



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Molecular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

---

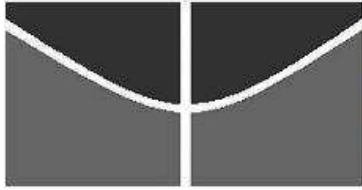
---

# **Clonagem, expressão heteróloga, purificação e caracterização funcional da endoglicanase A de *Aspergillus nidulans***

Eveline Queiroz de Pinho Tavares

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ildinete Silva Pereira

Brasília, março de 2010



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

---

# **Clonagem, expressão heteróloga, purificação e caracterização funcional da endoglicanase A de *Aspergillus nidulans***

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular.

Eveline Queiroz de Pinho Tavares

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dra. Ildinete Silva Pereira

Brasília, março de 2010

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular,  
departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências da  
Universidade de Brasília

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dra. Ildinete Silva Pereira

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup> Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes – Examinadora (UnB)

Prof<sup>a</sup> Dra. Eliane Ferreira Noronha – Examinadora (UnB)

Prof<sup>a</sup> Dra. Janice Lisboa de Marco – Suplente (UnB)

*Não quero ter a terrível limitação de quem vive apenas do que é passível de fazer sentido. Eu não: quero uma verdade inventada.*

*C. Lispector*



*Aqueles que aprenderam que o trabalho de um pesquisador, muito mais que um sinuoso caminho, é um exercício intenso de paixão.*

## Agradecimentos

---

Agradeço primeiramente aos meus pais, que sempre apoiaram (e patrocinaram!) minhas decisões profissionais sem nunca nelas interferirem: minha mãe, que sempre perguntava “como estão as bactérias?”, embora eu trabalhe com fungos; meu pai, que foi escondido ao Centro Comunitário em 2003 para ver que eu tinha passado no vestibular;

À dupla dinâmica (e magnífica!) Olinda & Marisa, que estabilizaram meu emocional (e meus neurotransmissores!). Tive sorte de contar com vocês;

À minha irmã Karla, por sempre estar por perto, pelas brigas, risadas e pelo complô contra a Dini; à minha irmã Keila, fisicamente distinta mas emocionalmente tão semelhante, serzinho tão questionador quanto eu que tornou-se capaz de jogar luz até em minhas interrogações mais abissais. Pelas fantasias compartilhadas, angústias digeridas e pelos cafés em sua invejável companhia – te amo!; ao meu sobrinho Cauan, pelas tardes ininterruptas em frente ao Playstation e por todas as vezes em que dei-lhe uma surra no ping pong (!!!);

À Moi “Baby”, que conseguiu concentrar em tão pequena estatura tanto amor e que é talvez a única que entende a carga emocional que tenho sobre tudo o que fiz nas páginas seguintes;

À uma das pessoas mais humanas que eu conheço: Ildinete. Agradeço incrivelmente pelo convite para integrar seu grupo, pela confiança que me deu e pelo tanto que me valorizou em seu laboratório. Ter trabalhado contigo é um dos meus maiores orgulhos. Você é uma das melhores partes da Biologia Molecular!;

Ao prof. Marcio, pelas discussões de resultados e pela cantoria juntos no karaokê; À prof<sup>a</sup> Fabrícia e à sua ex-aluna Gisele, da UFG, pelas contribuições nas etapas iniciais deste projeto; Aos professores Marcelo e Andrea e à Maylena (fada madrinha do meu mestrado), figurinhas garantidas nas deliciosas noites na casa da orientadora. Ao Thiago, vizinho de bancada, consultor emocional e eventual orientador informal. Nem sei enumerar em quantos experimentos você me ajudou. Você com certeza vai brilhar!; Ao Marciano, pelas idéias, sugestões e pela orientação no período de produção da enzima em frasco – e obviamente, pela sua divertida companhia em finais de semana no laboratório; À Lorena, inigualável em seus *insights* de experimentos – valeu pelas sugestões de discussão e cervejas compartilhadas nas fugas pós-reunião ou ao pé da escada;

À Izabel, Calliandra & Adriane, pelos sorvetes, almoços, cinemas e sempre muitas risadas! Um agradecimento enorme à amiga Izabel pela consultoria grátis em estatística e por ter me apresentado o SPSS!;

Aos estagiários do laboratório, do presente e do passado: Celiane & Antônio, sinto falta das bobeiras – mas não sinto falta dos infinitos cDNAs a clonar! Bárbara, ainda te espero voltar pra cá! Natália e Mariana – patetíssimas e engraçadíssimas companhias; Agradeço também aos demais integrantes do LAB 3: Miguel e Tatiane;

À sempre divertidíssima Cynthia Miami, ótima companhia para cervejas, cigarros e discussão de questões diversas – sempre vou ter uma pontinha de raiva por você não ter sequer

## Agradecimentos

---

disputado minha orientação com a All! Agradecimento à Marina, colega inseparável na época de seleção para o Mestrado. Sucesso!;

Ao prof. Edivaldo, da Enzimologia, que abriu espaço para a finalização do meu trabalho em seu laboratório, e à sua aluna Natália: agradeço a ambos pelas orientações, paciência e pelos reagentes, materiais e tempo doados! Vida eterna ao SpectraMax!; Ao Gilvan, Liana e Fernanda, também da Enzimologia, pela incrível prestatividade e paciência em me ajudar;

À Ana da secretaria do departamento (o que seria de todos nós sem você?), à Fernanda da limpeza (“óia ela!”) e à Fátima (Faaaaaafil!) e Ivanilde (“ói ieu!”) da sala de lavagem e esterilização – obrigada por toda a paciência por me aturarem!;

Aos amigos de outros laboratórios: Túlio, Renata, Greice e Viviane (com os quais eu sempre disputava o espectrofotômetro) (LAB 0), Victor, Rafael, Kelly (compartilhando xingamentos à *Pichia*) (LAB 1), Vivi's, Bruno, Juliana, Karen e Theyssa (valeu pelas dúvidas respondidas e pelos reagentes emprestados!) (LAB 2) Marcus (pelo trabalho no seqüenciador) (LAB 4), Rayner (pelas sugestões para precipitação de proteínas) (Bioquímica); Aos demais colegas da BioMol: agradeço pela paciência, pelas sugestões, pelo bom humor pela manhã, pelas eventuais diversões e também pelos reagentes emprestados;

À deliciosa trupe de São Paulo (que consumiu boa parte de minha bolsa em passagens aéreas): Rita Marques, Gô, Thaís, Moni, Marina, Deyse, Ju... como eu queria que o mundo fosse menorzinho para morarmos mais perto!; À todos aqueles me convidaram para pensar em outra coisa que não fosse Biologia Molecular – quando era isso que eu precisava - Vitor, Mizú, João Antônio, João Tadeu, Ema, Carlos, Claudinha, Edu e a linda Maria Fernanda (eu ainda vou roubá-la...); À Laís e à Alessandra, que esperam pacientemente (espero!) pela minha volta ao mundo lá de fora da BioMol;

Às professoras Lidia, Eliane e Janice, que aceitaram o convite para compor minha banca. Muitíssimo obrigada! Agradeço também aos professores Sueli, Fernando e Élide;

Ao CNPq, pela bolsa concedida;

E a todos aqueles que não fazem a menor idéia de nada do que consta nas páginas posteriores, mas que sabem por outros inúmeros meios o tamanho dessa conquista (e que me perdoarão pelo esquecimento!).

*“Soprar as velas e o desejo não contar,  
Manter o susto para quando ele chegar”*

Rita Marques

---

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	i
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	iii
<b>ABREVIATURAS</b>	iv
<b>RESUMO</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1 Biocombustíveis: o caso do bioetanol	2
2 Tipos de biomassa vegetal empregados na produção de bioetanol	4
3 Bagaço-de-cana: biomassa com potencial promissor rica em celulose	6
4 Lignocelulose: estrutura e aspectos relacionados à bioconversão	8
5 Celulose e celulasas: constituinte mais abundante da lignocelulose e alvo de enzimas produzidas por microrganismos	10
6 O potencial celulolítico de fungos filamentosos	14
7 Expressão heteróloga	18
8 Principais vetores de expressão e linhagens de <i>P. pastoris</i>	22
<b>JUSTIFICATIVA</b>	24
<b>OBJETIVOS</b>	26
<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	28
<b>MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b>	29
<b>Materiais</b>	30
1 Linhagens de microrganismos	30
✓ <i>Escherichia coli</i>	30
✓ <i>Pichia pastoris</i>	30
✓ <i>Aspergillus nidulans</i>	30

---

2 Vetores	30
✓ Para <i>Escherichia coli</i>	30
✓ Para <i>Pichia pastoris</i>	31
3 Oligonucleotídeos sintéticos específicos	32
4 Meios de cultura	33
4.1 Meios para cultivo de bactérias	33
4.1.1 Meio Lúria-Bertani	33
4.2. Meio para cultivo de fungos filamentosos	33
4.2.1 Meio mínimo para <i>A.nidulans</i>	33
4.2.2 Solução de Sais	33
4.2.3 Solução de elementos-traço	33
4.2.4 Meio completo para <i>A. nidulans</i>	34
4.2.5 Suplementos	34
4.3 Meios para cultivo de leveduras	34
4.3.1 Meio YPD pH 7,2	34
4.3.2 Meio YNB 10X (sem aminoácidos)	34
4.3.3 Meio MD ( <i>Minimal Dextrose Medium</i> )	35
4.3.4 Meio BMGY	35
4.3.5 Meio BMMY	35
5 Soluções	35
5.1 Soluções para eletroforese em gel de agarose	35
5.1.1 Tampão de corrida para eletroforese (TEB)	35
5.1.2 Tampão de amostra para eletroforese 5X	36
5.2 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	36
5.2.1 Tampão de amostra SDS-PAGE 5X	36
5.2.2 Tampão de corrida para SDS-PAGE Tris-Glicina 5X pH 8,3	36
5.2.3 Solução de Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)	36
5.2.4 Gel concentrador 5% SDS-PAGE	36
5.2.5 Gel separador 10% SDS-PAGE	37
5.2.6 Solução corante para SDS-PAGE	37
5.2.7 Solução descorante para SDS-PAGE	37
5.2.8 Solução fixadora I para SDS-PAGE	37
5.2.9 Solução fixadora II para SDS-PAGE	37
5.2.10 Solução sensibilizadora para SDS-PAGE	37

---

5.2.11 Solução de impregnação para SDS-PAGE	37
5.2.12 Solução reveladora para SDS-PAGE	37
5.3 Soluções para transformação de bactérias e extração de DNA	38
5.3.1 Solução de $\text{CaCl}_2$ para <i>E. coli</i> termocompetente	38
5.3.2 Solução estoque de ampicilina	38
5.3.4 Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-D-galactopiranosídeo (X-gal)	38
5.3.5 Solução de IPTG (Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo)	38
5.3.6 Tampão TE	38
5.3.7 Tampão de extração de DNA genômico de fungos filamentosos	38
5.3.8 Solução I para extração de DNA plasmidial	38
5.3.9 Solução II para extração de DNA plasmidial	39
5.3.10 Solução III para extração de DNA plasmidial	39
5.3.11 Solução de RNase A	39
5.4 Soluções para ensaios enzimáticos e dosagem de proteínas	39
5.4.1 Tampões para ensaios enzimáticos	39
5.4.2 Reagente de Bradford	39
5.4.3 Solução de ácido dinitrossalicílico (DNS)	39
<b>Métodos</b>	40
<u>Parte A</u> : Clonagem do cDNA <i>eglA</i> em vetores de expressão para <i>Pichia pastoris</i>	40
A.1 Cultivo de <i>Aspergillus nidulans</i>	40
A.2 Extração de DNA genômico	40
A.3 Padronização das condições de amplificação do gene de interesse	40
A.4 Extração de RNA total de <i>A. nidulans</i> sob condição de indução do sistema celulolítico	41
A.5 Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases	41
A.6 Obtenção dos cDNAs de interesse por RT-PCR	42

---

A.7 Clonagens	43
✓ Em vetor para <i>E. coli</i>	43
✓ Em vetores para <i>P. pastoris</i>	43
A.8 Extração de DNA plasmidial	43
A.9 Digestão com enzimas de restrição	44
A.10 Estratégia de integração no genoma da levedura	44
A.11 Estratégia de integração no genoma da levedura	44
<u>Parte B</u> : Obtenção e seleção de clones produtores da endoglicanase A recombinante (EG Ar)	45
B.1 Eletroporação de <i>Pichia pastoris</i>	45
B.2 Seleção de clones produtores de EG Ar em placa do tipo <i>deep well</i>	45
B.3 Ensaio de estabilidade mitótica	46
B.4 Seleção de clones produtores de EG Ar em frascos de 250 mL	46
B.5 Confirmação da integração do cDNA <i>eglA</i> e quantificação do número de cópias	46
B.6 Avaliação da atividade enzimática em carboximetilcelulose e crescimento celular em 144h	47
B.7 Ensaio enzimáticos	48
B.8 Quantificação de proteínas pelo método Bradford	49
<u>Parte C</u> : Purificação da enzima recombinante	49
C.1 Ultrafiltração em membrana com corte em 50 kDa	49
C.2 Cromatografia por gel filtração	49
<u>Parte D</u> : Precipitação de proteínas, análise do perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante e zimograma	50
D.1 Precipitação de proteínas	50
D.2 SDS-PAGE	50
D.3 Coloração de proteínas com azul de <i>Coomassie</i> e prata	51
D.4 Zimograma	51
<u>Parte E</u> : Caracterização bioquímica da EG A recombinante	52
E.1 Análise da atividade enzimática em função da temperatura de reação	52

---

E.2 Análise da atividade enzimática em função das condições tamponantes	52
E.3 Efeito de íons metálicos, quelantes, detergentes e agentes redutores na atividade da endoglicanase A recombinante	53
E.4 Avaliação da termoestabilidade da endoglicanase A recombinante	54
E.5 Análise da atividade enzimática sobre outros substratos	54
E.6 Cálculo de Km e V <sub>máx</sub>	55
E.7 Análise estatística	55
<b>RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO</b>	56
<u>Parte A:</u> Clonagem do cDNA <i>eglA</i> em vetores de expressão para <i>Pichia pastoris</i>	57
A.1 Clonagens	57
<u>Parte B:</u> Obtenção e seleção de clones produtores da endoglicanase A recombinante (EG A <sub>r</sub> )	60
B.1 Confirmação da integração do fragmento contendo o cDNA <i>eglA</i> no genoma de <i>Pichia pastoris</i> por qPCR	60
B.2 Produção da enzima recombinante em frascos agitados de 1 L	60
✓ Comparação dos valores de atividade enzimática da endoglicanase A secretada por meio de distintos peptídeo-sinais	60
✓ Otimização do meio de indução	62
<u>Parte C:</u> Purificação da enzima recombinante	63
C.1 Definição do ponto de maior atividade enzimática da endoglicanase recombinante	63
C.2 Ultrafiltração e cromatografia gel filtração	66
<u>Parte D:</u> Análise do perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante e zimograma	69
D.1 Perfil eletroforético das frações da purificação	69
D.2 Zimograma	70
<u>Parte E:</u> Caracterização bioquímica da EG A recombinante	71



E.1 Atividade enzimática da endoglicanase A em função da temperatura de reação	72
E.2 Atividade enzimática da endoglicanase A recombinante em função do tampão	73
E.3 Atividade enzimática da endoglicanase A recombinante em diferentes temperaturas	75
E.4 Efeito de quelantes, agentes redutores, detergentes e sais de íons metálicos na atividade enzimática da endoglicanase A recombinante	77
E.5 Atividade enzimática da endoglicanase A sobre outros substratos	79
E.6 Determinação de $K_m$ e $V_{máx}$	81
<b>PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÃO</b>	<b>83</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>86</b>

<b>Figura 1:</b> Representação da organização da fibra de celulose em regiões amorfa e cristalina e esquema do ataque enzimático	09
<b>Figura 2:</b> Esquema dos pontos de clivagem do substrato executada pelas três classes de celulasas	12
<b>Figura 3.</b> Dois dos três tipos de conformações tridimensionais das regiões que contêm os sítios ativos encontradas em glicosil hidrolases	13
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das principais reações da via de metabolização do metanol em uma célula de <i>Pichia pastoris</i>	20
<b>Figura 5.</b> Mapa físico do vetor pGEM-T <sup>®</sup> (Promega). Está indicado na figura o sítio múltiplo de clonagem e sítios de restrição para endonucleases	28
<b>Figura 6:</b> Mapa físico do vetor pGEM-T <sup>®</sup> (Promega). Está indicado na figura o sítio múltiplo de clonagem e sítios de restrição para endonucleases.	31
<b>Figura 7:</b> Mapa físico do vetor pHIL-D2	31
<b>Figura 8.</b> Mapa físico do vetor pPIC9	32
<b>Figura 9.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL ilustrando o perfil de digestão dos DNAs plasmidiais construídos em pGEM-T	58
<b>Figura 10.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL ilustrando o perfil de digestão do DNA plasmidial construídos em pHIL-D2	59
<b>Figura 11.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL ilustrando o perfil de digestão do DNA plasmidial construídos em pPIC9	59
<b>Figura 12.</b> Curva de crescimento dos clones transformantes de <i>P. pastoris</i> (a) e de produção de CMCase no sobrenadante dos mesmos (b) em frasco em 144h	62
<b>Figura 13.</b> Curva de crescimento dos clones transformantes de <i>P. pastoris</i> (a) e de atividade enzimática no sobrenadante dos mesmos (b) em 120h nos meios BMMY e BMMU	64
<b>Figura 14.</b> Curva de crescimento e de atividade enzimática sobre CMC do sobrenadante de clones produtor e controle por 120 h	66
<b>Figura 15.</b> Perfil da cromatografia de exclusão molecular da endoglicanase A recombinante	69

<b>Figura 16.</b> Perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante em SDS-PAGE 12% (p/v) corado com prata	71
<b>Figura 17.</b> Perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante em SDS-PAGE 12% (p/v) corado com azul brilhante de <i>Comassie</i> (a) e atividade em gel corado com vermelho do Congo (b)	72
<b>Figura 18.</b> Efeito da temperatura na atividade enzimática em CMC das três frações da purificação	74
<b>Figura 19.</b> Atividade enzimática da endoglicanase recombinante sobre CMC em função do pH final da reação	76
<b>Figura 20.</b> Atividade enzimática das três frações da purificação em diversos substratos	83
<b>Figura 21.</b> Avaliação qualitativa da atividade das três frações da purificação no substrato MUC	84

<b>Tabela 1.</b> Linhagem de <i>Escherichia coli</i> utilizada.	30
<b>Tabela 2.</b> Características dos oligonucleotídeos desenhados e seus respectivos sítios de restrição.	32
<b>Tabela 3.</b> Condições de reação para análise da atividade enzimática em função do tampão do substrato.	53
<b>Tabela 4.</b> Reagentes empregados no ensaio de análise da interferência de quelantes, agentes redutores, detergentes e sais de íons metálicos sobre a atividade enzimática.	53
<b>Tabela 5.</b> Construções plasmidiais realizadas neste trabalho	57
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros de atividade, concentração de proteínas e atividade específica obtidos para as frações da purificação da endoglicanase A recombinante a partir do sobrenadante de <i>P. pastoris</i>	70
<b>Tabela 7.</b> Análise da termoestabilidade da endoglicanase A presente nas frações testadas	78
<b>Tabela 8.</b> Efeito do tratamento com quelantes, sais de íons metálicos, detergentes e agentes redutores sobre a atividade enzimática nas três frações da purificação	81
<b>Tabela 9.</b> Principais resultados obtidos pela caracterização da endoglicanase A recombinante	86

## Lista de abreviaturas

---

°C	- graus Celsius
%	- porcentagem
BCA	- bagaço de cana-de-açúcar
BGL	- $\beta$ -glicosidase
BMMG	- meio completo tamponado com glicerol
BMMM	- meio completo tamponado com metanol
CBD	- domínio de ligação a carboidrato
cDNA	- ácido desoxirribonucléico complementar
CBH	- celobiohidrolase
CMC	- carboximetilcelulose
CMCase	- atividade enzimática em CMC
Da	- dalton
dNTP	- desoxirribonucleotídeo
DTT	- ditioneitol
EGL	- endoglicanase
F	- Faraday
FPase	- atividade enzimática em papel de filtro
g	- grama
<i>g</i>	- velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
IPTG	- isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
L	- litro
M	- molar (mol/L)
MCM	- meio de crescimento de micélio
MM	- meio mínimo
min	- minuto
MUC	- 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-celobiosídeo

## Lista de abreviaturas

---

OD	- densidade óptica
p/v	- peso por volume
pb	- pares de base
PCR	- reação de polimerização em cadeia
pH	- potencial hidrogeniônico
pNPC	- p-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo
q.s.p.	- quantidade suficiente para
RNAse	- ribonuclease
RPM	- rotações por minuto
RT-PCR	- transcrição reversa- reação de polimerização em cadeia
SDS	- sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	- gel desnaturante de poliacrilamida
TE	- tampão Tris-EDTA
TEB	- tampão Tris-EDTA-borato
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
T <sub>m</sub>	- temperatura de desnaturação
Tris	- tri(hidroximetil) aminometano
U	- unidade de atividade enzimática
V	- Volt
v/v	- volume por volume
10x	- solução dez vezes concentrada
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

O Bioetanol é um combustível alternativo particularmente interessante, pois paralelamente às técnicas já estabelecidas pela indústria sucroalcooleira no Brasil, são geradas imensas quantidades de bagaço-de-cana, um resíduo bastante sub-aproveitado. Este pode apresentar de 40 a 50% de celulose, polímero resultante da repetição de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4. Estas podem ser alvo de enzimas celulolíticas produzidas principalmente por fungos filamentosos. O emprego de estratégias envolvendo sistemas heterólogos para produção destas enzimas pode favorecer o alcance dos níveis máximos de produção em prazos inferiores aos observados em sistemas nativos, além de facilitar a purificação da proteína recombinante.

Neste trabalho, foi realizada a caracterização parcial da endoglicanase A (EG A) de *Aspergillus nidulans*, enzima de interesse biotecnológico incluída no projeto da rede Bioetanol (MCT/FINEP), onde nosso grupo desenvolve a meta de **“Produção de celulases recombinantes em sistema heterólogo de *Pichia pastoris*”**. As construções para clonagem envolveram promotores induzíveis por metanol, sendo o vetor de expressão obtido dirigido para integração no genoma de *P. pastoris*. Assim, após clonagem e transformação desta levedura metilotrófica, foi realizada a expressão heteróloga desta enzima seguida de sua purificação parcial.

Empregando o sobrenadante dos clones recombinantes, foi obtido um produto heterólogo com atividade máxima em carboximetilcelulose (CMC) a partir de 24 h de indução. Após purificação empregando ultrafiltração e filtração em gel, a enzima recombinante foi caracterizada, atuando preferencialmente em pH ácido (de 4,5 a 5,0) e temperatura próxima a 50°C, em torno da qual esta enzima apresentou-se termoestável a 45 e 55°C por cerca de 48 h. Foi observado um incremento de 30 a 80% nos valores de atividade diante da incubação com  $\text{Co}^{2+}$ , DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol. A degradação de substratos alternativos mostrou-se significativa somente na incubação com CMC e, em menor extensão, em papel de filtro. Além disso, a análise de atividade em gel e o perfil eletroforético das amostras das etapas da purificação confirmaram a massa molecular de 34 kDa, conforme esperado.

**Palavras-chave:** Bioetanol, endoglicanase, expressão heteróloga em *Pichia pastoris*, *Aspergillus nidulans*

Bioethanol is an alternative fuel of particular interest because in Brasil, the techniques used in fuel industry generate an enormous amount of a by-product, which could be further degraded: the sugarcane bagasse. It can presents 40-50% of cellulose content, which is a polymer composed by repeated units of D-glucose, linked by  $\beta$ -1,4 bonds. These bonds can be cleaved by cellulolytic enzymes produced specially by filamentous fungi. The use of heterologous expression strategies to produce these enzymes can be advantageous in order to higher levels of production in shorter periods compared as those observed with wild type enzymes, besides the feasibility of recombinant protein purification methods.

In this work, we describe the partial characterization of endoglucanase A (EG A), produced by *Aspergillus nidulans*. On account of the biotechnological interest, this enzyme was included in the project of the Bioethanol net (MCT/FINEP), and our group was responsible for developing the "Recombinant cellulases production employing *Pichia pastoris* as a heterologous expression system. The cloning vector was constructed using methanol-induced promoters, with the foreign DNA being directed to be integrated in the *Pichia pastoris* genome. Finally the enzyme was partially purified and characterized.

To examine whether higher levels of activity towards CMC would occur, we used the supernatant of the recombinant clones. We observed the highest level of activity after 24h of induction. After ultrafiltration and gel filtration purification procedures, we characterized an enzyme that acts preferentially at pH 4, which is thermostable at a temperature of approximately 50°C. It was observed an increased enzyme activity when the enzyme was incubated in the presence of  $\text{Co}^{2+}$ , DTT and  $\beta$ -mercaptoethanol. The hydrolysis of lignocellulosic substrates was significant only with CMC and, at a lesser extent, with filter paper. Also, the analysis of activity in gel and the electrophoretic profile of the purified samples confirmed the molecular mass of 34 kDa, as predicted.

**Key words:** Bioethanol, endoglucanase, *Pichia pastoris* heterologous expression, *Aspergillus nidulans*



---

# *Introdução*

---

### 1. Biocombustíveis: o caso do bioetanol

Um dos maiores desafios enfrentados pela nossa sociedade é o de atender as demandas mundiais no que tange ao consumo de energia e mudança da matriz energética. Os anos de negligência diante dos combustíveis renováveis trouxeram ao planeta e às indústrias de abastecimento uma grave crise energética. Como consequência, a economia da maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento tornou-se firmemente dependente da importação de petróleo. Cerca de 80% do suprimento de energia mundial consiste no uso deste composto (Goldemberg, 2007). Somente os Estados Unidos, que possuem 5% da população mundial, importam um quarto do petróleo produzido no planeta (Demain, 2009), consumindo cerca de 20 milhões de barris diariamente (Gray *et al.*, 2006). Este é comercializado por um consórcio de países que se encontram constantemente em situação de instabilidade devido a guerras e questões políticas delicadas. Conseqüentemente, as oscilações decorrentes de conflitos nestes locais têm feito oscilar não só o preço do petróleo como a economia global como um todo.

A crise energética gerada pelo custo e consumo elevados de combustíveis fósseis e pela alta produção de gases estufa tem alimentado a conscientização mundial no que concerne ao desenvolvimento sustentável. Para atingi-lo, investir financeira e intelectualmente em energia renovável é a mais eficiente via. A Comissão Mundial de Meio Ambiente e Desenvolvimento (*World Commission on Environment and Development – WCED*) definiu em 1987 este termo como “meio de se atingir as necessidades do presente sem comprometer a habilidade de gerações futuras de alcançarem suas próprias necessidades”. O consumo desenfreado de fontes energéticas não-renováveis tem ferido gravemente este conceito e o objetivo por ele proposto.

Diante destas constatações, é cada vez mais evidente que a soberania de mais de 30 anos do petróleo na indústria de combustíveis aproxima-se do fim. Os esforços dos setores responsáveis não devem concentrar-se na disponibilização de novas reservas de petróleo, pois crescente é a demanda por combustíveis assim como é crescente a conscientização da população mundial a respeito dos danos da queima de combustíveis fósseis. O consumo desgovernado desta fonte de energia tem produzido intensas mudanças climáticas, afetando a qualidade de vida em muitos países. No que concerne somente à emissão de gases estufa, espera-se que em 2030 seja produzido o dobro dos valores atuais (Demain, 2009). Temendo previsões alarmantes como essa, países como os Estados Unidos planejam uma redução de 20% no consumo de gasolina em menos de 10 anos (Ruth, 2008).

O que pode então substituir os combustíveis fósseis? Nesse contexto, estratégias tecnológicas têm surgido, sugerindo alternativas e demandando um grande comprometimento da comunidade científica. Nos dias de hoje as fontes renováveis de energia somente equivalem em volume a 2,5% dos 85 milhões de barris de petróleo consumidos por dia, e este número deve aumentar para 105 milhões até 2015 (Demain, 2009).

Segundo Goldemberg (2007), cerca de 2% do suprimento de energia mundial se deve ao emprego de fontes abundantes e renováveis, como é o caso da biomassa vegetal, da qual derivam os biocombustíveis (Howarth *et al.*, 2009). Preferencialmente os esforços têm se concentrado em biocombustíveis líquidos, uma vez que podem substituir os combustíveis atualmente utilizados sem necessidade de grandes modificações nos motores de automóveis e nas redes de abastecimento.

Dentre os biocombustíveis líquidos disponíveis atualmente, o bioetanol destaca-se, tendo sido gerados 55 bilhões de litros em 2007, sendo que o Brasil e os Estados Unidos foram por décadas responsáveis por 75% de sua produção. A produção de bioetanol ultrapassou a marca dos 18 bilhões de litros no final da década de 90, permanecendo sempre em níveis de produção superiores aos do biodiesel (Howarth *et al.*, 2008). Nos últimos anos, o bioetanol respondeu por 99% dos biocombustíveis comercializados nos EUA (Farrell, 2006), sendo que a produção anual deste em 2006 ultrapassou os 4 bilhões de galões (Gray *et al.*, 2006) e a perspectiva é de que até 2030 esta categoria de combustíveis substitua 30% dos combustíveis atualmente consumidos (Schubert, 2006). Até o presente momento, somente o biodiesel e o bioetanol têm sido produzidos em escala industrial, sendo que a produção anual nos Estados Unidos ultrapassou a brasileira em 2006 ao ultrapassarem a marca de 16 bilhões de litros, empregando, respectivamente, milho e cana-de-açúcar (Howarth *et al.*, 2009; Renewable Fuels Association, 2010).

Apesar de apresentar somente 2/3 do conteúdo energético da gasolina, o etanol apresenta-se como uma alternativa interessante à indústria de combustíveis em função de sua alta octanagem, reduzida toxicidade aos humanos e maior biodegradabilidade, podendo também substituir os atuais aditivos misturados à gasolina (Demain, 2009). Entretanto, maior vantagem deste combustível é também seu maior apelo publicitário: o etanol é menos poluente tanto no que concerne à emissão de compostos tóxicos contendo chumbo e enxofre e também de gases estufa como metano e dióxido de carbono (Goldemberg, 2007). Esse fato se deve ao seqüestro de carbono executado durante a fotossíntese por organismos vegetais, gerando um saldo inferior de emissão de compostos de carbono durante sua queima (Frazzetto, 2003).

Diferente de outros países, o Brasil já possui experiência na comercialização de álcool combustível. Durante o programa Pró-Álcool nos anos 70, o governo federal estipulou uma mistura de 25% de etanol na gasolina comercializada e encorajou fabricantes de automóveis a produzirem motores que consumissem etanol 100%. A motivação e o contexto eram semelhantes aos de hoje: necessidade de diminuição da dependência do petróleo e conseqüente redução de sua importação. Em seguida foram percebidos os benefícios ecológicos de sua utilização: diminuição do uso de aditivos tóxicos à gasolina como o MTBE (metil-tércio-butil-éter) e diminuição da emissão de gases estufa. Diante do custo superior que o etanol apresentava em relação à gasolina, subsídios foram necessários. Naquele momento, a produção de etanol saltou de 0,9 bilhões de galões para 3,0 em 1999 e 4,2 em 2006 (Goldemberg, 2007). Embora desde os anos 90 os subsídios ao etanol tenham sido removidos e este tenha se tornado financeiramente competitivo em relação à gasolina, o Programa Pró-Álcool foi enfraquecido neste mesmo período pelo crescente consumo de cana-de-açúcar na indústria alimentícia. A maior parte da cana produzida no país estava então voltada para a indústria alcooleira, e não para ser utilizada como alimento (Howarth *et al.*, 2009).

Nos dias atuais nos Estados Unidos já é largamente comercializado nos postos de abastecimento etanol 85% e os fabricantes de automóveis investem no mundo todo em veículos do tipo *flex*, sendo estes capazes de consumir tanto álcool como gasolina. O governo deste país pretende implementar até 2030 políticas que possibilitem a substituição de 30% dos combustíveis usados hoje por etanol (Schubert, 2006) e até 2022 pretendem atingir a patamar de produção de 54 bilhões de litros de bioetanol a partir de milho (Howarth *et al.*, 2009).

Porém a representatividade dos biocombustíveis de modo geral no contexto de suprimento de energia ainda permanece aquém do desejado. Para atingir as metas propostas pelos países produtores de bioetanol, encontram-se disponíveis diversos tipos de biomassa vegetal, extremamente heterogêneas quanto à sua composição e quanto a questões relativas à sua degradação.

## **2. Tipos de biomassa vegetal empregados na produção de bioetanol**

Fonte de tamanha abundância, a biomassa vegetal possui uma enorme energia armazenada e que pode ser empregada na produção de etanol, contribuindo para as medidas de desenvolvimento sustentável. Teoricamente qualquer resíduo de natureza vegetal pode ser empregado desta maneira como, por exemplo, milho, cana-de-açúcar, diversos tipos de palha e até papéis e jornais.

Atualmente os processos de fermentação e produção de etanol dão conta de três categorias principais de tipos de biomassa: açúcares (da cana-de-açúcar, beterraba e frutas), amido (milho, mandioca e batatas) e celulose (madeira e resíduos da agricultura de modo geral), sendo que somente o primeiro pode ser convertido a bioetanol diretamente (Lin & Tanaka, 2006).

A maior parte do bioetanol produzido mundialmente deve-se ao emprego da sacarose da cana-de-açúcar (no Brasil) e do amido de milho (nos Estados Unidos) (Sukumaran *et al.*, 2009). Os compostos de amido são convertidos à glicose por meio da participação de enzimas amilolíticas, produzidas por bactérias (principalmente do gênero *Bacillus* e *Clostridium*) e fungos (Sánchez & Cardona, 2008). Além do milho, é empregada também a mandioca, abundante em países tropicais, tendo um alto conteúdo de amido (85-90% de matéria seca).

No caso brasileiro, a fermentação alcoólica normalmente é realizada com o emprego de leveduras, em sua maioria *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de converter sacarose em açúcares simples como glicose e frutose (Sánchez & Cardona, 2008).

A seleção da mais adequada matéria-prima para a produção de bioetanol reside nas condições climáticas do local de produção. O emprego de compostos de amido tem levantado muito debate diante do investimento de energia que estes demandam em sua produção. Neste contexto, o bioetanol de cana-de-açúcar produzido no Brasil torna-se mais interessante, principalmente levando em conta o balanço entre investimentos e geração de energia. E, embora o rendimento em litros de bioetanol a partir de milho seja superior aquele produzido com o uso de cana-de-açúcar, a produção de bioetanol anual por hectare de terra plantada favorece o biocombustível gerado pelo emprego de cana-de-açúcar. O mesmo ocorre quando da comparação entre beterraba e milho (Sánchez & Cardona, 2008). Diante de todas as qualidades apresentadas pela cana-de-açúcar, esta é a matéria-prima mais largamente usada para produção de etanol, sendo empregada no Brasil, na Índia e na Colômbia (Sánchez & Cardona, 2008).

Entretanto, as previsões do aumento de demanda de energia são alarmantes. As tecnologias atuais que empregam principalmente cana-de-açúcar e milho na produção de bioetanol serão insuficientes para gerar toda a energia necessária (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Além disso, a busca por fontes que não sejam importantes como alimento para o homem tem ganhado força e deve em breve se tornar uma realidade.

### **3. Bagaço-de-cana: biomassa com potencial promissor**

Partindo do princípio de que o custo e a complexidade do processo de produção de combustíveis depende em grande parte da biomassa empregada, para que o bioetanol seja industrialmente viável e economicamente atraente, faz-se necessária a utilização de uma biomassa de baixo custo e alta disponibilidade. Visto que a demanda por combustíveis tem crescido assim como a demanda por alimento, é desejável que a utilização deste composto não interfira no fornecimento de alimentos, (Lin & Tanaka, 2006) como o milho, a beterraba e a mandioca tornam-se extremamente desvantajosas por serem utilizadas majoritariamente pela indústria alimentícia. Desse modo, um programa de bioconversão de material vegetal a etanol baseado no emprego de substratos usados como alimento seria forte alvo de críticas em razão do custo mais elevado de sua produção e do desvio destes produtos do setor alimentício para o de combustíveis. Já foi observado que o aumento da utilização de cereais é mais notável na indústria de combustíveis que na indústria alimentícia: só no Brasil metade dos 7 milhões de hectares destinados ao plantio de cana-de-açúcar é voltada para a produção de combustíveis (Howarth, 2009). Por outro lado, também seria frágil um programa de bioconversão voltado para a degradação de madeira, pois o consumo mundial desta já é altíssimo, sendo estimado em 3,5 bilhões de toneladas por ano (Kumar *et al.*, 2008).

Além disso, é indispensável que o processamento da biomassa vegetal resulte em um saldo positivo entre o capital investido e o ganho em energia produzida.

A escolha da fonte utilizada para produção de bioetanol deve depender das condições climáticas do país. Na Europa e nos Estados Unidos a produção é baseada em compostos de amido, já que nestes locais as condições não são favoráveis à plantação de cana-de-açúcar, a biomassa que responde pelo maior rendimento de etanol (Sánchez & Cardona, 2008). Nesse contexto, a competitividade da cana-de-açúcar brasileira tem se destacado, especialmente se o balanço de investimento e obtenção de energia é considerado. Segundo Sánchez & Cardona (2008), a produção da cana-de-açúcar brasileira é de até cerca de 120 toneladas por hectare de terra cultivada, sendo seu custo estimado em US\$ 0,01/kg. Este montante é responsável pela produção de mais de 10.000 L de etanol por hectare cultivado por ano, com o custo de US\$ 0,198 por litro, no caso do etanol anidro. Dados como estes favorecem a cana-de-açúcar para produção de bioetanol, em relação aos compostos de amido.

Responsável por 30% em peso seco da cana-de-açúcar (Coelho *et al.*, 2005) encontra-se um importante sub-produto de natureza lignocelulolítica: cerca de 270 kg de bagaço de cana são produzidos a cada tonelada de cana usada pela

indústria sucro-alcooleira (Baudel *et al.*, 2005). Em 2000 o bagaço de cana respondeu pela produção de somente 140 L de etanol por tonelada de bagaço (Moreira, 2000), sendo este valor um reflexo claro de sua sub-utilização. Partindo de uma composição de 40% de celulose e 17% de hemicelulose, se cerca de 8% do bagaço gerado fosse direcionado para a produção de etanol, seriam produzidos 2200 L deste combustível por hectare de cana-de-açúcar plantada, reduzindo o uso de terra em 29% (Leite *et al.*, 2009).

Assim como a cana-de-açúcar, o bagaço gerado apresenta grande disponibilidade em países de clima tropical e temperado, tendo um baixo custo de produção. A associação desta biomassa vegetal aos processos já bem estabelecidos para aproveitamento de cana-de-açúcar poderia diminuir a demanda de áreas cultiváveis e a necessidade de fertilizantes e agrotóxicos (Leite *et al.*, 2009). O emprego desta biomassa vegetal abundante e barata poderia aumentar ainda mais os níveis de produção de bioetanol no Brasil que, em 1999, giravam em torno de  $10,5 \times 10^9$  e  $6,5 \times 10^9$  litros (no caso do etanol hidratado e do anidro, respectivamente) (Wheals *et al.*, 1999). A previsão realizada por Lynd (1996) aponta para uma produção de energia duas vezes maior que a energia investida.

O bagaço é principalmente usado para geração de calor para execução de vários processos em uma destilaria. Quantidades menores deste resíduo são vendidas para geração de eletricidade na estação seca ou então usado como ração animal. Caso sua utilização seja possível, a cana-de-açúcar seria aproveitada em sua integridade, sem gastos excedentes com o transporte, já que o bagaço-de-cana é produzido no mesmo local onde dar-se-ia sua conversão a bioetanol (Wheals *et al.*, 1999).

Com a utilização do bagaço de cana, o objetivo de produção em larga escala de um combustível menos poluente torna-se mais provável diante da imensa disponibilidade de um subproduto rico em energia, de baixo custo e alta disponibilidade e sem utilização na indústria alimentícia. Sendo a lignocelulose o componente mais abundante do bagaço-de-cana, assim como da biomassa vegetal de modo geral, torna-se interessante o desenvolvimento de tecnologias de obtenção do açúcar presente neste composto.

Atualmente no Brasil só há uma indústria de utilização de bagaço para produção de bioetanol. A Dedini, localizada em Pirassununga (SP), é responsável pela produção de  $1600 \text{ m}^3$  de etanol a partir de bagaço-de-cana por ano, desde 2002 (Solomon *et al.*, 2007).

### **4. Lignocelulose: estrutura e aspectos relacionados à bioconversão**

Reconhecido mundialmente como um dos mais promissores biocombustíveis capazes de atender as crescentes demandas por energia, o bioetanol produzido a partir da lignocelulose pode apresentar inúmeras vantagens perante os demais substratos: apesar de ser um substrato mais complexo que o amido, é uma fonte geograficamente melhor distribuída, diminuindo as dependências de importação; é extremamente abundante, podendo ser obtida a partir de madeira, folhas, resíduos florestais e agroindustriais e até de papéis usados, tendo um alto potencial de bioconversão; o acúmulo desta biomassa resulta num problema não só ecológico (em razão da dificuldade em se desfazer de tamanha quantidade de material lignocelulósico gerado), mas também na perda de uma valiosa fonte de energia. Muito do “lixo lignocelulósico” é mal aproveitado, não tendo outro destino senão a queima (Kumar *et al.*, 2008). Aliado a isso, o uso de biomassa lignocelulósica diminui os conflitos gerados diante da utilização de alimentos para produção de combustíveis, podendo inclusive disponibilizar mais empregos em áreas rurais (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). O uso desta biomassa não pretende substituir as tecnologias já existentes, mas sim aliar-se a estas, gerando uma produção de bioetanol final superior aos níveis obtidos atualmente.

Calcula-se que a produção global anual de biomassa vegetal seja de  $200 \times 10^9$  toneladas, sendo que a lignocelulose responde por 90% deste valor. Porém, até  $20 \times 10^9$  toneladas permanecem inacessíveis (Lin & Tanaka, 2003). A lignina é a responsável por um dos grandes impedimentos físicos à hidrólise da lignocelulose. Em razão do alto grau de compactação conferido à celulose, faz-se necessária a introdução de uma etapa de pré-tratamento e delignificação, responsáveis pela remoção parcial deste composto e abertura da fibra, de modo a tornar a lignocelulose pré-tratada mais acessível às etapas seguintes. Porém, a etapa de pré-tratamento gera problemas que podem tornar toda a proposta do bioetanol desvantajosa: o tratamento químico realizado por meio de hidrólise ácida a altas temperaturas resulta em grandes quantidades de resíduos tóxicos, tanto para o ambiente quanto para as etapas subsequentes da degradação da lignocelulose (Leathers, 2003).

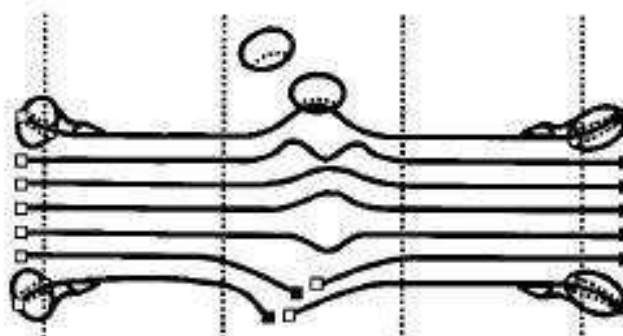
Em se tratando do polímero mais abundante do planeta, sua composição pode variar de acordo com a espécie vegetal em questão. Porém, a composição média consiste em 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Os dois primeiros são carboidratos resultantes da polimerização de açúcares, enquanto a lignina é um polímero aromático produzido a partir de precursores fenólicos (Sánchez, 2009), não contendo açúcares. Visto que na lignocelulose a celulose responde por cerca de metade da composição e que a degradação deste homopolímero libera



glicose a ser prontamente fermentada, torna-se então este o substrato alvo de intensas pesquisas.

A celulose é um polímero linear formado por repetições de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. O dímero resultante é a celobiose, que forma longas fibras celulósicas que interagem entre si por meio de ligações do tipo pontes de hidrogênio. Quanto maior a interação entre as fibras, maior é seu grau de cristalinização e maior sua inacessibilidade à hidrólise. Em contrapartida, a celulose apresenta regiões amorfas, nas quais as fibras associam-se mais frouxamente (fig. 1).

Já a hemicelulose é formada por diversos monômeros, dentre eles a D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose e a D-galactose (Sánchez, 2009). A lignina, por sua vez, liga-se tanto à celulose quanto à hemicelulose, envolvendo ambas e conferindo à lignocelulose a propriedade de resistência e impenetrabilidade, tão importante na manutenção das paredes celulares vegetais.



**Figura 1:** Representação da organização da fibra de celulose em regiões amorfa e cristalina e esquema do ataque enzimático. Estão indicadas as extremidades reductoras do polímero (□) e as extremidades não-reductoras (■). Modificado de Lynd (2002).

Atualmente a atenção dos investidores em bioenergia volta-se para a etapa seguinte ao pré-tratamento: a hidrólise enzimática dos polissacarídeos. Esta fase é decisiva tanto para o custo quanto para a eficiência do processo de bioconversão como um todo, pois uma degradação enzimática eficiente pode tanto gerar grande quantidade de produtos como diminuir a necessidade de um pré-tratamento quimicamente severo. O emprego de enzimas específicas para a degradação de biomassa vegetal é muito mais interessante que a hidrólise ácida diante do alto custo e risco ao ambiente apresentado por este último (Wyman, 2007).

Já a lignina, cuja hidrólise enzimática não libera açúcares, é apontada por alguns autores como possível combustível de todo o processo, podendo, após sua

remoção, ser queimada de modo a produzir calor para as etapas em curso (Wyman, 2007; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Especificamente no caso do bagaço-de-cana, foi possível no estudo de Sun e colaboradores (2004) a obtenção de mais de 43% de celulose após tratamento com ácido acético 80% e ácido nítrico 70%. Na celulose parcialmente purificada foram detectadas reduzidas quantidades de hemicelulose (cerca de 4%) e lignina (cerca de 0,5%). O bagaço-de-cana tratado desta forma poderia favorecer o surgimento de indústrias no país especializadas na produção de etanol de celulose em larga escala.

Porém, para converter qualquer fonte de açúcar em bioetanol, estes açúcares devem ser primeiro disponibilizados. No que concerne aos processos executados durante a bioconversão, inicialmente a biomassa lignocelulósica deve ser hidrolisada a di- e monossacarídeos fermentescíveis. Atualmente, as tecnologias para realização destes dois processos esbarram no alto custo e baixo rendimento, sendo ainda de difícil aplicação em larga escala e tornando o bioetanol de celulose relativamente caro diante dos combustíveis fósseis (Sun & Cheng, 2002).

### **5. Celulose e celulases: constituinte mais abundante da lignocelulose e alvo de enzimas produzidas por microrganismos**

Partindo-se da escolha de um substrato lignocelulósico disponível como o bagaço-de-cana, sabe-se que o custo do combustível produzido recairá principalmente sobre as etapas de processamento deste substrato. Esta etapa consiste em tornar acessível aos processos de fermentação alcoólica os açúcares presentes na celulose. Atualmente, duas formas de processamento são possíveis: a hidrólise química e a enzimática.

Dentre os processos de hidrólise química, o mais freqüentemente relatado pela literatura consiste na hidrólise ácida, na qual pode-se empregar  $H_2SO_4$  ou  $HCl$ , em temperaturas que variam de 200 a 240°C (Sánchez & Cardona, 2008). Embora estes sejam agentes poderosos na hidrólise da celulose, são também tóxicos, corrosivos e perigosos à manipulação humana, requerendo também a utilização de reatores resistentes à corrosão (Sun & Cheng, 2002). Além disso, a degradação da celulose por estes métodos inevitavelmente gera compostos tóxicos, como o hidroximetil-furfural (Sánchez & Cardona, 2008).

A hidrólise química é uma tecnologia já antiga e amadurecida, além de ter larga aplicação, porém apresenta, além das desvantagens supracitadas, a dificuldade de separação da glicose dos produtos tóxicos aos microrganismos empregados (Sukumaram *et al.*, 2009).

Atualmente têm sido sugerida a adaptação destas metodologias para os processos de pré-tratamento (Sun & Chen, 2002), que consistem basicamente em aumentar a exposição da lignocelulose ao ataque enzimático. Esta etapa é capaz de remover os constituintes de difícil degradação, como é o caso da lignina.

O método enzimático apresenta inúmeras vantagens perante às tecnologias de hidrólise química: embora o processo possa ser mais lento, ele tem demonstrado maior especificidade e eficiência, podendo ocorrer em condições ambientais sem produção de compostos tóxicos (Sánchez & Cardona, 2008; Sukumaram *et al.*, 2009). Um outro aspecto importante é que a supressão do emprego de grandes quantidades de ácidos fortes para hidrólise pode reduzir os gastos de produção (Wyman, 2007).

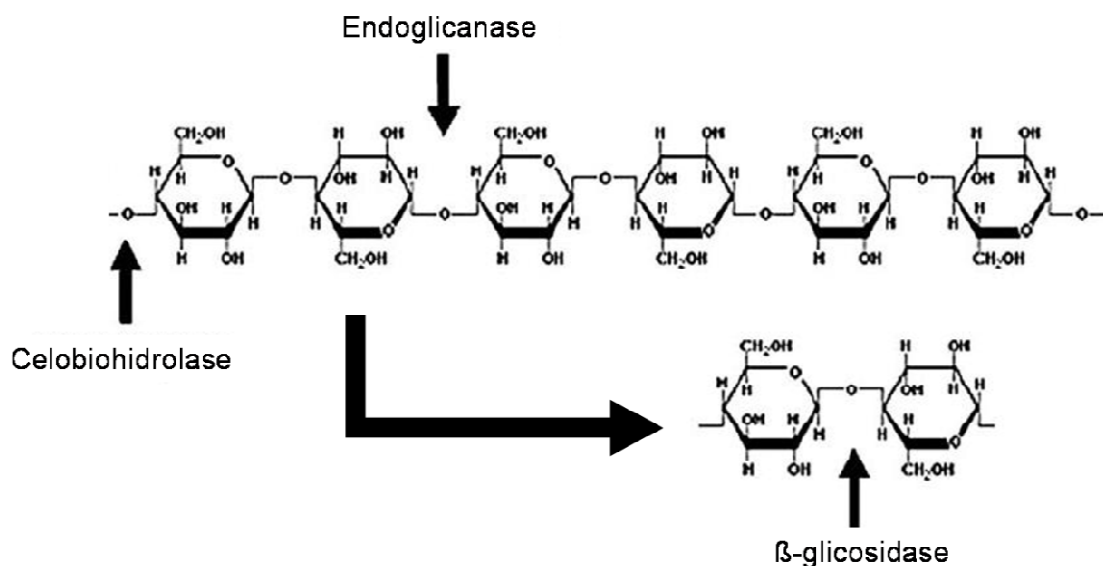
Porém, ao se optar pela segunda metodologia, surge a necessidade de contornar-se a questão da inacessibilidade da celulose de uma dada biomassa. Como mencionado acima, têm sido sugerido o emprego de compostos ácidos para promoverem a maior abertura da fibra lignocelulósica, facilitando o ataque enzimático. Além disso, a otimização de um só método de pré-tratamento é inviável, visto que há uma larga disponibilidade de biomassas com distintas características (Lin & Tanaka, 2006; Wyman, 2007). Por outro lado, existem também estratégias de pré-tratamento alternativas, como por exemplo a deslignificação biológica, a qual consiste na aplicação de enzimas responsáveis pela degradação da lignina, grande responsável pela impenetrabilidade da lignocelulose. Esta metodologia reside no emprego de peroxidases produzidas principalmente pelo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (Sun & Cheng, 2002; Kumar *et al.*, 2008).

Enzimas celulolíticas são encontradas nos três domínios (Cantarel *et al.*, 2008). Dentre as bactérias, os organismos celulolíticos concentram-se nos filos *Actinobacteria* e *Firmicutes*. Nestes casos as enzimas produzidas são ancoradas à parede celular num grande complexo chamado celulosoma. Já dentre os eucariotos, a distribuição é bastante ampla no reino *Fungi*, sendo estes microrganismos conhecidos decompositores de matéria orgânica (Lynd *et al.*, 2002). Aliado a isso, por apresentarem maior eficiência na hidrólise de compostos lignocelulósicos associada à produção de maiores quantidades de enzimas (Kumar *et al.*, 2008), as enzimas de fungos são biotecnologicamente mais interessantes, conforme será discutido mais adiante.

Em fungos, dentre as espécies capazes de realizar degradação de celulose destacam-se os Ascomicetos (gênero *Humicola*), Basidiomicetos (gênero *Phanerochaete*) e Deuteromicetos (gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*) (De-Paula *et al.*, 1999; Lynd *et al.*, 2002; Dashtban *et al.*, 2009).

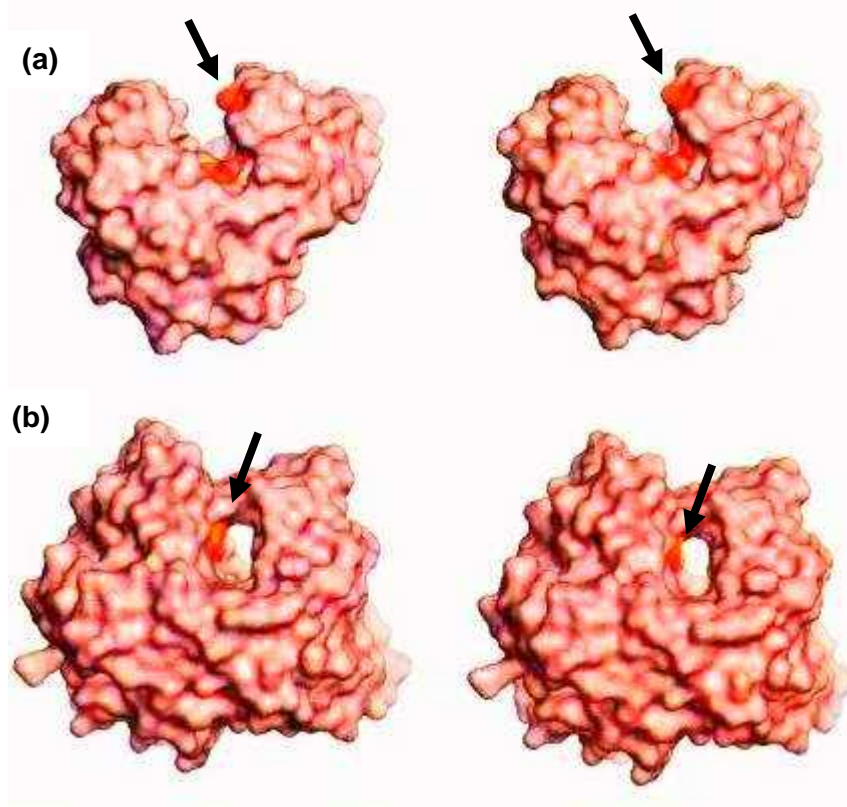
A utilização de celulose por microrganismos têm, além da aplicabilidade biotecnológica discutida neste trabalho, uma grande importância ecológica. Cerca de  $4 \times 10^9$  toneladas deste polímero são formadas anualmente (Aro *et al.*, 2005). Ao degradarem a matéria orgânica, os microrganismos possibilitam o fluxo de carbono em escala global reciclando-os de volta à forma inorgânica, evitando que esta imensa quantidade de biomassa se acumule e inviabilize a vida. Além disso, as celulases produzidas por estes microrganismos são indispensáveis na nutrição de ruminantes. Por sua vez, ruminantes são uma importante fonte de proteína na nossa dieta.

Enzimas celulolíticas ou celulases são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 da celulose e podem ser divididas em três classes, conforme seu modo de ação: endoglicanases ou endo- $\beta$ -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que são responsáveis pelo ataque randômico das ligações glicosídicas internas da celulose amorfa, gerando oligossacarídeos de variados tamanhos e também novas extremidades. Estas são alvo das celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que degradam processivamente extremidades reductoras e não-reductoras da celulose amorfa ou microcristalina, liberando glicose ou celbiose, um dímero de glicose. Por fim, as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam celbiose e por vezes também oligossacarídeos menores, liberando glicose (Lynd *et al.*, 2002; Sánchez, 2009). Um esquema da hidrólise enzimática operada por estas enzimas encontra-se na figura 2.



**Figura 2:** Esquema dos pontos de clivagem do substrato executada pelas três classes de celulases. Estão evidenciadas na figura regiões e ligações específicas a serem hidrolisadas por cada classe. Modificado de Kumar e colaboradores (2008).

Uma organização completa e didática de enzimas ativas sobre carboidratos foi elaborada, até o surgimento de uma atualizada base de dados de glicosil hidrolases, transferases, dentre outras (Cantarel *et al.*, 2008; <http://www.cazy.org>). Há cerca de vinte anos o mesmo grupo de pesquisa vem levantando dados a respeito de características comuns entre as diferentes glicosil hidrolases. Com o objetivo de evitar as categorizações controversas e insuficientes do sistema IUPAC, Henrissat e colaboradores (1991) iniciaram um processo de comparação sistemática de glicosil hidrolases. Desse modo, enzimas de uma mesma família compartilham aspectos como mecanismo de hidrólise, identidade do sítio catalítico e estrutura tridimensional, sendo que as famílias com proteínas de mesma conformação estão unidas no mesmo clã. Atualmente esta base de dados conta com 115 glicosil hidrolases alocadas em 14 clãs (Cantarel *et al.*, 2008). A conformação tridimensional do sítio catalítico é compatível com a região do substrato a ser atacada e com o modo de ação da enzima (fig. 3).



**Figura 3.** Dois dos três tipos de conformações tridimensionais das regiões que contêm os sítios ativos encontradas em glicosil hidrolases. (a) Fissura (endoglucanase E2 de *T. fusca*); (b) Túnel (celobiohidrolase II de *T. reesei*). O sítio catalítico previsto está indicado por setas. Modificado de Davies & Henrissat (1995).

O mecanismo de ação destas enzimas consiste na ação de um doador e um receptor de prótons, que formam a díade catalítica, podendo ser composta por resíduos de glutamato ou aspartato, a depender da família. Como resultado da

catálise, pode ocorrer tanto inversão quanto retenção da configuração do carbono anomérico, sendo este fator um outro aspecto decisivo para classificação destas enzimas (Withers & Aebersold, 1995).

Diante da já mencionada inacessibilidade e insolubilidade do substrato, celulases por vezes contam com um módulo de ligação a carboidratos (*carbohydrate-binding modules* - CBM) em sua estrutura. Esta região, embora dispensável para a catálise, é responsável por facilitar a hidrólise, aproximando enzima e substrato (Lynd *et al.*, 2002). Porém, o CBM não está presente em todas celulases, sendo sua ausência inclusive preferencial em algumas aplicações, como é o caso da indústria têxtil (Camassola *et al.*, 2007).

Como é comum aos sistemas enzimáticos que atuam em conjunto, as celulases atuam de forma cooperativa ou sinérgica. Logo, a soma das atividades individuais é inferior à atividade das enzimas atuando em conjunto. São descritas diversas formas de sinérgismo para celulases, dentre elas o existente entre endoglicanases e celobiohidrolases e também entre celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidases (Lynd *et al.*, 2002). Desse modo, assim como ocorre na natureza, é altamente aconselhável que a busca biotecnológica não se baseie em uma única enzima, e sim na otimização de misturas enzimáticas capazes de degradar um substrato natural complexo, liberando hexoses e pentoses, substratos para a posterior fermentação a etanol.

Seguindo o objetivo de obtenção de um combustível de baixo custo, interessante é a utilização de enzimas cujo custo de produção também seja baixo. O aumento da dosagem de enzimas na degradação de uma determinada biomassa pode aumentar o rendimento da hidrólise, porém concomitantemente aumentam-se os gastos. Desse modo, salienta-se a necessidade de obtenção de enzimas eficientes, de termoestabilidade considerável e com alta atividade específica. Conseqüentemente, a utilização de reduzidas quantidades de enzima resultaria na maior produção de glicose sem necessidade de adição de enzima excedente.

### **6. O potencial celulolítico de fungos filamentosos**

Um exemplo de fungo filamentoso conhecido produtor de celulases e organismo modelo de estudos nesta área é o deuteromiceto *Trichoderma reesei*. Este fungo tem alto potencial celulolítico, sendo responsável pela produção de cinco endoglicanases, duas celobiohidrolases e duas  $\beta$ -glicosidases (Takashima *et al.*, 1999; Herpöel-Gimbert *et al.*, 2008). Em razão de seu extenso arsenal enzimático e sua capacidade de degradação de celulose microcristalina, *T. reesei* tem sido há muito um parâmetro no que concerne à aplicação industrial de celulases (Kubicek *et al.*, 1992).

Este fungo é há cerca de cinquenta anos o modelo para estudo de enzimas lignocelulolíticas de modo geral, incluindo sua regulação (Rauscher *et al.*, 2005; Stricker *et al.*, 2008) e tendo representantes destas enzimas com estrutura tridimensional elucidada (Rouvinen *et al.*, 1990; Kleywegt *et al.*, 1997; Leggio *et al.*, 2002).

O secretoma de duas linhagens deste fungo obtidas por mutagênese randômica mostra a ocorrência de inúmeras enzimas lignocelulolíticas, revelando o direcionamento do metabolismo para a produção destas hidrolases quando da indução do fungo em meio contendo lactose (Herpöel-Gimbert *et al.*, 2008). A linhagem hipersecretora RUT-C30, por exemplo, demonstra ter um metabolismo mais voltado para a produção de celulasas, porém as mutações que causaram este fenômeno são ainda pouco claras (Herpöel-Gimbert *et al.*, 2008). Recentemente foram detectadas a deleção de 29 ORFs nesta linhagem em relação à linhagem selvagem (Seidl *et al.*, 2008), além da produção de uma forma truncada do mediador da repressão por carbono, CRE1. Os efeitos precisos destas mutações ainda são desconhecidos, embora seja provável que estes efeitos de causa pouco clara favoreçam a aplicação industrial desta linhagem. Entretanto, quando produzidas em sistema heterólogo as enzimas de *T. reesei* não necessariamente demonstrariam melhores valores de atividade, visto que sua expressão e secreção não dependeriam mais da fisiologia alterada artificialmente de seu organismo de origem. Outro fator a se salientar é que as misturas enzimáticas naturalmente produzidas por um único fungo não necessariamente são otimizadas para degradação de um determinado composto.

A caracterização do *pool* celulolítico e hemicelulolítico de um potente decompositor de biomassa como *T. reesei* é tema constante na literatura especializada (Juhász *et al.*, 2005; Herpöel-Gimbert *et al.*, 2008). Nesse sentido, é necessário investir não só em outros fungos como também em outras metodologias de produção de enzimas. Na natureza, uma só espécie não é o suficiente para degradação de biomassa vegetal, tampouco só uma classe enzimática. *T. reesei* tem alta produção da CBHI e escassez de BGLI e II, e também algumas linhagens, como RUT C-30 não têm potencial de degradar hemicelulose com eficiência (Herpöel-Gimbert *et al.*, 2008). Este desbalanço observado no *pool* lignocelulolítico de *T. reesei* pode desmotivar sua utilização na degradação de substratos complexos.

Há inúmeros outros fungos lignocelulolíticos com potencial biotecnológico comparável a *T. reesei* no que concerne à sua eficiência enzimática. Estes possuem também múltiplos genes de celulasas e o fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* não é exceção. Este organismo há muito têm seu arsenal lignocelulolítico descrito (Sharma *et al.*, 1991; Chikamatsu *et al.*, 1999; de Vries & Visser, 2001; Lockington *et al.*, 2002)

e seu genoma de 31 Mb seqüenciado, apresentando mais de 9000 genes codificadores de proteínas, organizados em oito cromossomos (Galagan *et al.*, 2005).

Foram descritas nos *Aspergilli* a produção das três classes de celulases, sendo a espécie *A. nidulans* produtora de um total de três endoglicanases, três celobiohidrolases e quatro  $\beta$ -glicosidases (de Vries & Visser, 2001). Dentre as endoglicanases de outras espécies do gênero *Aspergillus*, Bagga e colaboradores (1990) afirmam a existência de no mínimo uma e no máximo três isoenzimas. Segundo os resultados destes autores, em todos os outros *Aspergilli* observados, somente *A. nidulans* apresentou produção das três isoenzimas, sendo que outras espécies conhecidas como *A. niger* e *A. oryzae* apresentaram produção de só uma forma de endoglicanase.

Sabe-se que endoglicanases ou CMCase (nome dado em função do substrato artificial usado para caracterização de sua atividade em ensaios enzimáticos) são geralmente monoméricas e de tamanho molecular de 22 a 45 kDa, tendo pouca ou nenhuma glicosilação e apresentando freqüentemente atividade ótima na faixa de pH de 4 a 5 e temperatura de 50 a 70°C (Dashtban *et al.*, 2009). Quanto à sua estrutura, a díade catalítica está presente na porção interna de uma fissura em forma de “V” (Davies & Henrissat, 2005) e estas enzimas podem ou não apresentar CBMs (Dashtban *et al.*, 2009).

No arsenal celulolítico de *A. nidulans*, as endoglicanases são a classe enzimática melhor descrita. Os estudos eletroforéticos de Bagga e colaboradores (1989) já apontavam para a existência de três isoenzimas, nomeadas por este grupo EGI, EGII e EGIII. As duas primeiras endoglicanases foram detectadas em todas as linhagens empregadas neste estudo e somente EG I foi detectada em todas linhagens analisadas por Sharma e colaboradores (1990). Porém, foi observado que a terceira endoglicanase, de tamanho maior e surgimento mais tardio, tinha sua produção vinculada à formação de cleistotécios. Posteriormente, informações adicionais foram elucidadas a respeito desta enzima (Choi *et al.*, 2005).

Ainda segundo Bagga e colaboradores (1989), foi sugerido que as enzimas EGI e EGII tinham pico de produção de 2 dias em culturas agitadas e estacionárias. Foram obtidos consideráveis valores de atividade no meio intracelular, principalmente em frascos agitados. Em experimentos de atividade em gel foi observado a mesma intensidade de bandas tanto para a fração intra quanto extracelular. Este fato levanta a possibilidade de uso de um sistema de secreção mais eficiente, visto que relevante quantidade de enzima permaneceu no citoplasma.

Bagga e colaboradores (1990) purificaram e caracterizaram todo o *pool* celulolítico de *A. nidulans*, porém, especialmente em razão de diferentes



nomenclaturas dadas por diferentes autores, os resultados são de difícil comparação com outros estudos a respeito das mesmas enzimas.

Dentre as endoglicanases de *A. nidulans*, a endoglicanase A (EG A) é até então a enzima melhor descrita deste fungo (Chikamatsu *et al.*, 1999), embora as informações disponibilizadas quanto a seus parâmetros cinéticos sejam bioquimicamente insuficientes. Segundo este artigo, que utiliza nomenclatura de A a C para as endoglicanases, a produção de EG A respondeu à indução com carboxi-metilcelulose (CMC), gerando uma proteína de 35 kDa, posteriormente purificada. EG A mostrou atividade ótima a 50°C e em tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5, sendo que manteve cerca de 80% de sua atividade quando incubada por até duas horas em tampões de pH 4,5 a 7,5 a 37°C. Quanto à sua termoestabilidade, foi observada manutenção de 50% da atividade após 1h de incubação de 30 a 70°C.

Ainda segundo Chikamatsu e colaboradores (1999), esta enzima apresentou valores de atividade específica sobre CMC e celulose microcristalina (Avicel) de 21 e 0,32 U/mg de proteína, respectivamente. Neste estudo, uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima responsável pela liberação de 1 µmol de glicose por minuto.

A endoglicanase A apresenta 326 resíduos de aminoácidos, portando em sua seqüência primária características típicas de glicosil hidrolases da família 5, não apresentando módulo de ligação a carboidratos e com díade catalítica composta por dois resíduos de glutamato (Cantarel *et al.*, 2009).

Posteriormente, em uma ampla análise do potencial de degradação da parede celular de *Arabidopsis thaliana* operada por diversas enzimas de *A. nidulans*, Bauer e colaboradores (2006) clonaram 72 cDNAs codificadores destas enzimas. Dentre eles, estava a endoglicanase A. Esta enzima foi expressa pela linhagem X-33 de *Pichia pastoris* (Invitrogen) e apresentou valores de atividade maiores quando incubada em tampão não informado a 50 mM em pH 4,0 a cerca de 57°C. Entretanto, como o foco deste artigo era distinto do foco do presente trabalho, o sobrenadante da levedura transformada não passou por etapas de purificação das enzimas recombinantes, tampouco vários aspectos foram levantados para uma caracterização mais completa da endoglicanase A. Em razão de sua escassa informação a respeito do comportamento enzimático da proteína recombinante, optou-se por seguir os dados de Chikamatsu e colaboradores (1999) durante a caracterização.

Quanto às demais endoglicanases de *A. nidulans*, a literatura fornece informações controversas. Estudos recentes afirmam serem as endoglicanases B e C codificadas pelo mesmo gene (Endo *et al.*, 2008), enquanto artigos anteriores afirmavam o mesmo quanto às endoglicanases I e II (provavelmente correspondentes

a EG A e EG B) (Sharma *et al.*, 1990). Aliado a isso encontram-se as informações já mencionadas a respeito da produção da EG III (provavelmente correspondente à EG C) vinculadas à formação de cleistotécios (Bagga *et al.*, 1989; Choi *et al.*, 2005). Ainda uma quarta endoglicanase foi descrita, EG D, provavelmente envolvida em mecanismos de remodelação da parede celular durante a germinação devido a seu domínio expansina-*like* (Bouzarelou *et al.*, 2008).

Quando não confusa, a informação a respeito das endoglicanases, especialmente EG A, ainda é insuficiente. Diante dos esforços de diversos estudos pouco conclusivos (Bagga *et al.*, 1989; Bagga *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1990) e da caracterização superficial de uma endoglicanase promissora (Chikamatsu *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2006) a EG A mostra-se um alvo interessante de projetos de melhoramento de produção, caracterização bioquímica mais complexa e, futuramente, componente de misturas enzimáticas otimizadas em laboratório.

Um meio de facilitar a purificação para uma mais confiável caracterização bioquímica reside no emprego de organismos hospedeiros para expressão heteróloga.

### **7. Expressão heteróloga**

Dentre as mais utilizadas plataformas de produção de proteínas recombinantes encontra-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tendo sido a espécie pioneira em expressão heteróloga tanto para uso industrial, médico ou no âmbito da pesquisa. Embora tenham organização celular complexa típica de eucariotos, são de simples manipulação e sendo capazes de atingir altas densidades celulares (Romanos *et al.*, 1992).

Alternativamente também é muito utilizada a bactéria gram negativa *Escherichia coli*, porém, por não apresentarem maquinaria de processamento pós-traducional complexo como sistema heterólogo para a expressão de proteínas eucarióticas, procaríotos têm aplicação reduzida.

No caso específico de celulasas, a produção de celulasas das três classes empregando *S. cerevisiae* como sistema heterólogo resultou em baixos níveis de atividade em razão da reduzida secreção das respectivas proteínas conforme sugerido pelos autores (Benoliel *et al.*, 2009; Siqueira, 2006). Aliado a este fator, é perceptível a grande secreção de proteínas nativas de *S. cerevisiae* em relação à proteína heteróloga, como observado em experimentos de SDS-PAGE realizados pelos estudos supracitados. Desse modo, a purificação do produto recombinante é dificultada em razão da grande quantidade de proteínas contaminantes da própria levedura hospedeira.

Uma outra desvantagem conhecida de *S. cerevisiae* é a freqüente hiperglicosilação, podendo haver a adição de até 150 resíduos de manose (Balamurugan *et al.*, 2006). Esta modificação em relação à proteína produzida em sistema nativo poderia muito provavelmente afetar sua ação biológica.

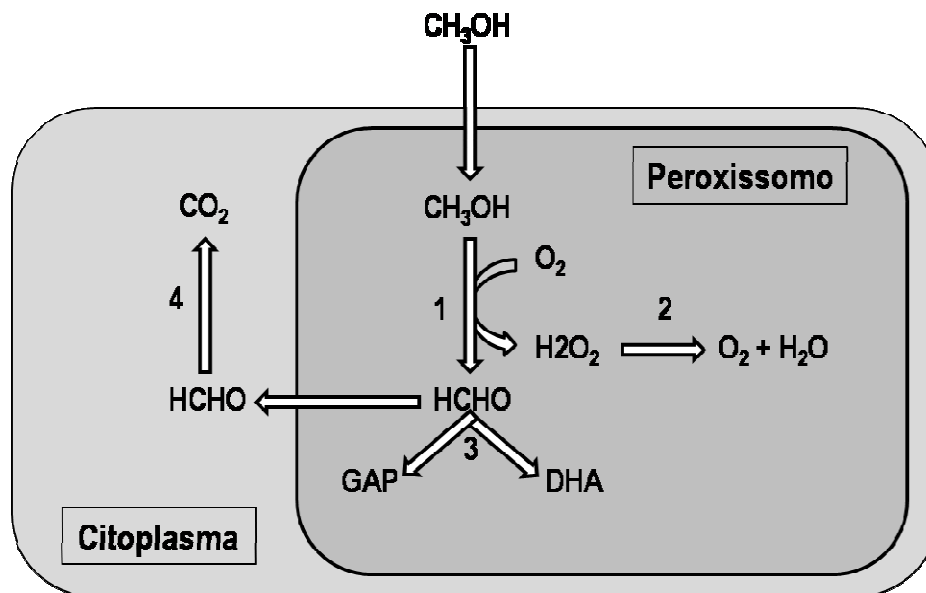
Citada na literatura como uma alternativa aos baixos níveis de secreção atingidos por *S. cerevisiae* estão as leveduras do gênero *Pichia*. Neste gênero destacam-se algumas espécies, como *P. pastoris* e *P. angusta* (anteriormente classificada no gênero *Hansenula*). Nos experimentos de Mack e colaboradores (2009) foram verificados maiores valores de densidade celular para *P. pastoris*, refletindo em maiores quantidades de proteína recombinante. Além disso, no mesmo estudo foram observados menores índices de degradação, quanto comparado com *P. angusta*. Quando da expressão heteróloga do fragmento NK-1 do fator de crescimento de hepatócitos, *P. pastoris*, com somente quatro cópias do gene *NK1* atingiu níveis de produção mais de 4 vezes superior aos de *P. angusta*, portando 12 cópias.

Também como sugerido por Romanos e colaboradores (1992), a levedura *Pichia pastoris* tem há muito surgido como hospedeira promissora na expressão heteróloga de genes eucarióticos, não tendo atividade de hiperglicosilação e utilizando metodologias de clonagem semelhantes às já estabelecidas para *Saccharomyces* (Cereghino & Cregg, 2000).

*P. pastoris* é um organismo unicelular de fácil manipulação e rápido crescimento, sendo também um eucarioto capaz de realizar eficientemente processos envolvidos na expressão, modificação pós-traducional e secreção de proteínas, gerando níveis de proteína e densidade celular elevados. *S. cerevisiae* freqüentemente é alvo das concentrações de substâncias tóxicas, como é o caso do ácido acético, produzido durante os processos de fermentação (Cereghino *et al.*, 2002).

Segundo Balamurugan e colaboradores (2000), um dos critérios para escolha do organismo hospedeiro deve levar em conta a fisiologia da expressão de genes heterólogos, ou seja, que vias de indução da expressão gênica favorecem a produção das proteínas de interesse e qual o efeito no crescimento celular. Em *P. pastoris*, o gene pode estar sob controle de um promotor induzível, sendo este responsivo ao metanol ao qual a levedura é exposta. Nos peroxissomos, o metanol é metabolizado a formaldeído e peróxido de hidrogênio com a participação da enzima álcool oxidase (AOX) na etapa inicial, consumindo oxigênio molecular. A enzima álcool oxidase citosólica é seqüestrada para o peroxissomo para, junto com a catalase, converter o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água. Parte do formaldeído gerado, por sua vez, é oxidado por desidrogenases citoplasmáticas, fornecendo energia à célula. O restante é

convertido a gliceraldeído-3-fosfato após uma série de reações (Cereghino & Cregg, 2000) (fig. 4)



**Figura 4.** Representação esquemática das principais reações da via de metabolização do metanol em uma célula de *Pichia pastoris*. 1, álcool oxidase; 2, catalase; 3, dihidroxiacetona sintase; 4, desidrogenases citoplasmáticas; DHA, dihidroxiacetona; GAP, gliceraldeído 3-fosfato. Os compartimentos celulares desenhados não estão em escala.

A enzima responsável por operar o primeiro passo do processo ilustrado na figura 4 tem baixa afinidade por oxigênio molecular. Portanto, o metabolismo aeróbico de *P. pastoris* parece compensar este fato produzindo altas quantidades de álcool oxidase (Higgins & Cregg, 1998). Isso é observado pelo aumento de cerca de 1000 vezes na produção da proteína heteróloga diante da utilização de metanol como única fonte de carbono. (Cereghino *et al.*, 2002).

*Pichia pastoris* é capaz de atingir altas densidades celulares (Cereghino & Cregg, 1999). Para tal, o aumento de biomassa é resultante do consumo de uma fonte de carbono não indutora, não-fermentescível, porém tampouco repressora: glicerol. Em seguida, inicia-se a alimentação com metanol, e esta pode ser realizada gradativamente caso o crescimento se dê em um fermentador. Neste caso, a administração de glicerol à cultura seria o fator limitante para o crescimento, diminuindo assim as forças de repressão do sistema de produção da enzima álcool oxidase. A ativação deste sistema dar-se-ia com o início da introdução de metanol em concentrações crescentes, permitindo a aclimatação da levedura e o início da produção da proteína recombinante (Cereghino *et al.*, 2002).

Há dois genes responsáveis pela síntese da enzima álcool oxidase: *AOX1* e *2*, embora o primeiro responda pela maior atividade desta enzima (Cregg *et al.*, 1988), sendo que em metanol os transcritos de *AOX1* podem atingir 5% do RNA poli-A<sup>+</sup>

produzido (Higgins & Cregg, 1998) e a enzima codificada, por sua vez, responsável por 30% do *pool* de proteínas intracelulares (Cereghino, 2000). Estes dados demonstram a atraente aplicabilidade do metanol na indução dos promotores AOX para expressão de genes sob seu controle. Desse modo, a inserção do gene codificador da proteína de interesse inserido em vetores de expressão integrativos pode ser direcionada para o *locus* AOX.

Visto que muitas das linhagens comerciais apresentam marcas auxotróficas, a confirmação da presença da seqüência de DNA exógena no meio intracelular é o crescimento na ausência de dado componente que a levedura é incapaz de produzir. Dentre as marcas auxotróficas existentes nesta levedura encontram-se a deleção dos *loci his4, ura3, arg4*, dentre outros. Porém, a verificação da integração no genoma de *P. pastoris* do fragmento de DNA exógeno só é possível mediante experimentos de estabilidade mitótica ou, mais confiavelmente, *Southern blot*. A correta integração de fragmentos do vetor de expressão no genoma é imprescindível, bem como a identificação do *locus* de integração. Esta última informação possibilita ao pesquisador identificar o fenótipo da levedura transformada no que concerne à taxa de utilização de metanol.

Em caso de integração no *locus HIS4* mutado no genoma, todas as leveduras terão seu gene *AOX1* preservado. Como este gene codifica a enzima responsável pela maior atividade da álcool oxidase no metabolismo de *P. pastoris*, a metabolização de metanol e o conseqüente crescimento da levedura são rápidos. Este quadro caracteriza o fenótipo *Mut<sup>+</sup>* (*methanol utilization plus* – utilização “rápida” de metanol). Por outro lado, a remoção do gene *AOX1* nativo resulta no fenótipo *Mut<sup>S</sup>* (*methanol utilization slow* – utilização lenta de metanol). A identificação do fenótipo é interessante visto que a velocidade de utilização de metanol e de crescimento da levedura podem influenciar em parâmetros como dosagem de metanol a ser realizada e processamento do produto heterólogo.

Após confirmação da integração da seqüência exógena no genoma da levedura hospedeira, bem como da identificação do número de cópias do gene heterólogo, os clones transformantes podem ser avaliados no que concerne à produção da proteína de interesse. Esta etapa de varredura é essencial para que seja selecionado o melhor transformante.

Encontram-se também disponíveis outras estratégias de indução e de integração no genoma de *Pichia pastoris*, como o emprego de promotores de resposta constitutiva, como o promotor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *P<sub>GAP</sub>*, e o promotor da formaldeído desidrogenase dependente de glutatona, *P<sub>FLD1</sub>* (Cereghino & Cregg, 2000), ou de resposta a outros indutores (Cereghino, 2000). São também

encontradas linhagens deficientes em genes codificadores de proteases, cujo emprego pode otimizar a produção da enzima heteróloga. Porém, devido a seu crescimento mais lento, sua utilização só é sugerida em casos de prejuízo na produção da proteína heteróloga devido à proteólise (Cereghino & Cregg, 2000). Independente do método de indução e vetores de expressão a serem empregados, o sistema de expressão de *P. pastoris* apresenta uma adicional vantagem de estar disponível como um *kit* comercial (*Pichia* Expression Kit, Invitrogen).

### **8. Principais vetores de expressão e linhagens de *P. pastoris***

Recentemente o genoma e o secretoma desta levedura foram publicados (Mattanovich *et al.*, 2009), enfatizando a facilidade da purificação de produtos heterólogos secretados diante da baixa quantidade de proteínas nativas secretadas pela hospedeira (Balamurugan *et al.*, 2006). No caso da linhagem DSMZ 70382 de *P. pastoris*, a maioria das proteínas tem massa molecular superior a 40 kDa. Dentre as linhagens disponíveis em nosso laboratório e visando o objetivo de alta produção de celulases recombinantes, torna-se interessante o emprego da linhagem GS115. É também interessante o emprego de linhagens com genes de proteases deletados, como é o caso de SMD1168. Entretanto, em razão de seus menores níveis de produção, esta torna-se uma opção somente quando a proteólise apresenta-se como um impedimento confirmado durante a produção da proteína heteróloga. A linhagem GS115, embora não apresente deleção de genes de proteases, é bastante eficiente no que concerne à alta produtividade em razão das altas taxas de divisão celular.

Quanto aos vetores para expressão heteróloga em *P. pastoris*, a estrutura básica de todos os vetores comercializados é mesma, sendo que nenhum conta com origem de replicação para levedura. Por outro lado, muitos vetores carregam o gene *his4*, responsável por complementar a marca auxotrófica da levedura após a integração, visto que muitas das linhagens comerciais de *P. pastoris* são incapazes de produzir histidina ou sobreviver em um meio sem este aminoácido. Para que o processo de transformação aconteça com sucesso, é necessário que a levedura recombinante His<sup>+</sup> tenha integrado em seu genoma a seqüência do vetor em parte ou em sua totalidade. Todos eles contam com a seqüência do promotor AOX1, localizada à montante do sítio múltiplo de clonagem. À jusante deste localiza-se a seqüência terminadora do gene *AOX1*. Está presente também o gene da  $\beta$ -lactamase, responsável pela resistência à ampicilina, alvo de pressão seletiva quando das etapas de sub-clonagem em bactéria. Por último, é encontrada também uma origem de replicação para bacteriófagos, visando a produção de ssDNA para experimentos envolvendo mutagênese.

Tendo em vista a purificação do produto heterólogo em um sobrenadante pobre de proteínas nativas, optamos pela secreção do produto heterólogo para o meio extracelular. Para tal, é necessária a presença do DNA codificador de uma seqüência-sinal no vetor ou no cDNA clonado.

Dentre os vetores com DNA de seqüência-sinal no próprio vetor está disponível pHIL-S1, portando a seqüência codificadora do peptídeo-sinal da fosfatase ácida (produzida a partir do gene *PHO*). Uma outra opção é o vetor pPIC9, que apresenta o peptídeo-sinal do feromônio do tipo e acasalamento  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, é salientado pela empresa comercializadora da levedura que a seqüência-sinal do gene *PHO*, apesar de ser nativa da própria levedura, pode não acarretar em correta secreção (*Pichia Expression kit*, Invitrogen).

Por fim, dentre os vetores desenhados para expressão intracelular, ressalta-se o vetor pHIL-D2. Neste caso, para secreção do produto heteróloga faz necessária a clonagem de uma seqüência codificadora de peptídeo-sinal a ser reconhecido pela hospedeira, conforme mencionado anteriormente. Em nosso grupo este vetor já foi empregado com sucesso por Oliveira (2007), que observou o correto processamento do peptídeo-sinal da celobiohidrolase 1.2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* por *P. pastoris*.

---

*Justificativa*

---



Diante do interesse biotecnológico em relação ao aproveitamento de resíduos da agricultura para a produção de bioetanol, vários esforços em nosso grupo de pesquisa têm sido realizados visando à produção heteróloga e caracterização de produtos recombinantes com atividade celulolítica. A caracterização de enzimas recombinantes rende maior confiabilidade ao seu emprego no futuro, como componente de misturas enzimáticas para degradação de substratos complexos.

Com o estabelecimento dessa linha de pesquisa em nosso laboratório, nossa participação no projeto Bioetanol MCT/FINEP residiu na produção de celulases recombinantes, dentre elas a endoglicanase A de *Aspergillus nidulans*. Aliado a isso, é possível enriquecer a literatura por meio da descrição mais completa de aspectos funcionais da endoglicanase A de *A. nidulans*, fungo com genoma seqüenciado e rico em atividade lignocelulolítica, porém com dados desatualizados e controversos no que diz respeito a aspectos mais específicos das celulases produzidas.

Nesse sentido, este trabalho propõe a utilização da vantajosa e padronizada metodologia de expressão heteróloga em *P. pastoris* para produção da endoglicanase A de *A. nidulans* com posterior purificação do produto recombinante e caracterização bioquímica.

---

# *Objetivos*

## 1 Objetivo

- **Objetivo geral:**

- ✓ Expressão heteróloga da endoglicanase A de *Aspergillus nidulans* e caracterização funcional da enzima recombinante.

- **Estratégia experimental:**

- ✓ Extração de RNA total de *A. nidulans*, após cultivo em condições de indução do sistema lignocelulolítico, e síntese do cDNA *eglA*

- ✓ Clonagem do cDNA *eglA* em vetor de expressão de *P. pastoris*

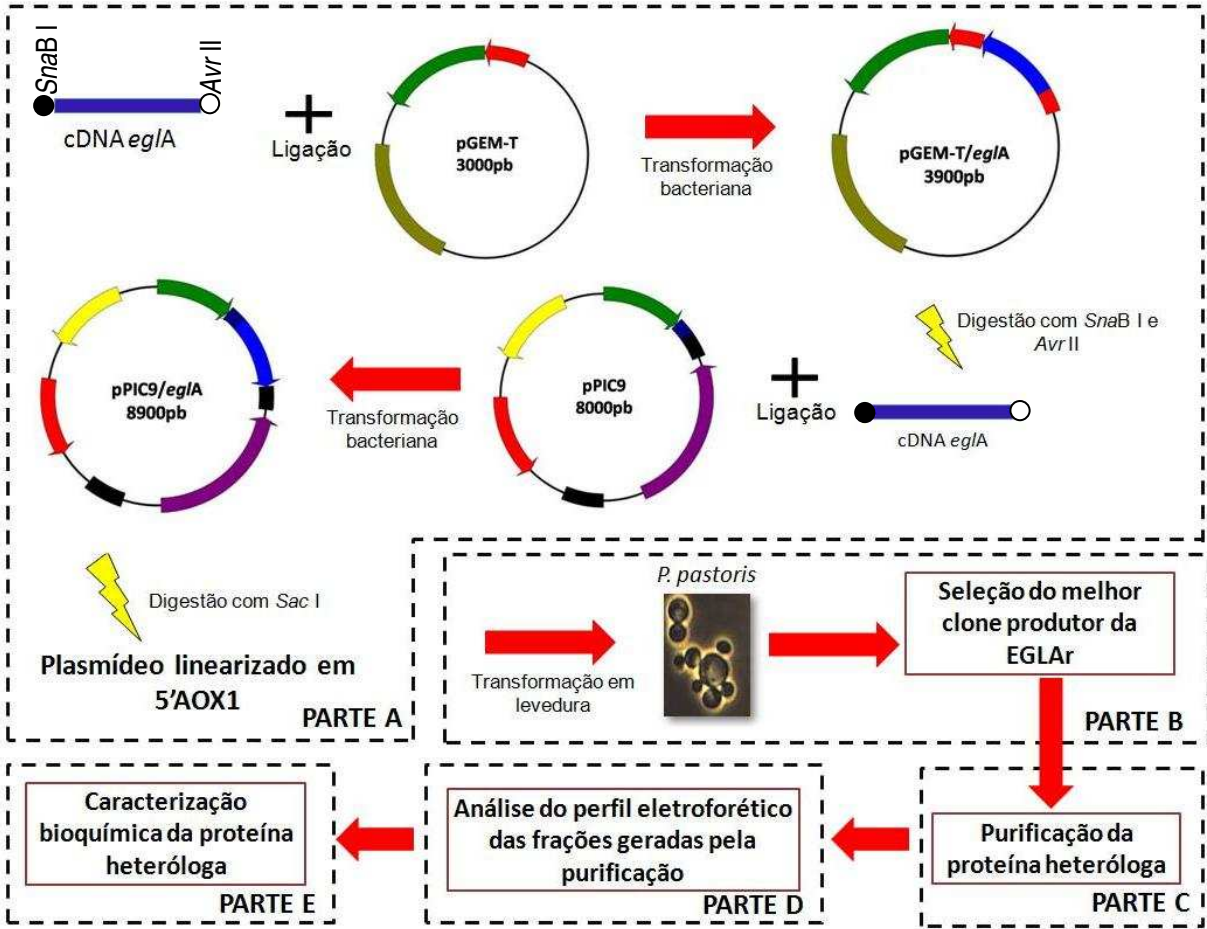
- ✓ Produção da enzima recombinante em sistema heterólogo de *P. pastoris*;

- ✓ Seleção dos clones produtores da enzima recombinante;

- ✓ Análise da cinética de produção da enzima heteróloga;

- ✓ Obtenção de frações purificadas total e/ou parcialmente contendo a endoglicanase A heteróloga;

- ✓ Caracterização bioquímica da endoglicanase A heteróloga presente nas diferentes frações da purificação.



**Figura 5:** Esquema da estratégia definida para clonagem do cDNAs *egIA* nos vetores de expressão para *P. pastoris*. Está ilustrada somente a estratégia de clonagem do cDNA de interesse no vetor pPIC9, sendo que para a construção em pHIL-D2 a estratégia geral foi a mesma. Estão indicadas as etapas de construção dos vetores (Parte A), transformação da levedura e seleção de clones (Parte B), purificação (Parte C) e caracterização do produto heterólogo (Parte D). A disposição dos itens nas seções *Métodos* e também na seção *Resultados* segue a divisão estabelecida neste fluxograma.

---

*Material  
& Métodos*

---

## 1 Linhagens de microrganismos

- ***Escherichia coli***

Para realização das etapas de transformação foi empregada a linhagem bacteriana XL10 Gold® *Ultracompetent Cells* (Stratagene). As alíquotas de células transformadas foram mantidas a -80°C em glicerol 35% e cultivadas em meio LB suplementado com os antibióticos adequados nas concentrações recomendadas. O protocolo de competência está descrito na seção *Métodos*.

**Tabela 1.** Linhagem de *Escherichia coli* utilizada.

Linhagem	Genótipo	Fabricante
XL10 Gold® <i>Ultracompetent Cells</i>	TetrD( <i>mcrA</i> )183 D( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacIqZDM15</i> Tn10 (Tetr) Amy Camr].	Stratagene

- ***Pichia pastoris***

Para realização das transformações de levedura visando produção das enzimas heterólogas foi utilizada a linhagem GS115 de *P. pastoris* (Invitrogen), incapaz de crescer na ausência de histidina em razão da deleção do gene *his4*. A transformação seguiu o protocolo descrito na seção *Métodos* (item B1) e as alíquotas de células foram utilizadas imediatamente.

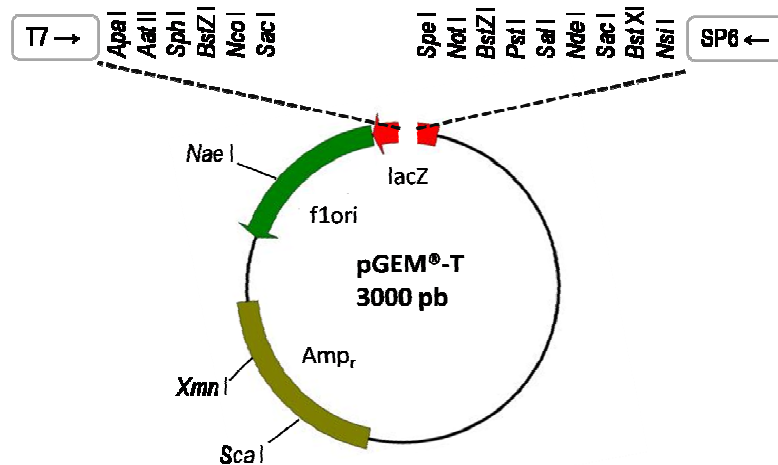
- ***Aspergillus nidulans***

A linhagem *argB*<sup>-</sup> (*pabaA1*, *biA1*, *methG1*, *argB*) utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelo Dr. Joseph Strauss da Universidade Tecnológica de Viena (Áustria) e é incapaz de crescer na ausência de arginina.

## 2 Vetores

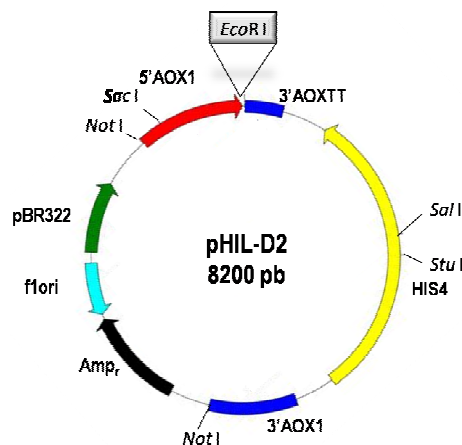
- **Para *Escherichia coli***

Para construção dos vetores visando a transformação bacteriana durante as etapas de sub-clonagem foi empregado o vetor comercial pGEM-T® (Promega) (fig. 6). As construções concluídas a partir deste vetor estão descritas na seção *Resultados* (tabela 2).

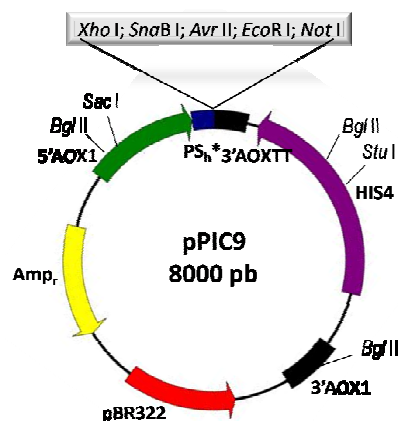


**Figura 6:** Mapa físico do vetor pGEM-T® (Promega). Está indicado na figura o sítio múltiplo de clonagem e sítios de restrição para endonucleases.

- Para *P. pastoris*



**Figura 7:** Mapa físico do vetor pHIL-D2 (Invitrogen). Estão indicados sítio múltiplo de clonagem (em destaque no topo), sítios de restrição para principais enzimas e outras regiões componentes.



**Figura 8.** Mapa físico do vetor pPIC9 (Invitrogen). Estão indicados sítio múltiplo de clonagem (em destaque no topo), sítios de restrição para principais enzimas e outras regiões componentes. PS<sub>n</sub>\*: seqüência codificadora do peptídeo-sinal do fator-α de *Saccharomyces cerevisiae*.

Quanto às construções para expressão heteróloga em *P. pastoris*, a estratégia experimental envolveu a utilização de dois diferentes vetores, cujos mapas estão nas figuras 7 e 8.

### 3 Oligonucleotídeos sintéticos específicos

Os oligonucleotídeos utilizados, sintetizados pela *IDT (Integrated DNA Technologies)*, foram recebidos na forma de um liofilizado, posteriormente ressuspendido em Tris-HCl 5 mM pH 7, para uma concentração final de 100 µM.

**Tabela 2.** Características dos oligonucleotídeos desenhados e seus respectivos sítios de restrição. Os sítios de restrição a serem introduzidos nos cDNAs produzidos correspondem à seqüência sublinhada

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)
endoglicanase A de A.	EG A <sub>1</sub> 5' ( <i>EcoRV</i> )	<u>GATATC</u> ACCATGAGATCTCTCGTCCTTC	57,8
<i>nidulans</i> – <sup>a</sup> PS nativo	EG A 3' ( <i>EcoRV</i> )	GGATATC <u>TTATTGACTTCCCACG</u> AAATAC	55,3
endoglicanase A de A.	EG A <sub>2</sub> 5' ( <i>SnaBI</i> )	<u>TACGTAGCTTT</u> CACATGGTTTGG	55,3
<i>nidulans</i> – <sup>a</sup> PS heterólogo	EG A 3' ( <i>AvrII</i> )	CCTAGG <u>TTATTGACTTCCCACG</u>	54,9
endoglicanase A de A. <i>nidulans</i>	EG An FW <sup>b</sup>	GTCCCTTGCCTGAACCTCA	56,5
endoglicanase A de A. <i>nidulans</i>	EG An REV <sup>b</sup>	CAGGCTCCAGTCCAAGAGTT	56,8

<sup>a</sup>PS: seqüência codificadora do peptídeo-sinal

<sup>b</sup> Oligonucleotídeos empregados no experimento de qPCR

A partir dessa solução estoque, foram preparadas alíquotas de cada iniciador na concentração de 10µM. O armazenamento deu-se a -20°C até o momento de sua utilização. A tabela 2 mostra as principais características dos oligonucleotídeos empregados. Estão também descritos nesta tabela os oligonucleotídeos empregados no experimento de PCR em tempo real.



## 4 Meios de cultura

Todos meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 20 minutos e diluídos em água destilada, exceto quando discriminado outro diluente ou outro processo de esterilização.

### 4.1 Meios para cultivo de bactérias

#### 4.1.1 Meio Lúria-Bertani (LB) pH 7,2

Extrato de levedura (p/v)	0,5 %
Peptona de caseína (p/v)	1,0 %
NaCl (p/v)	1,0 %

Para solidificação do meio foi empregado 1,5 % (p/v) de ágar bacteriológico.

### 4.2 Meios para cultivo de fungos filamentosos

#### 4.2.1 Meio mínimo para *A. nidulans* pH 6,8

Solução de sais (v/v)	2,0 %
Glicose (p/v)	1,0 %

Para solidificação do meio foi empregado 2 % (p/v) de ágar bacteriológico.

#### 4.2.2 Solução de Sais

KCl (p/v)	2,6 %
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (p/v)	1,0 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (p/v)	7,6 %
Solução de elementos traço (v/v)	5,0 %

#### 4.2.3 Solução de elementos-traço pH 2,0 10x

Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -10H <sub>2</sub> O (p/v)	0,04 %
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O (p/v)	0,40 %
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (p/v)	0,71 %
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O (p/v)	0,80 %
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (p/v)	0,08 %

Ajustar o pH com HCl.

**4.2.4 Meio completo para *A. nidulans* pH 6,5 a 6,8**

Solução de sais (v/v)	2,00 %
Caseína hidrolisada (p/v)	0,15 %
Glicose (p/v)	1,00 %
Peptona (p/v)	0,20 %
Extrato de levedura (p/v)	0,05 %
Suplementos	1x

**4.2.5 Suplementos**

Todos os suplementos foram diluídos em água bidestilada e esterelizados por filtração em membrana de 22 µm. As soluções foram feitas de modo a ficarem cem vezes concentradas em relação à sua concentração final.

**4.2.5.1 Solução de tartarato de Amônio**

Tartarato de amônio (p/v)	9,2 %
---------------------------	-------

**4.2.5.2 Solução de ácido paraminobenzóico**

Ácido paraminobenzóico (p/v)	0,02 %
------------------------------	--------

**4.2.5.3 Solução de D-biotina**

D-biotina (p/v)	0,01 %
-----------------	--------

**4.2.5.4 Solução de L-metionina**

L-metionina (p/v)	2,98 %
-------------------	--------

**4.3 Meios para cultivo de leveduras****4.3.1 Meio YPD pH 7,2**

Extrato de levedura (p/v)	1,0 %
Peptona de caseína (p/v)	2,0 %
Glicose (p/v)	2,0 %

Para solidificação do meio foram empregados 2,0 % (p/v) de ágar bacteriológico.

**4.3.2 Meio YNB 10X (sem aminoácidos)**

<i>Yeast Nitrogen Base Without aminoacids (Difco)</i> (p/v)	13,4 %
Sulfato de amônio (p/v)	10,0 %
Esterilizado por filtração (membrana de 22 µm).	

**4.3.3 Meio MD (*Minimal Dextrose Medium*)**

YNB (p/v)	1,34 %
Glicose (p/v)	1,00 %
Biotina (p/v)	$4 \times 10^{-5}$ %

Para solidificação do meio foram empregados 2,0% (p/v) de ágar bacteriológico. Para os testes de estabilidade mitótica o meio MD foi suplementado com histidina na concentração final de 0,004%, (p/v) originando o meio MDH (*Minimal Dextrose Medium + Histidine*).

**4.3.4 Meio BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) e BMGU**

Peptona (p/v)	2,00 %
Extrato de levedura (p/v)	1,00%
YNB (p/v)	1,34 %
Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0	100 mM
Biotina (p/v)	$4 \times 10^{-5}$ %
Glicerol (v/v)	1,00 %

Para o meio BMGU a fonte de nitrogênio foi trocada de YNB para uréia, mantendo-se a mesma concentração final.

**4.3.5 Meio BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) e BMMU**

Peptona (p/v)	2,00 %
Extrato de levedura (p/v)	1,00 %
YNB (p/v)	1,34 %
Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0	100 mM
Biotina (p/v)	$4 \times 10^{-5}$ %
Metanol (v/v)	0,50 %

Para o meio BMMU a fonte de nitrogênio foi trocada de YNB para uréia, mantendo-se a mesma concentração final.

**5 Soluções****5.1 Soluções para eletroforese em gel de agarose****5.1.1 Tampão de corrida para eletroforese Tris-borato-EDTA 10X pH 8,2**

Trizma Base (p/v)	10,8 %
Ácido Bórico (p/v)	5,5 %
EDTA (p/v)	3,0 %

**5.1.2 Tampão de amostra para eletroforese 5X**

TEB	5X
Glicerol (v/v)	30,0 %
Azul de bromofenol (p/v)	0,1 %
Xilenocianol (p/v)	0,1 %

**5.2 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)****5.2.1 Tampão de amostra SDS-PAGE 5X**

Tris-Cl pH 6,8	60,0 mM
Glicerol (p/v)	25,0 %
SDS (p/v)	2,0 %
$\beta$ -mercaptoetanol	14,4 mM
Azul de bromofenol (p/v)	0,1 %

**5.2.2 Tampão de corrida para eletroforese Tris-Glicina 5X pH 8,3**

Trizma-base	125,0 mM
Glicina	960,0 mM
SDS (p/v)	0,5 %

**5.2.3 Solução de Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)**

Acrilamida (p/v)	39%
Bis-acrilamida (p/v)	1%

A solução foi filtrada em papel de filtro e abrigada da luz a 4°C.

**5.2.4 Gel concentrador 5% SDS-PAGE**

Acrilamida/bis-acrilamida 39:1 (v/v)	5,00 %
Tris-Cl pH 6,8 (p/v)	1,52 %
SDS (p/v)	0,10 %
Persulfato de amônia (p/v)	0,05 %
TEMED (p/v)	0,10 %

**5.2.5 Gel separador 10% SDS-PAGE**

Acrilamida/bis-acrilamida (v/v)	10,00 %
Tris-Cl pH 8,8 (p/v)	4,54 %
SDS (p/v)	0,10 %
Persulfato de amônia (p/v)	0,05 %
TEMED (v/v)	0,05 %

**5.2.6 Solução corante para SDS-PAGE**

Metanol (v/v)	40,00 %
Ácido acético (v/v)	10,00 %
<i>Azul brilhante de Coomassie R-250</i> (p/v)	0,25 %

**5.2.7 Solução descorante para SDS-PAGE**

Metanol (v/v)	40%
Ácido acético glacial (v/v)	10%

**5.2.8 Solução fixadora I para SDS-PAGE**

Metanol (v/v)	30%
Ácido acético glacial (v/v)	10%

**5.2.9 Solução fixadora II para SDS-PAGE**

Etanol (v/v)	50%
--------------	-----

**5.2.10 Solução sensibilizadora para SDS-PAGE**

Tiosulfato de sódio (p/v)	0,02%
---------------------------	-------

**5.2.11 Solução de impregnação com prata para SDS-PAGE**

AgNO <sub>3</sub> (p/v)	0,200%
Formaldeído (v/v)	0,075%

**5.2.12 Solução reveladora para SDS-PAGE**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (p/v)	6,00%
Formaldeído (v/v)	0,05%

### 5.3 Soluções para transformação de bactérias e extração de DNA

#### 5.3.1 Solução de CaCl<sub>2</sub> para *E. coli* termocompetente

CaCl <sub>2</sub>	100 mM
Glicerol (v/v)	15%

#### 5.3.2 Solução estoque de ampicilina

Ampicilina	10 mg/mL
------------	----------

Adicionar gotas de NaOH até completa dissolução do reagente e esterilizar por filtração.

#### 5.3.4 Solução de 5-bromo-4-cloro-3indoxil-D-galactopiranosídeo (X-gal)

X-gal	20 mg
N, N - dimetilformamida	1 mL

#### 5.3.5 Solução de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo)

IPTG	100 mM
------	--------

Esterilizar por filtração.

#### 5.3.6 Tampão TE

Tris-Cl pH 8,0	25 mM
EDTA	20 mM

#### 5.3.7 Tampão de extração de DNA genômico de fungos filamentosos

Tris-Cl pH 8,0	10 mM
Proteinase K	200 µg/mL
EDTA	250 mM
Triton X100 (v/v)	0,5 %

Estocar a 4°C

#### 5.3.8 Solução I para extração de DNA plasmidial

Tris-Cl	25 mM pH 8,0
EDTA	10 mM pH 8,0
Glicose	50 mM

Estocar a 4°C

**5.3.9 Solução II para extração de DNA plasmidial**

NaOH	0,2 M
SDS (p/v)	1%

Misturar os reagentes somente no momento do uso.

**5.3.10 Solução III para extração de DNA plasmidial**

Acetato de potássio	3 M
Ácido acético glacial	2 M

O pH final da solução é em torno de 4,8 a 5,0. Estocar a 4°C

**5.3.11 Solução de RNase A**

RNase A	10 mg/mL
Acetato de sódio pH 4,8	50 mM

Ferver em banho-maria por 10 minutos.

**5.4 Soluções para ensaios enzimáticos e dosagem de proteínas****5.4.1 Tampões para ensaios enzimáticos**

Fosfato de sódio pH 6, 6,5 e 7	50 mM
Acetato de sódio pH 3, 4, 5 e 6	50 mM
Tris-Cl pH 7, 8 e 9	50 mM

Todos os tampões tiveram força iônica ajustada com NaCl

**5.4.2 Reagente de Bradford**

Azul brilhante de <i>Coomassie G</i> (70%) (p/v)	0,01 %
Etanol (v/v)	4,70 %
Ácido orto-fosfórico (v/v)	8,50 %

Filtrar em papel de filtro.

**5.4.3 Solução de ácido dinitrossalicílico (DNS)**

Ácido dinitrossalicílico (p/v)	1,0 %
Tartarato de sódio e potássio (v/v)	30,0 %

Dissolver lentamente sob aquecimento 10 g de DNS em 200 mL de NaOH 2M. Acrescentar lentamente 300g de tartarato de sódio e potássio e completar o volume para 1L com água destilada.

### **Parte A: Clonagem do cDNA *eglA* em vetores de expressão para *Pichia pastoris***

#### **A.1 Cultivo de *Aspergillus nidulans***

Com o objetivo de proceder a extração do DNA genômico do fungo filamentoso *A. nidulans*, este foi crescido por cerca de 5 a 6 dias em meio mínimo com ágar 2% a 30°C. Após verificação do crescimento do micélio e esporulação do fungo em placa, os esporos foram coletados com Tween 80 0,01% (p/v). A raspagem foi cuidadosamente realizada com espátula de modo a não remover juntamente fragmentos de micélio.

Os esporos foram contados com o auxílio de câmara de Neubauer (Loptik Labor Profundidade de 0,100mm 0,0025 mm<sup>2</sup>) e um total de 10<sup>6</sup> esporos/mL foram inoculados em meio completo. O fungo foi mantido sob constante agitação a 250 rpm por 24h a 30°C.

#### **A.2 Extração de DNA genômico (Bainbridge *et al.* 1990)**

Após coleta do fungo por filtração em papel de filtro, cerca de 500 mg (peso úmido) de micélio crescido foi macerado com nitrogênio líquido. Ao pó obtido adicionou-se 5 mL de tampão de extração juntamente com pérolas de vidro (4 mm). Misturou-se e agitou-se vigorosamente por 15 minutos. Após incubação do lisado a 37°C sob agitação a 250 rpm durante a noite, foi adicionado 0,15 volume de NaCl 1,5M, 0,7 volume de fenol tamponado pH 7,5 e 0,3 volume de clorofórmio. Após homogeneização, as fases foram separadas por centrifugação a 12000 x g durante 1 h a 4°C. A fase aquosa, obtida após a centrifugação, foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 50 µL de RNase A (10 mg/mL) e incubado por 10 min a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1 volume de clorofórmio.

Procedeu-se a centrifugação a 12000 x g por 10 min a 4°C e coletou-se a fase aquosa resultante. Adicionou-se 0,54 volume de isopropanol e o DNA precipitado foi coletado por centrifugação a 12000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70 % por meio de centrifugações a 5000 x g por 5 min a 4°C e, depois de secado a temperatura ambiente, o mesmo foi ressuspendido em 500 µl de tampão TE. Seguindo-se análise da integridade (por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL) e quantificação por espectrofotometria, o DNA genômico foi devidamente estocado a 4°C até o momento do uso.

#### **A.3 Padronização das condições de amplificação do gene de interesse**

As condições de PCR para a amplificação do gene alvo foram ajustadas, utilizando-se como molde da reação o DNA genômico de *A. nidulans*, extraído



conforme descrito anteriormente. A amplificação do gene de interesse foi executada empregando-se os iniciadores descritos na tabela 2 da seção *Materiais*.

O sistema de reação da amplificação para o gene *eglA* continha, em um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , os seguintes reagentes: 40 ng de DNA genômico de *A. nidulans*; 0,2 mM dNTPs; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2  $\mu\text{M}$  de cada um dos iniciadores (EG A<sub>1</sub> 5' para a versão com a seqüência codificadora do peptídeo-sinal nativo ou EG A<sub>2</sub> 5', para a versão sem esta mesma seqüência) e EG A 3'; 2U Taq DNA Polimerase (Cenbiot/RS); Tampão da enzima para concentração final 1X. Os parâmetros de amplificação consistiram das seguintes etapas: 94°C por 2 minutos; 94°C por 1 minuto; 45°C por 1 minuto e 30 segundos; 72°C por 2 minutos; 5 ciclos a partir do passo 2; 94°C por 1 minuto; 55°C por 1 minuto e 30 segundos; 72°C por 2 minutos; 29 ciclos a partir do passo 6 e polimerização final a 72°C por 5 minutos.

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **A.4 Extração de RNA total de *A. nidulans* sob condição de indução do sistema celulolítico**

Todos os reagentes, materiais e aparatos usados nesse procedimento, seguiram as condições padrões livres de RNAses, recomendadas à execução dessa metodologia (Sambrook *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2003).

A partir de um inóculo de  $10^6$  esporos/mL, os micélios foram cultivados em meio completo para *A. nidulans*. Após obtenção de massa de células, os micélios foram coletados e lavados com água autoclavada e em seguida transferidos para o meio de indução constituído de meio mínimo, suplementado com 0,1% bagaço de cana (BCA) e sem glicose. Após indução por 24 horas, a massa micelial foi coletada por filtração em papel de filtro e o fungo foi macerado com nitrogênio líquido. Ao pó obtido procedeu-se a extração do RNA total empregando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Em seguida, o RNA total foi analisado quanto sua integridade, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e quantificado por espectrofotometria. O RNA total foi devidamente estocado a -20°C até o momento do uso.

#### **A.5 Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNAses**

Cerca de 10  $\mu\text{g}$  do RNA total obtido foi submetido a tratamento com DNase I livre de RNase (Promega) a fim de se eliminar qualquer traço residual de

contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 25 µL de reação, foram: Tampão da DNase I 1X; 10 U da enzima DNase I livre de RNase (1U/µL). O tratamento foi realizado por meio de incubação a 37°C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição de EDTA na concentração final de 2,5 mM e aquecendo-se a 65°C por 10 minutos para inativar a enzima.

Em seguida o RNA total tratado foi precipitado empregando acetato de sódio na concentração final de 0,3 M e 3 volumes de etanol 100%, seguido de incubação a -20°C durante a noite juntamente com Foi usado glicogênio na concentração final de 50 µg/mL como carreador da precipitação (uma precaução adicional para minimizar perdas). Após centrifugado (12000 x g por 30 minutos a 4°C), o sedimento de RNA foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v), sendo a seguir deixado secar brevemente. Em seguida o RNA foi ressuspendido em um volume apropriado de água livre de RNases, quantificado por espectrofotometria, analisado por eletroforese em gel e estocado a -20°C.

### **A.6 Obtenção dos cDNAs de interesse por RT-PCR**

A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total livre de DNA. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg de oligodT<sub>(18)</sub> (IDT), sendo a mistura incubada a 70°C por 10 minutos e imediatamente colocada no gelo por cerca de 1 minuto. Em seguida, para um volume final de 25 µL, os seguintes reagentes foram adicionados (para as concentrações finais indicadas): tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 8 mM; dNTPs 0,4 mM cada. Posteriormente, 200 U da enzima transcriptase reversa (*SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase*, Invitrogen) foram adicionadas para cada sistema, seguindo-se a incubação a 37 °C por 1 h. Finalmente, a enzima foi desnaturada aquecendo-se a 94 °C por 2 minutos.

O cDNA obtido foi utilizado como molde para amplificação do gene de interesse empregando as condições previamente padronizadas. Nas amplificações foi utilizado ¼ do volume da reação de síntese da primeira fita de cDNA e DNA polimerase de alta fidelidade (*Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase High Fidelity*, Invitrogen). Uma vez que tal enzima gera produtos de amplificação com extremidades abruptas, adicionalmente foi feita a adição de resíduos de adenina nos produtos de amplificação. Esse procedimento visa à adição de um nucleotídeo de adenina às extremidades, condição necessária para a clonagem no vetor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega). Para a reação foram utilizados 100 ng do *amplicon*, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dATP e 5 U de *Taq* DNA polimerase (CENBIOT/RS), em um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 70°C por 30 min.

### A.7 Clonagens

- **Em vetor para *E. coli*:** pGEM<sup>®</sup>-T (Promega)

O fragmento de cDNA do gene de interesse amplificado foi eluído do gel de agarose a 1,5%, utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) e clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega), seguindo-se as recomendações de ambos fabricantes.

O passo seguinte consistiu na transformação da linhagem de *E.coli* (XL10 Gold<sup>®</sup> *Ultracompetent Cells*, Stratagene), pelo método de choque térmico com CaCl<sub>2</sub>, segundo protocolo otimizado em nosso laboratório (Azevedo *et al.*, 2003), empregando sistema de ligação (cDNA amplificado + pGEM-T).

- **Em vetores para *P. pastoris*:** pPIC9 e pHIL-D2 (Invitrogen)

Levando em conta a presença ou ausência de seqüências relativas a peptídeos-sinais nos vetores, as estratégias de clonagem foram elaboradas de modo a permitir duas construções plasmidiais portando ou não o peptídeo-sinal nativo do gene clonado.

Ambos insertos liberados por digestão enzimática e os respectivos vetores de expressão (previamente linearizados com as mesmas endonucleases) foram posteriormente ligados empregando-se T4 DNA ligase (Promega), segundo protocolo do fabricante e realizando a incubação a 16°C durante a noite. Anteriormente à ligação, para construção da versão de *eglA* com a seqüência do peptídeo-sinal nativo foi necessário tratamento com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I (*New England Biolabs*) para tornar abruptas as extremidades 3' e 5' do vetor digeridos com *Eco* RI. Em seguida foi realizada a defosforilação do vetor para impedir a sua religação após a digestão quando na presença da T4 DNA ligase. Este passo foi realizado empregando-se fosfatase alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Promega). Ambos procedimentos foram realizados seguindo os protocolos dos fabricantes.

As quantidades de inserto e vetor usadas foram, para a versão portando a seqüência codificadora do peptídeo-sinal nativo de *A. nidulans*, respectivamente, 350 e 400 ng e para a versão sem esta seqüência, 140 e 250 ng.

### A.8 Extração de DNA plasmidial

Após crescimento das colônias em meio LB ágar suplementado com ampicilina (na concentração final de 100 µg/mL), estas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo o mesmo antibiótico na mesma concentração final. As células foram incubadas a 37°C sob constante agitação (250 rpm) para crescimento durante a noite. No dia seguinte procedeu-se a extração de DNA plasmidial em pequena escala

empregando kit comercial *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

### A.9 Digestão com enzimas de restrição

Após quantificação do DNA plasmidial por métodos espectrofotométricos, procedeu-se a digestão enzimática empregando endonucleases de restrição, de modo a liberar o inserto tanto para confirmar a correta clonagem quanto para posterior transferência do inserto para os vetores de expressão. As enzimas utilizadas foram aquelas responsáveis pelo reconhecimento de seu sítio específico inserido nas extremidades do cDNA clonado pelos oligonucleotídeos usados para amplificação (ver tabela 3.1 na seção *Materiais e/ou estratégia experimental*).

As digestões foram realizadas por meio da utilização de enzimas comercializadas pela empresa *New England Biolabs*, seguindo recomendações do fabricante. Foi respeitada a razão de uma unidade de enzima para cada 1 µg de DNA a ser digerido e os sistemas foram montados de forma a não permitirem uma concentração de glicerol superior a 10%. A depender da massa de DNA a ser digerida este foi incubado de 4 a 18h na temperatura adequada da enzima.

### A.10 Estratégia de integração no genoma da levedura

As estratégias empregadas para integração dos vetores de expressão construídos ao genoma de *P. pastoris* envolveram a utilização de 10 µg de DNA plasmidial digerido com *Sac I* (New England Biolabs), para direcionar a integração ao *locus AOX1*.

### A.11 Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics). Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles dos oligonucleotídeos apropriados a cada cDNA e o kit comercial *DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing* (MJ Research, INC).

O *pipeline* de análise das seqüências obtidas envolveu análise de qualidade superior a 20 e montagem de *contigs* pelo CAP3 (Huang & Madan, 1999). Posteriormente deu-se a análise de alinhamentos locais pelo emprego da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), contra a base de dados do GeneBank. Para análise da proteína predita a partir da seqüência de DNA obtida pelo seqüenciador foi empregada a ferramenta de tradução *in silico* disponível em <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>.

As seqüências foram analisadas e manipuladas pelo *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999).

### **Parte B: Obtenção e seleção de clones produtores da endoglicanase A recombinante (EG Ar)**

#### **B.1 Eletroporação de *Pichia pastoris***

Um clone isolado da linhagem GS115 *P. pastoris* (Invitrogen) crescido em placa contendo meio YPD de 2 a 3 dias a 30°C foi pré-inoculado em 10 mL do mesmo meio e este foi incubado a 30°C a 200 rpm por cerca de 24h. A partir de uma alíquota deste pré-inóculo foi crescido um inóculo em 250 mL de YPD e incubado nas mesmas condições até que fosse atingida a faixa de densidade óptica a 600 nm de 1,3 a 1,5.

Após atingida a faixa de densidade óptica desejada, as células foram sedimentadas a 1500 x g por 5 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com água destilada estéril gelada, com volumes de 250 e 125 mL. As mesmas condições de centrifugação foram repetidas para lavagem com sorbitol 1 M gelado, com volumes de 20 e 0,5 mL. O DNA plasmidial, previamente digerido com as enzimas para integração e purificado por precipitação tradicional com etanol foi adicionado a 80 µL de células. O material foi incubado no gelo por 5 minutos juntamente com 320 µL de sorbitol 1 M gelado em cubeta de eletroporação (0,2 cm, BioAgency). Em seguida deu-se a eletroporação (Biorad) nos seguintes parâmetros: 1500 V, 400 Ω e 25 µF, por cerca de 8 ms.

Imediatamente após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado na cubeta e o volume final nela contido foi transferido para tubo estéril de 1,5 mL e as células transformadas foram semeadas em placas contendo meio MD em alíquotas de 400 a 500 µL. As placas foram mantidas a 30°C até o surgimento das colônias, o que ocorreu ao fim de dois dias.

#### **B.2 Seleção de clones produtores de EG Ar em placa do tipo *deep well***

A seleção inicial envolveu a análise de cerca de 100 clones produtores da endoglicanase A de ambas construções em placas do tipo *deep well*. Os clones foram inoculados em 800 µL de meio BMGY e crescidos de 48 a 72 h a 30°C a 200 rpm até formarem sedimentos de tamanhos visivelmente homogêneos no fundo da placa após centrifugação a 2000 x g por 5 minutos. Após este período os sedimentos de células foram lavados duas vezes com 800 µL de água destilada estéril gelada e centrifugados como descrito acima, de modo a remover a maior parte do glicerol presente. Ao final, as células foram ressuspensas em 800 µL de BMMY para indução

da produção das enzimas recombinantes. A indução com metanol ocorreu por 48 h, nas mesmas condições do cultivo, e diariamente uma nova alíquota de metanol era adicionada para concentração final de 0,5 % (v/v). Freqüentemente as placas eram vigorosamente agitadas repetidas vezes para minimizar a sedimentação das células da levedura.

O critério de seleção adotado neste experimento foi a análise comparativa dos valores da razão 540nm/OD600nm para todos os clones avaliados. Os 10 clones selecionados seguiram para a etapa seguinte.

### **B.3 Ensaio de estabilidade mitótica**

Foram realizadas dez passagens em meios MD e MDH alternadamente para verificar a estabilidade mitótica dos 10 clones selecionados no experimento anterior, na ausência e na presença da pressão seletiva exercida pela histidina.

### **B.4 Seleção de clones produtores de EG Ar em frascos de 250 mL**

A partir de uma colônia isolada dos clones produtores da endoglicanase recombinante de ambas construções, foram crescidos inóculos em 25 mL de BMGY a 30°C por 24 h sob agitação a 200 rpm. Após determinação da densidade óptica a 600 nm, uma alíquota foi recolhida e submetida à centrifugação (2000 x g/ 5 minutos/ 4°C) lavagem do sedimento celular por duas vezes com 50 mL de água destilada estéril gelada.

A densidade óptica do inóculo em meio de indução (BMMY) foi normatizada para apresentar o valor de OD<sub>600</sub> equivalente a 1.

Como critério de seleção neste experimento foram avaliados os valores de atividade enzimática (UI/mL) obtidos a partir do sobrenadante dos clones analisados.

### **B.5 Confirmação da integração do cDNA *eglA* e quantificação do número de cópias**

Com o intuito de determinar o número de cópias do cDNA *eglA* de *A. nidulans* integrado no genoma de *P. pastoris*, bem como para confirmar a integração, foi realizado um experimento de PCR em tempo real (qPCR). Para tanto, foram empregados, além de amostras do DNA genômico da levedura, oligonucleotídeos específicos para uma região interna do cDNA em questão, gerando um *amplicon* de aproximadamente 100 pb.

Três amostras de DNA genômico foram empregadas neste experimento: o DNA genômico do clone produtor e do clone controle, bem como o DNA genômico da linhagem GS115 não transformada da hospedeira. A extração de seu pelo protocolo

sugerido pela empresa comercializadora da levedura (*Pichia Expression kit*, Invitrogen).

Para quantificação absoluta dos *amplicons* gerados a partir das três amostras de DNA genômico supracitadas foi construída uma curva padrão empregando concentrações de 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl e 1 fg/μl do DNA plasmidial contendo o cDNA *eglA* clonado do vetor pPIC9.

Simultaneamente foram analisados os perfis de amplificação das três amostras de DNA genômico extraídas, em triplicata, juntamente com um controle negativo, também em triplicata, com água ao invés de DNA. A amplificação em tempo real foi padronizada conforme a seguir: 2 μL de DNA (totalizando cerca de 100 pg na reação), 0,2 μM dos iniciadores EG A AnFW e AnREV (tabela 2), adicionados a 5 μL do reagente Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). Os parâmetros de amplificação, para um volume final de 10 μL, foram: 50°C por dois minutos, 95°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de incubação a 95°C por 30 segundos e a 60°C por 30 segundos.

Este experimento foi realizado no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

### **B.6 Avaliação da atividade enzimática em carboximetilcelulose e crescimento celular em 144h**

Para procedimentos de indução em frascos de 1 L com 100 mL de meio, inicialmente foram inoculadas no meio de crescimento colônias isoladas dos clones a serem avaliados. O crescimento celular se deu a 30°C por 24 h sob agitação constante de 200 rpm. Após medida da densidade celular ( $OD_{600}$ ) as culturas foram centrifugadas (2000 x *g* por 10 minutos a 4°C) e o sedimento de células foi lavado duas vezes com 50 mL de água destilada autoclavada gelada. Ao final, as células foram ressuspensas para  $OD_{600}$  final igual a 1.

Após selecionado o melhor clone produtor da endoglicanase A secretada por meio do peptídeo-sinal heterólogo, deu-se a otimização dos meios de cultivo e indução em relação ao proposto pelo protocolo da levedura utilizada (*Pichia Expression Kit*).

Para otimização da composição do meio de indução foram avaliados como variável resposta os parâmetros crescimento ( $OD_{600nm}$ ) e atividade enzimática (UI/mL) em 120h. Foram testados os meios de indução BMMY e BMMU, sempre com concentração final de metanol igual a 0,5% (v/v).

Após otimizado o meio de crescimento e de indução para a produção da endoglicanase A recombinante foi construída novamente uma curva de crescimento e atividade em triplicata.

### **B.7 Ensaio enzimáticos**

Os ensaios enzimáticos iniciais para avaliar a atividade da endoglicanase recombinante produzida por *P. pastoris* empregaram carboximetilcelulose (CMC *low viscosity*, Sigma Aldrich) como substrato. A detecção de açúcares redutores liberados se deu pelo método DNS (Miller, 1959).

Para montagem dos sistemas de reação foram empregados 50 µL do sobrenadante de cultura ou das frações da purificação (no caso de manipulação de sobrenadantes de cultura este foi previamente centrifugado a 12000 x g por 10 minutos) adicionados a 100 µL de volume de CMC 1% diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5. A mistura foi mantida em banho a 50°C por 30 minutos e em seguida foram adicionados 300 µL do reagente DNS. O material foi fervido por 10 minutos, diluído com 1,5 mL de água destilada e ao final analisado por métodos espectrofotométricos a 540nm.

As condições tamponantes e de temperatura de reação empregadas foram as mesmas obtidas por Chikamatsu e colaboradores (1999), no trabalho com a enzima nativa.

Para conversão dos valores de absorbância para valores de atividade enzimática foi construída uma curva padrão obtida pela reação do reagente DNS empregando concentrações de glicose de 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 e 2 mg/mL, nas mesmas condições dos ensaios.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com dois tipos de controles montados nas mesmas condições, também em triplicata. Os controles da degradação do substrato, que consistiam em adição de água ao substrato para reação, e controles da amostra enzimática para avaliar a concentração de açúcares redutores na solução contendo enzima. Este último controle foi obtido com a adição de água ao sobrenadante de cultura ou às frações da purificação, na ausência do substrato. Os valores de absorbância dos brancos da enzima e do substrato foram subtraídos dos valores de absorbância das triplicatas experimentais.

Unidade internacional (UI) é definida como a quantidade de enzima responsável pela liberação de 1 µmol de açúcares redutores por minuto de reação.



### **B.8 Quantificação de proteínas pelo método Bradford**

As quantificações de proteínas foram realizadas utilizando-se 100 µL da solução de proteínas adicionada a 1 mL de reagente de Bradford (Bradford, 1976). A mistura foi mantida protegida da luz por cinco minutos e lida em espectrofotômetro a 595 nm.

Para conversão dos valores de absorbância para valores de massa foi construída uma curva padrão do reagente Bradford empregando albumina sérica bovina como padrão nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µg em 100 µL.

Vale ressaltar que, devido à possibilidade de interferência na leitura por Bradford que algumas moléculas apresentam (Banik *et al.*, 2009), o material foi previamente precipitado conforme descrito na parte E desta seção.

### **Parte C: Purificação da enzima recombinante**

De modo a ser realizada a seleção do ponto de coleta com maior atividade da enzima heteróloga, as curvas de crescimento e atividade foram analisadas, empregando-se as condições de indução otimizadas.

#### **C.1 Ultrafiltração em membrana com limite de retenção em 50 kDa**

Uma colônia isolada de *P. pastoris* transformada com a construção pPIC9/*egIA*<sub>2</sub> foi inoculada em meio de crescimento. Após protocolo padrão de crescimento e lavagem (item B6 desta seção), foram obtidos 400 mL de meio BMMY após indução por 48 h com 0,5 % (v/v) de metanol. Após centrifugação por 12000 x *g* por 15 minutos a 4°C para sedimentação e remoção das células, o sobrenadante foi tratado com azida sódica 0,02 % (p/v) para evitar contaminação.

O sobrenadante foi fracionado em sistema de ultrafiltração em membrana com limite de retenção de 50 kDa (PM50 Millipore Co., MA, EUA), sob pressão de 2,5 kgf/cm<sup>2</sup> a 10°C, de modo que proteínas maiores que 50 kDa ficassem retidas na membrana do ultrafiltrador. Foram obtidas duas frações: uma fração concentrada pelo ultrafiltrador e uma fração ultrafiltrada. Após determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas de ambas frações, a porção ultrafiltrada, cerca de 315 mL, foi então aplicada em coluna de exclusão molecular (Sephadex G50).

#### **C.2 Cromatografia por exclusão molecular**

À coluna de gel filtração Sephadex G50 (60,0 X 2,7 cm), a 28°C, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7, NaCl 0,15 M e azida sódica 0,02 % (p/v) foram aplicados cerca de 18 mL da fração ultrafiltrada pela membrana PM 50 com fluxo aproximado de 20 mL/h. O perfil cromatográfico dos 5 mL obtidos em

cada fração eluída em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 foi analisado quanto à atividade sobre CMC e também quanto à concentração de proteínas totais (A280 nm).

O critério para seleção das frações contendo misturas homogêneas da proteína recombinante foi o valor de atividade de CMCase igual ou superior a 0,25 UI/mL. As frações cromatográficas com esta atividade foram reunidas e a amostra única resultante foi avaliada quanto à atividade enzimática (método DNS) e concentração de proteínas (método Bradford).

### **Parte D: Análise do grau de pureza - Precipitação de proteínas e verificação do perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante e zimograma**

#### **D.1 Precipitação de proteínas**

Neste trabalho foram executadas três metodologias diferentes de precipitação de proteínas, a depender de sua aplicação posterior.

Foram avaliados por Banik e colaboradores (2009) alguns interferentes na quantificação pelo método Bradford. De modo a remover estes possíveis contaminantes, as amostras foram precipitadas com dois volumes de acetona gelada adicionados a um volume da solução de proteínas. Este material foi incubado a -20°C por uma hora e em seguida centrifugado a 12000 x g por 40 minutos. Após secagem do precipitado, este foi ressuscitado em volume adequado de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.

Para realização do procedimento de SDS-PAGE com coloração com nitrato de prata, foram adicionados 8 µL de deoxicolato de sódio 2% (p/v) a 1 mL de solução contendo proteínas. O material foi incubado no gelo por 15 minutos e em seguida foram adicionados 60 µL de TCA 100% (p/v) e o material foi mantido no gelo por mais 10 minutos. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e as proteínas precipitadas foram lavadas três vezes com 90 µL de acetona, sendo centrifugadas nas mesmas condições.

Já para a realização do zimograma e do gel corado com azul de *Comassie* a precipitação foi executada com TCA na concentração final de 20% e incubação do material a -20°C por uma hora. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 30 minutos e lavados duas vezes com 1 mL de acetona gelada, sendo centrifugados nas mesmas condições.

#### **D.2 SDS-PAGE**

Para análise do perfil grau de pureza das frações da purificação da endoglicanase A, foi executada a metodologia de SDS-PAGE 12% com migração

constante a 25 mA, conforme metodologia estabelecida em nosso laboratório (Sambrook *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2003).

### D.3 Coloração de proteínas com azul de *Coomassie* e prata

Para coloração com azul de *Coomassie* o gel foi incubado em solução corante por no mínimo duas horas sob vagarosa agitação, sendo em seguida transferido para solução descorante até a observação das bandas na intensidade desejada (Azevedo *et al.*, 2003).

Visando analisar a homogeneidade das frações obtidas nas etapas da purificação optou-se pela metodologia de coloração com nitrato de prata por sua maior sensibilidade. Este protocolo, modificado de Blum e colaboradores (1987), consiste na incubação do gel durante a noite, sob vagarosa agitação, à temperatura ambiente em solução fixadora (fixação I), sendo no dia seguinte transferido para solução fixadora II, permanecendo por 20 minutos.

Após duas lavagens com água MilliQ por cinco minutos cada, o gel foi incubado em solução de sensibilização por 20 minutos, e novamente lavado nas mesmas condições citadas acima.

Para tratamento com nitrato de prata o gel foi incubado na solução de impregnação por 20 minutos, sendo ao final novamente lavado nas mesmas condições já descritas. Para visualização da coloração, o gel foi tratado com a solução reveladora até que as bandas atingissem a intensidade desejada (5 a 10 minutos). Ao final, o gel foi incubado na solução de fixação I para parada da revelação.

Após duas lavagens com água MilliQ por 20 minutos cada, o gel foi escaneado e armazenado em solução de ácido acético 1% (v/v).

### D.4 Zimograma

Visando a observação da atividade enzimática em gel, as frações da purificação da endoglicanase A produzida em sistema heterólogo foram submetidas ao protocolo de SDS-PAGE contendo no gel 0,15% (p/v) de CMC.

Após precipitadas conforme descrito anteriormente, as proteínas foram aplicadas no gel sem fervura prévia e a migração se deu a 4°C, por cerca de 5 horas. Findado este tempo, iniciou-se o protocolo modificado de Sun e colaboradores (2008). Para remoção do SDS, o gel foi duas vezes lavado em solução de isopropanol 25% (v/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 por 20 minutos cada. Em seguida o gel foi lavado duas vezes por um minuto em água MilliQ e incubado a 4°C durante a noite em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 ao qual foi adicionado  $\beta$ -mercaptoetanol na concentração final de 5 mM.

No dia seguinte o gel foi lavado com água MilliQ duas vezes por dois minutos cada e novamente imergido em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 e mantido sem agitação, à temperatura ambiente, por cerca de duas horas. Ao final deste prazo, o gel foi incubado em banho pré-aquecido a 50°C por três horas, para hidrólise do CMC presente.

Para verificação da hidrólise, o tampão foi descartado e o gel agitado em solução de vermelho do Congo 0,5% (p/v) por 30 minutos. Em seguida o gel foi incubado duas vezes sob agitação por 15 minutos com NaCl 1 M para remoção do corante e visualização dos halos de hidrólise. Para melhor contraste dos halos amarelados em relação à região não hidrolisada corada com vermelho do Congo, o gel foi tratado com NaCl 1 M ao qual foi adicionado pequenos volumes de HCl fumegante.

Visando a sobreposição de bandas de proteína e halos de hidrólise, simultaneamente foi realizado um outro gel idêntico e seguindo os mesmos parâmetros. Este foi corado com azul de *Coomassie* nas condições descritas no item anterior.

### **Parte E: Caracterização bioquímica da EG A recombinante**

Para caracterização bioquímica da enzima heteróloga, três frações da purificação foram analisadas: o extrato bruto (EB), antes da aplicação no ultrafiltrador, a fração ultrafiltrada da membrana de 50 kDa (UF50) e as frações com atividade detectada após gel filtração (G50).

#### **E.1 Análise da atividade enzimática em função da temperatura de reação**

Para este experimento foi analisada a atividade enzimática em função da temperatura de reação, de 30 a 80°C. Para montagem do ensaio enzimático foram empregados 50 µL de solução de enzima e 100 µL de CMC 1%.

#### **E.2 Efeito do pH na atividade enzimática**

A tabela 3 mostra a composição da reação a qual era constituída de: 25 µL da solução de enzima das três etapas de purificação, 50 µL de CMC 1,2% diluído em água e 75 µL dos tampões listados no item 5.4 da seção *Material*. Vale ressaltar que a enzima recombinante das frações EB e UF50 encontravam-se no tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0 (ver meio BMMY, seção *Material*, item 4.3.5) e a enzima recombinante na fração G50 estava em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 (ver item C.2 desta seção). A tabela 3 mostra os valores de pH de cada reação.

Todos os tampões tinham força iônica ajustada com NaCl para equivalência, em termos de força iônica, ao tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5.

**Tabela 3.** Condições de reação para análise da atividade enzimática em função do tampão do substrato

Tampão	pH do tampão	pH da reação	
		frações EB e UF50	fração G50
Acetato de sódio 50 mM	3,0	4,01	4,45
	4,0	4,34	4,77
	5,0	5,32	6,13
	6,0	6,44	6,82
Fosfato de sódio 50 mM	6,0	6,21	6,48
	6,5	6,48	6,66
	7,0	6,77	6,92
Tris-Cl 50 mM	7,0	6,57	6,82
	8,0	7,23	7,40
	9,0	7,88	8,10

### E.3 Efeito de íons metálicos, quelantes, detergentes e agentes redutores na atividade da endoglicanase A recombinante

Diante da pouca uniformidade encontrada na literatura quanto ao valor de concentração final empregada neste ensaio, este estudo usou critério próprio. Foram normalizados os valores de molaridade dos reagentes tendo como base a concentração de  $\text{HgCl}_2$ , freqüentemente relacionado como inibidor da atividade de celulasas (Gao *et al.*, 2008; Elshafei *et al.*, 2009; Karnchanatat *et al.*, 2009), responsável pela perda de 50% de atividade da enzima presente na fração ultrafiltrada pela membrana de 50 kDa. A molaridade resultante foi de cerca de 18 mM, segundo equação obtida por regressão linear  $y = - 2,9005 + 100,86x$ , com  $R^2 = 0,9885$ .

**Tabela 4.** Reagentes empregados no ensaio de análise da interferência de quelantes, agentes redutores, detergentes e sais de íons metálicos sobre a atividade enzimática.

Categorias	Reagentes interferentes testados
Quelantes	Etilenodiamino tetracético (EDTA)
Agentes redutores	$\beta$ -mercaptoetanol, ditioneitol (DTT)
Detergentes	Dodecil sulfato de sódio (SDS)
Sais de íons metálicos	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{AlCl}_3$ , $\text{CaCl}_2$ , $\text{ZnSO}_4$ , $\text{NaCl}$ , $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $\text{KCl}$ , $\text{CuCl}_2$

Neste ensaio foram empregados 25  $\mu\text{L}$  de solução contendo enzima, 75  $\mu\text{L}$  de CMC 1,2% previamente diluído em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4. Para completar o volume de 150  $\mu\text{L}$ , os reagentes testados foram diluídos em 75  $\mu\text{L}$  de água destilada. Os agentes cuja interferência foi avaliada estão descritos na tabela 4.

### **E.4 Avaliação da termoestabilidade da endoglicanase A recombinante**

Os ensaios realizados para verificação da termoestabilidade da enzima heteróloga envolveram incubação nas temperaturas 45 e 55°C e também em temperaturas mais elevadas (70 e 80°C). Foi definido como padrão para as quatro temperaturas o valor de atividade enzimática obtido após incubação da enzima por 1 minuto na respectiva temperatura.

A solução de enzima das três etapas da purificação testadas foram incubadas por variados tempos nas temperaturas descritas acima. Em seguida, foi analisada a atividade enzimática retornando a enzima à sua faixa de atividade ótima (50°C). Os resultados foram expressos em termos de atividade enzimática relativa à atividade da amostra incubada por 1 minuto na temperatura correspondente.

Neste ensaio foram empregados 50  $\mu\text{L}$  da solução contendo a enzima e 100  $\mu\text{L}$  de CMC 1% previamente diluído em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4.

### **E.5 Análise da atividade enzimática sobre outros substratos**

Visando avaliar a atividade da enzima expressa em sistema heterólogo em substratos mais complexos e/ou específicos de outros tipos enzimáticos, foram testados: papel de filtro (Whatman n° 1), cortado em tiras de 6 cm x 1 cm (50 mg); celulose microcristalina 1% (Avicel, Sigma); xilana 1% e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG). Também foi avaliada a degradação do substrato 4-metilumbiferil- $\beta$ -D-celobiosídeo (MUC) e a liberação do monômero fluorescente.

O ensaio com os substratos xilana e celulose microcristalina foram realizados mantendo-se a concentração final de substrato equivalente a 0,67%, sendo o substrato já diluído em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4 e 50  $\mu\text{L}$  da solução contendo enzima. O ensaio com o papel de filtro envolveu a utilização de 50  $\mu\text{L}$  de enzima adicionada a 100  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4. Já para o ensaio com pNPG foi construída uma curva padrão com o monômero pNP a 0, 0,12, 0,24, 0,48, 0,60 e 0,72  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . O ensaio foi realizado conforme Saloheimo e colaboradores (2002).

Para o ensaio com MUC foi empregado o protocolo modificado a partir de Chernoglazov e colaboradores (1989): 250  $\mu\text{L}$  da solução de MUC 2 mM foram adicionados a 250  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4 e a 50  $\mu\text{L}$  de solução

contendo enzima. A avaliação da degradação do substrato foi qualitativa e analisada sob emissão de luz ultravioleta.

### **E.6 Cálculo de $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$**

Para determinação dos parâmetros cinéticos de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da enzima recombinante, foram empregados na reação enzimática soluções de CMC nas seguintes concentrações iniciais: 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6, 4,0, 4,4, 4,6 e 5,0 mg/mL. As condições de reação foram: 50°C, por 30 minutos em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4, procedendo em seguida conforme descrito no item B.7. Posteriormente os dados foram analisados empregando o programa *EnzFitter for Windows* (Biosoft, Cambridge, UK).

### **E.7 Análise estatística**

Com o intuito de avaliar as diferenças das médias da atividade enzimática, para cada fração (EB, UF50 ou G50) foi necessário, nos experimentos dos itens E.3, E.4 e E.5, o cálculo da atividade relativa (%) dos valores das atividades enzimáticas normalizados em relação ao tratamento controle, presente em todos ensaios. Já para os experimentos dos itens E.1 e E.2, o valor avaliado foi a média dos valores de atividades enzimáticas alcançados pelas triplicatas e o erro padrão gerado. Foi executado o teste ANOVA, no qual o nível de significância adotado foi de 5% e o programa estatístico utilizado foi o *SPSS for Windows* versão 17.0

---

# *Resultados & Discussão*

---



### **Parte A: Clonagem do cDNA *eglA* em vetores de expressão para *Pichia pastoris***

#### **A.1 Clonagens**

Para que fossem realizadas as clonagens de ambos cDNAs *eglA* de *A. nidulans* conforme descrito abaixo, as reações de amplificação de DNA foram padronizadas empregando oligonucleotídeos específicos e o DNA genômico de *A. nidulans* como molde.

Após a padronização das condições de amplificação, procedeu-se a extração do RNA total de *A. nidulans* cultivado em condições de indução do sistema lignocelulolítico. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria e posteriormente analisado por meios eletroforéticos quanto à sua integridade.

A partir do RNA total extraído foram sintetizados os dois cDNAs utilizados em seguida: cDNA *eglA* portando a seqüência codificadora do peptídeo-sinal nativo, a ser clonado no vetor pHIL-D2 (Invitrogen) e o cDNA *eglA* sem esta mesma região, a ser clonado no vetor pPIC9 (Invitrogen), que já apresenta clonado a seqüência do peptídeo-sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. A nomenclatura a ser seguida para distinguir ambas as construções encontra-se na tabela 5.

**Tabela 5.** Construções plasmidiais realizadas neste trabalho

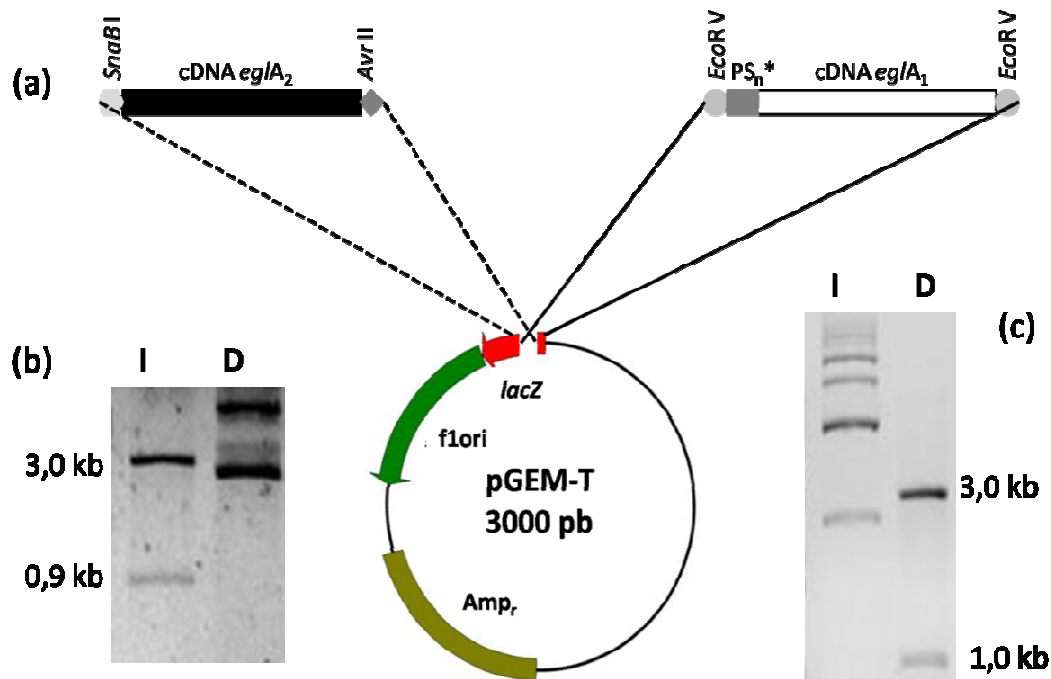
Hospedeira	Construção plasmidial	Nomenclatura	Plasmídeo e inserto (kb)
<i>E. coli</i> XL10 Gold <sup>®</sup> (Stratagene)	<i>eglA</i> PS <sup>*</sup> nativo - clonada em pGEM-T	pGEM-T/ <i>eglA</i> <sub>1</sub>	4,0 e 1,0
	<i>eglA</i> PS <sup>*</sup> heterólogo - clonada em pGEM-T	pGEM-T/ <i>eglA</i> <sub>2</sub>	3,9 e 0,9
<i>P. pastoris</i> GS115 (Invitrogen)	<i>eglA</i> PS <sup>*</sup> nativo - clonada em pHIL-D2	pHIL-D2/ <i>eglA</i> <sub>1</sub>	9,2 e 1,0
	<i>eglA</i> PS <sup>*</sup> heterólogo - clonada em pPIC9	pPIC9/ <i>eglA</i> <sub>2</sub>	8,9 e 0,9

\* PS: seqüência codificadora do peptídeo-sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*

Finalizadas as construções plasmídias em vetor de clonagem para bactérias, estes foram empregados na transformação de células competentes de *E. coli*. Em seguida o DNA plasmidial, replicado no interior da hospedeira, foi extraído com emprego de *kit* comercial e analisado por meio de digestão com enzimas de restrição (fig. 9). A digestão com as enzimas, cujos sítios foram introduzidos pelos oligonucleotídeos empregados na obtenção dos cDNAs (tabela 2), resultou na liberação dos insertos de 1,0 e 0,9 kb, correspondentes aos cDNAs clonados (versão com e sem a seqüência codificadora do peptídeo-sinal nativo, respectivamente). O tamanho dos fragmentos de cDNA e dos vetores resultantes estão descritos na tabela 5.

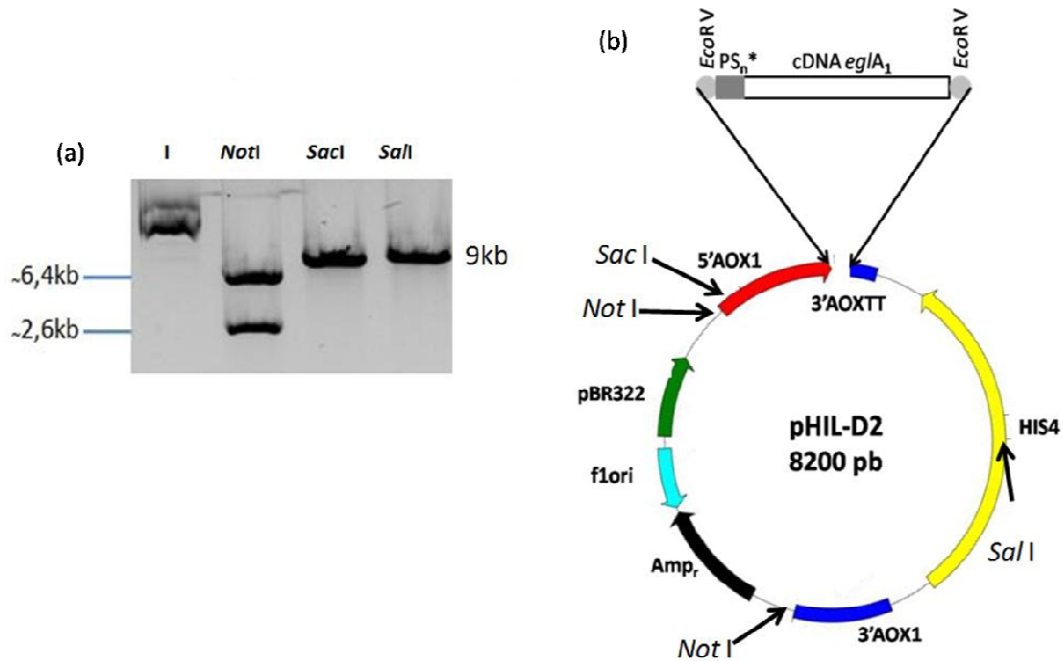
Os insertos liberados foram excisados do gel, purificados e ligados aos respectivos vetores de expressão. Com estas construções novamente foi realizada a

transformação de linhagem termocompetente de *E. coli*, seguida de nova extração de DNA plasmidial e verificação do perfil de restrição com diversas enzimas (fig.9).

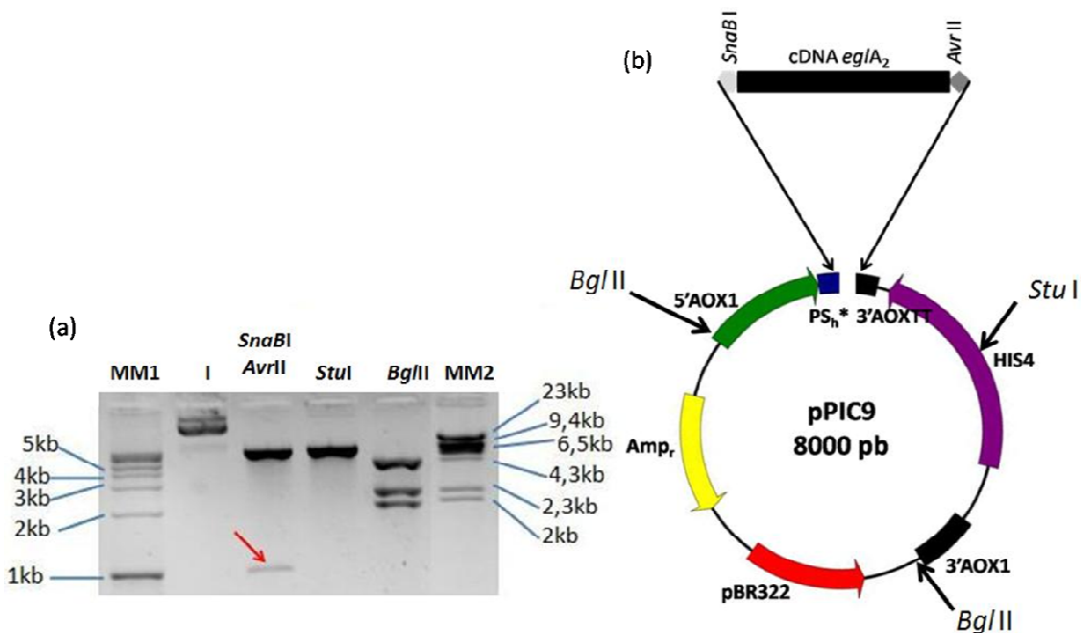


**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5  $\mu$ g/mL ilustrando o perfil de digestão dos DNAs plasmidiais construídos em pGEM-T. (a) Esquema da estratégia de clonagem dos cDNAs *egIA<sub>1</sub>* e *egIA<sub>2</sub>* em pGEM-T para transformação de células competentes de *E. coli*. (b, c) Perfil de restrição dos plasmídeos construídos com os cDNA *egIA<sub>2</sub>* (b) e *egIA<sub>1</sub>* (c) empregando enzimas cujos sítios foram inseridos pelo par de oligonucleotídeos utilizados. I - DNA plasmidial intacto; D - DNA plasmidial digerido. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos estão indicados ao lado.

Para confirmação da correta clonagem, o plasmídeo pPIC9/*egIA<sub>2</sub>* foi digerido com as enzimas de restrição conforme indicado, resultando na liberação de um fragmento de DNA de tamanho próximo ao esperado (fig. 10). A digestão de pHIL-D2/*egIA<sub>1</sub>* com as enzimas listadas na tabela 2 não foi possível em razão da modificação do sítio de *EcoRV* inserido nas extremidades deste cDNA. Após o tratamento com o fragmento Klenow da DNA polimerase 1 este sítio não mais foi reconhecido pela nuclease de restrição supracitada.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL ilustrando o perfil de digestão do DNA plasmidial construídos em pHIL-D2. (a) Perfil de restrição do DNA plasmidial pHIL-D2/*eglA<sub>1</sub>* empregando enzimas a serem utilizadas para digestão do plasmídeo visando integração no genoma de *P. pastoris*. (b) Esquema da estratégia de construção do vetor pHIL-D2/*eglA<sub>1</sub>*. I - DNA plasmidial intacto. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos estão indicados ao lado.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL ilustrando o perfil de digestão do DNA plasmidial construídos em pPIC9. (a) Perfil de restrição do DNA plasmidial pHIL-D2/*eglA<sub>1</sub>* empregando enzimas para correta liberação do fragmento correspondente ao cDNA (*SnaBI* e *AvrII*) e também aquelas a serem utilizadas para digestão do plasmídeo visando integração no genoma de *P. pastoris* (demais enzimas). (b) Esquema da estratégia de construção do vetor pPIC9/*eglA<sub>2</sub>*. I - DNA plasmidial intacto. MM1 – marcador de tamanho molecular 1 kb *Ladder* (Jenna Bioscience).

A escolha das enzimas de restrição empregadas para digestão da construção plasmidial a ser introduzida em *P. pastoris* foi de acordo com as possíveis estratégias de integração do DNA exógeno no genoma da levedura (*Pichia Expression Kit Manual*, Invitrogen). Dentre os dois *loci* disponíveis para integração na linhagem GS115 de *P. pastoris* (*HIS4* e *AOX1*), foi escolhida a inserção em *AOX1*, podendo resultar em qualquer um dos dois fenótipos referentes à utilização de metanol. Em razão disso, o DNA plasmidial pPIC9/*eglA*<sub>2</sub> foi incubado com a enzima de restrição *Bgl* II para liberação de dois fragmentos de DNA, de acordo com seu mapa de restrição. Entretanto, a digestão com esta endonuclease resultou na liberação de três fragmentos de DNA (fig. 11F), em razão da presença de um sítio de restrição para esta enzima dentro do cDNA *eglA*, o que foi identificado *a posteriori*.

Desse modo, optou-se, para ambas as construções, a digestão com *Sac* I, enzima de corte único responsável pela digestão do plasmídeo no gene 5'*AOX1*, resultando no fenótipo His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> após integração.

### **Parte B: Obtenção e seleção de clones produtores da endoglicanase A recombinante (EG A<sub>r</sub>)**

Após a confirmação das construções, os vetores de expressão contendo o cDNA *eglA* ou sem este inserto (controle negativo) foram empregados na transformação de *P. pastoris*, linhagem GS115, conforme protocolo descrito no item B.1 da seção *Métodos*. Em seguida foi realizada a varredura em placas do tipo *deep well* e também por meio do crescimento em frascos agitados de 250 mL, que culminaram na escolha de um clone produtor e um clone controle das leveduras transformadas com as construções pPIC9/*eglA*<sub>2</sub> e pHIL-D2/*eglA*<sub>1</sub>, cada construção com uma seqüência de peptídeo-sinal conforme a tabela 5. Dentre as leveduras mitoticamente estáveis transformadas com o vetor pHIL-D2 vazio ou com o cDNA *eglA*<sub>1</sub> clonado, foram selecionados os clones 8 (C8ctrC13<sup>1</sup>) e 13 (C13), respectivamente. Já quanto às leveduras transformadas com as construções a partir do vetor pPIC9 vazio ou com o cDNA *eglA*<sub>2</sub> clonado, foram selecionados os clones 2 (C2ctrC18<sup>2</sup>) e 18 (C18), respectivamente.

---

<sup>1</sup> C8ctrC13: Clone 8, linhagem controle da atividade enzimática do clone C13, transformada com o vetor pHIL-D2 vazio.

<sup>2</sup> C2ctrC18: Clone 2, linhagem controle da atividade enzimática do clone C18, transformada com o vetor pPIC9 vazio.

### **B.1 Confirmação da integração do fragmento contendo o cDNA *eglA* no genoma de *Pichia pastoris* por qPCR**

Após extração do DNA genômico dos clones C2ctrC18 e C18, bem como da levedura não transformada, procedeu-se a quantificação absoluta por PCR em tempo real (qPCR) visando estimar o número de cópias do cDNA *eglA* integradas no clone produtor. No entanto, alguns problemas técnicos impossibilitaram a finalização deste experimento com sucesso.

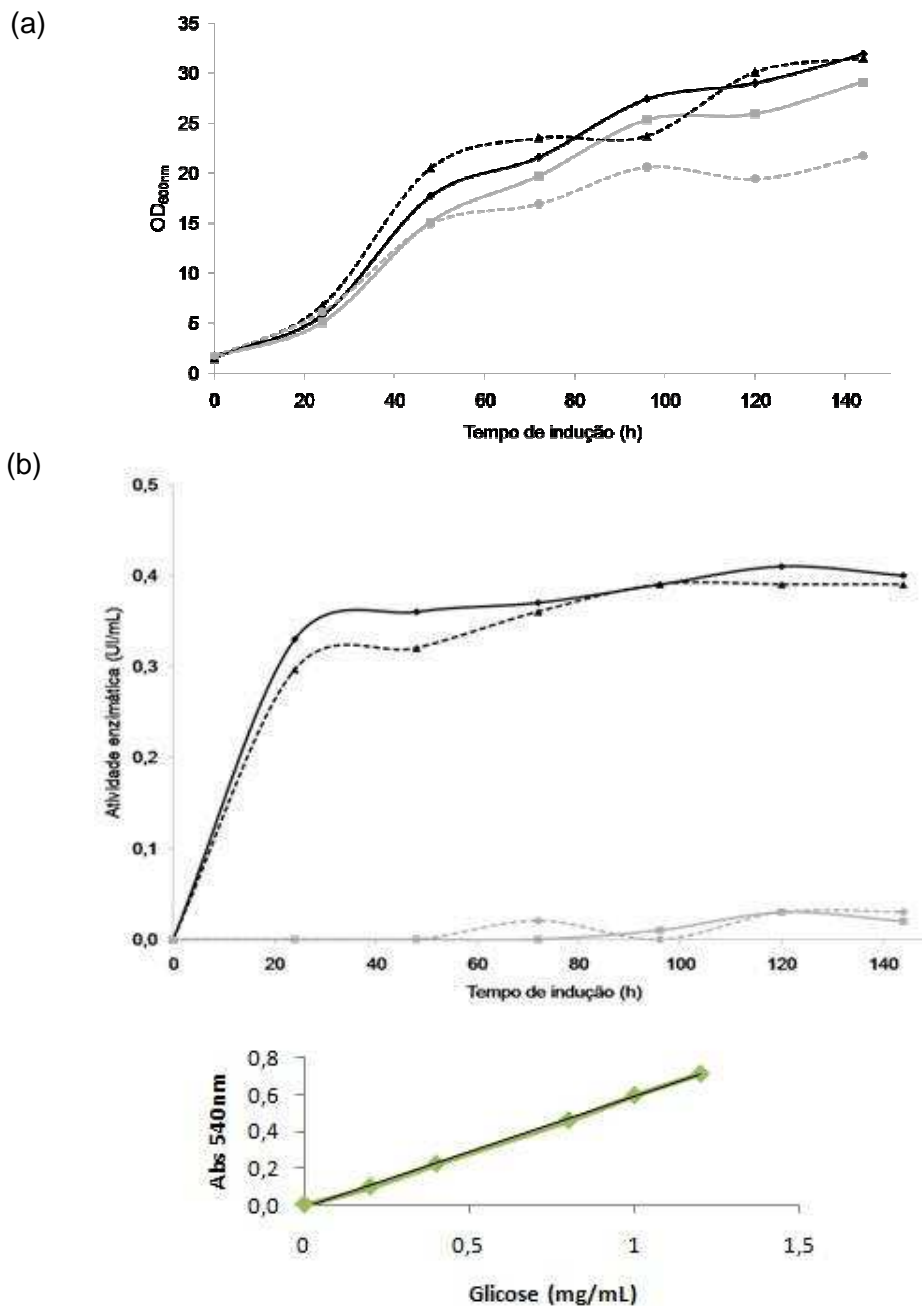
Outros experimentos de qPCR e/ou *Southern blot* serão realizados posteriormente para confirmação da integração do DNA exógeno no genoma de *P. pastoris*, bem como para determinação do número de cópias inseridas.

### **B.2 Produção da enzima recombinante em frascos agitados de 1 L**

#### **• Comparação dos valores de atividade enzimática da endoglicanase A secretada pelos diferentes clones recombinantes**

Visando a obtenção de um só clone positivo e seu respectivo controle dentre as duas construções empregadas (tabela 5), foram inoculadas colônias isoladas destes no meio de crescimento (BMGY). Após 24h de cultivo, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada e ressuspendidas no meio de indução (BMMY), ao qual era adicionado metanol diariamente para uma concentração final equivalente a 0,5% (v/v). Procedeu-se à análise da curva de crescimento e atividade enzimática por 144 h das alíquotas recolhidas a cada 24h contendo as enzimas secretadas pelos clones produtores transformados com ambas as construções. Estes dados foram comparados aos valores de atividade produzidos pelos respectivos controles negativos (fig. 12).

Este resultado mostra que o peptídeo-sinal nativo da endoglicanase A de *A. nidulans* foi reconhecido e corretamente processado pela hospedeira (fig. 12b). O mesmo foi observado por Oliveira (2007), durante a expressão heteróloga da celobiohidrolase 1.2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* portando a seqüência-sinal nativa em *P. pastoris*. Wonganu e colaboradores (2008) compararam os aspectos cinéticos e o perfil eletroforético do sobrenadante de *P. pastoris* transformada com o cDNA da endoglicanase de *Syncephalastrum racemosum* portando a seqüência-sinal nativa com a mesma construção com o peptídeo-sinal heterólogo. Os resultados para ambos produtos heterólogos foram bastante semelhantes, visto que após a remoção do peptídeo-sinal no meio intracelular, a proteína madura secretada pelos clones transformados com ambas construções é exatamente a mesma. Nossos resultados, conforme mostrados na figura 12, estão de acordo com o descrito acima.



**Figura 12:** Curva de crescimento dos clones transformantes de *P. pastoris* (a) e de produção de CMCase no sobrenadante dos mesmos (b) em frasco em 144h. C13 (---▲---): clone de *P. pastoris* transformado com a construção pHIL-D2/*egIA*<sub>1</sub>; C18 (—◆—): clone de *P. pastoris* transformado com a construção pPIC9/*egIA*<sub>2</sub>; C8ctrC13 (---●---): Clone 8, linhagem controle da atividade enzimática do clone C13, transformada com o vetor pHIL-D2 vazio; C2ctrC18 (—■—): Clone 2, linhagem controle da atividade enzimática do clone C18, transformada com o vetor pPIC9 vazio. Os pontos no gráfico são medidas experimentais de uma só réplica. Abaixo da figura (b) encontra-se a curva de calibração do reagente DNS, cuja equação obtida por regressão linear foi  $y = 3,9998x - 0,0115$ , com  $R^2 = 0,9988$ . A mesma equação foi empregada nos ensaios posteriores para realizar a conversão de unidades de absorbância em equivalentes de glicose produzida.

Embora não haja validação estatística neste experimento (fig. 12a), foi escolhido o clone portador da construção plasmidial pPIC9/*egIA*<sub>2</sub> e sua respectiva linhagem controle foram selecionados para os experimentos posteriores. Vale ainda

ressaltar que a ausência de informações a respeito do número de cópias do cDNA *egIA* que cada clone carrega torna impossível uma comparação do perfil de atividade entre ambos.

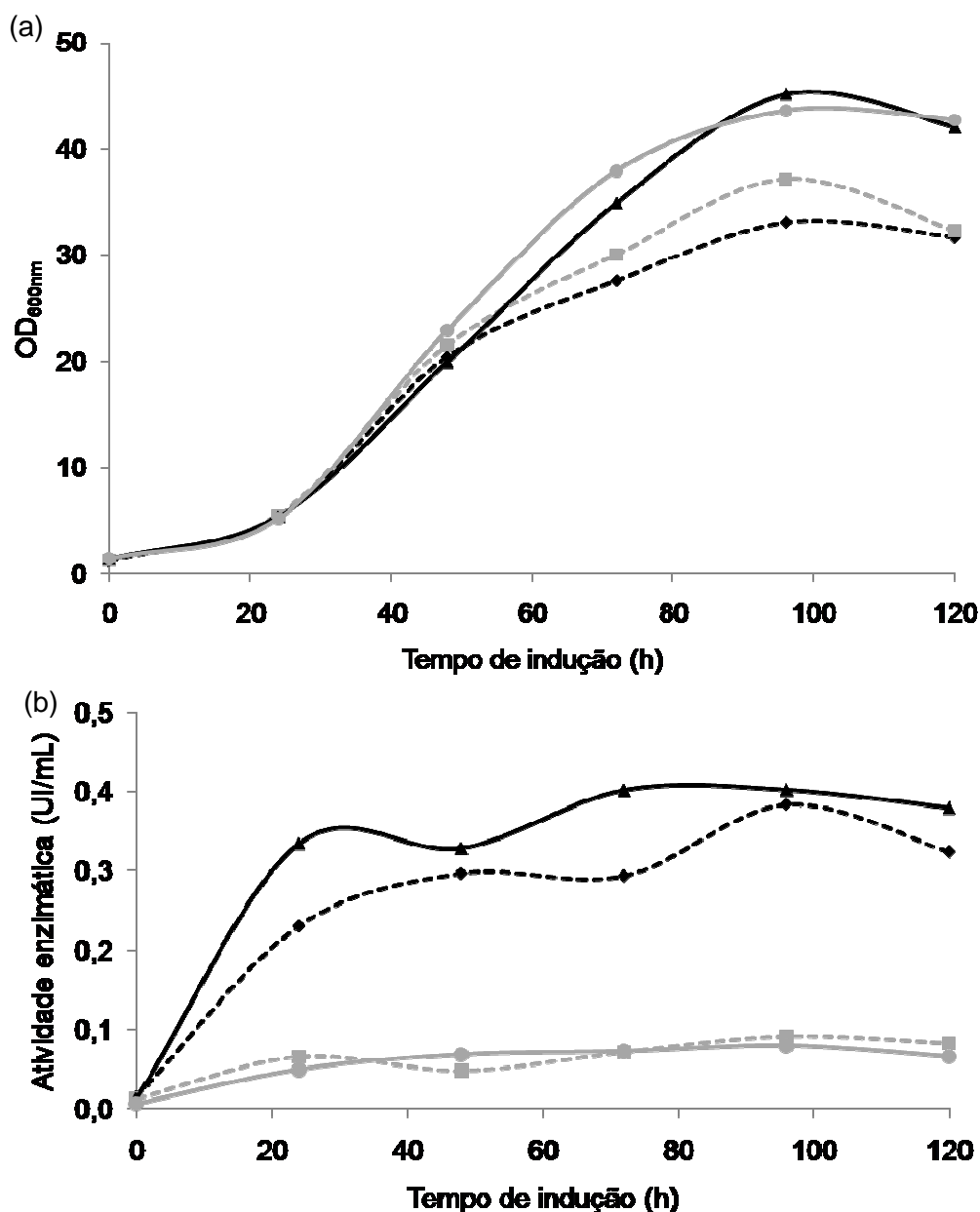
- **Otimização do meio de indução**

Após definida a linhagem produtora para os ensaios posteriores (clone C18, transformado com a construção plasmidial pPIC9/*egIA*<sub>2</sub>), uma colônia isolada desta e de seu respectivo clone controle foram inoculadas em meio de crescimento. Procedeu-se a análise da curva de crescimento e atividade enzimática em 120 h das enzimas secretadas pelo clone produtor quando comparado ao valor de atividade produzido pelo clone controle.

Este experimento teve como objetivo observar a contribuição do YNB para o crescimento das leveduras e, sobretudo, para a atividade enzimática. Este reagente é composto majoritariamente por pequenas quantidades de vitaminas, às quais foi adicionado sulfato de amônio na concentração sugerida pelo fabricante (Invitrogen). A tentativa de substituição deste reagente por uréia visou reduzir o custo dos meios de produção de enzima, objetivo atingido por Oliveira (2007).

Novamente observou-se o crescimento similar de todas as colônias analisadas (fig. 13a). Embora não seja possível a análise estatística, os valores de atividade enzimática no sobrenadante do meio de indução BMMY foram numericamente superiores (fig. 13b). É impossível então afirmar qual a contribuição de cada um dos meios testados. Entretanto, pode-se observar que a produção de enzima gerou valores semelhantes nas duas condições. Resultado semelhante foi observado por Rubini e colaboradores (2010, *in press*) quando da indução da produção heteróloga da endoglicanase 1 de *Penicillium echinulatum* em *P. pastoris*.

Este é um dado preliminar que sugere que, em um experimento em larga escala, o YNB poderia ser suprimido, reduzindo os custos da produção da EG A recombinante. Entretanto, para as etapas posteriores deste trabalho, o meio BMMY foi escolhido para obtenção da enzima a ser purificada.



**Figura 13:** Curva de crescimento dos clones transformantes de *P. pastoris* (a) e de atividade enzimática no sobrenadante dos mesmos (b) em 120h nos meios BMMY e BMMU. C18: clone transformado com a construção pPIC9/*eglA*<sub>2</sub> (com a seqüência do peptídeo-sinal heterólogo do fator- $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*) crescido nos meios BMMY (—▲—) e BMMU (—◆—); C2ctrC18: clone 2, linhagem controle da atividade enzimática do clone C18, transformada com o vetor pPIC9 vazio, crescido nos meios BMMY (—●—) e BMMU (—■—).

### Parte C: Purificação da enzima recombinante

#### **C.1 Definição do tempo de indução necessário para maior atividade enzimática da endoglicanase recombinante**

Visando a definição do ponto de mais alta atividade enzimática detectada no sobrenadante do clone produtor, avaliou-se o crescimento, concentração de proteínas e, sobretudo, a atividade da endoglicanase A recombinante no sobrenadante. Para tal, foram utilizados três frascos para cada um dos clones



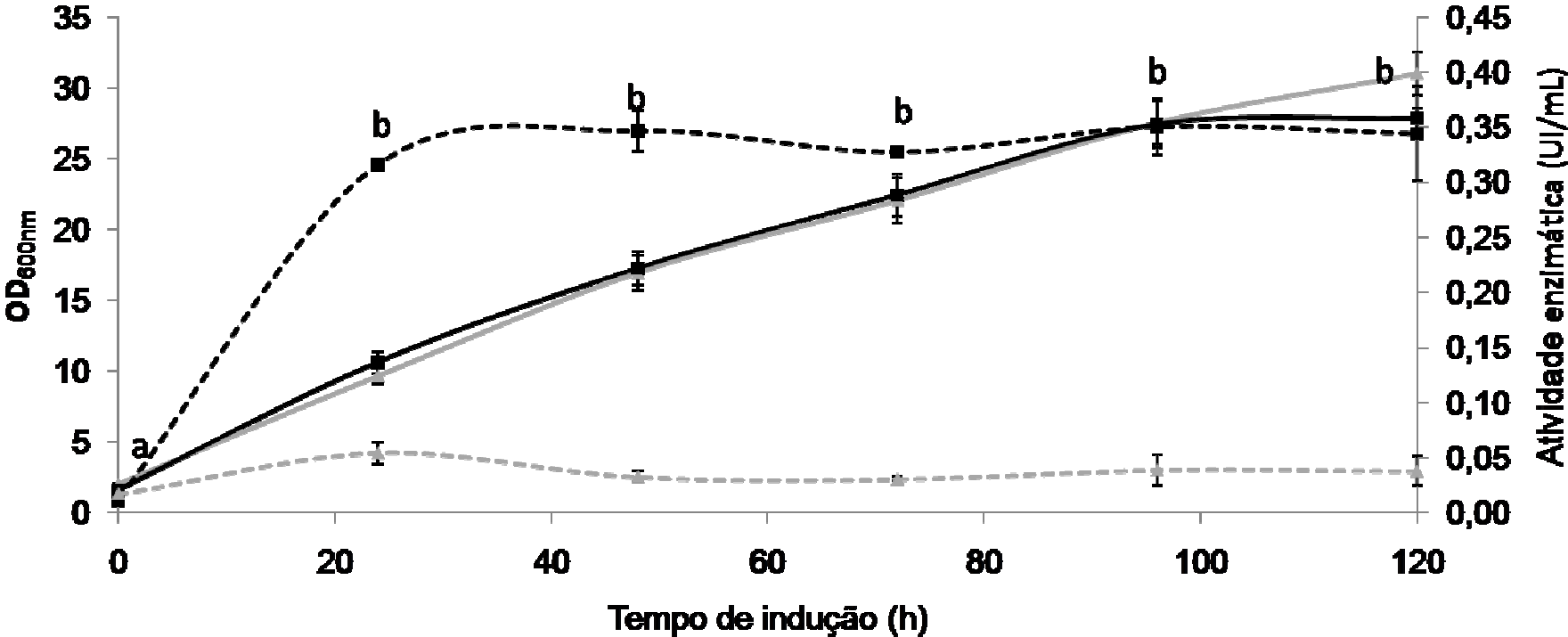
(produtor e controle) de modo a validar estatisticamente a escolha do ponto de coleta do sobrenadante do clone produtor para purificação da enzima heteróloga.

Após apresentarem crescimento similar no meio de indução, as triplicatas dos clones controle e produtor repetiram o comportamento anteriormente observado no que concerne aos valores de atividade enzimática do sobrenadante. Assim como no experimento anterior, o controle negativo (C2ctrC18) não ultrapassou 0,1 UI/mL, permanecendo até 120 h com valores em torno de 0,05 UI/mL. Estes foram inferiores quando comparados ao clone produtor (C18), tendo este atingido o valor máximo de aproximadamente 0,4 UI/mL já em 24 h de indução (fig. 14). Entretanto, em razão de maiores concentrações de proteínas totais ocorrerem somente a partir de 48 h (dados não mostrados), este foi definido como o ponto para coleta do sobrenadante visando a purificação da enzima heteróloga.

Em experimentos de produção de enzimas em sistema nativo, é possível observar um tempo mais prolongado para obtenção dos maiores valores de atividade sobre CMC (Lucas *et al.*, 2001; Karnchanatat *et al.*, 2008). Isso é principalmente reflexo da necessidade nutricional de fungos filamentosos, que carecem de concentrações consideráveis de fontes de carbono simples como glicose no meio de produção. A glicose tarda a ser totalmente consumida e a sua presença no meio favorece a repressão da expressão dos genes de celulasas mediada por fatores de transcrição.

Vale mencionar que mesmo em relação às análises de cinética de crescimento e atividade de *P. pastoris* observado por outros autores, os valores obtidos neste trabalho indicaram rápida indução da expressão gênica do cDNA clonado, reflexo dos maiores valores de atividade logo no segundo dia de indução. Oliveira (2007) e Rubini (2009), expressando *P. pastoris* celobiohidrolase 1.2 e endoglicanase 1 de fungos filamentosos (*H. grisea* e *P. echinulatum*, respectivamente) nas linhagens GS115 e SMD1168 de *P. pastoris*, respectivamente, observaram atividade máxima após 96 h de indução. Já Araújo (2008) obteve índices máximos da produção heteróloga de quimosina de *Bos taurus* em *P. pastoris* GS115 após 72h.

*P. pastoris* é uma levedura que secreta altos níveis de enzimas heterólogas (Romanos, 1995; Cereghino & Cregg, 2000), apresentando poucas proteínas próprias no sobrenadante (Mattanovich *et al.*, 2009), além das altas taxas de expressão de genes responsivos ao promotor AOX1 (Cregg *et al.*, 1999). A escolha desta hospedeira (linhagem GS115) favoreceu o alcance dos valores de atividade máxima em um tempo curto, o que torna o clone selecionado biotecnologicamente promissor.



**Figura 14:** Curva de crescimento (—■—) e de atividade enzimática (—■—) sobre CMC a partir do sobrenadante do clone produtor (preto) e controle (cinza) por 120 h. —▲—: densidade celular do clone 2, linhagem controle da atividade enzimática do clone C18, transformada com o vetor pPIC9 vazio; -▲-: atividade enzimática do sobrenadante do clone 2, linhagem controle do clone C18, transformada somente com o vetor pPIC9; —■—: densidade celular do clone C18; -■-: atividade enzimática do sobrenadante do clone C18. As barras verticais mostram o erro padrão da triplicata e as letras diferentes mostram diferença estatística (indicada somente para a curva de atividade enzimática do clone produtor) ( $p < 0,05$ ).

O alcance dos valores máximos de atividade em 24h de indução e a manutenção dos mesmos até 120 h são aspectos vantajosos atingidos pela estratégia de clonagem e expressão seguida neste trabalho. Tal resultado favorece a produção de enzima em maior escala diante do relativo curto tempo necessário para obtenção da atividade máxima e da conseqüente utilização de menores volumes de metanol, reagente tóxico e de alto custo.

Todavia, vale ressaltar que o metanol é um reagente altamente tóxico, inflamável e de elevado custo. Quando em escala industrial, sua utilização se daria em grandes volumes, elevando os gastos com a produção e comprometendo seriamente o trabalho de seus manipuladores. Embora altos níveis de produção possam ser alcançados empregando este indutor, o risco de explosão, lise celular, aquecimento do meio de cultura e elevado consumo de oxigênio obriga os pesquisadores a elaborarem estratégias alternativas de indução.

Por meio do emprego de citometria de fluxo, Jahic e colaboradores (2003) relataram a ocorrência de 12% de lise celular após 40 a 70 h de indução com metanol. Por outro lado, a indução com metanol quando realizada em condições de temperatura mais reduzidas, foram responsáveis pela redução da lise celular, possibilitando o alcance de maiores níveis de produção da proteína heteróloga. Isso ocorreu em razão da reduzida ocorrência de proteólise.

Entretanto, o resfriamento de grandes fermentadores em indústrias também resultaria em gastos excessivos, além de não resolver a maioria das questões que contam contra o metanol. Nesse sentido, são sugeridos promotores fortes responsivos à glicose, como o promotor do gene que codifica a enzima da via glicolítica, gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAP) (Waterham *et al.*, 1997). O promotor do gene GAP é de expressão constitutiva.

### **C.2 Purificação**

A estratégia empregada na purificação da endoglicanase consistiu em duas etapas. Em razão dos resultados obtidos por Mattanovich e colaboradores (2009) apontarem para a prevalência de proteínas nativas de *P. pastoris* em faixas superiores a 70 kDa, a estratégia empregada neste trabalho visou a remoção destas proteínas por meio de ultrafiltração em membrana com limite de retenção de 50 kDa. Dessa forma, as proteínas nativas seriam concentradas pelo ultrafiltrador e removidas da fração ultrafiltrada, na qual estaria a enzima heteróloga, de 34 kDa. Esta última fração foi então aplicada em coluna de gel filtração Sephadex G50 para obtenção de uma amostra com maior valor de atividade específica, e foi este o critério para análise dos resultados da purificação em curso (tabela 6).

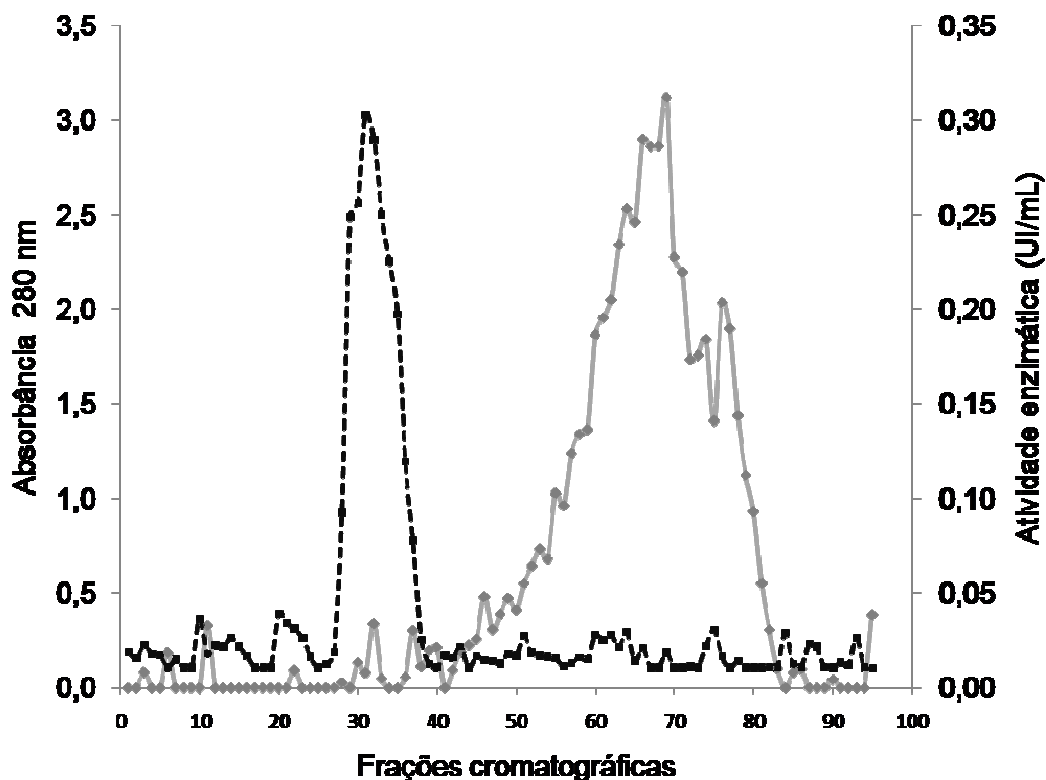
Após a etapa de ultrafiltração em membrana PM 50, dos 315 mL obtidos da fração ultrafiltrada foram utilizados 18 mL para aplicação na coluna de gel filtração. Foram eluídas 95 frações, avaliadas quanto à atividade enzimática e proteínas totais (A280), como mostrado na figura 15.

Vários trabalhos trazem metodologias de purificação de endoglicanases nativas a partir do extrato bruto do fungo crescido por períodos relativamente longos. O processo de purificação da EG A nativa de *A. nidulans* (Chikamatsu *et al.*, 1999) envolveu o emprego de precipitação com sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica e de gel filtração, intercaladas por uma etapa de concentração. Já Elshafei e colaboradores (2009), trabalhando com uma endoglicanase de *A. terreus*, utilizaram várias etapas de precipitação, diálise, liofilização e fracionamento com acetona, até finalizarem a purificação com cromatografia de troca iônica. Empregando uma endoglicanase de outra linhagem de *A. terreus*, Nazir e colaboradores (2009) fizeram uso de três etapas de cromatografia, intercaladas por processos de concentração de material por ultrafiltrador e sucessivas precipitações e diálises.

O processo de purificação realizado no presente trabalho se deu em pequena escala e com pequeno número de etapas, visto que o sobrenadante da hospedeira é pobre em proteínas nativas (Mattanovich *et al.*, 2009). Observa-se na tabela 6 o aumento no valor de atividade específica em uma razão superior a 2 após a ultrafiltração, apontando para eficiente remoção de proteínas da hospedeira. O rendimento de 61% indica a recuperação no ultrafiltrado de mais da metade da atividade enzimática sobre CMC, quando comparada àquela obtida no extrato bruto. De posse destes resultados salientamos a importância do processo de ultrafiltração, procedimento simples, rápido e de baixo custo.

A atividade retida no ultrafiltrador deve-se em parte às várias  $\beta$ -1,3-glicanases presentes no secretoma de *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2009), que têm atividade sobre CMC (Lynd *et al.*, 2002). Aliado a isso, uma possível saturação da membrana PM 50 levou à retenção de uma considerável parcela da proteína heteróloga, conforme confirmado posteriormente pela análise do perfil eletroforético das frações.

Ao final da purificação foi observado no cromatograma um pico único de atividade na fração G50, distinto do pico de maior concentração de proteínas (fig. 15), resultando em uma amostra com atividade específica cerca de 3 vezes superior àquela do extrato bruto (tabela 6). Quando são comparados os valores de atividade específica das frações G50 e UF50, estes são bastante semelhantes, assim como o perfil eletroforético de ambas, discutido a seguir.



**Figura 15:** Perfil da cromatografia de exclusão molecular da endoglicanase A recombinante (18 mL do ultrafiltrado em membrana PM 50) em colune cromatográfica Sephadex G50. As frações foram eluídas empregando o tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7. As frações eluídas foram caracterizadas quanto à determinação da concentração de proteínas totais (A280, —) e atividade enzimática (UI/mL, .....).

Vale ressaltar que os resultados referentes à cromatografia de exclusão molecular apresentados na figura 14 e na tabela 6 correspondem ao emprego de uma pequena fração da amostra UF50 (18 dos 315 mL). Desta forma, o rendimento de apenas 3% calculado para esta etapa da purificação está subestimado, uma vez que apenas uma pequena fração da amostra obtida da etapa de purificação anterior foi empregada nesta cromatografia (apenas cerca de 5,7% da amostra). Também é importante ressaltar que a atividade de 100% atribuída ao extrato bruto pode corresponder à contribuição das enzimas da hospedeira atuando sinergicamente com a enzima heteróloga. No que diz respeito à redução do rendimento calculado para a fração UF50 (61%, tabela 6), podemos provavelmente citar a participação tanto da remoção de parte das proteínas nativas como a retenção de uma considerável massa da proteína EG A recombinante na amostra concentrada em PM50 (fig. 16 e tabela 6).

Considerando as poucas proteínas nativas secretadas por *P. pastoris*, as estratégias de purificação de proteínas recombinantes empregando esta levedura como sistema heterólogo de expressão são geralmente simplificadas (Hong *et al.*, 2003; Galdino *et al.*, 2008), principalmente quando comparadas com o maior número de etapas requeridas na purificação da proteína nativa relacionada.

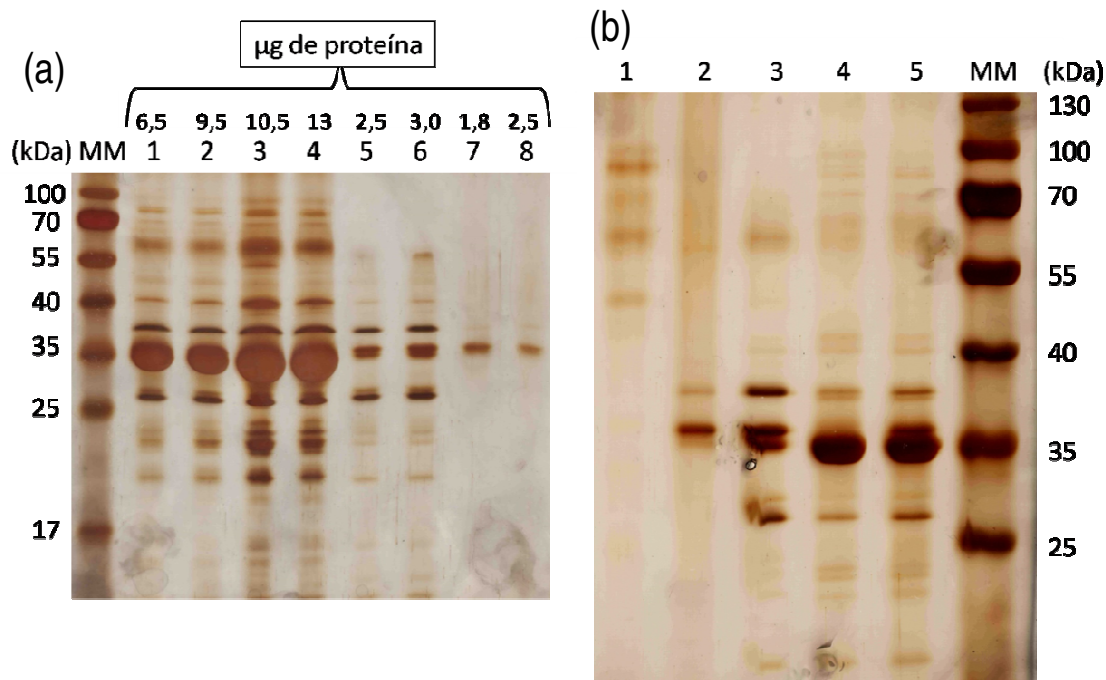
**Tabela 6.** Tabela de purificação da endoglicanase A recombinante a partir do sobrenadante de *P. pastoris*

Fração e volume disponível (mL)	Proteína total (mg)	Atividade da endoglicanase A recombinante			
		Atividade total (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Rendimento (%)	Purificação (x)
<b>Extrato bruto (EB); 25</b>	11,92 ± 1,62	109,56 ± 4,23	9,32 ± 1,37 <sup>a</sup>	100	1
<b>Concentrado da membrana de 50 kDa; 35</b>	4,62 ± 1,30	10,77 ± 0,37	2,45 ± 0,60 <sup>b</sup>	ND	ND
<b>Ultrafiltrado da membrana de 50 kDa (UF50); 315</b>	2,99 ± 0,35	66,78 ± 3,53	22,29 ± 4,13 <sup>c</sup>	61	2,4
<b>Sephadex G50 (G50)*; 25</b>	0,13 ± 0,02	3,10 ± 0,24	25,17 ± 4,04 <sup>c</sup>	3*	2,7

a, b, c: letras distintas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). ND – não determinado. \* Na cromatografia de filtração em gel, o rendimento de 3% foi obtido a partir da utilização de 18 mL dos 315 mL (cerca de 5,7% de amostra) da fração ultrafiltrada em membrana PM50 (UF50).

**Parte D: Análise do perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante e zimograma**

**D.1 Perfil eletroforético das frações da purificação**

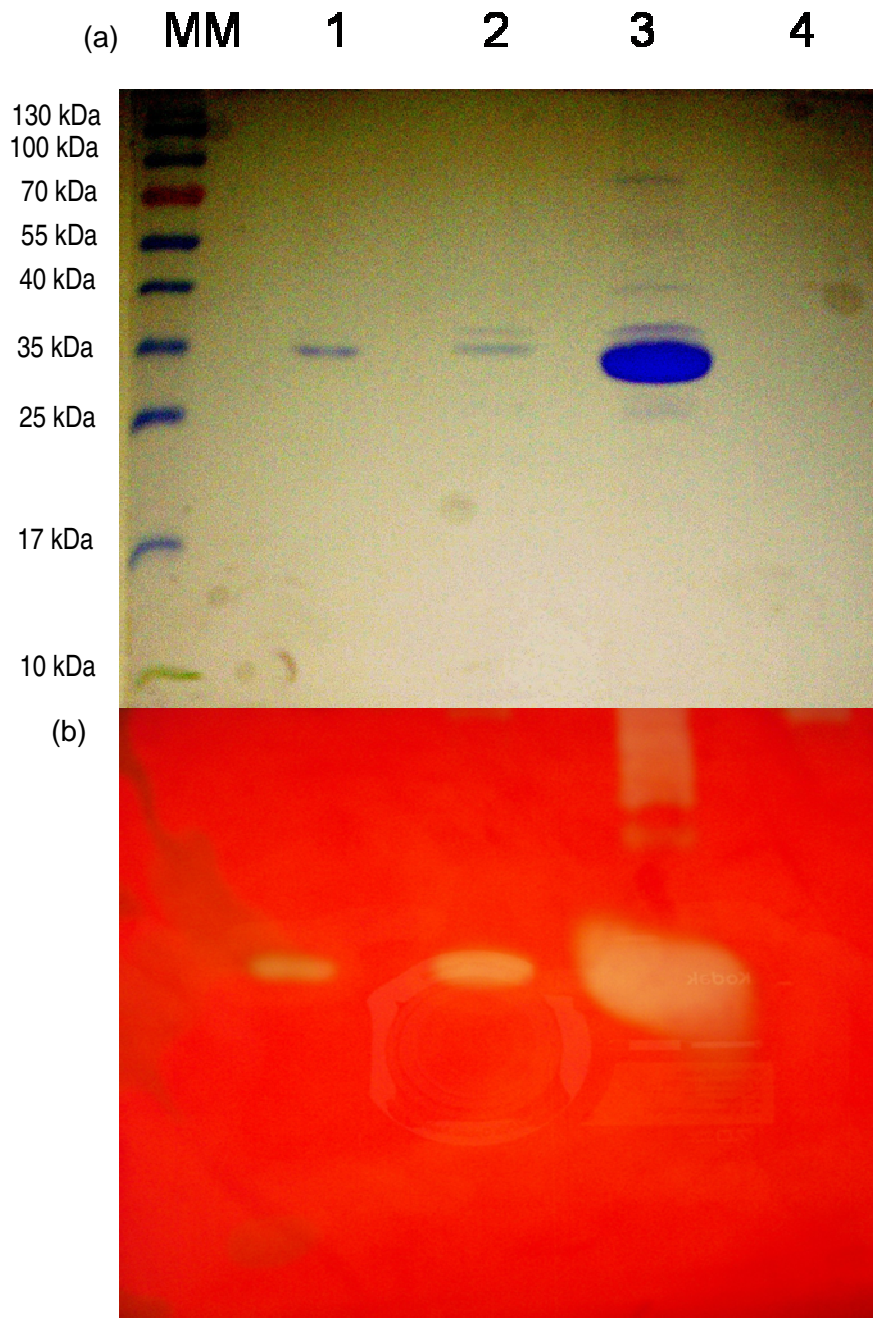


**Figura 16:** Perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante em SDS-PAGE 12% (p/v) corado com prata. MM: Marcador de massa molecular *Pageruller Prestained Protein Ladder* (Fermentas); Gel A: 1 e 2: EB; 3 e 4: fração concentrada após ultrafiltração com membrana PM 50; 5 e 6: UF50; 7 e 8: G50. Gel B: 1: proteínas presentes no sobrenadante da levedura transformada com o vetor vazio (controle negativo); 2: G50; 3: UF50; 4: proteínas na fração concentrada pelo ultrafiltrador com membrana de 50 kDa e 5: EB. No gel B foram empregados 2 µg de proteína total de cada amostra e no gel A estão indicadas as quantidades de proteína aplicadas em cada poço.

O perfil das proteínas das diversas frações (extrato bruto, fração concentrada e ultrafiltrada em membrana PM50 e a fração G50) obtidas nas etapas de purificação, foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme mostrado na figura 16.

Em todas as frações analisadas é possível a identificação de uma proteína de aproximadamente 34 kDa (fig. 15), exceto na amostra correspondente às proteínas totais do controle negativo (fig. 15B, poço 1). Também é possível observar a presença de diferentes proteínas da hospedeira, sobretudo nos poços de 1 a 4 (fig. 15A), sendo que aquelas maiores que cerca de 70 kDa foram removidas após ultrafiltração em membrana PM50 (fig. 15B, poço 3). Nos poços 2 (fig. 15B), 7 e 8 (fig. 15A) foi analisado o perfil das proteínas da fração G50, onde podemos observar um maior grau de purificação da EGA recombinante, sendo que a maioria das proteínas presentes nas outras frações foram removidas.

## D.2 Zimograma



**Figura 17:** Perfil eletroforético da endoglicanase A recombinante em SDS-PAGE 12% (p/v) corado com azul brilhante de *Comassie* (a) e atividade em gel corado com vermelho do Congo (b). MM: Marcador de massa molecular (Fermentas); 1: 6,3  $\mu$ g das proteínas na fração G50; 2: 8  $\mu$ g das proteínas na fração UF50; 3: 32  $\mu$ g proteínas do extrato bruto (EB); 4: 23  $\mu$ g das proteínas do controle negativo (sobrenadante da levedura transformada com vetor vazio).

A realização do zimograma teve o objetivo de confirmar a correspondência entre a massa molecular da EG A recombinante com a atividade sobre CMC observada ao longo deste trabalho. Assim, após a eletroforese e tratamento do gel



para a renaturação das proteínas, este foi incubado em condições favoráveis à hidrólise do substrato. Para tanto, foi avaliado também o perfil eletroforético da amostra controle, relativa às proteínas da hospedeira transformada com o vetor vazio (fig. 16A, poço 4). Neste poço não foram observadas proteínas com massa molecular na faixa de 34 kDa. Isso confirma que a atividade hidrolítica em gel foi gerada pelas proteínas das amostras apresentando a proteína de massa molecular equivalente a 34 kDa, as quais são superponíveis aos halos de hidrólise observados na figura 16B.

Entretanto, na amostra relativa ao extrato bruto, também foi observado halo de hidrólise do substrato na faixa de 70 a 130 kDa aproximadamente, atividade esta provavelmente relacionada às proteínas da hospedeira (fig. 16B, poço 3). O mesmo foi observado no limite superior do gel para a amostra relativa ao controle negativo (fig. 16B, poço 4), na qual localizam-se proteínas de massa molecular maior que 130 kDa. Estas proteínas estão ausentes nas demais frações, podendo ser relacionadas possivelmente às proteínas da própria hospedeira, as quais podem ter atividade sobre CMC (Lynd *et al.*, 2002).

O secretoma de *P. pastoris* conta com 38% de glicosidases que, embora sejam em parte originalmente proteínas ligadas à parede da levedura, podem soltar-se devido à reestruturação da parede celular (Mattanovich *et al.*, 2009) e lise celular em função da interação com o metanol. Isso contamina a fração UF50 e, principalmente, o extrato bruto com outras proteínas, que não a EG A<sub>r</sub>. Estas, caso sejam tratadas de uma mistura de β-1,3-glicanases, podem promover a degradação de CMC.

### **Parte E: Caracterização bioquímica da EG A recombinante**

Para avaliar o efeito dos constituintes do meio de indução e das proteínas de massa molecular superiores a 50 kDa parcialmente removidas na ultrafiltração, foram caracterizadas funcionalmente as frações do extrato bruto (EB) e ultrafiltrado da membrana de 50 kDa (UF50) juntamente com a fração obtida após a cromatografia de gel filtração Sephadex G50 (G50).

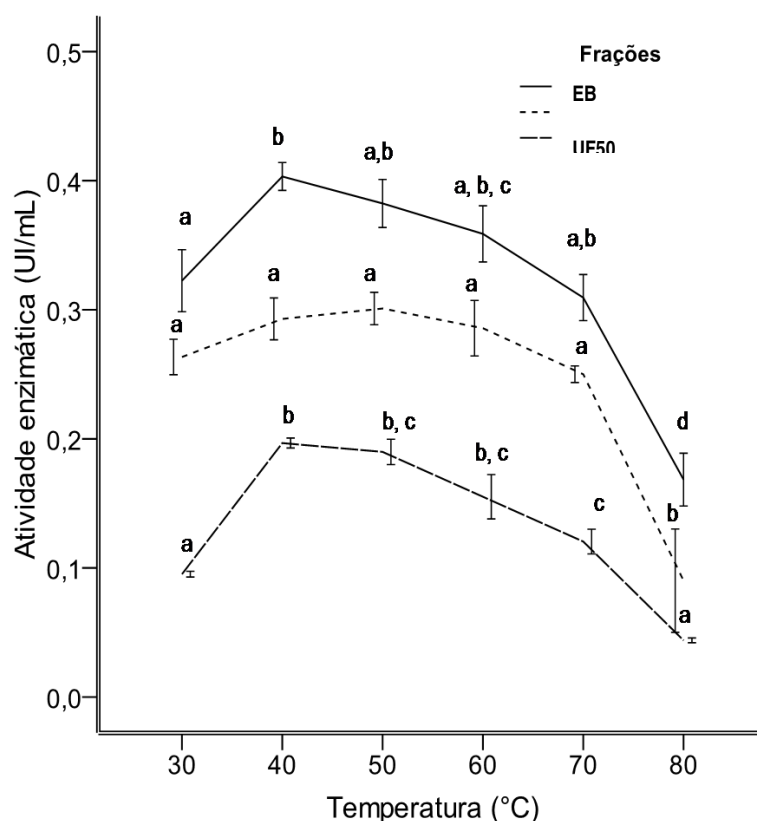
#### **E.1 Atividade enzimática da endoglicanase A em função da temperatura de reação**

Visando avaliar a influência da temperatura na atividade enzimática das três frações da purificação realizada, foram analisadas as temperaturas de 30 a 80°C, sendo o substrato (CMC) diluído em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,5.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas distintas condições avaliadas neste ensaio (fig. 18). Para as frações EB e UF50 a atividade enzimática é relativamente pouco afetada na faixa de temperatura de 30 a 70°C,

apresentando uma drástica redução a 80°C. A atividade enzimática da endoglicanase A recombinante na fração G50 mostrou pequena variação na faixa de temperatura de 40 a 60°C, sendo muito afetada nas temperaturas de 30 e 80°C.

Assim como foi observado para a enzima nativa (Chikamatsu *et al.*, 1999), para a enzima heteróloga não purificada (Bauer *et al.*, 2006), para outras endoglicanases do gênero *Aspergillus* (Garg & Neelakantan, 1982; Bagga *et al.*, 1990; Gao *et al.*, 2008; Nazir *et al.*, 2009) e para a família 5 de glicosil hidrolases (Minamiguchi *et al.*, 1995; Rubini *et al.*, 2010 *in press*) a atividade ótima foi observada na temperatura em torno de 50°C. Como mostrado na figura 18, a atividade ótima da endoglicanase A recombinante nas três frações foi observada na faixa de 40 a 60°C.



**Figura 18:** Efeito da temperatura na atividade enzimática em CMC das três frações da purificação. Os pontos apresentados nos gráficos são as médias das triplicatas experimentais e as barras verticais representam o erro padrão. As letras distintas indicam diferença estatística dentro da mesma fração ( $p < 0,05$ ).

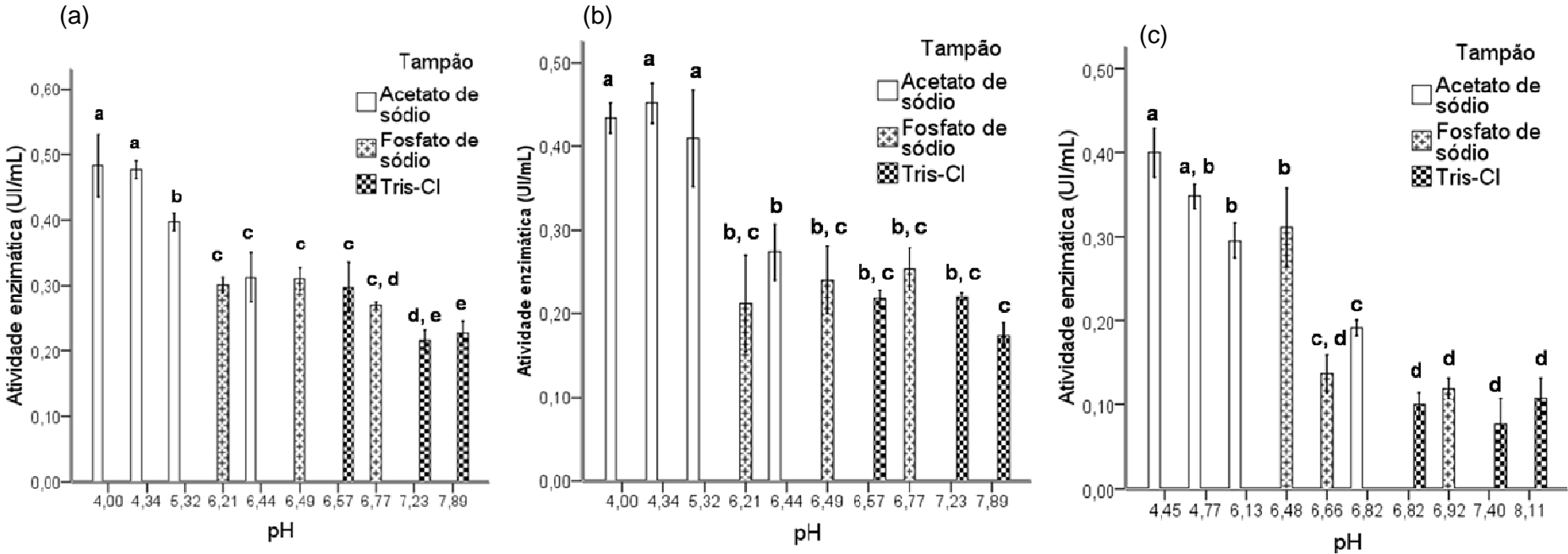
### E.2 Atividade enzimática da endoglicanase A recombinante em função do pH

As condições tamponantes testadas envolveram variações na composição do tampão e nos valores de pH, sendo os resultados obtidos mostrados na figura 18. Vale ressaltar que a montagem da figura leva em conta o pH final resultante da mistura do tampão testado com o tampão no qual a enzima se encontrava (tabela 4).

Assim como ocorreu para a temperatura de reação, o pH da reação afetou a atividade enzimática de forma semelhante para as três frações. Foram observados maiores valores de atividade em condições ácidas, principalmente com pH em torno de 4 a 4,5. Por outro lado, condições de reação neutras levemente alcalinas foram responsáveis pela redução da atividade, efeito este mais pronunciado na fração G50 (fig. 19c).

Foi mencionado neste trabalho que esta enzima encontra-se já parcialmente caracterizada. Um trabalho relata a purificação da enzima produzida em sistema nativo (Chikamatsu *et al.*, 1999) e outro traz alguns dados a respeito da endoglicanase A heteróloga presente no sobrenadante da linhagem X-33 de *P. pastoris* (Bauer *et al.*, 2006). O resultado do presente trabalho (fig. 19) não coincide com os dados de caracterização parcial desta enzima em sua forma nativa realizados por Chikamatsu e colaboradores (1999), no qual é sugerida a faixa de pH em torno de 6,5 para atividade ótima da EG A de *A. nidulans* em sua forma nativa. Em contrapartida, os resultados gerados neste experimento pelo presente trabalho confirma os de Bauer e colaboradores (2006) quanto ao pH preferencial para atividade máxima. Além disso, o presente trabalho é, neste aspecto, semelhante aos obtidos para a maioria das endoglicanases. Os trabalhos revisados por Dashtban e colaboradores (2009) apontam para uma faixa preferencial de pH em torno de 4 a 5 para as endoglicanases, assim como para celobiohidrolases. De fato, várias endoglicanases do gênero *Aspergillus* apresentaram maiores valores de atividade nesta faixa de pH (Garg & Neelakantan, 1981; Gao *et al.*, 2008). O mesmo foi observado para uma endoglicanase da família 5 (Sul *et al.*, 2004).

Visto que os processos de hidrólise preferencialmente ocorrem em condições ácidas, enzimas acidófilas têm maior interesse biotecnológico no que diz respeito à potencial degradação de lignocelulose (Dashtban *et al.*, 2009). É nestas condições que se dão muitas das estratégias de pré-tratamento (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). Entretanto, grupos de pesquisa têm investido esforços na obtenção de enzimas modificadas no sentido de atuarem preferencialmente em pH alcalino, sendo esta condição preferencial para processos da indústria têxtil (Camassola *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2008). Porém, a maior atividade de celulasas em pH ácido parece ser um aspecto intrínseco de sua estrutura protéica de difícil alteração pelo emprego de técnicas de mutação (Qin *et al.*, 2008).



**Figura 19:** Atividade enzimática da endoglucanase recombinante sobre CMC em função do pH final da reação. (a) valores de atividade enzimática obtidos a partir do sobrenadante do clone produtor (extrato bruto); (b) valores de atividade enzimática da fração obtida da ultrafiltração empregando membrana PM 50; (c) valores de atividade enzimática da fração obtida por cromatografia (Sephadex G50). Os pontos apresentados nos gráficos representam as médias das triplicatas experimentais e as barras verticais representam o erro padrão. As letras distintas indicam diferença estatística dentro da mesma fração ( $p < 0,05$ ).

A faixa de pH na qual a endoglicanase A recombinante tem seus maiores valores de atividade coincide com as condições preferenciais da maioria das endoglicanases e celobiohidrolases, confirmando que, no que concerne às condições tamponantes, a endoglicanase A recombinante pode atuar em misturas enzimáticas complexas. Portanto, para os demais ensaios enzimáticos de caracterização bioquímica foi empregado o tampão acetato de sódio 50 mM pH 4 como diluente do substrato. Esta condição, assim como demonstrado na tabela 4, proporciona um pH final na reação de cerca de 4,4 a 4,8.

### E.3 Avaliação da estabilidade térmica da endoglicanase A recombinante

Definidos os parâmetros otimizados para as reações seguintes, a endoglicanase recombinante foi caracterizada quanto à sua termoestabilidade. Neste experimento foram analisadas temperaturas próximas à temperatura ótima (45 e 55°C) e também valores mais extremos de temperatura (70 e 80°C). Para construção dos gráficos e análise dos dados foi estabelecido como padrão (100%) a solução de enzima incubada por somente um minuto na temperatura correspondente, sendo a temperatura de reação de 50°C.

Os valores de atividade enzimática permaneceram equivalentes durante quase todos os períodos de incubação a 45°C e 55°C (tabela 7), apresentando pequenas diferenças significativas somente a partir de 48 h. Este dado sugere uma marcante estabilidade da enzima em faixas de temperatura próximas à 50°C. Resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos de expressão heteróloga (Qin *et al.*, 2008; Thongekkaew *et al.*, 2008), inclusive com endoglicanases da família 5 (Siqueira, 2004), sendo sugerido a classificação das enzimas estudadas como termoestáveis (Qin *et al.*, 2008; Thongekkaew *et al.*, 2008). Seguindo o mesmo critério dos trabalhos supracitados, a EG A<sub>r</sub> também poderia ser classificada como uma enzima termoestável por manter de 85 a 100% de sua atividade após prolongados períodos (até 48 h) de incubação nestas temperaturas.

O mesmo não foi observado em vários casos descritos na literatura para enzimas termofílicas ou de organismos termófilos, como é o caso da endoglicanase de *Daldinia eschscholzii*, com meia-vida de cerca de 1h na faixa de temperatura que confere a máxima atividade (Karnchanatat *et al.*, 2008). As endoglicanases caracterizadas de *A. terreus* M11 e AN<sub>1</sub> perdem 20 e 40%, respectivamente, de suas atividades quando incubadas por somente 1h na temperatura na qual foi observada a atividade máxima (Gao *et al.*, 2008; Nazir *et al.*, 2009). Já a endoglicanase de *Chalara paradoxa* não resistiu por períodos superiores a 5 h em temperaturas próxima à sua faixa ótima (Lucas *et al.*, 2001).

**Tabela 7.** Análise da termoestabilidade da endoglicanase A presente nas frações testadas.

FR	T (°C)	Tempo de incubação (h)								
		0	1	2	3	6	12	24	48	72
EB	45	100 ± 2,3	NA	NA	108 ± 6,4	NA	100 ± 3,0	101 ± 8,7	97 ± 3,1	90 ± 2,5*
	55	100 ± 5,4	NA	NA	103 ± 2,1	NA	101 ± 5,8	105 ± 10,3	86 ± 5,0*	54 ± 4,3*
	70	100 ± 4,7	NA	NA	70 ± 0,5*	25 ± 2,0*	NA	NA	NA	NA
	80	100 ± 4,7	45 ± 0,4*	17 ± 0,3*	10 ± 3*	NA	NA	NA	NA	NA
UF50	45	100 ± 10,0	NA	NA	134 ± 4,0*	NA	106 ± 7,2	101 ± 2,0	100 ± 5,0	96 ± 6,2
	55	100 ± 5,7	NA	NA	108 ± 4,2	NA	106 ± 4,5	105 ± 4,6	100 ± 5,0	81 ± 6,0*
	70	100 ± 2,2	NA	NA	80 ± 1,8	9,6 ± 1,2*	NA	NA	NA	NA
	80	100 ± 1,2	55 ± 6,5*	44 ± 6,4*	46 ± 0,5*	NA	NA	NA	NA	NA
G50	45	100 ± 9,1	NA	NA	109 ± 11,3	NA	99,2 ± 5,8	100 ± 6,3	104 ± 8,4	84 ± 14,0*
	55	100 ± 10,2	NA	NA	106 ± 6,5	NA	108 ± 8,5	112 ± 5,2	82 ± 6,8*	76 ± 3,1*
	70	100 ± 3,9	NA	NA	59 ± 5,0*	30 ± 3,2*	NA	NA	NA	NA
	80	100 ± 5,8	40 ± 11,5*	11 ± 1,4*	13 ± 3,5*	NA	NA	NA	NA	NA

Os resultados estão expressos em atividade enzimática relativa (%). Os asteriscos (\*) indicam diferença estatística dentro da mesma fração ( $p < 0,05$ ), quando comparadas ao controle. FR – fração; T – temperatura de incubação; NA - não avaliado.

Para a EG A recombinante, após incubação nas temperaturas de 70 e 80°C foi observada significativa redução na atividade enzimática mesmo após 1 h a 80°C, apresentando redução de cerca de 50% em relação ao tratamento controle (80°C por 1 minuto). Após mais uma hora de incubação nesta temperatura as enzimas das três frações mantiveram no máximo cerca de 20% da atividade (tabela 7). Já na incubação a 70°C a atividade enzimática foi reduzida para cerca de 25 a 15% do valor controle após 6h.

A endoglicanase de *A. niger*, também agrupada na família 5, foi classificada por Hong e colaboradores (2003) como altamente estável por manter 80% de sua atividade máxima após incubação por 2h a 70°C. Por outro lado, a também termoestável endoglicanase de *D. eschscholzii* (Karnchanatat *et al.*, 2008), com atividade máxima a 70°C, manteve 20 % da atividade quando incubada por 2 h a 70°C ou 1 h a 80°C. Cerca de 70 % da atividade da EG A recombinante foi mantida quando incubada por 3 h na temperatura de 70°C, resultado esse observado nas três frações testadas. Esse dado aponta para uma termoestabilidade da EG A recombinante também a 70°C, se utilizados os mesmos critérios descritos por Hong e colaboradores (2001). Esta sugestão poderia ser confirmada após análise da termoestabilidade da EG A recombinante a 70°C por tempos inferiores a 3 h.

#### **E.4 Efeito de quelantes, agentes redutores, detergentes e sais de íons metálicos na atividade enzimática da endoglicanase A recombinante**

São descritos pela literatura que diferentes agentes interferem na atividade enzimática, de modo a atuarem como inibidores ou ativadores. O efeito de agentes interferentes na atividade enzimática neste trabalho foi observado por meio da incubação da EG A<sub>r</sub> com 18 mM destes agentes na reação enzimática. Em razão desta concentração de HgCl<sub>2</sub> resultar em 50% de inibição da atividade na EG A<sub>r</sub> na fração UF50, o emprego de agentes a esta concentração final na reação permitiu a observação de seus efeitos com uma clareza maior do que foi obtido com concentrações mais reduzidas (dados não mostrados). As discussões concentrar-se-ão no efeito sobre a fração mais pura, e as demais frações serão mencionadas como base de comparação, quando necessário.

Em inúmeros trabalhos o íon Hg<sup>2+</sup> é descrito forte inibidor da atividade enzimática, tendo sido relatada redução de até 95% quando na concentração de 1 mM, conforme descrito para a atividade da endoglicanase de *Daldinia eschscholzii* (Karnchanatat *et al.*, 2008). Segundo a literatura, a interação com cátions metálicos pode provocar oxidação dos grupos sulfidríla, desestabilizando pontes dissulfeto e afetando a conformação tridimensional da proteína (Rouvinen *et al.*, 1990; Ohmiya *et*

*al.*, 1995). O efeito inibidor deste íon também pode dever-se a interações com resíduos de triptofano (Elshafei *et al.*, 2009).

Dentre os tratamentos testados neste trabalho, alguns se destacam no que diz respeito à influência sobre a atividade (tabela 8). Agentes redutores tiveram efeito estimulatório na atividade da endoglicanase A, sendo este resultado mais visível na fração G50. O mesmo vale para elementos que provocaram redução na atividade, como foi o caso de  $\text{AlCl}_3$ , tendo provocado inibição de 10 a 30%, coincidindo com os resultados descritos para a endoglicanase 1 de *Penicillium echinulatum*, também da família 5 de glicosil hidrolases (Rubini *et al.*, 2010).

Dentre os íons divalentes analisados, a maioria não apresentou efeito estatisticamente significativo. Quanto aos inibidores desta categoria, o  $\text{Zn}^{2+}$ , resultou em efeito inibitório na atividade enzimática da enzima na fração G50. Entretanto, a inibição observada foi somente de cerca de 20 % diante da incubação na presença de uma alta concentração deste íon. Dados de incubação com íons metálicos juntamente com dados de incubação com agentes redutores apontam para pouca importância de pontes dissulfeto na estabilização da estrutura tridimensional. A incubação com agentes redutores, responsáveis pelo rompimento de pontes S-S, provocou aumento significativo na atividade enzimática das três frações analisadas, especialmente  $\beta$ -mercaptoetanol, responsável pelo incremento de 80% no valor de atividade.

A incubação com EDTA, agente quelante de íons divalentes, não resultou em efeito estatisticamente significativo, indicando que a endoglicanase A não é uma metaloproteína. O contrário ocorreu no tratamento das endoglicanases das linhagens M11 e DSM 826 de *Aspergillus terreus* (Gao *et al.*, 2008; Elshafei *et al.*, 2009). Em ambos os casos o EDTA teve efeito inibidor e foi observado intenso aumento na atividade enzimática quando da incubação com íons divalentes como  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ .

Os sais  $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{CaCl}_2$  figuraram entre os favorecedores do aumento da atividade, indicando alguma participação no mecanismo catalítico ou na estabilidade da enzima. Foi observado um acréscimo de 20% no valor da atividade enzimática diante da interação com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , assim como relatado para endoglicanase de *D. eschscholzii* (Karnchanatat *et al.*, 2008). Este fato é incoerente com a sugestão feita anteriormente de que EG A não seria uma metaloproteína. Porém, assim como foi sugerido no trabalho de Karnchanatat e colaboradores (2008), possivelmente ambos íons teriam efeito estabilizador na estrutura da enzima, não tendo papel essencial no mecanismo catalítico. O mesmo poderia ser sugerido para o efeito ativador de  $\text{Cu}^{2+}$  na EG A, resultado também observado por Nazir e colaboradores (2009), com uma endoglicanase descrita na linhagem AN<sub>1</sub> de *A. terreus*.



**Tabela 8.** Efeito do tratamento de diferentes agentes (quelantes, sais de íons metálicos, detergentes e agentes redutores) sobre a atividade enzimática nas três frações da purificação.

Tratamento	Fração	Atividade relativa (%)		
Controle	EB	100,00	±	2,23
	UF50	100,00	±	0,85
	G50	100,00	±	3,95
SDS	EB	103,66	±	10,75
	UF50	107,92	±	8,19
	G50	31,24	±	4,73 *
EDTA	EB	119,15	±	2,18 *
	UF50	133,11	±	11,12 *
	G50	103,69	±	4,07
DTT	EB	111,67	±	2,34 *
	UF50	117,09	±	4,74 *
	G50	132,43	±	3,11 *
β-mercaptoetanol	EB	131,72	±	0,94 *
	UF50	139,34	±	4,50 *
	G50	181,81	±	11,09 *
AlCl <sub>3</sub>	EB	89,93	±	2,01 *
	UF50	88,55	±	6,16 *
	G50	67,10	±	4,54 *
CaCl <sub>2</sub>	EB	118,87	±	4,71 *
	UF50	111,42	±	5,58 *
	G50	112,55	±	6,91 *
ZnSO <sub>4</sub>	EB	107,35	±	1,57 *
	UF50	84,33	±	1,80 *
	G50	83,03	±	7,19 *
NaCl	EB	180,68	±	7,63 *
	UF50	107,85	±	5,04
	G50	97,14	±	4,30
CoCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	EB	133,99	±	7,79 *
	UF50	125,33	±	0,59 *
	G50	132,26	±	3,19 *
CuCl <sub>2</sub>	EB	105,47	±	1,28
	UF50	97,74	±	2,22
	G50	120,37	±	2,33 *
KCl	EB	91,26	±	3,48 *
	UF50	100,35	±	1,14
	G50	99,34	±	4,20
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	EB	96,58	±	4,68
	UF50	79,34	±	4,43 *
	G50	92,00	±	6,09

\* Diferença estatisticamente significativa (p<0,05%)

Por fim, a incubação da EG A recombinante com SDS, um detergente iônico forte, provocou intensa redução nos valores de atividade enzimática, resultando na diminuição de cerca de 70 % na atividade da enzima na fração G50, sendo esta a única a ser afetada por este reagente.

### **E.5 Atividade enzimática da endoglicanase A sobre outros substratos**

Após a análise de efeitos dos diversos interferentes, procedeu-se a observação da atividade sobre outros substratos, visto que até então somente a carboximetilcelulose havia sido empregada nos ensaios. Neste experimento foram utilizados papel de filtro (*Whatman* n<sup>o</sup> 1), celulose microcristalina (*Avicel*, *Sigma*), xilana, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG, *Sigma*) e 4-metil-umbelliferil- $\beta$ -D-celobiosídeo (MUC, *Sigma*)

Nos ensaios quantitativos, foi definido como padrão (100%) a atividade da endoglicanase A recombinante sobre CMC.

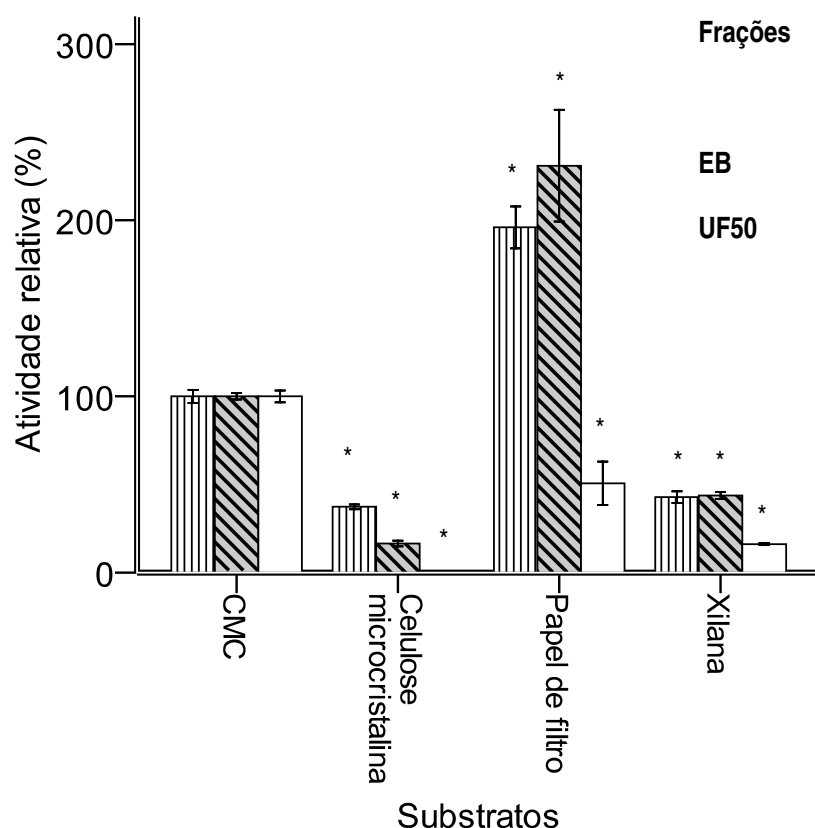
Conforme o esperado, a endoglicanase recombinante foi pouco eficiente na degradação de substratos específicos para outras classes enzimáticas (figura 20). A celulose microcristalina, muito compactada e de difícil acesso às hidrolases, é mais facilmente degradada por celobiohidrolases, que atacam o polímero pelas extremidades. Entretanto, a EG A nativa foi capaz de utilizar este substrato, embora com atividade específica baixa em relação àquela observada para CMC (*Chikamatsu et al*, 1999). Porém, os autores não deixam claro qual a quantidade deste substrato empregada no ensaio.

O substrato pNPG também não foi hidrolisado pela EG A<sub>r</sub>, concordando com os resultados obtidos com a enzima nativa (*Chikamatsu et al.*, 1999). Este fato é reflexo da conformação tridimensional do sítio catalítico de cada uma das classes de celulasas e mostra que a endoglicanase estudada neste trabalho não apresenta atividade de celobiohidrolase, tampouco de  $\beta$ -glicosidase, sinalizando para a necessidade de suplementação com outras classes enzimáticas para degradação de substratos complexos.

A xilana, por outro lado, também não foi eficientemente degradada em função de tratar-se de um polímero formado por pentoses, resultando em uma estrutura pouco reconhecida pelas celulasas, conforme também observado para a enzima nativa (*Chikamatsu et al.*, 1999).

O ensaio enzimático sobre papel de filtro, substrato insolúvel e de composição mais heterogênea, resultou em uma atividade enzimática duas vezes maior quando incubado com as frações EB e UF50 quando em comparação a atividade destas frações sobre CMC. A fração G50 apresentou atividade relativa de

cerca de 50% inferior àquela obtida empregando CMC como substrato. Sugere-se neste caso uma possível ação sinérgica da EG A<sub>r</sub> com as enzimas da célula hospedeira, que ainda estão presentes nas frações EB e UF50. Outros trabalhos (Akiba et al., 1994; Karnchanatat et al., 2008; Elshafei et al., 2009) relatam degradação de papel de filtro em níveis semelhantes ou ainda menos eficientes aos observados para a fração G50. Empregando o sobrenadante da cultura de hospedeiras para enzimas heterólogas, Siqueira (2004) e Rubini e colaboradores (2010, in press) relataram cerca de 60% de atividade enzimática sobre papel de filtro quando comparada àquela obtida em CMC. Vale mencionar que em ambos os casos as enzimas secretadas pelas hospedeiras podem ter contribuído para estes resultados, gerando uma possível ação sinérgica.



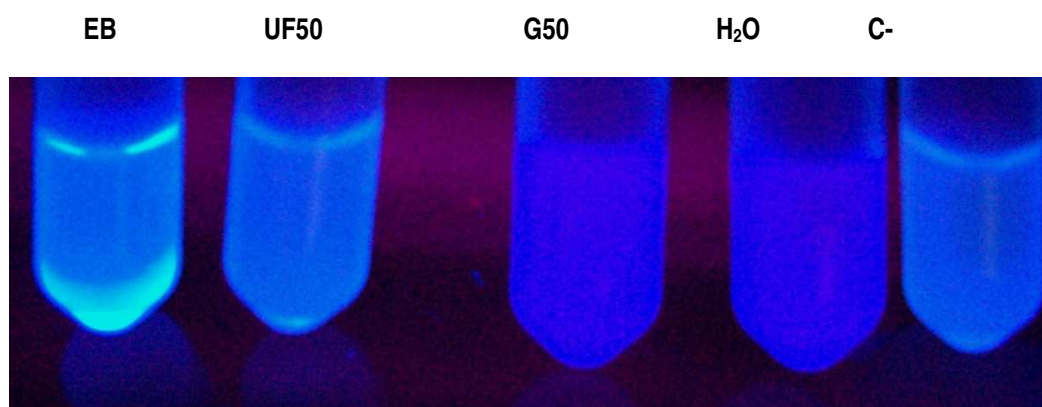
**Figura 20:** Atividade enzimática das três frações da purificação em diversos substratos: carboximetilcelulose (padrão), celulose microcristalina, papel de filtro e xilana. Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao padrão (CMC) ( $p < 0,05$ ).

A degradação de MUC e a liberação do produto fluorescente só foi visível para as frações EB e UF50 (fig. 21), sendo que esta última apresenta intensidade de

fluorescência visualmente indistinguível da obtida pelo controle negativo. Já com a fração G50 não foi detectada atividade enzimática sobre este substrato.

Este resultado corrobora o anterior no sentido que possivelmente as enzimas nativas de *P. pastoris* atuem sinergicamente com a endoglicanase recombinante. Nos ensaios das figuras 20 e 21, é possível observar que o padrão de degradação dos diversos substratos é mais pronunciado nas frações EB e UF50, em razão da presença de algumas proteínas nativas de *P. pastoris* com possível atividade sobre CMC (Lynd et al., 2002; Mattanovich et al., 2009), e talvez também sobre outros carboidratos. A fluorescência não detectada na amostra G50 parece indicar uma sutil ou inexistente atividade sobre oligossacarídeos. Entretanto, esse dado é controverso quando comparado com a fluorescência de EB, mais intensa que a observada no controle negativo. A diferença entre essas duas amostras (EB e controle negativo) pode dever-se à endoglicanase A recombinante, que só consegue atuar no substrato em questão quando em combinação com enzimas da hospedeira. O mesmo pode ser sugerido pela análise dos resultados apresentados por Siqueira (2004) e Rubini (2009), visto que em ambos trabalhos foi empregado o sobrenadante de cultura, equivalente à fração EB deste trabalho.

O melhor desempenho da endoglicanase A recombinante nas amostras EB e UF50 apontam para a importância do sinergismo e para a degradação incompleta de um substrato complexo empregando uma só enzima. Este dado reforça o objetivo de nosso grupo em elaborar misturas enzimáticas otimizadas para a degradação de substratos complexos, tendo em vista o aspecto sinérgico tão evidente na atividade de glicosil hidrolases.



**Figura 21:** Avaliação qualitativa da atividade das três frações da purificação no substrato MUC. A detecção de fluorescência sob luz UV indica um maior ou menor grau de hidrólise do substrato.

### E.6 Determinação de $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$

Por fim, foram determinados os valores de  $K_m$  e de  $V_{m\acute{a}x}$  para a enzima endoglicanase A recombinante. Foram utilizadas concentrações crescentes de CMC a

serem degradados nos ensaios de reação empregando a fração G50. Segundo o programa *EnziFitter* os parâmetros cinéticos de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para a endoglicanase A recombinante são, respectivamente:  $27,5 \pm 4,33$  mg/mL e  $1,185 \pm 0,11$   $\mu$ mol/min

Quando comparados a outros trabalhos, os aspectos cinéticos da EG A<sub>r</sub> indicam menor afinidade pelo substrato, o que tarda a saturação do sítio catalítico, possibilitando maiores valores de atividade quando se alcança a velocidade máxima.

Wonganu e colaboradores (2008) relataram que para a forma truncada da endoglicanase recombinante de *Syncephalastrum racemosum* houve um acréscimo no valor de  $K_m$  (25 e 19 mg/mL para as formas truncada e intacta da enzima, respectivamente). O incremento no valor de  $K_m$  após remoção de parte da estrutura protéica parece resultar do acoplamento dificultado do substrato no sítio catalítico, fato esse provavelmente favorecido pela proteína intacta. A forma truncada não apresenta justamente a região do CBM, cuja remoção pode ter sido responsável pela redução na afinidade sobre o substrato.

Desse modo, pode-se sugerir que a falta do CBM na estrutura da EG A<sub>r</sub> possa ser um dos fatores responsáveis pela sua afinidade pelo substrato relativamente baixa.

### Principais resultados

- Obtenção do cDNA *eglA* referente à endoglicanase A de *A. nidulans*;
- Construção de vetores para clonagem em *P. pastoris* (pHIL-D2/*eglA*<sub>1</sub> e pPIC9/*eglA*<sub>2</sub>);
- Transformação de *P. pastoris* e seleção do melhor clone produtor com atividade máxima a partir de 24 h de indução com metanol;
- Purificação parcial da endoglicanase A recombinante e análise do perfil eletroforético confirmando a massa molecular de 34 kDa, a atividade CMCásica da EG A<sub>r</sub> e a presença de enzimas próprias da hospedeira também com atividade CMCásica;
- Caracterização funcional da EG A<sub>r</sub>

**Tabela 9.** Principais resultados obtidos pela caracterização da endoglicanase A recombinante

Parâmetro	Característica
<b>pH</b>	4,5 a 5
<b>Temperatura</b>	40 a 50°C
<b>Termoestabilidade</b>	a 44 e 55°C: manutenção de 100% da atividade por 48 h; a 70°C: manutenção de 60% da atividade por 3 h
<b>Agentes interferentes</b>	incremento na atividade diante da incubação com Cu <sup>++</sup> (120%), Co <sup>++</sup> (132%), e DTT e β-mercaptoetanol provocaram aumento na atividade de 130% e 180%, respectivamente; Al <sup>3+</sup> gerou redução de 33% na atividade
<b>Atividades</b>	CMCásica e FPásica
<b>Atividade específica</b>	25 ± 4,0 UI/mg
<b>Parâmetros cinéticos</b>	Km = 27,5 ± 4,33 mg/mL e 1,185 ± 0,11 μmol/min

### Conclusão

A endoglicanase A de *A. nidulans* foi eficientemente expressa em sistema heterólogo, atingindo os valores máximos de atividade em cerca de 24 h de indução com metanol. A enzima recombinante, purificada por ultrafiltração com membrana PM 50 e gel filtração (Sephadex G50), apresentou maiores valores de atividade enzimática quando incubada de 40 a 60°C em pH ácido. A endoglicanase produzida mostrou-se termoestável, mantendo cerca de 100% de sua atividade após incubação a 45 e 55°C por 48 h, e quando da incubação a 70°C, manteve cerca de 60% da atividade enzimática. A atividade enzimática da EG A<sub>r</sub> foi cerca de 180% maior quando incubada com 18 mM de β-mercaptoetanol. As atividades detectadas para esta enzima foram sobre papel de filtro e CMC, apresentando atividade específica sobre este último substrato de 25 UI/mg e Km e V<sub>máx</sub> equivalentes a 27,5 ± 4,33 mg/mL e 1,185 ± 0,11 μmol/min, respectivamente.

A endoglicanase produzida em sistema heterólogo mostrou-se distinta da mesma enzima em sua forma nativa (Chikamatsu *et al.*, 1999) e o presente trabalho traz dados adicionais para uma caracterização mais completa. Tais características apontam para uma enzima com potencial biotecnológico promissor, sendo importante componente de misturas enzimáticas complexas a serem elaboradas posteriormente.

### *Perspectivas*

- Confirmação da integração do cDNA *egIA* no genoma da levedura, bem como Identificação do número de cópias inseridas;
- Otimização do processo de purificação da endoglicanase recombinante empregando etapas de precipitação e outras colunas cromatográficas, como cromatografia de afinidade ou de troca iônica, para possibilitar a obtenção de uma amostra mais pura;
- Elaboração de misturas enzimáticas empregando as celulases heterólogas já produzidas por nosso grupo (Oliveira, 2007; Benoliel *et al.*, 2009; Rubini *et al.*, 2010 *in press*) visando a degradação de substratos complexos. Sugere-se a realização de ensaios enzimáticos empregando a complementação do *pool* lignocelulolítico de *A. nidulans* com a enzima heteróloga produzida neste trabalho e/ou adição da EG A<sub>r</sub> a misturas enzimáticas de *T. reesei* gentilmente cedidas por colaboradores. O objetivo deste ensaio é avaliar a contribuição do sinergismo com enzimas de *T. reesei* na atividade da endoglicanase A recombinante.
- Uso de promotores alternativos na construção dos vetores (p. ex. promotor do gene *GAP*) visando a remoção do metanol para indução da produção da enzima recombinante.



---

*Referências  
bibliográficas*

---

- Araújo, J. A. Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris*. 2008. **Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular**, 2008, Universidade de Brasília.
- Aro N, Pakula T, Penttila M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol Rev.** 2005 Sep;29(4):719-39.
- Azevedo, MO; Felipe, MSS & Brígido, MM. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Universidade de Brasília, 2003.
- Bagga PS, Sandhu DK, Sharma S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **J Appl Bacteriol.** 1990 Jan;68(1):61-8.
- Bagga PS, Sharma S, Sandhu DK. Developmentally related changes in the production and expression of endo-beta-1,4-glucanases in *Aspergillus nidulans*. **Genome.** 1989 Apr;32(2):288-92.
- Bainbridge BW, Spreadbury CL, Scalise FG, Cohen J. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. **FEMS Microbiol Lett.** 1990 Jan 1;54(1-3):113-7.
- Balamurugan, V; Reddy & Suryanarayana, VVS. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines. **Indian Journal of Biotechnology.** 2007 (6):175-186.
- Banik SP, Pal S, Ghorai S, Chowdhury S, Khowala S. Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins. **Anal Biochem.** 2009 Mar 1;386(1):113-5.
- Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2006 Jul 25;103(30):11417-22.
- Benoliel, B, Poças-Fonseca, MJ, Torres, FAG & Moraes, LMP. Expression of a Glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in

- Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Biochem Biotechnol** 2009 160(7): 2036-44.
- Blum, H; Beier, H; & Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels **Electrophoresis** 1987(8): 93-9
- Bouzarelou D, Billini M, Roumelioti K, Sophianopoulou V. EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol.** 2008 Jun;45(6):839-50.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 1976 May 7;72:248-54.
- Camassola M, Dillon AJ. Effect of methylxanthines on production of cellulases by *Penicillium echinulatum*. **J Appl Microbiol.** 2007 Feb;102(2):478-85.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res.** 2009 Jan;37(Database issue):D233-8.
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol.** 2002 Aug;13(4):329-32.
- Cereghino GP, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Curr Opin Biotechnol.** 1999 Oct;10(5):422-7.
- Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev.** 2000 Jan;24(1):45-66.
- Chernoglazov VM, Jafarova AN, Klyosov AA. Continuous photometric determination of endo-1,4-beta-D-glucanase (cellulase) activity using 4-methylumbelliferyl-beta-D-cellobioside as a substrate. **Anal Biochem.** 1989 May 15;179(1):186-9.
- Chikamatsu G, Shirai K, Kato M, Kobayashi T, Tsukagoshi N. Structure and expression properties of the endo-beta-1,4-glucanase A gene from the

- filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett.** 1999 Jun 15;175(2):239-45.
- Choi CJ, Ju HJ, Park BH, Qin R, Jahng KY, Han DM, *et al.* Isolation and characterization of the *Aspergillus nidulans* *eglC* gene encoding a putative beta-1,3-endoglucanase. **Fungal Genet Biol.** 2005 Jul;42(7):590-600.
- Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **Int J Biol Sci.** 2009;5(6):578-95.
- Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. **Curr Opin Struct Biol.** 2005 Dec;15(6):637-45.
- de Paula, E. H.; Ramos, L. P. & Azevedo, M. O. The potencial of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology.** 1999 68: 35-41.
- de Vries RP, Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2001 Dec;65(4):497-522, table of contents.
- Demain AL. Biosolutions to the energy problem. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 2009 Mar;36(3):319-32.
- Elshafei AM, Hassan MM, Haroun BM, Abdel-Fatah OM, Atta HM, Othman AM. Purification and properties of an endoglucanase of *Aspergillus terreus* DSM 826. **J Basic Microbiol.** 2009 Oct;49(5):426-32.
- Elshafei AM, Hassan MM, Haroun BM, Abdel-Fatah OM, Atta HM, Othman AM. Purification and properties of an endoglucanase of *Aspergillus terreus* DSM 826. **J Basic Microbiol.** 2009 Oct;49(5):426-32.
- Endo Y, Yokoyama M, Morimoto M, Shirai K, Chikamatsu G, Kato N, *et al.* Novel promoter sequence required for inductive expression of the *Aspergillus nidulans* endoglucanase gene *eglA*. **Biosci Biotechnol Biochem.** 2008 Feb;72(2):312-20.

- Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'Hare M, Kammen DM. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**. 2006 Jan 27;311(5760):506-8.
- Frazzetto G. White biotechnology. **EMBO Rep**. 2003 Sep;4(9):835-7.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, *et al*. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**. 2005 Dec 22;438(7071):1105-15.
- Galdino AS, Ulhoa CJ, Moraes LM, Prates MV, Bloch C, Jr., Torres FA. Cloning, molecular characterization and heterologous expression of AMY1, an alpha-amylase gene from *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiol Lett**. 2008 Mar;280(2):189-94.
- Gao J, Weng H, Xi Y, Zhu D, Han S. Purification and characterization of a novel endo-beta-1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*. **Biotechnol Lett**. 2008 Feb;30(2):323-7.
- Garg SK, Neelakantan S. Studies on the properties of cellulase enzyme from *Aspergillus terreus* GN1. **Biotechnol Bioeng**. 1982 Mar;24(3):737-42.
- Goldemberg J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**. 2007 Feb 9;315(5813):808-10.
- Gray KA, Zhao L, Emptage M. Bioethanol. **Curr Opin Chem Biol**. 2006 Apr;10(2):141-6.
- Hall, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp**. 1999 (41):95-98.
- Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Liden G, Zacchi G. Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnol**. 2006 Dec;24(12):549-56.
- Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**. 1991 Dec 1;280 ( Pt 2):309-16.

- Herpoel-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Molle D, Lignon S, *et al.* Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnol Biofuels**. 2008;1(1):18.
- Higgins DR, Cregg JM. Introduction to *Pichia pastoris*. **Methods Mol Biol**. 1998;103:1-15.
- Hong J, Tamaki H, Yamamoto K, Kumagai H. Cloning of a gene encoding a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. **Biotechnol Lett**. 2003 Apr;25(8):657-61.
- Howarth, RW & Bringezu, S. Environment consequences & implications of changing land use. Proceedings of the Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) **International Biofuels Project Assessment**, 22-25 Sep 2008, Gummersbach, Alemanha. Cornell University, Ithaca, NY, EUA.
- Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res**. 1999 Sep;9(9):868-77.
- Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors SO. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. **Microb Cell Fact**. 2003 Jun 18;2(1):6.
- Juhasz T, Egyhazi A, Reczey K. beta-Glucosidase production by *Trichoderma reesei*. **Appl Biochem Biotechnol**. 2005 Spring;121-124:243-54.
- Karnchanatat, A; Petsom, A; Sangvanich, P; Piapukiew, J; Whalley, AS; Reynolds, CD; Gadd, GM & Sihanonth, P. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**. 2008 (42) 404–413
- Kleywegt GJ, Zou JY, Divne C, Davies GJ, Sinning I, Stahlberg J, *et al.* The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. **J Mol Biol**. 1997 Sep 26;272(3):383-97.

- Kubicek, CP. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1992 45:1-27.
- Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 2008 May;35(5):377-91.
- Leathers TD. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Res**. 2003 Apr;3(2):133-40.
- Leite, RCC; Leal, MLRV; Cortez, LAB; Griffin, WM & Scandiffio, MIG. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**. 2009 (34) 655–61.
- Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2006 Feb;69(6):627-42.
- Lynd. LR. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. **Annu. Rev. Energy Environ**. 1996 (21)403–65
- Lynd, LR, Weimer, PJ *et al*. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**. 2002 66(3): 506-77.
- Lo Leggio L, Larsen S. The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. **FEBS Lett**. 2002 Jul 17;523(1-3):103-8.
- Lockington RA, Rodbourn L, Barnett S, Carter CJ, Kelly JM. Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**. 2002 Nov;37(2):190-6.
- Lucas R, Robles A, Garcia MT, Alvarez De Cienfuegos G, Galvez A. Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. **J Agric Food Chem**. 2001 Jan;49(1):79-85.

- Mack M, Wannemacher M, Hobl B, Pietschmann P, Hock B. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. **Protein Expr Purif.** 2009 Aug;66(2):165-71.
- Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M, *et al.* Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. **Microb Cell Fact.** 2009;8:29.
- Miller, GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem.** 1959 31:426-428.
- Minamiguchi, K; Ooi, T; Kawaguchi, T; Okada, H; Murao, S & Arai, M. Secretive Expression of the *Aspergillus aculeatus* Cellulase (FI-CMCase) by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 1995 79 (4), 363-66.
- Moreira, J. R. Sugarcane and energy – recent results and progress in Brazil. **Energy for Sustainable Development.** 2009 4(3):43–54.
- Nazir, A.; Soni, R. ; Saini, H. S.; Manhas, R. K & Chadha, B. S. Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley *b*-glucan and xyloglucan. **World J Microbiol Biotechnol.** 2009 25:1189–1197
- Ohmiya Y, Takeda T, Nakamura S, Sakai F, Hayashi T. Purification and properties of wall-bound endo-1,4-beta-glucanase from suspension-cultured poplar cells. **Plant Cell Physiol.** 1995 Jun;36(4):607-14.
- Oliveira, G. Expressão heteróloga do gene de celobiohidrolase (*cbh1.2*) do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*. **Dissertação de Mestrado em Biologia**, 2007, Universidade Federal de Goiás.
- Qin Y, Wei X, Song X, Qu Y. Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum. **J Biotechnol.** 2008 Jun 1;135(2):190-5.



- Rauscher R, Wurleitner E, Wacenovsky C, Aro N, Stricker AR, Zeilinger S, *et al.* Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryot Cell**. 2006 Mar;5(3):447-56.
- Renewable Fuels Association. Industry Statics. <http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics/> Março, 2010.
- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**. 1992 Jun;8(6):423-88.
- Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T, Knowles JK, Jones TA. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Science**. 1990 Jul 27;249(4967):380-6.
- Rubini MR, Dillon AJ, Kyaw CM, Faria FP, Pocas-Fonseca MJ, Silva-Pereira I. Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulase gene. **J Appl Microbiol**. 2010 Aug 19.
- Ruth L. Bio or bust? The economic and ecological cost of biofuels. **EMBO Rep**. 2008 Feb;9(2):130-3.
- Saloheimo M, Kuja-Panula J, Ylosmaki E, Ward M, Penttila M. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta-glucosidase BGLII (*cel1A*). **Appl Environ Microbiol**. 2002 Sep;68(9):4546-53.
- Sambrook, J., Russel, D.W. **Molecular Cloning** – A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Edition. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv**. 2009 Mar-Apr;27(2):185-94.
- Sanchez OJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour Technol**. 2008 Sep;99(13):5270-95.
- Schubert C. Can biofuels finally take center stage? **Nat Biotechnol**. 2006 Jul;24(7):777-84.
- Seidl V, Gamauf C, Druzhinina IS, Seiboth B, Hartl L, Kubicek CP. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb

- (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. **BMC Genomics**. 2008;9:327.
- Sharma S, Sandhu DK, Bagga PS. Physical characterization of isozymes of endo-beta-1,4-glucanase and beta-1,4-glucosidase from *Aspergillus* species. **FEMS Microbiol Lett**. 1991 Mar 15;63(1):99-104.
- Siqueira, S. J. L Clonagem do cDNA da endoglicanase 2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular**, 2006, Universidade de Brasília
- Barry D. Solomon, B, Justin R. Barnes, JR & Halvorsen, KE. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. **Biomass and Bioenergy**. 2007 (31) 416–425
- Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008 Feb;78(2):211-20.
- Sul OJ, Kim JH, Park SJ, Son YJ, Park BR, Chung DK, *et al*. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2004 Nov;66(1):63-70.
- Sun X, Liu Z, Qu Y, Li X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. **Appl Biochem Biotechnol**. 2008 Mar;146(1-3):119-28.
- Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour Technol**. 2002 May;83(1):1-11.
- Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H, Uozumi T. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. **J Biochem**. 1999 Apr;125(4):728-36.
- Thongekkaew J, Ikeda H, Masaki K, Iefuji H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by

- high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif.** 2008 Aug;60(2):140-6.
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene.** 1997 Feb 20;186(1):37-44.
- Wheals AE, Basso LC, Alves DM, Amorim HV. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.** 1999 Dec;17(12):482-7.
- Withers SG, Aebersold R. Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. **Protein Sci.** 1995 Mar;4(3):361-72.
- Wonganu B, Pootanakit K, Boonyapakron K, Champreda V, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L. Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif.** 2008 Mar;58(1):78-86.
- Wyman CE. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends Biotechnol.** 2007 Apr;25(4):153-7.