



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Identificação e expressão heteróloga de proteínas acessórias do fungo *Thermomyces lanuginosus* em *Komagataella phaffii*

Luana Assis Serra

Brasília, 2019

LUANA ASSIS SERRA

Identificação e expressão heteróloga de proteínas acessórias do fungo *Thermomyces lanuginosus* em *Komagataella phaffii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília – UnB para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. João Ricardo M. De Almeida

Co-orientadora: Dra. Janice Lisboa de Marco

Brasília, 2019

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que esteve sempre ao meu lado durante todo o tempo dando força e coragem pra seguir em frente.

Agradeço a minha família muito querida e amada que não medem esforços pra me ajudar. Aos meu pais, Sônia e Ricardo, que sempre me deram apoio em todas as decisões da minha vida. Mãe, obrigada por toda amizade, pelo colinho de mãe sempre disponível, apoio, carinho e amor que a senhora me oferece. Pai, obrigada por todas as palavras de incentivo e ajuda nesta caminhada. Muita gratidão por ser filha de vocês, por me apoiarem e me ajudarem a realizar todos os meus sonhos, realmente não tenho palavras suficientes para agradecer! Aos meus irmãos, Patrícia e Igor, e ao meu sobrinho, Caio, que estão sempre comigo compartilhando amizade, amor e companheirismo. Meu muito obrigada a vocês! Obrigada à minha família que mora longe, principalmente meus avós, mas que estão sempre comigo. Em especial, minhas primas: Aline e Cris, que compartilham muitas risadas, amor e amizade comigo. Amo todos vocês, do fundo do meu coração.

Agradeço ao meu companheiro de todas as horas: Ricardo Pivetta, que me incentiva da melhor forma possível para que eu continue feliz mesmo quando as coisas estão difíceis. Muito obrigada por todo amor, companheirismo, amizade e incentivo “foca na bagaça”. Que venham muitos desafios e que a gente consiga superar todos eles juntos! Amo você.

Aos amigos que a vida me trouxe, especialmente a Pati e a Choc. Vocês são as melhores, muito obrigada pelo carinho, amizade e amor que compartilhamos durante muito tempo. Amor esse que só aumenta, ainda mais com a Lulu agora. Vocês sempre estiveram do meu lado e eu vou sempre estar ao lado de vocês! Quero agradecer as amigas que a biologia me trouxe: Ana, Nataly e Fernanda. O que dizer de vocês? Realmente não existem palavras pra definir meu amor, carinho e felicidade em compartilhar a vida com vocês. Muito obrigada, vocês são as melhores e eu amo cada uma de vocês! Muita saudade da nossa convivência diária e risadas, mas que apesar disso não deixaram de existir quando nos reunimos.

Aos meus amigos e colegas de bancada: Débora, Jéssica, Henrique, Bárbara, Carlos, Fernanda, Talita, Clara e Victor. Muito obrigada, vocês fizeram o meu dia a dia muito mais alegre e tornaram o trabalho muito mais divertido. Obrigada por todas as lamúrias de experimento que deram errado, piadas internas, happy hours e comemorações de quando os experimentos davam certo! Quero agradecer especialmente a Jessica, por toda a ajuda profissional e pessoal, sem você as coisas seriam mais difíceis. Vocês são maravilhosos! O

meu obrigada também ao pessoal da bancada ao lado. Obrigada Kelly por compartilhar todos os seus conhecimentos comigo. Quero agradecer em especial também a Jéssica G., que me ajudou, que riu comigo, chorou comigo e compartilhou dos melhores momentos naquele lab.

Aos meus orientadores, Janice e João, muito obrigada por todos os ensinamentos. Agradeço muito a paciência e dedicação de vocês. Muito obrigada de verdade, com vocês o meu enriquecimento não é apenas profissional, mas também pessoal. Tenho sorte de ter orientadores assim ao meu lado.

Quero agradecer a Embrapa-Agroenergia e Universidade de Brasília, que oferecem toda a estrutura e equipamentos pra que eu desenvolva meus experimentos. Estas instituições se tornaram minha segunda casa e sou muito grata por cada experiência vivida e pessoas que conheci nestes lugares.

A capes, pelo apoio financeiro.

“It’s a long way to the top if you wanna rock’n’roll.”

ACDC

RESUMO

A dependência por combustíveis fósseis tem fomentado o desenvolvimento de soluções alternativas baseadas em processos biotecnológicos para produção de energia e produtos químicos a partir de fontes renováveis. A biomassa lignocelulósica apresenta grande potencial para geração de biocombustíveis, por exemplo o etanol de segunda geração, e outros bioprodutos como ácidos orgânicos. As celulases, hemicelulases e proteínas com atividade auxiliar são essenciais no processo de liberação dos monômeros de açúcares da biomassa para posterior conversão em produtos de valor agregado. As expansinas, expansinas-like e mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) são exemplos de proteínas auxiliares que agem sinergicamente com enzimas lignocelulolíticas para a degradação dos componentes da biomassa. Sendo assim, visando a produção com alto rendimento e a redução de custos destas enzimas, a otimização de sistemas de expressão recombinantes em microrganismos é altamente desejada. Neste trabalho, a sequência de genes que codificam para duas LPMOs (*TLPMO1* e *TLPMO2*) e duas expansinas-like da família cerato plataninas (CP) (*TLEX2* e *TLEX3*) foram buscadas no genoma do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* para expressão heteróloga na levedura *Komagataella phaffii*. As sequências gênicas foram otimizadas e clonadas em vetor de expressão com fator- α de secreção (LPMO) e com fator de secreção nativo (expansina-like). Após a transformação genética de *K. phaffii*, os clones recombinantes foram cultivados em frascos Erlenmeyer e a expressão da proteína heteróloga foi avaliada pelas técnicas de SDS-PAGE e *Western-blot*. Dentre as expansinas-like, apenas a proteína TLEX2 foi detectada e se apresentou com tamanho próximo de 25 kDa. Apesar de clones recombinantes para TLPMO1 (sob controle do promotor GAP) terem sido obtidos, não houve detecção da proteína recombinante. A expressão de TLPMO1 e TLPMO2 foi então avaliada sob controle do promotor induzível AOX1. Colônias de *K. Phaffii* com *TLPMO1* e *TLPMO2* integrados foram obtidas e apenas a expressão da proteína recombinante TLPMO1 com tamanho aproximado de 55 kDa foi confirmada. As proteínas TLEX2 e TLPMO1 expressas foram purificadas por coluna de afinidade His-tag, alcançando a concentração máxima de proteína purificada de 0,017 mg/mL e 4,4 mg/mL, respectivamente. Ensaio de sinergismo com celulases foram realizados com TLEX2, porém a atividade da proteína não foi constatada. A atividade da TLPMO1 foi confirmada por ensaio amplex-RED, que permite a detecção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formado pela enzima. Por fim, as proteínas expansina-like e LPMO provenientes de *T. lanuginosus* são descritas pela primeira vez neste trabalho e apresentam grande potencial em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *Komagataella phaffii*, expressão heteróloga, proteínas acessórias, LPMO, expansina-like, cerato plataninas, fungo termofílico.

ABSTRACT

The dependence on fossil fuels has promoted the development of alternative solutions based on biotechnological processes for the production of energy and chemicals from renewable sources. Lignocellulosic biomass presents great potential for the generation of biofuels, for example second generation ethanol, and other bioproducts such as organic acids. Cellulases, hemicellulases and proteins with auxiliary activity are essential in the process of liberating the biomass sugar monomers for subsequent conversion into value-added products. The expansins, expansins-like and lytic polysaccharides monoxygenases (LPMOs) are examples of auxiliary proteins that act synergistically with lignocellulolytic enzymes for the degradation of biomass components. In that way, aiming the production with high yield and reduction of costs of these enzymes, the optimization of recombinant expression systems in microorganisms are highly desired. In this work, the sequence of encoding genes for two LPMOs (TLPMO1 and TLPMO2) and two expansins-like from the cerato platanin (CP) family (TLEX2 and TLEX3) were searched in the genome of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* for heterologous expression in the yeast *Komagataella phaffii*. The gene sequences were optimized and cloned into heterologous secretory factor (LPMO) and native secretory factor (expansin-like) expression vector. After the genetic transformation of *K. phaffii*, the recombinant clones were cultured in Erlenmeyer flasks and the expression of the heterologous protein was evaluated by SDS-PAGE and *Western-blot* techniques. Among the expansins-like, only the TLEX2 protein was detected and presented with an approximated size of 25 kDa. Although recombinant clones for TLPMO1 (under GAP promoter control) were obtained, there was no detection of the recombinant protein. The expression of TLPMO1 and TLPMO2 was then evaluated under control of the AOX1 inducible promoter. *K. Phaffii* colonies with integrated TLPMO1 and TLPMO2 were obtained and only the expression of recombinant TLPMO1 protein with approximate size of 55 kDa was confirmed. Expressed TLEX2 and TLPMO1 proteins were purified by His-tag affinity column, reaching the maximum protein concentration of 0.017 mg/mL and 4.4 mg/mL, respectively. Synergism tests with cellulases were performed with TLEX2, however the activity of the protein was not verified. The activity of TLPMO1 was confirmed by amplex-RED assay, which allows the detection of hydrogen peroxide (H₂O₂) formed by the enzyme. Finally, the proteins expansin-like and LPMO from *T. lanuginosus* are described for the first time in this work and present great potential for biotechnological applications.

Key words: *Komagataella phaffii*, heterologous expression, accessory proteins, LPMO, expansin-like, cerato platanin, thermophilic fungus.

LISTA DE ABREVIações

- AA9:** família 9 de enzimas com atividade auxiliar
- AOX:** proteína álcool oxidase
- AOX1:** gene que codifica para álcool oxidase 1
- AOX2:** gene que codifica para álcool oxidase 2
- APS:** persulfato de amônio
- BCH:** bagaço de cana hidrolisado
- BCIP:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
- BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*
- BMGY:** Buffered Glycerol-complex Medium
- BMMY:** Buffered Methanol-complex Medium
- BSA:** proteína albumina do soro bovino
- CAZy:** *carbohydrate active enzymes* (enzimas ativas em carboidrato)
- CBH:** celobiohidrolase
- CBM:** módulo de ligação ao carboidrato
- CDH:** celobiose desidrogenase
- CMC:** carboximetilcelulose
- CP:** Cerato platanina
- DNA:** ácido deoxirribonucleico
- dNTP:** deoxirribonucleotídeo
- EG:** endoglicanase
- GAP:** gliceraldeído-3-fosfato
- GH:** *glycoside hydrolases* (hidrolases de glicosídeos)
- His:** histidina
- HIS4:** gene que codifica para a histidinol desidrogenase
- kDa:** quiloDaltons
- LB:** luria-bertani
- LPMO:** mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre
- MM:** marcador molecular
- NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*
- NBI:** *Nitro-blue-tetrazolium*
- DO₆₀₀:** densidade óptica a 600 nm

p/v: peso por volume

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

pb: pares de base

PCR: reação de polimerização em cadeia

PI: Ponto isoelétrico

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecilsulfato de sódio

SB: borato de sódio

TCA: ácido tricloroacético

TEF1: fator 1 de alongamento da transcrição

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

TLEX2: Expansina-like proveniente do fungo *Thermomyces lanuginosus*

TLEX3: Expansina-like proveniente do fungo *Thermomyces lanuginosus*

TLPMO1: mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre provenientes do fungo *Thermomyces lanuginosus*

TLPMO2: mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre provenientes do fungo *Thermomyces lanuginosus*

v/v: volume por volume

YGT: meio *yeast extract glycerol tryptone*

YPD: meio *yeast extract peptone dextrose*

YPDS: meio *yeast extract peptone dextrose sorbitol*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Consumo de energia renovável em 2017 e projeção para 2023.....	2
Figura 2- Diferentes fontes de biomassa existentes.....	2
Figura 3- Organização da estrutura da parede celular de plantas.....	3
Figura 4- Organização da estrutura das fibras de celulose.....	4
Figura 5- Principais açúcares constituintes de hemiceluloses.....	4
Figura 6- Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	5
Figura 7- Hidrólise da celulose através de enzimas celulolíticas e enzimas acessórias.....	7
Figura 8- Mecanismo de ação da enzima LPMO.....	10
Figura 9- Mecanismo de oxidação por LPMO do carbono C1 e C4.....	10
Figura 10- Estrutura terciária de uma LPMO da família AA9 de <i>P. chrysosporium</i>	11
Figura 11- Estrutura tridimensional de uma cerato platanina de <i>Ceratocystis platani</i>	12
Figura 12- Visão geral sobre a expressão heteróloga em <i>K. phaffii</i>	17
Figura 13- Vetor de expressão pGAPZ α A, B, C.....	28
Figura 14- Vetor de expressão pGAPZ A, B, C.....	29
Figura 15- Vetor de expressão pPICZ α A, B, C.....	30
Figura 16- Domínios conservados das proteínas TLPMO1 e TLPMO2.....	51
Figura 17- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLPMO1.....	52
Figura 18- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLPMO2.....	52
Figura 19- Árvore filogenética das proteínas TLPMO1 e TLPMO2.....	53
Figura 20- Domínios conservados das proteínas TLEX2 e TLEX3.....	54
Figura 21- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLEX2.....	54

Figura 22- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLEX3.....	55
Figura 23- Árvore filogenética com as proteínas TLEX2 e TLEX3.....	55
Figura 24- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial obtido de colônias transformadas de bactérias.....	56
Figura 25- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial linearizado com enzima de restrição.....	57
Figura 26- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de DNA amplificado por PCR para verificação da inserção do gene de interesse no genoma da levedura.....	58
Figura 27- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX2) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em YPD.....	60
Figura 28- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX3) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em YPD.....	61
Figura 29- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX2) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em BMGY.....	62
Figura 30- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX3) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em BMGY.....	62
Figura 31- Análise da expressão da proteína recombinante expansina (TLEX 2) purificada produzida a partir da colônia 2 em BMGY.....	64
Figura 32- Cromatograma da proteína TLEX2-C2.....	65
Figura 33- Controle negativo (BSA) e TLEX2.....	67
Figura 34- Substrato tratado com Celluloclast sob diferentes concentrações contendo TLEX2 e BSA.....	69
Figura 35- Substrato tratado com enzimas de <i>Aspergillus</i> contendo TLEX2 e BSA.....	70
Figura 36- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 por SDS-PAGE a partir das colônias 3 e 4 confirmadas por PCR e corado com Comassie-Blue.....	71

Figura 37- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 por SDS-PAGE a partir das colônias 3 e 4 confirmadas por PCR e corado com Nitrato de Prata.....	72
Figura 38- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de gene de TLPMO1, TLPMO2 e vetor pPICZ α A digeridos por XbaI e ecoRI.....	73
Figura 39- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% para confirmar a ligação dos fragmentos digeridos dos genes de TLPMO1 e TLPMO2 no vetor pPICZ α A.....	74
Figura 40- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% para confirmar a linearização dos genes de TLPMO1 e TLPMO2 no vetor pPICZ α A.....	75
Figura 41- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de DNA amplificados das colônias de TLPMO1 por PCR para verificação da inserção do gene de interesse no genoma da levedura.....	76
Figura 42- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de DNA amplificados das colônias de TLPMO2 por PCR para verificação da inserção do gene de interesse no genoma da levedura.....	77
Figura 43- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 a partir das colônias 4, 8, 11 e 13 confirmadas por PCR e cultivadas em BMMY.....	78
Figura 44- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 a partir das colônias 14, 15, 16 e 17 confirmadas por PCR e cultivadas em BMMY.....	79
Figura 45- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 purificada e cultivada a partir da colônia 8 em BMMY.....	80
Figura 46- Cromatograma da proteína TLPMO1 C8.....	81
Figura 47- Resultados do ensaio de atividade amplex-RED com TLPMO1 purificada.....	84
Figura 48- Replicata do ensaio amplex-RED com TLPMO1 C8 purificada.....	85
Figura 49- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO2 cultivada em BMMY a partir das colônias 11 e 17 confirmadas por PCR.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de expressão.....	15
Tabela 2- Componentes da digestão do DNA plasmidial por EcoRI e XbaI.....	32
Tabela 3- Componentes da digestão do DNA plasmidial por EcoRI e XbaI.....	34
Tabela 4- Componentes da reação para a desfosforilação do vetor digerido pPICZ α A.....	35
Tabela 5- Reação de ligação (T4 ligase) com o vetor pPICZ α A e o fragmento de gene TLPMO1.....	36
Tabela 6- Reação de ligação (T4 ligase) com o vetor pPICZ α A e o fragmento de gene TLPMO2.....	36
Tabela 7- Oligonucleotídeos (pGAP e 3' AOX1) utilizados para a confirmação do inserto por PCR.....	39
Tabela 8- Oligonucleotídeos (5' AOX1 e 3' AOX1) utilizados para a confirmação do inserto por PCR.....	39
Tabela 9- Concentrações utilizadas de celluclast, <i>Aspergillus</i> , expansina-like e BSA para o ensaio de sinergismo.....	48
Tabela 10- Expressão de expansinas e expansinas-like provenientes de plantas, bactérias e fungos.....	67
Tabela 11- LPMOs fúngicas recombinantes sob o controle do promotor AOX1.....	83

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biomassa como fonte de energia	1
1.1.1 Estrutura da biomassa lignocelulósica	3
1.1.2 Hidrólise da biomassa: conversão de açúcares em biocombustíveis e bioprodutos	5
1.2 Enzimas lignocelulolíticas	6
1.2.1 Proteínas com atividade acessória	8
1.2.1.1 Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos - LPMOs	8
1.2.1.2 Expansinas e expansinas-like	11
1.3 Fungos produtores de expansinas-like e LPMOs	13
1.3.1 <i>Thermomyces lanuginosus</i>	14
1.4 Produção de proteínas heterólogas por <i>Komagataella phaffii</i>	14
1.4.1 Vetores de expressão	17
1.4.2 Promotores	18
1.5 LPMOs, expansinas e expansinas-like produzidas por <i>Komagataella phaffii</i>	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Meios de Cultura	23
4.1.1 Meios de cultura utilizados para <i>E. coli</i>	23
4.1.1.1 Meio LB - Luria-Bertani low salt	23
4.1.1.2 Meio YGT	23
4.1.2 Meios de cultura utilizados para <i>K. phaffii</i>	23
4.1.2.1 Meio YNB - Yeast Nitrogen Base (10X)	23
4.1.2.2 Meio YPD - Yeast Extract Peptone Dextrose	24
4.1.2.3 Meio YPDS - Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol	24
4.1.2.4 Meio BMGY – Buffered Glycerol-complex Medium	24
4.1.2.5 Meio BMMY – Buffered Methanol-complex Medium	24
4.2 Soluções e tampões	25
4.2.1 Tampão Citrato de sódio/ácido cítrico 100 mM pH 5	25
4.2.2 Tampão Cloreto de sódio 500 mM/Fosfato de sódio 20 mM	25
4.2.3 Tampão Cloreto de sódio 500 mM/Fosfato de sódio 20 mM, imidazol a 500 mM	25
4.2.4 Tampão fosfato de potássio 1M	26
4.2.5 Biotina 500X	26

4.3	Microrganismos utilizados.....	26
4.3.1	<i>Escherichia coli</i>	26
4.3.2	<i>Komagataella phaffii</i>	26
4.4	Obtenção das sequências das proteínas de interesse	26
4.4.1	Construção da árvore filogenética	27
4.5	Plasmídeos	27
4.5.1	pGAPZ α A e pGAPZB.....	27
4.5.2	pPICZ α A.....	29
4.6	Transformação de bactérias por eletroporação	30
4.6.1	Preparo de células eletrocompetentes	30
4.6.2	Transformação por eletroporação	31
4.7	Extração de DNA plasmidial	31
4.7.1	Obtenção de DNA plasmidial purificado - Mini preparação	31
4.7.2	Obtenção de DNA plasmidial purificado - Midi preparação	31
4.8	Análises de restrição de DNA plasmidial.....	32
4.8.1	Restrição plasmidial para confirmação dos fragmentos – EcoRI e XbaI	32
4.8.2	Linearização dos plasmídeos com as enzimas BspHI e PmeI.....	33
4.9	Clonagem das LPMOs em vetor pPICZ α A.....	34
4.9.1	Digestão dos fragmentos dos genes de interesse e vetor pPICZ α A.....	34
4.9.2	Purificação dos fragmentos de gene e vetor pPICZ α A em gel de agarose.....	35
4.9.3	Ligação dos fragmentos de gene no vetor pPICZ α A.....	35
4.9.4	Confirmação da ligação dos fragmentos de gene no vetor pPICZ α A.....	36
4.10	Transformação de levedura - <i>Komagataella phaffii</i>	37
4.11	Verificação por PCR da inserção do plasmídeo no genoma da levedura.....	38
4.12	Expressão da proteína recombinante em <i>K. phaffii</i>	39
4.12.1	Expressão das proteínas recombinantes em meio YPD	39
4.12.2	Expressão das proteínas recombinantes em meio BMGY	40
4.12.3	Expressão das proteínas recombinantes em meio BMMY.....	40
4.13	Quantificação de proteína total	41
4.14	Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE.....	41
4.14.1	Coloração de gel com Comassie Brilliant Blue G250	42
4.14.2	Coloração com Nitrato de Prata.....	43
4.15	Análise da expressão por Western-Blot.....	43
4.16	Purificação de proteínas recombinantes	45
4.17	Testes de atividade enzimática.....	46
4.17.1	Ensaio de atividade com a proteína recombinante LPMO	46
4.17.2	Ensaio de sinergismo com a proteína recombinante expansina-like.....	46

4.18 Ferramentas de bioinformática.....	49
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Sequências gênicas putativas de proteínas acessórias.....	50
5.1.1 Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (LPMOs).....	50
5.1.2 Expansinas-like da família Cerato platanina.....	53
5.2 Expressão de proteínas recombinantes em <i>K. phaffii</i>	55
5.2.1 Transformação genética de bactérias.....	55
5.2.2 Transformação genética de <i>K. phaffii</i>	57
5.3 Análise dos transformantes.....	58
5.3.1 Confirmação da inserção do vetor de expressão por PCR.....	58
5.4 Expressão da proteína recombinante: expansina (TLEX2 e TLEX3).....	59
5.4.1 Expressão das colônias positivas de TLEX2 e TLEX3 em meio YPD.....	59
5.4.2 Expressão das colônias positivas de TLEX2 e TLEX3 em meio BMGY.....	61
5.4.3 Purificação da proteína recombinante TLEX2-C2.....	63
5.4.4 Ensaio de sinergismo com celulases e expansina-like TLEX2C2.....	67
5.5 Expressão da proteína recombinante: LPMO (TLPMO1 e TLPMO2).....	70
5.5.1 Avaliação da expressão de TLPMO1 sob controle do promotor pGAP.....	70
5.5.2 Expressão de TLPMO1 e TLPMO2 clonadas no vetor pPICZ α A.....	72
5.5.2.1 Clonagem dos genes no vetor pPICZ α A.....	72
5.5.2.2 Obtenção de transformantes de <i>K. phaffii</i> com TLPMO 1 e 2.....	75
5.5.2.3 Expressão da proteína TLPMO1.....	77
5.5.2.4 Purificação de TLPMO1.....	79
5.5.2.5 Ensaio de atividade – Amplex RED.....	83
5.5.2.6 Expressão de TLPMO2.....	86
6. CONCLUSÃO.....	87
7. PERSPECTIVAS.....	88
8. REFERÊNCIAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa como fonte de energia

Os combustíveis fósseis, como carvão, gás e petróleo, são considerados fontes de energia não renováveis, pois não são capazes de se formar em um curto período de tempo. Durante o século XX, estas fontes foram extensivamente utilizadas para geração de energia e produtos químicos. Devido ao uso excessivo, a emissão de gás carbônico (CO₂) levou à alterações climáticas e poluição ambiental. Os recursos petroquímicos são finitos e devido ao aumento de demanda energética estão cada vez mais caros, gerando um aumento de preços em setores essenciais em todo o mundo. Levando em consideração os fatores ambientais e também econômicos, a busca por alternativas de energia limpa e sustentável tem sido bastante discutida no mundo atual. Diversos estudos estão investigando soluções baseadas em processos biotecnológicos renováveis e sustentáveis para a produção de energia em alternativa aos combustíveis fósseis (FATMA et al, 2018).

De acordo com a agência internacional de energia (*International Energy Agency – IEA*), foram realizadas análises demonstrando tendências e desenvolvimento globais em energia sustentável (hidroelétrica, solar, eólica, bioenergia e outros). Sendo assim, a participação das energias renováveis em resposta à uma demanda mundial foi prevista para o crescimento de um quinto nos próximos cinco anos, atingindo 12,4% em 2023. Dentre os países apresentados na Figura 1, o Brasil de acordo com a projeção, é o país que mais consumirá energia renovável chegando aproximadamente a 45% do consumo total em 2023. Devido a políticas de redução na emissão de gases que contribuem para o aquecimento global, a União Europeia, China e Índia também aumentarão o consumo de energia renovável até 2023. Como pode ser visto, a bioenergia que é a energia contida na biomassa de plantas, tem participação importante nas diferentes matrizes energéticas (Figura 1) e ainda apresenta grande potencial para utilização em diversos setores como eletricidade e transporte (BIROL, 2018).

A biomassa pode ser proveniente de diferentes fontes como por exemplo: resíduos da agricultura e agroindústria, lixo orgânico (restos de alimentos) e resíduos florestais (madeira) (Figura 2). Estes resíduos têm sido apontados como uma fonte alternativa para produção de biocombustíveis e biocompostos, como por exemplo: ácidos orgânicos. O bagaço da cana de açúcar, a palha de arroz e trigo são fontes de energia baratas e não competem com a produção de alimentos. Sendo assim, o interesse pela biomassa é também motivado pelo fato de

reduzirem a necessidade de ampliar as áreas de cultivo, diminuindo a emissão de gases que contribuem para o aquecimento global (BRETHAUER; STUDER, 2015). Neste contexto, o conceito de biorrefinarias pode ser introduzido pois é baseado na integração de processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos. A utilização da biomassa lignocelulósica tem sido amplamente avaliada, e assim, apontada como forma de viabilizar economicamente a cadeia produtiva de biocombustíveis, valorar resíduos e coprodutos e reduzir a eliminação de resíduos industriais (PAES; ALMEIDA, 2014).

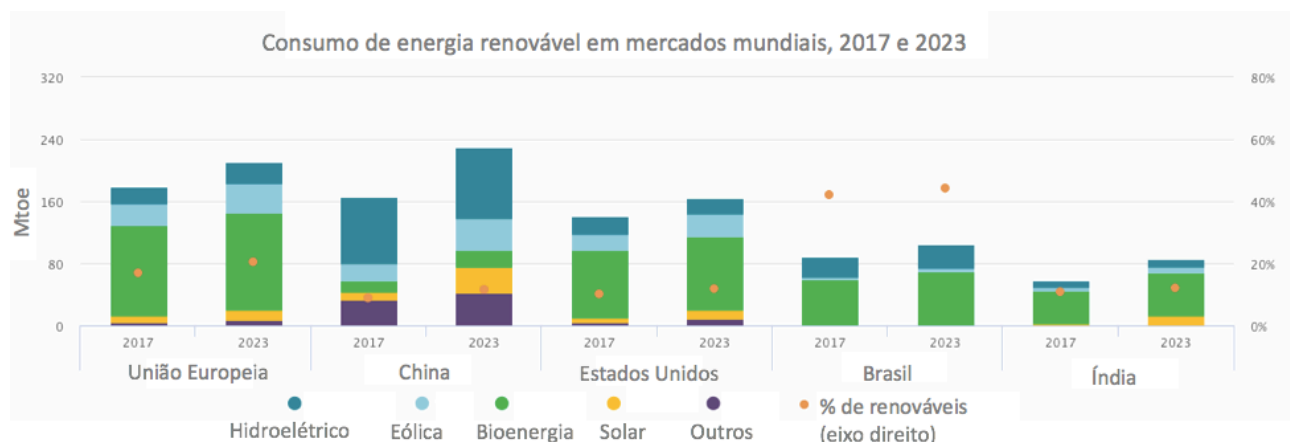


Figura 1- Consumo de energia renovável em 2017 e projeção para 2023. Consumo de energia: hidroelétrica, eólica, bioenergia, solar e outros dos mercados mundiais. A unidade do eixo y significa tonelada de óleo equivalente, do inglês *tonne of oil equivalent* (toe). Esta é uma unidade de medida de energia definida como “quantidade de energia liberada pela queima de uma tonelada de petróleo bruto”. Fonte: Birol, *International Energy Agency* (IEA), 2018.



Figura 2- Diferentes fontes de biomassa existentes. Estes são alguns exemplos de biomassa que podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis e bioprodutos. Fonte: autora.

1.1.1 Estrutura da biomassa lignocelulósica

A lignocelulose é um material complexo que faz parte da parede celular de plantas, que é constituída principalmente por celulose (40-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-20%), nas quais estas proporções podem variar dependendo da espécie de planta. Ainda, podem conter pequenas quantidades de pectina, compostos inorgânicos e outros componentes. Nesta organização, a celulose é revestida pela hemicelulose formando uma rede aberta, na qual os espaços são preenchidos por lignina (Figura 3) (LEE et al, 2014).

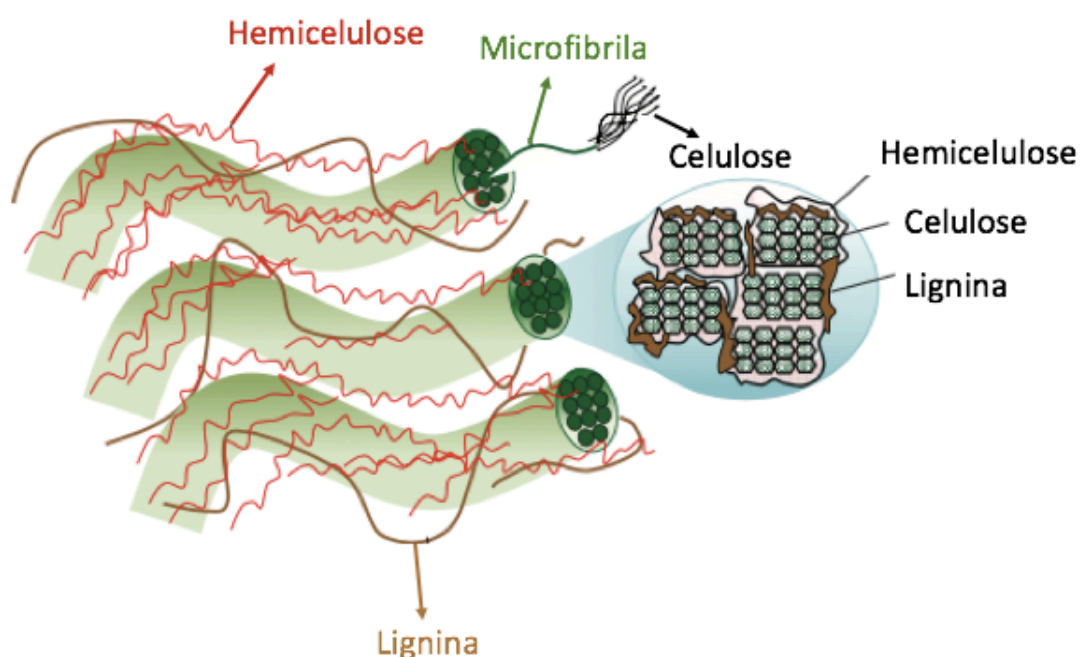


Figura 3- Organização da estrutura da parede celular de plantas. Componentes da biomassa lignocelulósica e secção transversal da microfibrila de celulose incorporadas em uma matriz de hemicelulose e lignina. Adaptado de Lee et al, 2014.

A celulose é o componente mais abundante da parede celular, sendo um polímero linear e homogêneo composto por unidades de glicose ligadas umas às outras por ligações glicosídicas β -1,4. Em sua forma cristalina, a celulose é formada por cadeias que interagem entre si por pontes de hidrogênio formando estruturas altamente insolúveis e organizadas denominadas microfibrilas. Em adição à região cristalina, a celulose contém regiões amorfas em que o grau de compactação é menor (Figura 4) (DE SOUZA, 2013).

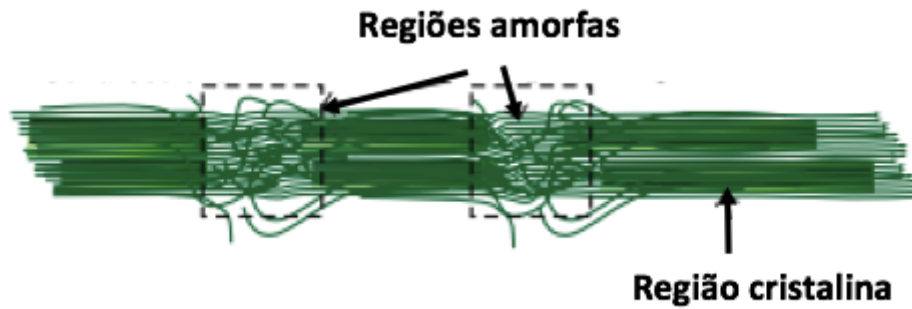


Figura 4- Organização da estrutura das fibras de celulose. As fibras são organizadas em regiões cristalinas e amorfas. Adaptado de Lee et al, 2014.

A hemicelulose é um polissacarídeo heterogêneo composto por diferentes unidades de açúcares e é considerado o segundo componente mais abundante da parede celular. Este heteropolímero é classificado de acordo com a maioria dos resíduos de açúcares presentes em sua cadeia, que podem ser tanto pentoses (C5 - xilose e arabinose), como hexoses (C6 - glicose, manose e galactose) (Figura 5) (BRANDT et al, 2013). Além disso, a composição da cadeia principal depende também da origem da matéria prima. As duas mais abundantes e representativas hemiceluloses são as cadeias de hetero xilanas 1,4-β-D-xilanas e hetero mananas com cadeias 1,4-β-D-mananas. As xilanas são os principais constituintes em madeiras duras e gramíneas, enquanto as mananas estão presentes em madeiras macias e em estruturas especializadas das plantas como sementes e frutas. Adicionalmente, as cadeias de hemicelulose podem ser ramificadas contendo grupos laterais como metil, acetil, feruloil e também ácidos orgânicos como galacturônico e p-cumárico (CHAUHAN et al., 2012; DE SOUZA, 2013).

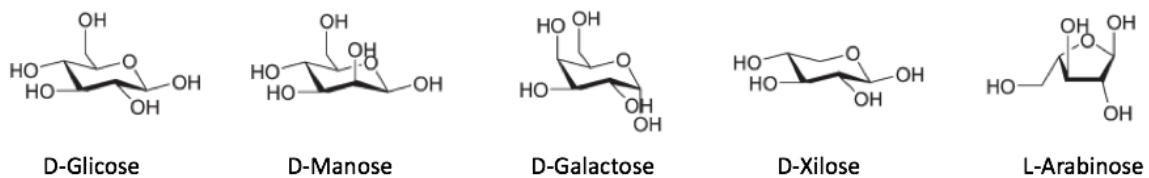


Figura 5- Principais açúcares constituintes de hemiceluloses. Os açúcares, pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose) podem ser encontrados na hemicelulose. Adaptado de Brandt et al, 2013.

A lignina é uma macromolécula bastante insolúvel, composto por unidades de fenilpropanóides. As suas cadeias são formadas por três monômeros que são unidos por ligações covalentes, são eles os álcoois p-cumárico, guaiacílico e sinapílico. Entre as suas

características estão a impermeabilidade e reforço estrutural à parede celular de plantas. A sua concentração também é variável em diferentes matérias primas, como exemplo a madeira macia possui uma maior quantidade de lignina quando comparada a outros tipos de biomassa (DE SOUZA, 2013).

A interação entre os componentes da biomassa lignocelulósica proporciona uma alta complexidade e estabilidade estrutural da parede celular das plantas, garantindo a resistência natural contra a atividade microbiana e a desconstrução enzimática. Esta resistência natural é referida como a recalcitrância da biomassa (BRETHAUER; STUDER, 2015).

1.1.2 Hidrólise da biomassa: conversão de açúcares em biocombustíveis e bioprodutos

Para a produção de biocombustíveis e bioprodutos, a biomassa lignocelulósica deve ser pré-tratada para que ocorra o afrouxamento da celulose, hemicelulose e lignina (Figura 6). Um fracionamento ideal da biomassa deve evitar a ruptura da estrutura ou perda de celulose, hemicelulose e lignina, ser economicamente viável e minimizar a produção de resíduos tóxicos. Atualmente existem diversos tipos de pré-tratamento: o físico (moagem); químico (ácidos e bases), físico-químico (explosão a vapor) e biológico (microrganismos e enzimas). Esta etapa é muito importante pois reduz a recalcitrância da biomassa lignocelulósica permitindo o acesso das enzimas responsáveis pela liberação dos açúcares durante a hidrólise (AREVALO-GALLEGOS et al., 2017).

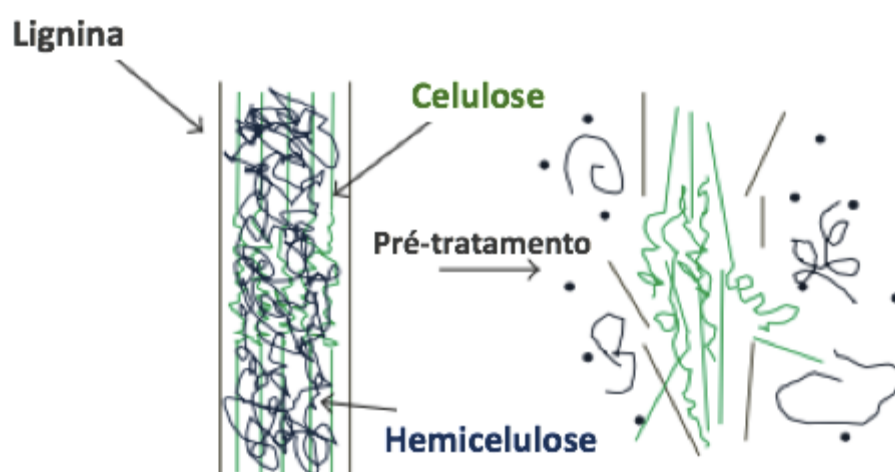


Figura 6- Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Desestruturação da biomassa lignocelulósica através do pré-tratamento liberando a celulose, hemicelulose e lignina. Adaptado de Lee et al 2014.

Após o pré-tratamento, o processo de hidrólise é responsável pela quebra dos carboidratos complexos da biomassa em açúcares monoméricos. A hidrólise pode ser realizada através de processo biológico (enzimático) ou físico-químico (tratamento com ácidos e bases em diferentes temperaturas, por exemplo). Contudo, a hidrólise enzimática apresenta certas vantagens em relação a química: não gera inibidores para a etapa de fermentação, utiliza baixo consumo de energia e condições de reação simples e favoráveis ao meio ambiente (MAITAN-ALFENAS et al, 2015). Coquetéis enzimáticos contendo diferentes classes de enzimas (como celulasas e hemicelulasas), em combinação com proteínas que possuem atividade acessória (expansinas e mono-oxigenases líticas de polissacarídeos - LPMOs) podem ser desenvolvidos para a desconstrução sinérgica dos componentes da biomassa lignocelulósica (SILVA et al, 2017).

A galactose, manose, glicose, xilose e arabinose são exemplos de açúcares liberados a partir da hidrólise da biomassa que podem ser utilizados como produto final ou matéria prima para fermentação e produção de biocombustíveis, como o etanol e metanol, e outros compostos químicos como ácidos orgânicos. No Brasil, duas empresas (Raizen e GranBio) já vêm aplicando a hidrólise enzimática da lignocelulose para liberação de monômeros de açúcares para emprego na produção de bioetanol (etanol 2G) (SILVA et al, 2017).

1.2 Enzimas lignocelulolíticas

A identificação e caracterização de enzimas capazes de romper as ligações presentes na biomassa lignocelulósica é de grande interesse. No conceito clássico, para a hidrólise da celulose são essenciais o sinergismo de 3 classes de enzimas: celobiohidrolases (exoglucanases), endoglucanases e β -glucosidase. As fibras de celulose são primeiramente clivadas pelas endoglucanases nas porções internas e amorfas, liberando fragmentos menores com extremidades redutoras e não redutoras. Então, estes fragmentos são atacados pelas extremidades pela celobiohidrolase gerando oligossacarídeos (celobiose) que são substratos para a β -glucosidase. A ação desta enzima cliva a celobiose (dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose) e por fim, libera os resíduos de glicose que compunham a celulose (MAITAN-ALFENAS et al, 2015). Atualmente, diversos estudos como revisado no trabalho de Horn e colaboradores (2012) demonstraram a ação de enzimas oxidativas (como LPMOs) capazes de degradar a celulose em conjunto com celulasas.

As enzimas capazes de clivar as ligações glicosídicas entre carboidratos ou entre grupamentos de carboidratos e não carboidratos estão classificadas no grupo de hidrolases

glicosídicas, do inglês *glycoside hydrolases* (GH). Estas proteínas estão agrupadas com base em sua similaridade na sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos e também em suas características estruturais. O banco de dados CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*) utiliza este sistema de classificação que foi proposto por Henrissat e Davies (1997) e são divididas em 149 famílias. Neste banco de dados, também estão classificados módulos não catalíticos denominados de módulos de ligação ao carboidrato (CBM) que auxiliam na ligação da enzima ao substrato e compõem a estrutura de muitas enzimas GH. Além destas, o CAZy ainda possui classificação para famílias de esterases de carboidratos (do inglês *carbohydrate esterases*, CE) e liases de polissacarídeos (do inglês *polysaccharide lyases*, PL) (HENRISSAT; DAVIES, 1997).

De acordo com a classificação do CAZy, existe uma classe denominada *auxiliary activity* (AA) do inglês, que agrupa proteínas com atividade auxiliar. Esta é dividida em 15 famílias, dentre as quais seis são de LPMOs: AA9, AA10, AA11, AA13, AA14 e AA15. Estas exercem um papel essencial na desconstrução da biomassa, pois possuem uma ação sinérgica com as GHs aumentando a quantidade de açúcar liberado. Assim, a atividade hidrolítica de enzimas como a endoglucanase e celobiohidrolases, aumentam na presença de enzimas acessórias como LPMOs, pois estas liberam novos pontos de acesso na superfície do substrato para ação das GHs, através de seu mecanismo oxidativo. (Figura 7) (HORN et al, 2012).

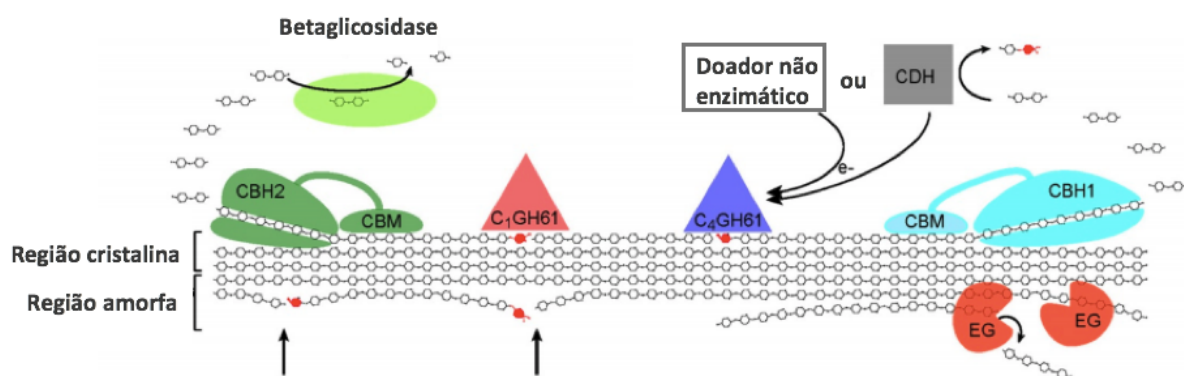


Figura 7- Hidrólise da celulose através de enzimas celulolíticas e enzimas acessórias. As endoglucanases (EG) agem na região interna e amorfa da celulose enquanto que as celobiohidrolases (CBH) possuem um mecanismo de ação pelas extremidades. Estas enzimas podem ter um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) que facilitam a ligação ao substrato. As enzimas auxiliares da família GH61 (reclassificadas para a família AA9) são LPMOs e possuem um mecanismo de ação oxidativo, onde o doador de elétrons pode ser não enzimático ou enzimático (CDH-celobiose desidrogenase). Os círculos vermelhos representam os açúcares oxidados e as setas indicam novos pontos de ataque para as CBHs e uma possível consequência da ação das LPMOs. Adaptado de Horn et al 2012.

Além destas, existem proteínas que possuem atividade disruptiva não-hidrolítica mas que são capazes de afrouxar a parede celular de plantas e que podem possivelmente facilitar a etapa de hidrólise enzimática. Estas proteínas são conhecidas como expansinas ou expansinas-like que podem exibir sinergismo com outras classes de enzima para a degradação da celulose (COSGROVE, 2017).

Por ser uma estrutura quimicamente mais complexa, a hidrólise da porção hemicelulósica da biomassa requer diferentes tipos de enzimas para sua degradação. Xilanases e β -mananases são responsáveis pela hidrólise de diferentes açúcares presentes na hemicelulose, dentre outras enzimas capazes de degradar esta porção da parede celular de plantas. As atividades destas GHs podem ainda ser aumentadas em sinergia com outros tipos de enzimas, como a feruloil esterase (FE) importante proteína que age sinergicamente com enzimas hemicelulolíticas facilitando o seu acesso a biomassa (MAITAN-ALFENAS et al, 2015). Assim como a FE, existem outras proteínas que exercem atividade auxiliar na degradação da hemicelulose conforme revisado no trabalho de Souza (2013).

1.2.1 Proteínas com atividade acessória

1.2.1.1 Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos - LPMOs

As LPMOs são metaloenzimas que agem na despolimerização oxidativa do polissacarídeo juntamente com o oxigênio molecular e um doador de elétrons, o qual pode ser enzimático ou não. As LPMOs podem ser provenientes de diferentes organismos, como por exemplo bactérias, fungos e até mesmo insetos (SABBADIN et al, 2018). A identificação destas têm atraído bastante atenção nos últimos anos, devido ao seu potencial de aplicação em biorefinarias para conversão da biomassa lignocelulósica. A diversidade das sequências gênicas de LPMOs secretadas por fungos demonstram as especificidades de substratos polissacarídicos distintos destas enzimas. A atividade de LPMOs foi demonstrada em variados substratos, como por exemplo: celulose, quitina, xilana e manana (SIMMONS et al, 2018). A família AA9 agrupa um diverso número de LPMOs fúngicas, as quais eram anteriormente classificadas como GH61. A família GH61 era caracterizada por sua baixa atividade de endoglucanase e seu mecanismo ainda era pouco conhecido. Somente era de conhecimento que as proteínas GH61 tinham a capacidade de aumentar a atividade de celulases e necessitavam de íons divalentes para permitir sua atuação (MONCLARO; FILHO, 2017).

O mecanismo de ação das LPMOs não foi completamente elucidado, mas modelos foram propostos em 2014 por Kjaergaard et al e Kim et al. Este modelo propõe a ligação de oxigênio (O₂) e a redução do complexo LPMO-Cu(II) para LPMO-Cu(I), formando um intermediário entre o oxigênio e o cobre (Figura 8). Este abstrai um átomo de hidrogênio do substrato e adiciona um grupamento hidroxila por um mecanismo conhecido como recombinação de oxigênio (do inglês, *oxygen rebound*). Este mecanismo, é descrito como a hidroxilação de compostos orgânicos mediados por oxigenases contendo íons em seu centro catalítico. A ligação glicosídica é então desestabilizada e rompida através de uma reação de eliminação (átomos ou moléculas) (MONCLARO; FILHO, 2017).

A cada molécula de oxigênio utilizada quatro elétrons são fornecidos para a reação, na qual dois destes são provenientes do substrato e outros dois de doadores de elétrons. Estes podem ser moléculas redutoras como ácido gálico ou ascórbico ou ainda de compostos solúveis derivados da biomassa (por exemplo, fenóis provenientes da lignina). Ainda, os doadores podem ser de origem enzimática como a celobiose desidrogenase (CDH). A coordenação do metal divalente (cobre) é realizada por um conjunto de histidinas (*histidine brace*) no sítio ativo (MONCLARO; FILHO, 2017). Na ausência de substrato, as LPMOs produzem um superóxido protonado, que pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (TANDRUP et al, 2018).

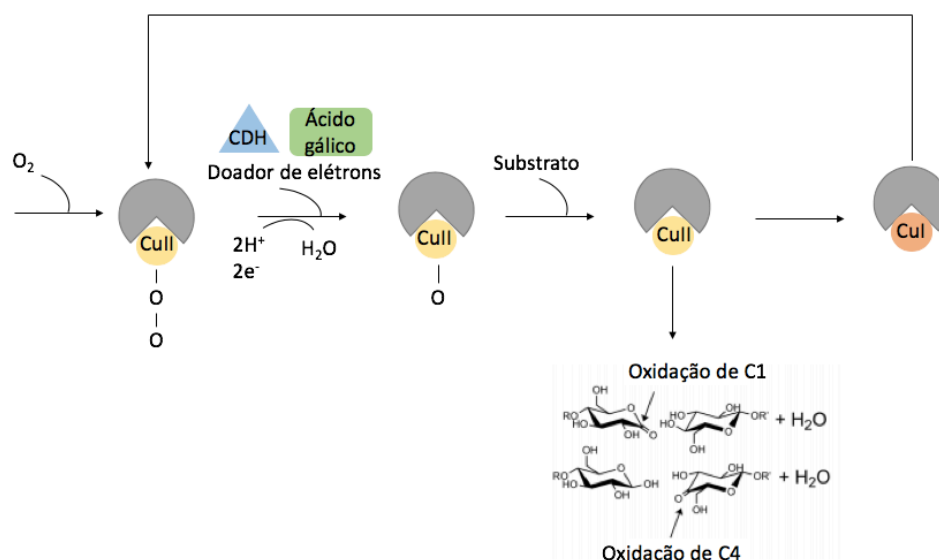


Figura 8- Mecanismo de ação da enzima LPMO. O mecanismo de reação das LPMOs está relacionado com a ligação de oxigênio (O₂) e a redução do complexo LPMO-Cu(II) para LPMO-Cu(I), formando um intermediário entre o oxigênio e o cobre. Os doadores de elétrons podem ser tanto enzimáticos (CDH) ou moléculas redutoras (ácido gálico). A ligação glicosídica é então desestabilizada e rompida através de uma reação de eliminação. O carbono C1, C4 ou C1 e C4 podem ser oxidados. Fonte: autora.

Algumas LPMOs são capazes de oxidar especificamente o carbono C1, enquanto outras oxidam apenas o C4, ou oxidam ambos os carbonos C1 e C4. A oxidação do carbono C1 resulta na formação da extremidade redutora de lactona, que quando presente em solução aquosa é hidratada gerando ácido aldônico. Já a oxidação do carbono C4, gera uma extremidade não redutora de ceto-aldose (Figura 9) (HEMSWORTH et al, 2015).

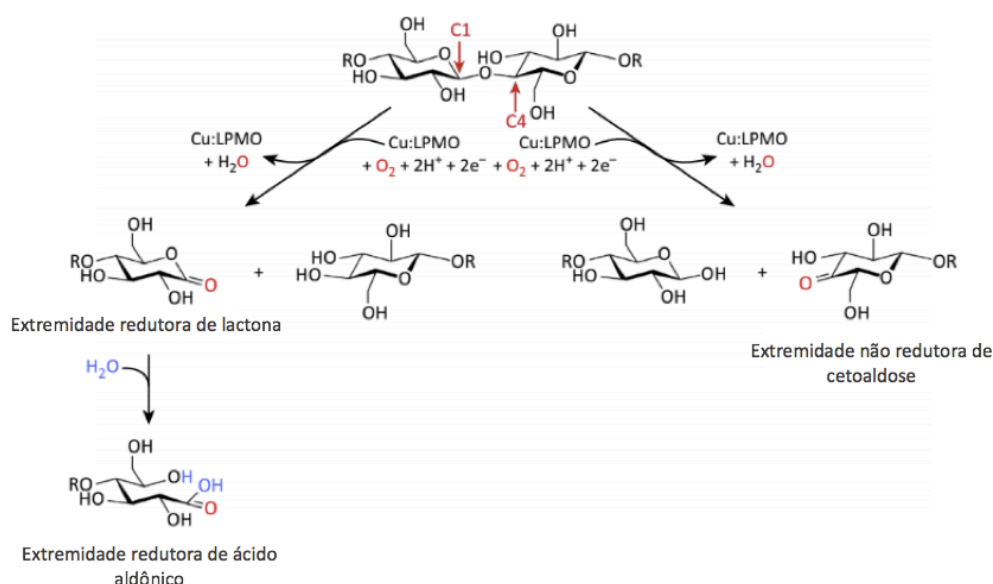


Figura 9- Mecanismo de oxidação por LPMO do carbono C1 e C4. Quando o carbono C1 é oxidado, uma extremidade não redutora de lactona é formada, a qual é hidratada à ácido aldônico. Quando o carbono C4 é oxidado, uma extremidade não redutora de cetoaldose é produzida. Figura adaptada de Hemsworth et al, 2015.

As LPMOs compartilham uma estrutura terciária de sanduíche- β semelhantes à de imunoglobulinas, estabilizadas por regiões hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto. O centro catalítico está localizado em uma superfície plana de um dos lados da cadeia de sanduíche- β . A estrutura apresenta três loops extensos e variáveis que estão implicados na superfície de ligação e especificidade do substrato (Figura 10) (HEMSWORTH et al, 2015; MONCLARO; FILHO, 2017).

Desta forma, as LPMOs são capazes de oxidar polissacarídeos e desempenham importante papel juntamente com outras enzimas para a desconstrução da biomassa lignocelulósica. A descoberta de novas LPMOs sinergicamente ativas para compor os coquetéis enzimáticos de desconstrução da biomassa é fortemente desejada.

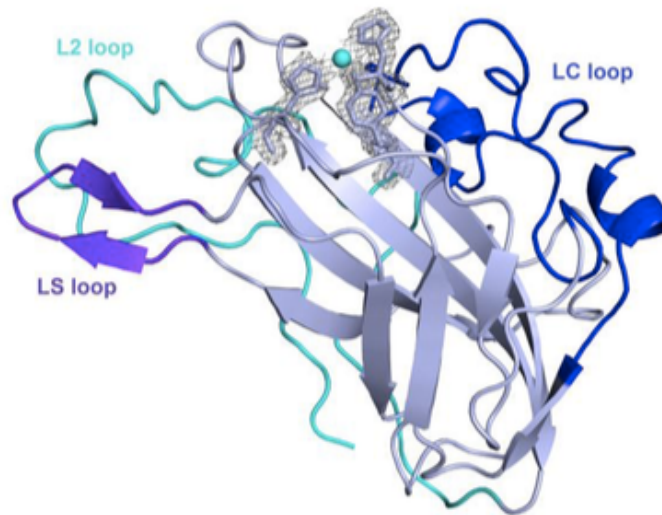


Figura 10- Estrutura terciária de uma LPMO da família AA9 de *Phanerochaete chrysosporium*. O centro catalítico planar é observado em uma das regiões da estrutura sanduíche β . Adaptado de Wu et al, 2013.

1.2.1.2 Expansinas e expansinas-like

As expansinas são proteínas que desenvolvem importantes funções fisiológicas ligadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Estas são capazes de romper as ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos da parede celular sem atividade hidrolítica, afrouxando-a. Nenhuma atividade enzimática foi confirmada para expansinas provenientes de plantas e microrganismos, e desta forma, estas são chamadas de proteínas de afrouxamento de parede (*wall-loosening*, do inglês), e não enzimas. Apesar de o mecanismo de ação destas proteínas não ser completamente elucidado, estudos recentes demonstraram que estas estão relacionadas com a plasticidade da parede celular que é fundamental para os processos fisiológicos das plantas. Adicionalmente, as expansinas podem ter papéis relacionados a fator de virulência e sinergia com celulases (COSGROVE, 2017).

As expansinas de plantas são classificadas em superfamílias que codificam para proteínas de tamanho molecular pequeno. Estas podem ser divididas em famílias de β -expansina sendo constituídas de principais alérgenos do pólen de gramíneas, e α -expansinas relacionadas com o crescimento da planta em pH ácido. Ambas as famílias já foram comprovadas com atividades relacionadas ao afrouxamento da parede celular de plantas. Além destes, existem os subgrupos expansina-like A e expansina like-B que são conhecidas apenas por suas sequências gênicas. Ainda, a família expansina-like X que possui sequências gênicas remotamente semelhantes a expansinas de plantas ou microrganismos (MAROWA et al, 2016). Estas proteínas apresentam dois domínios conservados em sua sequência: o

domínio I que apresenta homologia ao domínio catalítico das proteínas GH da família 45 (GH45) e o domínio 2 que é homólogo ao grupo 2 de alérgenos do pólen (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005).

As expansinas são secretadas em sua maioria por plantas, e os microrganismos como fungos e bactérias, produzem as chamadas expansinas-like. Estes tipos de proteínas compartilham similaridades na sequência gênica e estrutura com as expansinas, como por exemplo as swoleninas (SWO) e cerato plataninas. A SWO é uma proteína capaz de romper as fibras de celulose, porém sem atividade hidrolítica confirmada. Esta foi isolada de *Trichoderma reesei* a qual apresenta similaridade de sequência à expansinas de plantas. As SWO possuem em sua sequência domínio conservado no C-terminal para expansinas-like e CBM conservado no N-terminal, além de um domínio conservado para fibronectinas.

As cerato plataninas (CP) são proteínas de tamanho molecular pequeno relacionadas, em sua maioria, com fungos fitopatogênicos. Assim como as expansinas, estas proteínas não apresentam atividade hidrolítica e possuem o domínio I conservado em sua sequência gênica. Atualmente, as proteínas CP estão classificadas no banco de dados Pfam (o qual agrupa proteínas com base no alinhamento múltiplo de sequências) na família cerato platanina 07249. Estudos recentes demonstraram as funções de CP como moduladoras na defesa de plantas e relacionadas ao afrouxamento de papel de filtro *in vitro* (COSGROVE, 2017). A estrutura tridimensional de uma CP do fungo *Ceratocystis platani* foi elucidada no trabalho de Oliveira e colaboradores (2011). Esta tem por característica uma estrutura bastante semelhante ao encontrado em endoglucanases e ao domínio I de expansinas. Conforme pode ser observado na Figura 11, a CP possui duas α -hélices e seis folhas- β que formam a dobra dupla do $\psi\beta$ -barril.

Sendo assim, expansinas e expansinas-like apresentam a capacidade de afrouxar a celulose parede celular de plantas, mas poucas destas proteínas apresentam sinergismo com celulases (BACELLI et al, 2014). Portanto, a identificação destas proteínas com alto efeito sinérgico na hidrólise da celulose é desejada para sua aplicação no processo de degradação da biomassa lignocelulósica.

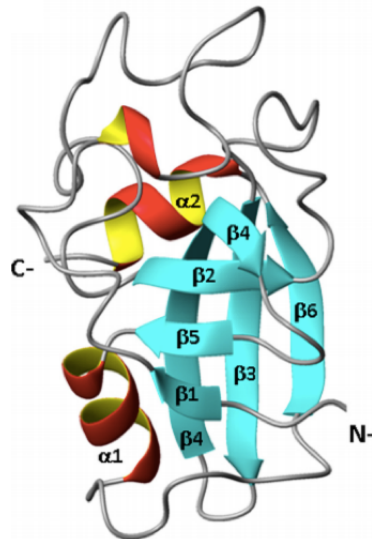


Figura 11- Estrutura tridimensional de uma cerato platanina de *Ceratocystis platani*. A estrutura possui duas α -hélices e seis folhas- β , formando a dobra dupla do ψ β -barril, elucidada por Oliveira et al (2011).

1.3 Fungos produtores de expansinas-like e LPMOs

Diversos microrganismos produzem enzimas para degradação da parede celular de plantas, a fim de adquirirem nutrientes para sua sobrevivência. Os fungos saprofíticos utilizam material orgânico em decomposição, como folhas e madeiras, para obterem energia. Estes representam um papel essencial na degradação da biomassa, produzindo diversas enzimas que degradam carboidratos (DE SOUZA, 2013). Para auxiliar na degradação do substrato lignocelulósico, os fungos podem secretar proteínas com atividade auxiliar. As espécies do gênero *Trichoderma* são importantes produtores de enzimas com aplicações biotecnológicas secretando celulases, hemicelulases e LPMOs para a degradação da biomassa conforme revisado no trabalho de Druzhinina e Kubicek (2016).

Assim como *Trichoderma*, o gênero *Aspergillus* também é um importante produtor de enzimas utilizadas na degradação da biomassa. Diversos trabalhos reportam a expressão de LPMOs por este gênero, por exemplo Nekiunaite e colaboradores (2016) demonstraram a produção desta proteína pelo fungo *Aspergillus nidulans*. Outra proteína acessória produzida por uma diversidade de microrganismos são as expansinas-like, que podem ser expressas por ascomicetos como *Trichoderma*, *Penicilium* e *Aspergillus* conforme revisado por Kubicek e Kubicek (2016). Devido a esta diversidade de gêneros produtores de proteínas acessórias, o estudo de várias espécies, como por exemplo *Thermomyces lanuginosus*, tem sido feito para descoberta de novas enzimas com potenciais aplicações biotecnológicas.

1.3.1 *Thermomyces lanuginosus*

Thermomyces lanuginosus (antigo *Humicola lanuginosus*) é um fungo aeróbio e termofílico pertencente ao filo Ascomycota e família Trichomaceae. *Thermomyces* é um gênero de degradadores da biomassa lignocelulósica e podem ser encontrados em matéria orgânica em decomposição em diversas regiões do mundo. A reprodução de *T. lanuginosus* acontece apenas na forma assexuada, através da formação de conídeos (HOUBRAKEN et al, 2014). Por serem termofílicos, apresentam temperatura ótima de crescimento de 50 °C e suas enzimas por consequência, são termo resistentes. Esta característica gera bastante interesse comercial, devido a estas enzimas serem mais termo resistentes do que proteínas produzidas por microrganismos mesófilos. Assim, estas podem ser empregadas em reações com temperaturas mais elevadas sem perder sua atividade (SINGH et al, 2003).

Existe uma diversidade de proteínas que podem ser encontradas no sobrenadante da cultura de fungos quando cultivados em substratos distintos. O fungo *T. lanuginosus* é capaz de produzir em sua maioria enzimas hemicelulolíticas. Diversos estudos vêm demonstrando a capacidade destes fungos de produzir xilanases, mananases e outras hidrolases de glicosídeos. Assim, a produção de suas enzimas tem atraído bastante o interesse da indústria, principalmente a de papel que utiliza a xilanase em alternativa a produtos químicos para o branqueamento da celulose. Porém, a presença de outras classes de proteínas, como por exemplo as acessórias, produzidas por *T. lanuginosus* foi pouco avaliada. Desta forma, novos estudos devem ser realizados para identificação de outros tipos de proteínas além das já tradicionalmente estudadas (xilanases, lipases e mananases) (SINGH et al, 2000; SINGH et al, 2003).

1.4 Produção de proteínas heterólogas por *Komagataella phaffii*

A expressão heteróloga consiste na introdução de DNA exógeno em um organismo, que codifica para uma determinada proteína de interesse, em uma célula de modo que a maquinaria celular do hospedeiro produza a proteína exógena. Esta tecnologia de DNA recombinante para clonagem e expressão pode ser feita em variados hospedeiros como bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células de mamíferos e insetos. Desta forma, a escolha de um sistema de expressão adequado é essencial para a produção eficiente da proteína de interesse, pois características como tempo de crescimento, custo e modificações

pós-traducionais variam entre hospedeiros (GOMES et al., 2016). As vantagens e desvantagens destes sistemas de expressão estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de expressão. Bactéria, levedura, fungo filamentoso, insetos e células de mamífero. Tabela adaptada de Gomes et al, 2016.

Sistema de expressão	Vantagens	Desvantagens
Bactéria - <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil manipulação • Rápido crescimento celular • Baixo custo 	<ul style="list-style-type: none"> • Não possui modificações pós traducionais • Formação de corpos de inclusão • Não possuem maquinaria para remoção de introns dos transcritos • Acumulação de endotoxinas
Leveduras	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo • Modificações pós traducionais • Não produzem endotoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperglicosilação de proteínas • Possível retenção intracelular da proteína de interesse
Fungo filamentoso	<ul style="list-style-type: none"> • Altos níveis de expressão 	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de estudo de sua fisiologia
Insetos/baculovírus	<ul style="list-style-type: none"> • Altos níveis de expressão • Modificações pós traducionais 	<ul style="list-style-type: none"> • Expressão contínua não é possível • Condições de cultura mais exigentes
Células de Mamíferos	<ul style="list-style-type: none"> • Dobramento adequado das proteínas • Modificações pós traducionais • Glicosilação adequada 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo • Crescimento demorado • Possíveis contaminações com vírus animais

A produção da proteína funcional está intimamente relacionada com a maquinaria celular do organismo hospedeiro escolhido. As leveduras são importantes sistemas de expressão que vem sendo extensivamente utilizados para a produção heteróloga. Estas são capazes de combinar as vantagens em nível procariótico como por exemplo: crescimento rápido, meios de cultura mais baratos, fácil manutenção, manipulação e escalonamento aliado

às vantagens em nível eucariótico, como a capacidade em realizar a maioria das modificações pós-traducionais como glicosilações, formação de pontes dissulfeto e correto dobramento da proteína de interesse (GOMES et al., 2016, AHMAD et al, 2014).

A levedura *Komagataella phaffii*, previamente conhecida como *Pichia pastoris*, é capaz de produzir quantidades da proteína recombinante variando de miligramas a gramas tanto para fins de pesquisa (laboratoriais) quanto para a indústria. Quando comparada a células de eucariotos mais complexos, a levedura *K. phaffii* não requer meio de crescimento ou condições de cultura complexos e é geneticamente mais fácil de se manipular. Adicionalmente, pode ser cultivada a densidades celulares muito altas usando meios mínimos e os vetores integrados ao seu genoma facilitam a estabilidade genética dos elementos recombinantes mesmo em processos de fermentação contínuos e em larga escala (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Pertencente ao domínio Eukaryota e reino Fungi, a *K. phaffii* teve seu genoma sequenciado (DE SCHUTTER et al., 2009) e passou por um processo de reclassificação (denominada anteriormente como *Pichia pastoris*) devido a análises filogenéticas de sequências do RNA ribossômico (rRNA) sendo realocada para um novo gênero (*Komagataella*) proposto por Yamada et al (1995). Neste novo gênero estão presentes as leveduras *K. phaffii*, *K. pastoris* e *K. pseudopastoris* dentre as sete espécies já descritas. As linhagens de *K. phaffii* utilizadas em estudos de expressão heteróloga são a X33, cepa prototrófica, e a GS115 que possui uma mutação no gene da histidina desidrogenase (*HIS4*) gerando um fenótipo HIS^{-} (KURTZMAN, 2005). Por ser uma levedura metilotrófica, a *K. phaffii* tem a capacidade de utilizar o metanol como única fonte de carbono. No genoma da levedura existem dois genes que codificam a álcool oxidase (AOX) que são induzidos por metanol e reprimidos em glicose (KRAINER et al., 2012).

Atualmente, diversos medicamentos e proteínas com importância industrial são produzidos neste organismo. Para a expressão eficiente da proteína heteróloga em *K. phaffii*, alguns passos fundamentais devem ser seguidos. O primeiro consiste na inserção do gene (DNA exógeno) no vetor de expressão adequado, seguida pela introdução e integração deste vetor no genoma da levedura e por fim, a expressão da proteína em linhagem hospedeira específica (CEREGHINO; CREGG, 2000). Além disto, a escolha de combinações do promotor (constitutivo ou induzido), marcas de seleção adequadas (dominantes ou auxotróficas) e escolha do peptídeo sinal para secreção extracelular (quando desejada) são também essenciais para o sucesso da produção da proteína de interesse (Figura 12). A escolha

do vetor de expressão apropriado e a linhagem hospedeira complementar são essenciais para uma expressão bem sucedida (AHMAD et al., 2014).

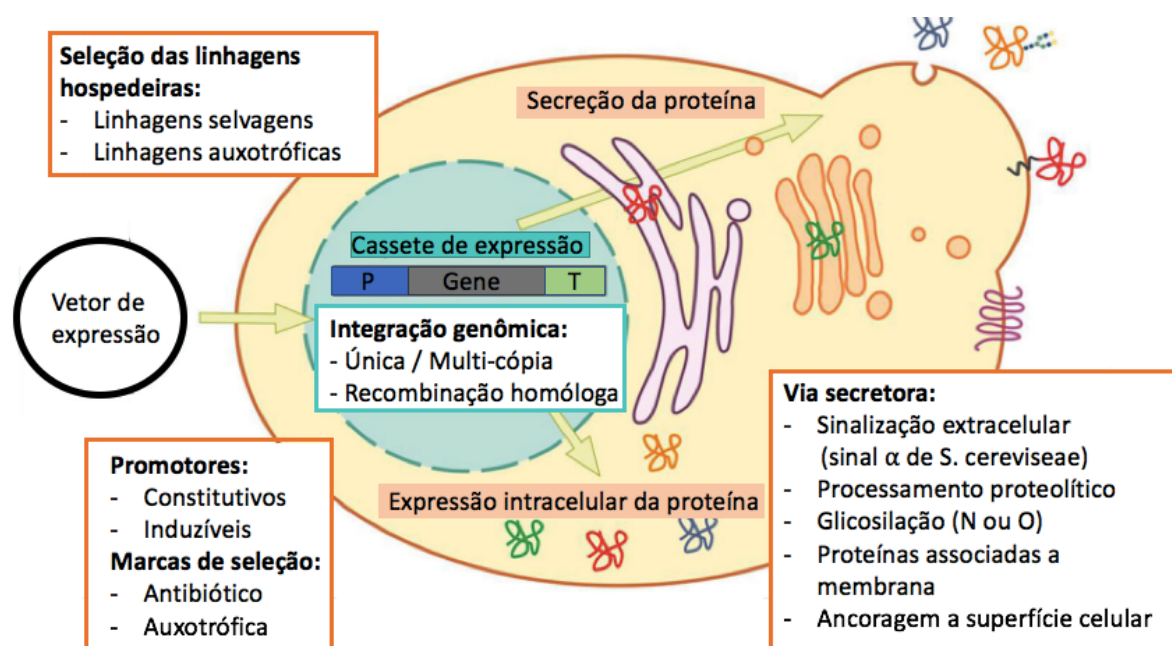


Figura 12- Visão geral sobre a expressão heteróloga em *K. phaffii*. O vetor de expressão deve ser integrado no genoma da levedura podendo ocorrer por eventos de única ou multi-cópia e recombinação homóloga. A proteína pode ser expressa tanto intracelularmente, como ancorada na superfície celular. Ela pode ainda ser secretada (via de sinalização extracelular) pelo fator alfa de secreção de *S. cerevisiae* e processada por eventos como a glicosilação. Para o cassete de expressão é importante a escolha de um promotor (constitutivo ou induzido) e terminador adequado, assim como a escolha de marcas de seleção. O vetor de expressão e linhagens hospedeiras devem ser complementares para uma expressão bem-sucedida. Adaptado de Ahmad et al, 2014.

1.4.1 Vetores de expressão

Atualmente, existem diversas opções de vetores de expressão que estão disponíveis comercialmente para a expressão heteróloga em *K. phaffii*. É importante que o vetor de expressão escolhido tenha características adequadas para a expressão da proteína heteróloga de interesse. A grande maioria dos vetores são do tipo integrativos e são capazes de se propagar tanto em bactéria (*E. coli*), como em levedura (*K. phaffii*), sendo do tipo bifuncionais. Além disto, os vetores possuem sequências regulatórias (promotores), um sítio múltiplo de clonagem para inserção do gene de interesse, um terminador adequado para terminação da transcrição e quando necessário sinal de secreção para o transporte extracelular da proteína. Adicionalmente, os vetores precisam conter uma origem de replicação bacteriana

e uma marca de seleção que funcione tanto em bactéria como em levedura (AHMAD et al., 2014; BATISTA, 2012).

1.4.2 Promotores

Diversos tipos de promotores induzidos e constitutivos são utilizados para a expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii*, e dentre estes os mais utilizados são os promotores AOX e GAP (AHMAD et al., 2014). O promotor do gene *GAP* que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato (GAP) promove uma expressão constitutiva e em níveis elevados em vários organismos, uma vez que esta proteína é uma enzima chave da via glicolítica. Este foi caracterizado demonstrando que podem ser expressas proteínas heterólogas em altos níveis em *K. phaffii* dependendo da fonte de carbono (WATERHAM et al., 1997; ZHANG et al., 2009). Os níveis de expressão do promotor GAP são elevados na presença de glicose, porém quando a fonte de carbono disponível é o glicerol ou etanol, os níveis de expressão podem cair pela metade e até mesmo para um terço, respectivamente. A expressão constitutiva fornece a transcrição contínua do gene de interesse e não se faz necessário o uso de indutores tóxicos, potencialmente prejudiciais e perigosos, como o caso do promotor AOX induzido por metanol (AHMAD et al., 2014; CEREGHINO; CREGG, 2000).

O promotor AOX1 (do gene *AOX1* que codifica a enzima álcool oxidase I) é um promotor induzível muito utilizado na expressão heteróloga, o qual é altamente regulado e é somente expresso na presença de metanol e ausência de glicose. Esta enzima catalisa a primeira reação da via para metabolização do metanol, convertendo-o em formaldeído. No genoma de *K. phaffii* existem dois genes que codificam para álcool oxidases: AOX1 e AOX2. O primeiro é responsável por 90% da presença de enzimas na célula, enquanto o segundo codifica menos de 10%. No sistema de expressão contendo o promotor AOX1, é possível desacoplar o crescimento da fase de produção, pois a biomassa é acumulada antes da expressão da proteína. Desta forma, as células não são estressadas pelo acúmulo de proteína recombinante durante a fase de crescimento e até mesmo a produção de proteínas tóxicas para *K. phaffii* é viável. No entanto, o promotor AOX é reprimido por glicose, glicerol e etanol. Adicionalmente, o metanol é uma substância tóxica e inflamável que pode causar danos ao meio ambiente e a quem o manipula, tornando o seu uso para produção de enzimas em larga escala indesejado devido ao seu potencial perigo (AHMAD et al., 2014; ZHANG et al., 2009).

Ambos os promotores apresentam vantagens e desvantagens quanto a expressão de proteínas recombinantes. O sistema de expressão contendo o promotor GAP foi desenvolvido em alternativa ao promotor AOX, resolvendo problemas como a produção de proteínas heterólogas em larga escala sem a necessidade de um indutor como o metanol. No sistema GAP, a produção de biomassa e a síntese da proteína heteróloga ocorrem de maneira simultânea, sem a necessidade de ser adicionado um agente indutor. Porém, a produção de proteínas tóxicas para *K. phaffii* não é possível. No sistema AOX1, a expressão destes tipos de proteínas já é viável pois a fase de crescimento é separada da fase de indução. Alguns estudos demonstram que a expressão é maior quando o promotor GAP é utilizado, e outros trabalhos indicam que a produção de proteínas é mais elevada quando o promotor AOX é usado (COS et al, 2006). Em alguns casos, as estratégias de fermentação não são otimizadas, e desta forma, o efeito dos promotores no nível de produção da proteína recombinante é difícil de ser comparado. Por fim, a eficiência global da expressão proteica sob a regulação dos promotores AOX1 ou GAP em *K. phaffii* depende do gene alvo e da própria proteína a ser expressa (COS et al, 2006; VARNAI et al, 2014).

1.5 LPMOs, expansinas e expansinas-like produzidas por *Komagataella phaffii*

Para reduzir o custo e alcançar altas concentrações de produção de proteínas acessórias, um sistema de expressão heterólogo é altamente vantajoso. Em contraste com outros sistemas de expressão eucarióticos, *K. phaffii* não secreta enzimas lignocelulolíticas endógenas em quantidades significativas. Apenas uma β -glicosidase foi identificada e caracterizada em *K. phaffii*. Sendo assim, as cepas recombinantes desta levedura são capazes de fornecer preparações de proteínas heterólogas sem a necessidade de muitas etapas de purificação, reduzindo o tempo e custo deste processo (MELLITZER et al., 2012).

Diversos estudos vêm relatando a expressão heteróloga de LPMOs na levedura *K. phaffii*. No trabalho de Kittl e colaboradores (2012), quatro sequências de LPMOs provenientes de *Neurospora crassa* foram clonadas no vetor de expressão pPICZ α A, que estão reguladas sob o promotor AOX1. O sinal de secreção utilizado foi nativo, proveniente da sequência das enzimas e não do vetor de expressão. As enzimas foram então purificadas atingindo produtividade de até 0,79 g/L. A atividade enzimática foi comprovada por um ensaio capaz de detectar a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela LPMO. A expressão de LPMOs sob controle do promotor AOX1 vêm sendo bastante descrita na

literatura (AHMAD et al, 2014). O estudo de Kojima et al (2016) demonstrou a expressão heteróloga de uma LPMO proveniente do fungo *Gloeophyllum trabeum*. A sequência gênica de *G. trabeum* escolhida tinha como característica ser filogeneticamente distante de outras LPMOs já conhecidas. A enzima foi expressa e a sua promiscuidade quanto aos substratos foi descrita, pois esta obteve atividade em diferentes substratos hemicelulósicos (xiloglucanas e glucomanas). Além do uso do promotor AOX1, o promotor GAP também foi utilizado para a expressão heteróloga da LPMO Cel61A do fungo *Trichoderma reesei* (TANGHE et al, 2015). Porém, foi observado que a expressão, com o promotor AOX1 atingiu maior produção da proteína recombinante atingindo concentrações com mais de 400 mg/L. Além disto, a sequência da proteína possuía sinal nativo de secreção e otimização de códons, reportados como fatores cruciais para os altos níveis de expressão da proteína recombinante.

Assim como para as LPMOs, diversos estudos vêm descrevendo a expressão heteróloga das proteínas acessórias expansinas e expansinas-like provenientes de microrganismos em *K. phaffii*. No trabalho de Wang e colaboradores (2014), duas expansinas-like uma obtida de *T. reesei* e outra de *Bacillus subtilis* foram expressas em *K. phaffii* X33, ambas sob o controle do promotor AOX1. A produção máxima das proteínas recombinantes foi otimizada utilizando inibidores de protease no cultivo, atingindo concentrações de 860 mg/L (*B. subtilis*) e 120 mg/L (*T. reesei*). Além disto, ensaios de sinergismo foram realizados com celulasas comprovando as atividades das duas expansinas-like expressas. Além de expansinas provenientes de microrganismo, proteínas de origem vegetal também foram produzidas heterologicamente em *K. phaffii*. O trabalho de Liu e colaboradores (2015) descreveu a expressão de uma expansina da planta *Lycopersicon esculentum* sob o controle do promotor AOX1. A proteína recombinante foi expressa atingindo concentrações próximas de 70,9 mg/L. Assim como no trabalho de Wang e colaboradores (2014), inibidores de proteases foram utilizados para alcançar alto níveis de expressão e ensaios de sinergismo com celulasas foram realizados.

Desta forma, é possível constatar que expansinas, expansinas-like e LPMOs vêm sendo expressas em *K. phaffii* de maneira bem-sucedida. O sistema de expressão nesta levedura é bem estabelecido e a obtenção de miligramas a gramas da proteína recombinante podem ser obtidas para caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas.

2. JUSTIFICATIVA

Levando em consideração os fatores políticos, econômicos e ambientais novas fontes de energia têm sido investigadas em alternativa aos combustíveis fósseis. A biomassa lignocelulósica possui grande potencial para geração de biocombustíveis e outros produtos químicos de valor agregado, reduzindo custos e resíduos. As proteínas acessórias, como LPMOs e expansinas-like, desempenham um importante papel na desconstrução da biomassa, podendo ser utilizadas em sinergismo com outras classes de enzimas para maior liberação de açúcares e produção de biocombustíveis e bioprodutos. Para a redução do custo e maior produção de proteínas acessórias, os sistemas recombinantes vêm sendo extensamente estudados e relatados na literatura. A busca por novas enzimas sinergicamente ativas com potencial de aplicação na indústria e alta produção em sistemas heterólogos são fortemente desejados. Além disto, a produção em maiores concentrações de proteínas recombinantes facilita a sua caracterização bioquímica.

A levedura *K. phaffii* é um excelente sistema para expressão heteróloga de proteínas com diversas aplicações. A sua capacidade de realizar modificações pós traducionais, fácil manipulação genética, altos níveis de secreção da proteína heteróloga e o status GRAS (*Generally recognized as safe*) tornam esta levedura um importante sistema de expressão. Para que a produção da proteína seja bem-sucedida, a escolha do vetor de expressão deve ser levada em consideração. Diversos estudos vêm relatando a expressão bem-sucedida de proteínas acessórias nos plasmídeos contendo os promotores GAP e AOX1.

Neste trabalho, a levedura *K. phaffii* X33 foi escolhida como hospedeira para a produção recombinante de uma expansina-like e LPMO, utilizando os vetores de expressão pGAPZB e pPICZ α A, respectivamente. As sequências destas proteínas são provenientes do genoma do fungo *T. lanuginosus*. Por ser um fungo termofílico, espera-se que suas enzimas sejam termo resistentes e possam ser utilizadas em processos com temperaturas mais elevadas. Além disto, este fungo é bastante conhecido pela secreção de enzimas lignocelulolíticas, como xilanases e mananases. Porém, não há estudos indicando a presença de LMPOs e expansinas-like produzidas por ele. Assim, estas proteínas de *T. lanuginosus* foram descritas pela primeira vez neste trabalho. Por fim, as LPMOs e expansinas-like apresentam potencial de aplicação em coquetéis contendo diferentes classes de enzimas para a degradação sinérgica dos componentes da biomassa lignocelulósica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e expressar as proteínas expansinas-like, TLEX2 e TLEX3, e as proteínas LPMOs, TLPMO1 e TLPMO2, provenientes do fungo *Thermomyces lanuginosus* na levedura *Komagataella phaffii* X33.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as sequências de expansinas-like e LPMOs no genoma do fungo *Thermomyces lanuginosus*;
- Otimizar e clonar as sequências gênicas das LPMOs em vetor de expressão pGAPZ α A e pPICZ α A;
- Otimizar e clonar as sequências gênicas das expansinas-like contendo o fator de secreção nativo da proteína no vetor pGAPZB;
- Expressar as proteínas recombinantes em *K. phaffii*;
- Purificar as proteínas LPMO e expansina-like;
- Verificar a atividade enzimática da proteína LPMO;
- Verificar atividade de sinergismo com celulases da proteína expansina-like.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de microrganismos foram esterilizados em autoclave nas condições de aproximadamente 120 °C por 20 minutos a 1 atm. Os volumes foram completados com água destilada em todos os meios de cultura. A esterilização por filtração em membrana de 0,22 µm foi utilizada quando a solução específica não pôde ser autoclavada.

4.1.1 Meios de cultura utilizados para E. coli

4.1.1.1 Meio LB - Luria-Bertani low salt:

Triptona 1% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

Cloreto de Sódio (NaCl) 0,5% (p/v)

Para LB low salt sólido é adicionado ágar 2% (p/v). O pH do meio de cultura foi ajustado para o pH 7,5.

4.1.1.2 Meio YGT:

Glicerol (P.A – Dinâmica) 10 % (v/v)

Extrato de levedura 0,125 % (p/v)

Triptona 0,25 % (p/v)

A esterilização foi feita por filtração em membrana de 0,22 µm.

4.1.2 Meios de cultura utilizados para K. phaffii

4.1.2.1 Meio YNB - Yeast Nitrogen Base (10X):

YNB (sem aminoácido e sulfato de amônio) 1,7 % (p/v)

Sulfato de amônio 5% (p/v)

4.1.2.2 Meio YPD - Yeast Extract Peptone Dextrose:

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Dextrose (D-glicose) 2% (p/v)

Para YPD sólido foi adicionado ágar 2% (p/v).

4.1.2.3 Meio YPDS - Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol:

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Dextrose (d-glicose) 2% (p/v)

Sorbitol 1 M (182,2 gramas em 1 litro)

Para YPDS sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

4.1.2.4 Meio BMGY – Buffered Glycerol-complex Medium:

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

100 mM Tampão fosfato de potássio, pH 6.0

YNB 1,34% (p/v)

Biotina 4×10^{-5} % (p/v)

Glicerol 2% (v/v)

Para a preparação de 1 litro de meio, foram dissolvidos 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona em 700 mL de água destilada. Após autoclavagem, foram adicionados:

- 100 mL do tampão fosfato de potássio na concentração de 1M;
- 100 mL de YNB 10X;
- 2 mL de Biotina 500X;

O volume foi completado para 1 litro com glicerol a uma concentração final de 2%.

4.1.2.5 Meio BMMY – Buffered Methanol-complex Medium:

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

100 mM Tampão fosfato de potássio, pH 6.0

YNB 1,34% (p/v)

Biotina 4×10^{-5} % (p/v)

Metanol 0,5% (v/v)

Para a preparação de 1 litro de meio, foram dissolvidos 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona em 700 mL de água destilada. Após autoclavagem, foram adicionados:

- 100 mL do tampão fosfato de potássio na concentração de 1M;
- 100 mL de YNB 13,4%;
- 2 mL de Biotina 500X;

O volume de 1 litro foi completado com solução de metanol a uma concentração final de 0,5%.

4.2 Soluções e tampões

4.2.1 Tampão Citrato de sódio/ácido cítrico 100 mM pH 5

Para o preparo de 1 litro de solução, foram utilizados 14,705 g de citrato de sódio di-hidratado dissolvidos em água destilada para um volume de 500 mL. Para o ácido cítrico anidro foram necessários 9,605 g para o mesmo volume de 500 mL. Assim, aos poucos a solução de ácido cítrico foi adicionada à solução de citrato de sódio até atingir o pH desejado.

4.2.2 Tampão Cloreto de sódio 500 mM/Fosfato de sódio 20 mM

Para o preparo de 1 litro de solução, foram necessários 29,22 g de cloreto de sódio e 2,75 g de fosfato de sódio monobásico. A solução foi completada para 1 litro e teve o pH ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio (NaOH). Feito isso, o tampão foi filtrado em membrana de celulose de 0,22 μ m.

4.2.3 Tampão Cloreto de sódio 500 mM/Fosfato de sódio 20 mM com imidazol a 500 mM

O preparo do tampão foi feito como descrito acima no item 4.2.2, porém foi adicionado à solução 34,04 g de imidazol (concentração final de 500 mM).

4.2.4 Tampão fosfato de potássio 1M

Para o preparo de 1 litro do tampão fosfato de potássio são necessários 132 mL de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) a 1M e 868 mL de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 1M. Para ajustar o pH foram utilizados ácido fosfórico ou hidróxido de potássio (KOH). A solução foi autoclavada e armazenada em temperatura ambiente.

4.2.5 Biotina 500X

Biotina 0,02 % (p/v)

A solução foi filtrada em filtro 0,22 μ m e armazenada à 4 °C.

4.3 Microrganismos utilizados

4.3.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* DH 10BT1 (Invitrogen) foi utilizada como hospedeira para manipulação e multiplicação dos plasmídeos. Esta linhagem é eficiente na transformação de DNA e possui resistência à infecção de bacteriófagos T1.

Genótipo: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1 endA1*
araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ -*rpsL nupG tonA*

4.3.2 *Komagataella phaffii*

Para os experimentos de expressão heteróloga a linhagem com genótipo prototrófico da levedura *Komagataella phaffii* X33 foi utilizada.

4.4 Obtenção das sequências das proteínas de interesse

As sequências referentes às proteínas de interesse foram pesquisadas no genoma do fungo *T. lanuginosus* em bancos de dados online (GenBank). A partir do genoma completo de *T. lanuginosus*, a anotação estrutural e funcional foi feita pelo programa Maker 2.0. A

partir das sequências geradas, a busca por domínios funcionais foi realizada utilizando o programa InterProScan versão S. As sequências putativas geradas das proteínas acessórias foram analisadas manualmente na função BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*. Desta forma, as duas sequências selecionadas de LPMOs foram enviadas para a síntese no vetor de expressão pGAPZ α A por empresa especializada, Genone^{LTDA}. Da mesma forma, as sequências das expansinas foram sintetizadas no vetor de expressão pGAPZB.

O fator α de secreção das LPMOs é proveniente do vetor pGAPZ α A e para as expansinas, foram utilizados o fator de secreção nativo. A sequência otimizada foi clonada entre os sítios de restrição EcoRI (extremidade 5') e XbaI (extremidade 3'). O epítipo myc e cauda de histidina (6xHIS) foram clonados em fase com a sequência da proteína. Adicionalmente, foi necessário ajustar o número de bases do sítio em XbaI, para manter a construção em fase com a finalidade de assegurar a tradução correta da proteína.

4.4.1 Construção da árvore filogenética

A partir das sequências de aminoácidos obtidas, um alinhamento múltiplo foi realizado com proteínas similares comparando as expansina-like e LPMOs obtidas de *T. lanuginosus* contra o banco de dados do NCBI. Aproximadamente 20 sequências com homologia a sequência de TLEX2 e TLEX3 foram obtidas e alinhadas para a construção da árvore, assim como para TLPMO1 e TLPMO2. As sequências das proteínas foram recuperadas do banco de dados e um alinhamento múltiplo foi feito no programa Mega 7.0. Para que o alinhamento das sequências fosse significativo, o valor do *Expectation* (*e-value*) foi considerado. Este valor estatístico representa quantas vezes se esperaria que o alinhamento ocorresse ao acaso. Desta forma, quanto menor o valor do *e-value* mais significativa é a semelhança. Para as sequências analisadas e alinhadas com outros genes foram considerados apenas valores menores que $1e^{-6}$ para garantirem que a relação entre elas é verdadeira (ALBERTS et al, 2010). A árvore filogenética foi gerada pela ferramenta Mega 7.0, utilizando o método de *neighbor-joining* com um *bootstrap* de 1000.

4.5 Plasmídeos

4.5.1 pGAPZ α A e pGAPZB

O vetor de expressão pGAPZ α A (3,2 kb) e pGAPZB (2,9 kb) são vetores bifuncionais, que podem ser utilizados tanto em bactérias como leveduras. Estes possuem como características comuns o promotor constitutivo GAP e o gene *Sh ble* que confere resistência a zeocina, marca de seleção para ambos os microrganismos. Os vetores apresentam sítios múltiplos de clonagem, o epítipo myc e cauda de histidina que podem ser observados na Figura 13 e 14. O sinal de terminação nativo do gene *AOX1* (AOX1 TT), promotor TEF1 e EM7 (promotores que promovem a transcrição do gene de resistência a zeocina em *K. phaffii* e *E. coli*, respectivamente), região terminadora 3' do gene *CYC1* (CYC1 TT) e origem de replicação pUC de bactérias estão presentes nos dois plasmídeos. A principal diferença entre estes vetores é a presença do fator alfa de secreção nativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no pGAPZ α A.

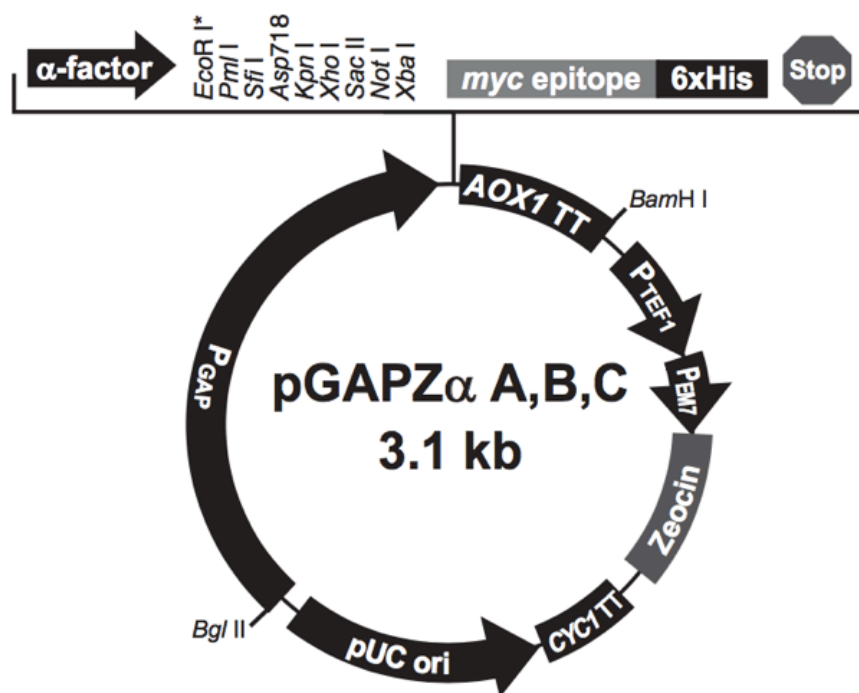


Figura 13- Vetor de expressão pGAPZ α A, B, C. Representação esquemática do vetor de expressão pGAPZ α A, B, C (Figura do manual Invitrogen).

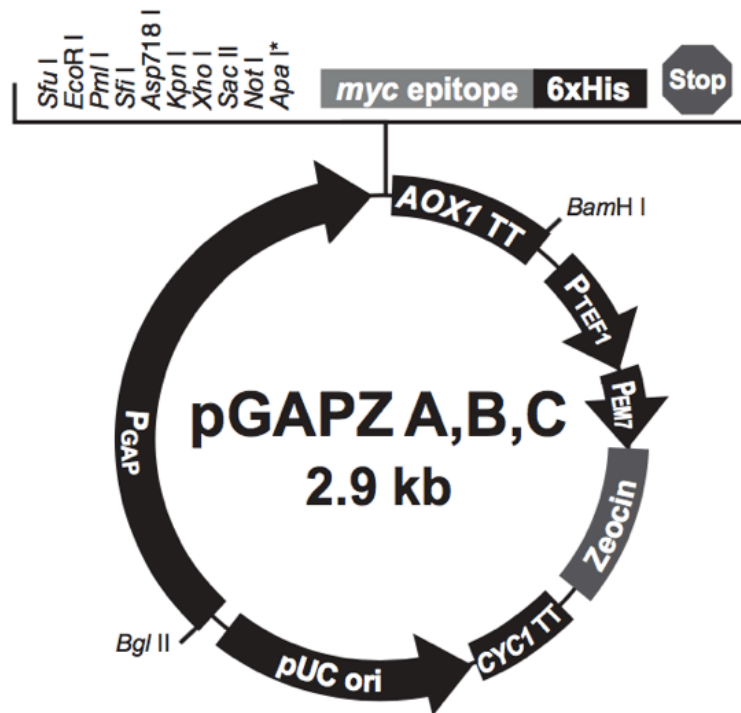


Figura 14- Vetor de expressão pGAPZ A, B, C. Representação esquemática do vetor de expressão pGAPZ A, B, C (Figura do manual Invitrogen).

4.5.2 pPICZ α A

O vetor de expressão pPICZ α A é um vetor bifuncional, que pode ser utilizado tanto em bactérias como leveduras. Este possui o gene *Sh ble* que confere resistência a zeocina, marca de seleção para ambos os microrganismos. O vetor possui um tamanho de 3,6 kb contendo o promotor induzido por metanol AOX1 e o sítio múltiplo de clonagem. Este contém o fator alfa de secreção nativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sítios de restrição, o epítipo myc e cauda de histidina conforme pode ser observado na Figura 15. O sinal de terminação nativo do gene *AOX1* (AOX1 TT), promotor TEF1 e EM7 (promotores que promovem a transcrição do gene de resistência a zeocina em *K. phaffii* e *E. coli*, respectivamente), região terminadora 3' do gene *CYCI* (CYC1 TT) e origem de replicação pUC de bactérias também estão presentes neste plasmídeo.

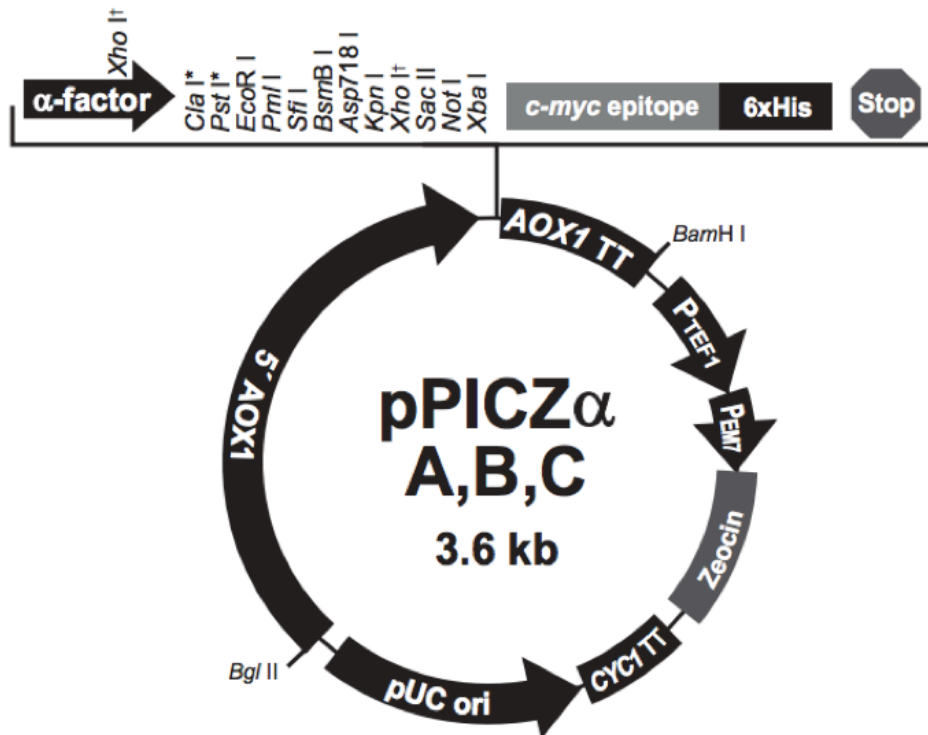


Figura 15- Vetor de expressão pPICZ α A, B, C. Representação esquemática do vetor de expressão pPICZ α A, B, C (Figura do manual Invitrogen).

4.6 Transformação de bactérias por eletroporação

4.6.1 Preparo de células eletrocompetentes

Para a transformação de *E. coli* é necessário que as células passem por um processo que as tornem competentes para receber o DNA exógeno. Em placa contendo meio LB *low salt*, células de *E. coli* foram repicadas a partir do estoque armazenado no ultrafreezer a -80°C e incubadas a 37°C por 16 h. Para o pré-inóculo, uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB *low salt*, que posteriormente foi incubado a 37°C , sob uma agitação de 200 rpm durante a noite. Para o inóculo, foram adicionados 5 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB *low salt*, em um frasco Erlenmeyer de 1 litro e em seguida incubado a 37°C , sob uma agitação de 280 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,5. A seguir, a cultura foi resfriada por vinte minutos no gelo e posteriormente as células foram centrifugadas a $4000 \times g$ por 15 min, na temperatura de 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 200 mL de água ultrapura gelada. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e ressuscitadas em 200 mL de glicerol 10% gelado. Posteriormente, a amostra foi centrifugada nas mesmas condições e

ressuspensa com 10 mL de glicerol 10% gelado. Para eliminao de sais e outros componentes do meio de cultura, a amostra foi novamente centrifugada e ressuspensa em 1 mL de GYT. Por fim, foram preparadas alquotas de 50 µL que foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

4.6.2 Transformao por eletroporaao

As clulas eletrocompetentes armazenadas em ultrafreezer à -80 °C foram descongeladas em gelo e 50 µL de clulas foram utilizadas, nas quais adicionou-se 0,5 µL (aproximadamente 100-150 ng) do plasmdeo contendo o gene de interesse. Apas o perodo de incubao em gelo por 5 minutos, a amostra foi transferida para as cubetas de 0,1 mm de eletroporaao (BioRad) estereis previamente geladas. As cubetas foram colocadas no eletroporador Gene pulser II (BioRad) que foi preparado para os seguintes parmetros: 1,8 kV, 25 µF e 200 Ω. Imediatamente apas o choque, foi adicionado 1 mL de meio LB a cubeta e a soluo foi transferida para um microtubo de 1,5 mL que foi incubado a 37 °C durante 1 hora.

Ao fim do perodo de incubao, as clulas eletroporadas foram plaqueadas em meio LB *low salt* sldido contendo zeocina na concentraao final de 25 µg/mL. Posteriormente, foram preparadas duas placas: na primeira, 200 µL da amostra foram plaqueadas. Na segunda placa, a amostra foi centrifugada a 2000 x g por aproximadamente 10 minutos em temperatura ambiente e parte do sobrenadante foi descartado, o restante (aproximadamente 100 µL) foi plaqueado. As placas foram armazenadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 24 horas. As colnias crescidas foram cultivadas em meio LB *low salt* lquido e armazenadas em ultrafreezer - 80 °C em microtubos contendo glicerol 25% (v/v).

4.7 Extraao de DNA plasmidial

4.7.1 Obtenao de DNA plasmidial purificado - Mini preparao

Para obter pequenas quantidades de DNA plasmidial purificado, o kit comercial de mini preparao da *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit* foi utilizado e protocolo foi seguido conforme instrues do fabricante.

4.7.2 Obtenao de DNA plasmidial purificado - Midi preparao

Após a transformação genética de bactérias, duas colônias foram isoladas em placas contendo meio low salt LB-sólido e crescidas em tubo de 50 mL contendo 5 mL de low salt LB líquido ambos contendo zeocina 25 µg/mL. Os tubos foram incubados durante 16 horas em agitação a 37 °C a 250 rpm. A extração para conseguir maiores concentrações de DNA plasmidial purificado foi feita com o kit de midi-preparação *ThermoFisher Scientific GeneJET Plasmid Midiprep*. Após seguir o protocolo como descrito pelo fabricante, o plasmídeo purificado foi utilizado para posterior transformação de *Komagataella phaffii* X33. Após a extração do DNA plasmidial, 1 µL da amostra purificada foi adicionada ao espectrofotômetro ND-1000 (*Nanodrop*) para ser quantificado.

4.8 Análises de restrição de DNA plasmidial

4.8.1 Restrição plasmidial para confirmação dos fragmentos – *EcoRI* e *XbaI*

As amostras dos plasmídeos extraídos de *E. coli* foram incubadas com enzimas de restrição, *EcoRI* (extremidade 5') e *XbaI* (extremidade 3'), que clivam os sítios específicos onde os fragmentos dos genes de interesse foram inseridos. As amostras foram preparadas com a enzima de restrição *EcoRI fast digest* (*Thermo Scientific*) e *XbaI fast digest* (*Thermo Scientific*) ambas com concentração de 10 U/µL e o respectivo tampão de enzima (tampão FD - *fast digest*). A digestão foi realizada conforme a Tabela 2 e as amostras foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 1 hora.

Tabela 2- Componentes da digestão do DNA plasmidial por *EcoRI* e *XbaI*.

COMPONENTES	QUANTIDADE (µL)
DNA plasmidial (700 ng/ µL)	4,0
<i>EcoRI fast digest</i> (10 U/µL)	0,5
<i>XbaI fast digest</i> (10 U/µL)	0,5
Tampão FD 10X	1,0
Água ultrapura	4,0
TOTAL	10 µL

Posteriormente, foi feita eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) para verificação dos fragmentos de restrição. Utilizou-se o tampão SB na concentração de 1X - Borato de

Sódio (51 g de ácido bórico e 8 g de hidróxido de sódio, completados para o volume de 1 litro) para preparação do gel. O agente intercalante utilizado foi o brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL. As amostras foram então preparadas, adicionando ao gel 3 µL do marcador molecular (*GeneRuler DNA Ladder Mix - Thermo Scientific*, concentração 0,5 µg/mL), 2 µL de amostra não digerida (plasmídeo não digerido) e 4 µL do plasmídeo digerido. Após serem aplicadas, as amostras foram submetidas a corrente elétrica e visualizadas através da exposição do gel à luz ultravioleta.

4.8.2 Linearização dos plasmídeos com as enzimas *BspHI* e *PmeI*

Para a transformação genética de levedura é preciso linearizar o plasmídeo com enzima de restrição para que este se integre de forma mais eficiente no genoma da levedura. A enzima utilizada para linearizar o vetor pGAPZ α A e pGAPZB contendo o gene de interesse foi a *BspHI* com concentração de 10 U/µL (*ThermoFisher Scientific*) e seu respectivo tampão Buffer O (concentração 10X, composição: 50 mM Tris -HCl, pH 7.5 a 37°C, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl). As amostras de DNA plasmidial purificado estavam com uma concentração aproximada de 10 µg e foram incubadas com 1 µL de *BspHI* e buffer O na concentração final de 1X a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Após o período de incubação, foi feito um gel de agarose 0,8% para eletroforese para a confirmação da linearização do plasmídeo. Foram adicionadas ao gel 3 µL de marcador molecular *GeneMix ruler* (*ThermoFisher Scientific*), 4 µL de amostra não digerida e 2 µL de amostra digerida (linearizada com *BspHI*).

Para a linearização do plasmídeo pPICZ α A contendo o gene de interesse, a enzima utilizada foi a *PmeI* com concentração de 5 U/ µL (*ThermoFisher Scientific*) e seu respectivo tampão Buffer O (concentração 10X, composição: 50 mM Tris -HCl, pH 7.5 a 37°C, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl). As amostras de DNA plasmidial purificado estavam com uma concentração aproximada de 10 µg e foram incubadas com 1 µL de *PmeI* e buffer O na concentração final de 1X a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Após o período de incubação, foi feito um gel de agarose 0,8% para eletroforese para a confirmação da linearização do plasmídeo. Foram adicionadas ao gel 3 µL de marcador molecular *GeneMix ruler*, 4 µL de amostra não digerida e 2 µL de amostra digerida (linearizada com *PmeI*).

Assim, o DNA linearizado foi purificado pelo protocolo de precipitação por Acetato de sódio (CH₃COONa) (ZEUGIN; HARTLEY, 1985). É necessário adicionar a amostra 1

volume de isopropanol e Acetato de sódio ajustado para a concentração final de 0,3 M (solução estoque de 3M: 12,3 g completados com água destilada para o volume final de 50 mL) seguidos por um período de incubação em freezer - 20 °C durante a noite. Após este período, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12000 x g e o sobrenadante foi descartado e pellet ressuscitado com etanol 70% e incubado durante 5 minutos. Esta etapa de lavagem com etanol foi repetida novamente e após a secagem do pellet em concentrador de amostra a vácuo, o mesmo foi ressuscitado em 10 µL de água ultrapura estéril.

4.9 Clonagem das LPMOs em vetor pPICZαA

4.9.1 Digestão dos fragmentos dos genes de interesse e vetor pPICZαA

Os genes de *Tl-LPMO1* e *Tl-LPMO2* se encontravam ligados ao vetor de expressão pGAPZαA (entre os sítios de restrição EcoRI e XbaI). Para a clonagem no vetor de expressão pPICZαA, os genes *Tl-LPMO1* e *Tl-LPMO2* foram digeridos e purificados para clonagem no vetor pPICZαA. Para isso, foi necessário realizar uma mini preparação (item 4.7.2) do vetor pPICZαA, de *Tl-LPMO1* e *Tl-LPMO2* (ainda clonados no pGAPZαA) previamente transformados em bactéria. Após a purificação do DNA plasmidial, foi feita a digestão do vetor pPICZαA e dos fragmentos de gene de *Tl-LPMO1* e *Tl-LPMO2* com as enzimas XbaI e EcoRI (*ThermoScientific – fast digest*). A concentração de DNA plasmidial de *Tl-LPMO1* e *Tl-LPMO2* para a digestão foi calculada para 7,5 ug (microgramas), enquanto que para o vetor de expressão pPICZαA foi calculado para 2,5 ug. Assim, as reações foram feitas conforme a Tabela 3. As amostras foram incubadas a 37 °C durante a noite para a digestão.

Tabela 3- Componentes da digestão do DNA plasmidial por EcoRI e XbaI.

COMPONENTES	pPICZαA	TLPMO1	TLPMO2
DNA plasmidial	20	50	30
Tampão Fast digest 10X	3	6,5	4,5
XbaI fast digest (10 U/uL)	2	3	3
EcoRI fast digest (10 U/uL)	2	3	3
Água ultrapura	3	2,5	4,5
TOTAL (uL)	30 uL	65 uL	45 uL

4.9.2 Purificação dos fragmentos de gene e vetor pPICZ α A em gel de agarose.

A partir das amostras incubadas com EcoRI e XbaI, foi feita a análise por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) para verificação dos fragmentos de restrição. Utilizou-se o tampão SB na concentração de 1X - Borato de Sódio para preparação do gel. O agente intercalante utilizado foi o brometo de etídeo na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram então preparadas, adicionando ao gel 3 μL do marcador molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)*, 4 μL de amostra não digerida (plasmídeo não digerido) e 4 μL da amostra digerida. Após a confirmação da restrição, um novo gel de agarose foi feito e o volume da amostra digerida do vetor pPICZ α A, TLPMO1 e TLPMO2 foi aplicado no gel para a purificação dos fragmentos digeridos. Assim, os fragmentos correspondentes ao genes e vetor foram purificados do gel com o kit de purificação "*Wizard SV gel and PCR Clean-up system*" (Promega).

Após a purificação do vetor pPICZ α A, 300 ng deste foi desfosforilado com a enzima SAP (*Shrimp Alkaline phosphatase*) da marca *ThermoScientific* com a concentração de 1 U/ μL e seu respectivo tampão 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 100 mM MgCl₂). A reação foi feita conforme a Tabela 4 e foi incubada a 37 °C durante 1 hora.

Tabela 4- Componentes da reação para a desfosforilação do vetor digerido pPICZ α A.

COMPONENTES	QUANTIDADE (μL)
SAP (1 U/ μL)	3
pPICZ α A (10 ng/ μL)	30
Tampão SAP 10X	4
Água ultrapura	4
TOTAL (μL)	40 μL

4.9.3 Ligação dos fragmentos de gene no vetor pPICZ α A.

Para a ligação dos fragmentos de interesse no vetor pPICZ α A foram utilizados: 50 ng de pPICZ α A purificado e desfosforilado, e o fragmento de gene de interesse que estava três vezes mais concentrado (150 ng). A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (*ThermoScientific*) na concentração de 1 U/ μL e seu respectivo tampão 5X [250 mM

Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (p/v) polietileno glicol-8000], conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5- Reação de ligação (T4 ligase) com o vetor pPICZ α A e o fragmento de gene TLPMO1.

COMPONENTES	QUANTIDADE (uL)
pPICZ α A (90 ng/ μ L)	0,55
TLPMO1 (17,9 ng/ μ L)	8,4
T4 ligase (1 U/ μ L)	1
Tampão reação 5X	4
Água ultrapura	6,05
TOTAL (uL)	20 uL

Para a reação de ligação com o fragmento de TLPMO2, os cálculos foram feitos da mesma forma como descrita anteriormente. A reação foi feita conforme Tabela 6.

Tabela 6- Reação de ligação (T4 ligase) com o vetor pPICZ α A e o fragmento de gene TLPMO2.

COMPONENTES	QUANTIDADE (uL)
pPICZ α A (90 ng/ μ L)	0,55
TLPMO2 (11,3 μ L/ng)	13,3
T4 ligase (1 U/ μ L)	1
Tampão reação 5X	4
Água ultrapura	1,15
TOTAL (uL)	20 uL

Os microtubos contendo as ligações de TLPMO1 e TLPMO2 no vetor pPICZ α A foram armazenados em geladeira durante três dias para otimização da reação. Após a ligação, o plasmídeo ligado ao gene de interesse foi transformado em bactéria por eletroporação e estocado em glicerol 25% (v/v) (item 4.6).

4.9.4 Confirmação da ligação dos fragmentos de gene no vetor pPICZ α A

Após a transformação em bactérias, as colônias obtidas foram isoladas em placas de LB- *low salt* contendo 25 μ g/mL de zeocina e crescidas em meio LB- *low salt* para a extração

do DNA plasmidial (Mini-prep, item 4.7.1). Posteriormente, o DNA plasmidial purificado foi submetido a análise de restrição com as enzimas EcoRI e XbaI (item 4.8.1) para verificação dos fragmentos de gene inseridos no vetor pPICZ α A. Após o período de incubação, foi feita a análise por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) para verificação dos fragmentos de restrição conforme descrito no item 4.8.1.

4.10 Transformação de levedura - *Komagataella phaffii*

De acordo com o manual da Invitrogen (Catálogo n. V200–20), para a transformação de levedura é recomendado obter 5-10 μ g de DNA plasmidial linear purificado. Para o preparo das células eletrocompetentes, o pré-inóculo foi feito transferindo uma colônia da levedura *K. phaffii* X33 crescida em YPD sólido para 5 mL de meio YPD líquido que foi incubado a 30 °C a uma agitação de 200 rpm por aproximadamente 16 horas. Para o inóculo contendo 100 mL de YPD em frasco Erlenmeyer de 1 litro, foram adicionados o volume necessário de pré-inóculo para atingir uma DO₆₀₀ de 1,3-1,5 e incubado nas mesmas condições. Quando atingido a DO₆₀₀ necessária, as células foram submetidas a centrifugação a 1500 x g durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ressuspensionado em 100 mL de água destilada estéril gelada e centrifugada nas mesmas condições. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em 50 mL de água destilada estéril gelada e novamente centrifugadas. Desta vez, 4 mL da solução de sorbitol 1M (182,2 gramas de sorbitol para o volume final de 1 litro) gelado e estéril foi utilizada para ressuspender as células. Após mais uma etapa de centrifugação nas mesmas condições, as células foram ressuspensionadas com 200 μ L de sorbitol 1M. Assim, 10 μ L de DNA previamente purificado e linearizado foram adicionados à 80 μ L de células eletrocompetentes que foram transferidas para cubetas de eletroporação 0,2 cm (BioRad) e incubadas por 5 minutos em gelo.

As células foram submetidas ao choque utilizando o equipamento Gene pulser II (BioRad) nos parâmetros seguintes: 1,5 kV, 25 μ F e 400 Ω . Após o choque, foram adicionados 1 mL de sorbitol 1M gelado à cubeta e o conteúdo foi transferido para um tubo de 15 mL. As amostras foram incubadas a 30 °C sem agitação por aproximadamente 2 horas. As células transformadas foram plaqueadas em duas placas contendo meio YPDS e 200 μ g/mL de zeocina. A primeira placa continha 200 μ L das células ressuspensionadas após o choque, na segunda, a amostra foi submetida a centrifugação 2000 x g por 10 minutos e

descartado parte do sobrenadante, plaqueando apenas um volume aproximado de 100 μ L. As placas foram armazenadas em estufa a 30 °C por aproximadamente 3 dias.

4.11 Verificação por PCR da inserção do plasmídeo no genoma da levedura

Após o crescimento das colônias transformadas, estas foram repicadas para placas de YPDS contendo zeocina na concentração de 100 μ g/mL. A transferência da colônia foi feita com palito de madeira estéril tanto para a nova placa YPDS quanto para o meio líquido, contendo 10 mL de YPD e zeocina 100 μ g/mL em tubo de 50 mL que foi crescido durante a noite a 30 °C sob agitação de 200 rpm. O DNA genômico da levedura crescida em meio líquido foi extraído de acordo com o protocolo do kit comercial *GeneJET Genomic DNA Purification kit* (Invitrogen) para confirmação da inserção dos genes. Para as reações de PCR, o DNA genômico foi utilizado como molde. Para os genes de interesse inseridos no plasmídeo pGAPZ α A e pGAPZB foram utilizados os oligonucleotídeos específicos do promotor 5' pGAP (forward) e o 3' AOX1 (reverse) (Tabela 7). Para os genes de interesse inseridos no plasmídeo pPICZ α A foram utilizados os oligonucleotídeos específicos do promotor 5' AOX1 (forward) e o 3' AOX1 (reverse) (Tabela 8). Assim, foram adicionados ao mix os seguintes componentes:

- 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen)
- 1X de 10X PCR Buffer (-MgCl₂)
- 3,7 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂)
- 0,2 mM de dNTPs a 10 mM
- 0,8 mM de oligonucleotídeos 5' pGAP Forward (para pGAPZ α A e pGAPZB) ou 5' AOX1 Forward (para pPICZ α A)
- 0,8 mM de oligonucleotídeos 3' AOX1 Reverse
- 10 ng de DNA
- Água ultrapura estéril para volume final de 25 μ L

A taq DNA polimerase, PCR buffer e Cloreto de Magnésio (MgCl₂) foram obtidas comercialmente pela Invitrogen. A reação ocorreu em termociclador (*Applied Biosystems*), com a desnaturação inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, anelamento dos primers a 54 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 5 minutos. Por fim, a extensão final durou 10 minutos com uma temperatura de 72 °C. Após a reação de PCR, foi feito um gel de agarose 0,8% para eletroforese para

confirmação do DNA amplificado. As colônias que apresentaram fragmento amplificado correspondente ao gene de interesse foram cultivadas em meio YPD líquido e armazenadas em ultrafreezer - 80 °C em microtubos contendo glicerol 25% (v/v).

Tabela 7- Oligonucleotídeos (pGAP e 3'AOX1) utilizados para a confirmação do inserto por PCR.

Oligonucleotídeo	Sequência
pGAP forward	5'- GTCCTATTTCAATCAATTGAA - 3'
3'AOX reverse	5'- GCAAATGGCATTCTGACATCC - 3'

Tabela 8- Oligonucleotídeos (5'AOX1 e 3'AOX1) utilizados para a confirmação do inserto por PCR.

Oligonucleotídeo	Sequência
5'AOX forward	5'- GACTGGTTCCAATTGACAAGC - 3'
3'AOX reverse	5'- GCAAATGGCATTCTGACATCC - 3'

4.12 Expressão da proteína recombinante em *K. phaffii*

4.12.1 Expressão das proteínas recombinantes em meio YPD

As colônias confirmadas repicadas em placas de YPDS contendo zeocina 100 µg/mL foram transferidas para meio YPD líquido. Além dos clones confirmados por PCR, o controle negativo (X33 contendo o vetor pGAPZB ou pGAPZαA vazio) também foi cultivado nas mesmas condições. O pré-inóculo das colônias foram preparados em tubos falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio YPD e zeocina 100 µg/mL crescidas em agitação com rotação de 250 rpm, a 28 °C durante a noite. A densidade óptica das culturas foi determinada em comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), fazendo-se as diluições adequadas para o espectrofotômetro utilizado. Desta forma, para o inóculo foi padronizado uma DO₆₀₀ inicial de 2 em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio YPD. O cultivo foi incubado para crescimento a 28 °C com agitação de 250 rpm durante 96 horas. O ponto inicial do experimento foi recolhido e a cada 24 horas era retirado um novo ponto, totalizando cinco amostras correspondentes a 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A partir das 48 horas o cultivo foi suplementado com glicose 2% (p/v). Assim, 1 mL do inóculo eram retirados a cada 24 horas para acompanhar o crescimento celular através da densidade óptica e submetido a centrifugação a 14000 x g por 5 minutos. Feito isso, o sobrenadante era retirado e armazenado em microtubo de 1,5 mL e acondicionado em geladeira para análises posteriores.

4.12.2 Expressão das proteínas recombinantes em meio BMGY

As colônias confirmadas por PCR, foram crescidas em placas de YPDS e transferidas para meio BMGY líquido. O pré-inóculo foi feito em tubos falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio BMGY. O inóculo das colônias positivas e controle negativo foram feitos como descrito no item 4.11.1. O ponto inicial do experimento foi recolhido e a cada 24 horas era retirado um novo ponto, totalizando cinco amostras correspondentes a 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Além disso, a partir das 48 horas a cultura foi suplementada com glicerol 2% (v/v). Assim, 1 mL do inóculo eram retirados a cada 24 horas para acompanhar o crescimento celular através da densidade óptica e submetido a centrifugação a 14000 x g por 5 minutos. Feito isso, o sobrenadante era retirado e armazenado em microtubo de 1,5 mL e acondicionado em geladeira para análises posteriores.

Um novo cultivo foi realizado com a colônia positiva selecionada e o pré-inóculo preparado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio BMGY crescidas em agitação com rotação de 250 rpm, a 28 °C durante a noite. Desta vez, para o inóculo foi padronizado uma DO₆₀₀ inicial de 7 em frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meio BMGY. O cultivo foi incubado para crescimento a 28 °C com agitação de 250 rpm durante 72 horas. O cultivo foi suplementado com glicerol 2% a partir de 48 horas. Assim, a cada 24 horas amostras de 1 mL eram retiradas, centrifugadas e armazenadas conforme descrito anteriormente.

4.12.3 Expressão das proteínas recombinantes em meio BMMY

As colônias positivas repicadas em placas de YPDS contendo zeocina 100 µg/mL foram transferidas para meio líquido com palito de madeira estéril. Além dos clones positivos, o controle negativo (X33 contendo o vetor pPICZαA vazio) também foi crescido nas mesmas condições. O pré-inóculo das colônias foram preparados em tubos de 50 mL contendo 5 mL de meio BMGY crescidas em agitação com rotação de 250 rpm, a 28 °C durante a noite. A densidade óptica das culturas foi determinada em comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), fazendo-se as diluições adequadas para o espectrofotômetro utilizado. Desta forma, para o inóculo foi padronizado uma DO₆₀₀ inicial de 2 em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio BMMY. O cultivo foi incubado para crescimento a 28 °C com agitação de 250 rpm durante 96 horas. As amostras foram suplementadas com metanol 0,5%

a cada 24 horas. O ponto inicial do experimento foi recolhido e a cada 24 horas era retirado um novo ponto, totalizando cinco amostras correspondentes a 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Assim, 1 mL do inóculo eram retirados a cada 24 horas e submetido a centrifugação a 14000 x g por 5 minutos. Feito isso, o sobrenadante era retirado, armazenado em microtubo de 1,5 mL e condicionado em geladeira.

Um novo cultivo foi realizado com a colônia positiva selecionada e o pré-inóculo preparado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio BMGY crescidas em agitação com rotação de 250 rpm, a 28 °C durante a noite. Desta vez, para o inóculo foi padronizado uma DO₆₀₀ inicial de 7 em frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meio BMMY. O cultivo foi incubado para crescimento a 28 °C com agitação de 250 rpm durante 72 horas. O cultivo foi suplementado com metanol 1% a cada 24 horas, assim como a retirada de amostras também era realizada. Assim, as amostras foram centrifugadas e armazenadas conforme descrito anteriormente.

4.13 Quantificação de proteína total

A quantificação de proteínas foi feita com o kit comercial: *BCA protein assay* (*Thermo Fisher Scientific*). Este é um ensaio colorimétrico capaz de detectar a concentração total de proteínas de uma amostra. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços e o tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5 (item 4.2.1) utilizado para as reações de quantificação. O volume de 25 µL de amostra previamente diluída e os pontos da curva padrão foram transferidos para a microplaca, aos quais adicionou-se 200 µL do reagente de trabalho (50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos e após o período de incubação, foi feita a leitura no espectrofotômetro a 562 nm. A curva padrão foi feita com BSA em concentrações variando de 0,05 a 2 mg da proteína (a partir de um estoque de 2 mg/mL). Quando necessário, as amostras de proteína foram diluídas. O protocolo foi seguido conforme descrito pelo fabricante.

4.14 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

O gel foi preparado conforme descrito por Laemmli (1970), com solução do gel separador a 12% e gel concentrador a 4%. O sobrenadante das amostras referentes a 48, 72 e

96 horas obtidas no cultivo foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. O extrato bruto (sobrenadante) das amostras foi concentrado pelo protocolo de precipitação por acetona adaptados ao descrito pela *Thermo Fisher Scientific (Acetone precipitation of proteins, 2009)*. Neste, foram adicionados 1 mL de acetona 100% gelada a 1 mL de extrato bruto e armazenados em freezer -20 °C durante à noite. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 8000 x g durante 30 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet colocado em concentrador de amostra a vácuo para completa secagem. O pellet seco foi ressuscitado com aproximadamente 60 µL de água ultrapura. O tampão de amostra desnaturante concentrado 5 vezes foi feito da seguinte forma: 3,1 mL de Tris-HCl 1M pH 6,8 (12,110 g de Tris ajustado com HCl 1 M em medidor de pH), 5 mL de glicerol 100% (v/v), 0,5 mL de azul de bromofenol 1% (p/v), SDS 10% (p/v) e 1 mL de β-mercaptoetanol 10% (p/v). O tampão de amostra foi adicionado ao pellet ressuscitado, de forma que ficasse com uma concentração final de 1X. Assim, 15 µL de tampão de amostra foram adicionados e as amostras com um volume final de 75 µL foram fervidas em banho seco a 100 °C por 5 minutos.

As amostras precipitadas foram quantificadas (item 4.12) e então adicionadas ao gel com uma concentração de aproximadamente 60 µg, juntamente com o controle negativo e o marcador de peso molecular (*Page ruler Protein Ladder, Thermo Scientific* ou *Precision Plus Protein, Bio-Rad*). Aproximadamente 3 µL do marcador molecular e 15 µL de amostra foram adicionados aos poços e a corrida foi feita aplicando-se uma corrente de 25 mA para cada gel.

4.14.1 Coloração de gel com *Comassie Brilliant Blue G250*

Após a corrida, o gel foi corado com solução de *Comassie Brilliant Blue G250* (Sigma) e deixado em recipiente fechado em mesa com agitação oscilante por 30 minutos. A solução de *Comassie* foi preparada da seguinte forma: 2,5 g de *Comassie*, 450 mL de metanol 100%, 100 mL de ácido acético 100% e água destilada para completar o volume final de 1000 mL. Passado o tempo, a solução foi descartada adequadamente e adicionada solução descorante (10 mL de ácido acético 10%, 30 mL de metanol 100% e 60 mL de água destilada para um volume final de 100 mL de solução) que foi deixada em mesa com agitação oscilante durante a noite. Após o descoramento adequado, o gel foi armazenado em água e registrado em foto-documentador para análise. (HE, 2011).

4.14.2 Coloração com Nitrato de Prata

O protocolo descrito a seguir foi baseado no trabalho de Nesterenko e colaboradores (1994). Para corar o gel com prata foi feito o preparo de soluções estoque de: Acetona 50% (v/v), TCA (ácido tricloroacético) 50% (p/v), Nitrato de Prata (AgNO_3) 20% (p/v) e Tiosulfato pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) 10% (p/v). Com as soluções estoque preparadas, o seguinte protocolo foi seguido: o primeiro passo foi fixar as proteínas no gel com a solução 1 (60 mL de acetona 50%, 25 μL de formaldeído 37% e 1,5 mL de TCA 50%) e colocar em mesa agitadora por 5 minutos. Transcorrido o tempo, a solução 1 foi descartada e o gel lavado com água destilada durante 5 segundos, procedimento de lavagem que foi repetido 3 vezes. Feito isso, foram colocados 60 mL de água destilada e incubados em mesa agitadora por 5 minutos. Finalizando a etapa de lavagem, foram adicionados 60 mL de acetona 50% para o pré tratamento do gel e incubado em mesa agitadora por mais 5 minutos. Ainda nesta etapa, após o descarte adequado da acetona uma solução 2 (100 μL de tiosulfato 10% e 60 mL de água destilada) foram adicionados e incubados em mesa agitadora por 1 minuto.

Em seguida, a solução 2 foi descartada e o gel lavado com água durante 5 segundos repetindo o procedimento 3 vezes. A impregnação com prata foi a próxima etapa na qual a solução 3 (800 μL de Nitrato de prata 20%, 600 μL de formaldeído a 37% e 60 mL de água destilada) foram adicionadas ao gel e incubado em mesa agitadora por 8 minutos. Foi necessário lavar duas vezes o gel por 5 segundos com água destilada. A etapa de revelação do gel foi feita com Carbonato de Sódio (Na_2CO_3), que foi preparado na solução 4 (1,2 gramas de Carbonato de Cálcio, 25 μL de formaldeído 37%, 25 μL de Tiosulfato 10% e 60 mL de água destilada). Esta etapa dura de 10 a 20 segundos dependendo da intensidade da cor das bandas coradas pela prata. Em seguida, a solução 4 foi descartada e adicionada a solução de parada de reação (ácido acético 1% em água destilada, concentração em volume/volume) por 30 segundos. Assim, a solução de parada foi descartada e o gel lavado com água destilada durante 10 segundos. O gel foi registrado em foto-documentador e armazenado em água destilada.

4.15 Análise da expressão por *Western-Blot*

Para o *Western-blot*, foi necessário realizar a corrida de dois géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme protocolo descrito no item 4.13. Um gel foi transferido para uma

membrana de nitrocelulose 0,45 μm (*Amershan Protan*) e o outro gel foi corado com Nitrato de prata (item 4.13.2) servindo como padrão de comparação de bandas. A preparação das amostras de proteínas foi feita com precipitação por acetona conforme descrito anteriormente. As amostras utilizadas são provenientes dos experimentos do cultivo da proteína recombinante e sua purificação, além do controle negativo que foram devidamente preparadas.

Após a corrida de ambos os géis, um foi transferido para a membrana e o outro gel foi corado com nitrato de prata 20% (p/v). Para a transferência do gel para a membrana de nitrocelulose este foi colocado em tampão de transferência (2,9 g de glicina, 5,8 g de Tris-base, 0,37 g de SDS, 200 mL de metanol e por fim, adicionar água destilada para o volume final de 1 litro) e foi preparado para incubação da seguinte forma: em sequência foram colocados dois papéis filtro Whatman número 1 (nas mesmas dimensões do gel de poliacrilamida), gel, dois papéis filtro Whatman Nº 1 e membrana de nitrocelulose que foi incubado durante 10 minutos. Transcorridos o tempo de incubação, o gel foi disposto na seguinte ordem: dois papéis filtro Whatman Nº 1, gel, membrana e dois papéis filtro em eletrotransferidor (*Novex™ Semi-Dry Blotter, Thermo Scientific*). O "sanduíche" contendo o gel é então embebido com tampão de transferência e submetido à corrida no eletrotransferidor (parâmetros: 10 Volts e 120 mA durante 30 minutos).

Após a transferência das amostras para a membrana, foi preciso colocá-la em uma solução de bloqueio (3 gramas de leite em pó desnatado diluídos em 100 mL de TBS 1X) durante 40 minutos em mesa agitadora. Para obtenção do reagente TBS 1X é necessário diluí-lo do estoque de TBS 10X (60,6 g de Tris-base, 87,7 g de cloreto de sódio-NaCl completados para um volume de 1 litro de água destilada). Após a incubação, a solução de bloqueio foi descartada adequadamente e em seguida, colocada a solução contendo o anticorpo primário monoclonal anti-his tag (Sigma-Aldrich) e incubado por 1 hora em mesa agitadora. A solução contendo o anticorpo primário foi preparada em uma proporção de 1 μL de anticorpo primário para 3000 μL de solução de bloqueio, sendo assim foram preparados 21 mL de solução para 7 μL de anticorpo.

Em seguida, foi realizada uma sequência de 3 lavagens que possui uma duração de 3 minutos cada com a solução TBS 1X + Tween 20 0,1% (v/v) que foi preparada da seguinte forma: 200 mL de TBS 1X ao qual são adicionados 200 μL de Tween 20 para atingir a concentração final de 0,1%. Após a lavagem, foi adicionado a solução contendo o anticorpo secundário Anti-mouse IgG – *Alkaline phosphatase antibody* (Sigma-Aldrich). Esta solução

foi preparada na proporção de 1 µL de anticorpo secundário a cada 5000 µL, desta forma, em 20 mL de solução de bloqueio foram adicionados 4 µL de anticorpo e colocados sobre a membrana. A seguir, a membrana foi incubada por mais 1 hora em mesa agitadora. Após este tempo, a lavagem com TBS 1X + Tween 20 0,1% foi repetida da mesma forma descrita anteriormente.

Depois destes processos, a etapa de revelação foi iniciada com a seguinte solução: 8 mL de água destilada, 1 mL de NBT (Nitro-blue-tetrazolium) e 1 mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato). Esta solução foi colocada em contato com a membrana e a reação ocorreu no escuro por 15 minutos com agitação para revelação do resultado.

4.16 Purificação de proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi feita no equipamento ÄKTA™Pure (GE healthcare), com a coluna HisTrap, *HP histidine-tagged protein purification columns* de 1 mL (GE healthcare). Ambas proteínas (LPMO e expansina-like) foram expressas com cauda de histidina, a qual pode ser utilizada para purificação em colunas de afinidade por níquel. Os tampões utilizados foram descritos no item 4.2.2 (*Binding buffer*) e 4.2.3 (*Elution buffer*).

Para a purificação, o extrato bruto do cultivo da proteína recombinante foi concentrado em concentrador Amicon (*Millipore Stirred Cells*). A membrana de polietersulfona de 10 kDa foi utilizada para a LPMO e a membrana de 5 kDa para a expansina-like. Após concentrar aproximadamente 10 vezes, o volume final foi filtrado (filtro polietersulfona 0,22 µm, marca Merck) e adicionado imidazol na amostra com uma concentração final de 10 mM. A seguir, a amostra foi aplicada manualmente por seringa em um *sample loop* de 500 µL no equipamento AKTA. A coluna foi equilibrada com a concentração de 10 mM de imidazol e a lavagem da coluna após a passagem da amostra foi feita com 25 mM de Imidazol. O *flow through* (fração coletada a partir da lavagem da coluna) correspondente a um volume de 10 mL foi coletado. Para a eluição, foi utilizado um gradiente linear de imidazol iniciado com uma concentração de 25 mM até 500 mM. As frações de 1 mL obtidas na etapa da eluição foram coletadas no coletor de frações (*fraction collector*) do equipamento. O fluxo utilizado na cromatografia foi de 1 mL por minuto.

4.17 Testes de atividade enzimática

4.17.1 Ensaios de atividade com a proteína recombinante LPMO

Os ensaios de atividade para a LPMO foram feitos com o kit comercial da *Thermo Scientific, Amplex red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Activity Assay*. Este kit é um ensaio acoplado que apresenta um alto grau de sensibilidade para detecção da formação do peróxido de hidrogênio pela LPMO na presença do oxigênio e um agente redutor como o ácido ascórbico. Assim, o AmplexRed reage com a peroxidase (*Horseradish peroxidase, HRP*) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com uma estequiometria de 1 para 1 gerando o produto resofurina. Esta pode ser detectada tanto por ensaio no espectrofotômetro e por fluorescência. Neste caso, o ensaio foi realizado por detecção em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm.

Para o ensaio, foram utilizadas duas concentrações de TLPMO1: 2 μ M e 10 μ M. Os cálculos das quantidades necessárias em microgramas referentes a estas duas concentrações foram realizados no site *Molarity Calculator (Quick Calcs, mass from volume & concentration)*. Para a concentração de 2 μ M foram necessários 11 μ g da proteína purificada, enquanto que para a concentração de 10 μ M, 55 μ g de proteína. Assim, a quantidade utilizada em microlitros no ensaio de atividade dependia da concentração da proteína purificada. O ensaio foi realizado conforme o protocolo descrito pelo fabricante, utilizando a curva padrão de peróxido de hidrogênio.

4.17.2 Ensaios de sinergismo com a proteína recombinante expansina

Os ensaios de atividade da proteína recombinante expansina foram feitos juntamente com celulasas, para verificar o sinergismo entre estas proteínas. O experimento foi realizado em microplacas de PCR de 96 poços contendo como substrato discos de papel filtro Whatman n°1 com peso de 3,4 mg e 7 mm de diâmetro. As reações foram feitas em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5 (item 4.2.1) a 50 °C, com um volume final de 60 μ L. O mix de celulasas utilizado foi proveniente do *celluclast* (Sigma-Aldrich) contendo hidrolases glicosídicas produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*. Além deste, foram utilizadas mix de celulasas produzidas por *Aspergillus* sp (Sigma-Aldrich) e celobiase produzida por *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich), ambas utilizadas em conjunto.

Diferentes concentrações para o mix de celulases e expansinas-like foram utilizadas (Tabela 9). O controle negativo do ensaio foi realizado com a proteína albumina do soro bovino (BSA) e foi testado com as mesmas concentrações da expansina. Para o *celluclast*, as concentrações de 0,012 e 0,06 FPU (*filter paper unit*) foram testadas separadamente e em conjunto com as diferentes concentrações de expansina e controle negativo: 0,1 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. Para as enzimas de *Aspergillus*, 1 mg de enzimas por grama de substrato foram utilizadas separadamente e em conjunto com as concentrações citadas acima de expansina e controle negativo. Desta forma, o experimento continha diversas reações que podem ser visualizadas na Tabela 9, além dos controles: do substrato (sem a presença da enzima), da enzima (sem a presença do substrato) e do espectrofotômetro (apenas tampão). A unidade de papel de filtro (FPU) corresponde a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ Mol de açúcar redutor por minuto.

Após o período de incubação, a concentração de açúcar redutor liberado foi quantificada por DNS (ácido dinitrosalisílico) pelo método proposto por Miller (1959). Os valores de açúcares liberados foram subtraídos pelos valores apresentados pelos controles. A curva padrão foi feita com glicose (estoque de 5 mg/mL) variando a concentração de 0,078 mg até 2,5 mg de açúcar. Foram adicionados aos poços da microplaca (contendo 60 μ L da reação), 200 μ L de DNS e incubados em termociclador por 10 minutos a 98 °C. Passado o tempo de incubação, as amostras foram resfriadas para 4 °C. Uma alíquota de 120 μ L foi transferida para a microplaca a fim de se realizar a leitura no espectrofotômetro a 540 nm. Assim, a partir da curva padrão a equação da reta foi gerada, nos quais os valores das absorbâncias foram substituídos para conhecer a concentração final de açúcar liberado na reação.

Tabela 9 – Concentrações utilizadas de celluclast, *Aspergillus*, expansina-like e BSA para o ensaio de sinergismo.

Celluclast e Expansina				Celluclast e Expansina			
0,012 FPU	0,012 FPU	0,012 FPU	0,012 FPU	0,06 FPU	0,06 FPU	0,06 FPU	0,06 FPU
0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1 mg	0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1 mg
Celluclast e BSA				Celluclast e BSA			
0,012 FPU	0,012 FPU	0,012 FPU	0,012 FPU	0,06 FPU	0,06 FPU	0,06 FPU	0,06 FPU
0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1 mg	0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1 mg
<i>Aspergillus</i> e Expansina				<i>Aspergillus</i> e BSA			
1mg	1 mg	1 mg	1 mg	1mg	1 mg	1 mg	1 mg
0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1 mg	0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1 mg
Expansina				BSA			
0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1mg	1 mg	0,3 mg	0,5 mg	1mg
Celluclast				<i>Aspergillus</i>			
0,012 FPU		0,06 FPU		1 mg			

4.18 Ferramentas de bioinformática

- A busca e análise de sequência foram feitas no GenBank - NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Busca de domínios conservados nas sequências de proteína:
[https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)
- As informações sobre as proteínas, como tamanho e ponto isoelétrico foram obtidas no site ExPASy: <https://web.expasy.org/protparam/>
- Informações sobre as famílias das enzimas e classificações, CAZy (Carbohydrate Active enzymes): <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>
- Predição de sítios de O-glicosilação: NetOGlyc 3.1
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/>
- Predição de sítios de N-glicosilação: NetNGlyc 1.0
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sequências gênicas putativas de proteínas acessórias

A partir de sequências descritas previamente para LPMOs e expansinas-like provenientes de diferentes fungos como por exemplo, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, estas foram comparadas e alinhadas com o genoma de *T. lanuginosus*. A partir do genoma completo deste fungo, a anotação estrutural e a busca por domínios funcionais foram realizadas, resultando na sequência putativa das proteínas de interesse. Quatro sequências gênicas codificadoras para possíveis proteínas com atividade acessória foram obtidas por mineração a partir da base de dados de domínio público (GenBank). As sequências selecionadas do fungo *T. lanuginosus* codificam para duas LPMOS (TLPMO1 e TLPMO2) classificadas na família AA9 e duas expansinas-like (TLEX2 e TLEX3) classificadas na família de cerato plataninas. Para uma análise mais aprofundada, as sequências das possíveis proteínas foram alinhadas em bancos de dados na função BLASTp. A comparação destas sequências com proteínas anteriormente caracterizadas é capaz de prever domínios conservados e função proteica similares.

5.1.1 Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (LPMOs)

As sequências de aminoácidos de TLPMO1 e TLPMO2 apresentaram o domínio conservado para a família GH61 (Figura 16). De acordo com o banco de dados CAZy, as enzimas pertencentes a GH61 foram reclassificadas para enzimas com atividade auxiliar - AA9, devido a sua baixa atividade de endoglucanase. O sítio catalítico destas enzimas é formado por resíduos de aminoácidos de ligação a metal: uma histidina N-terminal e uma histidina adicional (conhecidas como *histidine brace*), que estão envolvidas na coordenação do cobre, conforme revisado por Monclaro e Filho (2017).

A) TLPMO1



B) TLPMO2

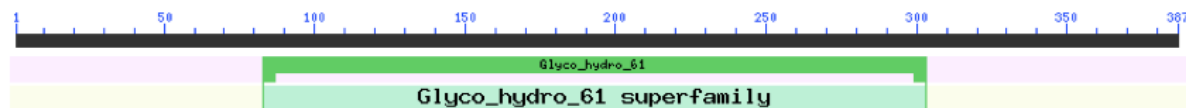


Figura 16- Domínios conservados das proteínas TLPMO1 e TLPMO2. A sequência foi analisada pelo programa online da NCBI (*conserved domains*) que busca os domínios conservados de proteínas. A) Domínio conservado de TLPMO1 e B) Domínio conservado de TLPMO2.

A sequência gênica que possivelmente codifica para LPMO (TLPMO1) possui 822 pb e codifica para uma proteína com 274 resíduos de aminoácido (Figura 17). Sua massa molecular predita é de 29,16 kDa, com um ponto isoelétrico (pI) de 4,46. De acordo com análises de predição utilizando ferramenta NetOglyc e NetNglyc (item 4.17), TLPMO1 apresenta apenas um potencial sítio de *N-glicosilação* (N129) enquanto que para *O-glicosilação* foram preditos sete sítios em resíduos de treonina e três de serina (T218, T221, T227, S259, S260, S261, T264, T266, T268, T270).

A sequência gênica correspondente a TLPMO2 possui 1161 pb e codifica para uma proteína com 387 resíduos de aminoácidos (Figura 18), com uma massa molecular predita de 41,48 kDa e pI de 6.03. A sequência possui seis possíveis sítios de *N-glicosilação* em resíduos de asparagina (N61, N131, N209, N225, N265, N345) e sete possíveis sítios de *O-glicosilação* em resíduos de treonina (T105, T119, T326, T329, T331, T337, T387).

A árvore filogenética foi construída a partir de alinhamento múltiplo com sequências de aminoácidos similares à TLPMO1 e TLPMO2. O sequenciamento do genoma de diferentes gêneros de fungos tem auxiliado na taxonomia, contribuindo para as análises filogenéticas. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicilium* (pertencentes à família Aspergillaceae) apresentaram similaridades quando alinhadas com as sequências de TLPMO1 e TLPMO2. Conforme pode ser observado na Figura 19, as LPMOs provenientes de *T. lanuginosus* ficaram agrupadas com endoglucanases e LPMOs de diferentes espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicilium*. Estudos recentes (baseados no sequenciamento do genoma) demonstraram que a família de *T. lanuginosus*, Trichomaceae, é um grupo irmão da família de Aspergillaceae (HOUBRAKEN et al, 2014), explicando possivelmente porque estas

proteínas estão agrupadas em ramos próximos. A proteína TLPMO1 quando analisada na função BLASTp, obteve identidade de 80% com uma proteína putativa da família AA9 ([XP_661115.1](#)) de *Aspergillus nidulans*. Possivelmente, devido à alta similaridade da sequência entre TLPMO1 e a proteína de *A. nidulans*, estas se agruparam em um mesmo ramo. Apesar das proteínas TLPMO1 e TLPMO2 terem sido obtidas do mesmo fungo, estas apresentam algumas diferenças na sequência de aminoácidos. Desta forma, estas se apresentaram próximas (como grupo irmão) na árvore, porém não ocuparam o mesmo ramo. As proteínas próximas aos ramos de TLPMO1 e TLPMO2 são proteínas com sequência putativa de *A. nidulans* e *A. calidoustos* ainda não caracterizadas (marcadas com asterisco na Figura 19).

```

      10      20      30      40      50      60
MKGSTTASLL LPLLASVTRT SAHGFVSNLV INGVFYRGWL PTEDPYKADP PIGVGWETPN

      70      80      90     100     110     120
LGNGFVLPPEE ASTDAIVCHK EAEPARGYAS VAAGDKIYIQ WQPNPWPESH HGPVIDYLAP

     130     140     150     160     170     180
CNGDCSTVNK  * TSLEFFKIDG VGLIDGSSPP GKWADDELIA NNGWLWQIIP EDIKPGNYVL

     190     200     210     220     230     240
RHEIIALHEA FNQNGAQIYP QCFNLQITGS GTVEPEGTPA  *  *  *  *  *  *  *
                                *  *  *  *  *  *  *

     250     260     270
TYVVPGPTLI PQAVEIEQSS SAVTATGTPT PAAA
                        * * * * *

```

Figura 17- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLPMO1. Os asteriscos cinzas representam potenciais sítios de N-glicosilação em resíduos de Asparagina, enquanto que os vermelhos apresentam potenciais sítios de O-glicosilação.

```

      10      20      30      40      50      60
MDATQMFDPPE SLGHFEGRRI GGASKIGSIE TQASILPSSW QWHDGHVEEL SKDSAAILTA

      70      80      90     100     110     120
NISTTMIFPV  * TFLAFISIAS AHGFVTKITV LGDNNKDYPG FDPSTPKVEP  *  *  *  *  *  *
                                *  *  *  *  *  *

     130     140     150     160     170     180
ASDQGYMSSS  * NASYHSKDFI CHRNAKPAPD AAQVHAGDKV QLHWTQWPGP EDHQGPILDY

     190     200     210     220     230     240
LASCNGPCSN VEKASLKWTK IDEAGRFPNG  * TWATDLLRNG GNTWNVVTIPS  *  *  *  *  *  *
                                *  *  *  *  *  *

     250     260     270     280     290     300
NEIIALHSAR NMGGAQHMYQ CVNLNVTGTG  * HRELQGVSAE EFINPTDPGI LINVWQTQSL

     310     320     330     340     350     360
SSYHIPGPTL LAADTGNDDG HSASSTLATV  *  *  *  *  *  *  *
                                *  *  *  *  *  *

     370     380
FHPVCNARFR HGSTFTLTTL VAPPART  *

```

Figura 18- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLPMO2. Os asteriscos cinzas representam potenciais sítios de N-glicosilação em resíduos de Asparagina, enquanto que os vermelhos apresentam potenciais sítios de O-glicosilação.

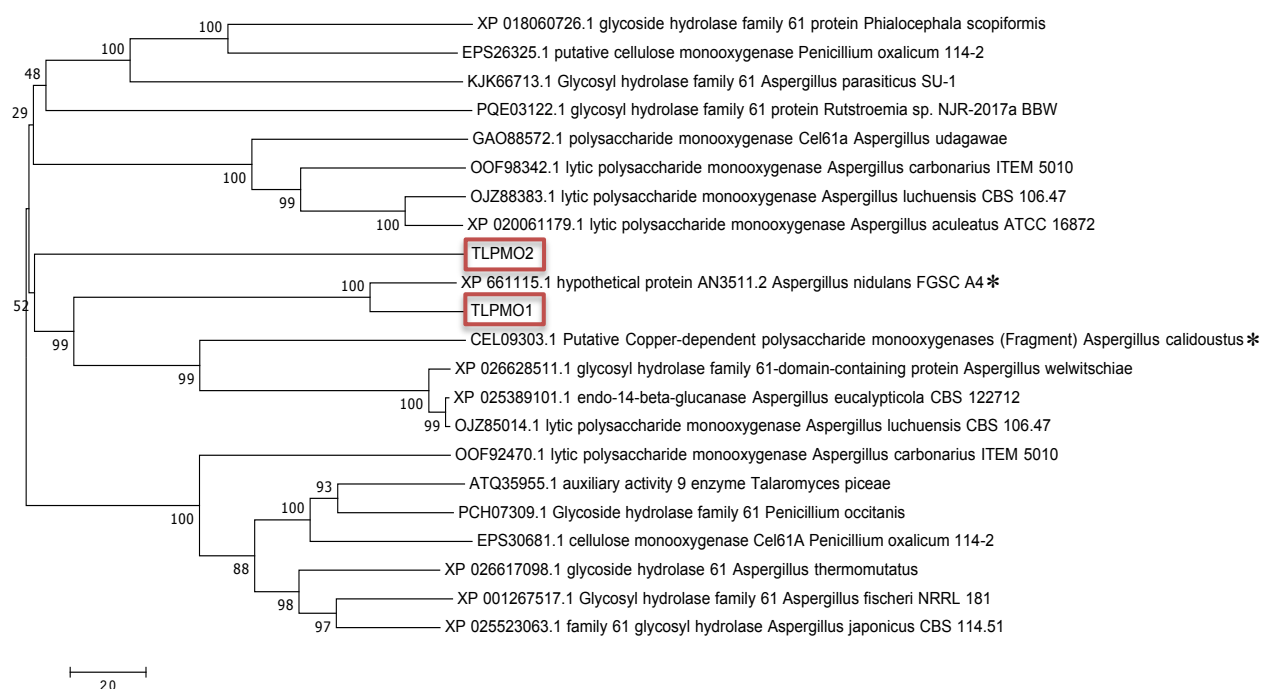


Figura 19- Árvore filogenética das proteínas TLPMO1 e TLPMO2. Uma comparação utilizando o BLASTp foi realizada para identificar sequências de proteínas com similaridade a TLPMO1 e TLPMO2. Estas sequências (marcadas pelos quadrados vermelhos) foram recuperadas do GenBank e um alinhamento múltiplo foi feito através do software MEGA 7.0. A árvore foi gerada pelo mesmo programa utilizando o método de neighbor-joining com um *bootstrap* de 1000. O asterisco apresenta uma sequência putativa de uma proteína próxima ao ramo de TLPMO1.

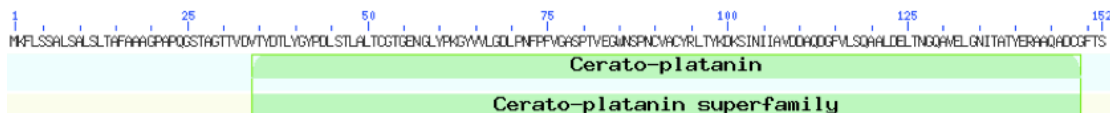
5.1.2 Expansinas-like da família *Cerato platanina*

As sequências de expansinas-like obtidas do genoma de *T. lanuginosus* quando analisadas por BLASTp apresentaram domínio conservado para a família de Cerato platanina (CP) (Figura 20). De acordo com o banco de dados pfam, a superfamília de CPs apresentam proteínas fúngicas fitotóxicas com aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos e quatro resíduos de cisteína que formam duas ligações tiosulfeto, características que podem ser observadas nas sequências de TLEX2 e TLEX3 (Figura 21 e 22). De acordo com estudos recentes, as CPs são capazes de exibir o afrouxamento de substratos celulósicos sem atividade enzimática (característico de expansinas) (COSGROVE, 2017).

A sequência gênica putativa de TLEX2 possui 456 pb que codifica para uma proteína com 152 resíduos de aminoácidos (Figura 21). A sua massa molecular predita é de 15,78 kDa, com um valor de pI de 4,03. De acordo com análises de predição utilizando ferramenta NetOglyc e NetNglyc (item 4.17), a sequência apresenta um possível sítio de *N-glicosilação* no resíduo 135 de asparagina, enquanto que três possíveis sítios são preditos para *O-*

glicosilação em resíduos de treonina (T27, T30 e T31). Para TLEX3, a sequência gênica putativa apresenta a mesma quantidade de pares de base e resíduos de aminoácidos que TLEX2. Porém, TLEX3 possui uma massa molecular predita de 15,51 kDa e pI de 4,29. Quanto a glicosilações, nenhum sítio de *N-glicosilação* e *O-glicosilação* foram previstos (Figura 22).

A) TLEX2



B) TLEX3

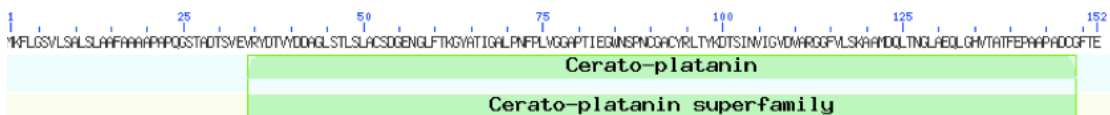


Figura 20- Domínios conservados das proteínas TLEX2 e TLEX3. A sequência foi analisada pelo programa online da NCBI (*conserved domains*) que busca os domínios conservados de proteínas. A) Domínio conservado de TLEX2 e B) Domínio conservado de TLEX3.

```

      10      20      30      40      50      60
MKFLSSALS LSLTAFAAAG PAPQGSTAGT TVDVYDTLY GYPDLSTLAL TCGTGENGLY
          * *
      70      80      90      100     110     120
PKGYVVLGDL PNFPPVGGASPT VEGWNPNCAVCYRLTYKD K SINIIAIVDD A QDGFVLSQA

      130     * 140     150
ALDELDTNGQA VELGNITATY ERAAQADCGF TS
  
```

Figura 21- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLEX2. Os asteriscos cinzas representam potenciais sítios de N-glicosilação em resíduos de Asparagina, enquanto que os vermelhos apresentam potenciais sítios de O-glicosilação. Os resíduos de cisteínas (marcados em vermelho) formam duas ligações dissulfeto.

```

      10      20      30      40      50      60
MKFLGSLVLS LSLAFAAAG PAPQGSTADT SVEVRYDTVY DDAGLSTLSL A QSDGENGLF
          *
      70      80      90      100     110     120
TKGYATIGAL PNFPLVGGAP TIEGWNPNCAVCYRLTYKD T SINVIIGVDV ARGGFVLSQA

      130     140     150
AMDQLTNGLA EQLGHVTATF EPAAPADCGF TE
  
```

Figura 22- Sequência de aminoácidos da proteína putativa TLEX3. A sequência de TLEX3 não apresenta potenciais sítios de N-glicosilação e O-glicosilação. Os resíduos de cisteínas (marcados em vermelho) formam duas ligações dissulfeto.

A partir do alinhamento múltiplo de proteínas com sequências de aminoácido similares a TLEX2 e TLEX3, uma árvore filogenética foi construída. As sequências de TLEX2 e TLEX3 são muito similares (TLEX2 possui 70% de similaridade com TLEX3) e conforme pode ser observado na Figura 23, ambas se apresentaram no mesmo ramo. Além disto, estas proteínas foram agrupadas (em grupos irmãos) juntamente com alérgenos de pólen de *A. niger* e *A. awamori*, e a cerato plataninas de duas espécies de *Aspergillus*: *A. welwitschiae* e *A. vadensis*. Possivelmente estas proteínas foram agrupadas em ramos próximos devido à relação de grupos irmãos das famílias Aspergillaceae e Trichomaceae conforme revisado por Houbraken e colaboradores (2014).

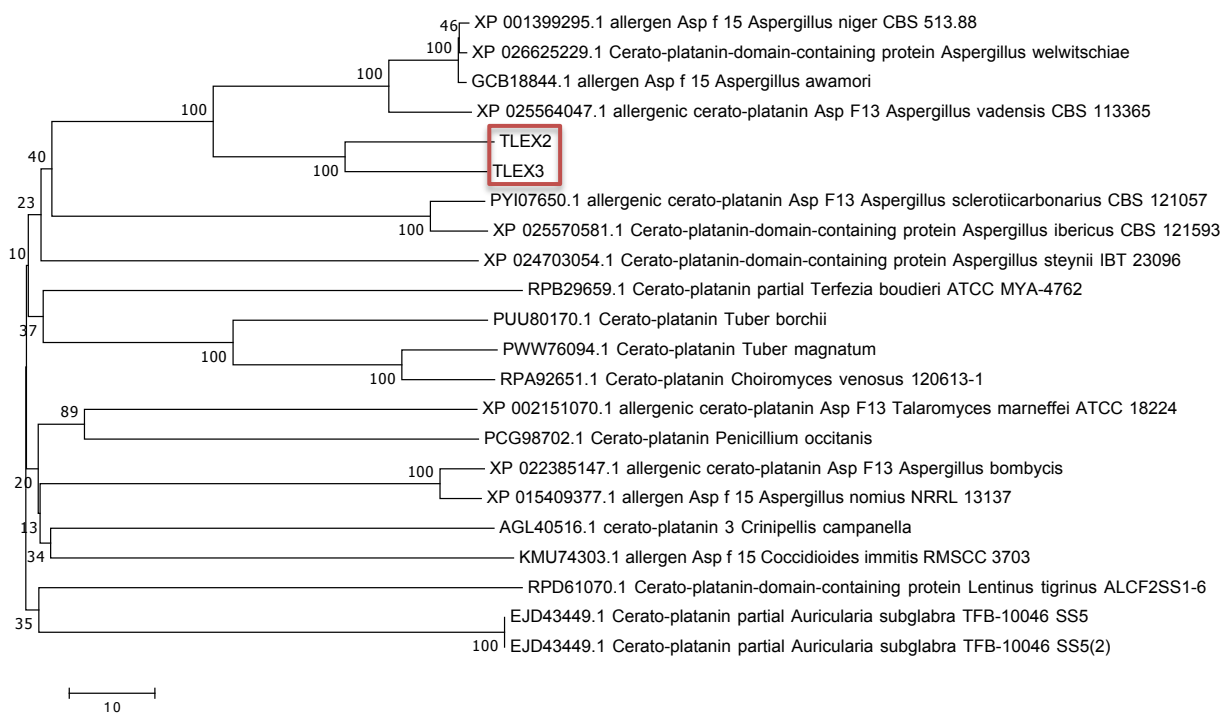


Figura 23- Árvore filogenética com as proteínas TLEX2 e TLEX3. Uma comparação utilizando o BLASTp foi realizada para identificar sequências de proteínas com similaridade a TLEX2 e TLEX3. Estas sequências foram recuperadas do GenBank e um alinhamento múltiplo foi feito através do software MEGA 7.0. A árvore foi gerada pelo mesmo programa utilizando o método de neighbor-joining com um *bootstrap* de 1000.

5.2 Expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii*

5.2.1 Transformação genética de bactérias

A partir dos clones obtidos pela transformação bacteriana, estes foram cultivados e o DNA plasmidial (vetor pGAPZ α A, contendo o gene de interesse) digerido para confirmar a

presença e tamanho dos fragmentos de genes de interesse. Na Figura 24, podem ser observados o vetor não digerido com enzimas de restrição para os genes de TLPMO1 e TLPMO2, os quais possuem tamanho previsto de 3914 e 4253 pares de base, respectivamente. O vetor pGAPZ α A vazio (sem o gene de interesse) possui 3084 pb e os fragmentos dos genes possuem 822 pb (TLPMO1) e 1161 pb (TLPMO2). O fragmento de TLPMO2 ficou abaixo do marcador de 1500 pb e TLPMO1 se apresentou pouco abaixo do marcador de 1000 pb (Figura 24 A). Ambos os fragmentos se apresentaram próximo ao tamanho esperado.

Para o vetor pGAPZB contendo os genes de expansina-like, quando não digerido apresenta um tamanho aproximado de 3284 pares de base. Os fragmentos de gene de TLEX2 e TLEX3 apresentam mesmo tamanho contendo 456 pares de base. O DNA plasmidial para a digestão foi obtido de duas colônias de bactérias transformadas com TLEX3 (colônia 1 e 2) e somente uma colônia para TLEX2 (colônia 2). Conforme pode ser observado na Figura 24 B, ambos fragmentos de gene de TLEX2 e 3 ficaram próximo ao marcador molecular de 500 pb. Desta forma, o tamanho esperado para estes fragmentos foi confirmado através da análise por gel de agarose.

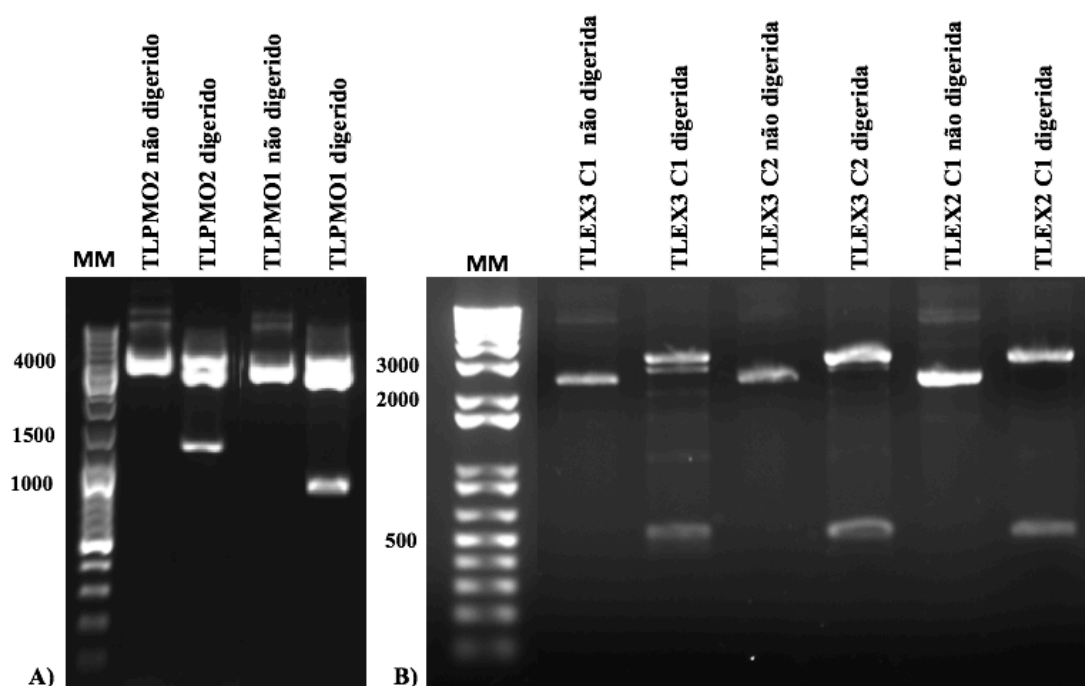


Figura 24- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial obtido de colônias transformadas de bactérias. As amostras foram digeridas com enzimas de restrição EcoRI e XbaI. A) DNA plasmidial digeridos e não digeridos contendo os fragmentos de gene de TLPMO1 e TLPMO2 O marcador molecular (MM) utilizado foi *GeneRuler DNA ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)*. B) DNA plasmidial (obtidos de colônias transformadas de bactérias) digeridos e não digeridos contendo os fragmentos de gene de TLEX2 e TLEX3. O marcador molecular utilizado *1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific)*.

5.2.2 Transformação genética de *K. phaffii*

Após a confirmação dos tamanhos corretos dos fragmentos dos genes de interesse, o DNA plasmidial purificado de cada um dos genes foi linearizado para transformação da levedura. A linearização foi realizada com uma enzima que cliva somente uma vez na região do promotor GAP e não interfere na sequência da proteína de interesse. Para a verificação, uma pequena alíquota do DNA linearizado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A migração das amostras linearizadas apresentou-se de forma distinta quando comparadas ao DNA íntegro, isto ocorre pela diferença na compactação do DNA. Com o DNA linear, a migração é mais lenta pela malha do gel devido ao maior grau de descompactação da molécula. Já na forma não linearizada, o DNA está mais enovelado e é capaz de migrar mais rapidamente pelo gel (DE-SOUZA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2016).

Desta forma, a Figura 25 A confirmou a linearização dos plasmídeos contendo TLPMO1 (possui 3914 pb e ficou próxima ao marcador de 4000 pb) e TLPMO2 (possui 4253 e ficou acima do marcador de 4000 pb) pelo padrão diferente de migração das bandas e tamanho esperado. A Figura 25 B, também apresentou a linearização de TLEX2 e TLEX3 devido a diferente migração do DNA plasmidial linearizado e não linearizado. Além disto, TLEX2 e TLEX3 ficaram acima do marcador de 3000 pb, próximos ao esperado pois ambos apresentam tamanho aproximado de 3284 pb.

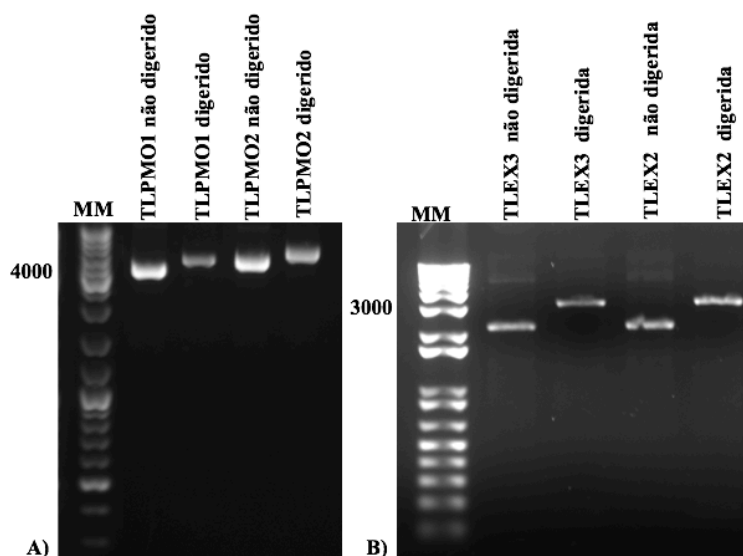


Figura 25- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial linearizado com enzima de restrição **BspHI**. A) DNA plasmidial linearizado contendo os genes de LPMO (TLPMO 1 e 2). Marcador molecular (MM) utilizado: *GeneRuler DNA ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)*. B) DNA plasmidial linearizado contendo os genes de expansina (TLEX 2 e 3). Marcador molecular (MM) utilizado: *1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific)*.

A integração no genoma da levedura ocorre por recombinação homóloga entre o DNA transformante linearizado e regiões de homologia no genoma (locus do promotor GAP) de *K. phaffii*. Com o vetor de expressão integrado no genoma, a estabilidade dos transformantes é afetada de forma positiva (CEREGHINO; CREGG, 2000). Após a transformação em levedura, as colônias capazes de crescer em meio com antibiótico foram isoladas e analisadas por PCR para a verificação da integração do plasmídeo no genoma da levedura.

5.3 Análise das colônias positivas

5.3.1 Confirmação da inserção do vetor de expressão por PCR

O DNA genômico das leveduras foi extraído empregando kit comercial e submetido à análise para confirmação por PCR da inserção do vetor de expressão no genoma de *K. phaffii*. Os oligonucleotídeos utilizados amplificaram a região do promotor GAP (forward) e terminador 3'AOX (reverse), estes produzem um produto de PCR de 540 pb que deve ser contabilizado ao inserto para interpretação dos resultados. As colônias 3 e 4 de TLPMO1 possuem tamanhos previstos de 1370 pb (830 pb do gene adicionados 540 pb). Os fragmentos ficaram pouco acima do marcador molecular de 1200 pb (Figura 26 A), próximos ao esperado.

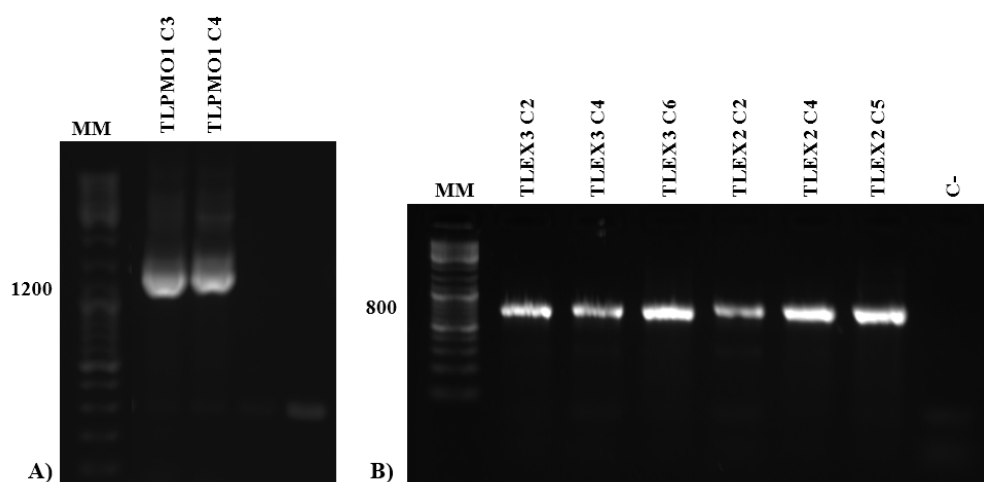


Figura 26- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de DNA amplificados por PCR para verificação da inserção do gene de interesse no genoma da levedura. (A) Colônias 3 e 4 de TLPMO1 apresentaram amplificação dos fragmentos corretos. (B) Colônias 2, 4 e 6 de TLEX3 e 2, 4 e 5 de TLEX2 apresentaram ampliação dos fragmentos corretos. O marcador molecular (MM) utilizado foi *GeneRuler DNA ladder Mix* (*Thermo Fisher Scientific*).

Para os clones expressando as expansinas-like, os oligonucleotídeos utilizados amplificaram a região do promotor GAP (forward) e terminador 3' AOX (reverse) produzindo um produto de PCR de 275 pb foram contabilizados ao inserto para interpretação dos resultados. Três colônias (2, 4 e 6) de TLEX2 apresentaram fragmentos amplificados por PCR na altura do marcador de 800 pb, confirmando o padrão esperado (456 pb adicionados 275 pb do produto de PCR, totalizando 731 pb). O fragmento de gene de TLEX3 foi amplificado nas colônias de 2, 4 e 6, apresentando migração no gel próximo ao marcador de 800 pb, confirmando o tamanho esperado de 731 pb (Figura 26 B).

A expressão da proteína TLEX2 e TLEX3 serão abordadas no tópico 5.4 enquanto que TLPMO1 e TLPMO2 vão ser relatadas no tópico 5.5.

5.4 Expressão da proteína recombinante: expansina-like (TLEX2 e TLEX3).

Uma vez que clones positivos para TLEX2 e TLEX3 foram obtidos, avaliou-se a expressão das proteínas recombinantes cultivadas em meio de cultura YPD e BMGY. Um fator importante para o crescimento de microrganismos a altas densidades celulares é a escolha do meio de cultura utilizado. Além disto, a otimização destes meios tem sido essencial para aumentar a expressão de proteínas recombinantes. A composição do meio de cultura, a proteína recombinante a ser expressa e a linhagem hospedeira escolhida devem ser levados em consideração para alcançar resultados mais satisfatórios (MATTHEWS et al, 2017).

5.4.1 Expressão das colônias positivas de TLEX2 e TLEX3 em meio YPD

Para a avaliação da expressão das colônias confirmadas por PCR, foi feito um cultivo em frascos de 250 mL com meio YPD com as colônias positivas de TLEX2 (colônias 2,4 e 5) e TLEX3 (colônias 2 e 6). As amostras retiradas no decorrer do cultivo (0 a 96 horas) foram analisadas por SDS-PAGE e *Western-blot*. As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas por BCA e foram aplicadas no gel de SDS-PAGE. Este foi corado com prata, e a banda de TLEX2 não pôde ser observada para nenhuma das colônias analisadas (Figura 27 A). O tamanho predito para a expansina-like TLEX2 é de 15,78 kDa. No trabalho de Baccelli e colaboradores (2014), uma expansina-like da família CP foi expressa em *K. phaffii* e o tamanho observado no gel de SDS-PAGE foi de 17 kDa. Além disto, as expansinas de plantas canônicas (que possuem os dois domínios conservados) apresentam tamanho

molecular pequeno próximo aos 26 kDa (BACCELLI et al, 2014). Próximo ao tamanho molecular das proteínas relatadas na literatura, as colônias de TLEX2 apresentaram a banda da proteína recombinante pouco abaixo do marcador molecular de 25 kDa quando analisadas por *Western-blot* (figura 27 B). Possivelmente o aumento do peso molecular de TLEX2 foi devido à N e O glicosilações previstas em sua sequência, pois é uma das modificações pós traducionais mais comuns em *K. phaffii* (WANG et al, 2014).

A proteína TLEX2 provavelmente foi produzida em pequenas concentrações e, desta forma, foi observada somente no *Western-blot*. A imunodeteção de proteínas em filtro de nitrocelulose, conhecido como *Western-Blot*, possui maior sensibilidade quando comparado à coloração com nitrato de prata, pois é capaz de detectar quantidades mínimas de proteína (1 a 10 pg) presentes em uma amostra (Manual Invitrogen). A técnica utiliza anticorpos específicos que se ligam a cauda de histidina da proteína recombinante permitindo a sua identificação. Para as colônias confirmadas por PCR de TLEX3, não foi possível observar a banda da proteína recombinante por SDS-PAGE e *Western-blot* conforme pode ser observado na Figura 28. A proteína TLEX3 possui um tamanho predito de 15,51 kDa e nenhuma banda foi observada próximo a este tamanho. A colônia 4 confirmada por PCR não foi cultivada, pois não apresentou crescimento na placa contendo antibiótico.

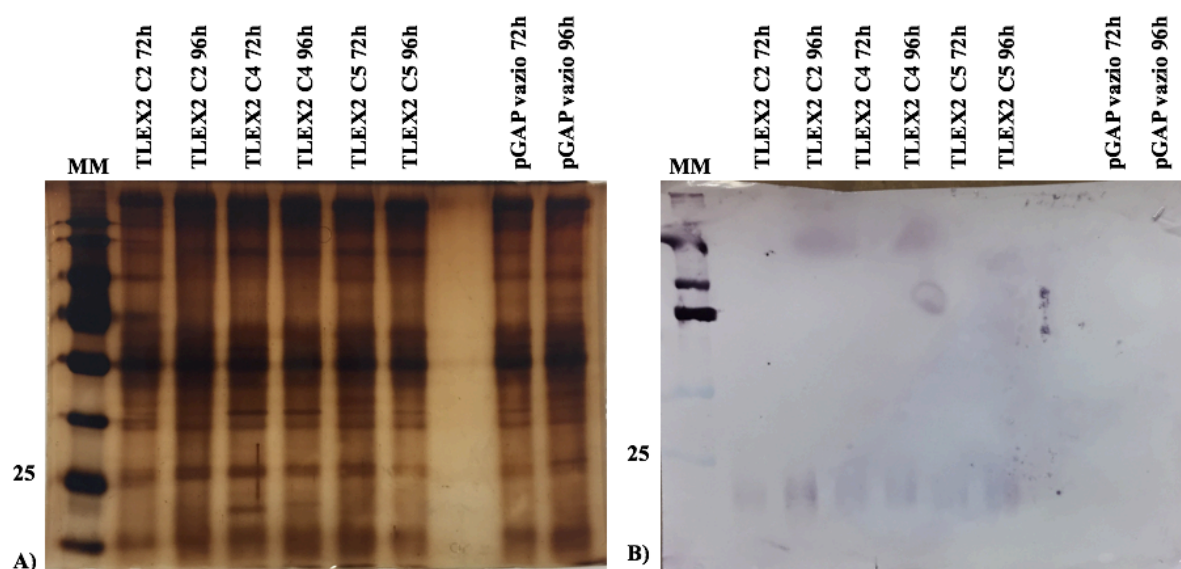


Figura 27- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX2) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em YPD. Análise das colônias positivas de TLEX2 (2, 4 e 5) por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular *Precision plus protein* (Biorad).

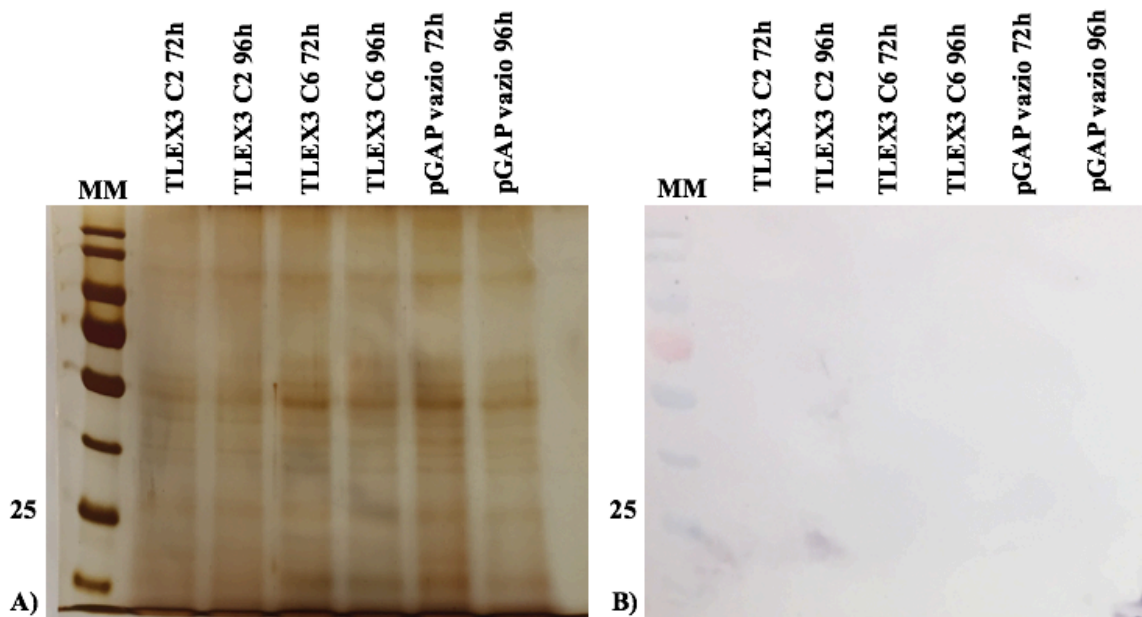


Figura 28- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX3) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em YPD. Análise das colônias positivas de TLEX3 (2, e 6) por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular, *PageRuler Plus Prestained Protein* (Thermo Fisher Scientific).

5.4.2 Expressão das colônias positivas de TLEX2 e TLEX3 em meio BMGY

O BMGY é um meio de cultura tamponado que tem como fonte de carbono o glicerol. Este é enriquecido com diversos nutrientes e bastante utilizado para a expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii*. Sendo assim, as colônias positivas de TLEX2 cultivadas em meio BMGY (frascos de 250 mL), apresentaram expressão da proteína recombinante que pôde ser detectada por gel de SDS-PAGE e *Western-blot* (Figura 29). As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas por BCA. A proteína TLEX2 novamente se apresentou próximo ao marcador molecular de 25 kDa, assim como na expressão com o meio YPD. As expansinas e expansinas-like possuem diferentes padrões de glicosilação, e podem se apresentar no gel em forma de múltiplas bandas. Trabalhos anteriores demonstram os diferentes padrões de migração das expansinas no gel, devido a sua múltipla forma molecular resultante de glicosilações (WANG et al, 2014). Conforme pode ser observado na Figura 29, a proteína TLEX2 foi expressa por todas as colônias e não se apresenta como uma banda definida. No gel de SDS-PAGE corado com prata e no *Western-blot*, TLEX2 se apresentou logo abaixo do marcador de 25 kDa em uma banda mais alongada visualmente.

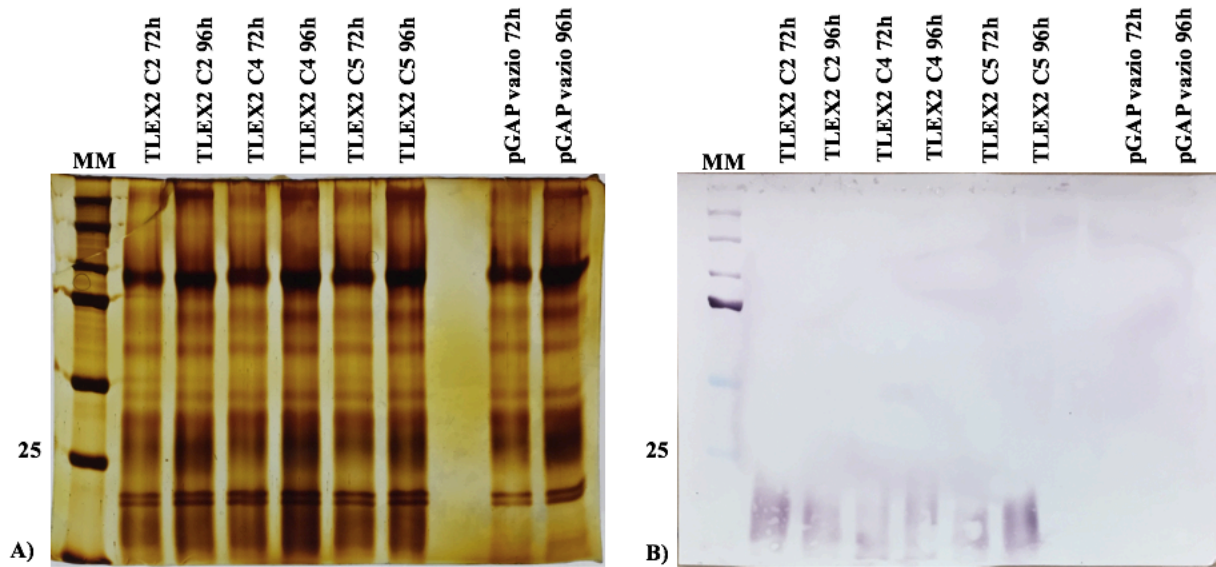


Figura 29- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX2) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em BMGY. Análise das colônias positivas de TLEX2 (2, 4 e 5) por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular *Precision plus protein* (Biorad).

Para a expansina TLEX3, as colônias positivas que tiveram inserção do cassete de expressão no genoma (2 e 6) não apresentaram expressão da proteína recombinante assim como no meio YPD. A presença da proteína não foi detectada por SDS-PAGE nem *Western-blot* (Figura 30).

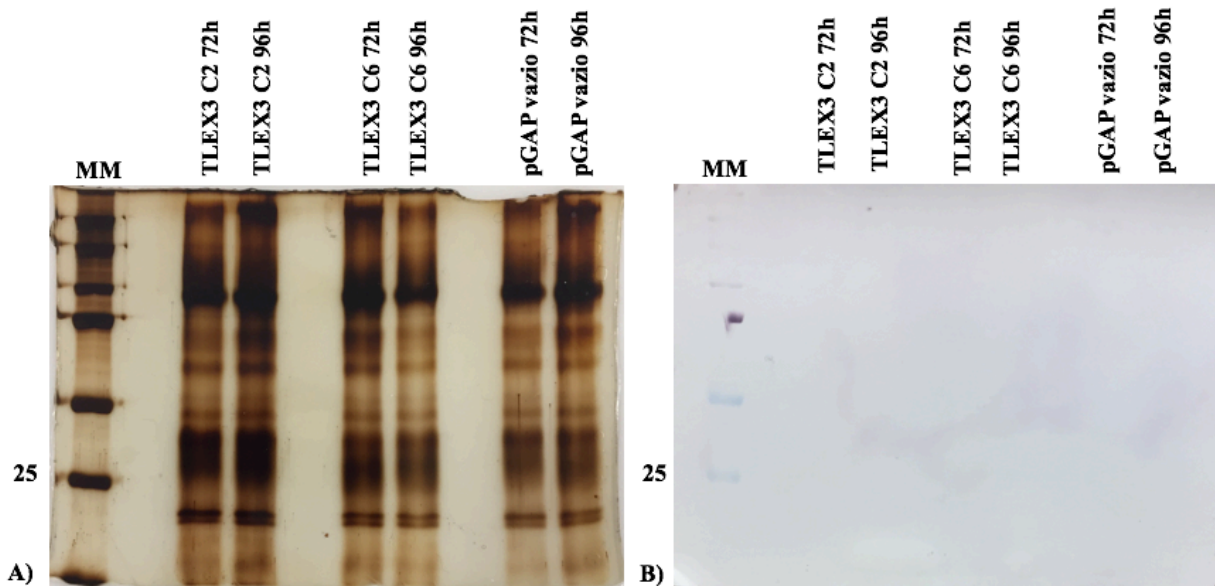


Figura 30- Análise da expressão da proteína recombinante expansina-like (TLEX3) a partir de diferentes colônias confirmadas por PCR e cultivadas em BMGY. Análise das colônias positivas de TLEX3 (2, 4 e 5) por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular *Precision plus protein* (Biorad).

Quando comparadas a expressão em YPD e BMGY, as colônias cultivadas neste último meio apresentaram maior crescimento (avaliados pela medida da densidade celular, DO₆₀₀). As leveduras crescidas em YPD chegaram a uma DO₆₀₀ próxima de 30 enquanto que para o meio BMGY a DO₆₀₀ ficou próxima de 70. Diferentes resultados no nível de expressão foram observados em estudos anteriores, comparando a glicose e o glicerol como fontes de carbono no sistema de expressão controlado pelo promotor GAP. No trabalho de Chen e colaboradores (2016) melhores resultados na expressão da proteína hialuronidase humana foram obtidas em YPD enquanto que outros trabalhos apresentam a expressão de proteínas recombinantes, como a fitase, obtendo melhores rendimentos em glicerol (meio BMGY) (TANG et al 2009). O efeito destes meios de cultura, YPD e BMGY, no nível de expressão depende possivelmente do gene que está sendo expresso (CHEN et al, 2016). Desta forma, devido a diferença de crescimento das colônias de TLEX2 e do nível de expressão entre estes dois meios, os cultivos seguintes de TLEX2 foram feitos utilizando o meio BMGY. Por não apresentar expressão em ambos os meios de cultura, o estudo da proteína TLEX3 não foi continuado nas etapas seguintes (purificação e verificação de atividade sinérgica).

Para a etapa de purificação, uma única colônia de TLEX2 foi selecionada. Por serem proteínas sem atividade hidrolítica, não existe um teste rápido e simples que determine qual colônia recombinante expresse proteína ativa. Desta forma, a colônia 2 (TLEX2-C2) foi escolhida sem critérios rígidos de seleção quanto à atividade da proteína expansina-like.

5.4.3 Purificação da proteína recombinante TLEX2-C2.

A colônia 2 de TLEX2 (TLEX2-C2) foi cultivada em 4 frascos de 1000 mL contendo 100 mL de meio BMGY, a fim de se obter maior volume de cultivo e concentração da expansina para sua purificação. Na Figura 31, TLEX2-C2 purificada pode ser observada próxima ao marcador de 25 kDa, tanto por SDS-PAGE como *Western-blot*. Porém, a concentração de TLEX2-C2 purificada se manteve muito baixa, próxima a uma concentração de 0,017 mg/mL (quantificada por BCA). Na Figura 31 A, podem ser observadas o extrato bruto (sobrenadante) da proteína TLEX2 expressa em 72 e 96 horas. Conforme pode ser visto na Figura 31 B, a expressão foi maior em 72 horas. Possivelmente, isto ocorre devido a produção de proteases por *K. phaffii* durante o cultivo. A concentração de proteases presentes no cultivo pode aumentar com o decorrer do tempo, e por consequência diminuir a produtividade da proteína de interesse (AHMAD et al, 2014). Desta forma, cultivos posteriores foram mantidos até 72 horas, no qual foi observado maior expressão.

Quando o extrato bruto foi concentrado em amicon, retirou-se uma pequena alíquota da amostra liberada para verificar se a proteína TLEX2 estava sendo retida pela membrana ou não. Como pode ser observado na Figura 31 B, a proteína TLEX2C2 não foi retida totalmente pela membrana, pois mesmo em quantidade menor foi detectada pelo *Western-blot*. A amostra de TLEX2C2 foi injetada na coluna de afinidade e após isto, foi feita a lavagem da coluna com tampão contendo 10 mM de imidazol. A banda referente a esta etapa (*flow through*) pode ser vista na Figura 31, na qual pode ser concluído que a proteína recombinante permaneceu ligada a coluna, pois não foi detectada pelo SDS-PAGE e nem pelo *Western-blot*. A proteína TLEX2-C2 foi purificada utilizando-se esta técnica cromatográfica sendo eluída numa concentração de imidazol de 110 a 193 mM. Como pode ser observado no cromatograma (Figura 32) gerado pelo equipamento Akta, um pequeno pico foi detectado próximo à fração 4, 5 e 6 que correspondem à proteína TLEX2-C2.

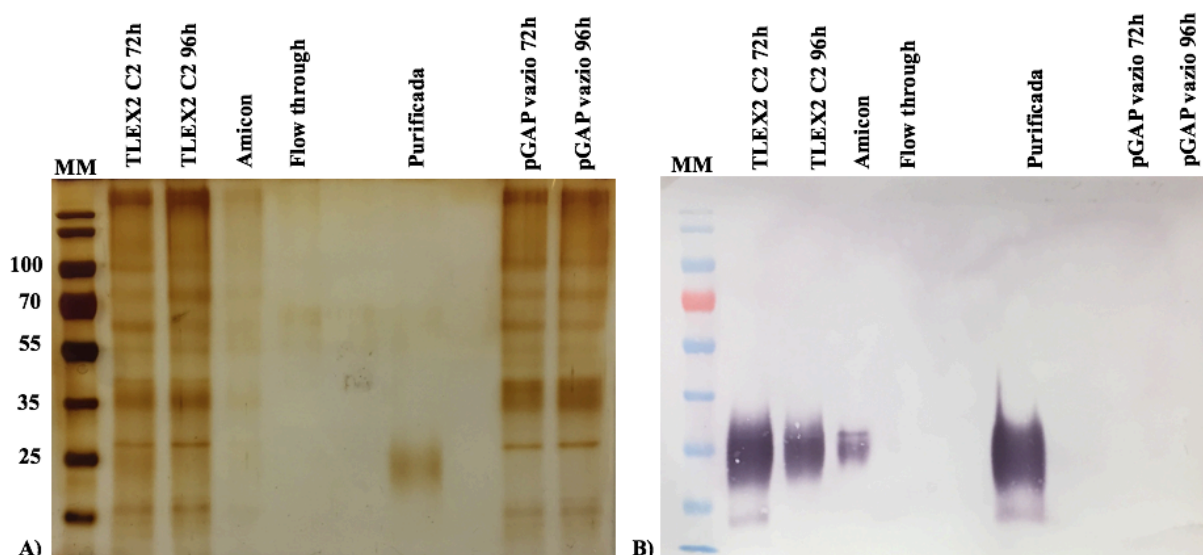


Figura 31- Análise da expressão da proteína recombinante expansina (TLEX 2) purificada produzida a partir da colônia 2 em BMGY. Análise da proteína recombinante purificada por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular, *PageRuler Plus Prestained Protein (Thermo Fisher Scientific)*.

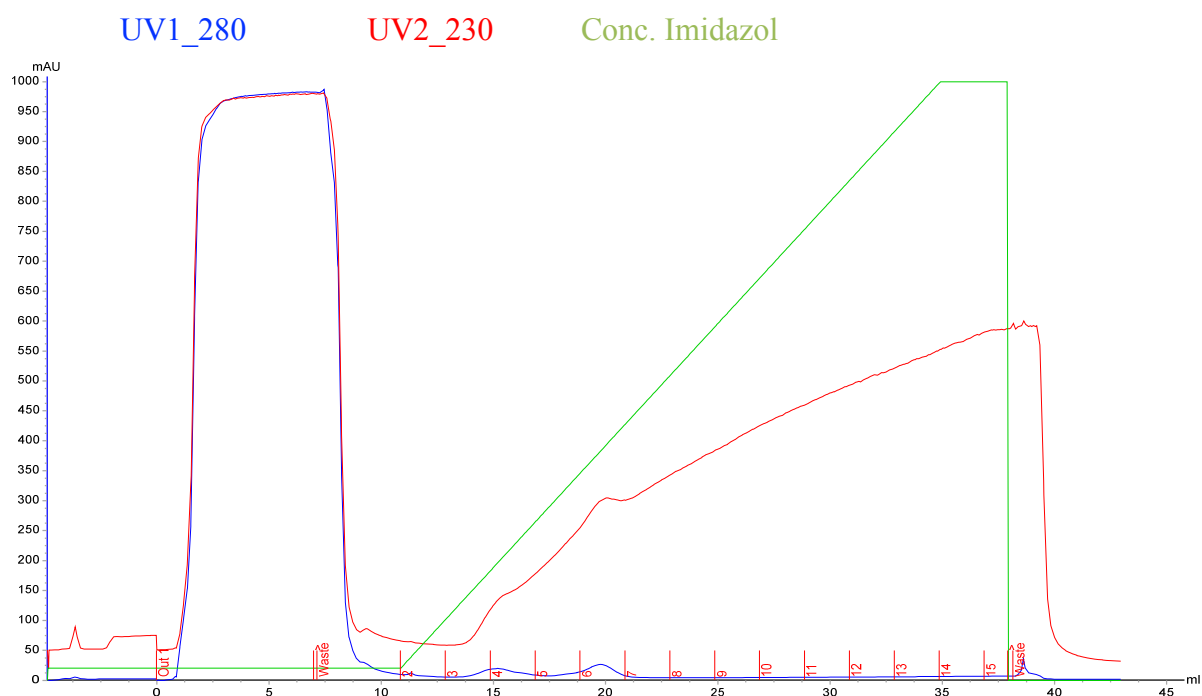


Figura 32- Cromatograma da proteína TLEX2-C2. A proteína foi eluída por um gradiente de linear de 10 a 500 mM de Imidazol (linha verde), detectada nas frações 4, 5 e 6 com a concentração 110 mM, 152 mM e 193 mM de Imidazol, respectivamente. A linha azul corresponde à absorvância de 280 nm que absorve compostos com anel aromático, enquanto que a linha vermelha (230 nm) absorve as ligações peptídicas das proteínas.

A expansina-like TLEX2-C2 de *T. lanuginosus* foi expressa sob o controle do promotor GAP e purificada pela primeira vez neste trabalho. O nível de sua expressão pode ser comparado com proteínas já descritas na literatura de expansinas de plantas, bactérias e fungos, conforme pode ser visto na Tabela 10. No trabalho de Wang e colaboradores (2014), o cultivo de duas expansinas-like foi otimizado adicionando ao meio de cultura PMSF (fluoreto de fenil-metilsulfonilo, inibidor de protease de serina e cisteína) e tablets inibidores de protease comercial. As proteínas BsEXLX1 e TrSwo1 atingiram concentrações máximas de 860 mg/L e 120 mg/L, respectivamente. Os rendimentos foram aproximadamente de 2,4 vezes maior para TrSow1 e 86 vezes para BsEXLX1 em comparação com a expressão em outras células hospedeiras (Tabela 10). Além disto, quando o inibidor de protease estava presente uma maior concentração da proteína recombinante foi constatada no sobrenadante. O trabalho de Liu e colaboradores (2015) também constatou a otimização da produção de LeEXP2 através da utilização de PMSF e tablete inibidores de protease, alcançando concentração máxima de 70,9 mg/L de proteína recombinante. Assim, para uma maior obtenção de TLEX2 cultivos com inibidores de proteases podem ser realizados para otimizar a produção desta proteína, que está relativamente baixa quando comparadas com outras expansinas-like expressas no mesmo hospedeiro (*K. phaffii*) (Tabela 10).

Tabela 10- Expressão de expansinas e expansinas-like provenientes de plantas, bactérias e fungos. *n.d., não determinado.

Organismo	Expansina	Sistema de expressão	Vetor de expressão	Condições de cultivo	Nível de expressão	Referências
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Planta LeEXP2	<i>Komagataella pastoris</i> X33	pPICZ α A	Frasco: meio BMGY/ BMMY	70,9 mg L ⁻¹	Liu et al, 2014
<i>Oryza sativa</i>	Planta OsEXP	<i>Escherichia coli</i> BL21	pET28-a p-ColdI	Meio LB	n.d.*	Seki et al, 2015
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéria BsEXLX1	<i>Escherichia coli</i>	pET21-a	Meio LB	10 mg L ⁻¹	Kim et al, 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéria BsEXLX1	<i>Komagataella phaffii</i> X33	pPICZ α A	Frasco: meio BMGY/BMMY	860 mg L ⁻¹	Wang et al, 2014
<i>Trichoderma reesei</i>	Fungo TrSwo1	<i>Komagataella phaffii</i> X33	pPICZ α A	Frasco: meio BMGY/BMMY	120 mg L ⁻¹	Wang et al, 2014
<i>Ceratocystis platani</i>	Fungo Cerato platanina	<i>Komagataella phaffii</i> GS115	pPIC9	Frasco: meio BMGY/BMMY	n.d.*	Baccelli et al, 2014
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Fungo Cerato platanina TLPMO1	<i>Komagataella phaffii</i> X33	pGAPZB	Frasco: meio BMGY	17 mg L ⁻¹	Este trabalho

5.4.4 Ensaio de sinergismo com celulases e expansina-like TLEX2C2.

Devido a ausência de atividade enzimática da proteína expansina-like, um ensaio de sinergismo com celulases (celluclast e enzimas de *Aspergillus* sp) tendo como substrato papel filtro foi realizado. O celluclast é uma solução que contém celulases provenientes de *Trichoderma reesei*, um fungo filamentosos capaz de produzir diversas enzimas de interesse industrial e laboratorial que degradam a biomassa lignocelulósica (PECIULYTE et al, 2014). Diversos trabalhos na literatura vêm demonstrando que a quantidade de açúcares redutores liberados em uma reação contendo expansinas ou expansina-like e celulases pode ser de 1,4 a 12,3 vezes maior que a reação controle contendo apenas a celulase (LIU et al, 2015). Os ensaios de sinergismo com celulases utilizam como controle negativo o BSA (WANG et al, 2014). Sendo assim, como descrito na literatura o substrato foi tratado apenas com BSA e TLEX2 que não apresentaram atividade hidrolítica conforme o esperado (Figura 33).

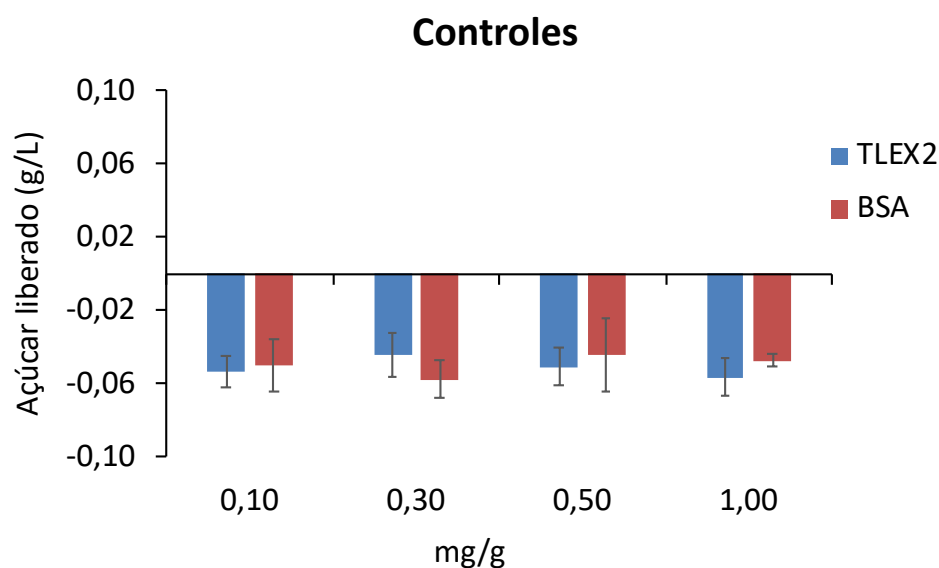
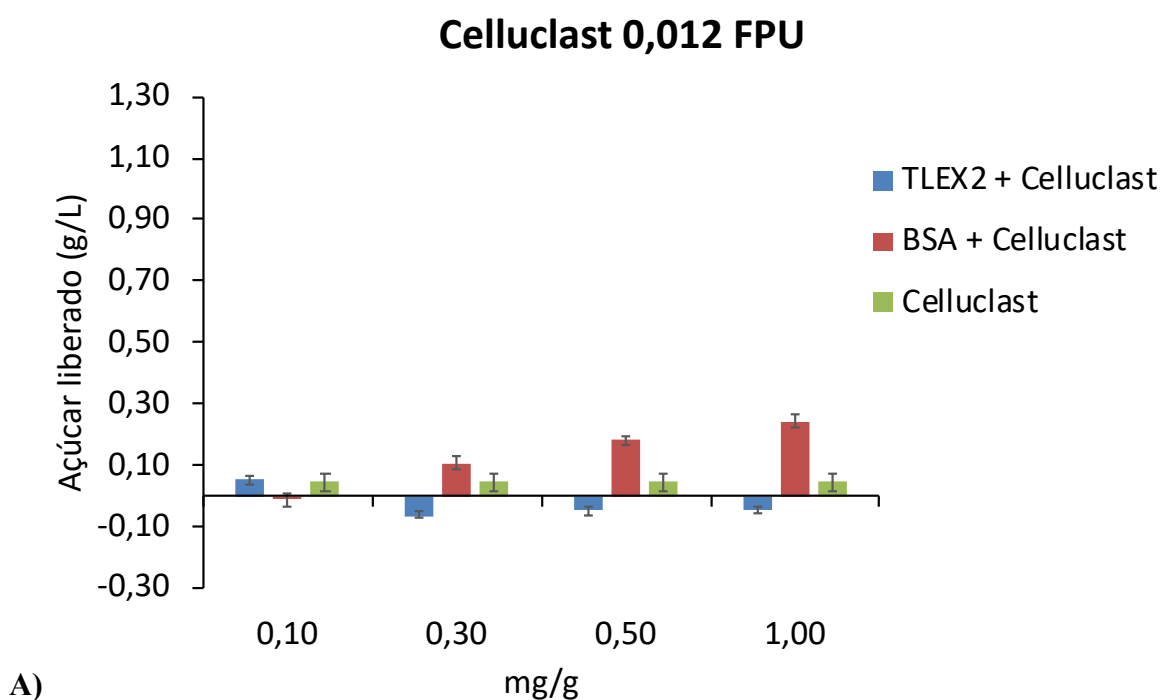


Figura 33- Controle negativo (BSA) e TLEX2. O gráfico apresenta a quantidade de açúcar liberado em g/L por TLEX2 e BSA. As diferentes concentrações das proteínas se encontram no eixo x e estão em uma concentração de miligramas por grama de substrato.

Para o celluclast, duas concentrações de enzimas foram testadas: 0,012 e 0,06 FPU. A Figura 34 A apresenta o resultado do substrato contendo somente celluclast a uma concentração de 0,012 FPU, celluclast adicionada TLEX2 e celluclast mais BSA. Conforme pode ser observado, quando tratado com celluclast mais BSA a concentração de açúcar redutor liberado do substrato foi maior. Conforme a concentração de BSA foi aumentada,

maior a quantidade de açúcar liberado. Estudos relatam que o aumento da atividade de celulases está relacionado ao fato de que BSA protege estas proteínas da desativação térmica, garantindo uma maior estabilidade (WANG et al, 2014). Não houve aumento significativo na liberação de açúcares quando comparada celluclast sozinha e celluclast incubada com TLEX2 C2.

Quando a concentração de celluclast foi aumentada para 0,06 FPU, uma maior concentração de açúcar foi liberada chegando a 1,1 g/L. Novamente, quando o substrato foi tratado com celluclast e BSA uma maior concentração de açúcar foi produzida dentre todos os tratamentos, sendo este aumento progressivo com o aumento de BSA na solução. Para TLEX2 nas concentrações de 0,3 mg/g; 0,5 mg/g e 1 mg/g, juntamente com celluclast pode ser notado um aumento na liberação de açúcar quando comparada com celluclast sozinho. Porém, as maiores concentrações de açúcares foram liberadas quando incubados com celluclast e BSA (Figura 34 B).



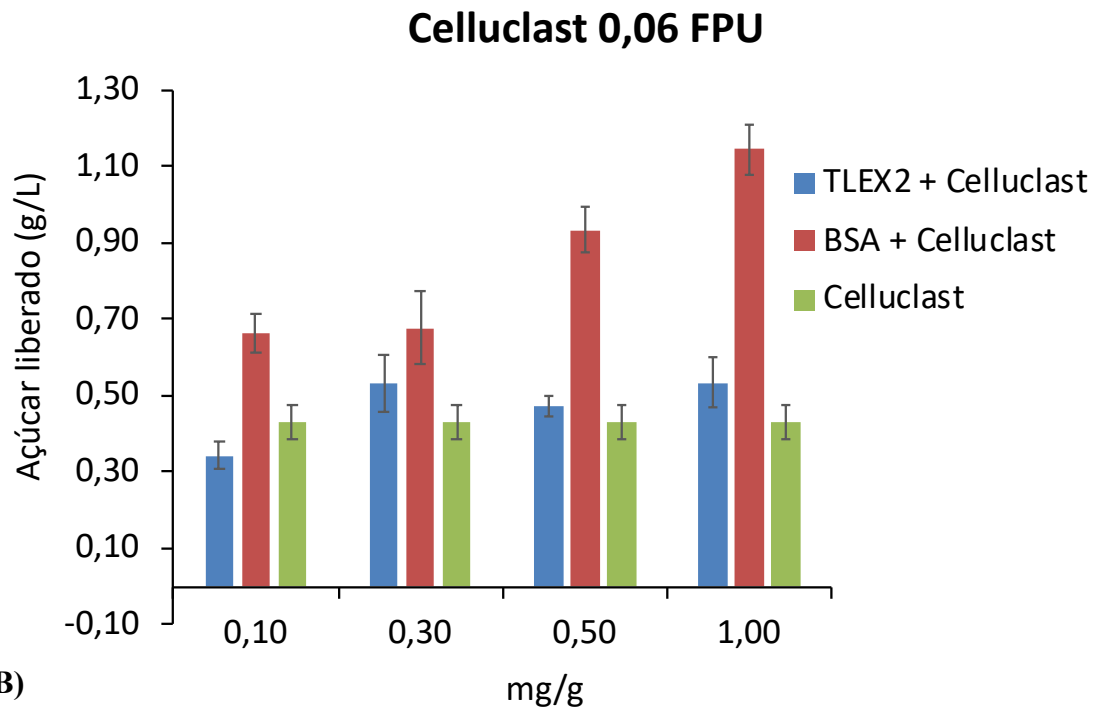


Figura 34- Substrato tratado com Celluclast sob diferentes concentrações contendo TLEX2 e BSA. O gráfico apresenta a quantidade de açúcar liberado em g/L por Celluclast adicionada TLEX2, Celluclast adicionado BSA e Celluclast sozinho. As diferentes concentrações das proteínas se encontram no eixo x e estão em uma concentração de miligramas por grama de substrato. A) Celluclast sob a concentração de 0,012 FPU. B) Celluclast sob a concentração de 0,06 FPU.

Os fungos do gênero *Aspergillus* sp. são capazes de produzir uma vasta gama de enzimas que podem ser aplicadas na conversão da biomassa lignocelulósica. Sendo assim, suas enzimas sinergicamente ativas se tornam de grande importância industrial e para a pesquisa acadêmica (HOUBRAKEN et al, 2014). Desta forma, quando o substrato foi tratado apenas com as enzimas de *Aspergillus* (1 mg/mL), esta condição apresentou uma maior liberação de açúcares (0,9 g/L) quando comparado aos outros tratamentos. Quando incubadas em conjunto com BSA e expansina-like, não foram observados o aumento da liberação de açúcares do substrato. Ambos tratamentos liberaram uma quantidade bastante próxima de açúcar conforme pode ser observado na Figura 35.

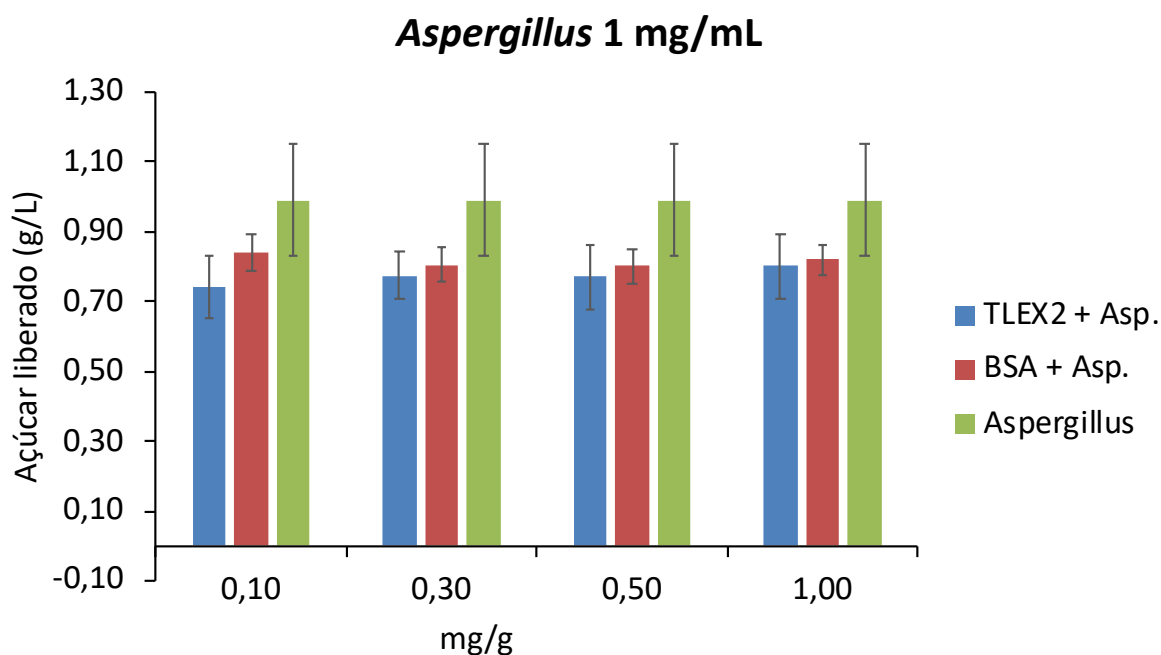


Figura 35- Substrato tratado com enzimas de *Aspergillus* contendo TLEX2 e BSA. O gráfico apresenta a quantidade de açúcar liberado em g/L por enzimas de *Aspergillus* a uma concentração de 1 mg/mL. O substrato foi tratado adicionando *Aspergillus* e TLEX2, *Aspergillus* e BSA e *Aspergillus* sozinho. As diferentes concentrações das proteínas se encontram no eixo x e estão em uma concentração de miligramas por grama de substrato.

Sendo assim, não foi observado um efeito sinérgico entre a proteína TLEX2 e as celulases. O resultado do ensaio não foi surpreendente, pois até então não foram reportadas CPs que possuam atividade sinérgica com celulases. No estudo de Bacelli e colaboradores (2014), CP não aumentou a atividade de celulases além daquela observada em BSA. Apenas a sua capacidade de afrouxar as fibras de celulose do papel filtro foi descrita. Porém, CPs recém identificadas (como a deste trabalho) devem ser analisadas quanto a sua capacidade sinérgica, já que estas são capazes de afrouxar as fibras de celulose e facilitar o acesso de celulases ao substrato aumentando a quantidade de açúcares liberados. Desta forma, ensaios para a verificação da capacidade do afrouxamento de fibras de celulose posteriores devem ser realizados com TLEX2.

5.5 Expressão da proteína recombinante: LPMO (TLPMO1 e TLPMO2)

5.5.1 Avaliação da expressão de TLPMO1 sob controle do promotor pGAP

A fim de se avaliar a expressão das proteínas recombinantes das colônias 3 e 4 de TLPMO1 confirmadas por PCR, foi feito o crescimento em meio YPD em frascos Erlenmeyer. Ao decorrer do crescimento, foram retiradas amostras nos pontos de 0 a 96 horas (nas quais as proteínas foram quantificadas por BCA) que foram submetidos a análise por SDS-PAGE e *Western-Blot*. O gel SDS contendo o sobrenadante do cultivo das colônias 3 e 4 de TLPMO1 foram coradas primeiramente com *Comassie-Blue*. Ao comparar o padrão de bandas com o controle (pGAPZ α A vazio), foi possível a visualização de bandas de aproximadamente 40 kDa conforme pode ser observado pelas setas na Figura 36. A massa molecular prevista para a proteína TLPMO1 foi de 29,16 kDa, porém ao adicionar o peptídeo sinal, epítipo myc, cauda de histidina à sequência e possíveis N e O glicosilações, a sua massa molecular pode ter sido aumentada, levando a acreditar que a banda vista no gel poderia pertencer a TLPMO1. Para a confirmação da proteína recombinante, o gel de SDS foi corado com Nitrato de prata que é considerado de 100 a 1000 vezes mais sensível na detecção de baixas concentrações da proteína de interesse (Figura 37). (DE-SOUZA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2016). As bandas por volta de 40 kDa se confirmaram como sendo proteínas nativas de *K. phaffii* X33, pois o controle negativo apresentou o mesmo padrão de bandas conforme apontados pelas setas na Figura 37.

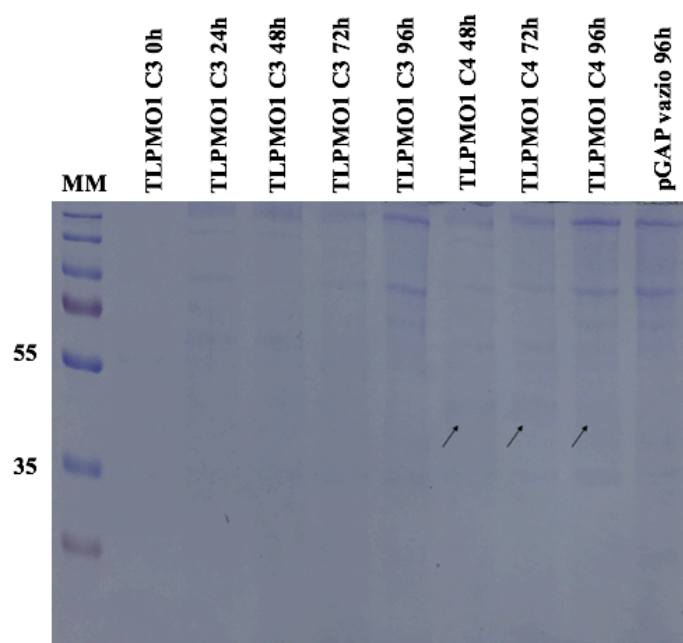


Figura 36- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 por SDS-PAGE a partir das colônias 3 e 4 confirmadas por PCR e corado com *Comassie-Blue*. Os diferentes pontos (0 a 96 horas) retirados durante o experimento de expressão enzimática, assim como o controle negativo (pGAPvazio). Marcador molecular *PageRuler Plus Prestained Protein* (*Thermo Fisher Scientific*).

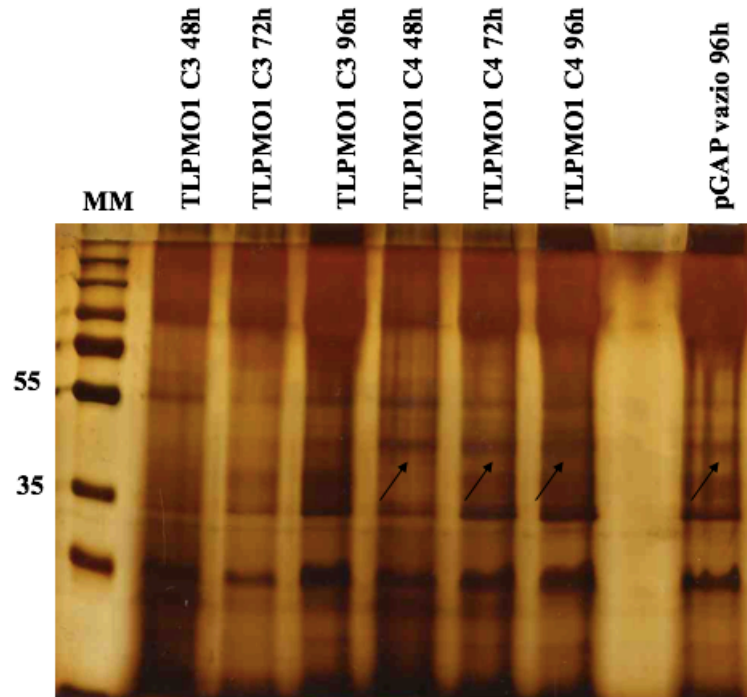


Figura 37- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 por SDS-PAGE a partir das colônias 3 e 4 confirmadas por PCR e corado com Nitrato de Prata. Os diferentes pontos (48 a 96 horas) retirados durante o experimento de expressão enzimática, assim como o controle negativo (pGAPvazio). Marcador molecular *PageRuler Plus Prestained Protein* (Thermo Fisher Scientific).

Como as colônias 3 e 4 de TLPMO1 tiveram a inserção do plasmídeo no genoma da levedura, é possível que a proteína recombinante tenha sido produzida em concentrações muito baixas que não foram visualizadas por SDS-PAGE. Por possuir maior sensibilidade para detecção de proteínas, foi feito o *Western-blot*. Porém, o ensaio não apresentou resultado positivo confirmando que a proteína TLPMO1 não foi produzida. Possivelmente, a proteína pode ter sido expressa em concentrações muito baixas e não foi detectada por nenhuma das metodologias citadas. Além disto, o anti-corpo anti his-tag pode não ter se ligado à TLPMO1 devido a sua conformação (não expondo a cauda de histidina) e assim, não marcando a banda da proteína no *Western-blot*. Desta forma, uma nova estratégia foi abordada: o fragmento de gene de TLPMO1 e TLPMO2 foram clonados em vetor sob controle do promotor AOX e os resultados das etapas de clonagem e ligação são descritas nos itens a seguir.

5.5.2 Expressão de TLPMO1 e TLPMO2 clonadas no vetor pPICZαA

5.5.2.1 Clonagem dos genes no vetor pPICZαA

Os genes correspondentes às LPMOs foram clonados originalmente no vetor controlado pelo promotor GAP. Para a clonagem no vetor pPICZ α A, os fragmentos dos genes ainda ligados no vetor pGAPZ α A foram tratados com enzimas de restrição a fim de liberar os fragmentos para a clonagem no vetor sob o controle do promotor AOX1. Desta forma, o vetor pPICZ α A também foi submetido à digestão nos sítios de restrição específicos aonde seriam clonados os fragmentos de gene das LPMOs. Desta forma, foi feito um gel para confirmar a digestão dos fragmentos corretos e sua purificação. Como pode ser observado na Figura 38, o fragmento de gene de TLPMO1 (822 pb) ficou acima do marcador molecular de 700 pb, enquanto TLPMO2 (1161 pb) se apresentou pouco acima do marcador de 1000 pb. Ambos os fragmentos ficaram próximos ao tamanho esperado. O vetor pPICZ α A vazio apresenta tamanho aproximado de 3600 pb, quando digerido por XbaI e EcoRI seu tamanho diminui em aproximadamente 65 pb. Conforme observado na Figura 38, o vetor não digerido se apresentou próximo ao marcador de 4000 pb. Após a digestão, o vetor apresentou diferente padrão de migração no gel com a banda pouco abaixo do vetor não digerido. Sendo assim, os fragmentos de gene e vetor se apresentaram no tamanho esperado, e foram purificados a partir do gel. A reação de ligação entre os fragmentos de gene e o vetor purificados foram realizadas com a enzima T4 ligase.

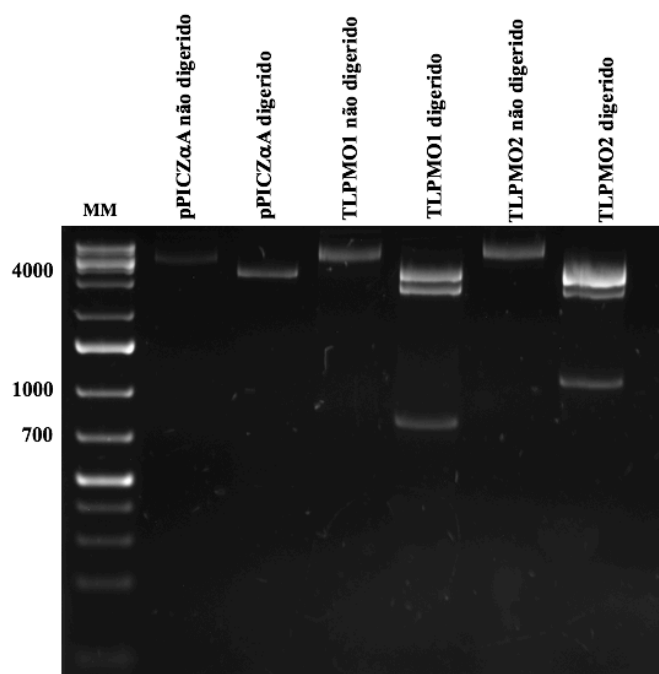


Figura 38- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de gene de TLPMO1, TLPMO2 e vetor pPICZ α A digeridos por XbaI e *ecoRI*. Marcador Molecular (MM) 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

Após a ligação do gene desejado (TLPMO1 e TLPMO2) com o vetor pPICZ α A, o sistema foi utilizado para transformar a bactéria *E. coli*. Para TLPMO1, o crescimento de apenas uma colônia foi observado na placa, enquanto que para TLPMO2, três colônias apresentaram crescimento. Sendo assim, estas colônias foram cultivadas e submetidas a purificação do DNA plasmidial. Este DNA foi então novamente digerido com as enzimas de restrição específicas (locais aonde foram inseridos os fragmentos de interesse) para verificação da ligação dos fragmentos ao vetor. A colônia 1 de TLPMO1 apresentou um fragmento com tamanho esperado próximo ao marcador molecular de 800 pb. Para TLPMO2, a colônia 1 apresentou um fragmento próximo ao marcador de 1200 pb, a colônia 2 (TLPMOC2) apresentou fragmento pouco acima ao marcador 1000 pb e a colônia 3 não apresentou liberação do fragmento do gene de interesse (Figura 39).

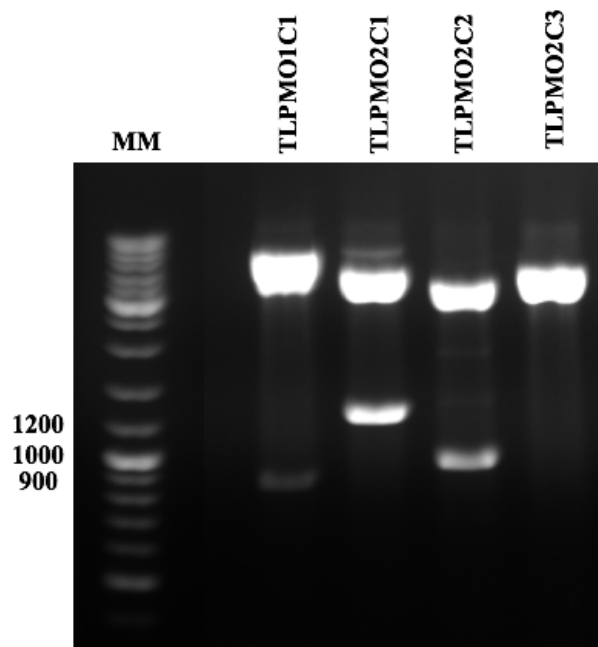


Figura 39- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% para confirmar a ligação dos fragmentos digeridos dos genes de TLPMO1 e TLPMO2 no vetor pPICZ α A. A digestão foi feita com as enzimas de restrição XbaI e EcoRI. Marcador Molecular (MM) 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

Desta forma, a colônia 1 de TLPMO1 foi utilizada para o restante dos experimentos pois apresentou o fragmento de gene do tamanho esperado. Para TLPMO2, a colônia 2 foi selecionada para os demais experimentos, já que foi a única entre as três, que exibiu o fragmento de gene próximo ao tamanho esperado. Assim, ambas colônias positivas para o vetor com o gene de interesse ligado foram cultivadas e seu DNA plasmidial purificado para transformação genética de levedura.

5.5.2.2 Obtenção de transformantes de *K. phaffii* com TLPMO 1 e 2

Para a transformação de *K. phaffii*, é necessário que o plasmídeo esteja linearizado para a eficiente recombinação entre o plasmídeo pPICZ α A e regiões de homologia (locus do promotor AOX1) no genoma da levedura. Conforme pode ser visto na Figura 40, o DNA plasmidial não linearizado e linearizado migraram pela malha do gel de forma diferente. A amostra linearizada ficou entre o marcador molecular de 4000 pb e 5000 pb, tamanho aproximado de TLPMO1 (4400 pb) e TLPMO2 (4700 pb). Assim, após a confirmação o DNA linear foi transformado em levedura sendo possível a obtenção de clones para TLPMO1 e TLPMO2.

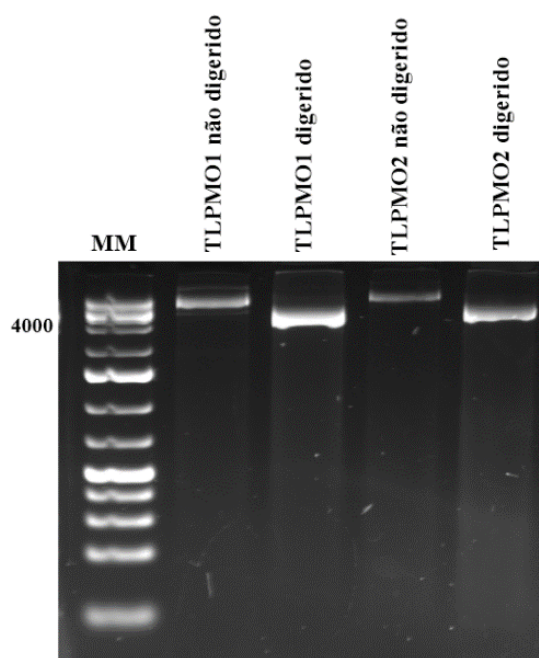


Figura 40- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% para confirmar a linearização dos genes de TLPMO1 e TLPMO2 no vetor pPICZ α A. A enzima de restrição PmeI foi utilizada. Marcador Molecular (MM) 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

Para a confirmação do inserto no genoma da levedura, foi feito uma PCR das colônias obtidas pela transformação. Para a interpretação correta dos resultados, os oligonucleotídeos utilizados que amplificaram a região do promotor AOX5' (forward) e terminador 3'AOX (reverse) produzindo um produto de PCR de 588 pb foram contabilizados ao inserto. Diferentes padrões de banda podem ser visualizados no gel de agarose, caso os fenótipos das colônias transformadas sejam diferentes. Para o fenótipo Mut⁺, uma banda com tamanho de 2200 pb correspondente ao gene AOX1 e outra banda do tamanho do inserto (adicionado o

produto de PCR) podem ser visualizadas. Este é denominado como Mut⁺, pois o promotor do gene AOX1 continua intacto sendo capaz de assimilar o metanol de maneira habitual. Para o fenótipo Mut^S, a letra “s” é proveniente do inglês *slow* (devagar) na qual o metanol é assimilado de maneira menos eficiente, pois o plasmídeo é integrado na região do gene AOX1 fazendo com que tenha a sequência modificada e apenas o gene AOX2 continua ativo. Quando analisado em gel de agarose, apenas a banda do inserto pode ser observada para o fenótipo Mut^S. Ainda pode ocorrer o fenótipo Mut⁺, no qual a assimilação de metanol é comprometida pois ambos genes (AOX1 e AOX2) foram modificados pela integração do plasmídeo (COS et al, 2016).

Assim, catorze colônias foram avaliadas para a confirmação da inserção do fragmento de interesse no genoma de *K. phaffii*. Diversas bandas foram amplificadas demonstrando fenótipos Mut⁺ e Mut^S. As colônias 8 e 11 apresentaram amplificação do gene AOX1 (fragmento de 2200 pb) que migrou próximo ao marcador molecular de 2000 pb e a banda correspondente ao gene de interesse (822 pb) adicionados ao produto de PCR (588 pb) totalizando 1410 bp. Sendo assim, as colônias 8 e 11 apresentam o fenótipo Mut⁺, pois as duas bandas esperadas (gene AOX1 e inserto) foram amplificadas. Apesar da fraca intensidade, a amplificação da banda do inserto e do gene AOX1 também foram observadas nas colônias 14, 15 e 16. As colônias 4, 13 e 17 apresentaram apenas a amplificação da banda do inserto, sugerindo o padrão para o fenótipo Mut^S. As demais colônias não apresentaram amplificação da banda correspondente ao inserto ou ao gene AOX1 (Figura 41).

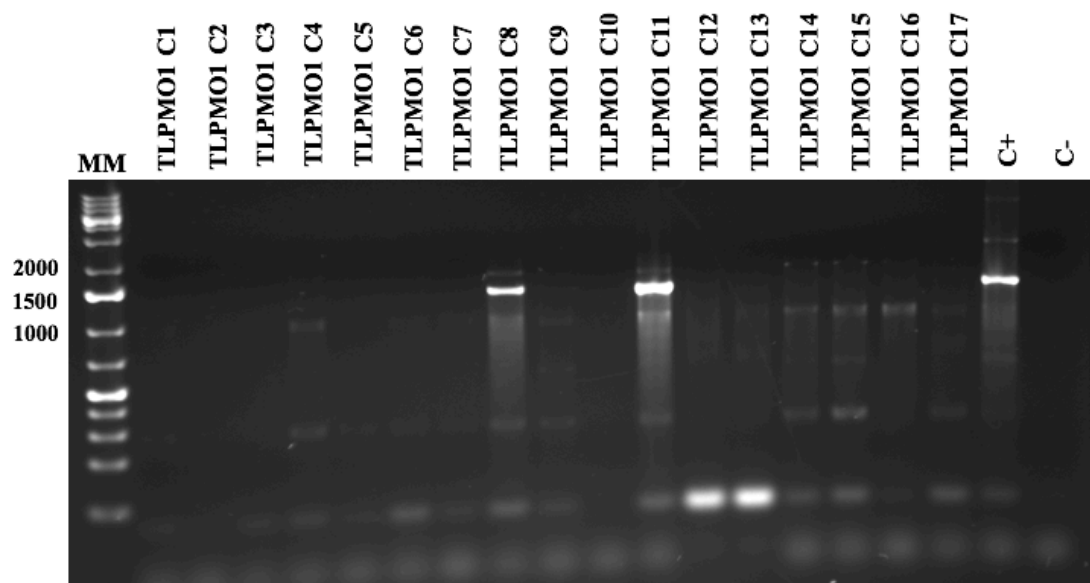


Figura 41- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de DNA amplificados das colônias de TLPMO1 por PCR para verificação da inserção do gene de interesse no genoma da levedura. O marcador molecular (MM) utilizado foi *GeneRuler DNA ladder Mix* (*Thermo Fisher Scientific*).

Assim, as colônias 4, 8, 11, 13, 14, 15, 16 e 17 foram selecionadas para a etapa de cultivo e verificação da expressão da proteína recombinante TLPMO1.

Para TLPMO2, dezessete colônias foram obtidas pela transformação de leveduras e avaliadas por PCR. Os oligonucleotídeos utilizados que amplificaram a região do promotor AOX5' (forward) e terminador 3'AOX (reverse) produzem um produto de PCR de 588 pb que foram contabilizados a TLPMO2, totalizando em 1757 pb (1169 pb adicionados a 588 pb). Conforme pode ser observado na Figura 42, as colônias 11 e 17 apresentaram a amplificação da banda do gene *AOX1* (2200 pb) pouco abaixo do marcador de 2500 pb e a banda relativa ao inserto (1757 pb) próximo ao marcador molecular de 2000 pb, sendo assim possivelmente Mut⁺. Apesar da baixa intensidade, a banda do gene *AOX1* foi amplificada nas colônias 9 e 10 apresentando a amplificação desta e do inserto próximos ao marcador de 2000 pb. As demais colônias não apresentaram amplificação do DNA plasmidial contendo o gene de interesse TLPMO2. Assim, as colônias 9, 10, 11 e 17 foram cultivadas para avaliar a expressão da proteína recombinante por SDS-PAGE e *Western-blot*.

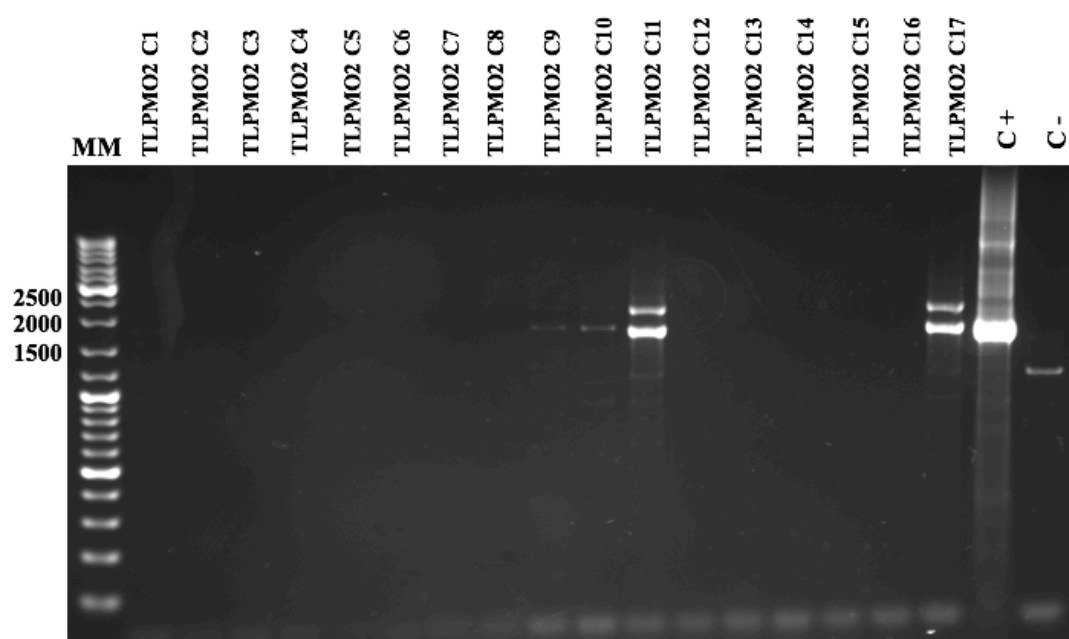


Figura 42- Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% de DNA amplificados das colônias de TLPMO2 por PCR para verificação da inserção do gene de interesse no genoma da levedura. O marcador molecular (MM) utilizado foi *GeneRuler DNA ladder Mix* (*Thermo Fisher Scientific*).

5.5.2.3 Expressão da proteína TLPMO1

As oito colônias confirmadas por PCR de TLPMO1 foram cultivadas em frascos de 250 mL contendo meio BMMY. A Figura 43 A, apresenta o gel de SDS-PAGE confirmando

a expressão da LPMO das colônias 4, 8, 11 e 13. O tamanho predito para TLPMO1 é de 29,16 kDa, porém esta se apresentou próximo ao marcador molecular de 55 kDa e 130 kDa. Este aumento do tamanho da proteína pode estar relacionado com a adição do epítipo myc, cauda de histidina à sequência e possíveis sítios para N e O glicosilações. O ensaio de *Western-blot* também detectou a presença da proteína TLPMO1 (Figura 43 B). As colônias 14, 15, 16 e 17 também foram cultivadas nas mesmas condições, a expressão da proteína TLPMO1 foi visualizada pelo gel de SDS-PAGE e por *Western-blot* (Figura 44). Assim, todas as colônias confirmadas por PCR expressaram a proteína TLPMO1 contendo uma banda próxima ao marcador molecular de 55 kDa e uma banda apresentando possível dimerização próxima ao marcador de 130 kDa. Provavelmente, a proteína TLPMO1 também pode ter sofrido glicosilações (pois possui sítios potenciais) aumentando o seu tamanho molecular. No trabalho de Jagadeeswaran e colaboradores (2018), uma LPMO recombinante de *A. nidulans* (AN1602) produzida em *K. phaffii* apresentava tamanho esperado de 36,7 kDa, porém o observado foi por volta de 75 kDa. Assim como TLPMO1, a diferença no tamanho molecular da proteína AN1602 provavelmente decorreu de N e O glicosilações fato que já foi observado em diversas LPMOs (JAGADEESWARAN et al, 2018).

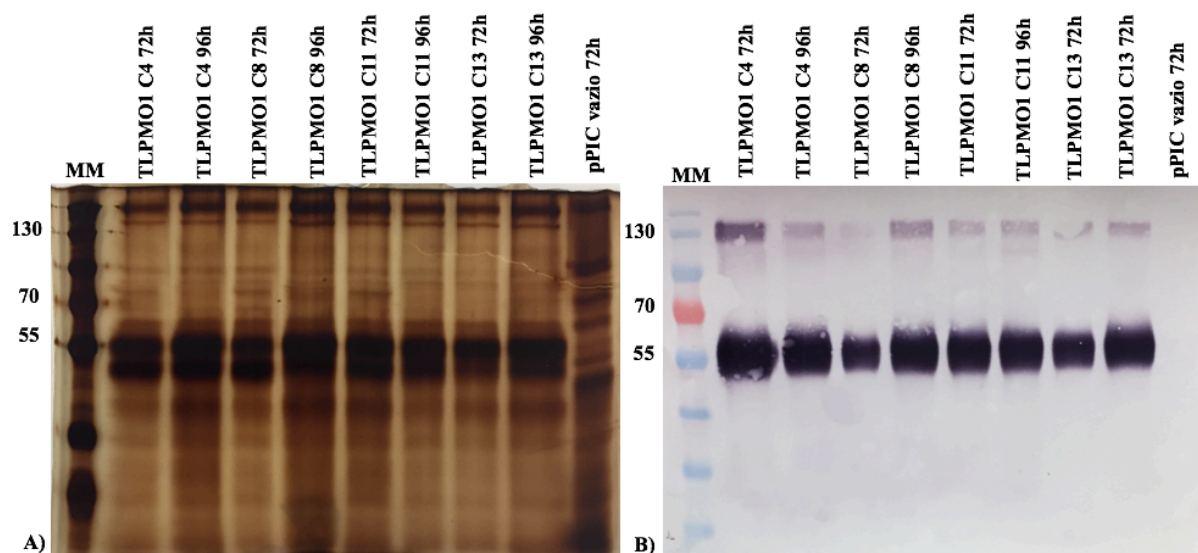


Figura 43- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 a partir das colônias 4, 8, 11 e 13 confirmadas por PCR e cultivadas em BMMY. Análise da expressão das colônias 4, 8, 11 e 13 de TLPMO1 por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular *Precision plus protein* (Biorad).

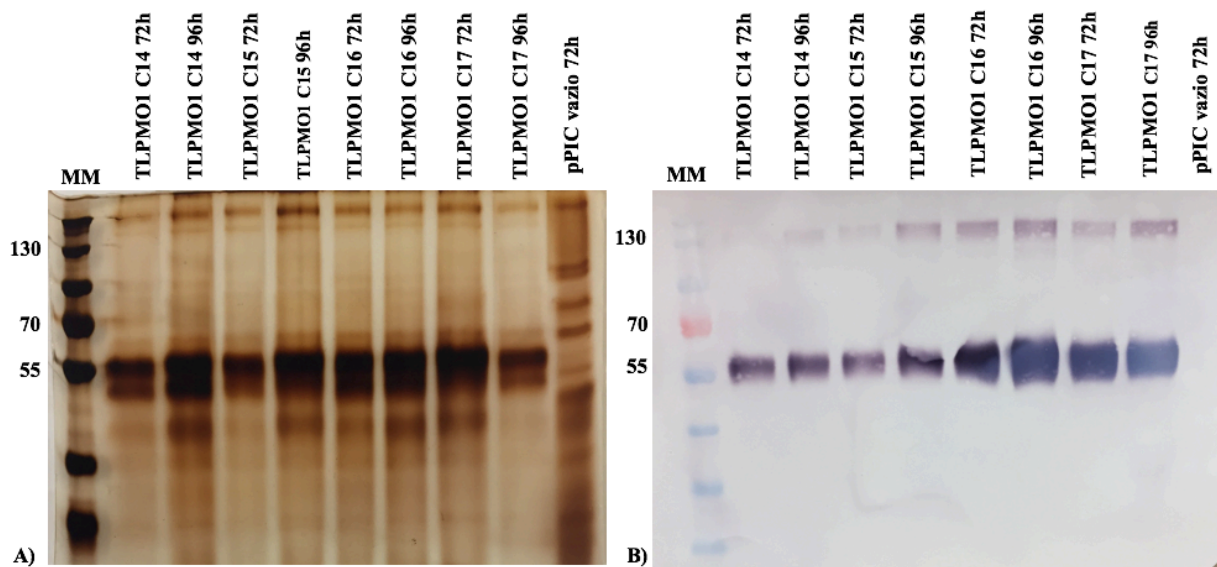


Figura 44- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 a partir das colônias 14, 15, 16 e 17 confirmadas por PCR e cultivadas em BMMY. Análise da expressão das colônias 14, 15, 16 e 17 de TLPMO1 por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular *Precision plus protein* (Biorad).

Sendo assim, por não possuir um teste de atividade rápido e de baixo custo, apenas uma colônia confirmada de TLPMO1 foi escolhida para testes posteriores pelo seu fenótipo. A colônia 8 de TLPMO1 (TLPMO1-C8) que possui o fenótipo Mut⁺ foi selecionada para as etapas posteriores de cultivo e purificação. Os diferentes fenótipos, como Mut⁺ e Mut^S, apresentam diferenças na produção da proteína recombinante e crescimentos celular. A escolha de clones Mut⁺ vem sendo relatada na literatura como um fenótipo utilizado para expressão de diversas proteínas como revisado no trabalho de Macauley-Patrick e colaboradores (2005). Porém, o fenótipo ideal para uma dada aplicação pode diferir exibindo linhagens Mut^S com maior produtividade do que as colônias Mut⁺ em alguns casos (IA et al, 2013). Desta forma, por motivos relacionados a limitação do laboratório e tempo, apenas a colônia 8 com fenótipo Mut⁺ foi escolhida para as etapas posteriores.

5.5.2.4 Purificação de TLPMO1

O cultivo para a purificação foi feito com a colônia 8 em 4 frascos de 1000 mL contendo meio BMMY. Assim, o extrato bruto do cultivo de TLPMO1-C8 foi concentrado em amicon aproximadamente 10 vezes. A banda denominada ‘amicon’ que pode ser observada na Figura 45 é referente ao descarte do extrato bruto concentrado no equipamento, sugerindo que a retenção de TLPMO1 não foi completa. Após a concentração da amostra do

extrato bruto o mesmo foi submetido a uma cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel. A purificação de TLPMO1 foi realizada mais de uma vez e o cromatograma apresenta o resultado de uma das cromatografias realizadas, mostrando o pico de proteína recombinante na fração 8, eluída com uma concentração de aproximadamente 450 mM de imidazol (Figura 46).

Posteriormente, diferentes volumes correspondentes à fração 8 foram analisados no gel de SDS-PAGE (Figura 45A) para avaliar o grau de purificação da proteína TLPMO1 (Figura 45), que mostrou uma banda correspondente a massa molecular de 55 kDa. Pequenas bandas também foram visualizadas próximas ao marcador de 70 kDa. Isto pode ser resultado de diferentes processamentos da proteína como uma diferença na glicosilação, conforme foi destacado com a LPMO recombinante expressa em *K. phaffii* no trabalho de Patel e colaboradores (2016) bem como pode ser atribuído a artefatos da própria coloração de prata descritos na literatura (OCHS et al,1983). Na figura 45 B, a banda referente a 70 kDa não foram marcadas no *Western-blot* sugerindo que esta apareceu possivelmente em decorrência dos atributos da coloração. No trabalho de Patel e colaboradores (2016), após a purificação da LPMO recombinante proveniente do fungo *Pestalotiopsis* sp, duas bandas foram observadas sugerindo a formação de múltiplos padrões de glicosilação. Após a purificação de TLPMO1 C8, a proteína recombinante alcançou uma concentração final de 4,4 mg/mL (quantificada por BCA).

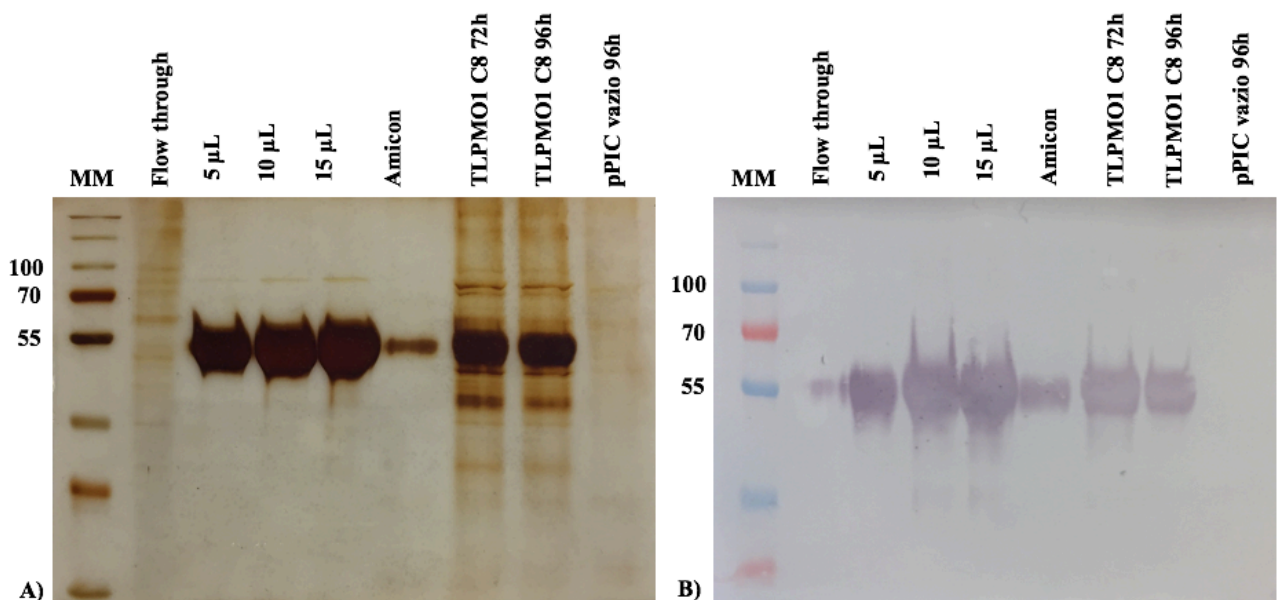


Figura 45- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO1 purificada e cultivada a partir da colônia 8 em BMMY. Análise da proteína recombinante purificada por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular, *PageRuler Plus Prestained Protein* (Thermo Fisher Scientific).

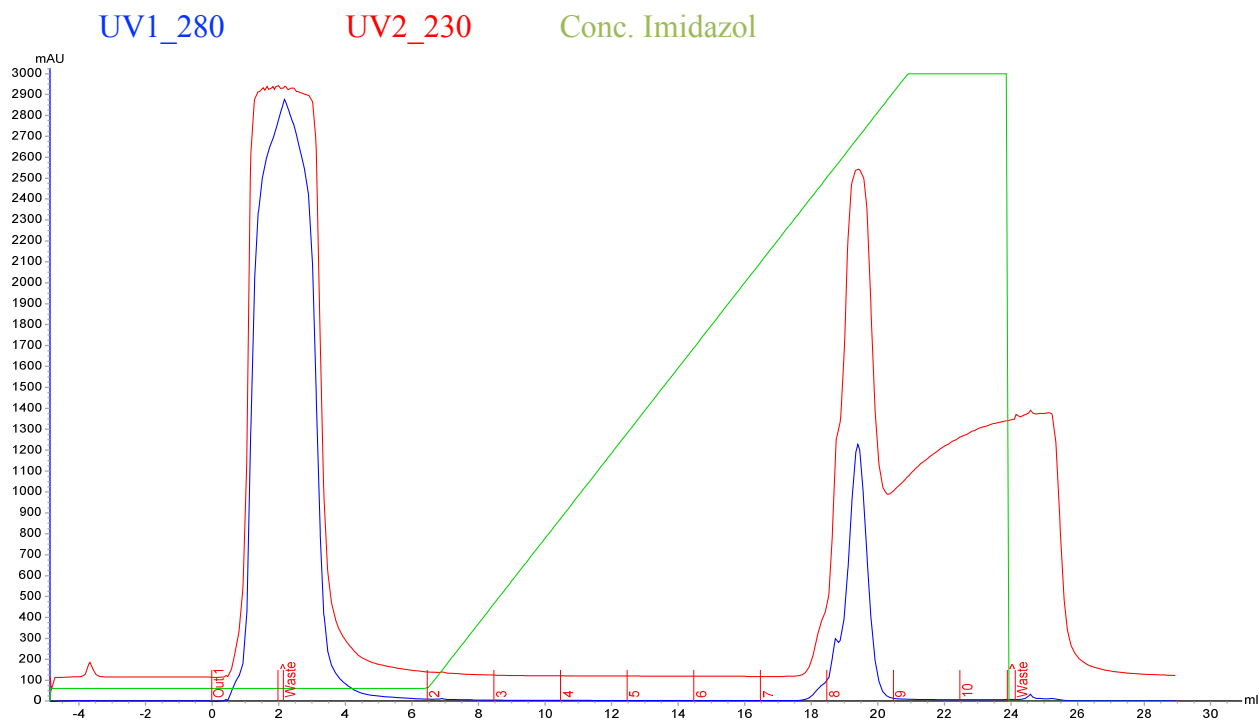


Figura 46- Cromatograma da proteína TLPMO1 C8. A proteína foi eluída por um gradiente de concentração de 10 a 500 mM de Imidazol (linha verde), sendo detectada na fração 8 com a concentração 450 mM de Imidazol. A linha azul corresponde à absorbância de 280 nm que absorve compostos com anel aromático, enquanto que a linha vermelha (230 nm) absorve as ligações peptídicas das proteínas.

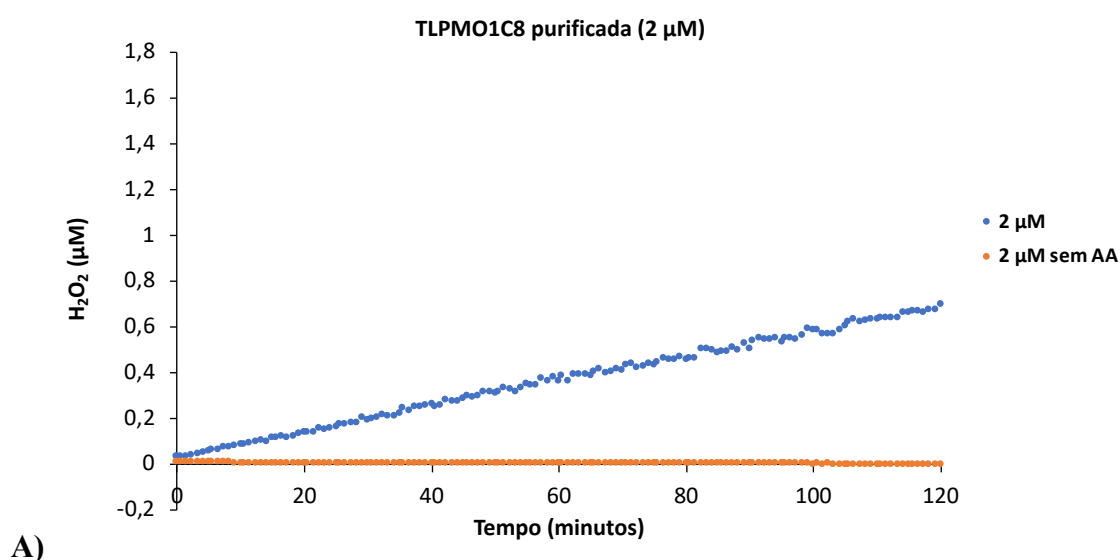
A proteína TLPMO1 de *T. lanuginosus* foi descrita e purificada pela primeira vez neste trabalho, atingindo concentração máxima de proteína purificada de 4,4 mg/mL (quantificada por BCA). Sendo assim, a produção da proteína recombinante TLPMO1 pode ser comparada com outras LPMOs já descritas, conforme pode ser observado na Tabela 11. Diferentes LPMOs de fungos como *N. crassa*, *G. trabeum* e *T. reesei* foram expressas em *K. phaffii* sob o controle do promotor AOX1, confirmando a eficiência deste sistema na expressão de proteínas recombinantes. Dentre as LPMOs apresentadas pela Tabela 11, o maior nível de expressão foi alcançado pela proteína recombinante de *G. trabeum* seguido pela TLPMO1 de *T. lanuginosus* deste trabalho. Assim, a proteína TLPMO1 alcançou um bom nível de expressão quando comparadas com outras LPMOs descritas na literatura.

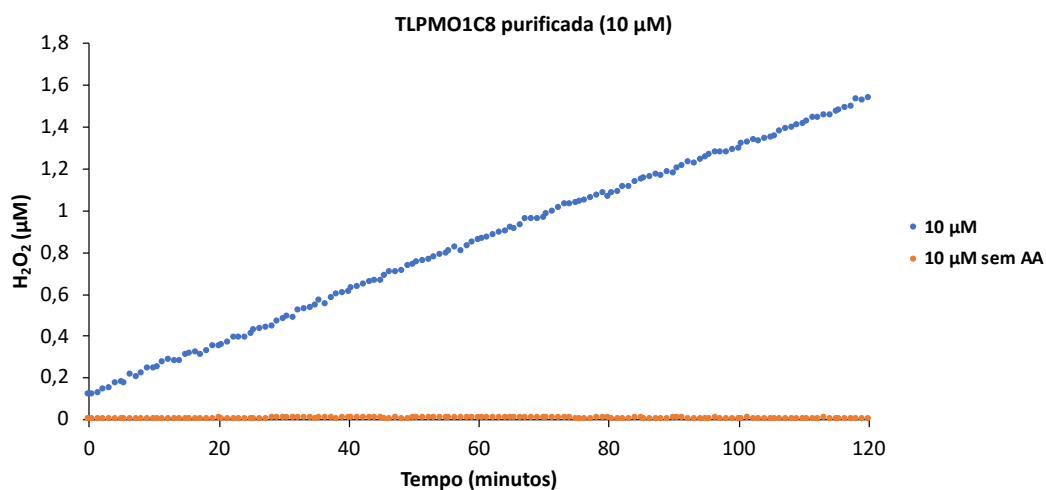
Tabela 11- LPMOs fúngicas recombinantes sob o controle do promotor AOX1. O sistema de expressão, linhagem, condições de cultivo e nível de expressão foram apresentadas para as LPMOs recombinantes descritas na literatura. *n.d., não determinado.

Organismo	Sistema e linhagem de expressão	Vetor de expressão	Condições de cultivo	Nível de expressão	Referências
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (GtLPMO9A-2)	<i>Komagataella pastoris</i> KM71H	pPICZ α	Frasco: 0,4 L de meio YP adicionado metanol	13.1 g L ⁻¹	Kojima et al, 2016
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Komagataella phaffii</i> KM71H	pPICZ α A	Bioreator: 3 L de meio de sais basal	PMO01867: 1.57 g L ⁻¹ PMO02916: 2,76 g L ⁻¹ PMO03328: 1,82 g L ⁻¹ PMO08760: 1.33 g L ⁻¹	Kittl et al, 2012
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Komagataella phaffii</i> X33	pPICZ α A	Bioreator: 4 L de meio de sais basal e fase de indução com metanol	0.45 g L ⁻¹	Sygmund et al, 2012
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Komagataella pastoris PichiaPink</i> TM strain 4	pPINK_GAP_AfCel12 A	Frasco: 1,5 L de meio YPD	1.4 g L ⁻¹	Borisova et al, 2015
<i>Pestalotiopsis sp.</i> NCi6	<i>Komagataella pastoris</i>	pPICZ α A	Bioreator: 2 L de meio de sais basal e fase de indução com metanol	LPMOA: 0.085 g L ⁻¹ LPMOB: 0.26 g L ⁻¹	Patel et al, 2016
<i>Podospora anserina</i> S mat+ (PaLPMO9A, PaLPMO9B)	<i>Komagataella phaffii</i> X33	pPICZ α A	Bioreator: 2 L de meio de sais basal e fase de indução com metanol	PaLPMO9A: 0,15 g L ⁻¹ PaLPMO9B: 1 g L ⁻¹	Bey et al, 2013
<i>Podospora anserina</i> S mat+ (PaLPMO9D)	<i>Komagataella phaffii</i> X33	pPICZ α A	Bioreator: 2 L de meio de sais basal e fase de indução com metanol	n.d.*	Bennati-Granier et al, 2015
<i>Trichoderma reesei</i> QM6A (Cel61A)	<i>Komagataella pastoris</i> CBS7435	-	Bioreator: 2 L de meio de sais basal e fase de indução com metanol	0,447 g L ⁻¹	Tanghe et al, 2015
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Komagataella phaffii</i> X33	pPICZ α A	Frasco: 0,4 L de BMMY	4,4 g L ⁻¹	Este trabalho

5.5.2.5 Ensaio de atividade – Amplex RED

Para avaliar a atividade da proteína purificada TLPMO1 C8, foi empregado o ensaio de atividade pelo Amplex RED. Este utiliza a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por uma reação lateral da LPMO que ocorre quando não há presença de substrato. O agente redutor utilizado na reação é o ácido ascórbico (AA). A curva padrão foi realizada e os valores de absorbância obtidos foram substituídos na equação da reta para o cálculo da concentração em micromolar (μM) de H_2O_2 . A Figura 47 apresenta o primeiro resultado relativo a este ensaio, na qual foi utilizado a TLPMO1 purificada que atingiu a concentração de 1,7 mg/mL (quantificada por BCA). Conforme foi descrito no trabalho de Kittl e colaboradores (2012), a formação de H_2O_2 é diretamente proporcional a concentração de LPMO utilizada. Ou seja, quanto maior a concentração de enzima, maior a liberação de H_2O_2 . Assim, quando a concentração aproximada de 2 μM de TLPMO1 foi utilizada 0,6 μM de H_2O_2 foram produzidos (Figura 47 A). Aumentada a concentração para aproximados 10 μM , a liberação de H_2O_2 foi pouco mais que o dobro da observada anteriormente, chegando a 1,6 μM (Figura 47 B). O controle negativo (TLPMO1 sem a presença de AA) permaneceu sem atividade em ambas condições. O controle contendo apenas o tampão do ensaio adicionado o ácido ascórbico também não apresentou atividade (dados não mostrados).

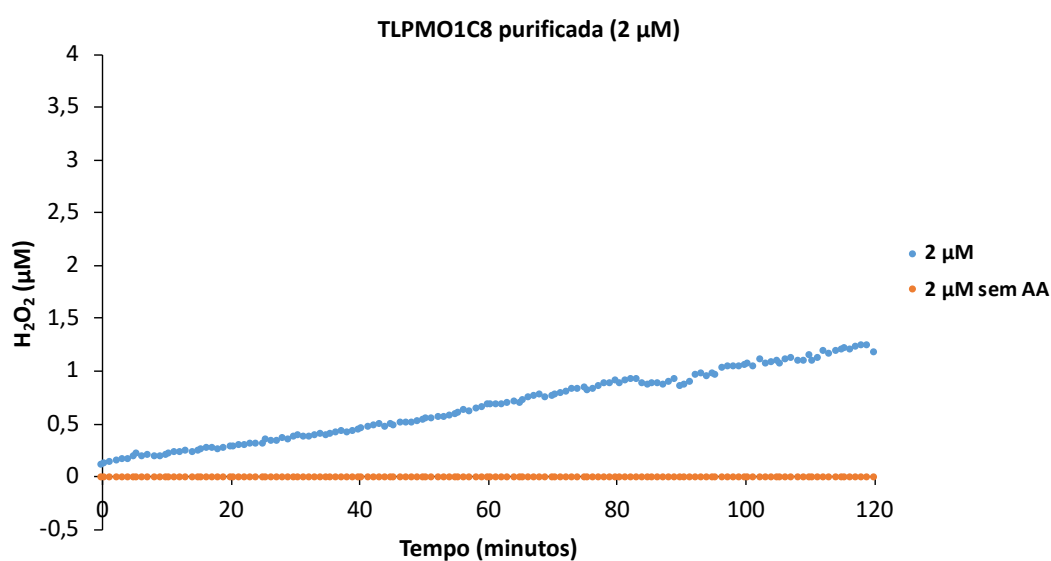




B)

Figura 47- Resultados do ensaio de atividade amplex-RED com TLPMO1 purificada. O ensaio amplex-red foi realizado com a TLPMO1 purificada nas concentrações de 2 e 10 µM.

O ensaio foi repetido com um novo cultivo de TLPMO1, a qual foi purificada e a produção da proteína recombinante atingiu a concentração de 4,4 mg/mL. Para a concentração de 2 µM, a produção de H₂O₂ atingiu aproximadamente 1,5 µM. Quando aumentada para 10 µM, a produção de H₂O₂ se aproximou de 4 µM. Por ser um ensaio bastante sensível, a leitura dos pontos de tempos em tempos pode sofrer algumas irregularidades como apresentadas na Figura 48. Na replicata do ensaio, o padrão visto no primeiro amplex realizado novamente foi reproduzido: a produção de H₂O₂ é diretamente proporcional a concentração de enzima utilizada (KITTL et al, 2012).



A)

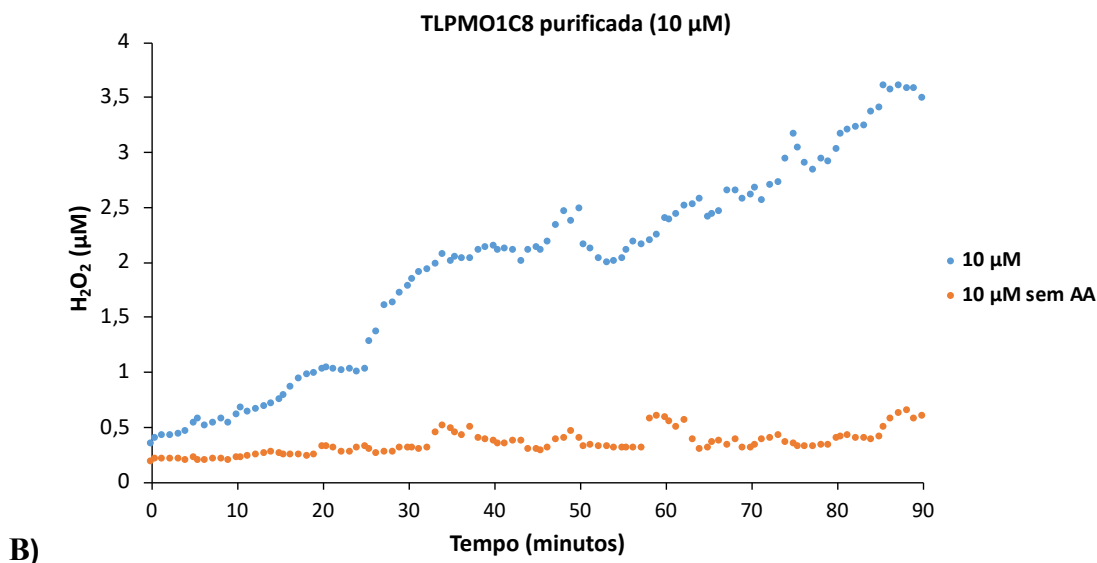


Figura 48- Replicata do ensaio amplex-RED com TLPMO1 purificada. O ensaio amplex-red foi realizado com a TLPMO1 purificada nas concentrações de 2 e 10 μM .

Apesar de as mesmas concentrações terem sido calculadas para ambos os ensaios, a replicata do experimento pode ter alcançado maior produção de H_2O_2 devido a maior produção da proteína recombinante (4,4 mg/mL). No primeiro ensaio, o volume utilizado de proteína TLPMO1 teve que ser diminuído pois ultrapassaria o volume máximo da reação de 100 μL . Neste caso, o volume calculado para se manter próximo da concentração de 2 μM era de 8,5 μL mas foram utilizados apenas 8 μL . Enquanto que para 10 μM o volume calculado foi de 42 μL mas apenas 25 μL foram utilizados. Sendo assim, as concentrações de TLPMO1 em ambas as condições foi diminuída, o que possivelmente contribuiu para uma menor produção de H_2O_2 . Na replicata do experimento, os cálculos foram feitos e devido a alta concentração da proteína recombinante (quantificada por BCA) não foi necessário o ajuste dos volumes utilizados para cada reação. Desta forma, as concentrações calculadas permaneceram em 2 e 10 μM .

O amplex é uma metodologia bastante utilizada para verificar a atividade de LPMOs. Porém, este método apresenta algumas limitações como a alta sensibilidade e dificuldade de medir a atividade de extrato bruto. O ensaio passa a ser mais útil para medições rápidas de atividade da LPMO após o processo de purificação de proteínas (BRESLMAYR et al, 2018). Assim, outros ensaios de atividade são descritos na literatura e podem ser realizados com estas enzimas. O trabalho de Breslmayr e colaboradores (2018) descreve o ensaio com o reagente 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) que reage com a LPMO até a formação de

coerulignona que pode ser detectada no espectrofotômetro. Além deste, os produtos de reação da LPMO podem ser caracterizados em cromatografia de troca iônica (HPAEC) e espectrômetro de massas (MALDI-TOF), como apresentados no trabalho de Kadowaki e colaboradores (2018). Assim ensaios como estes citados, devem ser realizados para a caracterização da atividade de TLPMO1 no futuro.

5.5.2.6 Expressão de TLPMO2

Após a confirmação das colônias positivas (9, 10, 11, 17) de TLPMO2, estas foram isoladas em placas contendo zeocina a 100 µg/mL. Porém, não foi observado crescimento em placa das colônias 9 e 10. Desta forma, o cultivo foi feito apenas com as colônias 11 e 17. Este foi realizado em frascos de 250 mL contendo meio BMMY e a expressão da proteína recombinante foi avaliada por SDS-PAGE e *Western-blot* (Figura 49). O tamanho predito para TLPMO2 é de 41,48 kDa, porém a proteína não foi observada no gel de SDS-PAGE e também não foi detectada por *Western-blot* (o controle positivo do experimento não foi mostrado). Apesar do DNA plasmidial ter sido integrado ao genoma da levedura, não foi observada a expressão da proteína recombinante.

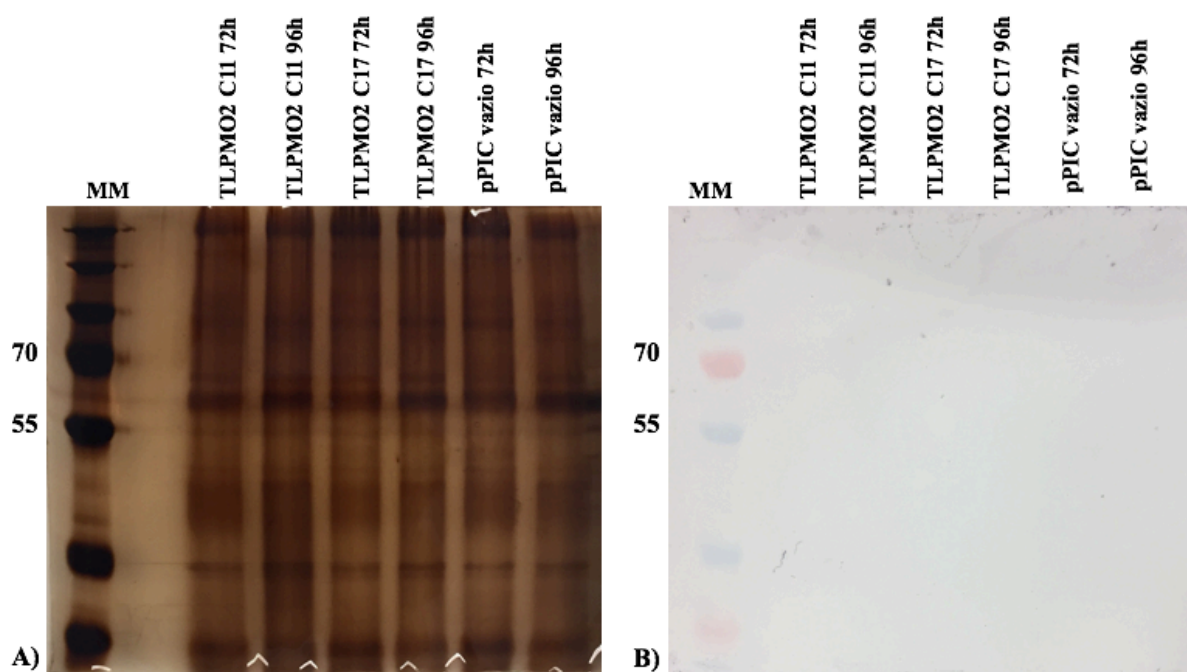


Figura 49- Análise da expressão da proteína recombinante TLPMO2 cultivada em BMMY a partir das colônias 11 e 17 confirmadas por PCR. Análise da expressão das colônias 11 e 17 de TLPMO2 por SDS-PAGE (A) e *Western-blot* (B). Marcador molecular *Precision plus protein* (Biorad).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo a expressão recombinante de possíveis proteínas com atividade auxiliar, LPMOs (TLPMO1 e TLPMO2) e expansina-like (TLEX2 e TLEX3), na levedura *K. phaffii*. Para tanto, foi possível a identificação de quatro sequências gênicas de proteínas acessórias putativas no genoma do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*. Estas foram clonadas em vetor de expressão sob o controle do promotor GAP. A expressão da proteína TLEX2 foi confirmada e seu tamanho observado foi de 25 kDa, porém, não foi constatada a expressão da expansina-like TLEX3. As colônias obtidas através da transformação em levedura de TLPMO1 (clonadas no vetor pGAPZ α A) foram confirmadas por PCR e cultivadas. Contudo, não foi observada a expressão da proteína recombinante. Desta forma, uma nova estratégia foi abordada e os fragmentos de gene de *TLPMO1* e *TLPMO2* foram clonados em vetor de expressão sob o controle do promotor AOX1. Após o cultivo, apenas a expressão da proteína TLPMO1 foi detectada. As proteínas TLEX2 e TLPMO1 foram purificadas em coluna de afinidade. Um ensaio de sinergismo com celulases e a expansina-like TLEX2 foi realizado e o aumento na atividade de celulases não foi observado. Isto pode ter ocorrido devido a baixa concentração de TLEX2 purificada que atingiu uma concentração máxima de 0,017 mg/mL, sugerindo que a expressão da proteína foi baixa. A proteína TLPMO1 apresentou uma concentração de 4,4 mg/mL após a purificação e a sua atividade foi confirmada pelo ensaio Amplex-red. O estudo demonstrou pela primeira vez a expressão de uma LPMO e uma expansina-like do fungo *T. lanuginosus*.

7. PERSPECTIVAS

- Otimizar o cultivo de TLPMO1 e TLEX2.
- Aumentar a escala de produção para biorreator.
- Caracterizar a proteína TLPMO1 quanto a substrato, temperatura e pH.
- Avaliar os efeitos sinérgicos de TLPMO1 quando em presença com celulases.
- Avaliar os efeitos sinérgicos de TLEX2 quando em presença de celulases.
- Analisar o efeito de TLEX2 quanto ao relaxamento das fibras de celulose em papel filtro.
- Avaliar TLPMO1 e TLEX2 em coquetéis enzimáticos sobre o bagaço da cana de açúcar hidrolisado.
- Publicação de artigos científicos.

8. REFERÊNCIAS

AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

AREVALO-GALLEGOS, A. et al. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 308–318, 2017.

BACCELLI, I.; LUTI, S.; BERNARDI, R. Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 175–184, 2014.

BATISTA, V. D. F. **Construção de um vetor para expressão heteróloga em *Pichia pastoris***. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

BENNATI-GRANIER, C. et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 90, p. 1–14, 2015.

BEY, M. et al. Cello-Oligosaccharide Oxidation Reveals Differences between Two Lytic Polysaccharide Monooxygenases (Family GH61) from *Podospora anserina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 488–496, 2013.

BIROL, F. Renewables 2018: Market analysis and forecast from 2018 to 2023. **International Energy Agency**, 2018. Disponível em < <https://www.iea.org/renewables2018/>>. Acesso em: 20/12/18.

BORISOVA, A. S. et al. Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 38, p. 22955–22969, 2015.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, 2013.

BRESLMAYR, E. et al. A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 79, p. 1–13, 2018.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals – A Review. **CHIMIA International Journal for**

Chemistry, v. 69, n. 10, p. 572–581, 2015.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

CHAUHAN, P. S. et al. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1817–1830, 2012.

CHEN, K. J. Constitutive expression of recombinant human hyaluronidase PH20 by *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 6, p. 673–678, 2016.

COS, O. et al. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 321–335, 2006.

COSGROVE, D. J. Microbial Expansins. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 479–497, 2017.

DE SCHUTTER, K. et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 561–566, 2009.

DE SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: SILVA, A. K. C. AND S. S. DA (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. InTech, 2013. p. 208–247.

DE-SOUZA, M.T.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. **Técnicas básicas em biologia molecular**. 2. ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2016.

DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 95, p. 69–147, 2016.

FATMA, S. et al. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, p. 148–163, 2018.

GASTEIGER, E. et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic acid researchs**, v. 31, n.13, p. 3784–3788, 2003.

GOMES, A. R. et al. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 7, p. 346–356, 2016.

GUPTA, R.; BRUNAK, S. Prediction of Glycosilation across the human proteome and the correlation to protein function. **Biocomputing 2002**, p. 310–322, 2001.

HE, F. Coomassie Blue Staining. **Bio-protocol Bio101**, 2011. Disponível em < <https://bio-protocol.org/bio101/e78>> Acesso em: 10/12/18.

HEMSWORTH, G.R. et al. Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n.12, p. 747–761, 2015.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 637–644, 1997.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. In: SARIASLANI, S.; GADD, G. M. (Ed.). **Advances of Applied Microbiology**. 2014. p. 199–249.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2012.

IA, P. et al. Evaluation of Mut⁺ and Mut^S *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 3, p. 881–888, 2006.

INVITROGEN EUA, manual *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant protein. Catalog n. V200–20, 2010.

INVITROGEN EUA, manual *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin and purification of secreted, recombinant proteins. Catalog n. V195–20, 2010.

JAGADEESWARAN, G.; GAINEY, L., MORT, A. J. An AA9-LPMO containing a CBM1 domain in *Aspergillus nidulans* is active on cellulose and cleaves cello-oligosaccharides. **AMB express**, v. 8, n. 171, p. 1–13, 2018.

KADOWAKI, M. A. S. et al. Functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. **Plos one**, v. 13, n. 8, p. 1–16, 2018.

KIM, E. S. et al. Functional Characterization of a Bacterial Expansin From *Bacillus subtilis* for Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1342–1353, 2009.

KIM, S. et al. Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxy, oxygen-rebound mechanism. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 111, n. 1, p. 149–154, 2014.

KITTL, R. et al. Production of four *Neurospora crassa* lytic polyssacharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 79, p. 1–13, 2012.

KJAERGAAD, C.A. et al. Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 24, p. 8797–8802, 2014.

KOJIMA, Y. et al. A Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Xyloglucan Specificity from the Brown-Rot Fungus *Gloeophyllum trabeum* and Its Action on Cellulose-Xyloglucan Complexes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6557–6572, 2016.

KRAINER, F. W. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n.22, p. 1–14, 2012.

KUBICEK, C. P.; KUBICEK, E. M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 51–57, 2016.

KURTZMAN, C. P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 973–976, 2005.

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435–1438, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAMBERTZ, C. et al. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: A review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2014.

LEE, H. V.; HAMID, S. B.; ZAIN, S. K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1541–1551, 2015.

LIU, X. et al. Heterologous expression and functional characterization of a novel cellulose-disruptive protein LeEXP2 from *Lycopersicum esculentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 186, p. 148–155, 2014.

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. RIA M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015.

MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 5, p. 949–965, 2016.

MATTHWES, B. C. et al. Development of general defined medium for *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 103–113, 2017.

MELLITZER, A. et al. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–11, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONCLARO, A.A.; FILHO, E.X.F. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: recent developments and application in lignocellulose breakdown. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 771–778, 2017.

NEKIUNAITE, L. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases and other oxidative enzymes are abundantly secreted by *Aspergillus nidulans* grown on different starches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2016.

NESTERENKO, V. M.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 28, p. 239–242, 1994.

OCHS, D. Protein contaminants of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 135, n. 2, p. 470–474, 1983.

OLIVEIRA, A. L. et al. The Structure of the Elicitor Cerato-platanin (CP), the First Member of the CP Fungal Protein Family, Reveals a Double $\psi\beta$ -Barrel Fold and Carbohydrate Binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 17560–17568, 2011.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2014.

PATEL, I. et al. Salt-responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. NCi6. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 108, p. 1–12, 2016.

PECIULYTE, A. et al. Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. **Fungal Genetics Biology**, v. 72, p. 64–72, 2014.

RAGUZ, S. et al. Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. **Gene**, v. 119, n. 2, p. 183–190, 1992.

SABBADIN, F. et al. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. **Nature Communications**, v. 9, n. 756, p. 1–12, 2018.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2005.

SEKI, Y. et al. Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from *Oryza sativa*. *Planta*, v. 241, n. 1, p. 83–93, 2015.

SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–13, 2017.

SIMMONS, T. J. et al. Structural and electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–12, 2017.

SINGH, S. et al. Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 975–982, 2000.

SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. *Thermomyces lanuginosus*: Properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3–16, 2003.

STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **The EMBO journal**, v. 32, n. 10, p. 1478–1488, 2013.

SYGMUND, C. et al. Characterization of the Two *Neurospora crassa* Cellobiose Dehydrogenases and Their Connection to Oxidative Cellulose Degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6161–6171, 2012.

TANDRUP, T. et al. Recent insights into lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). **Biochemical Society transactions**, v. 46, n. 6, p. p. 1431–1447 2018.

TANG, S.Q. et al. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 157–162, 2009.

TANGHE, M. et al. Recombinant Expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris* : Optimizing Yield and N-terminal Processing. **Molecular Biotechnology**, 2015.

VÁRNAI, A. et al. Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

WANG, W. et al. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 16–27, 2014.

WATERHAM, H. R. et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 37–44, 1997.

Wu, M. et al. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monoxygenase GH61D from the basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18 p. 12828–12839, 2013.

YAMADA, Y. et al. The Phylogenetic Relationships of Methanol- assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 439–444, 1995.

ZEUGIN, J.; HARTLEY, J. L. Ethanol Precipitation of DNA. **Focus**, v. 7, n 4, p. 1–2, 1985.

ZHANG, A. L. et al. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6, p. 1611–1619, 2009.