonte de carbono apresentou boas concentrações de leveduras no planejamento 1. Porém a glicose é forte repressora do promotor *AOX1* usado para a expressão da proteína recombinante em metanol.<sup>66</sup> Para aliviar os efeitos repressores da glicose, foi feito um condicionamento por 12 horas com sorbitol a 1%.<sup>67</sup>

Por conta do sorbitol ser uma matéria-prima de alto valor agregado, fez-se também experimentos utilizando glicerol como fonte de carbono. Escolheu-se, portanto, o uso do meio *BMGY* encontrado no manual *Pichia EasySelect* da Invitrogen.

### 4.2.1 Curva de crescimento do clone 13 da *K. pastoris*

A Figura 20 mostra a curva de crescimento da *K. pastoris* em todas as fermentações feitas para esse experimento. Observa-se que houve uma perda de biomassa quando se efetuou a lavagem das células para a troca do meio. A lavagem constitui-se na centrifugação do cultivo e a suspensão do pellet obtido em um novo meio. Todos os cultivos atingiram níveis semelhantes de

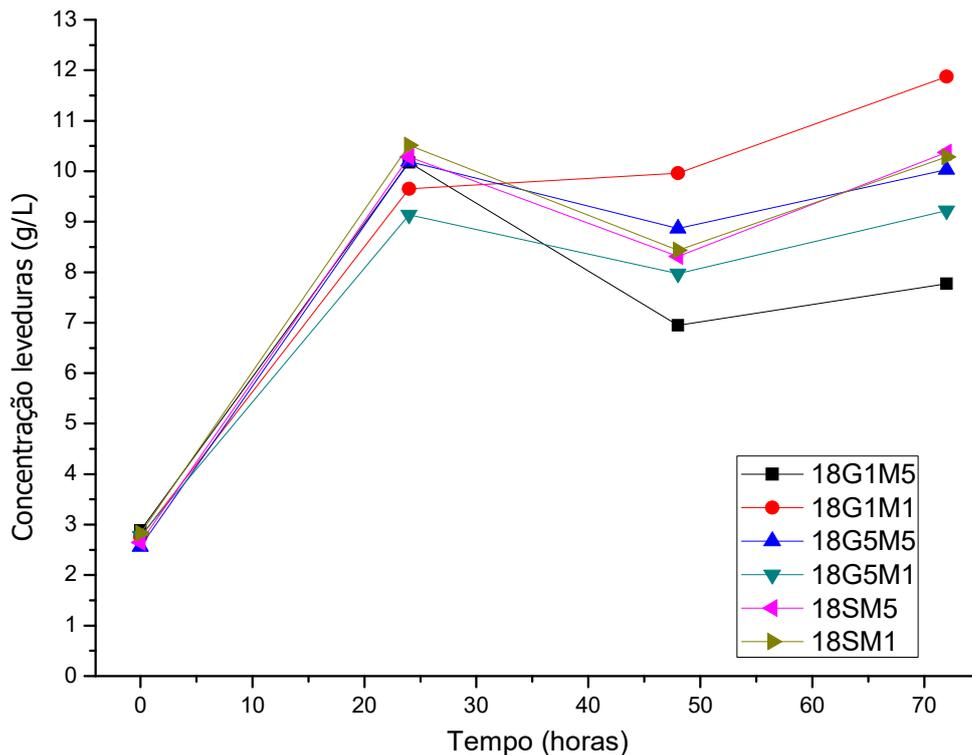
concentração. A adição de sorbitol 1% antes da adição de metanol aparenta não ter tido nenhum efeito no crescimento em comparação ao meio com somente metanol.



**Figura 20:** Curva de crescimento das fermentações do clone 13. G1 representa glicerol 1%; G5 glicerol 5%; S glicose a 5% e posteriormente sorbitol a 1%. M representa metanol a 1% ou a 0,5%.

#### 4.2.2 Curva de crescimento do clone 18 da *K. pastoris*

A curva de crescimento do clone 18, mostrado na Figura 21, segue no geral o mesmo padrão das fermentações com o clone 13, com exceção apenas da fermentação com glicerol 1% e metanol 1%, onde não houve diminuição da concentração celular, apenas uma estagnação do crescimento após a adição de metanol. Comparando novamente com as fermentações com o clone 13 (Figura 20) as fermentações com o clone 18 (Figura 21) demonstra maior variabilidade nas concentrações de levedura após o início da fase de indução a metanol.

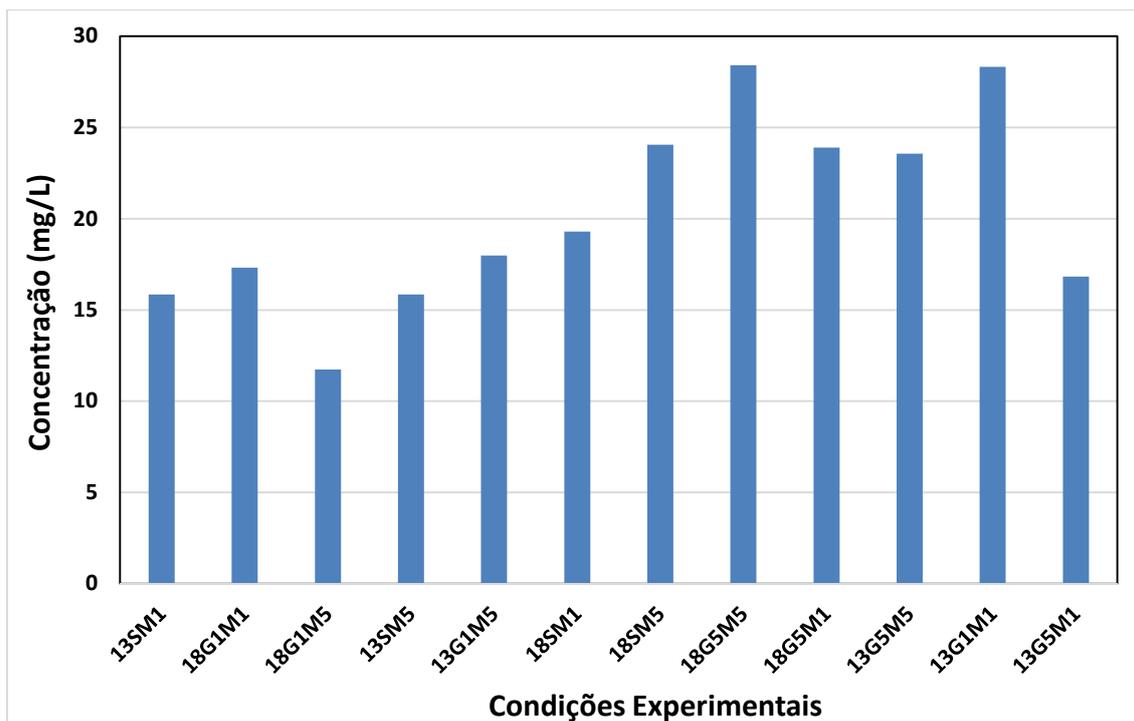


**Figura 21:** Curva de crescimento das fermentações do clone 18. G1 representa glicerol 1%; G5 glicerol 5%; S glicose a 5% e posteriormente sorbitol a 1%. M representa metanol a 1% ou a 0,5%.

#### 4.2.3 Determinação das proteínas solúveis por Bradford

Como mencionado em materiais e métodos a quantificação de proteínas foi feita através de Bradford usando a curva padrão da Figura 6 e as medições dessas concentrações proteicas encontram-se na Figura 22.

Pode-se observar na Figura 22 que não houve diferença expressiva na produção de proteínas solúveis no sobrenadante entre os clones 13 e 18. Os dois maiores níveis de produção ocorreram com glicerol a 5% e metanol a 0,5%. Os menores níveis ocorreram com glicose/sorbitol e metanol a 5% para o clone 13 e glicerol a 1% com metanol a 0,5% para o clone 18.



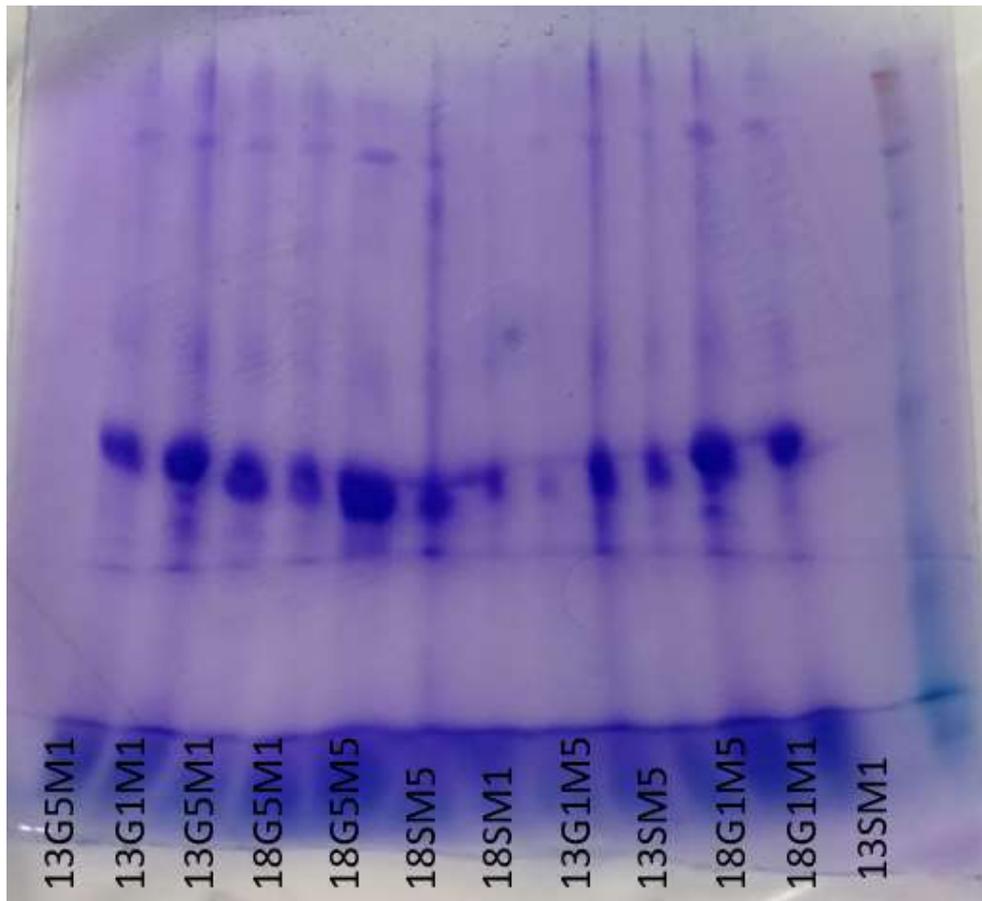
**Figura 22:** Concentração de proteínas solúveis. Os números em frente referem-se ao clones 13 ou 18. G1 refere-se a glicerol 1%; G5 refere-se a glicerol 5%; S refere-se a glicose 5%. M1 refere-se a metanol 1%; M% refere-se a metanol 0,5%.

#### 4.2.4 Avaliação das proteínas solúveis presentes no sobrenadante dos clones 13 e 18

Confirmou-se a expressão das expansinas através do SDS-PAGE do sobrenadante após 48 horas de indução, concentrando-os a 10X com TCA. Como pode-se observar na Figura 23, existe apenas uma banda dominante de proteína para cada fermentação na faixa de 22 kDa, perto dos 24 kDa esperado.<sup>52</sup>

Com base nesses resultados pode-se assumir que a quantificação de proteínas por Bradford do sobrenadante está relacionada a expressão da proteína expansina, contendo quantidades mínimas de proteínas endógenas da *K. pastoris*.

Foi observado que para os diferentes meios de cultivo houve a expressão da proteína expansina. Como primeiro passo para a otimização da produção algumas variáveis devem ser avaliadas e comparadas entre si, optou-se por um novo planejamento de experimental.



**Figura 23:** Gel SDS-PAGE das proteínas solúveis. Os números em frente referem-se ao clone. G1 refere-se a glicerol 1%; G5 refere-se a glicerol 5%; S refere-se a glicose 5%. M1 refere-se a metanol 1%; M% refere-se a metanol 0,5%.

### 4.3 Planejamento experimental com *Komagataella (Pichia) pastoris*

Pelo fato de ter se obtido expressão com o uso de glicerol e glicose, optou-se por fazer 2 planejamentos fatoriais, usando separadamente essas fontes de carbono. No entanto decidiu-se não repetir o condicionamento de sorbitol pelo fato de ser de alto valor e por não ter apresentado nenhum ganho significativo de expressão em relação a produção com glicerol.

#### 4.3.1 Planejamento experimental 2 com glicerol

Após a obtenção da expressão da expansina BsEXLX1 em *Komagataella pastoris*, fez-se um planejamento experimental para se ter maior entendimento de qual dos fatores e suas interações são significativos na produção de enzima expansina.

Assim como no experimento anterior, as fermentações foram divididas em três etapas: Pré-inóculo, crescimento de biomassa e indução de acordo com o experimento feito anteriormente.

Buscou-se com esse planejamento (Tabelas 2 e 4) determinar os efeitos dos principais fatores responsáveis para a boa expressão de proteínas recombinantes, sendo que os níveis dos fatores foram definidos também de acordo com os valores aceitáveis na literatura e no manual do kit EasySelect Pichia Expression.<sup>68</sup>

Como mostra a Tabela 2, o planejamento fatorial 2 foi um planejamento fatorial completo 2<sup>5</sup>. Variando o pH, taxas de concentração de glicerol durante o crescimento, o volume do meio, a concentração de metanol durante a fase de indução e a temperatura.

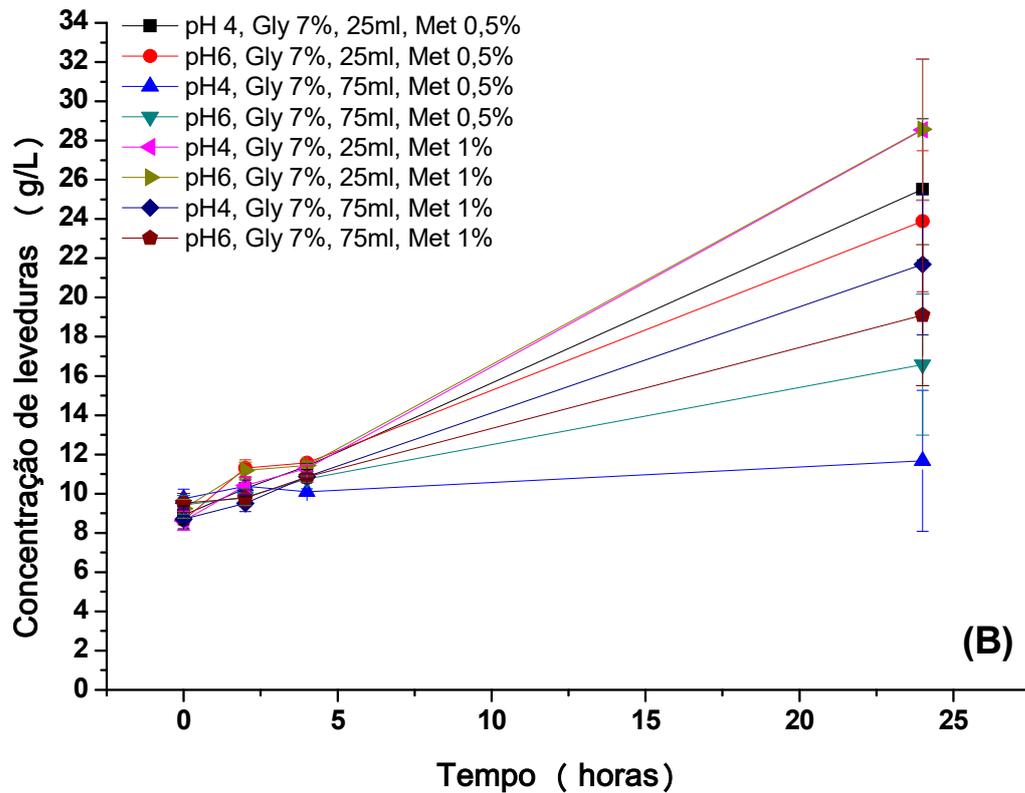
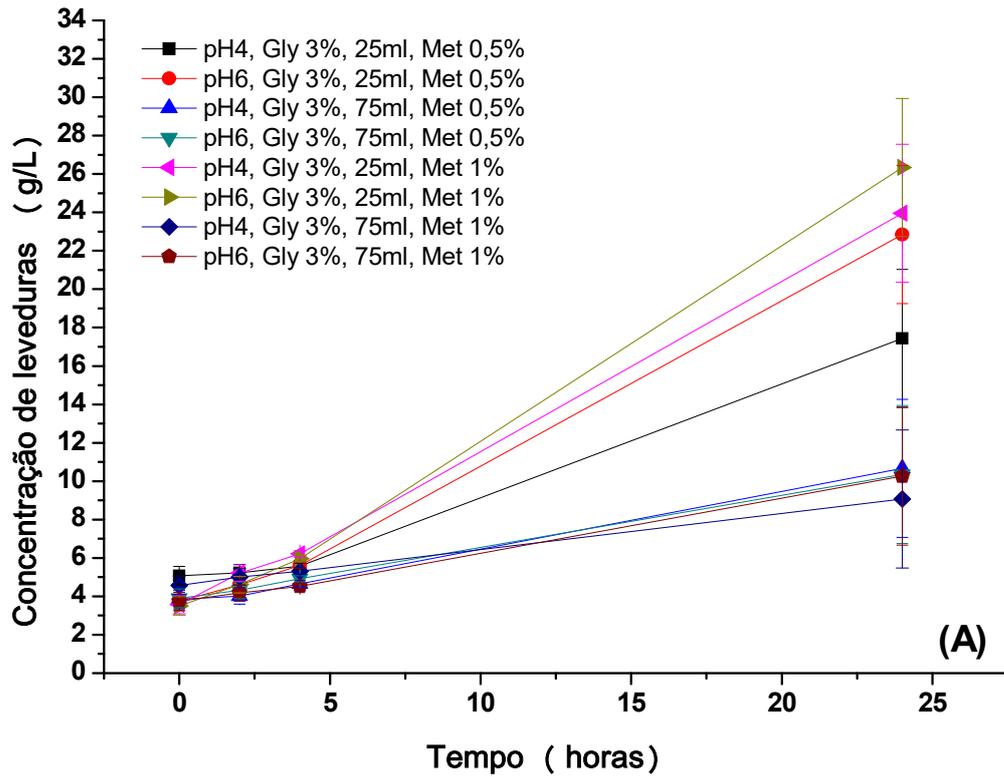
Manteve-se fixo a concentração de inóculo em relação a quantidade de glicerol, a 12,5%, e a agitação do meio, a 250 rpm. Observou-se que os tampões não conseguem segurar o pH devidamente. Todas as culturas terminaram as fermentações com pH acima de 6 e abaixo de 8. As condições com glicerol apresentaram excelente crescimento de leveduras, chegando a atingir concentrações perto de 30 g/L.

As curvas de crescimento foram divididas em duas, uma contendo a fase de crescimento em glicerol (Figuras 24) e a outra a fase de indução a metanol (Tabela 5). Também se agrupou os gráficos nas condições de mesma temperatura, sendo os 2 primeiros gráficos apresentados na condição 25 °C (Figura 24), seguidos pelos 2 gráficos da condição do ponto central a 30 °C (Figuras 25 e 26), e por fim os dois da condição de 35 °C (Figura 27).

De acordo com a Figura 24 a maioria das condições com glicerol atingiu níveis de concentração acima de 12 g/L, com exceção das condições com glicerol 3% e 75 mL e da condição 7 (pH = 4, 7% de glicerol, 75 mL), as quais obtiveram no final da fermentação a glicerol em torno de 10g/L de leveduras. As duas maiores concentrações, acima de 27 g/L, foram com as condições 11 e 12 que continham meio com 7% e 25 mL em um frasco de 250mL. As outras duas reações homólogas nessa etapa do planejamento fatorial, as condições 3 e 4, também com 7% de glicerol e 25 mL de volume, obtiveram concentrações de 25 g/L.

Todas as 4 condições com 3% de glicerol em 25 mL (Condições 1, 2, 9

e 10) apresentaram taxas de crescimento significativamente maiores que as demais condições, chegando a atingir níveis de concentração finais semelhantes as condições que começaram com 12,5 % de inóculo em 7% de glicerol, ou seja, com mais que o dobro da concentração de levedura inicial. Indicando que alta aeração do meio com menor quantidade de inóculo favorece um melhor crescimento de biomassa em glicerol.



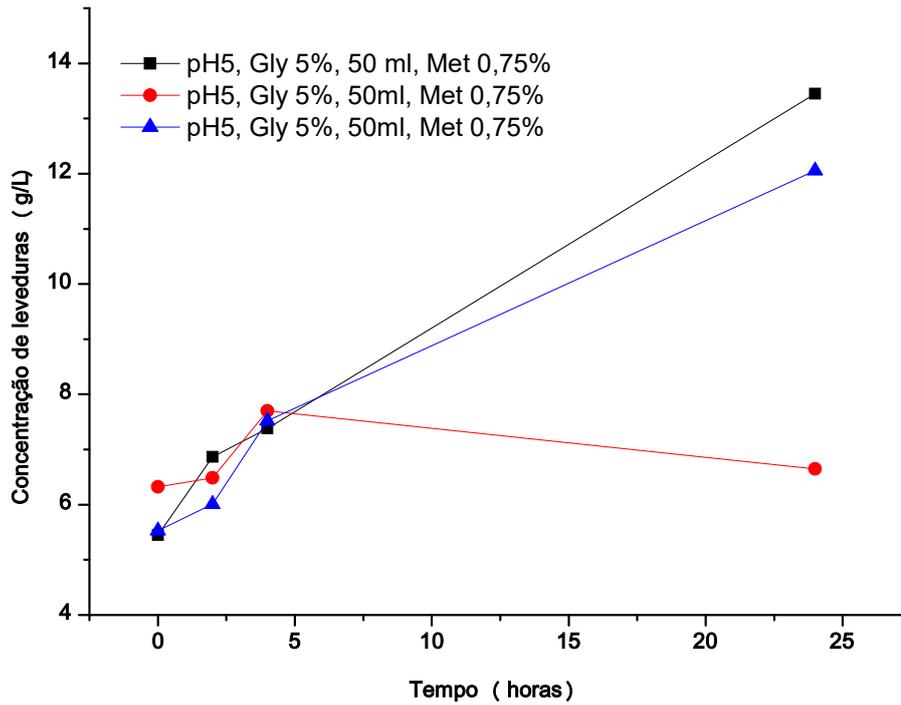
**Figura 24:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de crescimento em glicerol a 25 °C. O Gráfico (A) representa as condições com 3% de glicerol. O Gráfico (B) representa as condições com 7% de glicerol.

Na Tabela 5 observa-se a concentração de biomassa das leveduras em metanol possui um perfil de crescimento semelhante entre todas as condições, obtendo maior ganho de biomassa nas primeiras 24 horas, e estagnando ou ganhando menos biomassa nas últimas 24. As condições com as maiores taxas foram 9 (pH = 4, 3% de glicerol e 25 mL), 11 (pH = 4, 7% de glicerol e 25 mL) e 16 (pH = 6, 7% de glicerol e 75 mL). A condição 11 atingiu a maior concentração final de leveduras, atingindo 28 g/L de concentração. A condição 12 também teve alta concentração final, porém com um aumento de biomassa não tão expressivo.

**Tabela 5:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante indução por metanol após crescimento em glicose.

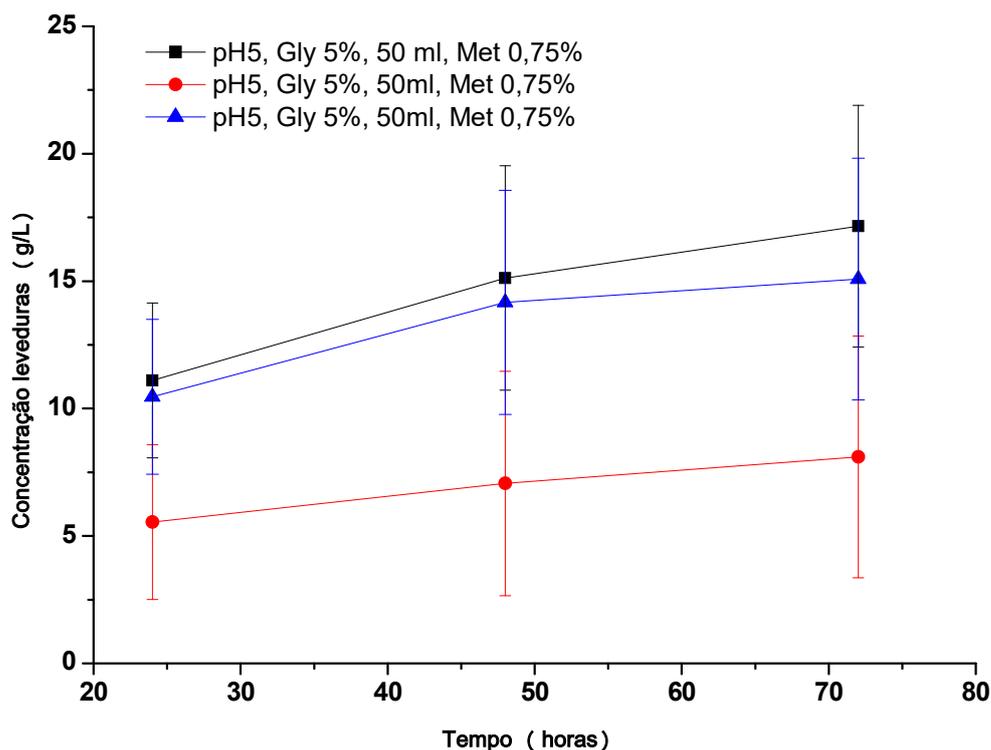
Condições	24 horas	Erro	48 horas	Erro	72 horas	Erro
1	14,39	3,04	15,60	4,40	16,34	4,74
2	16,74	3,04	21,45	4,40	22,92	4,74
3	16,54	3,04	24,80	4,40	25,67	4,74
4	16,78	3,04	24,36	4,40	25,91	4,74
5	8,99	3,04	12,73	4,40	13,97	4,74
6	8,97	3,04	13,17	4,40	14,37	4,74
7	11,10	3,04	12,76	4,40	14,67	4,74
8	14,37	3,04	16,82	4,40	16,76	4,74
9	14,53	3,04	23,52	4,40	23,28	4,74
10	13,81	3,04	20,10	4,40	20,22	4,74
11	17,63	3,04	27,14	4,40	28,54	4,74
12	20,42	3,04	24,20	4,40	27,26	4,74
13	7,78	3,04	13,41	4,40	14,96	4,74
14	8,62	3,04	11,54	4,40	13,45	4,74
15	15,08	3,04	19,10	4,40	23,48	4,74
16	11,84	3,04	19,46	4,40	22,96	4,74
17	8,91	3,04	10,09	4,40	11,46	4,74
18	9,21	3,04	11,26	4,40	11,92	4,74
19	12,80	3,04	12,82	4,40	15,22	4,74
20	12,30	3,04	16,28	4,40	15,70	4,74
21	7,10	3,04	9,57	4,40	9,09	4,74
22	6,86	3,04	9,07	4,40	9,15	4,74
23	10,89	3,04	13,59	4,40	15,06	4,74
24	10,67	3,04	13,57	4,40	15,28	4,74
25	9,13	3,04	13,39	4,40	11,40	4,74
26	11,40	3,04	10,45	4,40	10,91	4,74
27	11,94	3,04	15,70	4,40	15,32	4,74
28	12,36	3,04	16,28	4,40	14,45	4,74
29	7,66	3,04	10,15	4,40	10,27	4,74
30	7,34	3,04	9,65	4,40	9,61	4,74
31	11,10	3,04	7,94	4,40	14,67	4,74
32	11,30	3,04	11,98	4,40	13,25	4,74

Com exceção da condição central 2, as condições centrais de crescimento da biomassa em glicerol (Figura 25), as leveduras apresentaram bons crescimento de leveduras, observados pelo ângulo da curva, chegando a atingir concentrações finais próximas de condições que começaram com o dobro da concentração de leveduras.



**Figura 25:** Concentrações de biomassa da *K. pastoris* em 30 °C durante a fase de crescimento em glicerol.

A Figura 26 mostra a concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de indução, que embora tenham tido expressivas, ainda foi uma taxa de crescimento em torno de 30% menor que a condição 11 nas primeiras 24 horas de indução.

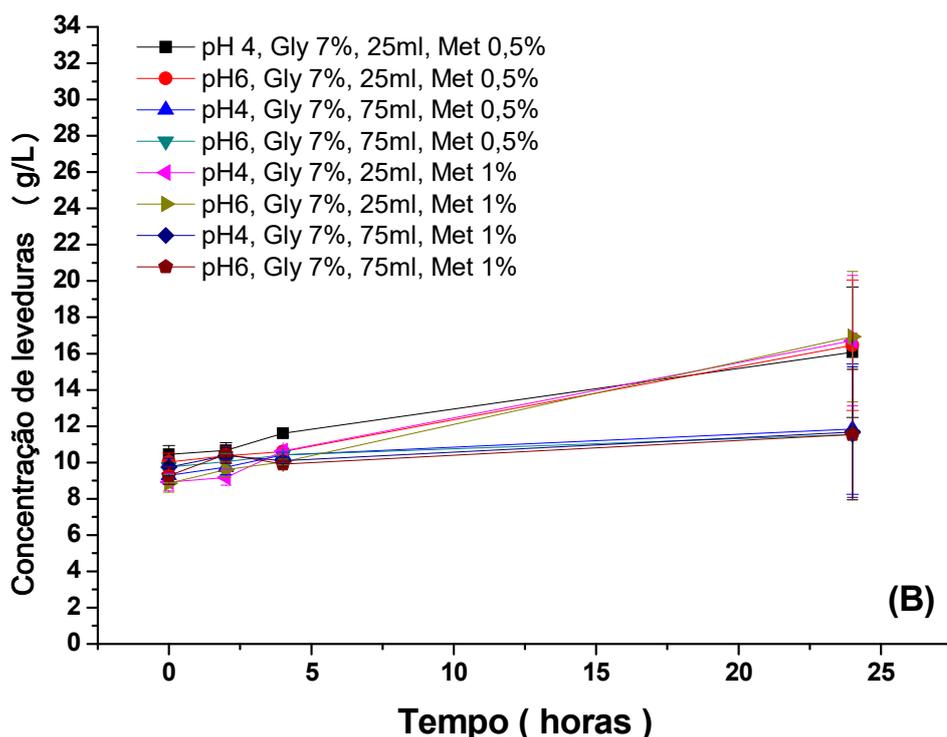
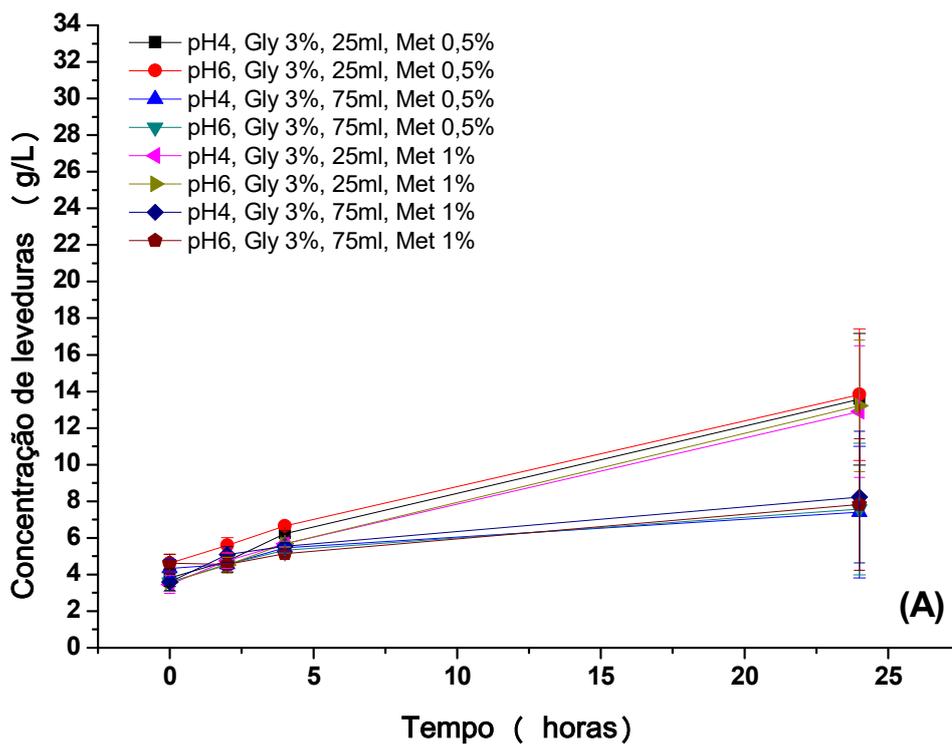


**Figura 26:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* em 30 °C durante a fase de indução em metanol.

Esperava-se, no entanto que a levedura se obtivesse suas condições de crescimento na temperatura de 30 °C, por ser a temperatura recomendada de fermentação tanto no Manual da *PichiaEasySelect* como também a aplicada na maioria dos trabalhos acadêmicos envolvendo produção heteróloga da *Pichia*. Esse resultado, com as maiores taxas de crescimento a 25 °C, se torna uma linha interessante de desenvolver maiores trabalhos, pois até a conclusão dessa dissertação, não houve (ao meu conhecimento) estudos sobre o efeito da temperatura na produção da proteína expansina BsEXLX1 em *K. pastoris*.

A Figura 27 demonstra que as curvas de crescimento a glicose, em 35 °C, estão basicamente divididas em dois padrões de crescimento, formando basicamente 4 linhas bem definidas.

Analisando esse padrão da Figura 27, percebe-se que as fermentações com maiores crescimentos são as que continham 25 mL de meio, enquanto que as menores continham 75 mL, indicando que a 35 °C a aeração pode ser significativa para o bom crescimento da levedura, ou até mesmo determinante para sua viabilidade.



**Figura 27:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase crescimento com glicerol a 35 °C. O Gráfico (A) representa as condições com 3% de glicerol. O Gráfico (B) representa as condições com 7% de glicerol.

A condição 31 (pH = 4, 7% de glicerol, 75 mL e metanol 1%) da Figura 29 apresentou forte queda na concentração após a indução, evento também observado com a mesma condição no planejamento 3 com a glicose. Os dois

experimentos foram realizados com meios diferentes com tampões diferentes. O mesmo meio foi utilizado para a condição 27 (pH = 4, 7% de glicerol, 25 mL, metanol 1%), que não apresentou tal comportamento descartando erro de preparo do meio. Comparando a condição 32 dos dois planejamentos, observa-se que embora não tenha tido queda tão acentuada, não houve crescimento significativo.

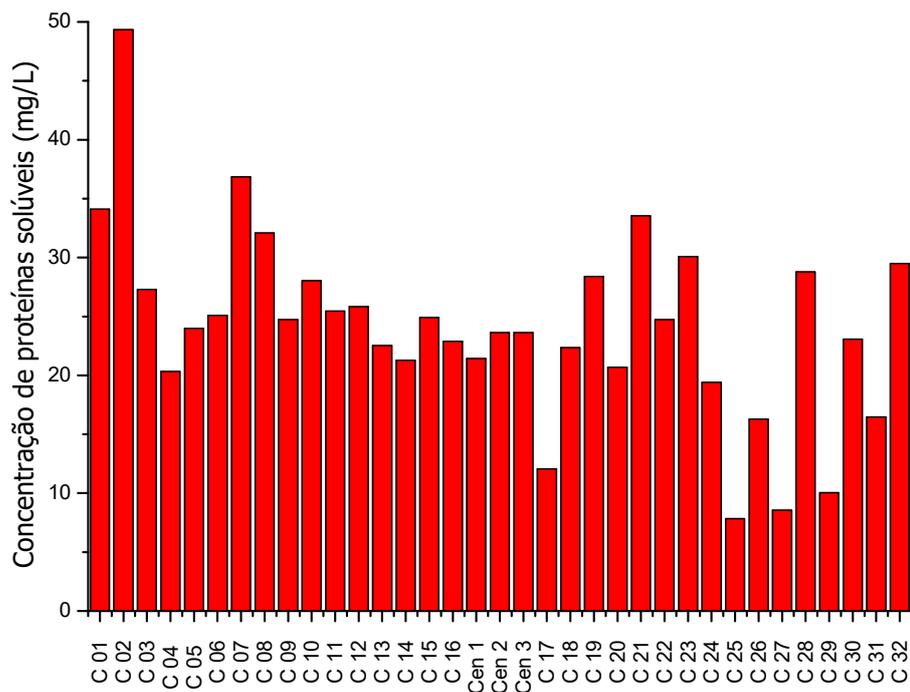
A *K. pastoris* depende de grande aeração para a metabolização do metanol, pois ela incorpora oxigênio para a formação de formaldeído.<sup>69</sup> Os fatores que podem ocasionar menor quantidade dissolvido no meio são alto volume do meio e concentração de leveduras. As condições 31 e 32 tinham ambas as variáveis altas, juntamente com alta concentração de metanol. É possível que por conta desses fatores as leveduras tiveram maior dificuldade de crescer adequadamente. O pH mais ácido é um outro fator que parece dificultar ainda mais a metabolização do metanol.

Nessas condições, o aumento da concentração das fermentações 31 e 32 nas últimas 24 horas era esperado, por conta da eventual degradação do metanol no meio, bem como a diminuição da concentração de leveduras viáveis, diminuindo o consumo de oxigênio dissolvido.

#### 4.3.1.1 Determinação das proteínas por Bradford nas fermentações com glicerol/metanol

As leituras de Bradford (Figura 28) mostraram que 7 condições produziram acima de 30 mg/L, sendo que apenas a condição 2 passou a marca de 40 mg/L, chegando a 49 mg/L. A condição 1, que ocorreu em condições parecidas, salvo o pH, também teve uma produção aceitável, embora significativamente abaixo da condição 2.

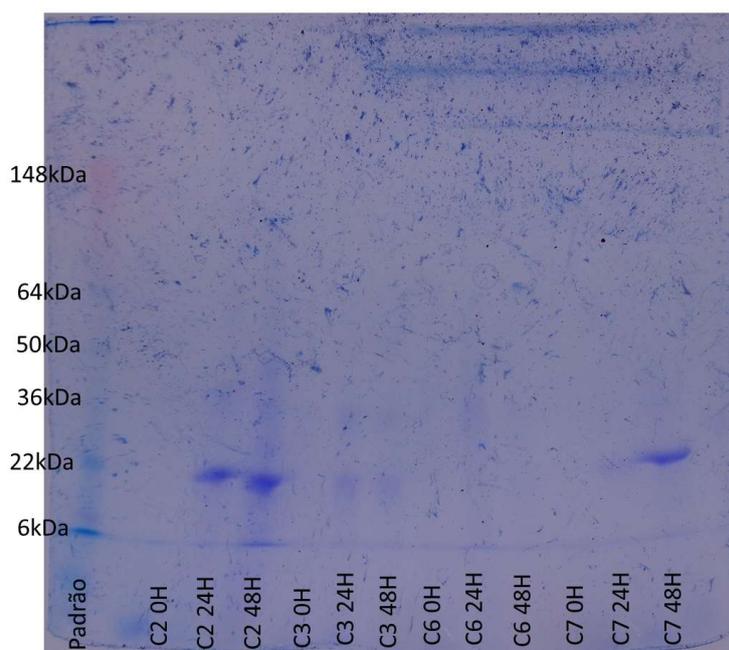
Se comparado com as taxas de crescimento, observa-se que a condição 2 teve uma das maiores, tanto com glicerol, quanto com metanol. Esses dados indicam que a cultura estava altamente viável e adaptada ao meio, podendo este ser o fator determinante para a boa produção da proteína recombinante em comparação com as outras condições.



**Figura 28:** Concentração de proteínas solúveis das fermentações com glicerol durante a fase de crescimento. Os dados das condições centrais estão representados como “Cen” e os das demais condições como “C” numerado de acordo com a matriz de planejamento.

#### 4.3.1.2 Eletroforese das condições 2,3,6 e 7

Fez-se análise via SDS-PAGE dos 3 pontos coletados de quatro condições para comparação com o observado no Bradford. Escolheu-se fazer com condições 2, 3, 6 e 7 pois estas foram fermentadas juntas, sendo que a condição 2 apresentou a maior produção de proteínas solúvel, como mostra a Figura 28. A ausência das proteínas na faixa de 22 kDa a 0 h de indução, como mostra a Figura 29, são uma forte indicação que a proteína visualizada é de fato a expansina.



**Figura 29:** Gel SDS-PAGE concentrado em 5X usando-se TCA. Foram analisadas as condições 2, 3, 6 e 7 da matriz de planejamento do experimento com glicerol.

#### 4.3.2 Planejamento experimental 3 com glicose

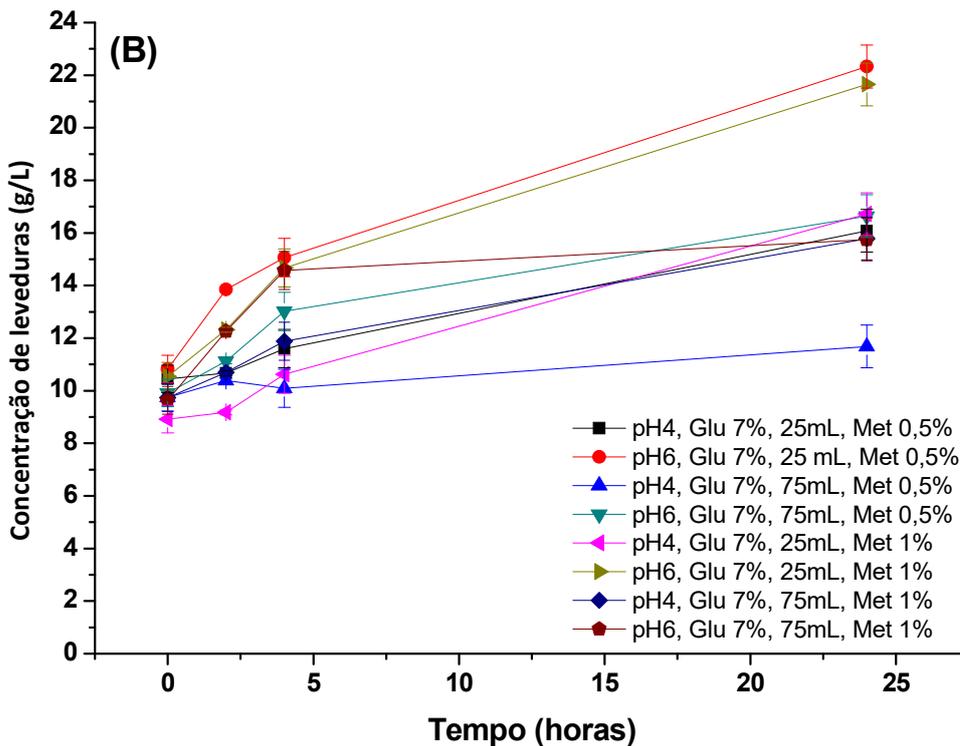
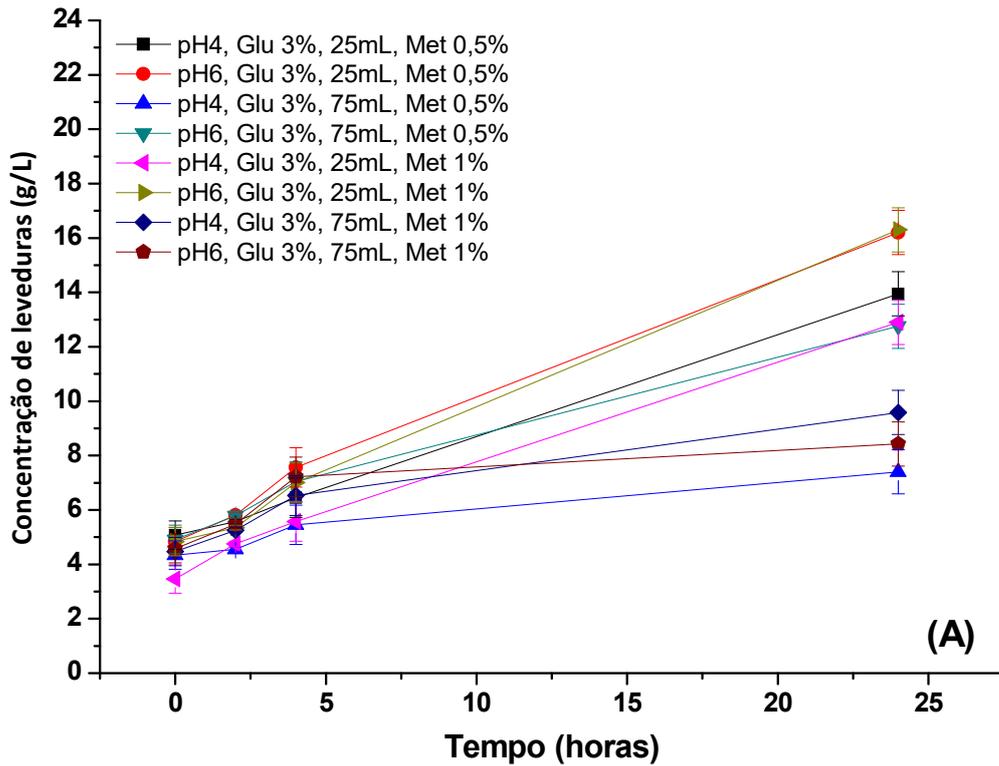
Assim como no experimento anterior, as fermentações foram divididas em três etapas: Pre-inóculo, crescimento de biomassa e indução de acordo com o manual da *PichiaEasy Select* da Invitrogen, buscou-se ver os efeitos dos principais fatores responsáveis para a boa expressão de proteínas recombinantes, sendo que os níveis dos fatores foram definidos também de acordo com os valores aceitáveis na literatura e no manual do kit *EasySelect Pichia Expression*.<sup>64, 68</sup>

O planejamento experimental 3 (Tabelas 3 e 4) baseia-se em planejamento fatorial completo 2<sup>5</sup>. Variando o pH, taxas de concentração de glicerol durante o crescimento, o volume do meio, a concentração de metanol durante a fase de indução e a temperatura.

As curvas de crescimento foram divididas da mesma forma as apresentadas no planejamento fatorial 2, sendo divididas em duas, uma contendo a fase de crescimento em glicerol e a outra a fase de indução a metanol. Também se agrupou os gráficos nas condições de mesma temperatura, sendo os 2 primeiros gráficos apresentados na condição 25 °C,

seguidos pelos 2 gráficos da condição do ponto central a 30 °C, e por fim os dois da condição de 35 °C.

De acordo com a Figura 30 (A) e (B), a maioria das condições com glicose atingiu níveis de concentração de leveduras acima de 10 g/L, com exceção das condições com glicerol 3% e 75 mL, resultado semelhante ao observado no planejamento 2 com glicerol. As duas maiores concentrações, acima de 20 g/L, foram com as condições 4 e 12 que continham meio com pH = 6, 7% e 25 mL, ou seja, são duas reações homólogas nessa etapa do planejamento fatorial. Além dessas duas, as outras reações que tiveram expressiva taxa de crescimento foram 1, 2, 9 e 10, todas com glicose a 3% e 25 mL e a condição 6 com glicose a 3% e 75 mL de meio.



**Figura 30:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase crescimento em glicose a 25°C. O Gráfico (A) representa as condições com 3% de glicose. O gráfico (B) representa as condições com 7% de glicose.

Novamente, observa-se, na Figura 30, todas as 4 condições com 3% de

glicose em 25 mL (Condições 1, 2, 9 e 10) com crescimento de biomassa significativamente maiores que as demais condições, chegando a atingir níveis de concentração finais semelhantes as condições que começaram com 12,5 % de inóculo em 7% de glicose, ou seja, com mais que o dobro da concentração de levedura inicial. Levando a forte indicação de que alta aeração do meio com menor quantidade de inóculo favorece um melhor crescimento de biomassa em glicerol e também em glicose.

O perfil de crescimento das leveduras em metanol nesse planejamento 3, difere-se do planejamento 2 por ter maior variabilidade entre as diferentes condições. Porém o perfil de crescimento maior nas primeiras 24 horas, passando a estagnar ou a crescer com uma menor taxa nas últimas 24 h, permanece, como mostra a Tabela 6. As condições com as maiores taxas foram 8 (pH = 6, 7% de glicose, 75 mL e metanol 0,5%), 9 (pH = 4, 3% de glicose, 25 mL e metanol 1%), 11 (pH = 4, 7% de glicose, 25 mL, metanol 1%) e 16 (pH = 6, 7% de glicose, 75 mL e metanol 1%). Todas essas condições, com exceção da 8, foram também as que apresentaram as maiores taxas no planejamento experimental 2 com glicerol.

**Tabela 6:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de indução por metanol após crescimento em glicerol.

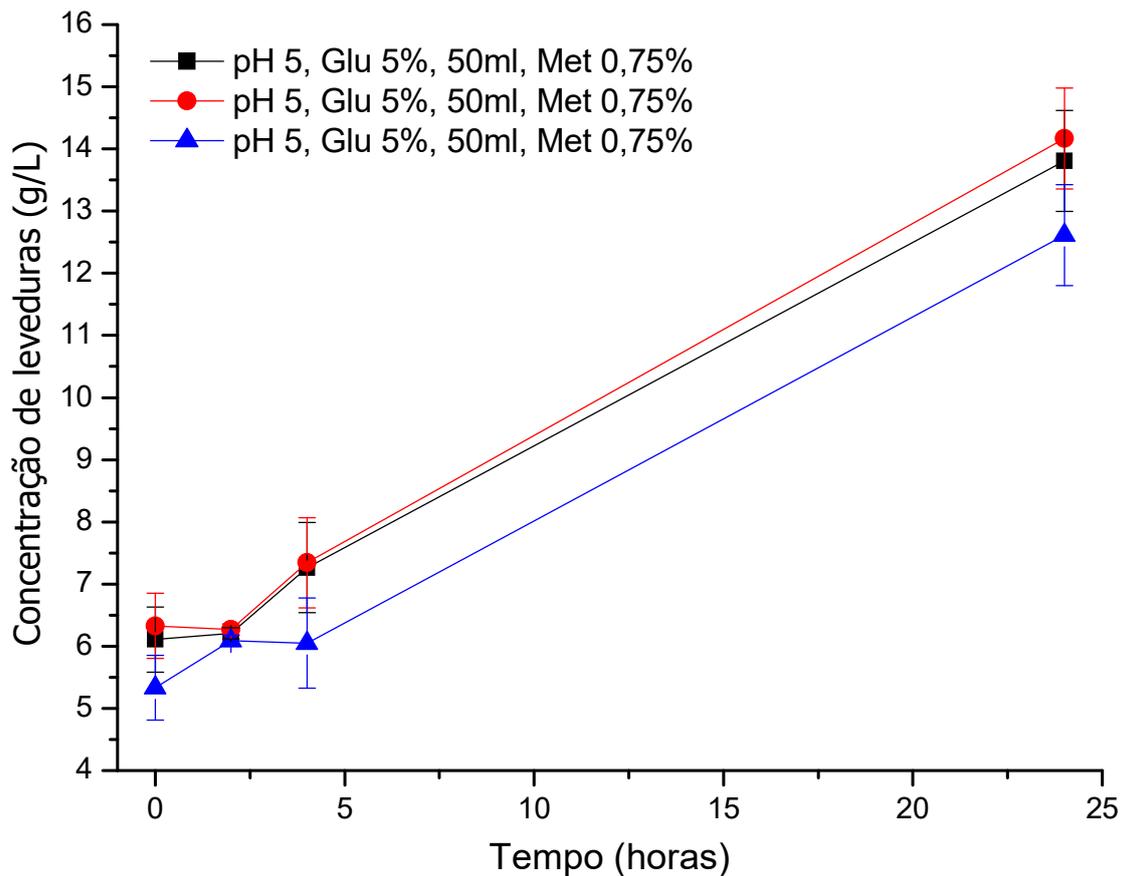
<b>Condições</b>	<b>24 horas</b>	<b>Erro</b>	<b>48 horas</b>	<b>Erro</b>	<b>72 horas</b>	<b>Erro</b>
<b>1</b>	11,46	0,47	14,37	0,24	15,00	1,12
<b>2</b>	11,42	0,47	13,93	0,24	12,89	1,12
<b>3</b>	12,26	0,47	14,33	0,24	14,61	1,12
<b>4</b>	10,47	0,47	12,58	0,24	13,83	1,12
<b>5</b>	12,64	0,47	14,95	0,24	14,95	1,12
<b>6</b>	12,80	0,47	12,82	0,24	15,22	1,12
<b>7</b>	15,52	0,47	18,71	0,24	18,29	1,12
<b>8</b>	7,10	0,47	9,57	0,24	9,09	1,12
<b>9</b>	11,02	0,47	13,61	0,24	13,15	1,12
<b>10</b>	11,10	0,47	12,76	0,24	14,67	1,12
<b>11</b>	15,52	0,47	19,54	0,24	18,57	1,12
<b>12</b>	9,13	0,47	13,39	0,24	11,40	1,12
<b>13</b>	11,34	0,47	13,41	0,24	13,25	1,12
<b>14</b>	11,94	0,47	15,70	0,24	15,32	1,12
<b>15</b>	16,30	0,47	15,84	0,24	16,26	1,12
<b>16</b>	8,96	0,47	10,45	0,24	10,45	1,12
<b>17</b>	7,36	0,47	9,78	0,24	10,25	1,12
<b>18</b>	14,88	0,47	16,75	0,24	16,60	1,12
<b>19</b>	14,59	0,47	17,58	0,24	18,53	1,12
<b>20</b>	11,12	0,47	14,55	0,24	12,78	1,12
<b>21</b>	12,04	0,47	12,90	0,24	13,35	1,12
<b>22</b>	11,62	0,47	14,81	0,24	14,63	1,12
<b>23</b>	12,60	0,47	15,06	0,24	18,13	1,12
<b>24</b>	7,42	0,47	9,43	0,24	9,71	1,12
<b>25</b>	7,52	0,47	8,48	0,24	8,16	1,12
<b>26</b>	11,00	0,47	13,73	0,24	14,27	1,12
<b>27</b>	11,82	0,47	13,53	0,24	13,21	1,12
<b>28</b>	8,56	0,47	11,20	0,24	11,88	1,12
<b>29</b>	9,55	0,47	16,96	0,24	10,49	1,12
<b>30</b>	11,48	0,47	13,77	0,24	12,62	1,12
<b>31</b>	13,23	0,47	14,49	0,24	14,05	1,12
<b>32</b>	7,66	0,47	10,15	0,24	10,27	1,12

As concentrações finais de levedura, no entanto foram consideravelmente menores que as do planejamento anterior, chegando no máximo a 18 g/L ante 28 g/L de concentração quando fermentadas com glicerol. Análises de HPLC (dados não mostrados) não detectaram presença de glicose no início da indução com metanol, eliminando a possibilidade de repressão da expressão do gene AOX1 por glicose. Essa diferença de crescimento dos dois

planejamentos, pode ter sido ocasionada pela dificuldade da levedura em se adaptar as condições mais limitantes de crescimento com metanol vindo da metabolização de glicose.

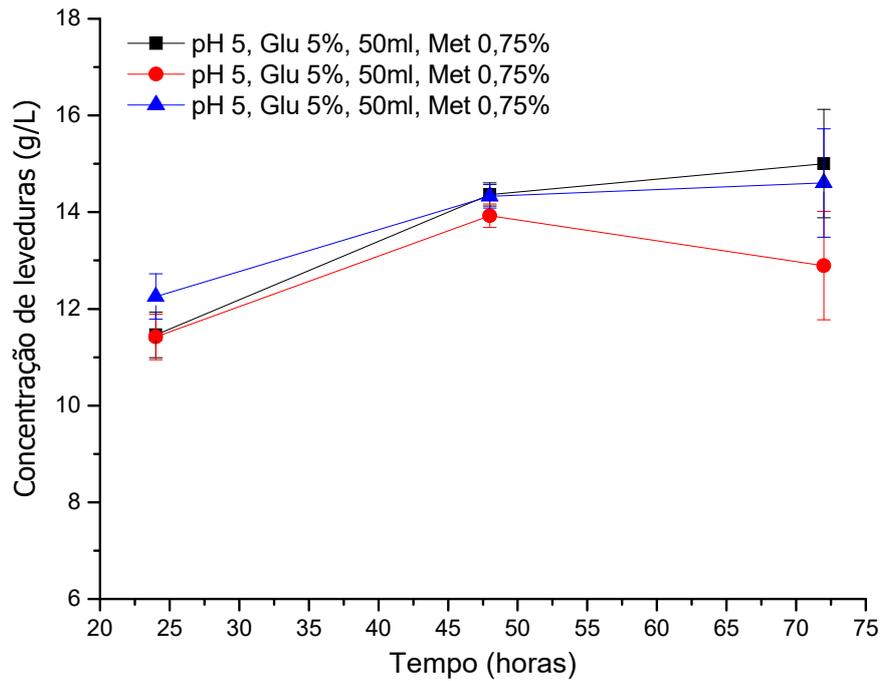
Na Tabela 07 também fica em evidente a curva da condição 26 (pH = 6, 3% de glicose, 25 mL e metanol 1%) o forte declínio da concentração da levedura após 24 horas de indução com metanol. Têm-se observado que as culturas que chegaram a concentrações superiores a 16 g/L apresentam estagnação do crescimento ou morte celular, apresentado através do declínio da concentração, nas 24 horas seguidas.

A Figura 31 apresenta a curva de crescimento da *K. pastoris* nas condições centrais, as quais foram feitas em triplicata para cálculo do erro experimental e análise do crescimento no que se acredita ser as condições ideais do planejamento fatorial. Nota-se que as concentrações finais de levedura estão em torno da média observada com as condições feitas a 25° C, não demonstrando grande vantagem em relação à algumas condições feitas, como as que continham menor quantidade de inóculo e menor quantidade de meio, sendo que essas outras condições chegaram a ter até 18 g/L de concentração final.



**Figura 31:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de crescimento do ponto central do Planejamento 3 feito em triplicata a 30°C com glicose a 5%.

A Figura 32 apresenta a curva de crescimento feito com os pontos centrais após a lavagem do meio com glicose e adição do meio BMMY 0,75%. Como observado em todas as fermentações até agora, ocorre-se uma perda de biomassa durante a lavagem das leveduras, porém as culturas crescem e voltam a se estabilizar com uma concentração em torno de 14 g/L.



**Figura 32:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de indução na condição do ponto central do Planejamento 3.

A Figura 33 apresenta os dados das fermentações realizadas com a temperatura de 35 °C na etapa de crescimento celular em glicose. Observa-se um perfil bem semelhante entre as diferentes condições do planejamento 3, com destaque a condição 21 (pH = 4, 3% de Glicose, 75 mL), onde teve-se uma acentuada queda da concentração após um alto crescimento nas primeiras 4 horas de fermentação, a maior taxa observada em todas as fermentações. Novamente as condições com 3% de glicose em 25 mL apresentaram na média as maiores taxas entre as condições.

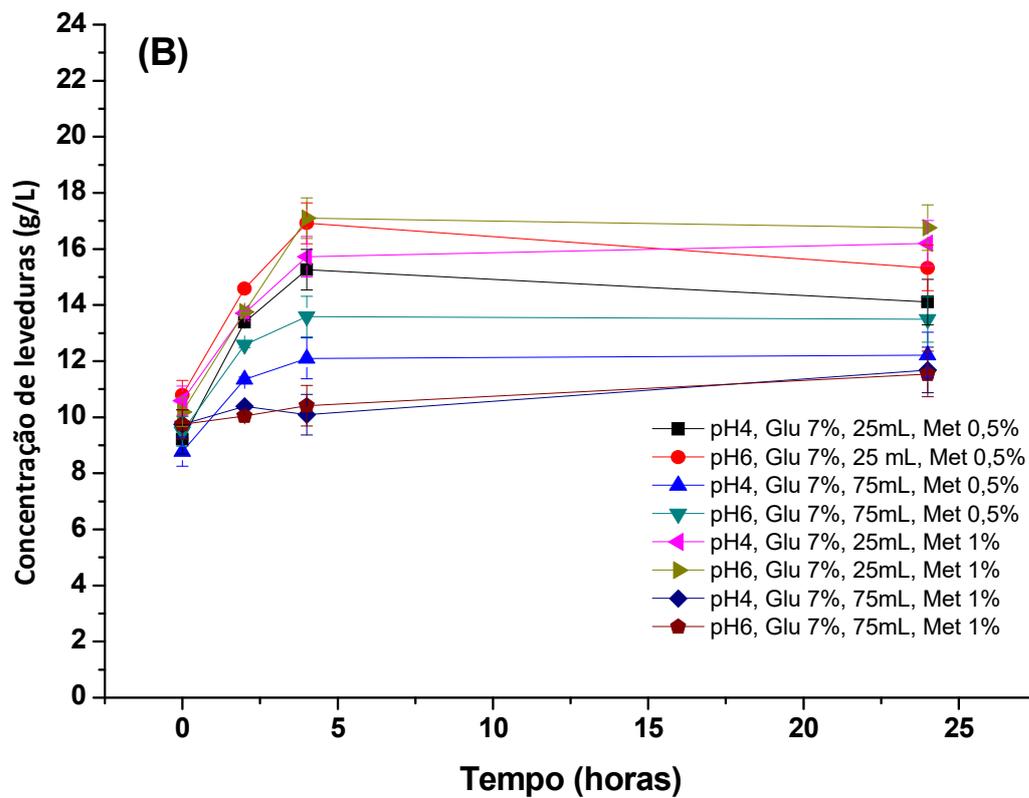
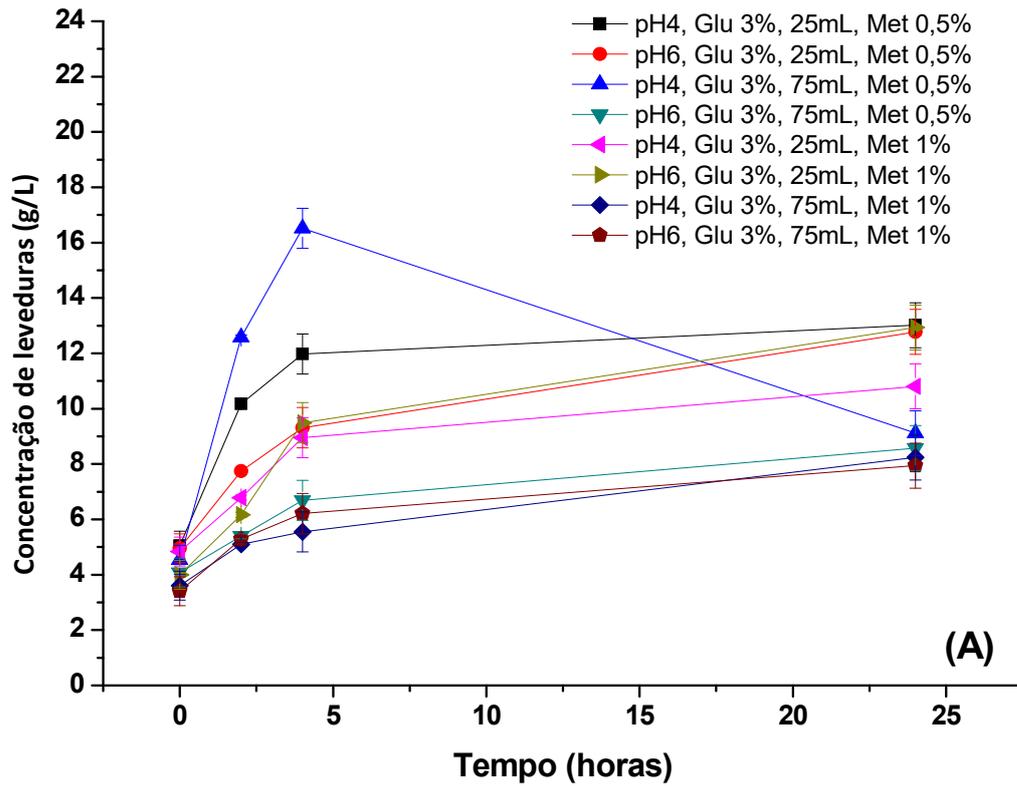


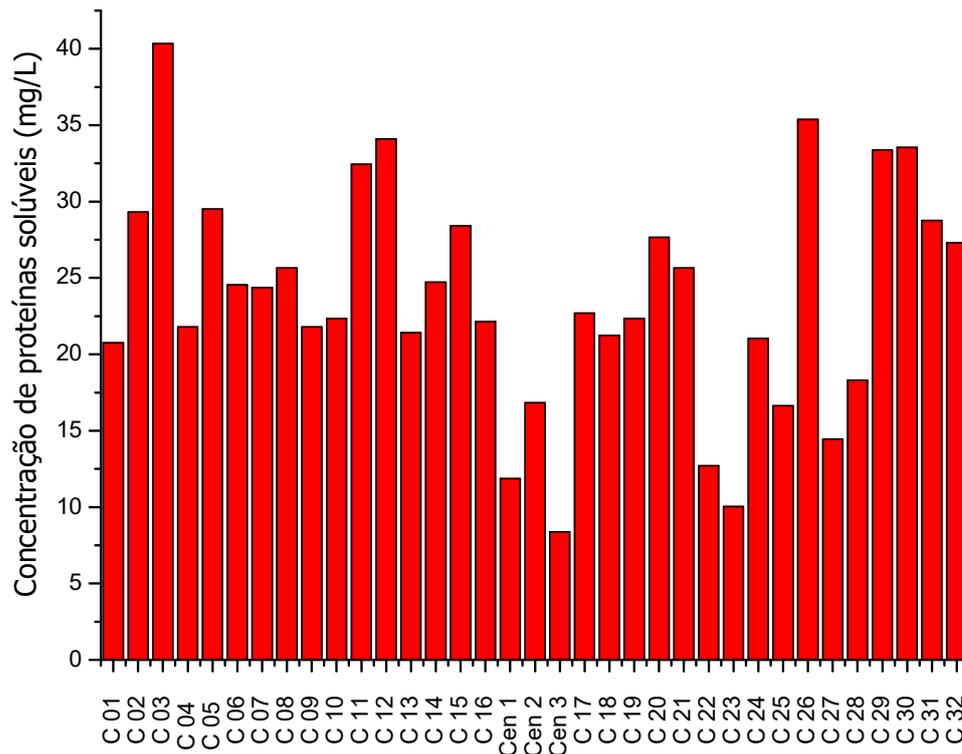
Figura 33: Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante as 24 horas da fase de crescimento com glicose em 35 °C.

Nota-se que o crescimento da *K. pastoris* na condição 31 (pH = 4, 7% de glicose, 75 mL e metanol 1%) mostrado na Figura 31(B) é menor que as demais observadas durante a fase de crescimento.

#### 4.3.2.1 Determinação das proteínas por Bradford nas fermentações com glicose/metanol

As leituras de Bradford na Figura 34 mostraram que as condições que mais produziram, acima de 30 mg/L, ocorreram com fermentação com 25 mL de volume, com exceção apenas das condições 29 e 30 que tinham as condições de 3% de glicose, 75 mL de meio e metanol a 1%. Em linha do que foi observado com as fermentações a glicerol, a condição 2 (pH = 6, 3% de glicose, 25 mL e metanol 0,5%) produziu bem, sendo a condição que apresentou a melhor taxa entre as fermentações com glicose, chegando a produzir 40 mg/L.

Outra condição que teve boa taxa de produção foi a 26 (pH = 6, 3% de glicose, 25 mL e metanol 1%) produzindo 35 mg/L. Analisando a curva de crescimento, percebe-se que as taxas de crescimento dessas condições, principalmente durante fase da indução a metanol, foram significativamente mais altas, muito embora a condição 26 apresentou forte declínio de sua concentração de biomassa nas últimas 24 horas do experimento.

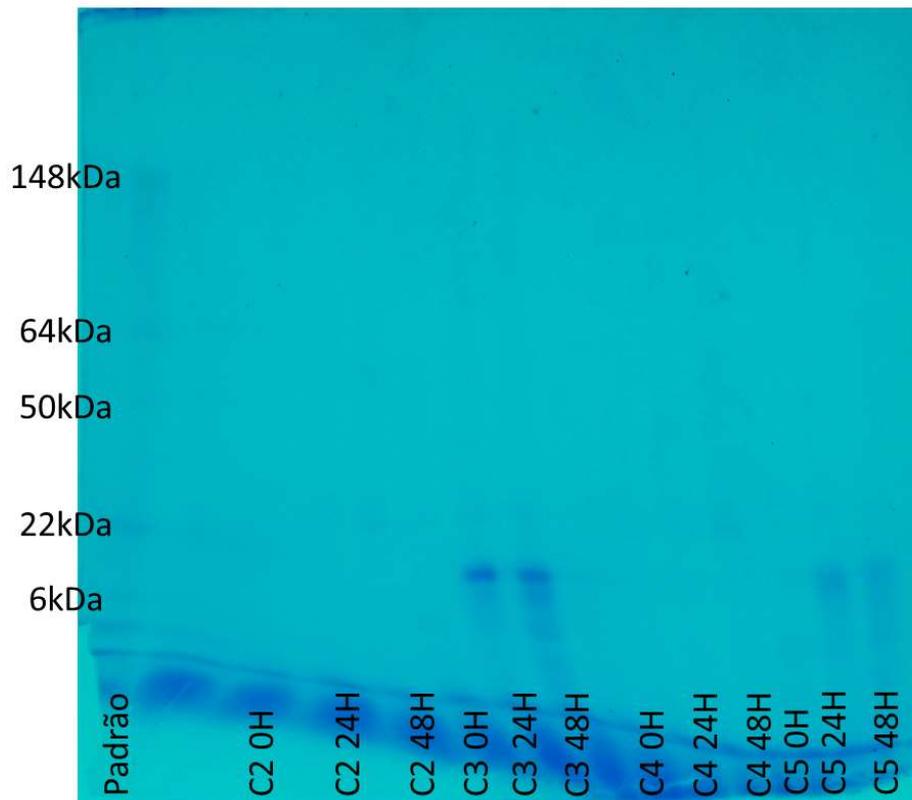


**Figura 34:** Concentração de proteínas solúveis das fermentações com glicose durante a fase de crescimento. Os dados das condições centrais estão representados como “Cen” e os das demais condições como “C” numerado de acordo com a matriz de planejamento.

#### 4.3.2.2 Eletroforese das condições 2, 3, 4 e 5

Com intuito de visualizar se de fato as proteínas medidas no Bradford eram a expansina, fez-se análise via SDS-PAGE dos 3 pontos coletados de quatro condições para comparação com o observado no Bradford.

Escolheu-se fazer com condições 2, 3, 4 e 5, pois a condição 2 apresentou a maior produção de proteínas solúvel. Analisou-se as fermentações das condições 3, 4 e 5, pois também foram executadas em conjunto com a condição 2. A ausência das proteínas na faixa de 22 kDa a 0 h de indução são uma forte indicação que a proteína visualizada é de fato a expansina, como mostra a Figura 35.



**Figura 35:** Gel SDS-PAGE concentrado com TCA em 5X da condição 2, 3, 4 e 5 de glicerol. Condição 3 teve a maior expressão entre todas as condições.

## 5 - Conclusões e Perspectivas

O planejamento experimental 1 demonstrou que a *Pichia stipitis* tende a produzir mais etanol em condições anaeróbicas mais ácidas, não afetando de forma significativa no crescimento da levedura. A concentração de biomassa foi apenas afetada pela concentração de inóculo, não ocorrendo alterações significativas, mesmo quando se observou condições anaeróbicas de crescimento.

O crescimento da *K. pastoris* em glicerol a 25°C foi significativamente maior comparando com as temperaturas de 35°C e até mesmo de 30°C, com a condição 10 (pH = 6, 25 mL e 1% de metanol) produzindo biomassa até 4 vezes maior que a quantidade inicial de biomassa. Observou-se que as condições que promoviam maior áreação, através do menor volume no frasco, promoviam as maiores taxas de crescimento. Durante a fase de indução com metanol houve uma diminuição na taxa de crescimento, mas as condições a 25°C ainda apresentaram as melhores condições de crescimento, especialmente as que continham baixo volume de meio, observando um sinergismo entre essas duas variáveis.

No planejamento experimental 3 com glicose, as taxas de crescimento foram bem menores comparadas as mesmas condições em glicerol. Porém observou-se o mesmo comportamento, a temperaturas mais baixas há um maior crescimento quando comparado a temperatura maior (35°C). As condições a 35°C tiveram uma estagnação do crescimento após as 4 horas de fermentação. Durante a fase de indução as condições a 35°C apresentaram em sua maioria nenhum crescimento significativo nas 48 horas de indução. Nas outras temperaturas houve pouco ganho de biomassa, em torno de 2 gramas em média, tendo uma estagnação nesse crescimento após as 24 horas de indução.

A diferença da produção das proteínas recombinantes não foi tão acentuada em relação a mudança de fonte de carbono na etapa de crescimento do inóculo, como foi observado para o crescimento da *K. pastoris*. Contudo, observa-se que com o glicerol houve um maior número de condições que ultrapassaram a marca de 25 mg/L de proteínas produzidas. Foi com glicerol também que se atingiu a maior produção entre os dois planejamentos,

ultrapassando 49 mg/L na condição 2 (pH = 6, 3% de glicerol, 25 mL e 0,5% de metanol). Os resultados tornam-se mais significativo por conta das condições brandas de temperatura (25 °C), durante a execução desse trabalho não foi observado nenhum trabalho na literatura no qual utiliza-se estas condições.

Conclui-se, portanto, que para o primeiro passo de otimização da produção da proteína expansina BsEXLX1 tem-se como condições 3% glicerol, como fonte de carbono durante a fase de crescimento da levedura, e metanol a 0,5% durante a fase de indução. Ambas as etapas ocorreram na temperatura ótima de 25°C e 10% de volume de cultura no frasco.

Como esse novo processo descrito para a produção da proteína BsEXLX1, fica espaço para a fermentação em biorreatores para se atingir níveis mais altos de produção, até a total viabilidade de escalonamento a níveis industriais, possibilitando o emprego dessa proteína na fabricação de coquetéis enzimáticos para a desconstrução de matérias lignocelulósicas. Isso pode ser alcançado através de uma otimização das condições de fermentação em reator.

## 6 -Referências

- [1] DIKICIOGLU, D., WOOD, V., RUTHERFORD, K. M., MCDOWALL, M. D. & OLIVER, S. G. Improving Functional Annotation for Industrial Microbes: A Case Study with *Pichia Pastoris*. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 396-399, 2014.
- [2] COS, O., RAMÓN, R., MONTESINOS, J. L. & VALERO, F. Operational Strategies, Monitoring and Control of Heterologous Protein Production in the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris* under Different Promoters: A Review. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 1, p. 17, 2006.
- [3] CEREGHINO, J. L. & CREGG, J. M. Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.
- [4] SIEMINSKI, A. International Energy Outlook. **Energy Information Administration (EIA)**, 2014.
- [5] SANDERSON, K. Lignocellulose: A Chewy Problem. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. S12-S14, 2011.
- [6] JOHNSON, T. G. & ALTMAN, I. Rural Development Opportunities in the Bioeconomy. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 341-344, 2014.
- [7] TOBIAS, M. C. & MORRISON, J. G. Bioeconomics: A New National Blueprint. In: (Ed.). **Why Life Matters: Fifty Ecosystems of the Heart and Mind**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p.97-98.
- [8] BARANAUSKAS, V. Large Scale Fuel Farming in Brazil. **IEEE Technology and Society Magazine**, v. 2, n. 1, p. 12-20, 1983.
- [9] DA CRUZ, M. G., GUERREIRO, E. & RAIHER, A. P. A Evolução Da Produção De Etanol No Brasil, No Período De 1975 a 2009. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 43, n. 4, p. 141-160, 2016.
- [10] MILANEZ, A. Y., NYKO, D., GARCIA, J. L. F. & REIS, B. L. S. F. S. O Déficit De Produção De Etanol No Brasil Entre 2012 E 2015: Determinantes, Consequências E Sugestões De Política. **BNDES Setorial**, n. 35, mar. 2012, p. 277-302, 2012.
- [11] NYKO, D., VALENTE, M. S., MILANEZ, A. Y., TANAKA, A. K. R. & RODRIGUES, A. V. P. A Evolução Das Tecnologias Agrícolas Do Setor Sucroenergético: Estagnação Passageira Ou Crise Estrutural? **BNDES Setorial**, n. 37, mar. 2013, p 399-442, 2013.
- [12] LYND, L. R., LASER, M. S., BRANSBY, D., DALE, B. E., DAVISON, B., HAMILTON, R., HIMMEL, M., KELLER, M., MCMILLAN, J. D., SHEEHAN, J. & WYMAN, C. E. How Biotech Can Transform Biofuels. **Nat Biotech**, v. 26, n. 2, p. 169-172, 2008.
- [13] BADGER, P. Ethanol from Cellulose: A General Review. **Trends in new crops and new uses**, v. 14, p. 17-21, 2002.
- [14] COSGROVE, D. J. Growth of the Plant Cell Wall. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.
- [15] SAMPATHKUMAR, A., YAN, A., KRUPINSKI, P. & MEYEROWITZ, ELLIOT M. Physical Forces Regulate Plant Development and Morphogenesis. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R475-R483, 2014.

- [16] SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S. & AIKAT, K. Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An Overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.
- [17] KIM, I. J., LEE, H. J., CHOI, I.-G. & KIM, K. H. Synergistic Proteins for the Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose by Cellulase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8469-8480, 2014.
- [18] PAULY, M. & KEEGSTRA, K. Plant Cell Wall Polymers as Precursors for Biofuels. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 3, p. 304-311, 2010.
- [19] LIEPMAN, A. H., WIGHTMAN, R., GESHI, N., TURNER, S. R. & SCHELLER, H. V. Arabidopsis—a Powerful Model System for Plant Cell Wall Research. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 1107-1121, 2010.
- [20] LE GALL, H., PHILIPPE, F., DOMON, J.-M., GILLET, F., PELLOUX, J. & RAYON, C. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. **Plants**, v. 4, n. 1, p. 112, 2015.
- [21] COSGROVE, D. J. Expansive Growth of Plant Cell Walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 109-124, 2000.
- [22] COSGROVE, D. J. Re-Constructing Our Models of Cellulose and Primary Cell Wall Assembly. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 22, p. 122-131, 2014.
- [23] MACHADO, C. R., D; MENDES, T; PACHECO, T. **Microrganismos Na Produção De Biocombutíveis Líquidos**. Embrapa Agroenergia, 2013.
- [24] LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H. & PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- [25] LI, S., BASHLINE, L., ZHENG, Y., XIN, X., HUANG, S., KONG, Z., KIM, S. H., COSGROVE, D. J. & GU, Y. Cellulose Synthase Complexes Act in a Concerted Fashion to Synthesize Highly Aggregated Cellulose in Secondary Cell Walls of Plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201613273, 2016.
- [26] HAIGLER, C. H., GRIMSON, M. J., GERVAIS, J., LE MOIGNE, N., HÖFTE, H., MONASSE, B. & NAVARD, P. Molecular Modeling and Imaging of Initial Stages of Cellulose Fibril Assembly: Evidence for a Disordered Intermediate Stage. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93981, 2014.
- [27] WORDEN, N., PARK, E. & DRAKAKAKI, G. Trans-Golgi Network—an Intersection of Trafficking Cell Wall Components. **Journal of integrative plant biology**, v. 54, n. 11, p. 875-886, 2012.
- [28] VAN DEN BRINK, J. & DE VRIES, R. P. Fungal Enzyme Sets for Plant Polysaccharide Degradation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477-1492, 2011.
- [29] WILLATS, W. G. T., MCCARTNEY, L., MACKIE, W. & KNOX, J. P. Pectin: Cell Biology and Prospects for Functional Analysis. In: CARPITA, N. C., CAMPBELL, M. & TIERNEY, M. (Ed.). **Plant Cell Walls**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001. p.9-27.
- [30] ZENG, Y., ZHAO, S., YANG, S. & DING, S.-Y. Lignin Plays a Negative Role in the Biochemical Process for Producing Lignocellulosic Biofuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 38-45, 2014.
- [31] KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J. & STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and

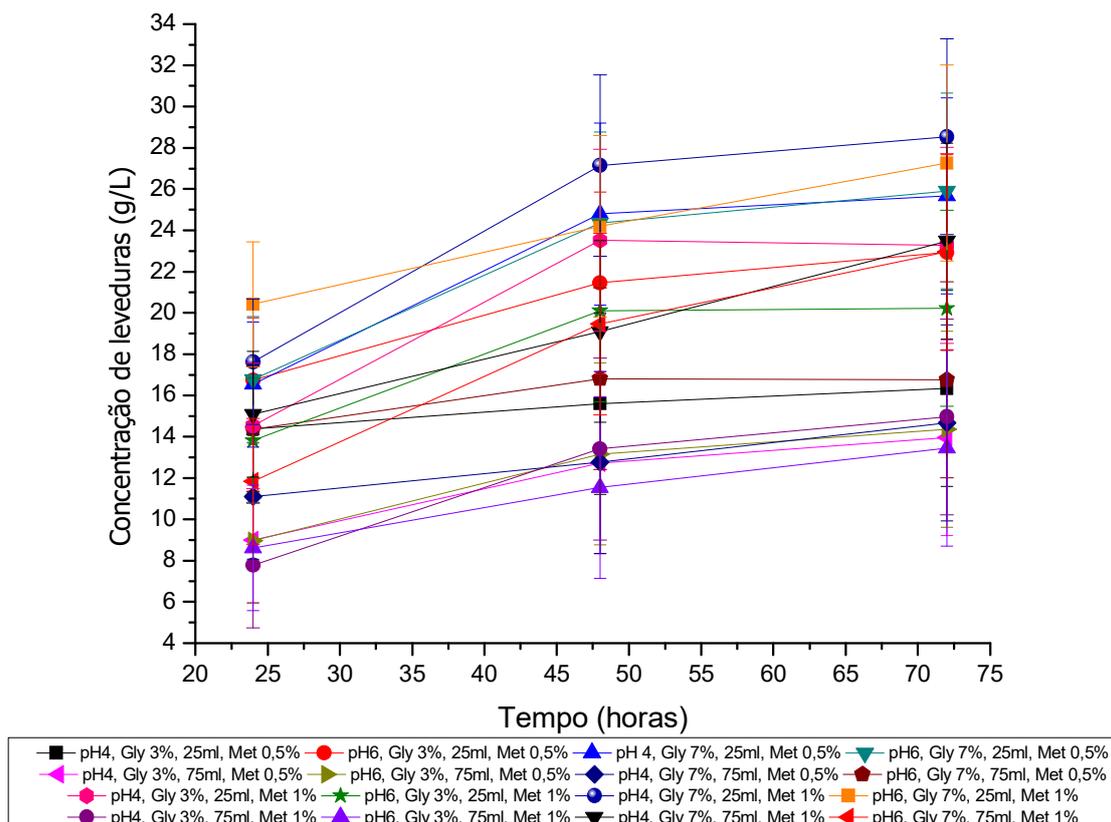
- Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.
- [32] ALCARDE, A. *Árvore Do Conhecimento Cana-De-Açúcar*. Disponível em: < [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_108\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html) >. Acesso em: 07/12/2016.
- [33] Acompanhamento Da Safra Brasileira, Cana-De-Açúcar. v. V. 3, n. 72, p. 1-72, 2016.
- [34] DIONISI, D., ANDERSON, J. A., AULENTA, F., MCCUE, A. & PATON, G. The Potential of Microbial Processes for Lignocellulosic Biomass Conversion to Ethanol: A Review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 366-383, 2015.
- [35] MILANEZ, A. Y., NYKO, D., VALENTE, M. S., SOUSA, L. C., BONOMI, A. M. F. L. J., JESUS, C. D. F. D., WATANABE, M. D. B., CHAGAS, M. F., REZENDE, M. C. A. F. & CAVALETT, O. De Promessa a Realidade: Como O Etanol Celulósico Pode Revolucionar a Indústria Da Cana-De-Açúcar: Uma Avaliação Do Potencial Competitivo E Sugestões De Política Pública. **BNDES Setorial, Rio de Janeiro**, n. 41, 2015.
- [36] SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. D., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M. & REZENDE, S. T. Potencial Da Palha De Cana-De-Açúcar Para Produção De Etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- [37] TUCKER, M. P., KIM, K. H., NEWMAN, M. M. & NGUYEN, Q. A. Effects of Temperature and Moisture on Dilute-Acid Steam Explosion Pretreatment of Corn Stover and Cellulase Enzyme Digestibility. In: DAVISON, B. H., LEE, J. W., FINKELSTEIN, M. & MCMILLAN, J. D. (Ed.). **Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-Fourth Symposium**. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. p.165-177.
- [38] OGEDA, T. L. & PETRI, D. F. Hidrólise Enzimática De Biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- [39] YU, Z., ZHANG, B., YU, F., XU, G. & SONG, A. A Real Explosion: The Requirement of Steam Explosion Pretreatment. **Bioresource technology**, v. 121, p. 335-341, 2012.
- [40] ZHAO, X., CHENG, K. & LIU, D. Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815-827, 2009.
- [41] MILLATI, R., SYAMSIAH, S., NIKLASSON, C., CAHYANTO, M. N., LUDQUIST, K. & TAHERZADEH, M. J. Biological Pretreatment of Lignocelluloses with White-Rot Fungi and Its Applications: A Review. **BioResources**, v. 6, n. 4, p. 5224-5259, 2011.
- [42] SARITHA, M. & ARORA, A. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 2, p. 122-130, 2012.
- [43] BROWN, T. R. & BROWN, R. C. A Review of Cellulosic Biofuel Commercial-Scale Projects in the United States. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, n. 3, p. 235-245, 2013.
- [44] SEIBOTH, B., IVANOVA, C. & SEIDL-SEIBOTH, V. **Trichoderma Reesei: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels**. INTECH Open Access Publisher Rijeka, 2011.

- [45] SADHU, S. & MAITI, T. K. Cellulase Production by Bacteria: A Review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235, 2013.
- [46] ARANTES, V. & SADDLER, J. N. Access to Cellulose Limits the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis: The Role of Amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.
- [47] MANSFIELD, S. D., MOONEY, C. & SADDLER, J. N. Substrate and Enzyme Characteristics That Limit Cellulose Hydrolysis. **Biotechnology progress**, v. 15, n. 5, p. 804-816, 1999.
- [48] GILLIGAN, W. & REESE, E. T. Evidence for Multiple Components in Microbial Cellulases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 90-107, 1954.
- [49] REESE, E. T., SIU, R. G. & LEVINSON, H. S. The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and Its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 4, p. 485, 1950.
- [50] HU, J., GOURLAY, K., ARANTES, V., VAN DYK, J., PRIBOWO, A. & SADDLER, J. N. The Accessible Cellulose Surface Influences Cellulase Synergism During the Hydrolysis of Lignocellulosic Substrates. **ChemSusChem**, v. 8, n. 5, p. 901-907, 2015.
- [51] MCQUEEN-MASON, S., DURACHKO, D. M. & COSGROVE, D. J. Two Endogenous Proteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. **The Plant Cell**, v. 4, n. 11, p. 1425-1433, 1992.
- [52] KIM, I. J., KO, H.-J., KIM, T.-W., NAM, K. H., CHOI, I.-G. & KIM, K. H. Binding Characteristics of a Bacterial Expansin (Bsex1x1) for Various Types of Pretreated Lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5381-5388, 2013.
- [53] COSGROVE, D. J. Loosening of Plant Cell Walls by Expansins. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 2000.
- [54] LI, Y., DARLEY, C. P., ONGARO, V., FLEMING, A., SCHIPPER, O., BALDAUF, S. L. & MCQUEEN-MASON, S. J. Plant Expansins Are a Complex Multigene Family with an Ancient Evolutionary Origin. **Plant physiology**, v. 128, n. 3, p. 854-864, 2002.
- [55] GEORGELIS, N., NIKOLAIDIS, N. & COSGROVE, D. J. Bacterial Expansins and Related Proteins from the World of Microbes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 9, p. 3807-3823, 2015.
- [56] COSGROVE, D. J. Plant Expansins: Diversity and Interactions with Plant Cell Walls. **Current opinion in plant biology**, v. 25, p. 162-172, 2015.
- [57] BORON, A. K., VAN LOOCK, B., SUSLOV, D., MARKAKIS, M. N., VERBELEN, J.-P. & VISSENBERG, K. Over-Expression of Atex1a2 Alters Etiolated Arabidopsis Hypocotyl Growth. **Annals of botany**, v. 115, n. 1, p. 67-80, 2015.
- [58] NIKOLAIDIS, N., DORAN, N. & COSGROVE, D. J. Plant Expansins in Bacteria and Fungi: Evolution by Horizontal Gene Transfer and Independent Domain Fusion. **Molecular biology and evolution**, v. 31, n. 2, p. 376-386, 2014.
- [59] KERFF, F., AMOROSO, A., HERMAN, R., SAUVAGE, E., PETRELLA, S., FILÉE, P., CHARLIER, P., JORIS, B., TABUCHI, A. & NIKOLAIDIS, N. Crystal Structure and Activity of Bacillus Subtilis Yoaj (Ex1x1), a Bacterial Expansin That Promotes Root Colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 44, p. 16876-16881, 2008.

- [60] COSGROVE, D. J. **Enhancement of Accessibility of Cellulose by Expansins**: Google Patents 2001.
- [61] JAHIC, M., VEIDE, A., CHAROENRAT, T., TEERI, T. & ENFORS, S. O. Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia Pastoris*. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 6, p. 1465-1473, 2006.
- [62] BAWA, Z. & DARBY, R. A. Optimising *Pichia Pastoris* Induction. **Recombinant Protein Production in Yeast: Methods and Protocols**, p. 181-190, 2012.
- [63] MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M. L., MCNEIL, B. & HARVEY, L. M. Heterologous Protein Production Using the *Pichia Pastoris* Expression System. **yeast**, v. 22, 2005.
- [64] WANG, W., LIU, C., MA, Y., LIU, X., ZHANG, K. & ZHANG, M. Improved Production of Two Expansin-Like Proteins in *Pichia Pastoris* and Investigation of Their Functional Properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 16-27, 2014.
- [65] PASCHOALINI, G. & ALCARDE, V. E. Estudo Do Processo Fermentativo De Usina Sucroalcooleira E Proposta Para Sua Otimização. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2011.
- [66] WANG, X., CAI, M., SHI, L., WANG, Q., ZHU, J., WANG, J., ZHOU, M., ZHOU, X. & ZHANG, Y. Ppnrg1 Is a Transcriptional Repressor for Glucose and Glycerol Repression of Aox1 Promoter in Methylotrophic Yeast *Pichia Pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 291-298, 2016.
- [67] INAN, M. & MEAGHER, M. M. Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (Aox1) Promoter of *Pichia Pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 585-589, 2001.
- [68] LOOSER, V., BRUHLMANN, B., BUMBAK, F., STENGER, C., COSTA, M., CAMATTARI, A., FOTIADIS, D. & KOVAR, K. Cultivation Strategies to Enhance Productivity of *Pichia Pastoris*: A Review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1177-1193, 2015.
- [69] VOGL, T. & GLIEDER, A. Regulation of *Pichia Pastoris* Promoters and Its Consequences for Protein Production. **New biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385-404, 2013.

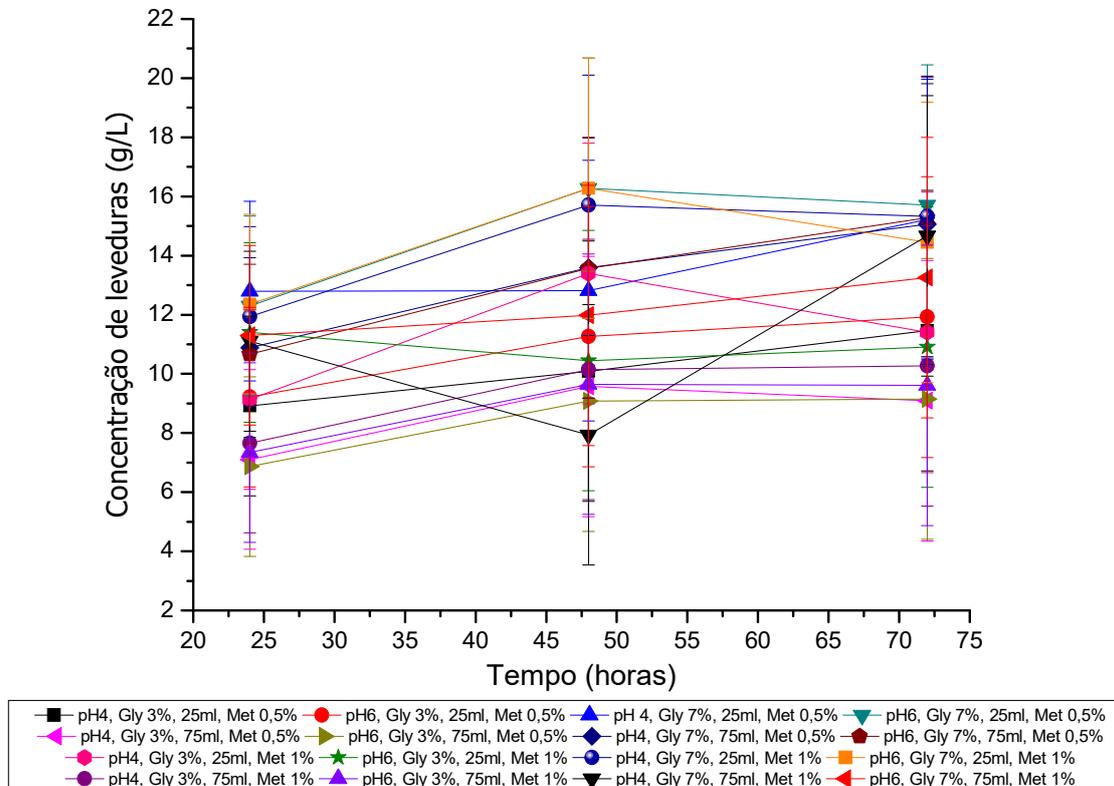
## Anexo A- Gráficos da fase de indução do Planejamento 2

A Figura 36 apresenta a concentração de biomassa da *K. pastoris* das condições 1 a 16, como mostradas na Tabela 04, durante as 48 horas da fase de indução a metanol a 25°C.



**Figura 36:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de indução por metanol a 25°C.

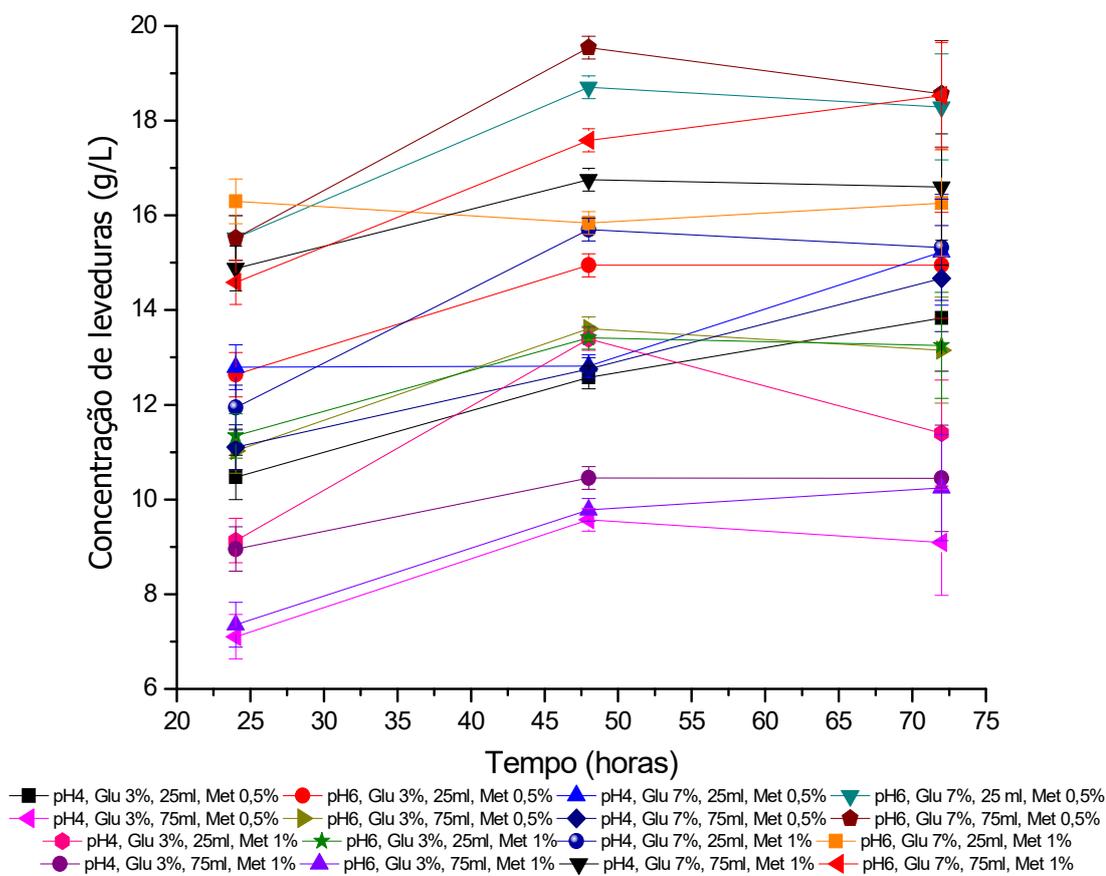
A Figura 37 apresenta a concentração de biomassa da *K. pastoris* das condições 17 a 32, como mostradas na Tabela 04, durante as 48 horas da fase de indução a metanol a 35°C.



**Figura 37:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante fase de indução por metanol a 35°C.

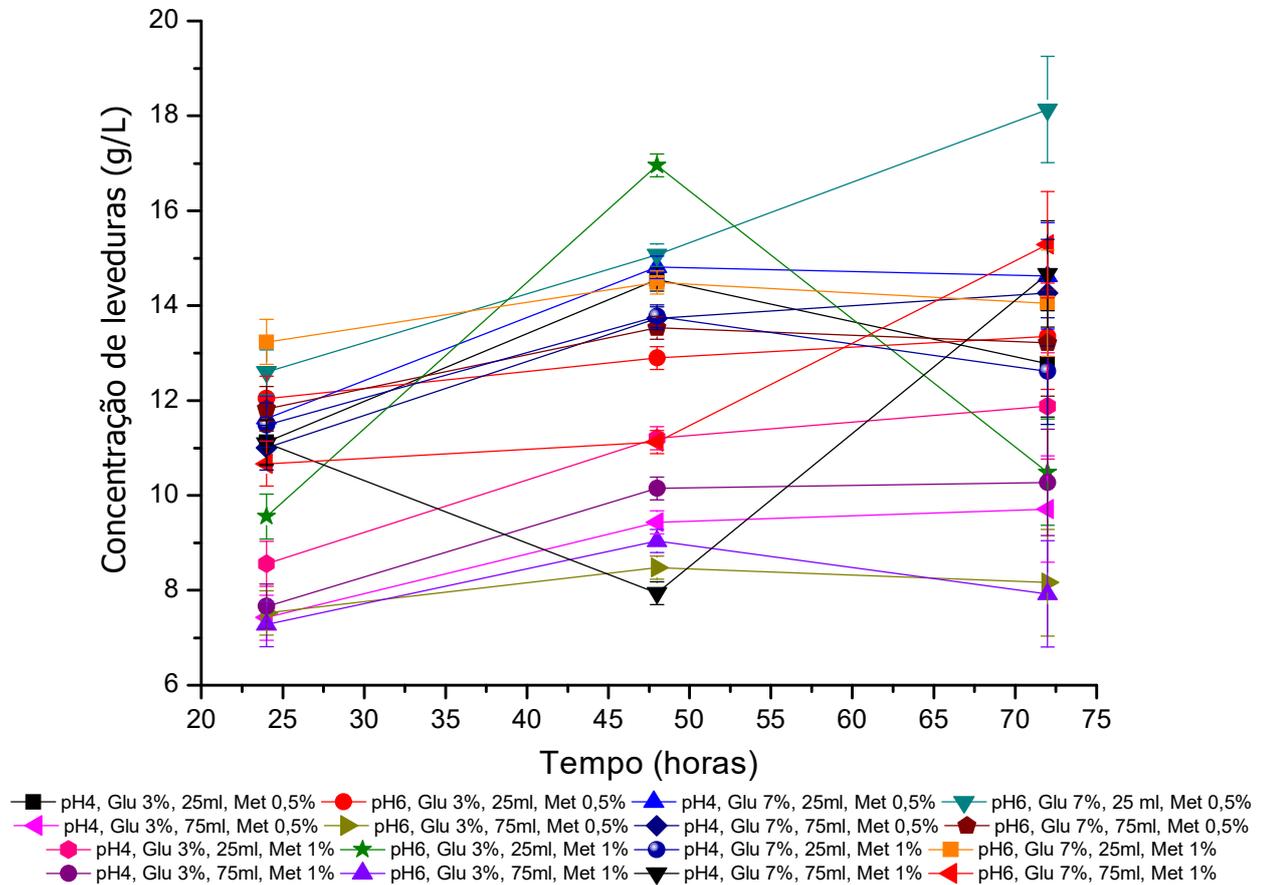
## Anexo B- Gráficos da fase de indução do Planejamento 3

A Figura 38 apresenta a concentração de biomassa da *K. pastoris* das condições 1 a 16, como mostradas na Tabela 06, durante as 48 horas da fase de indução a metanol a 25°C.



**Figura 38:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de indução por metanol a 25°C.

A Figura 39 apresenta a concentração de biomassa da *K. pastoris* das condições 16 a 32, como mostradas na Tabela 06, durante as 48 horas da fase de indução a metanol a 35°C,.



**Figura 39:** Concentração de biomassa da *K. pastoris* durante a fase de indução por metanol a 25°C.