

MARINA QUÁDRIO RAPOSO BRANCO RODRIGUES

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE CELULASES EM *Kluyveromyces marxianus*
PARA UTILIZAÇÃO EM BIOPROCESSO CONSOLIDADO NA PRODUÇÃO
DE ETANOL CELULÓSICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696e
2012

Rodrigues, Marina Quádrio Raposo Branco, 1986-
Expressão heteróloga de celulases em
Kluyveromyces marxianus para utilização em bioprocessos
consolidados de produção de etanol celulósico / Marina
Quádrio Raposo Branco Rodrigues. – Viçosa, MG, 2012.
xiv, 105f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 94-100

1. *Kluyveromyces marxianus*. 2. Bagaço de cana.
3. Biocombustíveis. 4. Enzimas. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.562

MARINA QUÁDRIO RAPOSO BRANCO RODRIGUES

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE CELULASES EM *Kluyveromyces marxianus*
PARA UTILIZAÇÃO EM BIOPROCESSO CONSOLIDADO NA PRODUÇÃO
DE ETANOL CELULÓSICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 6 de fevereiro de 2012

Prof. Dr. Wendel Batista da Silveira

Prof. Dr. Leandro Licursi de Oliveira

Prof. Dr. Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

*“Deus te deu a ciência, a fim de que a estendas, em benefício de nossos irmãos, com tal
devotamento que a ignorância jamais consiga entenebreecer os caminhos da
humanidade”*

*Ceifa de Luz
Francisco Cândido Xavier
Pelo espírito Emmanuel*

Dedico:

À Deus

À meus avós Carlos e Lili,

À Paula, Fábio, Júlia e Ian

Ao meu noivo Daniel

Aos meus amigos e familiares

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de aprendizado de todos os dias;

À Universidade Federal de Viçosa por me acolher nestes sete anos de muito aprendizado;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por ceder a estrutura intelectual e física para realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luciano Gomes Fietto por ser para nós um verdadeiro professor e mestre, pelos valiosíssimos ensinamentos, pelo exemplo de conduta ética e profissional, pela dedicação, paciência, pelo otimismo e pela amizade; e à sua família por sempre nos receber com carinho;

Ao Prof. José Ivo pela amizade, pelos valiosos conselhos, pelo aprendizado e pela orientação estatística nestes quatro anos de trabalho conjunto;

À Prof^a. Andréa Ribon pela co-orientação, pela amizade, incentivo e pelas sugestões ao trabalho;

À Prof^a. Flávia Passos, pela co-orientação, pela disponibilidade, otimismo e incentivo de sempre;

Ao Prof. Dr. Leandro Licursi pela atenção e presteza no auxílio da etapa de purificação e pelas correções e sugestões;

Ao Prof. Dr. Wendel Silveira pela atenção e pelas correções e sugestões;

À Prof^a. Vera Lúcia dos Santos por ceder prontamente o uso do equipamento de HPLC;

Ao Eduardo, secretário do Programa, pela simpatia, eficiência e presteza com que trabalha;

À minha linda e amada família, meus avós Carlos e Lili, minha mãe Paula, e meu pai drasto Fábio, meus irmãos Ian e Júlia, e à D. Geni pela minha educação, por todo o amor, dedicação e apoio;

Ao meu futuro esposo, Daniel, pelo amor, pela alegria, pelo apoio, pela paciência, pelo aprendizado conjunto de todos os dias; e pelo auxílio no HPLC; e à sua família pelo carinho, apoio e incentivo;

Aos meus familiares, avós, pai, irmãos, tios e primos, cuja lista é muito extensa, que me apóiam à distância, me dão força na caminhada e estão guardados no meu coração;

À Ancély pela amizade, pelo companheirismo, por todo o aprendizado de quatro anos de trabalho juntas e por sua grande contribuição para este trabalho;

Ao Carlos pela amizade, pelos valiosos conselhos, pelo carinho, pelas críticas e sugestões e pelo auxílio nos experimentos de SSF;

À Aline pela amizade, pela eficiência e dedicação no auxílio dos experimentos e pelas sugestões;

Aos amigos do LBM pela amizade, pela excelente convivência, pelas risadas, pelo apoio, pelas broquices, pela paciência e pela saudade que vão deixar: Adíverson, Ananda, Ancély, Aline Abrantes, Aline Mello, Carlos, Daiane, Dani Arruda, Dani Mendes, Edgard, Glauco, Héllida, Mary, Mariana, Mário, Murilo, Patrícia, Priscilla, Raphael, Silvana, Zaira e Zamira.

Às amigas e companheiras de república Michelle, Valdilene, Andreza, Aparecida e Dani pela sincera amizade, pelo carinho e excelente convivência, pelos conselhos e puxões de orelha;

Aos amigos Ângelo e Maju, pela amizade, pelo exemplo, pelo carinho e cuidado;

Aos amigos da “Juventude Religare”, especialmente Plínio, Bruno, João e Bruninho pela amizade, carinho, apoio e pelas oportunidades de trabalho edificante;

Aos amigos, evangelizadores e amiguinhos do Meimei por todo o carinho e aprendizado e por tornarem tão felizes as minhas tardes de sábado;

À grande família de amigos que eu fiz em Viçosa, pelo carinho e pelo aprendizado....vocês vão estar para sempre dentro do meu coração!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1.0- Revisão de Literatura	1
1.1- Etanol Celulósico	2
1.2- Desafios e estratégias para obtenção do etanol de segunda geração	3
1.3- Hidrólise da celulose por enzimas celulolíticas	4
1.4- Expressão heteróloga de celulases	7
1.5- Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	8
2.0- Objetivos	12
2.1- Objetivo geral	12
2.2- Metas específicas	12
3.0- Metodologia	13
3.1- Micro-organismos e meios de cultura	13
3.2- Obtenção e seleção de <i>K. marxianus</i> UFV-3 recombinantes para os genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> de <i>A. niger</i>	14
3.3- Caracterização do mutante <i>K. marxianus cbhA-C4</i> '	20
3.4- Otimização das condições de cultivo para secreção de proteínas em <i>K. marxianus cbhA 4</i> '	24
4.0- Resultados e Discussão	27
4.1- Obtenção e seleção de <i>K. marxianus</i> UFV-3 recombinantes para os genes <i>cbhA</i> e <i>engB</i> de <i>A. niger</i>	27
4.2- Caracterização do mutante <i>K. marxianus cbhA-C4</i> ' quanto à estabilidade genética, secreção de proteínas e potencial fermentativo	53
4.3- Otimização da produção de celobiohidrolase por <i>K. marxianus cbhA 4</i> '	72
5.0- Conclusão e Perspectivas	92
6.0- Referências Bibliográficas	94
7.0- Anexos	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Esquema de construção dos cassetes de expressão PKG-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX

Figura 4.1 - Construção dos cassetes de expressão PGK-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX

Figura 4.2 – Confirmação da construção dos cassetes PGK-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX

Figura 4.3 – Sequências de DNA e aminoácidos resultantes do seqüenciamento dos cassetes PGK-cbhA-kanMX (a) e PGK-eng1-kanMX (b) utilizando o primer α -mat F

Figura 4.4 – Seleção de clones cbhA oriundos da primeira tentativa de transformação com cassete PGK-cbhA-KanMX

Figura 4.5 – Seleção de clones eng1 oriundos da primeira tentativa transformação com cassete PGK-eng1-KanMX

Figura 4.6 – Seleção de clones cbhA oriundos da segunda tentativa de transformação com cassete PGK-cbhA-KanMX

Figura 4.7 – Seleção de clones eng1 oriundos da segunda tentativa transformação com cassete PGK-eng1-KanMX

Figura 4.8 – Crescimento do clone sensível à temperatura

Figura 4.9 – Padronização de PCRs para confirmação da integração dos cassetes de expressão em *K. marxianus* recombinantes

Figura 4.10 – Investigação da integração do cassete PGK-cbhA-kanMX por PCR de colônia amplificando os fragmentos PGK-cbhA e cbhA

Figura 4.11 – Investigação da integração do cassete PGK-eng1-kanMX por PCR de colônia amplificando o gene eng1

Figura 4.12 – Atividade enzimática extracelular de clones putativos para o gene *cbhA*

Figura 4.13 – Atividade enzimática extracelular de clones putativos para o gene *cbhA*

Figura 4.14 – Atividade enzimática do extrato celular de clones putativos para o gene *cbhA*

Figura 4.15 – Comparação percentual dos valores de atividade enzimática intra e extracelular de clones putativos para o gene *cbhA*

Figura 4.16 – Atividade enzimática extracelular de clones putativos para o gene *eng1*

Figura 4.17 – Atividade enzimática do extrato celular de clones putativos para o gene *eng1*

Figura 4.18 – Estabilidade genética do clone C4'

Figura 4.19 – Comparação do perfil de proteínas secretadas por *K. marxianus* UFV-3 e clones *cbhA* 2 e 4'

Figura 4.20 – Comparação do perfil de proteínas secretadas por *K. marxianus* UFV-3 e clones *cbhA* 2 e 4'

Figura 4.21 – Comparação do perfil de proteínas secretadas por *K. marxianus* UFV-3 e clone *cbhA* 4'

Figura 4.22 – Perfil de eluição de proteínas da purificação do sobrenadante de *K. marxianus* UFV-3 e clone *cbhA* 4'

Figura 4.23 – Atividade enzimática das frações purificadas do sobrenadante do clone *cbhA* 4'

Figura 4.24 – Comparação das frações purificadas do sobrenadante de cultura de *K. marxianus* UFV-3 e clone *cbhA* 4'

Figura 4.25 – Análise da glicosilação de proteínas de frações purificadas do sobrenadante de cultura do clone *cbhA* 4'

Figura 4.26 – Comparação da capacidade fermentativa da cepa UFV-3 e clone *cbhA* 4'

Figura 4.27 – Comparação da produção de etanol de 0 a 10 h de SSF com a cepa UFV-3 e clone *cbhA* 4'

Figura 4.28 – Comparação da produção de etanol de 15 a 30 h de SSF com a cepa UFV-3 e clone *cbhA* 4'

Figura 4.30 – Efeitos dos fatores estudados sobre a atividade extracelular de celobiohidrolase

Figura 4.31 – Perfil de resposta da secreção geral, secreção da proteína de interesse e crescimento do clone *cbhA* 4' quanto ao deslocamento de fatores

Figura 4.32 – Superfícies de resposta ajustadas para a atividade extracelular do clone *cbhA* 4'

Figura 4.33 – Superfícies de resposta ajustadas para a secreção de proteínas e crescimento do clone *cbhA* 4'

Figura 4.34 – Análise de micélios do clone *cbhA* 4' em lupa

Figura 4.35 – Micrografias da cultura de *K. marxianus cbhA* 4' com crescimento micelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Sequências de *primers* utilizadas na construção dos cassetes de expressão com o respectivo número, nome e função.

Tabela 3.2 – Sequências dos *primers* utilizados na identificação dos fragmentos PGK, *cbhA*, *eng1*, PGK-*eng1* e PGK-*cbhA* em cepas recombinantes de *K. marxianus*.

Tabela 3.3 – Série McIlvaine para obtenção de tampão citrato/fosfato em pH 3,0 a 7,5.

Tabela 4.1 – Análise de sequências obtidas a partir da amplificação dos cassetes PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX em reação de seqüenciamento de DNA pelo método de Sanger. Os fragmentos de cada cassete obtidos com os *primers* indicados foram alinhados pelo BLASTn/NCBI, sendo apresentadas as sequências resultantes do alinhamento (Identidade no GenBank), a cobertura da sequência investigada e a respectiva identidade entre estas sequências.

Tabela 4.2 – Combinações de níveis, segundo Fatorial Fracionado Resolução IV, dos fatores peptona (%), temperatura (°C), extrato de levedura (%), pH, Tween 80 (%) e glicose (%) ensaiadas no experimento com os respectivos valores observados de atividade sobre pNPG (nmol/(mL*min)) e DO₆₀₀.

Tabela 4.3 – Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a atividade em pNPG e respectivos valores calculados do teste t (T) e p-valores (p).

Tabela 4.4 – Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a DO₆₀₀ e respectivos valores calculados do teste t (T) e p-valores (p).

Tabela 4.5 – Combinações de níveis dos fatores peptona (%), temperatura (°C), pH, Tween 80 (%) e glicose (%), ensaiadas no experimento de deslocamento, com os respectivos valores observados de atividade sobre os substratos pNPG e pNPC (nmol/(mL*min)), concentração de proteínas (Ptn) (mg/mL) e DO₆₀₀.

Tabela 4.6 – Combinações de níveis dos fatores peptona (%), temperatura (°C), pH e glicose (%), ensaiadas no DCCR, com os respectivos valores observados de atividade sobre os substratos pNPG e pNPC (nmol/(mL*min)), concentração de proteínas (mg/mL) e DO₆₀₀.

Tabela 4.7 – Modelos ajustados, com unidades naturais, para a atividade (nmol/(mL*min)) sobre pNPG e pNPC, para a concentração de proteína (mg/mL) e para o crescimento (DO₆₀₀) do clone *cbhA* 4' e os respectivos valores de R².

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)₂SO₄: sulfato de amônio

α : probabilidade máxima de erro associada à hipótese alternativa de teste estatístico

λ : comprimento de onda

μ : micro

μ g: microgramas

μ L: microlitros

A₆₀₀: absorvância no comprimento de onda 600 nm

ADH2p: promotor ADH2

BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária

cbhA: gene da celobiohidrolase A de *Aspergillus niger*

CBHa: celobiohidrolase codificada pelo gene *cbhA*

CMC: carboximetilcelulose

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacionado

DMB: Departamento de Microbiologia

DNS: método ou reagente para quantificação de açúcares redutores

DO: Densidade óptica

eng1: gene da endoglucanase 1 de *Aspergillus niger*

FPU: Unidade de Papel de Filtro

g: gramas

G418: antibiótico comercial similar à geneticina

GL: Graus de Liberdade

GRAS: *generally recognized as safe*

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HCl: ácido clorídrico

kanMX: gene que confere resistência a G418

KDa: quilo Dalton

KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico

L: litro

LBM: Laboratório de Biotecnologia Molecular

m: mili

M: molar

mM: milimolar

mg: miligramas
mL: mililitro
MgSO₄·7H₂O: sulfato de magnésio heptahidratado
n: nano
nm: nanometros
nmol: nanomol
Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico
NaCl: cloreto de sódio
NH₄Cl: cloreto de amônio
p: probabilidade real de erro associada à hipótese alternativa de teste estatístico
PGK: gene codificador da fosfogliceraldeído quinase de *S. cerevisiae*
pKLAC1: vetor de expressão comercial
pNP: *p*-nitrofenol
pNPC: *p*-nitro-fenil-β-D-celobiosídeo
pNPG: *p*-nitro-fenil-β-D-glicopiranosídeo
pNPLac: *p*-nitro-fenil-lactosídeo
QM: Quadrado Médio
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SQ: Soma de Quadrados
SSF: sacarificação e fermentação simultânea
Tris: hidroximetilaminometano
UFV: Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

RODRIGUES, Marina Quádrrio Raposo Branco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2012. **Expressão heteróloga de celulasas em *Kluyveromyces marxianus* para utilização em bioprocesso consolidado de produção de etanol celulósico.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Flávia Maria Lopes Passos e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

O alto custo de celulasas constitui uma das principais barreiras para a bioconversão de lignocelulose em etanol, e o acoplamento da produção de celulasas à sacarificação e fermentação simultânea do bagaço, em Bioprocesso Consolidado, pode contribuir para a viabilização deste processo. Para tanto, seria necessário um agente biocatalizador, ou um consórcio de micro-organismos, capaz de secretar enzimas celulolíticas e fermentar os açúcares resultantes a etanol. A levedura *Kluyveromyces marxianus* desponta no cenário biotecnológico de produção de etanol por apresentar características chave - como termotolerância, capacidade de produção de etanol em ambiente aerado e alto potencial para secreção de proteínas - para uso em Bioprocesso Consolidado. Neste trabalho, *K. marxianus* UFV-3 foram transformadas com cassetes de expressão contendo os genes *eng1* ou *cbhA* de *A. niger*, que codificam respectivamente uma endoglucanase e uma celobiohidrolase, com secreção dirigida pelo peptídeo sinal α -MF de *K. lactis*, sob controle do promotor PGK de *S. cerevisiae*, e a marca de seleção *kanMX*. Foram obtidos clones *cbhA* com expressão e secreção diferencial, em relação à cepa não transformada, sugerindo que o promotor PGK, de *S. cerevisiae*, e o peptídeo sinal α -MF, de *K. lactis*, são reconhecidos pela maquinaria de expressão e secreção de *K. marxianus* UFV-3. A caracterização de um clone *cbhA*, com maior secreção de celobiohidrolase recombinante, sugere que a expressão heteróloga leva a mudanças metabólicas e no perfil de secreção de proteínas nas células recombinantes. A Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada para estudo e otimização das condições de cultivo que favorecem a secreção de proteínas endógenas e heteróloga em *K. marxianus* UFV-3. Nossos resultados indicam que o crescimento micelial de *K. marxianus*, observado em condições limitantes de crescimento, está altamente relacionado ao aumento da secreção de proteínas nestas condições. Os resultados apresentados sobre a manipulação genética e condições que favorecem a secreção de proteínas em *K. marxianus* UFV-3 abrem perspectiva para a obtenção de um consórcio de leveduras recombinantes e selvagens - com capacidade de secreção de celulasas,

hidrólise da celulose e fermentação dos açúcares resultantes - para aplicação em Bioprocesso Consolidado na produção de etanol celulósico.

ABSTRACT

RODRIGUES, Marina Quádrio Raposo Branco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2012. **Heterologous expression of cellulases in *Kluyveromyces marxianus* for cellulosic ethanol production by consolidated bioprocess.** Advisor: Luciano Gomes Fietto. Co-advisors: Flávia Maria Lopes Passos and Andréa de Oliveira Barros Ribon.

The high cost of cellulase is one of the main barriers for the bioconversion of lignocellulose to ethanol, and the coupling of cellulase production and the simultaneous saccharification and fermentation of bagasse, in the Consolidated Bioprocessing, can contribute to the viability of this process. This strategy requires a biocatalyst agent, or a consortium of micro-organisms, able to secrete cellulolytic enzymes and ferment the resulting sugars to ethanol. The yeast *Kluyveromyces marxianus* emerges in the biotechnological scenario of ethanol production by presenting key features - such as thermotolerance, production capacity of ethanol in aerated environment and high potential for protein secretion - for use in Consolidated Bioprocessing. In this work, *K. marxianus* UFV-3 were transformed with expression cassettes containing the *cbhA* or *eng1 A. niger* genes, which respectively encode an endoglucanase and a cellobiohydrolase, with secretion directed by the *K. lactis* α -MF signal peptide, under control of the *S. cerevisiae* PGK promoter, and the selection mark *kanMX*. *cbhA* clones were obtained with differential expression and secretion of cellobiohydrolase, in relation to non-transformed strain, suggesting that the *S. cerevisiae* PGK promoter, and the *K. lactis* α -MF signal peptide are recognized by the machinery of expression and secretion of *K. marxianus* UFV-3. The characterization of a *cbhA* clone, with increased secretion of recombinant cellobiohydrolase, suggests that the heterologous expression of recombinant proteins leads to changes in metabolic profile and secretion in the cells. The Response Surface Methodology was used to study and optimization of culture conditions that favor the secretion of endogenous and heterologous proteins in *K. marxianus* UFV-3. Our results indicate that the mycelial growth of *K. marxianus*, observed in limiting conditions of growth, is closely related to increased secretion of proteins in these conditions. The results presented here about genetic manipulation and culture conditions that promote protein secretion in *K. marxianus* UFV-3 open perspectives for obtaining a consortium of yeast, with recombinant and wild strains, - with ability to secrete cellulases, to hydrolyze cellulose and to ferment derived sugars - for use in Consolidated Bioprocessing on cellulosic ethanol production.

1.0 – REVISÃO DE LITERATURA

Leveduras têm sido industrialmente usadas como hospedeiros para produção de proteínas recombinantes por combinarem as características de um organismo unicelular (como fácil manipulação genética e rápido crescimento) com a habilidade de realizar modificações pós-traducionais, além de constituírem sistemas de expressão econômicos, produzir altos títulos de proteínas e muitas vezes possuem *status* GRAS (*generally recognized as safe*). *S. cerevisiae* tem sido amplamente difundida em aplicações biotecnológicas, mas apresenta algumas limitações para uso na produção de proteínas recombinantes secretadas, o que tem aumentado o interesse pelo desenvolvimento de sistemas de expressão em leveduras não convencionais como *Pichia*, *Zygosaccharomyces* e *Kluyveromyces* (Çelik & Çalik, 2011; Lane et al., 2011). A levedura *Kluyveromyces marxianus* desponta no cenário biotecnológico de produção de etanol por apresentar características chave para uso em Bioprocesso Consolidado como termotolerância, capacidade de produção de etanol em ambiente aerado e alto potencial para secreção de proteínas. Porém, o conhecimento acerca da manipulação genética e fisiológica de *K. marxianus* para produção de proteínas recombinantes ainda é escasso (Lane et al., 2011), e não existe um sistema de expressão estabelecido para esta levedura (Lane & Morrissey, 2010).

Desenvolver um sistema ótimo para expressão de proteínas recombinantes envolve várias etapas cruciais, como: (1) selecionar o hospedeiro capaz de realizar apropriadamente o dobramento e modificações pós-traducionais na proteína; (2) escolher um vetor de transformação (episomal ou integrativo) com um promotor apropriado (constitutivo ou regulado) e uma marca de seleção eficiente; (3) otimizar os códons do gene, especialmente no caso de leveduras do complexo CTG; (4) escolher o peptídeo sinal para o endereçamento da proteína; (5) prevenir a clivagem proteolítica do produto; (6) desenvolver um meio fermentação (fonte de carbono e nitrogênio); e (7) otimizar os parâmetros do processo (temperatura, pH, aeração) (Çelik & Çalik, 2011). Para se chegar a um sistema ótimo de produção de proteínas recombinantes para determinada espécie de levedura seria necessário o desenvolvimento de vários trabalhos que abordassem diferentes estratégias de produção.

O presente trabalho apresenta os resultados do desenvolvimento de uma estratégia de transformação de *K. marxianus* com genes de celulases, seleção e caracterização de transformantes, e otimização das condições para secreção de proteína

recombinante e proteínas endógenas; e discute o conhecimento científico, as limitações e vantagens desta estratégia. Os resultados e a discussão associada a eles são apresentados em três tópicos: (1) obtenção e seleção de *K. marxianus* transformadas com os genes *cbhA* e *eng1* de *A. niger*; (2) caracterização de *K. marxianus* recombinante para o gene *cbhA* quanto à secreção de proteínas e potencial fermentativo; (3) otimização da secreção de proteínas por *K. marxianus* recombinante para o gene *cbhA*.

1.1 – Etanol Celulósico

Celulose é o produto primário da fotossíntese em ambientes terrestres, e a mais abundante fonte renovável da biosfera (Zhang et al., 2006), tratando-se de um homopolímero linear e não-ramificado, constituído de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo ($\beta 1 \rightarrow 4$) (Nelson e Cox, 2006). A biodegradação de celulose por celulasas e celulosomas tem grande importância para a agricultura e processos de reciclagem, e poderia ser completamente utilizada na obtenção de produtos sustentáveis e bioenergia que substituíssem a utilização de combustíveis fósseis (Zhang et al., 2006). Internacionalmente, algumas das mais promissoras alternativas para obtenção de energia renovável estão focadas na utilização de resíduos agroindustriais, dentre os quais resíduos fibrosos da indústria de açúcar têm atraído especial atenção (Botha e Blottnitz, 2006).

A utilização de resíduos celulósicos é uma alternativa emergente para a produção de *bio-commodities* (Lynd et al., 1996), e, neste contexto, o etanol celulósico é especialmente promissor, pois é obtido a partir de matérias-primas abundantes e de baixo custo, tem alta octanagem, pode ser misturado ao petróleo ou usado puro em alguns motores, além de ser considerado ambientalmente correto (Wyman, 2007). O etanol tem sido introduzido em larga escala no Brasil, Estados Unidos e alguns países da Europa, com expectativas de se tornar um dos combustíveis renováveis dominantes no setor de transportes nos próximos 20 anos. Os principais produtores são o Brasil e os EUA, tendo como fontes primárias a cana de açúcar e o milho, respectivamente (Hahn-Hagerdal, 2006).

Dentre os resíduos agroindustriais com potencial para a geração de etanol, se destaca o bagaço da cana-de-açúcar, cuja utilização pode incrementar em até 30% a produção de etanol sem o aumento da área plantada (Petrobrás, 2007). A cada

quilograma de açúcar produzido, a moagem da cana resulta em 0,3g de melaço, como produto secundário, e, aproximadamente, 1,25 kg de resíduo fibroso, o bagaço, o qual é utilizado para suprir as necessidades energéticas do processo (Botha e Blottnitz, 2006). As 434 usinas de açúcar e álcool do Brasil são auto-suficientes em energia, proveniente da combustão do bagaço de cana, e 100 delas já vendem excedentes para o sistema integrado nacional. Essa bioeletricidade contribuiu, em 2009, com 670 megawatts médios para a rede, ou quase 2% da energia consumida no País, segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (Unica). De acordo com o Sindicato das Indústrias de Açúcar e Álcool de Minas Gerais (SIAMIG - 2010), todas as usinas do Estado são auto-suficientes em energia elétrica. Das 43 usinas associadas, todas produzem a energia que consomem e outras 18 ainda vendem o excedente. Porém, menos de 50% do bagaço é utilizado para sustentar a demanda energética das usinas, o restante se acumula nos pátios sem fim determinado.

1.2 – Desafios e estratégias para obtenção do etanol de segunda geração

O etanol pode ser produzido a partir de biomassa lignocelulósica por um processo de quatro etapas que inclui: o pré-tratamento, a hidrólise, fermentação e destilação (Mosier et al., 2005).

O primeiro passo para a conversão de biomassa em etanol é o pré-tratamento e a hidrólise da molécula de celulose. Os polímeros de celulose e hemicelulose são hidrolisados por enzimas ou ácidos gerando monômeros de açúcar. Estes açúcares podem ser fermentados, em etapa posterior, por bactérias, leveduras ou fungos filamentosos. A porção de lignina, o principal sólido remanescente da biomassa, pode ser queimada para gerar calor e eletricidade para o processo, sendo, por isso, tida como um co-produto (Hahn-Hagerdal et al., 2006).

O pré-tratamento visa aumentar a dimensão dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose, sendo necessário para expor as fibras de celulose às enzimas ou, pelo menos, para torná-la mais acessível. Um eficiente pré-tratamento pode, substancialmente, reduzir exigências de enzima, as quais constituem uma grande parte do custo de produção (Hahn-Hagerdal et al., 2006).

Durante a etapa de sacarificação a celulose é hidrolisada, por tratamento ácido ou enzimático, liberando as unidades de glicose e celobiose a serem assimiladas pela levedura na etapa de fermentação. A hidrólise ácida da celulose foi a primeira

alternativa a ser testada e apresentou inconvenientes como a produção de compostos furfúricos, inibidores da etapa seguinte de fermentação, e a degradação de açúcares por exposição prolongada (4–6h) ao meio reacional (Zhang et al., 2006). Frente aos empecilhos de utilização da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da celulose, pelo complexo celulolítico, tem recebido a atenção dos pesquisadores.

O alto custo de celulases e a inibição de sua atividade pelo produto (glicose e celobiose) constituem as principais barreiras para a bioconversão de celulose em etanol (Zhou et al., 1999). O processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), onde as etapas de hidrólise da celulose e fermentação dos açúcares resultantes são realizados simultaneamente, é apontado como alternativa para diminuir a inibição de celulases, aumentando taxa global de conversão de celulose em etanol (Hari et al., 2001; Bollók et al., 2000; Stenberg et al., 2000; Tomás-Pejó et al., 2008). Uma estratégia ainda mais promissora para reduzir o custo do processo é o desenvolvimento de biocatalizadores etanologênicos, isto é, micro-organismos capazes de produzir celulases e fermentar açúcares a etanol ao mesmo tempo (Zhou et al., 2001), resultando no chamado Bioprocesso Consolidado.

1.3 – Hidrólise da celulose por enzimas celulolíticas

O mecanismo mais aceito para a hidrólise da celulose envolve a ação sinérgica de três celulases: endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91), e β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (Zhang and Lyng, 2004). Endoglucanases hidrolisam, ao acaso, ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$) no interior da cadeia de celulose, diminuindo o grau de polimerização da molécula; celobiohidrolases catalisam processivamente a clivagem da cadeia a partir das extremidades, gerando celobiose ou glicose; e a β -glicosidase hidrolisa celobiose a glicose (Zhang et al., 2006), podendo ainda hidrolizar alguns celooligossacarídeos (Jeon et al., 2009). Celobiose e glicose são potentes inibidores competitivos de endoglucanases e celobiohidrolase que devem ser removidos para prevenir autoinibição (Zhou et al., 2001), esta característica dificulta a hidrólise de celulose em sistemas nos quais não existe consumo de glicose.

A ação das três enzimas ocorre simultaneamente, havendo, inicialmente, uma diminuição do grau de polimerização da celulose até seis resíduos de glicose (fase líquida) após a hidrólise catalizada pelas enzimas endoglucanases e celobiohidrolase. A etapa de despolimerização, realizada por estas duas enzimas, é o passo limitante para

toda a hidrólise da celulose. A ação combinada de endoglucanases e celobiohidrolases modifica a todo tempo as características da superfície da celulose, resultando em rápidas mudanças nas taxas de hidrólise, o que torna complicado o controle do processo *in vitro*. A hidrólise secundária, na fase líquida, envolve essencialmente a hidrólise de celobiose à glicose por β -glicosidases (Zhang et al., 2006). A ação da celobiase (β -glicosidase), além de finalizar a despolimerização, também contribui para o aumento da taxa global do processo, uma vez que consome celobiose, principal inibidor de endoglucanases e celobiohidrolases (Olsen et al., 2010). Nosso grupo de pesquisa (Rodrigues, 2010; Lopes, 2011) encontrou condições de cultivo nas quais a levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 é capaz de secretar uma β -glicosidase com atividade celulásica, e está trabalhando na otimização da secreção desta enzima endógena. Este achado abre perspectivas para a clonagem e expressão de uma endoglucanase e uma celobiohidrolase em *K. marxianus* UFV-3, visando sua utilização em Bioprocesso Consolidado para produção de etanol celulósico.

1.3.1 – Endo- β -1,4-glucanase codificada pelo gene *eng1*

A enzima endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) cliva as ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$) no interior da molécula de celulose, diminuindo significativamente seu grau de polimerização e contribuindo para diminuição de sua viscosidade (Zhang et al., 2006).

Endoglucanases têm sido isoladas de vários fungos superiores, os mais potentes degradadores de celulose. Estas enzimas são monoméricas, com massa molecular tipicamente entre 22 e 45 KDa, sendo comumente glicosiladas e apresentando de 1 a 12% de carboidratos (Baldrian e Valáskoka, 2008). Como outras glicosil hidrolases, elas geralmente possuem um domínio catalítico e um ou mais domínios não-catalíticos, como aqueles responsáveis pela ligação ao substrato ou a moduladores alostéricos. Endoglucanases possuem sítio de ligação ao substrato em forma de pinça, ao qual se associa a capacidade de ligação randômica ao polímero de celulose (Davis e Henrissat, 1995). Endoglucanases de basidiomicetos apresentam pH ótimo entre 4,0 e 5,0, e temperaturas ótimas entre 50°C e 70°C, comuns no habitat natural destes microorganismos. Carboximetilcelulose e celulose amorfa são bons - apesar de sintéticos - substratos da maioria das endoglucanases e indicam que a atividade desta enzima é dirigida para regiões amorfas da molécula de celulose (Baldrian e Valáskoka, 2008).

O gene *eng1*, que codifica uma endo- β -1,4-glucanase de *Aspergillus niger*, tem sido objeto de alguns trabalhos de expressão heteróloga de celulases (Hong et al., 2001; Hong et al., 2007; Jeon et al., 2009). A endoglucanase codificada por este gene possui alta similaridade com glicosil hidrolases da classe V (Hong et al., 2001), possuindo mecanismo catalítico de inversão da configuração do carbono anomérico (Davis e Henrissat, 1995). Dentre as características interessantes desta enzima, estão sua estabilidade a ampla faixa de pH (3,0 – 10,0) e temperatura (-20°C a 80°C) e sua resistência à degradação por proteases (Hong et al., 2001), o que a torna de fácil manipulação e capaz de atuar em ambientes como o meio de fermentação.

Desta forma, o gene *eng1* torna-se um bom candidato para a expressão heteróloga de endoglucanase na levedura de interesse biotecnológico *K. marxianus*.

1.3.2 – Celobiohidrolase codificada pelo gene *cbhA*

As celobiohidrolases ou exoglucanases (CBH-EC 4.2.1.91) são o grupo de enzimas que apresentam maior eficácia quando separadas do complexo celulolítico. Elas são em geral conhecidas por exibir uma estrutura multi-domínio, caracterizada por um domínio catalítico (core) e outro de ligação ao carboidrato (CBD), separados por um peptídeo ligante rico em resíduos de prolina, serina e treonina. Espécies de *Aspergillus niger* e *Phanerochaete chrysosporium* em contraste com espécies de *Trichoderma* são capazes de sintetizar celobiohidrolases com e sem o domínio de ligação. Embora o mecanismo molecular de ação da enzima não seja ainda completamente entendido, sabe-se que ela atua separando as cadeias individuais da celulose e hidrolisando celodextrinas de modo processivo (Nimlos et al., 2007). Esta atividade é de extrema importância para o completo aproveitamento da fibra, pois aumenta o acesso das outras enzimas ao polímero de celulose contribuindo para a taxa global de hidrólise.

São conhecidas duas famílias de CBD, uma em que seus representantes se ligam à extremidade redutora (Família I em *Trichoderma* ou A em *Aspergillus*) da cadeia e outra na qual o domínio se liga à extremidade não redutora (Família II em *Trichoderma* ou B em *Aspergillus*). As estruturas da família A apresentam especificidade para ligação à superfície da celulose cristalina, por meio de interações hidrofóbicas entre os grupos laterais dos três aminoácidos aromáticos presentes na superfície da proteína. Essas interações hidrofóbicas fornecem a energia livre necessária para dirigir a mudança de conformação responsável pela atividade da enzima (Nimlos et al., 2007).

As celobiohidrolases de fungos filamentosos são empregadas nos processos industriais, em virtude do seu alto potencial degradativo. A celobiohidrolase A (CBHa) de *A. niger*, codificada pelo gene *cbhA*, foi identificada por Gielkens et al. (1999), apresentando homologia com outras celobiohidrolases de fungos, enquadrando-se na família 7 de glicosil hidrolases. Essa enzima tem atividade catalítica na hidrólise das ligações β -1,4 glicosídicas nas extremidades redutoras da celulose, liberando celobiose. Sua atividade pode ser medida utilizando-se os substratos sintéticos p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (pNPC) e p-nitrofenil- β -D-lactosídeo (pNPLac) (Gielkens et al., 2004; Zhang et al., 2006). A enzima CBHa atua em faixa de temperatura de 40 a 60 °C, sendo observada atividade ótima entre 55 e 60 °C, e possui atividade quase invariável em ampla faixa de pH (3,0 a 6,5) (Gielkens et al., 2004), o que constitui vantagem para aplicação industrial desta enzima.

1.4 – Expressão heteróloga de celulases

Celulases são naturalmente produzidas por uma variedade de micro-organismos, dentre os quais se destaca os fungos superiores. Atualmente, a maioria das celulases comerciais é produzida por espécies dos gêneros de *Thichoderma* e *Aspergillus* (Cherry and Fidantsef, 2003; Esterbauer et al., 1991; Kirk et al., 2002). Fungos são conhecidos por secretar grandes quantidades de enzimas endógenas, porém, a secreção de proteínas heterólogas nestes organismos ainda tem baixos rendimentos (Wang et al., 2007).

O grande potencial que as celulases assumem nas emergentes indústrias de bioenergia e bioprodutos se torna uma motivação para o desenvolvimento de melhores preparações enzimáticas para a hidrólise da celulose. O melhoramento de celulases deve abranger características necessárias para sua utilização em biorrefinarias, como alta eficiência catalítica em substratos celulósicos insolúveis, alta estabilidade a elevadas temperaturas e a determinado pH, e alta tolerância a produtos inibitórios (Zhang et al., 2006).

Uma forma de reduzir os custos da adição de enzimas celulolíticas, na produção de etanol celulósico, é desenvolver micro-organismos com capacidade de hidrolisar celulose e fermentar glicose, gerando etanol, simultaneamente, no chamado Bioprocesso Consolidado. Esta abordagem tem sido desenvolvida com vários micro-organismos que produzem naturalmente etanol, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas*

mobilis, e bactérias celulolíticas, como *Clostridium thermocellum* e *C. thermosaccharolyticum* (Zhou et al., 2001).

Alguns trabalhos têm desenvolvido cepas etanologênicas de leveduras que co-expressam celulasas (Cho et al., 1999; Hong et al., 2001; Zhou et al., 2001; Fugita et al., 2002; Hong et al., 2007; Kotaka et al., 2008; Jeon et al., 2009; Yanase et al., 2010), levando a uma diminuição de até 40% no requerimento de enzimas comerciais (Zhou et al., 2001), porém ainda não foi alcançada a independência da adição dos preparados enzimáticos durante o processo. Os esforços têm se voltado para a busca de micro-organismos que sejam capazes de fermentar uma variedade de açúcares (pentoses e hexoses) e que possuam, ao mesmo tempo, tolerância a condições de estresse como temperaturas em torno de 40°C, e presença de compostos inibidores no meio fermentativo. O melhoramento genético de micro-organismos para otimizar o processo de fermentação é um dos principais fatores necessários para geração de uma planta competitiva para produção de etanol a partir de lignocelulose (Zaldivar et al., 2001).

A heterogeneidade de materiais celulósicos e a dinâmica complexa de interação entre substratos insolúveis e enzimas celulolíticas resulta em problemas na extrapolação da medida de atividade de um substrato sólido para outro, especialmente aqueles com impactos em biorrefinarias (Zhang et al., 2006). A maioria dos trabalhos de produção de enzimas celulolíticas, em sistemas de expressão heteróloga, apresentam eficiência de hidrólise em laboratório, utilizando celulose cristalina como substrato, mas mostram-se falhos quando aplicados a outros substratos insolúveis de resíduos agroindustriais (Zhang et al., 2006), o que mostra a necessidade de se testar o potencial de hidrólise utilizando o bagaço ou celulose amorfa como substrato.

1.5 – Levedura *Kluyveromyces marxianus*

Cepas de *K. marxianus* têm sido isoladas de uma grande variedade de habitat, o que resulta em uma alta diversidade metabólica e em substancial grau de polimorfismo intraespecífico (Fonseca et al., 2008; Lane & Morrissey, 2010). *K. marxianus* foram descritas pela primeira vez em 1888 por E. C. Hansen, o qual as denominou *Saccharomyces marxianus* em homenagem a Marx, que originalmente isolou esta levedura de uvas (Lodder and Kreger-van Rij, 1952). Comparando-se *K. marxianus* e *Kluyveromyces lactis*, organismo modelo, o conhecimento acumulado sobre a primeira é

muito menor e, aquele existente, se distribui por um amplo número de diferentes cepas (Fonseca *et al.*, 2008).

K. marxianus possui *status* GRAS e o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas com esta levedura tem sido motivado pela identificação de vantagens quando comparada com *K. lactis* (Fonseca *et al.*, 2008; Lane & Morrissey, 2010). Estas vantagens incluem o fato de que *K. marxianus* pode crescer em um amplo espectro de substratos e a altas temperaturas, e possui altas taxas de crescimento (Bellaver *et al.* 2004). *K. marxianus* tem sido utilizada como fonte de enzimas de interesse industrial como inulinase, β -glicosidase, β -galactosidase e endopoligalacturoses (Fonseca *et al.* 2008; Lane & Morrissey, 2010), principalmente por sua habilidade natural de secretar enzimas, o que é uma propriedade desejada, uma vez que diminui o custo de etapas *downstream* no processo (Hensing *et al.* 1994). Hong *et al.* (2007) demonstrou que o peptídeo sinal *α -mating factor* de *S. cerevisiae*, é reconhecido para secreção de enzimas celulolíticas em *K. marxianus*, e o presente trabalho pretende utilizar o peptídeo sinal do *α -mating factor* de *K. lactis* (α -MF) para dirigir a secreção de celulases em *K. marxianus* UFV-3. Apesar do grande potencial para aplicação biotecnológica de *K. marxianus* ainda não foi desenvolvido ou padronizado um sistema de expressão eficiente para esta levedura, e pouco conhecimento se tem acumulado a respeito da manipulação genética da mesma (Fonseca *et al.*, 2008).

A primeira transformação eficiente de *K. marxianus* foi reportada por Iborra em 1993, utilizando o método de lítio (Ito *et al.*, 1983) e eletroporação (Meilhoc *et al.* 1990), sendo resultados similares apresentados por Zhang *et al.* (2003). Abdel-Banat *et al.* (2010) padronizaram o protocolo de transformação de *K. marxianus* com cassetes lineares obtidos por PCR de fusão, atingindo alta eficiência de transformação. Promotores constitutivos para dirigir a expressão heteróloga nesta levedura têm sido descritos, como aquele do gene da purina-citosina permease (Ball *et al.* 1999), da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAP) e álcool desidrogenase (Hong *et al.*, 2007). Porém mais estudos são requeridos para atender a demanda de aplicação biotecnológica dessa levedura (Fonseca *et al.*, 2008). O promotor PGK de *S. cerevisiae* foi utilizado com sucesso para expressão heteróloga de proteínas em *K. marxianus* NBRC1777 (Hong *et al.*, 2007; Yanase *et al.*, 2010), e foi testado no presente trabalho para expressão de celulases em *K. marxianus* UFV-3.

Recentemente, alguns trabalhos têm publicado a clonagem e expressão de genes codificantes de enzimas celulolíticas em *K. marxianus*. O trabalho de Hong *et al.* (2007)

mostrou a expressão heteróloga de uma endoglucanase, uma celobiohidrolase e uma β -glicosidase em *K. marxianus* NBRC1777, sendo o transformante capaz de fermentar celobiose, porém, incapaz de hidrolisar material celulósico como CMC. Yanase et al. (2010), obtiveram transformantes de *K. marxianus* NBRC1777 co-expressando as enzimas endoglucanase e β -glicosidase, sendo capazes de hidrolisar o substrato β -glucano e fermentar os açúcares resultantes. Porém, frente à diversidade e recalcitrância de materiais lignocelulósicos, resultados de hidrólise obtida em substratos sintéticos e com menor recalcitrância não podem ser extrapolados para a hidrólise da biomassa, apesar destes substratos serem úteis na seleção de clones recombinantes. Neste contexto, torna-se necessário o incentivo a trabalhos como estes no Brasil, visando o desenvolvimento de tecnologia brasileira de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

K. marxianus UFV-3 foi isolada na Universidade Federal de Viçosa, a partir de soro de queijo e tem sido testada quanto à capacidade de produção de etanol (Silveira et al., 2005) e secreção de proteínas heterólogas. Nosso grupo tem desenvolvido trabalhos de caracterização e melhoramento de *K. marxianus* UFV-3, visando potencializar seu uso para produção de etanol celulósico em Bioprocesso Consolidado. Neste sentido, trabalhos de Costa (2011) e Souza (2011) mostraram o potencial de *K. marxianus* UFV-3 para utilização em sistema de SSF para produção de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar quando comparada a outras cepas termotolerantes. Vetores de expressão comerciais ainda não foram desenvolvidos para transformação de *K. marxianus*, e nosso grupo tem trabalhado no desenvolvimento de um sistema de expressão eficiente para esta levedura. Lopes (2008) modificou o vetor comercial pKLAC1, resultando no vetor denominado pKLAC1-pADH2, para transformação de *K. marxianus*, onde o promotor ADH2 de *S. cerevisiae* foi clonado imediatamente antes do α -MF de *K. lactis* e do sítio de múltipla clonagem do vetor pKLAC1. Santos (2009) clonou as sequências codificadoras dos genes *eng1* e *cbhA*, a partir do RNA_m de *A. niger*, no vetor adaptado pKLAC1-pADH2. Rodrigues (2009) testou o vetor pKLAC1-pADH2-*eng1* quanto à capacidade de transformação de *K. marxianus* UFV-3 e expressão de endoglucanase. Os clones obtidos foram capazes de expressar e secretar endoglucanase, porém em quantidades insuficientes para utilização em sistema de SSF. Sugeriu-se que os baixos níveis de expressão estariam associados ao promotor ADH2 e não ao reconhecimento do sinal de secreção, uma vez que 80% da proteína funcional expressa foi identificada no sobrenadante de cultura (dados não publicados). Diante destes resultados, nos

propomos a transformar *K. marxianus* UFV-3 com os genes *eng1* e *cbhA* de *A. niger* sob controle do promotor PGK de *S. cerevisiae* e com secreção dirigida pelo peptídeo sinal α -MF de *K. lactis* para utilização na produção de etanol celulósico.

2.0 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Obter e caracterizar linhagens de leveduras *K. marxianus* expressando as enzimas heterólogas endo- β -1,4-glucanase e celobiohidrolase para utilização em Bioprocesso Consolidado na produção de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

2.2 – Metas Específicas:

2.2.1 - Transformar e selecionar leveduras *K. marxianus* UFV-3 com os genes *eng1* e *cbhA* de *Aspergillus niger* sob controle do promotor PGK de *Saccharomyces cerevisiae* e com secreção dirigida pelo peptídeo sinal do α -mating factor de *K. lactis*;

2.2.2 - Caracterizar *K. marxianus* recombinante para o gene *cbhA* quanto à secreção de proteínas e potencial fermentativo;

2.2.3 - Estudar e otimizar a secreção de proteínas endógenas e heteróloga por *K. marxianus* recombinante para o gene *cbhA*.

3.0 – METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. As etapas abaixo indicadas foram realizadas em outros laboratórios com espaço gentilmente cedido pelos professores responsáveis:

- Análises da concentração de glicose e etanol por cromatografia líquida de alto desempenho: Departamento de Microbiologia/UFMG;

- Cromatografias de troca iônica: Laboratório de Imunovirologia e Glicobiologia /Departamento de Biologia Geral/UFV;

- Micrografias: Laboratório de Associações Biológicas Micorrízicas / Departamento de Microbiologia / UFV.

3.1 – Micro-organismos e meios de cultura

Leveduras *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, isoladas e caracterizadas no Laboratório Fisiologia de Micro-organismos/DMB/BIOAGRO/UFV, foram utilizadas como hospedeiras para a expressão heteróloga das enzimas endo- β -1,4-glucanase e celobiohidrolase de *Aspergillus niger*, sendo a cepa não transformada utilizada como controle em todos os experimentos.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem LBM-1, selvagem, isolada de uma indústria de etanol de Minas Gerais pelo grupo de pesquisadores do LBM, foi utilizada para amplificação do promotor PGK a partir do DNA genômico. A levedura *S. cerevisiae* (BY4742; Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR016c::kanMX4), em que o gene SOK2 (YMR016c) foi interrompido pelo gene *kanMX*, foi usada como doadora do DNA para amplificação da marca de seleção *kanMX*.

As células estocadas em 30% de glicerol a -80 °C foram ativadas em meio de cultura YPD (2% p/v extrato de levedura, 1% p/v peptona e 2% v/v glicose) por 16 h a 37°C com agitação orbital de 180 rpm. Para cultivo em placas foi utilizado meio YPD sólido (2% p/v extrato de levedura, 1% p/v peptona, 2% v/v glicose e 2 % ágar) a 28 ou 37 °C, sendo adicionado o antibiótico G418, nas concentrações de 50, 100, 200 ou 300 μ g/mL, quando da seleção de transformantes. O meio SSF (tampão citrato 5 mM pH 4,8 acrescido de 2,5 g/L de extrato levedura, 2,5 g/L de peptona, 2 g/L de NH₄Cl, 1 g/L de KH₂PO₄, 0,3 g/L de MgSO₄7H₂O) foi utilizado na avaliação do potencial fermentativo

(item 3.3.4), sendo acrescentado de 45 g/L de glicose ou 32 g/L de bagaço pré-tratado quando da fermentação em glicose e bagaço, respectivamente.

3.2 – Obtenção e seleção de *K. marxianus* UFV-3 recombinantes para os genes *cbhA* e *eng1* de *A. niger*

3.2.1 – Construção dos cassetes lineares de expressão PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX

Os cassetes de expressão PKG-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX foram construídos utilizando a técnica de *overlap PCR* (ou *PCR* de fusão), segundo parâmetros padronizados por Cha-aim et al. (2009) e Shevchuk et al. (2004). A *overlap PCR* permite que sequências nucleotídicas de interesse sejam fusionadas de modo específico via *PCR*. Esta estratégia é utilizada em detrimento do uso de enzimas de restrição e ligação, trazendo grande economia de tempo e reagentes.

Neste trabalho, o promotor PGK de *S. cerevisiae* foi fusionado aos genes *eng1* e *cbhA* de *A. niger*, já contendo a sequência codificadora do peptídeo sinal α -MF de *K. lactis*, e à marca de seleção *kanMX* que confere resistência ao antibiótico G418. Os vetores de expressão pKLAC1-ADH2-*eng1* e pKLAC1-ADH2-*cbhA*, construídos no Laboratório de Biotecnologia Molecular (Lopes, 2009; Santos 2010), foram utilizados para amplificação das sequências codificadoras dos genes *eng1* e *cbhA* fusionadas ao peptídeo sinal α -MF de *K. lactis* e ao terminador transcricional do *LAC4* de *K. lactis*. O promotor PGK e a marca de seleção *kanMX* foram amplificados a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae*.

O esquema dos cassetes de expressão construídos e o posicionamento dos *primers* utilizados na construção são apresentados na Figura 3.1. As sequências dos *primers* utilizados na construção e sua respectiva numeração, nome e função são apresentados na tabela 3.1.

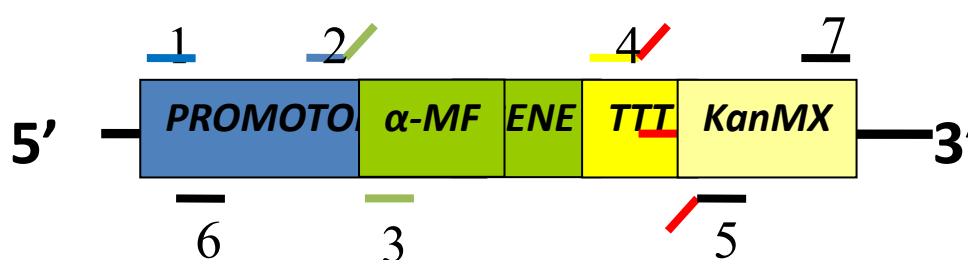


Figura 3.1 – Esquema de construção dos cassetes de expressão PKG-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX. Os traços indicam a região de anelamento dos *primers* segundo a numeração indicada (tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Sequências de *primers* utilizadas na construção dos cassetes de expressão com o respectivo número, nome e função.

Nº	Nome	Sequência	Função
1	PGK F	AGACGCGAATTTTTCGAAGAA	Anelamento: 1Kb <i>upstream</i> à sequência do promotor PGK
2	OvPGK R	<u>ATGCGGCTAATATAGTAGAGAA</u> <u>TTTCATTGTTTTATATTTGTTGTA</u> AAAAGTAGATAAATTACTTCC	Amplificação do promotor PGK e fusão (sublinhado) com a sequência do α -MF
3	α -MF F	ATGAAATTCTCTACTATATTAGC CGCAT	Amplificação do α -MF, fusionado aos genes, do vetor pKLAC1
4	Ovterm R	<u>CCCCCCCCCCCCCTATACAAC</u> ATCGAAGAAGAGTCTTTCTTT	Amplificação do terminador <i>LAC4</i> , fusionado ao α -MF e aos genes, do vetor pKLAC1 e fusão (sublinhado) com a sequência do <i>kanMX</i>
5	OvkanMX F	<u>GGGGGGGGGGGGGGGGT</u> AGGTCT AGAGATCTGTTTAGCTTGCC	Amplificação da marca <i>kanMX</i> e fusão (sublinhado) com a sequência do terminador
6	PGK nested	CGTCGATGACTTCCCATACTG	Anelamento 889 pb <i>upstream</i> à sequência do PGK
7	kanMX nested	TCGAATCGACAGCAGTATAGCG	Anelamento: 50 pb <i>upstream</i> à sequência do terminador do <i>kanMX</i> .

Inicialmente, cada porção do cassete de expressão (promotor PGK, genes *cbhA* ou *eng1*, e marca de seleção *kanMX*) foi amplificada utilizando-se *primers* (tabela 3.1 – *primers* 1 a 5) que adicionam à sequência do amplificado uma extremidade complementar ao fragmento ao qual se pretende fusionar aquela sequência. O *primer* 2, utilizado na amplificação do promotor PGK com extremidade complementar ao α -MF, foi construído segundo parâmetros (número de nucleotídeos, proporção de GC e temperatura de desnaturação (T_m)) estabelecidos por Shevchuk et al. (2004). Já os

primers 4 e 5, de fusão do terminador *LAC4* à marca *kanMX*, com porção de fusão rica em GC, foram construídos segundo parâmetros padronizados por Cha-aim et al. (2009). Para amplificação de cada fragmento os seguintes parâmetros foram utilizados: 94 °C 5 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 56 °C/1 min e 68 °C/2 min; 68 °C/5 min, usando a enzima *Pfu DNA Polimerase* (Fermentas).

Os fragmentos amplificados com extremidades complementares foram colocados juntos em uma reação de *PCR* (passo A), onde as porções complementares de cada sequência se anelam e servem de *primer* para amplificação do fragmento fusionado Shevchuk et al. (2004). O passo A de amplificação consistiu da seguinte reação: 94 °C/2 min; 10 ciclos de 94 °C/15 seg, 68 °C/20 seg e 72 °C/2 min, utilizando a enzima *High Fidelity DNA Polimerase* (Fermentas).

Os produtos gerados por esta fusão foram amplificados com *nested primers* (6 e 7) para aumentar a concentração do produto de interesse (passo B). O passo B de amplificação consistiu da seguinte reação: 94 °C 2 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 50 °C/1 min e 68 °C/4 min; 68 °C/5 min, utilizando a enzima *High Fidelity DNA Polimerase* (Fermentas). Os produtos desta reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) e os fragmentos com peso molecular correspondente ao esperado para os cassetes de expressão foram purificados do gel utilizando o *DNA Extraction Kit* (Fermentas), segundo as recomendações do fabricante. Os cassetes purificados foram enviados para sequenciamento e usados para transformação de *K. marxianus* UFV-3. As sequências provenientes do seqüenciamento foram analisadas utilizando o *software* livre Chromas Lite e comparadas por alinhamento utilizando as ferramentas BLASTn e BLASTp (NCBI). As sequências nucleotídicas foram traduzidas utilizando a ferramenta SIXFRAME (Work Bench).

3.2.2 – Transformação de *K. marxianus* e seleção de transformantes resistentes à G418

Leveduras *K. marxianus* UFV-3 foram transformadas com os cassetes de expressão lineares PGK-eng1-kanMX e PGK-cbhA-kanMX, em separado, por fenômeno integrativo, segundo protocolo padronizado por Abdel-Banat et al. (2010), com pequenas alterações. Para tanto, *K. marxianus* ativadas por crescimento em meio YPD sólido a 37 °C por 48 h foram inoculadas em 25 mL de YPD e incubadas a 28 °C por e agitação orbital de 150 rpm durante 16 h, ou até atingir aproximadamente $DO_{600} =$

10. As células foram centrifugadas (4500 x g por 5 min) e ressuspensas em 1,4 mL de solução TM [PEG 3350 40% (p/v), ácido acético (200 mM) e ditiotreitol (100 mM)], sendo submetidas à nova centrifugação (4500 x g por 2 min). O sedimento de células foi ressuspenso em 0,5 mL de solução TM e separado em alíquotas de 100 µL, às quais foi adicionado o cassete de expressão purificado (25-50 ng). A mistura células-DNA foi incubada a 47 °C por 15 minutos com posterior adição de 900 µL de YPD. A suspensão de células foi plaqueada em meio YPD sólido contendo o antibiótico G418 (50 ou 100 µg/mL, de acordo com a estratégia adotada) e incubada a 28 °C.

Transformantes de *K. marxianus* com potencial de expressão dos cassetes PGK-eng1-kanMX e PGK-cbhA-kanMX foram selecionados por duas estratégias, cada uma correspondendo a uma tentativa de transformação.

A estratégia (1) de seleção, primeira tentativa de transformação, consistiu das seguintes etapas: as células advindas da transformação foram inoculadas em meio YPD sólido contendo 50 e 100 µg/mL de G418; as células foram incubadas a 28 °C e as colônias crescidas foram transferidas, sucessivamente (intervalos de 72 h), para novas placas de YPD contendo 100, 200 e 300 µg/mL de G418 e incubadas a 28 °C.

A estratégia (2) de seleção, segunda tentativa de transformação, consistiu das seguintes etapas: as células advindas da transformação foram inoculadas em meio YPD sólido contendo 100 µg/mL de G418; as células foram incubadas a 28 °C e as colônias crescidas foram transferidas para novas placas contendo 100 µg/mL de G418; as células foram incubadas a 28 °C e as colônias crescidas em 48 h foram transferidas, ao mesmo tempo, para placas de YPD contendo 200 e 300 µg/mL de G418 e incubadas a 28 °C durante 48 e 96 h, respectivamente.

As colônias resistentes a 300 µg/mL de G418, provenientes das duas estratégias de seleção, foram consideradas transformantes positivos e estocados em meio YPD sólido a 4 °C e em glicerol 30 % a -80°C.

3.2.3 – Análise da integração dos cassetes de expressão PGK-eng1-kanMX e PGK-cbhA-kanMX em *K. marxianus* recombinantes

Para confirmar a integração completa do cassete de expressão no genoma dos transformantes selecionados, foram padronizadas PCRs de amplificação dos fragmentos: PGK, eng1, PGK-eng1, cbhA e PGK-cbhA. Os *primers* utilizados para amplificação destes fragmentos são listados na tabela 3.2. A reação para amplificação

do fragmento PGK-eng1 foi testada quanto à temperatura de anelamento no intervalo de 52 a 56 °C sem sucesso. A *PCR* de colônia padronizada para os demais fragmentos consistiu dos seguintes passos: 94 °C 15 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 56 °C/1 min e 72 °C/1 min; 72 °C/5 min, utilizando a enzima *Go Taq DNA Polimerase* (Promega). Este programa de *PCR* foi utilizado para amplificação dos fragmentos eng1, cbhA e PGK-cbhA a partir de colônias, crescidas em meio seletivo 300 µg/mL de G418, putativas para a presença dos cassetes de expressão. Para tanto, a mistura reacional para a *PCR* (segundo especificações do fabricante da polimerase) foi acrescida de 1% (v/v) de Triton X-100. As colônias foram diluídas em 10 µL de água estéril e 1 µL da solução foi adicionada a 20 µL da mistura para a *PCR*. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) e comparados quanto ao peso molecular com padrão *1 Kb DNA Ladder* (Fermentas).

Tabela 3.2 – Sequências dos *primers* utilizados na identificação dos fragmentos PGK, cbhA, eng1, PGK-eng1 e PGK-cbhA em cepas recombinantes de *K. marxianus*.

Identificação	Sequência
F PGK	CCTGACTTCAACTCAAGACGC
R PGK	CAAATATGTATTTCTTGCATTGACC
F cbhA	CTACGGTGTCACTGACG
R cbhA	TATATCCTCGTCGCCAAAGG
F eng1 s/p	GGATCGAATGAGTCTGGTGC
R eng1 s/p	CAGACCTCAAAGATATGCCTCC
F PGK-eng1	CAGCTTCCAATTTTCGTCACA
R PGK-eng1	CGTCCGTTACCGCTTTTATC
F PGK-cbhA	TGTCCGAATCGTGTGACAAC
R PGK-cbhA	CAATGAATCACCGTCAGTGG

3.2.4 – Seleção de *K. marxianus* quanto a expressão e secreção de endoglucanase e celobiohidrolase recombinantes

Os transformantes de *K. marxianus* selecionados por resistência à 300 µg/mL de G418 foram investigados quanto à atividade de endoglucanase e celobiohidrolase no sobrenadante de cultura e no extrato celular. Para tanto, os clones selecionados e a cepa controle não transformada UFV-3 foram ativados e inoculados em meio YPD, com DO₆₀₀ inicial igual a 0,2, e incubados a 37 °C com agitação orbital de 180 rpm, durante 48 h. A absorvância das culturas em $\lambda = 600$ nm foi medida em 24 e 48 h para

determinação da DO_{600} , a qual foi posteriormente transformada em massa de células utilizando a relação 1 unidade de $DO_{600} = 0,507 \text{ g.L}^{-1}$ de massa seca de *K. marxianus* UFV-3 (Diniz et al., 2011). Alíquotas de 1 mL foram retiradas em 24 e 48 h de cultura, centrifugadas (4500 x g por 5min) e o sobrenadante foi utilizado para ensaio de atividade enzimática. Alíquotas de 2 mL foram retiradas em 48 h de cultura, centrifugadas (4500 x g por 5min), e o sedimento de células foi congelado com N_2 líquido e estocado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para obtenção do extrato celular, foi adicionado ao sedimento de células estocado 0,5 mL de tampão de lise (5 $\mu\text{L/mL}$ de PMSF 100 mM, 8 $\mu\text{g/mL}$ de Pepstatina, em tampão citrato 50 mM pH5,0) e 0,3 g de micro-pérolas de vidro. A mistura foi agitada por cinco vezes em vortex durante 15 segundos e foram adicionados 0,5 mL de tampão de lise. O extrato foi centrifugado (12000 x g por 5min), o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e centrifugado (12000 x g por 5min) novamente para sedimentação do excesso de proteínas ou restos celulares. Este extrato celular e o sobrenadante de cultura foram submetidos à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), utilizando o reagente *Protein Assay* BIORAD e segundo as recomendações do fabricante.

As amostras de sobrenadante e extrato celular de clones putativos *eng1* e *cbhA* foram submetidas a ensaio de atividade celulásica geral utilizando o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG). Os ensaios foram conduzidos em volume total de 100 μL , sendo 15 μL de amostra, 25 μL de substrato pNPG 2 mM (SIGMA) e 60 μL de tampão citrato 50 mM pH 5,0. Os componentes da reação foram adicionados, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, em microplacas de 250 μL , a placa foi centrifugada (3000 x g por 20 seg) e incubada em termociclador por 20 min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A reação foi interrompida por adição de 100 μL de carbonato de sódio 1 M. A mistura (150 μL) foi transferida para microplacas e a concentração de p-nitrofenol (pNP) foi estimada por espectrofotometria em $\lambda = 410 \text{ nm}$ por comparação com curva padrão de pNP.

A atividade de endoglunase foi medida de forma específica (Zhang et al., 2006) por quantificação de extremidades reductoras, geradas no ensaio de hidrólise do substrato sintético carboximetilcelulose (CMC), utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller et al 1959). Para tanto, os ensaios foram conduzidos em volume total de 100 μL , sendo 25 μL de amostra, 50 μL de substrato CMC 2 % (p/v) (SIGMA) em tampão e 25 μL de tampão citrato 50 mM pH 5,0. Os componentes da reação foram adicionados, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, em microplacas de 300 μL , a placa foi centrifugada (3000 x g por 20 seg) e incubada em termociclador por 3 h a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A reação foi interrompida pela

adição de 100 μL de reagente de DNS. A mistura foi incubada a 99 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min e a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 5min e transferida (150 μL) para microplacas e a concentração de açúcares redutores foi estimada por espectrometria em $\lambda = 540 \text{ nm}$.

A atividade específica de celobiohidrolase foi medida por quantificação da hidrólise dos substratos sintético p-nitro-fenil- β -D-celobiosídeo (pNPC) e p-nitro-fenil-lactosídeo (pNPLac). Os ensaios foram conduzidos em volume total de 100 μL , sendo 15 μL de amostra, 25 μL de substrato pNPC 2 mM (SIGMA) ou pNPLac 3 mM (SIGMA) e 60 μL de tampão citrato 50 mM pH 5,0. Os componentes da reação foram adicionados a 4 $^{\circ}\text{C}$ em microplacas de 250 μL , a placa foi centrifugada (3000 x g por 20 seg) e incubada em termociclador por 40 min a 50 $^{\circ}\text{C}$. A reação foi interrompida por adição de 100 μL de carbonato de sódio 1 M. A mistura foi transferida para microplacas e a concentração de pNP foi estimada por espectrofotometria em $\lambda = 410 \text{ nm}$.

Estes ensaios foram também utilizados na etapa de otimização da secreção de proteínas heterólogas por *K. marxianus* UFV-3 recombinantes.

Os valores de atividade enzimática obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias por intervalo de confiança utilizando $\alpha = 0,05$ no *software* Minitab 16[®].

3.3 – Caracterização do mutante *K. marxianus cbhA*

3.3.1 – Análise da estabilidade genética do clone *cbhA 4'*

As culturas estocadas de *K. marxianus cbhA 4'* e da cepa controle UFV-3 foram ativadas por crescimento em YPD sólido a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 48 h. As cepas foram estriadas, ao mesmo tempo, em nova placa de YPD e em outra placa de YPD contendo 300 $\mu\text{g/mL}$ de G418 e incubadas a 28 $^{\circ}\text{C}$. A cada, no mínimo, 48 h as cepas foram transferidas, a partir da placa YPD sem antibiótico, para novas placas de YPD e de YPD contendo 300 $\mu\text{g/mL}$ de G418 e incubadas a 28 $^{\circ}\text{C}$, sendo este procedimento repetido 7 vezes. A capacidade de crescimento em meio seletivo e não seletivo foi observada durante estas passagens e a velocidade média de crescimento de 0,75 h^{-1} foi considerada para cálculo do número de gerações (Fonseca et al., 2008).

3.3.2 – Avaliação das proteínas secretadas por *K. marxianus* UFV-3 e *K. marxianus* recombinantes para o gene *cbhA*

Alíquotas do sobrenadante de 24 e 48 h de cultura (item 3.2.4) de *K. marxianus* UFV-3 e dos clones 2 e 4' recombinantes para o gene *cbhA* foram submetidas a eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE). Para tanto, 6 mL de sobrenadante de cultura foram concentrados por ultrafiltração em membranas de 10 KDa WMCO (GE Healthcare) por centrifugação a 8000 x g por 10 min a 4°C. Foi realizada quantificação de proteínas pelo método de Bradford antes e depois da concentração para todas as amostras. O sobrenadante também foi concentrado por evaporação a vácuo, para tanto 1,9 mL de sobrenadante foram incubados em *speed vac*, durante 16 h e o sedimento resultante foi ressuspensão em 190 µL de água deionizada. As amostras foram misturadas a tampão de amostra [150mM Tris-HCl pH7, 6% β-mercaptoetanol, 12% (p/v) Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 30% (v/v) glicerol e 0,05 (p/v) de Coomassie Blue G-250], na proporção de 3:1 (amostra/tampão). A mistura foi aquecida a 100° C por 5 minutos e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (v/v). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, em tampão Tris-HCl glicina pH 8,8, utilizando marcador padrão de peso molecular *Broad Range* (BIORAD). Os géis foram corados: com Coomassie Brilliant Blue R-250 [50% (v/v) metanol, Coomassie Brilliant Blue R-250 1g·L⁻¹, 10% (v/v) ácido acético glacial] e descorados com solução de metanol 25 % (v/v) e ácido acético 7,5 % (v/v); ou com Coomassie G-250 coloidal 0,2 % (p/v) em solução fixadora de ácido orto-fosfórico 2 % (v/v), etanol 18 % (v/v) e (NH₄)SO₄ 15 % (p/v). A coloração com Coomassie G-250 coloidal foi realizada somente para visualização das proteínas provenientes da purificação e da reação de deglicosilação.

O peso molecular das proteínas de interesse foi estimado utilizando-se o *software* Alpha Easer FC 4.0.

3.3.2.1 – Purificação de proteínas do sobrenadante de *K. marxianus* UFV-3 e *cbhA* C-4'

Os sobrenadantes de 48 h de cultura (item 3.2.4) de *K. marxianus* UFV-3 e do clone *cbhA* 4' foram submetidos a purificação, via cromatografia líquida de troca iônica, para aumentar a pureza relativa da celobiohidrolase recombinante secretada pelo clone e compará-la ao controle UFV-3. Para tanto, os parâmetros cromatográficos foram

determinados com base no trabalho Gielkens et al. (2004) e na análise das características da celobiohidrolase A (CBHa) de *A. niger* disponível no banco de dados (Nº de acesso: AAF04491.1). A CBHa possui pI predito de 3,89, tendo sido escolhido tampão acetato/ácido acético 20 mM pH 5,5 para diluição da amostra, de forma a permitir que proteínas com carga negativa, incluindo a CBHa, interagissem com a coluna Mono Q (GE *Healthcare*) trocadora de ânions. As amostras de sobrenadante foram filtradas em membrana de 0,22 µm e 5 e 2,5 mL, correspondendo a 2,5 e 1,25 mg de proteína, das amostras *cbhA* e UFV-3, respectivamente, foram diluídos dez vezes em tampão acetato/ácido acético 20 mM pH 5,5 e aplicados em coluna cromatográfica de troca aniônica Mono Q, com fluxo de injeção de 0,8 mL/min. A fração que não interagiu com a coluna foi armazenada a -20 °C. As proteínas que interagiram com a coluna foram eluídas em gradiente contínuo de NaCl de 0 a 1 M, aplicado com fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 0,5 mL. A eluição foi acompanhada por espectrometria em $\lambda = 280$ nm e as frações correspondentes a picos de absorvância foram investigadas quanto à atividade sobre os substratos pNPG e pNPC, segundo protocolo do item 3.2.4. Os gráficos para o perfil cromatográfico (A_{280}) e para os valores de atividades foram construídos no *software* GraphPad Prism 4.0. As frações que apresentaram atividade sobre pNPG e/ou pNPC foram analisadas em SDS-PAGE (a concentração de proteína em cada amostra foi corrigida para aplicação de 1 µg no gel) segundo protocolo do item 3.3.2, utilizando coloração com Comassie G-250 coloidal.

3.3.3 – Análise do perfil de glicosilação das proteínas do sobrenadante de *K. marxianus cbhA-C4*'

As frações purificadas (item 3.3.2.1) do sobrenadante do clone *cbhA 4*' , contendo atividade sobre o substrato específico pNPC, foram submetidas a reação de de-glicosilação para investigação da presença de N- e O-glicosilação nas proteínas presentes nestas frações. Para tanto, 10 µL de cada amostra, contendo 1 µg de proteína, foi tratada com 0,125 U de N-glicosidase (PNGase F - *Biolabs New England*) e/ou 10 U de O-glicosidase (endo-N-acetilgalactosaminidase - *Biolabs New England*) por incubação a 37 °C durante 3 h e 40 min. As frações não tratadas foram comparadas com as amostras tratadas com N-glicosidase, O-glicosidase e com ambas enzimas, em SDS-PAGE (item 3.3.2), utilizando coloração com Comassie G-250 coloidal.

3.3.4 - Avaliação do potencial fermentativo de *K. marxianus cbhA-C4'*

3.3.4.1 – Fermentação em glicose

As culturas ativadas de *K. marxianus* UFV-3 e *cbhA 4'* foram centrifugadas (5000 x g por 10min), as células foram lavadas duas vezes com água deionizada estéril e inoculadas em 50 mL de meio SSF, contendo 45 g/L de glicose, em erlenmeyers de 125 mL, com DO₆₀₀ inicial igual a 2. As culturas foram incubadas a 42 °C por 24 h sob agitação orbital de 180 rpm, sendo retiradas alíquotas de 1 mL a cada 2 h para determinação de DO₆₀₀ e armazenamento do sobrenadante. Os valores de DO₆₀₀ foram posteriormente transformados em massa de células utilizando a relação 1 unidade de DO₆₀₀ = 0,507 g.L⁻¹ de massa seca de *K. marxianus* UFV-3 (Diniz et al., 2011). As alíquotas foram centrifugadas (1000 x g por 5min) e o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22 µm e armazenado a -20 °C. As amostras de sobrenadante foram submetidas à cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC LC-20A Prominence), utilizando coluna HPLC Supelcogel G610H 30com x 7,8 mm ID (59320-U), com temperatura 65 °C, com fluxo de injeção de 1,0 mL/min e volume de injeção de 100 µL, utilizando ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel. Utilizou-se Detector RID - Refractive Index Detector (temperatura de 45 °C) para quantificação das concentrações de etanol e glicose pela comparação da área do pico de absorvância com curva padrão.

3.3.4.2 – Fermentação em bagaço

As culturas ativadas de *K. marxianus* UFV-3 e *cbhA 4'* foram inoculadas em meio YPD, com DO₆₀₀ inicial igual a 0,2, e incubados a 37 °C com agitação orbital de 180 rpm, durante 48 h. As culturas resultantes foram diluídas em água, e 10 mL da mistura de células e sobrenadante foi inoculada em 40 mL de meio SSF, em erlenmeyers de 125 mL, contendo 32 g/L de bagaço pré-tratado, para DO₆₀₀ inicial igual a 2. Para cada cepa, foram adicionadas à cultura três quantidades (5, 10 e 15 FPU) de um *pull* de celulasas comercial (Celluclast – SIGMA). Cada tratamento, combinação da cepa (UFV-3 ou *cbhA 4'*) e da quantidade de enzima (5, 10 e 15 FPU), foi repetido duas vezes, totalizando 12 unidades experimentais que foram distribuídas de forma inteiramente casualizada. As culturas foram incubadas a 42 °C, sob agitação orbital de 180 rpm, durante 30 h. A cada 5 h alíquotas de 1 mL foram retiradas, centrifugadas (10000 x g por 5min), o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22 µm e armazenado a -20 °C. As amostras de sobrenadante foram submetidas à cromatografia

líquida de alto desempenho (item 3.3.4.1) para determinação da concentração de etanol. Os resultados foram submetidos à ANOVA da regressão e teste t para os coeficientes estimados utilizando $\alpha = 0,05$. Os valores residuais e ajustados da resposta concentração de etanol, calculados a partir das equações ajustadas, foram utilizados para se testar as pressuposições da ANOVA e para construção de gráficos (de superfície e contorno), respectivamente. Todas as análises estatísticas e construção de gráficos foram realizadas no *software* Minitab 16[®].

O pré-tratamento ácido-básico do bagaço utilizado nesta etapa foi realizado segundo o protocolo padronizado por Souza et al. (2012).

3.4 – Otimização das condições de cultivo para secreção de proteínas em *K. marxianus cbhA 4*'

Para otimização da secreção de proteínas heterólogas em *K. marxianus cbhA 4*' foram utilizados experimentos sequenciais da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Primeiramente, foi realizada, por meio de um delineamento fatorial fracionado, a seleção de fatores importantes em causar variação nas respostas atividade enzimática e crescimento; em seguida foi realizado um delineamento de deslocamento para a seleção das faixas de cada fator onde a resposta atividade enzimática pudesse ser explicada por um modelo linear de segundo grau; em última etapa foi executado um Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR) para se ajustar os modelos de superfície que explicassem a variação das respostas atividade enzimática e concentração de proteínas do sobrenadante, e crescimento celular quanto aos fatores controláveis estudados.

O efeito dos fatores controláveis pH, temperatura (°C), concentração de peptona % (p/v), concentração de glicose % (p/v), concentração de extrato de levedura % (p/v) e concentração de Tween 80 % (v/v) sobre as respostas atividade enzimática do sobrenadante sobre pNPG e pNPC e crescimento celular (DO_{600}) foi investigado por meio de um experimento Fatorial Fracionado de Resolução IV (1/4 fração) com adição de um ponto central (quatro repetições), totalizando $(2^{6-1} + 4) = 20$ ensaios, com 17 diferentes combinações entre os fatores. Para tanto, foram definidos um nível alto (+1), um nível intermediário (0) e um nível baixo (-1) de cada fator, com base na informação da literatura sobre o efeito destes fatores na secreção de proteínas. As combinações de níveis ensaiadas são apresentadas no item 4.3.1. As células ativadas foram inoculadas em 10 mL de meio, em erlenmeyers de 25 mL, contendo peptona, extrato de levedura,

glicose e Tween nas concentrações indicadas em cada tratamento diluídos em tampão McIlvaine (citrato/fosfato) em pH indicado em cada tratamento, com DO₆₀₀ inicial igual a 0,2. A tabela 3.3 mostra as proporções de mistura de Na₂HPO₄ 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M para obtenção das soluções tampão da série McIlvaine. As culturas foram incubadas sob agitação orbital de 180 rpm, durante 48 h, nas diferentes temperaturas ensaiadas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em 24 e 48 h de cultivo para medida da atividade enzimática do sobrenadante (item 3.3.2) e medida de DO₆₀₀. Os valores obtidos foram submetidos a ANOVA e teste t para efeitos, utilizando $\alpha = 0,05$.

Tabela 3.3 – Série McIlvaine para obtenção de tampão citrato/fosfato em pH 3,0 a 7,5.

pH	Ácido cítrico 0,1M	Na ₂ HPO ₄ 0,2M	Volume final
3,0	7,945 mL	2,055 mL	10 mL
3,5	7,020 mL	2,980 mL	10 mL
4,0	6,145 mL	3,855 mL	10 mL
4,5	5,505 mL	4,495 mL	10 mL
5,0	4,535 mL	5,465 mL	10 mL
5,5	4,355 mL	5,645 mL	10 mL
6,0	3,685 mL	6,315 mL	10 mL
6,5	2,965 mL	7,035 mL	10 mL
7,0	1,765 mL	8,235 mL	10 mL
7,5	0,830 mL	9,170 mL	10 mL

O experimento fatorial fracionado permitiu determinar os fatores pH, temperatura, concentração de peptona, concentração de glicose e concentração de Tween como importantes em causar variação na resposta atividade enzimática. Diante disso, foi realizado um delineamento de deslocamento, composto por cinco combinações diferentes de cada fator (deslocamentos – D), sendo realizadas duas repetições de cada combinação, totalizando 10 unidades experimentais que foram inteiramente casualizadas. Os passos (diferença entre os níveis de um fator) foram determinados de acordo com o efeito de cada fator estimado no fatorial fracionado. As combinações de níveis de cada fator ensaiadas são apresentadas no item 4.3.2. As células ativadas foram inoculadas em 10 mL de meio, em erlenmeyers de 25 mL, contendo extrato de levedura 2% (p/v) e peptona, glicose e Tween nas concentrações

indicadas em cada tratamento, diluídos em tampão McIlvaine (citrato/fosfato) em pH indicado em cada tratamento, com DO_{600} inicial igual a 0,2. As culturas foram incubadas sob agitação orbital de 180 rpm, durante 48 h, nas diferentes temperaturas ensaiadas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em 24 e 48 h de cultivo para medida da atividade enzimática e da concentração de proteínas do sobrenadante (item 3.3.2) e medida de DO_{600} . Os resultados foram analisados graficamente pelo ajuste de modelos para cada resposta quanto aos deslocamentos (D1 a D5).

Para modelagem de superfície de resposta para a atividade enzimática e concentração de proteínas do sobrenadante e crescimento celular quanto aos fatores pH, temperatura, concentração de peptona e de glicose, foi realizado um DCCR. A porção cúbica deste delineamento foi planejada como um Fatorial Fracionado de Resolução IV (1/2 fração), contendo 8 combinações. A porção axial foi definida utilizando α rotacionado igual a 2. O ponto central foi repetido quatro vezes. O delineamento ($2^{4-1} + 2 \times 4 + 4$) totalizou 20 unidades experimentais, as quais foram inteiramente casualizadas. As combinações de níveis de cada fator ensaiadas no DCCR são apresentadas na tabela 4.6. As células ativadas foram inoculadas em 10 mL de meio, em erlenmeyers de 25 mL, contendo extrato de levedura 2% (p/v) e peptona e glicose nas concentrações indicadas em cada tratamento, diluídos em tampão McIlvaine (citrato/fosfato) em pH indicado em cada tratamento, com DO_{600} inicial igual a 0,2. As culturas foram incubadas sob agitação orbital de 180 rpm, durante 48 h, nas diferentes temperaturas ensaiadas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em 24 e 48 h de cultivo para medida da atividade enzimática e da concentração de proteínas do sobrenadante (item 3.3.2) e medida de DO_{600} . Os resultados foram submetidos à ANOVA da regressão e teste t para os coeficientes estimados utilizando $\alpha = 0,05$. Os valores residuais e ajustados da respostas estudadas, calculados a partir das equações ajustadas, foram utilizados para se testar as pressuposições da ANOVA e para construção de gráficos (de superfície e contorno), respectivamente.

Todas as análises estatísticas e construção de gráficos da etapa de otimização foram realizadas no *software* Minitab 16[®].

4.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Obtenção e seleção de *K. marxianus* UFV-3 recombinantes para os genes *cbhA* e *eng1* de *A. niger*

4.1.1 – Construção dos cassetes lineares de expressão PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX para transformação de *K. marxianus* UFV-3

Os cassetes lineares de expressão PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX foram construídos utilizando-se a técnica de PCR de fusão, também utilizada por Abdel-Banat et al. (2010) para obtenção de DNA linear para transformação de *K. marxianus*. As considerações realizadas para o desenho dos cassetes, ou seja, escolha do promotor, marca de seleção e estratégia de transformação serão discutidas posteriormente. A eletroforese mostrando os amplificadores resultantes do segundo passo (passo B) de amplificação da PCR de fusão é mostrada na Figura 4.1. Observa-se deste resultado que os produtos de interesse PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX, de tamanho esperados 4,3 e 4,1 Kb, respectivamente, não são os únicos amplificadores, porém, são aqueles que possuem maior concentração e cuja separação de outras bandas inespecíficas permitiram sua purificação do gel sem contaminação. Para o desenho dos *primers* utilizados nestas construções foram adotados parâmetros padronizados por Shevchuk et al. (2004), na fusão PGK-gene (*cbhA* ou *eng1*), e a metodologia de fusão mediada por sequências ricas em GC, padronizada por Cha-aim et al. (2009), para fusão gene-kanMX. A combinação das duas estratégias de fusão mostrou alta eficiência de obtenção dos produtos de interesse (Figura 4.1). Porém, acreditamos que o maior número de ampliações inespecíficas nesta *overlap PCR*, quando comparadas à *overlap PCRs* da literatura (Shevchuk et al., 2004; Heckman & Pease, 2007), seja causada pelas sequências de fusão ricas em GC. Neste contexto, sugere-se que a fusão por complementariedade, aos moldes do trabalho de Shevchuk et al. (2004), seja aplicada para fins onde exista o requerimento de alta pureza dos produtos de fusão.

O rendimento das construções foi suficiente para purificar os cassetes lineares PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX, em concentrações aproximadas de 100 ng/μL, usá-los para confirmação da construção, via PCR e sequenciamento, e para transformação de *K. marxianus* UFV-3. Esta amplificação foi obtida da fusão dos três fragmentos de interesse (PGK1, *cbhA* ou *eng1* e kanMX), amplificadas com as respectivas regiões de fusão, no primeiro passo de amplificação da PCR de fusão.

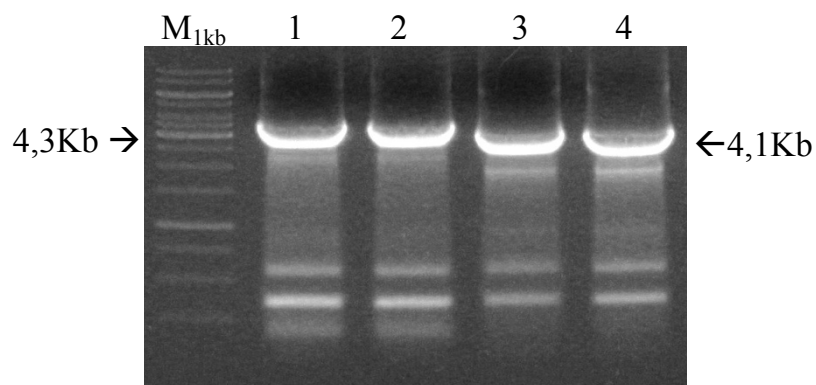


Figura 4.1 - Construção dos cassetes de expressão PGK-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX. Eletroforese em gel de agarose 0,9% mostrando a amplificação dos cassetes de expressão PGK-cbhA-KanMX de 4,3 Kb (canaletas 1 e 2), e PGK-eng1-KanMX de 4,1 Kb (canaletas 3 e 4), resultante do passo B do PCR de fusão, segundo protocolo do item 3.2. M_{1Kb}: marcador *1Kb DNA Ladder* Fermentas.

Na transformação de leveduras podem ser aplicados vetores episossomais, os quais requerem uma origem de replicação autônoma, ou vetores integrativos, os quais são incorporados ao genoma da levedura por recombinação homóloga ou ectópica. Vetores integrativos são preferíveis em muitos casos, especialmente porque não requerem pressão seletiva durante a produção da proteína recombinante, o que traria custos adicionais ao processo, e porque a integração múltipla de cópias no genoma – por exemplo 100 cópias descritas para *H. polymorpha* (Kunze et al., 2009) e 30 cópias para *P. pastoris* (Cregg et al., 2009) - pode levar a altos rendimentos na expressão da proteína recombinante (Çelik & Çalik, 2011). Neste contexto, escolheu-se neste trabalho utilizar cassetes de expressão lineares para transformação de *K. marxianus* UFV-3 por fenômeno integrativo. Nonkland et al. (2008) descreveu que em *K. marxianus* a transformação com DNA linear obtido via PCR ocorre com alta eficiência e em cepas de *K. marxianus* selvagens a integração ectópica ocorre com maior frequência, através do sistema NHEJ (*non-homologous ends joining*). Baseando-se neste conhecimento, os cassetes integrativos utilizados no presente trabalho foram construídos sem adição de extremidades homólogas de direcionamento da integração.

A escolha do promotor para expressão heteróloga pode afetar fortemente os rendimentos do processo. Uma grande variedade de promotores, constitutivos ou regulados, está disponível para expressão em leveduras (Çelik & Çalik, 2011), sendo vários deles originários de *S. cerevisiae*. Em *K. marxianus*, promotores nativos, como PCPL3 e INU1, e promotores de *S. cerevisiae*, como TDH3, PGK1 e GAL1 têm sido estudados para dirigir a expressão de genes heterólogos, porém, ainda não há um

consenso sobre qual deles seria melhor aplicado em um sistema padronizado de expressão. O promotor PGK1 de *S. cerevisiae* foi utilizado com sucesso para expressão heteróloga de proteínas em *K. marxianus* NBRC1777 (Hong et al., 2007; Yanase et al., 2010) e foi escolhido para dirigir a expressão dos genes *cbhA* e *eng1* no presente trabalho.

Uma marca de seleção eficiente é necessária para selecionar os transformantes com baixos níveis de falsos positivos. Frente à dificuldade de obtenção de cepas auxotróficas estáveis, em si tratando da transformação de leveduras selvagens, e, em especial, de cepas que podem ser poliplóides, marcas de seleção dominantes são preferíveis. As marcas de seleção dominantes mais utilizadas em leveduras são genes que conferem resistência a antibióticos como G418, higromicina e zeomicina. Dentre as marcas de seleção dominantes utilizadas para seleção de transformantes de *K. marxianus* estão os genes *kanMX*, *AUR1* e *nat* (Lane & Morrissey, 2010). No presente trabalho, o gene *kanMX*, que confere resistência à G418, foi escolhido como marca de seleção, principalmente por permitir a seleção de clones com maior potencial de expressão do gene recombinante pelo crescimento em concentrações crescentes do antibiótico. Esta característica torna-se de suma importância em um sistema onde se espera que a integração seja ectópica, e, conseqüentemente, o local de integração pode afetar muito a expressão do gene de interesse.

Para confirmar a correta construção dos cassetes foi realizada nova *PCR* usando os cassetes PGK-*cbhA*-*kanMX* e PGK-*eng1*-*kanMX* como molde e combinações de *primers* que permitissem verificar a amplificação dos fragmentos PGK-gene e gene-*kanMX*. O resultado destas *PCRs* está apresentado na eletroforese da Figura 4.2, onde se observa a amplificação forte e específica, com pesos moleculares esperados, dos fragmentos investigados.

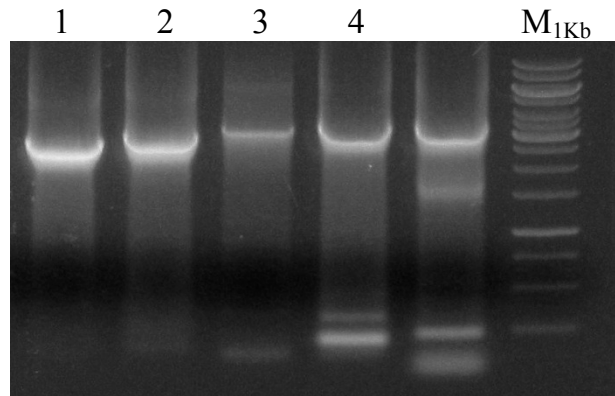


Figura 4.2 – Confirmação da construção dos cassetes PGK-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX. Eletroforese em gel de agarose 0,9% mostrando a amplificação: dos fragmentos PGK-eng1 de 2,7 kb (canaleta 1) e eng1-kanMX de 3,0 Kb (canaleta 2) gerados a partir do cassete PGK-eng1-kanMX; e dos fragmentos PGK-cbhA de 3,1 (canaleta 3) e cbhA-kanMX de 3,7 Kb (canaleta 4), gerados a partir do cassete PGK-cbhA-kanMX. M_{1Kb}: marcador *1Kb DNA Ladder* Fermentas.

Os cassetes PGK-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX foram sequenciados a fim de avaliar sua correta construção e a existência de mutações que pudessem comprometer a expressão. A tabela 4.1 mostra a análise de alinhamento utilizando o BLASTn/NCBI contra o banco de dados GenBank das sequências obtidas do seqüenciamento com os respectivos *primers* utilizados na amplificação.

Tabela 4.1 – Análise de sequências obtidas a partir da amplificação dos cassetes PGK-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX em reação de seqüenciamento de DNA pelo método de Sanger. Os fragmentos de cada cassete obtidos com os *primers* indicados foram alinhados pelo BLASTn/NCBI, sendo apresentadas as sequências resultantes do alinhamento (Identidade no GenBank), a cobertura da sequência investigada e a respectiva identidade entre estas sequências.

Cassete	Primer	pb	Identidade no GenBank	Cobertura (%)	Identidade (%)
PGK-cbhA-kanMX	PGK F	244	-	-	-
	Ter R	632	pKLAC1	81	93
			<i>A. niger cbhA</i>	17	94
	α -mat F	703	pKLAC1	36	98
			<i>A. niger cbhA</i>	62	99
kanMX R nested	723	kanMX	99	97	
PGK-eng1-kanMX	PGK F	260	-	-	-
	Ter R	624	-	-	-
	α -mat F	819	pKLAC1	26	97
			<i>A. niger eng1</i>	73	88
			<i>A. niger endoglucanase B</i>	73	94
kanMX R nested	652	kanMX	98	94	

Observa-se que alguns fragmentos não foram seqüenciados, e que alinhamentos com identidades de sequência com valores entre 93 e 98% revelavam possíveis erros de seqüenciamento. A análise dos cromatogramas permitiu separar as mutações reais observadas nas construções daquelas originadas de erro no seqüenciamento, e as sequências corrigidas resultantes foram analisadas utilizando a ferramenta SIXFRAME do WorkBench para avaliar a presença de mutações nas regiões codificadoras que alterassem o *frame* e/ou introduzissem códons de parada nas sequências (Figura 4.3). A sequência codificadora do gene *eng1* da construção PGK-eng1-kanMX foi mais idêntica àquela da endoglucanase B de *A. niger* do que àquela do gene *eng1*, abrindo a possibilidade de que o gene que codifica a primeira tenha sido clonado em detrimento do gene *eng1*. Novo seqüenciamento deve ser realizado para confirmar esta hipótese.

(a)

```

L F V V W L L S F Y R N * H R R S S N I
1 ttattcgttgatggctgctcagtttctaccgaaactgacatcgacgatcttccaatc 60
G S R K K P * L D S L T * P G M K F T L
61 ggttccagaaagaagccttgattggattcattgacttaaccggggatgaagtttacctg 120
L P V N N G T H T G I L F L N T T I A E
121 ttgctggttaataacggaaccacactgggtattctattcttaaacaccaccatcgctgaa 180
A A F A D K D D L E K R E A E A R R A R
181 gctgctttcgctgacaaggatgatctcgagaaaagagaggctgaagctagaagagctaga 240
S P R G T V D M H Q R A L L F S A L L T
241 tctcctaggggtaccgctgacatgcatcaacgtgcccttctcttctcagccctgctgacg 300
S V R A G Q A G T L T E E V H P S L T W
301 tctgttcgcgcccagcaagcccgaaacgcttaccggaggaagtcctcctccttgacctgg 360
Q K C T S E G S C T E Q S G S V V I D S
361 cagaaatgcacttctgaaggcagctgcaactgaacagagtggtcagttgtcattgactcg 420
N W R W T H S V N D S T N C Y T G N T W
421 aactggcgctggaccattctgtcaatgacagcaccaattgctacactggcaacacctgg 480
D A T L C P D D E T C A T N C A L D G A
481 gatgcaactctcgcctgatgatgagacctgtgacccaactgcgcctggacggagcg 540
D Y E S T Y G V T T D G D S L T L K F V
541 gactacgagtcacactacgggtgtcaccactgacgggtgattcattgacactgaaattcgtc 600
T G S N V G S R L Y P P W T T S D E G Y
601 actggctccaatgttggtcgcggttgatcctccatggacaacgagtgacgagggatac 660
Q G P X Q L G L T P S S L S
661 caaggaccgttncaacttggttgacgccgagttcactttcga 703

```

(b)

```

C F I R A M A A P V S T E T D I D D L P
3 tgctttattcgtgcatggctgctccagtttctaccgaaactgacatcgacgatcttcca 62
I S V P E E A L I G F I D L T G D E V S
63 atatcggttccagaaagaagccttgattggattcattgacttaaccggggatgaagtttcc 122
L L P V N N G T H T G I L F L N T T I A
123 ttgttgctggttaataacggaaccacactgggtattctattcttaaacaccaccatcgct 182
E A A F A D K D D L E M K F Q S T L L L
183 gaagctgctttcgctgacaaggatgatctcgagatgaagtttcagagcactctgcttctt 242
A A A A G S A L A V P H G S G H K K R A
243 gccgccgctgggttccgcggttgctgtgccccatggctctggacataagaagagggcg 302
S V F E W F G S N E S G A E F G T N I P
303 tctgtgttgaatggttcggatcgacagagctggtgctgaatttgggaccaatatccca 362
G V W G T D Y I F P D P S T I S T L I G
363 ggctctggggaaccgactacatcttcccggaccctcgaccatctctacgttaattggc 422
K G M N F R V Q F M M E R L L P D S M
423 aagggaatgaacttcttccgcgctccagttcatgatggagaggttgcttctcactcgatg 482
T G S Y D E E Y L A N L T T V V K A V T
483 actggttcatacagcagaggatctggccaacttgacgaccgtggtgaaagcggtcacg 542
D G G A H A L I D P H N Y G R Y N G E I
543 gatggagggcgcgcatgctgcatcgaccctcataactatggcagatacaatggcgagatc 602
I S S T S D F Q T F W Q N L A G Q Y K D
603 atctccagtacatcggtattccagactttctggcagaatctggcgggcccagtacaaagat 662
N D L V M F D T T T N T T T W T X D L V
663 aacgacctggtcatgtttgatacaacaacgaatactacgacttgaccangacctcggt 722
A E L H K Q A L T G F G L R V H T P R T
723 gctgaacttcacaagcagggcattaacgggcttcgggctgcggggtgcacacgccacgtacn 782
L F P S E G Q F L D P D
783 ctttttcgctccgaagggcaattcctggaccggacc 819

```

Figura 4.3 – Sequências de DNA e aminoácidos resultantes do sequenciamento dos cassetes PGK-cbhA-kanMX (a) e PGK-eng1-kanMX (b) utilizando o primer α -mat F. As porções sublinhadas referem-se ao peptídeo sinal MF- α de *S. cerevisiae*, clonado *in frame* com as sequências codificadoras dos genes *cbhA* (a) e *eng1* (b). Metionina inicial do peptídeo sinal MF- α e do gene de interesse estão marcadas em negrito e azul.

A análise das sequências codificadoras dos genes *cbhA* e *eng1* fusionadas à sequência codificadora do peptídeo sinal MF- α dos cassetes construídos está mostrada na Figura 4.3. Observa-se a ausência de códons de parada na região sequenciada e a fusão *in frame* da sequência codificadora do peptídeo sinal MF- α com os genes *cbhA* e *eng1*. O peptídeo sinal MF- α possui tamanhos diferentes nas construções *cbhA* e *eng1*, sendo que na última o segundo sítio de clivagem para secreção da proteína está ausente, impossibilitando o uso desta sequência para direcionamento da secreção da endoglucanase recombinante. Esta diferença é advinda da etapa de clonagem no vetor pKLAC1, o qual foi molde para amplificação das sequências codificadoras utilizadas no trabalho. Neste caso, a presença do peptídeo sinal do gene *eng1* de *A. niger* na construção permite inferir sobre o reconhecimento deste peptídeo sinal em *K. marxianus* caso a proteína recombinante seja secretada. A sequência de proteína codificada para a construção *eng1* foi mais similar à sequência da endoglucanase B de *A. niger* que àquela da endoglucanase 1 (ENG1) de *A. niger*, reafirmando a possibilidade de que a primeira tenha sido clonada em detrimento da segunda.

4.1.2 – Transformação de *K. marxianus* UFV-3 e seleção de clones recombinantes para os cassetes de expressão PGK-*eng1*-kanMX e PGK-*cbhA*-kanMX

K. marxianus UFV-3 foram transformadas com os cassetes lineares de expressão PGK-*eng1*-kanMX e PGK-*cbhA*-kanMX em separado, por fenômeno integrativo, utilizando o protocolo de transformação por tratamento com acetato de lítio padronizado por Abdel-Banat et al. (2010). A partir da transformação duas estratégias para seleção de transformantes foram testadas: (1) as células foram plaqueadas em YPD contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de G418 e as colônias resistentes foram sequencialmente transferidas para meio YPD sólido contendo 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de G418; (2) as células foram plaqueadas em YPD contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de G418 e as colônias resistentes foram transferidas, ao mesmo tempo, para meio YPD sólido contendo 100, 200 ou 300 $\mu\text{g/mL}$ de G418. As figuras 4.4 e 4.5 mostram o resultado da estratégia (1) de seleção de transformantes (primeira tentativa de transformação) e as figuras 4.6 e 4.7 mostram o resultado da estratégia (2) de seleção (segunda tentativa) para transformação com os genes *cbhA* e *eng1*, respectivamente.

A estratégia (1) mostrou baixa eficiência de seleção, sendo observado o crescimento de muitas colônias em meio contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de G418 para as duas

construções. Transferiu-se 48 colônias de cada construção para meio contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (Figuras 4.4a e 4.5a) e duas colônias de cada construção foram capazes de crescer em 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (Figuras 4.4e e 4.5e), totalizando um percentual de seleção de 4,16% para as duas construções. Estes números mostram que o uso de meio contendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 não é recomendado para a seleção de transformantes de *K. marxianus* UFV-3, uma vez que pode levar a seleção de grande número de clones falso positivos. Desta etapa de seleção foram escolhidos os clones C1 e C2, transformados com *cbhA*, e os clones E1 e E2, transformados com *eng1* para as demais etapas de caracterização, sendo utilizado como critério de escolha o crescimento em meio contendo 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418.

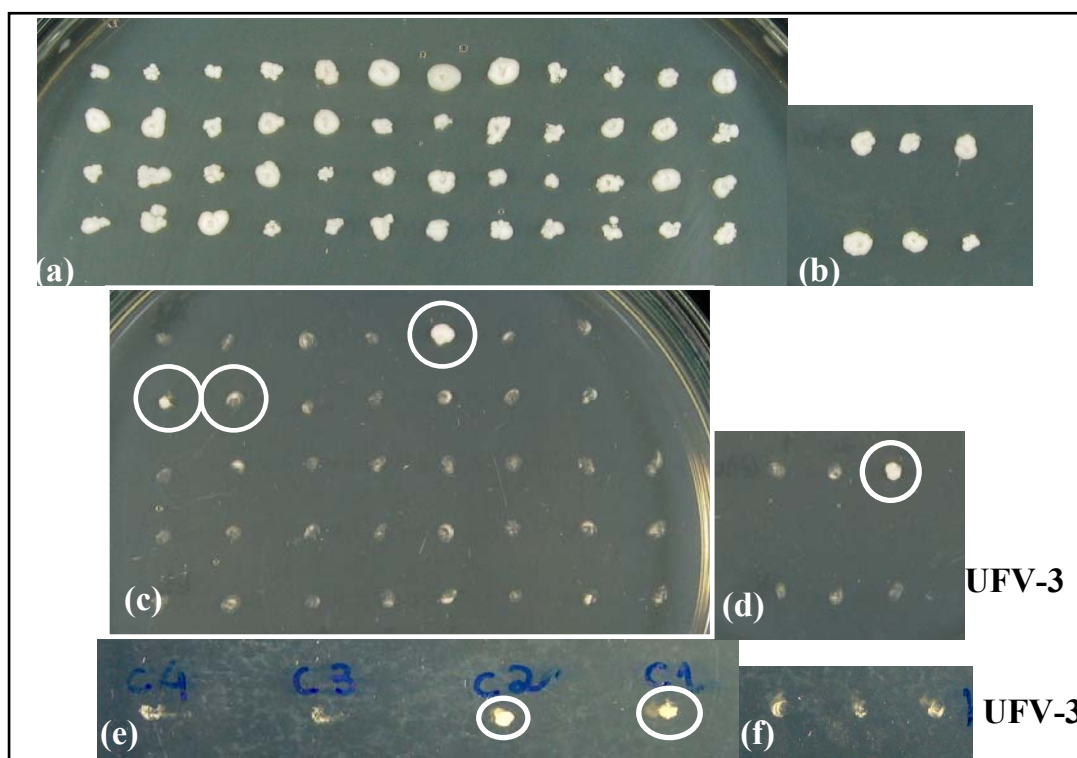


Figura 4.4 – Seleção de clones *cbhA* oriundos da primeira tentativa de transformação com cassete PGK-*cbhA*-KanMX. Colônias crescidas 117h em YPD com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 transferidas a partir de placas YPD com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) da seleção de transformantes; colônias crescidas 72h em YPD com 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 oriundas da seleção inicial em 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (c) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d) de G418 e cepa controle UFV-3; colônias crescidas 72h em YPD com 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 transferidas a partir de YPD com 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (e) e cepa controle UFV-3 (f). As duas colônias crescidas em 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 foram denominadas C1 e C2 para posterior caracterização. Os círculos indicam colônias consideradas resistentes que foram escolhidas para a etapa seguinte de seleção.

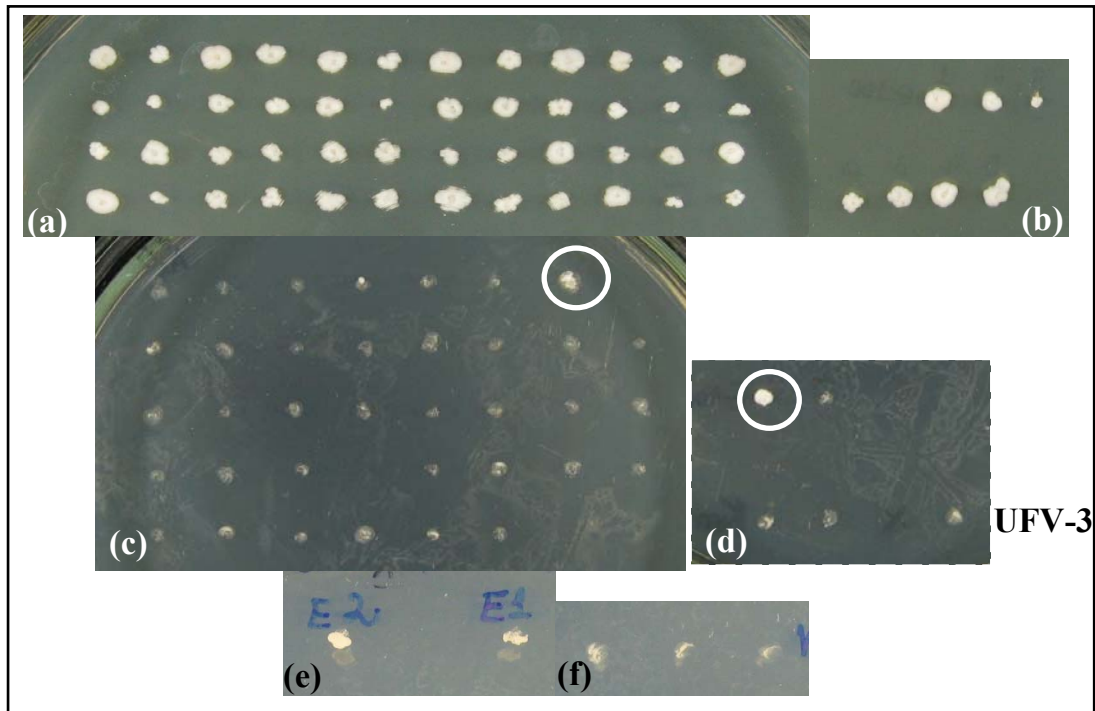


Figura 4.5 – Seleção de clones *eng1* oriundos da primeira tentativa transformação com cassete PGK-*eng1*-KanMX. Colônias crescidas 117h em YPD com 100 µg/mL de G418 transferidas a partir de placas YPD com 50 µg/mL (a) e 100 µg/mL (b) da seleção de transformantes; colônias crescidas 72h em YPD com 200 µg/mL de G418 oriundas da seleção inicial em 50 µg/mL (c) e 100 µg/mL (d) de G418 e cepa controle UFV-3; colônias crescidas 72h em YPD com 300 µg/mL de G418 transferidas a partir de YPD com 200 µg/mL de G418 (e) e cepa controle UFV-3 (f). As duas colônias crescidas em 300 µg/mL de G418 foram denominadas E1 e E2 para posterior caracterização, sendo E1 originário de 50 µg/mL de G418 e E2 de 100 µg/mL. Os círculos indicam colônias consideradas resistentes que foram escolhidas para a etapa seguinte de seleção.

A segunda estratégia de seleção testada teve eficiência superior à primeira, observando-se o crescimento de um número muito inferior de colônias no primeiro meio de seleção (contendo 100 µg/mL de G418). Todas as colônias crescidas em 100 µg/mL de G418 (15 colônias *cbhA* e 10 colônias *eng1*) cresceram em novo meio com 100 µg/mL de G418 (Figuras 4.6a e 4.7a) e, destas, 53,3 e 30%, para os cassetes PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX respectivamente, foram capazes de crescer em meio contendo 200 e 300 µg/mL de G418 (Figuras 4.6 a e b e 4.7 a e b). De acordo com a estratégia (2) de seleção, as transformações com cassete *cbhA* e *eng1* tiveram eficiência de aproximadamente 60 transformantes/µg de DNA e 33 transformantes/µg de DNA, respectivamente. Estes valores de eficiência são baixos quando comparados àqueles obtidos por Nonkland et al. (2008), $4,2 \times 10^2$ transformantes/µg de DNA, e Abdel-Banat et al. (2010), $2,5 \times 10^6$ transformantes/µg de DNA, para transformação de *K. marxianus* com cassetes lineares e seleção por auxotrofia. No entanto, Rocha et al. (2010) não

puderam obter transformantes com vetor integrativo utilizando transformação mediada por acetato de lítio. Abdel-Banat et al. (2010) relataram que a integração de alta eficiência de DNA linear no genoma de *K. marxianus* deve ser mediada pelo sistema de recombinação não homóloga NHEJ, preferencial nesta levedura; e que a inserção de sequências homólogas entre 50 e 1000 pb nas extremidades dos cassetes pode diminuir muito a eficiência de transformação (de 2600 para 350 transformantes/ μ g) pela competição do sistema de reparo por recombinação homóloga (HR) com NHEJ pelas moléculas de DNA. O mesmo trabalho mostra que ainda utilizando 1000 pb com homologia flanqueando as sequências de transformação, somente 11% dos transformantes sofreram recombinação no *locus* de homologia. O fenômeno de competição entre os sistemas HR e NHEJ pelo cassete de expressão pode explicar a baixa eficiência de transformação observada no presente trabalho. *K. marxianus* UFV-3 ainda não possui genoma seqüenciado, no entanto o promotor PGK de *S. cerevisiae* apresenta alta identidade (87%) com aquele de *K. marxianus* CBS 712, o que sugere que poderia servir de sequência de homologia durante a integração. Entretanto, ainda acreditamos que as integrações efetivas ocorridas nos clones selecionados por resistência à G418 ocorreram de modo aleatório no genoma de *K. marxianus* UFV-3, dada a diversidade fisiológica observada nos clones em experimentos apresentados nas secções seguintes.

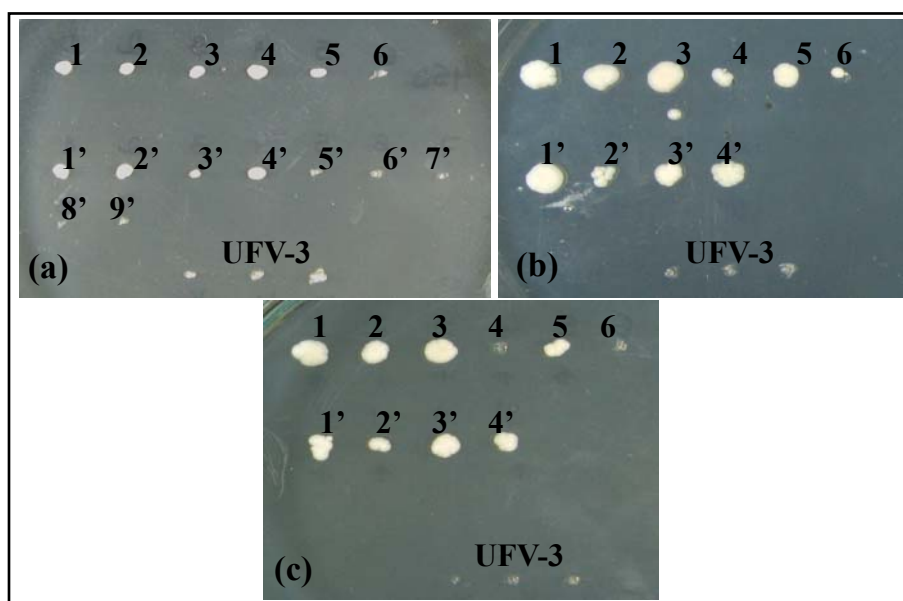


Figura 4.6 – Seleção de clones *cbhA* oriundos da segunda tentativa de transformação com cassete PGK-*cbhA*-KanMX. Colônias crescidas em YPD com 100 µg/mL de G418 (a) transferidas a partir de placas YPD com 100 µg/mL da seleção de transformantes e cepa controle UFV-3; colônias crescidas em YPD com 200 µg/mL (b) e 300 µg/mL (c) de G418 oriundas da placa com 100 µg/mL de G418 (a) e cepa controle UFV-3. As colônias 1, 2, 3, 4, 5, 1', 2', 3' e 4' crescidas em 300 µg/mL de G418 foram selecionadas para caracterização.

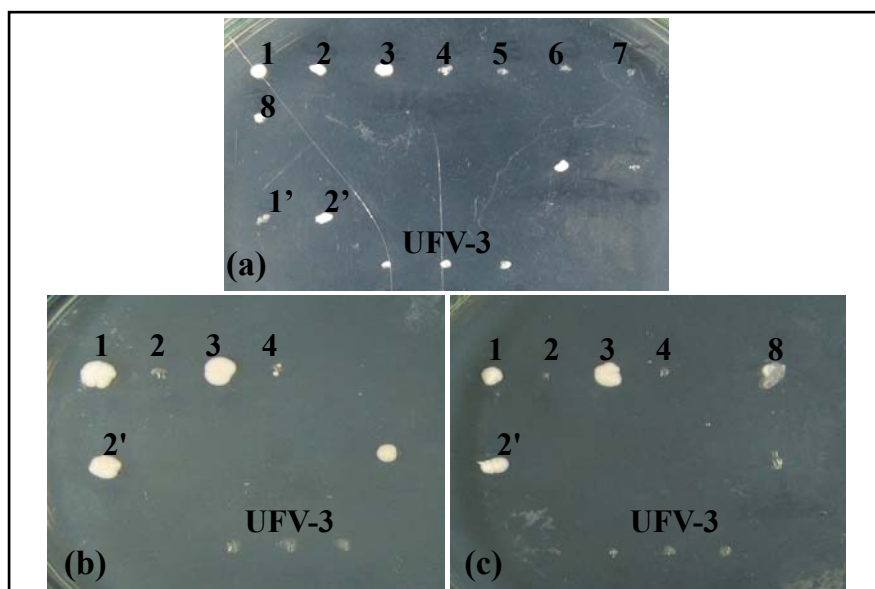


Figura 4.7 – Seleção de clones *eng1* oriundos da segunda tentativa transformação com cassete PGK-*eng1*-KanMX. Colônias crescidas em YPD com 100 µg/mL de G418 (a) transferidas a partir de placas YPD com 100 µg/mL da seleção de transformantes e cepa controle UFV-3; colônias crescidas em YPD com 200 µg/mL (b) e 300 µg/mL (c) de G418 oriundas da placa com 100 µg/mL de G418 (a) e cepa controle UFV-3. As colônias 1, 3 e 2' crescidas em 300 µg/mL de G418 foram selecionadas para caracterização.

Apesar do pequeno número de transformantes obtidos, a estratégia (2) utilizada neste trabalho mostrou-se robusta na seleção de transformantes com maior potencial de expressão do gene de interesse, apresentando um pequeno número de falsos positivos. Sugere-se que em trabalhos futuros a seleção de transformantes seja realizada inicialmente em 200 µg/mL de G418 com transferência de colônias resistentes para meios contendo concentrações crescentes do mesmo antibiótico.

Observa-se nas Figuras 4.6 e 4.7 a existência de colônias de diferentes tamanhos, revelando que os clones selecionados possuem velocidade de crescimento diferente no meio seletivo. Este resultado sugere que a integração dos cassetes de expressão no genoma de *K. marxianus* UFV-3 deve ter ocorrido preferencialmente de modo ectópico, o que reforça a importância do uso de uma marca de seleção dominante que permita a seleção de clones cujo local de integração favoreça a expressão do gene de resistência e, por conseguinte, do gene de interesse, e onde possa ter ocorrido múltiplas integrações.

A integração de um cassete no genoma pode ainda ocasionar perda ou ganho de características fisiológicas importantes para a aplicação biotecnológica da cepa transformada. Dentre *K. marxianus* recombinantes selecionadas neste trabalho foram observados dois clones, *cbhA* 3' e *eng1* E1, incapazes de crescer a 37°C. A Figura 4.8 ilustra a sensibilidade do clone E1 quando comparado à cepa controle UFV-3. A termotolerância, compartilhada por várias cepas de *K. marxianus*, constitui uma das características mais importantes para aplicação industrial desta levedura na produção de etanol celulósico. Ainda não existem dados que expliquem a maior termotolerância de *K. marxianus* em relação à *K. lactis* e as bases fisiológicas do crescimento em altas temperaturas ainda não são conhecidas (Lane et al., 2011). No entanto, baseando-se em trabalhos com *S. cerevisiae*, acredita-se que a termotolerância seja uma característica poligênica (Cubillos et al., 2011). Neste contexto, torna-se interessante, e constitui sugestão do presente trabalho, que os clones *cbhA* 3' e *eng1* E1, sensíveis à temperatura, sejam melhor caracterizados buscando aumentar o conhecimento sobre as bases genéticas da termotolerância em *K. marxianus*. Os dois clones foram estocados e não foram utilizados nas etapas seguintes deste trabalho.



Figura 4.8 – Crescimento do clone sensível à temperatura. Cepa controle UFV-3 (esquerda) e clone E1 sensível à temperatura (direita) cultivados em meio YPD à 37°C.

4.1.3 – Análise da integração dos cassetes de expressão PGK-eng1-kanMX e PGK-cbhA-kanMX em *K. marxianus* recombinantes

A resistência à G418 indica possíveis clones que tiveram o cassete de expressão integrado ao genoma, porém, esta integração pode ter ocorrido de modo incompleto, uma vez que os mecanismos de integração em *K. marxianus* ainda não são bem conhecidos. Para confirmar a integração da porção promotor-gene, ou seja, PGK-cbhA e PGK-eng1, ao genoma dos clones selecionados como resistentes à G418, foram construídos cinco pares de *primers* para amplificação de fragmentos, variando entre 700 e 1000 pb, das sequências PGK, *cbhA*, PGK-cbhA, *eng1* e PGK-eng1. A Figura 4.9 mostra a padronização das *PCRs* de identificação utilizando estes *primers* e o DNA genômico de *K. marxianus* UFV-3 não transformada como controle. A reação 1, de amplificação do promotor PGK, mostrou amplificação específica para a cepa controle, revelando que o promotor PGK de *K. marxianus* UFV-3 deve possuir alto valor de identidade com o PGK de *S. cerevisiae*, como aquele observado (87%) para *K. marxianus* CBS 712. Em caso afirmativo, isto aumenta a probabilidade deste promotor ser reconhecido para expressão. Esta reação foi descartada como método de identificação. As demais reações apresentaram amplificações inespecíficas a partir do DNA de *K. marxianus*, porém, não foram observadas bandas de mesmo tamanho dos amplificadores esperados. Neste contexto, as reações de amplificação dos fragmentos *cbhA*, PGK-cbhA e *eng1* foram utilizadas para investigação da integração via *PCR* de colônia.

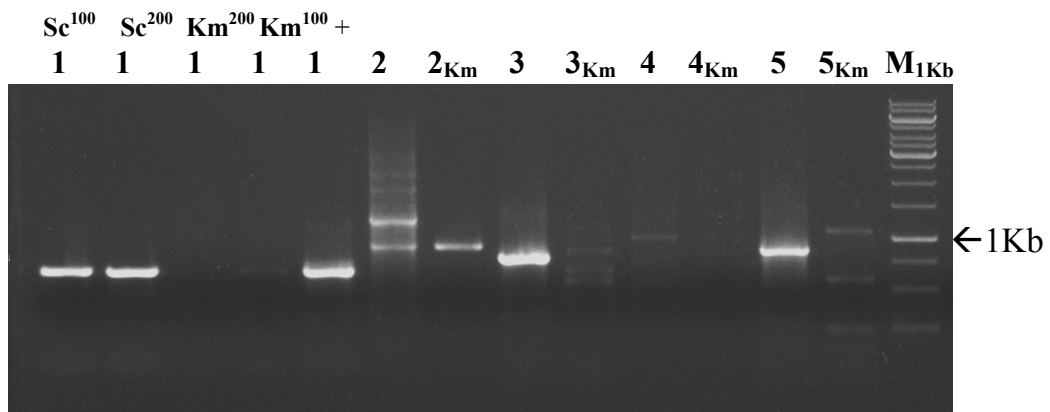


Figura 4.9 – Padronização de PCRs para confirmação da integração dos cassetes de expressão em *K. marxianus* recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 0,9% mostrando o resultado das PCRs para amplificação a partir do DNA genômico (100 ou 200 ng) de *S. cerevisiae* (Sc) e de *K. marxianus* (Km) e dos cassetes PGK-eng1-KanMX e PGK-cbhA-KanMX: do promotor PGK (reação 1), amplificado de 661 pb; gene *eng1* (reação 2), amplificado de 900 pb; gene *cbhA* (reação 3), amplificado de 790 pb; fragmento PGK-eng1 (reação 4), amplificado de 988 pb; fragmento PGK-cbhA (reação 5), amplificado de 900 pb. As reações utilizando o cassete como molde são mostradas com o respectivo número e as reações utilizando o DNA genômico de *K. marxianus* como controle são indicadas com Km em subscrito. M: marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder Fermentas.

A Figura 4.10 mostra o resultado da *PCR* utilizando as colônias recombinantes putativas para o gene *cbhA* como molde e os *primers* de amplificação dos fragmentos PGK-cbhA e *cbhA*. A comparação destes resultados revela o caráter inconclusivo da *PCR* de colônia, uma vez que colônias de amplificação positiva para PGK-cbhA não apresentaram amplificação para *cbhA*. Porém, a análise de atividade enzimática no sobrenadante dos clones (item 4.4) mostra que, à exceção do clone 2, todos os clones com atividade específica para os substratos pNPC e pNPLac foram positivos para amplificação do fragmento PGK-cbhA.

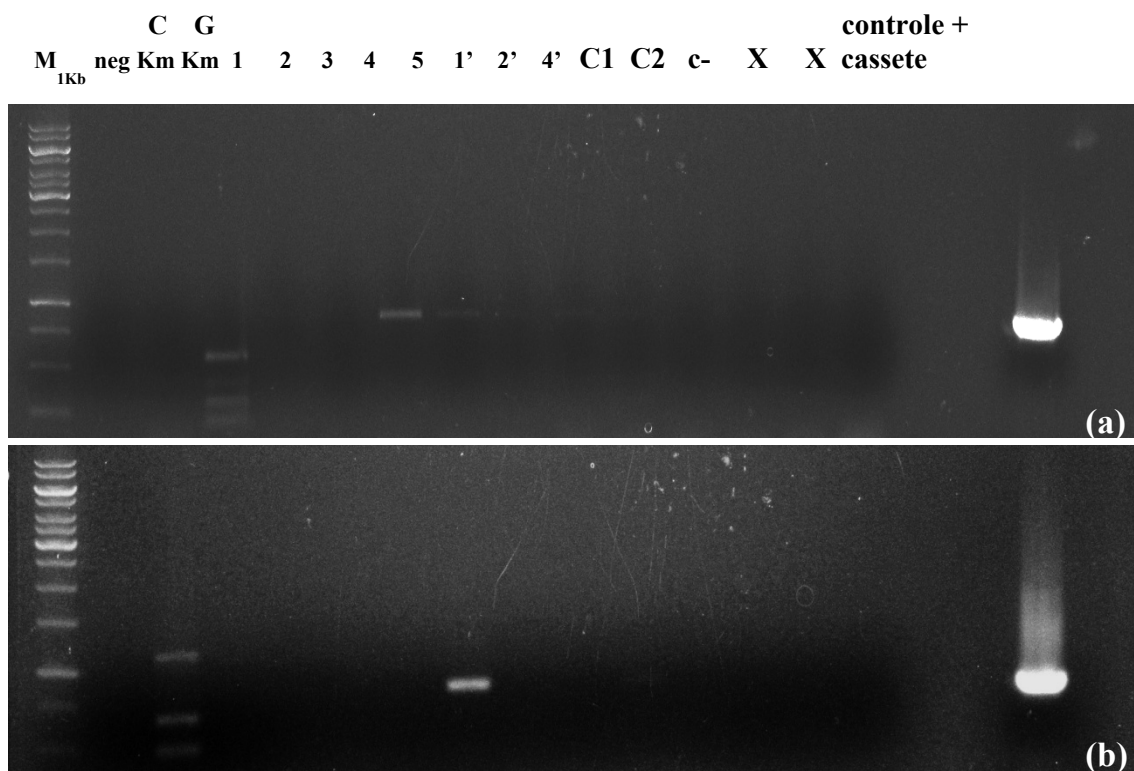


Figura 4.10 – Investigação da integração do cassete PGK-cbhA-kanMX por PCR de colônia amplificando os fragmentos PGK-cbhA e cbhA. Eletroforese em gel de agarose 0,9% mostrando a amplificação do fragmento PGK-cbhA de 900 pb (a) e cbhA de 790 pb (b) a partir de clones putativos para o gene cbhA. Neg: controle negativo da reação. C Km: colônia da cepa controle UFV-3. G Km: DNA genômico da cepa controle UFV-3. No gel (b) a ordem de C Km e G Km está invertida em relação ao mapa. 1 a C2: colônias investigadas. Controle positivo: cassete PGK-cbhA-KanMX. M: marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder* Fermentas. Os clones 3, 4, 5, 1', 2' e 4' apresentam fraca amplificação para PGK-cbhA, e somente o clone 4 apresenta amplificação para cbhA.

A Figura 4.11 mostra o resultado da *PCR* utilizando as colônias recombinantes putativas para o gene *eng1* como molde e os *primers* de amplificação do fragmento *eng1*, sendo os clones 1 e 3 positivos para a amplificação. Na *PCR* de colônia para amplificação do fragmento PGK-*eng1* não observou-se amplificação para os clones ou cepa controle.

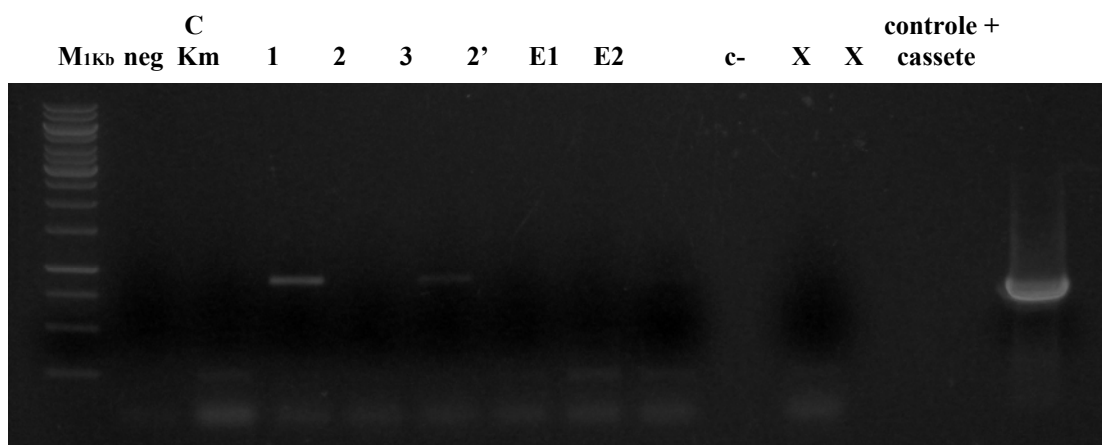


Figura 4.11 – Investigação da integração do cassete PGK-eng1-kanMX por PCR de colônia amplificando o gene eng1. Eletroforese em gel de agarose 0,9% mostrando a amplificação do fragmento eng1 de 900 pb a partir de clones putativos. Neg: controle negativo da reação. C Km: colônia da cepa controle UFV-3. G Km: DNA genômico da cepa controle UFV-3. 1 a E2: colônias investigadas. Controle positivo: cassete PGK-eng1-KanMX. M: marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder* Fermentas. Os clones 1 e 3 apresentaram amplificação.

Várias tentativas de padronização da PCR de identificação dos cassetes PGK-cbhA-kanMX e PGK-eng1-kanMX utilizando colônias e DNA genômico como molde foram realizadas sem sucesso. Os principais problemas encontrados foram a dificuldade de amplificação específica e a propensão das reações à contaminação. Esta dificuldade de uso da *PCR* como método de detecção de transformantes, comumente observada em fungos filamentosos, pode ser uma característica ainda não documentada para *K. marxianus*. Trabalhos recentes de transformação desta levedura (Nokland et al., 2008; Abdel-Banat et al., 2010) apresentam *shouthern blot* como metodologia de identificação de transformantes, a qual permite ainda analisar se houve direcionamento para determinado *locus* de integração, e não fazem menção ao uso de *PCR*. Sugere-se que, em futuros trabalhos de transformação de *K. marxianus* UFV-3, o *shouthern blot* seja padronizado para uso como metodologia de identificação em detrimento da *PCR*. Rocha et al. (2010) e Rocha et al. (2011) realizaram a seleção de transformantes de *K. marxianus* SLC33 para expressão de glicose oxidase e esterase, respectivamente, por análise qualitativa da atividade enzimática de colônias, sem passagem em meio seletivo ou análise da integração das construções no genoma.

4.1.4 – Seleção de *K. marxianus* recombinantes expressando os genes *cbhA* e *eng1*

Dada a dificuldade de confirmar a transformação de *K. marxianus* UFV-3 com os cassetes PGK-*cbhA*-kanMX e PGK-*eng1*-kanMX via *PCR*, todos os clones *cbhA* e *eng1* selecionados como resistentes à G418, à exceção dos clones *cbhA* 3' e *eng1* E1 sensíveis à temperatura, foram investigados quanto à capacidade de expressar e secretar enzimas com atividade de celobiohidrolase ou endoglucanase.

A Figura 4.12 mostra os valores médios, provenientes de três repetições, de atividade do sobrenadante de cultura, de 24 e 48 horas, de clones *cbhA* e cepa controle UFV-3 sobre o substrato sintético pNPG. Este substrato mimetiza as ligações β -1,4-glicosídicas, presentes na molécula de celulose, sendo usado para quantificar atividade celulásica de modo geral (endo, exo e β -glicosidases) (Zhang et al., 2006). De acordo com estes resultados, o sobrenadante da cepa controle UFV-3 apresenta capacidade de hidrólise do substrato pNPG, decorrente da secreção de uma β -glicosidase endógena que está sendo caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa (Rocha 2011; Rodrigues, 2009). Espera-se que esta enzima tenha pequena capacidade de hidrólise sobre o substrato pNPC e, ainda menor, sobre o substrato pNPLac, o qual tem sido utilizado como substrato específico para quantificação da atividade de celobiohidrolases (Zhang et al., 2006), de modo que a interferência da enzima endógena nos ensaios com estes substratos seja mais baixa. Nestes ensaios utilizou-se um meio de fermentação (contendo 1% de extrato de levedura e 2% de peptona) que desfavorece a secreção da β -glicosidase endógena (segundo dados obtidos por nosso grupo de pesquisa e ainda não publicados), buscando diminuir a interferência da mesma enzima.

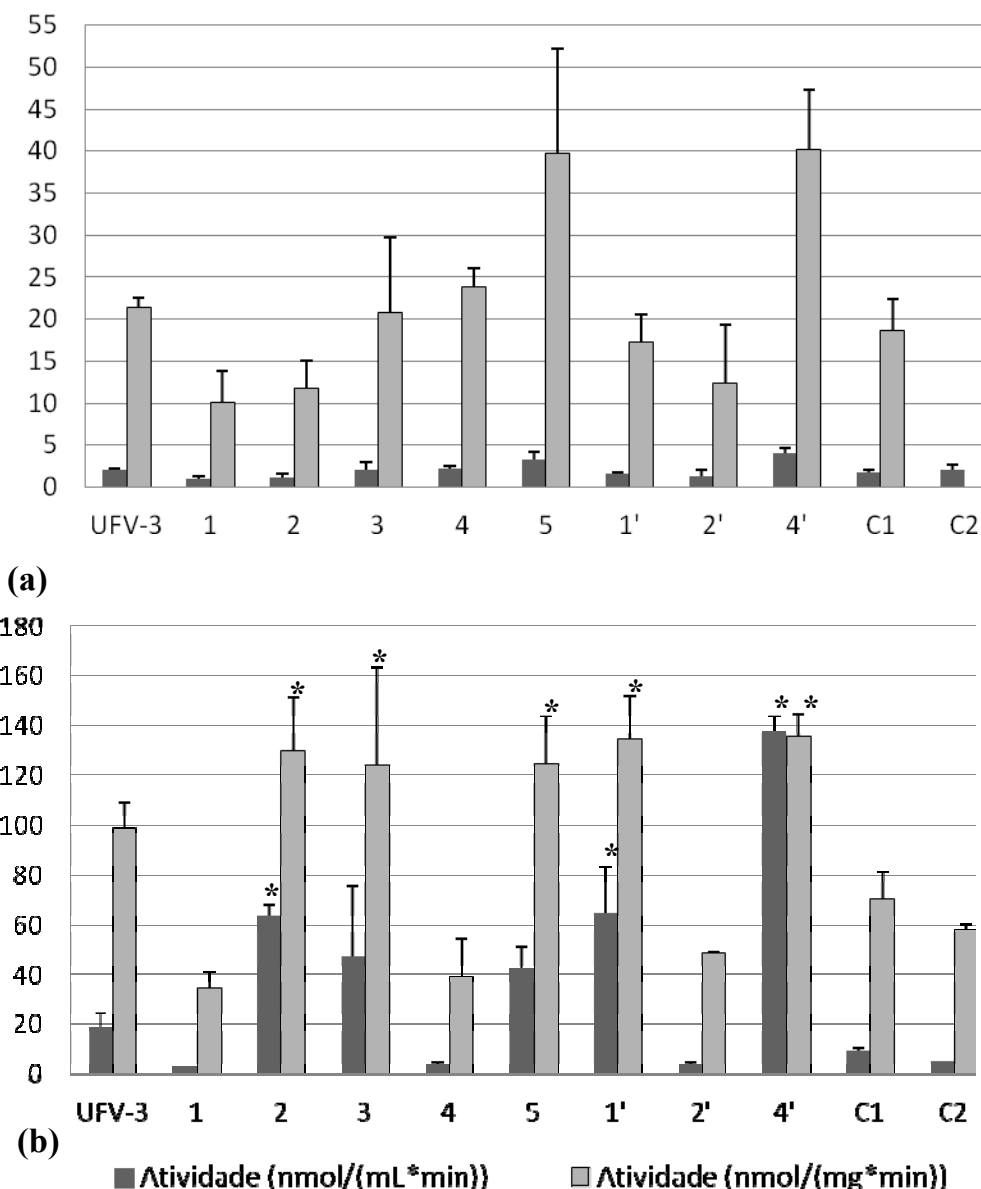


Figura 4.12 – Atividade enzimática extracelular de clones putativos para o gene *cbhA*. Atividade enzimática sobre o substrato pNPG do sobrenadante de 24 h (a) e 48 h (b) de cultura de clones *cbhA* putativos e cepa controle UFV-3. Barras cinza claro representam os valores de atividade em nmol de pNP/(mL*min) e barras cinza escuro representam os valores de atividade específica em nmol de pNP/(mg*min). (*) indica médias de atividade significativamente maiores (p-valor < 0,05) que aquelas do controle UFV-3.

Os clones 2, 1' e 4' se destacam quanto aos valores de atividade em (nmol/(mL*min)), ao passo que os clones 2, 3, 5, 1' e 4' se destacam quanto aos valores de atividade específica, sendo estas médias significativamente (p-valor < 0,05) maiores que àquelas da cepa não transformada UFV-3 (Figura 4.12 b). Dentre estes, o clone 4' é aquele que apresenta valores mais altos de atividade específica e atividade por mL de cultura, sendo a média desta última significativamente (p-valor < 0,05) cinco vezes

maior que aquela observada para a cepa controle. O clone 4' apresentou ainda elevada concentração de proteínas no sobrenadante (1 mg/mL) em relação aos demais clones e à cepa controle, e o perfil diferencial de secreção de proteínas deste clone será analisado posteriormente (item 4.2.3). Comparando-se os valores de atividade obtidos em 24 e 48 horas de cultivo (Figura 4.12 a e b), nota-se que alguns clones que em 24 horas possuíam atividade igual ou superior à UFV-3 tiveram uma manutenção ou queda na atividade em 48 horas. Este resultado sugere haver diferenças na estabilidade das proteínas secretadas, com atividade hidrolítica, pelos diferentes clones, o que pode ser decorrente da secreção diferencial de proteases pelos mesmos. A observação de que os clones apresentaram diferenças significativas na secreção de proteínas reforça esta idéia.

Observa-se na Figura 4.12 que alguns clones (1, 4, 2', C1 e C2) apresentaram médias de atividade extracelular significativamente (p -valor $< 0,05$) menor que a cepa UFV-3, sugerindo que a transformação destas cepas pode ter resultado na diminuição da secreção da β -glicosidase endógena. A expressão de uma proteína heteróloga em altos níveis pode diretamente limitar outros processos celulares pela competição por substratos ou interferência direta no metabolismo, induzindo situações de estresse ou interferindo na produção de proteínas endógenas (Mattanovich et al., 2004). Proteínas heterólogas sendo secretadas competem com proteínas endógenas pela entrada na via de secreção, podendo ainda comprometer a secreção destas proteínas (Mattanovich et al., 2004). Nos clones com baixa atividade sobre pNPG, a expressão do gene heterólogo pode ter interferido na secreção da β -glicosidase endógena, e a atividade da proteína recombinante não foi suficiente para superar a perda da contribuição da β -glicosidase. Outra hipótese é que a integração do cassete pode ter interrompido genes importantes para a secreção de proteínas nestes clones.

A Figura 4.13 mostra os valores médios, provenientes de três repetições, de atividade do sobrenadante de 48 horas de cultura de clones *cbhA* e cepa controle UFV-3 sobre os substratos sintéticos pNPC e pNPLac. O perfil de atividade dos clones e UFV-3 sobre o substrato pNPC (Figura 4.13 a) é muito similar àquele observado para a atividade sobre pNPG do sobrenadante de 48 horas de cultura (Figura 4.12), ao passo que apenas os clones (2, 3, 5, 1' e 4') com atividade sobre pNPG significativamente maior que o controle apresentaram atividade para o substrato pNPLac. Este resultado sugere a existência no sobrenadante destes clones de uma proteína diferente, em relação ao sobrenadante da cepa UFV-3, com atividade sobre pNPLac, sendo provavelmente a CBHa recombinante. O clone 4' apresentou atividade média (nmol/(mL*min)) do

sobrenadante de cultura sobre o substrato pNPC significativamente (p -valor $< 0,05$) sete vezes maior que o controle UFV-3. Esta maior diferença na atividade do clone 4' e UFV-3 em relação à diferença observada para atividade sobre pNPG sugere que proteínas do sobrenadante do clone possuem maior tendência de hidrólise do pNPC que aquelas do sobrenadante da cepa controle, o que constitui mais um indício de que a CBHa recombinante está sendo secretada.

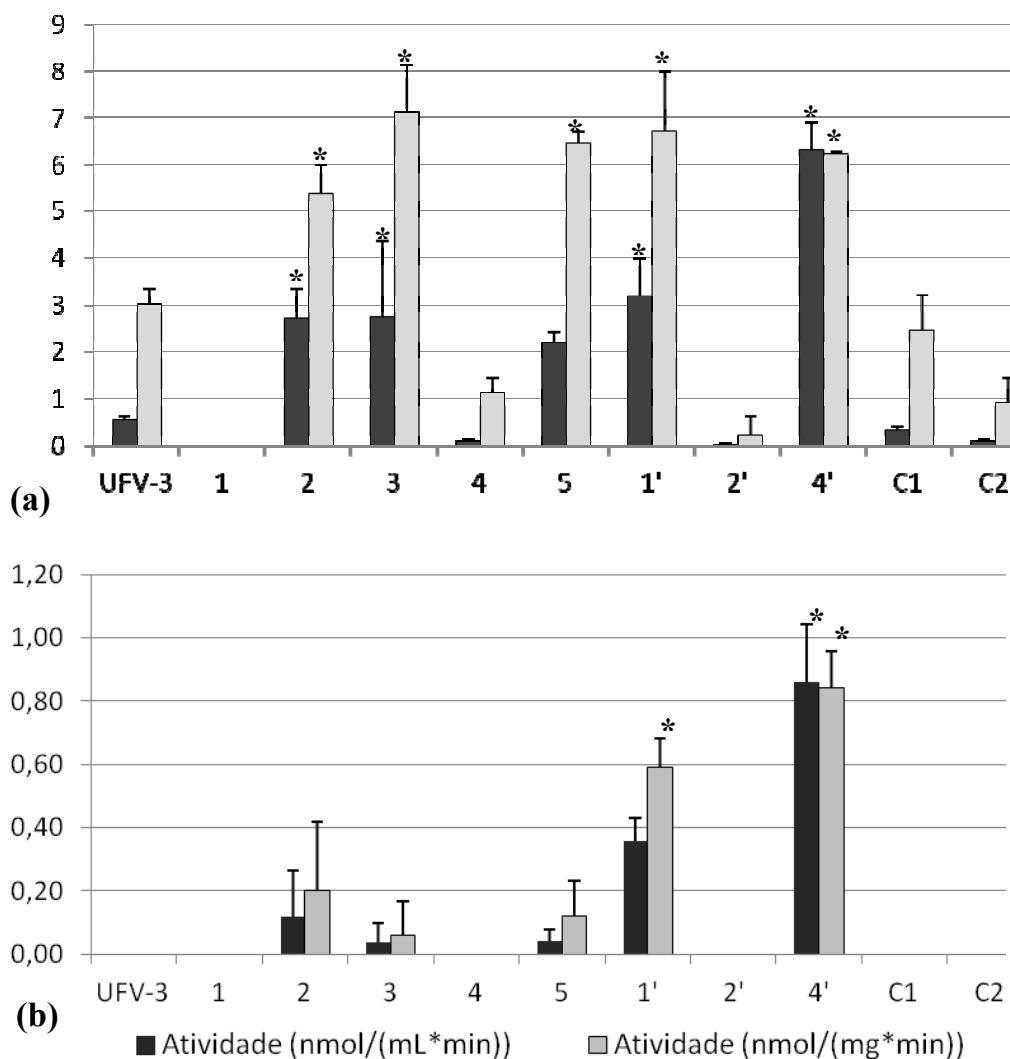


Figura 4.13 – Atividade enzimática extracelular de clones putativos para o gene *cbhA*. Atividade enzimática sobre o substrato pNPC (a) e pNPLac (b) do sobrenadante de 48 h de cultura de clones *cbhA* putativos e cepa controle UFV-3. Barras cinza escuro representam os valores de atividade em nmol de pNP/(mL*min) e barras cinza claro representam os valores de atividade específica em nmol de pNP/(mg*min). (*) indica médias de atividade significativamente maiores (p -valor $< 0,05$) que aquelas do controle UFV-3.

O correto dobramento e formação de pontes dissulfeto têm sido identificados como as etapas limitantes na produção de proteínas heterólogas, sendo que a habilidade do hospedeiro de processar, dobrar e secretar os produtos recombinantes determina a produtividade do sistema de expressão (Çelik & Çalik, 2011). Neste contexto, a análise funcional do produto formado, ou seja, no caso de enzimas secretadas a análise de sua atividade, é de suma importância na seleção de clones com potencial para produção da proteína recombinante. De acordo com os resultados aqui apresentados, caso a capacidade de hidrólise de ligações beta-glicosídicas detectada no sobrenadante de cultura de *K. marxianus* recombinantes para o gene *cbhA* advenha, em parte ou completamente, da secreção da CBHa heteróloga, pode-se inferir que *K. marxianus* UFV-3 foram capazes de realizar o correto dobramento, e modificações pós-traducionais, como processamento do peptídeo sinal, para secreção da enzima recombinante funcional. Estes resultados abrem perspectivas para uso de *K. marxianus* UFV-3 como hospedeira para produção heteróloga de outras proteínas de interesse biotecnológico.

A Figura 4.14 apresenta os valores de atividade sobre os substratos pNPG, pNPC e pNPLac dos extratos protéicos obtidos da lise celular de clones recombinantes para o gene *cbhA* e cepa UFV-3. A título de comparação de cepas, os valores foram corrigidos pela massa de células (mg) e não podem ser diretamente relacionados aos valores de atividade obtidos para o sobrenadante de cultura. A Figura 4.15 permite a comparação percentual da atividade extra e intracelular e será discutida posteriormente.

As médias de atividade, sobre os substratos pNPG, pNPC e pNPLac, obtidas do extrato celular dos clones *cbhA* são estatisticamente menores ou iguais àquelas obtidas para a cepa UFV-3, sugerindo que a β -glicosidase endógena seja a principal proteína intracelular responsável pela hidrólise. Os clones 2, 3, 1' e 5, positivos para atividade extracelular sobre pNPLac, possuem atividade intracelular sobre pNPG significativamente (p -valor $< 0,05$) menor que àquela observada para a cepa UFV-3. Estes resultados reforçam a hipótese de que a expressão e secreção de uma proteína recombinante podem interferir na expressão de proteínas endógenas. O clone 4' mostrou-se exceção a este comportamento, apresentando atividade intracelular sobre pNPG significativamente (p -valor $< 0,05$) maior que os demais clones, mas estatisticamente (p -valor $> 0,05$) igual à UFV-3. Provavelmente este clone possui não só maior secreção, mas também maior expressão da proteína recombinante, sendo que experimentos de quantificação de RNA_m são necessários para confirmar esta hipótese.

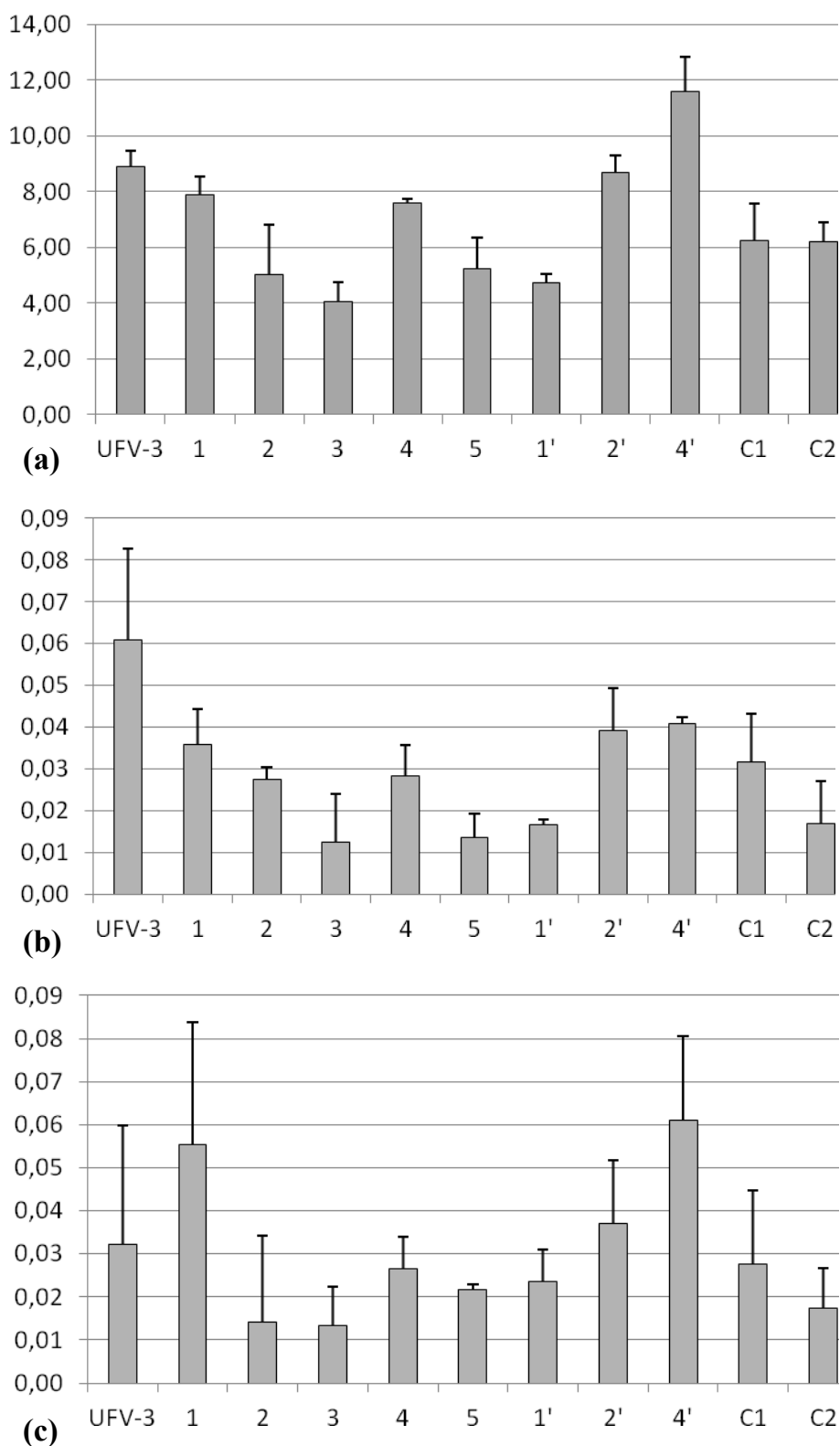


Figura 4.14 – Atividade enzimática do extrato celular de clones putativos para o gene *cbhA*. Atividade enzimática (nmol de pNP/(mg*min)) corrigida pela massa de células sobre o substrato pNPG (a), pNPC (b) e pNPLac (c) do extrato celular de 48 h de cultura de clones *cbhA* putativos e cepa controle UFV-3.

A Figura 4.15 mostra a comparação percentual dos valores de atividade intra e extracelular sobre os substratos pNPG, pNPC e pNPLac obtidos para os clones *cbhA* e cepa controle UFV-3. Nota-se que a cepa UFV-3 possui maior atividade percentual intracelular do que extracelular, para todos os substratos, confirmando a expectativa de que no meio de cultivo utilizado a secreção de β -glicosidase não é favorecida. O percentual de secreção observado para o clone 4' foi maior que aquele de outros clones e da cepa UFV-3, revelando que o diferencial deste clone deve estar, principalmente, na secreção da proteína recombinante e/ou na secreção de proteínas em geral. A comparação dos percentuais de atividade intra e extracelular em pNPG, pNPC e pNPLac para o clone 4' permitem sugerir que a atividade sobre o substrato pNPG pode ser resultado da ação conjunta da CBHa recombinante e da β -glicosidase endógena, ao passo que as atividades sobre pNPC e pNPLac devem ser resultado da ação prioritária, ou exclusiva, da CBHa.

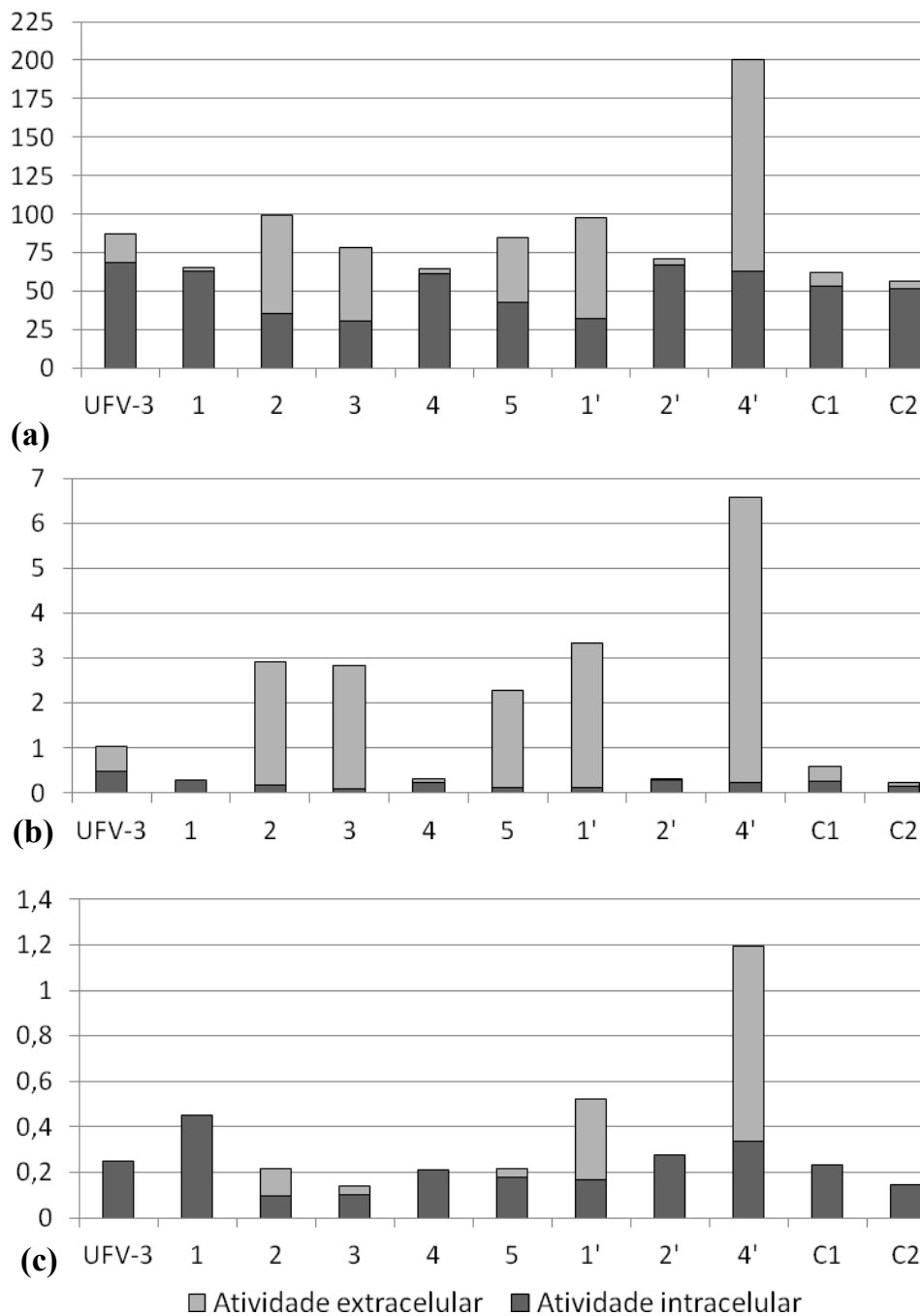


Figura 4.15 – Comparação percentual dos valores de atividade enzimática intra e extracelular de clones putativos para o gene *cbhA*. Atividade enzimática (nmol de pNP/(mL de cultura*min)) sobre o substrato pNPG (a), pNPC (b) e pNPLac (c) do extrato celular de 48 h de cultura de clones *cbhA* putativos e cepa controle UFV-3. Barras cinza claro representam os valores de atividade extracelular e barras cinza escuro representam os valores de atividade intracelular para 1 mL de cultura.

Diante destes resultados, o clone *cbhA* 4' foi escolhido para caracterização quanto à estabilidade genética, perfil de secreção de proteínas e potencial fermentativo.

Os clones putativos para o gene *engB* foram investigados quanto à atividade extracelular e intracelular sobre os substratos pNPG e carboximetilcelulose (CMC), sendo este último específico para atividade endoglucanase. A Figura 4.16 mostra os valores médios de atividade, obtidos de três repetições, do sobrenadante de 48 horas de cultura de clones *engB* putativos e controle UFV-3 sobre o substrato pNPG. De acordo com estes resultados, somente o clone 3 apresentou médias de atividade, por mL de cultura e por mg de proteína, estatisticamente iguais (p-valor > 0,05) àquelas da cepa UFV-3, enquanto os demais clones apresentaram médias estatisticamente inferiores ao controle. Estes resultados, comparado ao ocorrido com clones *cbhA*, podem ser consequência da interferência da expressão da endoglucanase recombinante na expressão e/ou secreção da β -glicosidase endógena. O sobrenadante de cultura, de 24 e 48 horas, de clones putativos *engB* e cepa UFV-3 não apresentou capacidade de hidrólise de CMC, revelando a incapacidade dos clones selecionados de secretar uma endoglucanase recombinante funcional em concentrações suficientes para ser detectada.

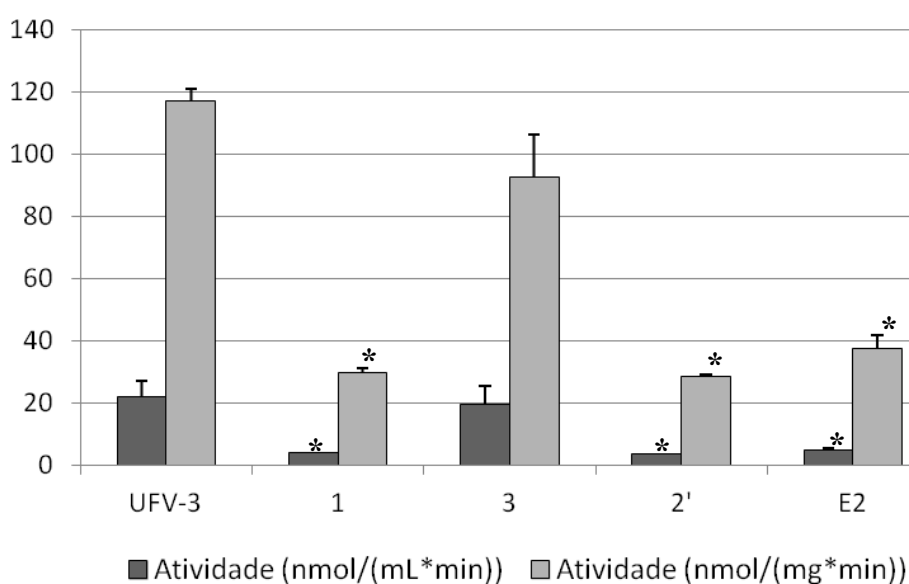


Figura 4.16 – Atividade enzimática extracelular de clones putativos para o gene *engB*. Atividade enzimática sobre o substrato pNPG do sobrenadante de 48 h de cultura de clones *engB* putativos e cepa controle UFV-3. Barras cinza escuro representam os valores de atividade em nmol de pNP/(mL*min) e barras cinza claro representam os valores de atividade específica em nmol de pNP/(mg*min). (*) indica médias de atividade significativamente (p-valor < 0,05) menores que aquelas do controle UFV-3.

A Figura 4.17 apresenta os valores médios de atividade sobre os substratos pNPG e CMC dos extratos protéicos obtidos da lise celular de clones recombinantes para o gene *engB* e cepa UFV-3. Observa-se que o clone 3, único a apresentar atividade

extracelular sobre o substrato pNPG, possui médias de atividade específica sobre pNPG e CMC estatisticamente (p -valor $< 0,05$) superiores à cepa controle e aos demais clones. Estes resultados mostram que o clone 3 foi capaz de expressar uma enzima com atividade endoglucanásica, possivelmente a endoglucanase recombinante codificada pelo gene *engB*, mas foi incapaz de secretá-la para o meio extracelular. Neste contexto, pode-se inferir que o peptídeo sinal do gene *engB* de *A. niger* não é eficientemente reconhecido por *K. marxianus* UFV-3, uma vez que a porção do peptídeo MF- α presente nesta construção não é funcional. Comparando estes resultados àqueles obtidos para clones *cbhA*, pode-se sugerir que o promotor PGK1 de *S. cerevisiae* foi corretamente reconhecido em *K. marxianus* UFV-3 para expressão heteróloga dos genes *cbhA* e *engB*, e que o peptídeo sinal MF- α de *K. lactis* foi corretamente reconhecido e processado para secreção de uma CBHa recombinante.

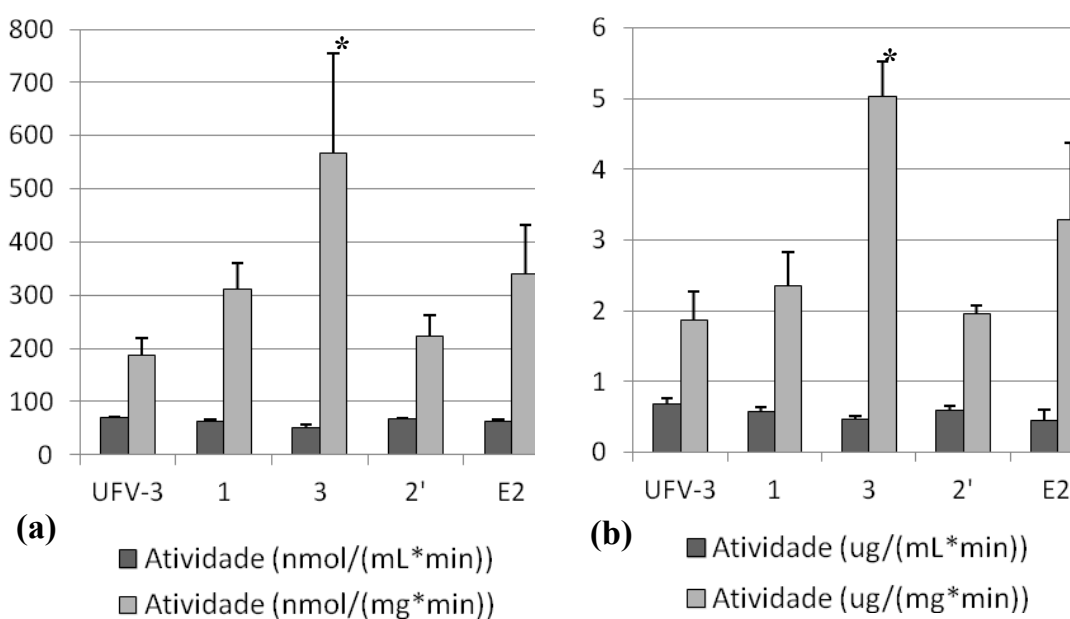


Figura 4.17 – Atividade enzimática do extrato celular de clones putativos para o gene *engB*. (a) Atividade enzimática sobre o substrato pNPG do extrato celular de 48 h de cultura de clones *engB* putativos e cepa controle UFV-3. Barras cinza escuro representam os valores de atividade em nmol de pNP/(mL de cultura*min) e barras cinza claro representam os valores de atividade específica para o extrato em nmol de pNP/(mg*min). (b) Atividade enzimática sobre o substrato CMC do extrato celular de 48 h de cultura de clones *engB* putativos e cepa controle UFV-3. Barras cinza escuro representam os valores de atividade em μ g de açúcar redutor/(mL de cultura*min) e barras cinza claro representam os valores de atividade específica para o extrato em μ g de açúcar redutor/(mg*min). (*) indica médias de atividade específica (nmol/(mg*min)) ou μ g de açúcar redutor/(mg*min) significativamente maiores que as observadas para o controle UFV-3.

Como resultado adicional, o extrato celular de *K. marxianus* UFV-3 foi capaz de hidrolisar o substrato CMC (Figura 4.17 b). Jeon et al. (2009) demonstraram que a β -glicosidase 1 é capaz de hidrolisar celobiose e celooligossacarídeos eficientemente, podendo ser utilizada juntamente com endo- β -1,4-glucanase para hidrólise completa da celulose à glicose. Os resultados do presente trabalho mostram que a β -glicosidase intracelular de *K. marxianus* UFV-3 possui capacidade de hidrólise de celooligossacarídeos, como já demonstrado para outras β -glicosidasas.

4.2 – Caracterização do mutante *K. marxianus cbhA 4'* quanto à estabilidade genética, secreção de proteínas e potencial fermentativo

4.2.1 – Estabilidade genética do clone C4'

A Figura 4.18 ilustra o crescimento diferencial do clone C4' em meio seletivo (YPD contendo 300 $\mu\text{g/mL}$ de G418) em relação à cepa controle não transformada UFV-3. O clone C4' foi avaliado quanto à manutenção da resistência à G418 após sete repicagens em meio não seletivo, apresentando-se estável, com mesmo padrão de crescimento observado na Figura 4.18, durante todas as passagens analisadas. As repicagens foram realizadas em intervalos iguais ou superiores a 48 horas. Tomando o tempo de geração padrão de *K. marxianus* como 0,75 h^{-1} (Fonseca et al., 2008), o clone C4' foi estável quanto à resistência à G418 por, no mínimo, 448 gerações.

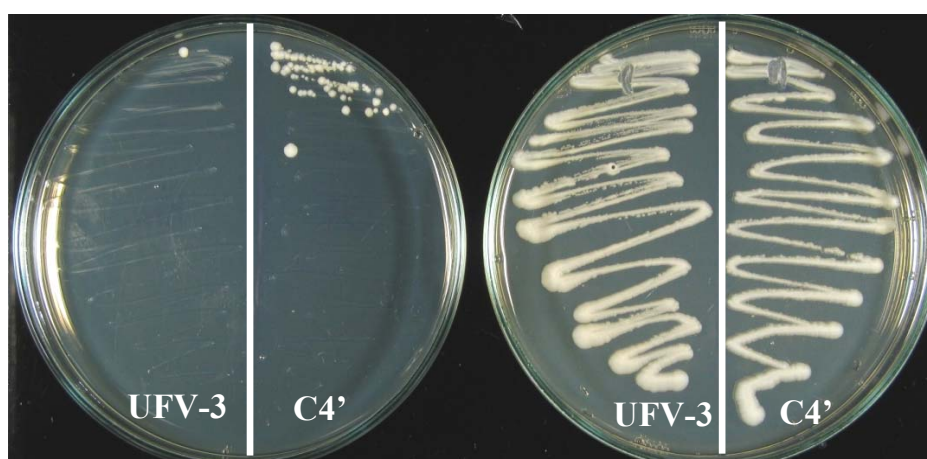


Figura 4.18 – Estabilidade genética do clone C4'. Cepa controle UFV-3 e clone C4' cultivados em meio YPD contendo 300 $\mu\text{g/mL}$ de G418 (esquerda) e meio YPD (direita) após a quarta passagem em meio não seletivo.

Nota-se na Figura 4.18 que o crescimento do clone em meio seletivo é muito inferior àquele observado para o meio não seletivo, o que pode ser devido a prejuízo no

crescimento na presença do antibiótico. A ploidia de uma cepa pode influenciar imensamente a estabilidade genética de transformantes obtidos. Lane et al. (2011) demonstraram a existência de cepas de *K. marxianus* haplóides e diplóides. Estudos sobre a ploidia de *K. marxianus* UFV-3 ainda não foram realizados.

4.2.2 – Comparação do perfil de secreção de proteínas de *K. marxianus* UFV-3 e *K. marxianus* recombinantes para o gene *cbhA*

Os experimentos realizados durante a seleção de transformantes para o gene *cbhA* mostraram que alguns clones, com maior capacidade de hidrólise de substratos específicos e não específicos, possuíam maior concentração total de proteínas no sobrenadante de cultura, sugerindo que estes clones possuíam maior potencial de secreção de proteínas que a cepa não transformada. Para analisar melhor este fenômeno, o sobrenadante de cultura da cepa UFV-3 e de dois clones positivos para atividade de celobiohidrolase foram analisados em eletroforese desnaturante de proteínas. A Figura 4.19 mostra o perfil de migração eletroforética das proteínas presentes no sobrenadante de 48 h de cultura de *K. marxianus* UFV-3 e dos clones *cbhA* 2 e 4'. A expressiva diferença observada na concentração e diversidade de proteínas presentes no sobrenadante das cepas transformadas quando comparadas à cepa UFV-3 é bastante intrigante.

Para confirmar se a ausência de algumas proteínas no sobrenadante da cepa controle seria uma questão de concentração, os sobrenadantes de cultura concentrados foram analisados em nova eletroforese utilizando quantidades comparáveis de proteína para os clones (25 e 50 µg) e a cepa UFV-3 (12,5 e 25 µg) (Figura 4.20). A análise conjunta das Figuras 4.19 e 4.20 mostra que o perfil de secreção de clones *cbhA* difere daquele observado para UFV-3 não só pela concentração total de proteínas, como também no conjunto de proteínas presentes. Nota-se que o sobrenadante da cepa UFV-3 possui uma proteína (Figura 4.19 - banda 2), com alta concentração percentual, de aproximadamente 95 KDa, correspondente à enzima endógena inulinase (Rouwenhorst et al., 1990), e concentração muito baixa de outras proteínas secretadas em relação às cepas transformadas. A enzima inulinase está presente em menor concentração no sobrenadante dos clones analisados, reforçando a idéia de que a expressão de uma proteína recombinante pode interferir na expressão e/ou secreção de proteínas endógenas.

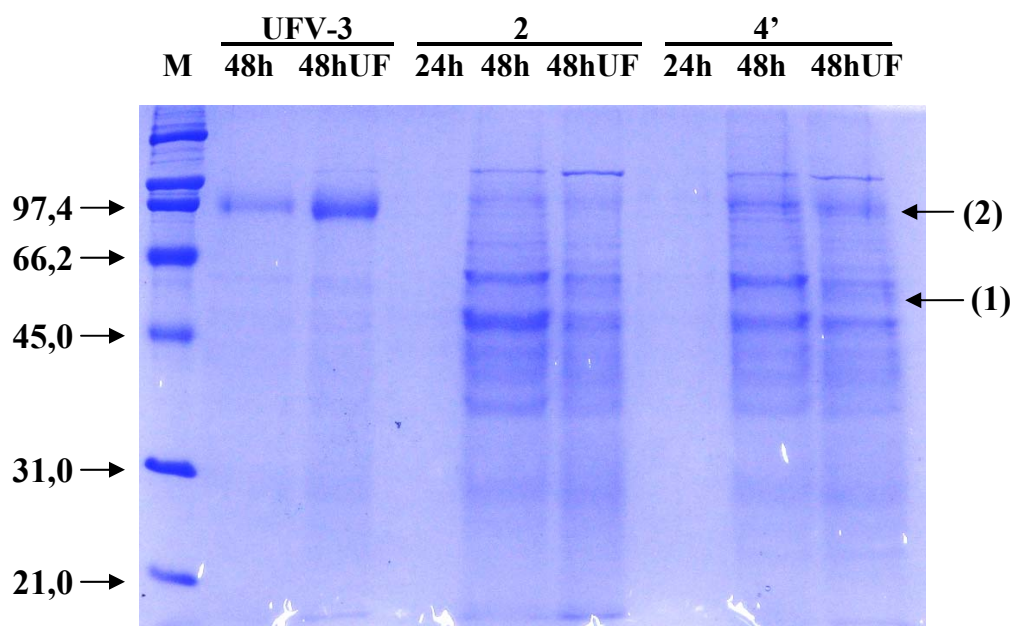


Figura 4.19 – Comparação do perfil de proteínas secretadas por *K. marxianus* UFV-3 e clones *cbhA* 2 e 4'. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% do sobrenadante de 48 horas de cultura, concentrado 10 vezes por evaporação a vácuo (48h) e concentrado 3 vezes por ultrafiltração (48h UF), da cepa UFV-3 e clones *cbhA* 2 e 4'. As canaletas 24h representam o sobrenadante não concentrado de 24 horas de cultura dos clones 2 e 4'. Setas (1) e (2) indicam a banda putativa da proteína recombinante CBHA (aproximadamente 54,0 KDa) e a banda da proteína endógena inulinase, respectivamente. M: marcador de peso molecular *Broad Range* (BIORAD) com os respectivos pesos (KDa) indicados.

De acordo com a literatura (Rouwenhorst et al., 1990; Lertwattanasakul et al., 2011) aproximadamente 50% da inulinase produzida por *K. marxianus* é secretada, enquanto 35% é retida no periplasma e 15% é intracelular. A baixa concentração relativa da proteína inulinase no sobrenadante das cepas transformadas constitui um forte indício de que o perfil diferencial de proteínas observado não é resultado de lise celular ou dano na parede celular. Outra observação que corrobora para esta hipótese é a manutenção da termotolerância nas cepas recombinantes analisadas (dados não apresentados), uma vez que tem sido observado que a resistência da parede celular está associada à termotolerância em cepas de *K. marxianus* (Lane et al., 2011). Curiosamente, Cai et al. (2005) obtiveram um padrão diferencial de secreção de proteínas entre *K. marxianus* CBS4857, não transformada e transformadas com vetor episomal para expressão heteróloga de interferon, em meio YPD, muito semelhante àquele observado no presente trabalho. Cai et al. (2005) não exploraram este resultado e não apresentaram sugestão para explicar a mudança no perfil de secreção de cepas transformadas de *K. marxianus*, porém, uma vez que estes autores utilizaram um vetor

não integrativo, a comparação de seus resultados com os nossos permite sugerir que a interrupção de genes relacionados à secreção não pode explicar este fenômeno.

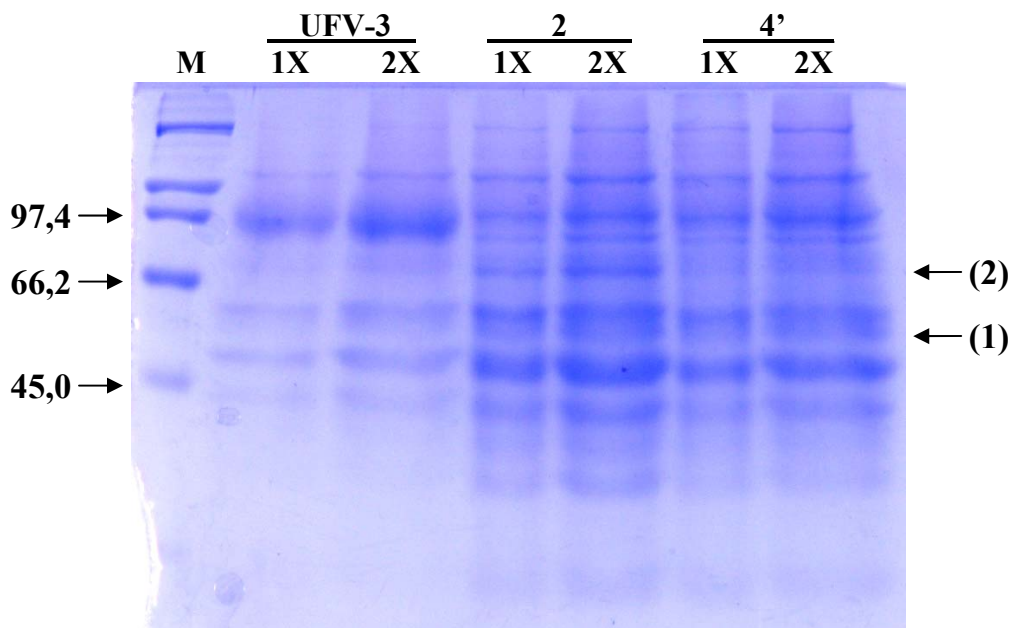


Figura 4.20 – Comparação do perfil de proteínas secretadas por *K. marxianus* UFV-3 e clones *cbhA* 2 e 4'. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% de 6 μ L (1X) e 12 μ L (2X) do sobrenadante de 48 horas de cultura, concentrado 10 vezes por evaporação a vácuo, da cepa UFV-3 e clones *cbhA* 2 e 4'. Setas (1) e (2) indicam a banda putativa da proteína recombinante CBHa (aproximadamente 54,0 KDa) e a banda de uma proteína com concentração diferencial para o clone 2, respectivamente. M: marcador de peso molecular *Broad Range* (BIORAD) com os respectivos pesos (KDa) indicados.

A enzima inulinase é a proteína de maior concentração percentual, aproximadamente 60%, encontrada no sobrenadante de cultura de *K. marxianus* quando cultivada em meio YPD (Rouwenhorst et al., 1990; Lertwattanasakul et al., 2011). A regulação da produção de inulinase parece divergir muito entre cepas de *K. marxianus*, sendo encontradas cepas cuja produção da enzima depende da presença dos substratos inulina e/ou sacarose no meio de cultura, e outras, como a cepa CDBB-L 278, cuja produção de inulinase independe da presença de seus substratos (Lertwattanasakul et al., 2011). De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 4.19 e 4.20, *K. marxianus* UFV-3 foi capaz de produzir inulinase, em alta concentração no sobrenadante, na ausência dos substratos indutores e na presença de glicose, sugerindo a inexistência de efeito de repressão catabólica na produção de inulinase para esta cepa. Rouwenhorst et al. (1990) demonstraram que o monômero de inulinase, presente no sobrenadante de *K. marxianus*, apresenta-se como uma banda de proteína difusa, entre 87 e 102 KDa,

consistindo de um polipeptídeo de 64 KDa com 26 a 37% da massa correspondendo a carboidratos (glicosilação). Este padrão é muito similar àquele observado para a banda 2 (Figura 4.19). Rouwenhorst et al. (1990) demonstraram que a inulinase é encontrada no sobrenadante de *K. marxianus* como um dímero, enquanto a proteína periplasmática é um tetrâmero. Os mesmos autores sugerem que glicoproteínas oligoméricas periplasmáticas, como a inulinase (tetrâmero) em *K. marxianus* e invertase (octâmero) em *S. cerevisiae*, podem ter um importante papel na formação de uma barreira de permeabilidade nas regiões mais externas da parede celular, contribuindo para a retenção de proteínas no espaço periplasmático. Neste contexto, sugere-se que o aumento na secreção total de proteínas observado nas cepas recombinantes de *K. marxianus* pode ser um efeito indireto da interferência da expressão de uma proteína heteróloga na produção de inulinase, resultando em aumento da permeabilidade da parede celular. Para investigar este fenômeno a expressão e atividade de inulinase devem ser comparadas entre diferentes cepas transformadas e não transformadas de *K. marxianus*. Estes estudos podem contribuir para a engenharia genética de microorganismos, revelando as bases do acúmulo de proteínas no periplasma de hospedeiros potenciais como *S. cerevisiae* e *K. marxianus*.

Nota-se na Figura 4.20 que os clones *cbhA* 2 e 4' foram capazes de secretar uma proteína de aproximadamente 200 KDa em concentração mais alta que a proteína correspondente na cepa controle. Esta capacidade de secreção de proteínas de alto peso molecular, observada para a cepa controle e, de forma mais proeminente, para as cepas recombinantes, reafirma o potencial de secreção de proteínas para a cepa UFV-3, o qual já tem sido demonstrado para outras cepas de *K. marxianus* (Fonseca et al., 2008). Observa-se ainda a presença de bandas protéicas (Figura 4.20 – banda 2) em concentrações diferentes quando se compara os clones 2 e 4', sugerindo a existência de diferenças quanto à secreção de proteínas entre as cepas recombinantes obtidas.

Comparando-se o perfil de proteínas presentes nas amostras UFV-3 e clones 2 e 4' foi possível identificar uma banda (Figuras 4.19 e 4.20 – banda1), de peso molecular estimado de aproximadamente 54 KDa, presente no sobrenadante dos clones e ausente na cepa controle, podendo corresponder à CBHA recombinante. A banda mais próxima observada no controle tem peso estimado de 58 KDa. Entretanto, as bandas apresentadas nas Figuras 4.19 e 4.20 são bastante difusas, devido à sua alta concentração, dificultando a comparação de peso molecular entre bandas próximas. A Figura 4.21 mostra nova eletroforese de proteínas realizada com diferentes

concentrações do sobrenadante, concentrado e não concentrado, de cultura de *K. marxianus* UFV-3 e clone *cbhA* 4'. Neste gel a diferença entre a banda putativa para CBHa (banda 1) e a banda mais próxima no controle UFV-3 fica mais clara, sendo estimados pesos moleculares de 54,42 e 58,46 KDa para as duas proteínas, respectivamente. Para melhor comparação, a banda 2, indicada na Figura 4.21, teve pesos moleculares estimados de 133,15 e 134,75 KDa para o clone 4' e a cepa controle, respectivamente. A celobiohidrolase codificada pelo gene *cbhA* possui peso molecular predito de 48,26 KDa (WorkBench). A comparação dos pesos moleculares estimado (105 KDa) e real para a inulinase, tanto nos clones quanto para a cepa controle, e a comparação visual de bandas com o marcador utilizado, revela que os pesos calculados neste trabalho podem estar superestimados. Porém, para uma análise semi-quantitativa, buscando principalmente a comparação de cepas, estes pesos aproximados são suficientes.

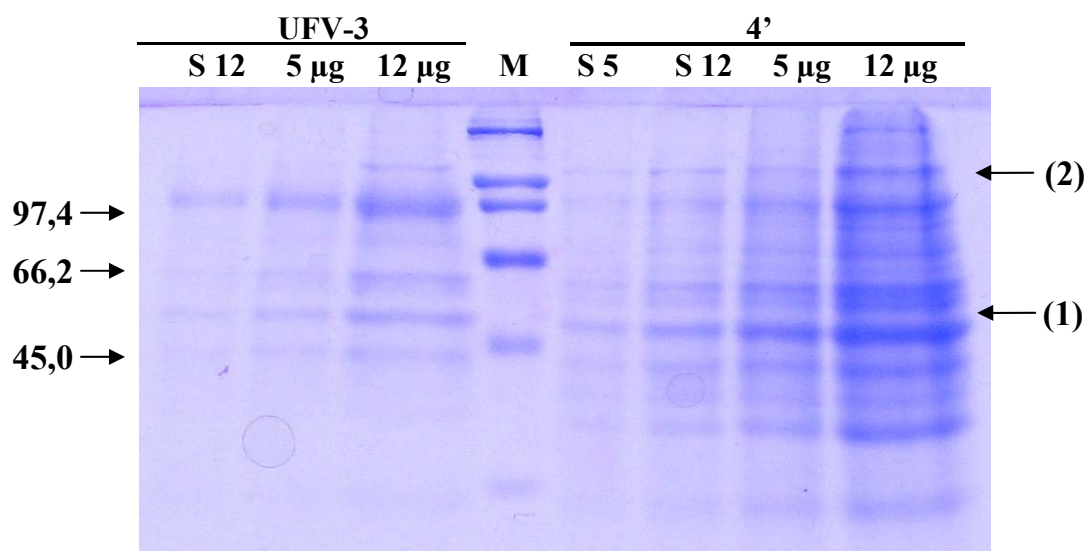


Figura 4.21 – Comparação do perfil de proteínas secretadas por *K. marxianus* UFV-3 e clone *cbhA* 4'. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% de 5 e 12 µL (S5 e S12) do sobrenadante de 48 horas de cultura sem concentrar, e 5 e 12 µg do sobrenadante concentrado por evaporação a vácuo, da cepa UFV-3 e clone *cbhA* 4'. Setas (1) e (2) indicam respectivamente a banda putativa da proteína recombinante CBHa (54,42 KDa) e a banda de uma proteína usada para comparação das diferenças de peso observadas no clone e UFV-3. M: marcador de peso molecular *Broad Range* (BIORAD) com os respectivos pesos (KDa) indicados.

O sobrenadante de cultura do clone *cbhA* 4' e da cepa controle UFV-3 foram submetidos à purificação visando identificar a banda referente à proteína heteróloga CBHa. Para tanto, a cromatografia de troca iônica foi aplicada segundo os parâmetros determinados por Gielkens et al. (2004) para purificação da CBHa de *A. niger*. A Figura

4.22 apresenta o perfil de eluição de proteínas das cromatografias realizadas para o sobrenadante do clone 4' e da cepa UFV-3. Os perfis de eluição de proteínas para o clone 4' e cepa UFV-3 se assemelham quanto à forma dos picos, diferindo porém na intensidade dos mesmos, dada a maior concentração de proteínas presente na amostra *cbhA* 4'. De acordo com este perfil, as frações da amostra UFV-3 parecem atrasadas em 0,5 mL em relação à amostra *cbhA* 4'. Neste contexto, as frações 28 a 35 (12 a 17,5 mL) purificadas para o clone 4' foram analisadas quanto à atividade sobre os substratos pNPG e pNPC, sendo os resultados apresentados na Figura 4.23.

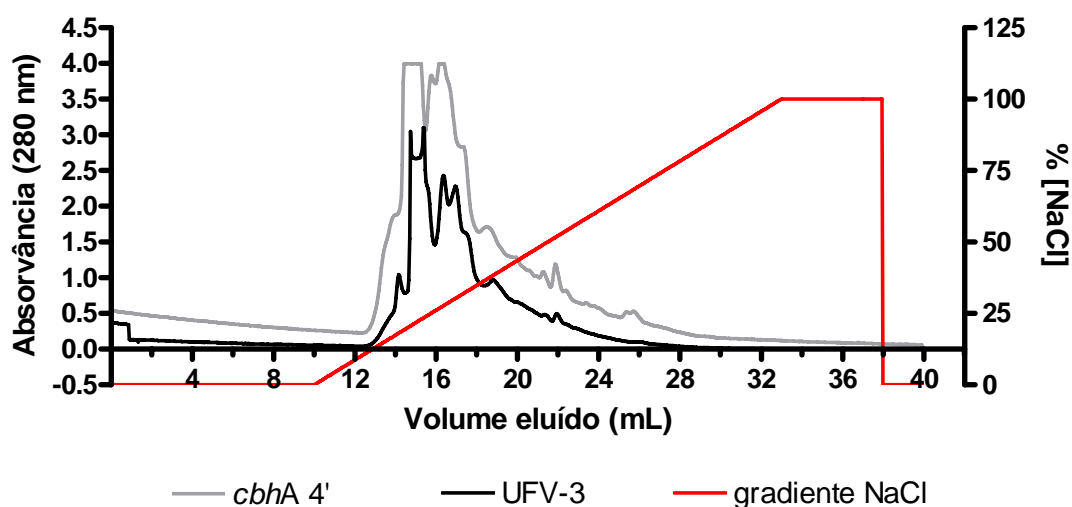


Figura 4.22 – Perfil de eluição de proteínas da purificação do sobrenadante de *K. marxianus* UFV-3 e clone *cbhA* 4'. Valores de absorvância em $\lambda=280$ nm para frações eluídas (mL) da cromatografia de troca iônica do sobrenadante do clone *cbhA* 4' (cinza) e cepa UFV-3 (preto) e gradiente de NaCl (vermelho) em percentual da solução de 1M.

A análise dos valores de atividade para os substratos pNPC e pNPG (Figura 4.23) permite sugerir que a proteína de interesse, com atividade de hidrólise do substrato específico pNPC, está presente em maior concentração e grau de pureza na fração 29. Observa-se a existência de dois picos de atividade sobre pNPG: o primeiro pico pode ser resultado da ação conjunta da CBHa e de uma das isoformas da β -glicosidase endógena, enquanto o segundo pico pode representar a atividade da outra isoforma de β -glicosidase.

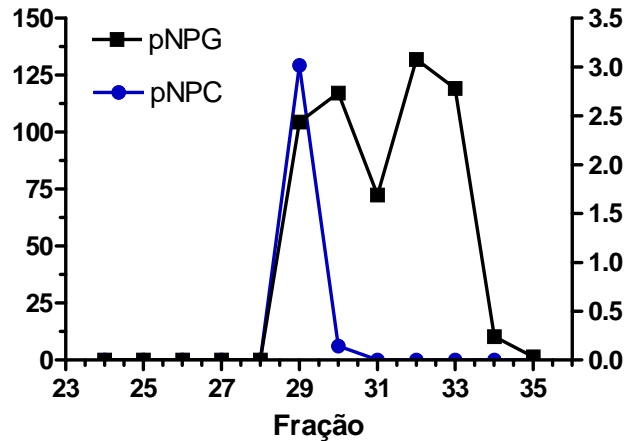


Figura 4.23 – Atividade enzimática das frações purificadas do sobrenadante do clone *cbhA 4'*. Valores de atividade (nmol/(mL*min)) sobre os substratos pNPC (azul; eixo direito) e pNPG (preto; eixo esquerdo) das frações 24 a 35 obtidas da cromatografia de troca iônica so sobrenadante do clone *cbhA 4'*.

As proteínas presentes nas frações 29 a 35 da purificação das amostra *cbhA 4'* e UFV-3 foram avaliadas em eletroforese desnaturante (Figura 4.24). Nota-se a presença de diversas proteínas eluídas da purificação da amostra *cbhA* em cada fração, evidenciando que muitas das proteínas presentes no sobrenadante de cultura possuem valor de pI abaixo de 5,5. A seta (1) (Figura 4.24 a) mostra a banda de uma proteína, de peso molecular estimado 54,35 KDa, presente na fração 29 purificada do sobrenadante do clone 4' e ausente nas frações 29 e 30 purificadas da cepa UFV-3. As proteínas que aparecem na mesma faixa de peso nas demais frações analisadas, para o clone 4' e para UFV-3, possuem peso molecular estimado superior a 55 KDa, à exceção da banda (1) apontada na Figura 4.24 (b) que apresentou peso estimado de 53,56 KDa. Diante deste resultado, a banda (1) (Figura 4.24 a) da fração 29 da amostra 4' foi excisada do gel e enviada para sequenciamento de proteína, buscando confirmar se ela corresponde à CBHa recombinante.

Observa-se que a fração 29 da purificação da amostra UFV-3 possui alta concentração e alto grau de pureza da inulinase endógena, sendo detectadas apenas duas proteínas adicionais em concentrações muito baixas. A proteína inulinase possui valor predito de pI de 4,6, tendo sido preferencialmente retida na resina de troca aniônica em detrimento das demais proteínas do sobrenadante de cultura da cepa UFV-3. Resultado muito semelhante foi obtido por Rouwenhorst et al. (1990) para purificação da inulinase de *K. marxianus* CBS 6556 em três passos: ultrafiltração, cromatografia de troca iônica e gel filtração de alta performance (FPLC). Neste contexto, sugere-se que a

cromatografia de troca aniônica, com os parâmetros utilizados neste trabalho (item 3.3.2.1), seja utilizada como metodologia de purificação, em um único passo, da inulinase de *K. marxianus* UFV-3 em processos onde a completa pureza da enzima não seja uma exigência.

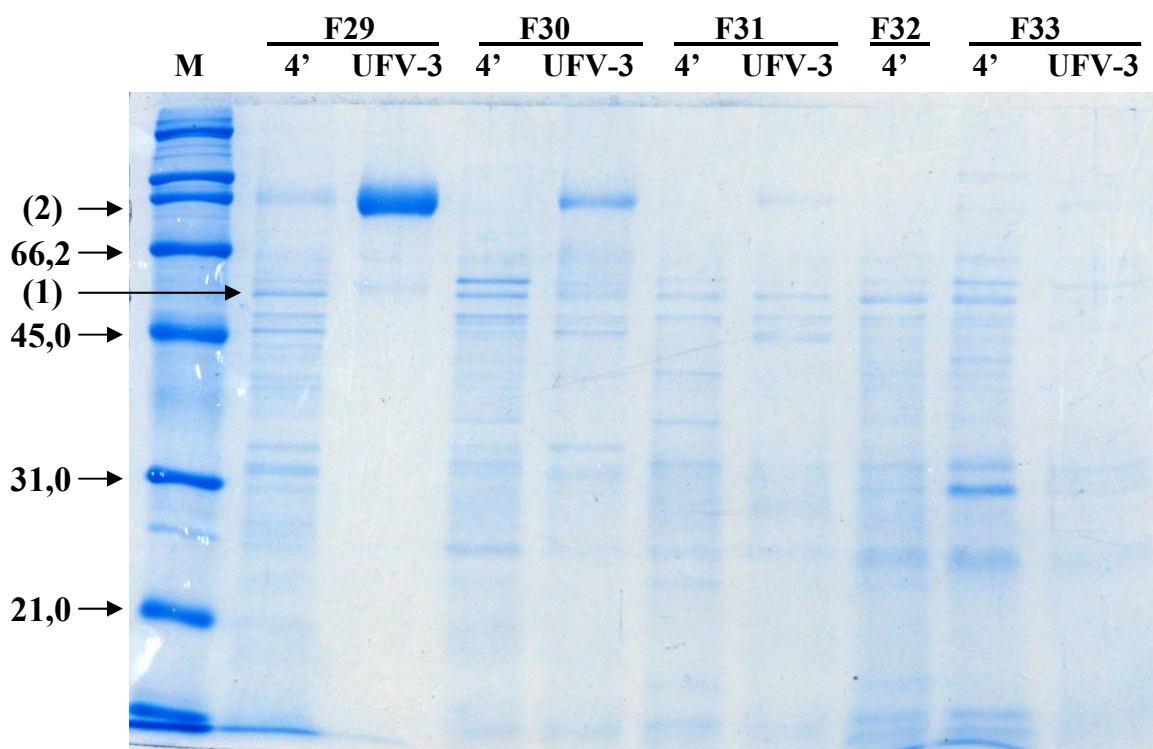


Figura 4.24 – Comparação das frações purificadas do sobrenadante de cultura de *K. marxianus* UFV-3 e clone *cbhA* 4'. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) 12% das frações 29 a 33 obtidas da cromatografia de troca iônica para o sobrenadante de 48 horas de cultura da cepa UFV-3 e clone *cbhA* 4'. Setas (1) e (2) indicam a banda putativa da proteína recombinante CBHa (54,35 KDa) e a banda da proteína endógena inulinase, respectivamente. M: marcador de peso molecular *Broad Range* (BIORAD) com os respectivos pesos (KDa) indicados.

4.2.3 – Análise do perfil de glicosilação das proteínas do sobrenadante de *K. marxianus cbhA*-C4'

Realizou-se com as frações 29 e 30, provenientes da purificação da amostra *cbhA* 4', reação de de-glicosilação utilizando uma N-glicosidase (PNGase) e uma O-glicosidase (endo- α -N-acetilgalactosaminidase), de modo a inferir sobre os tipos e o grau de glicosilações inseridas pela levedura *K. marxianus* nas proteínas secretadas presentes nestas frações. Este experimento permitiria ainda investigar a existência no sobrenadante mais de uma forma glicosilada da CBHa recombinante. A eletroforese em

gel de poliacrilamida mostrando o padrão de migração das proteínas antes e depois do tratamento com as glicosidases está mostrada na Figura 4.25.

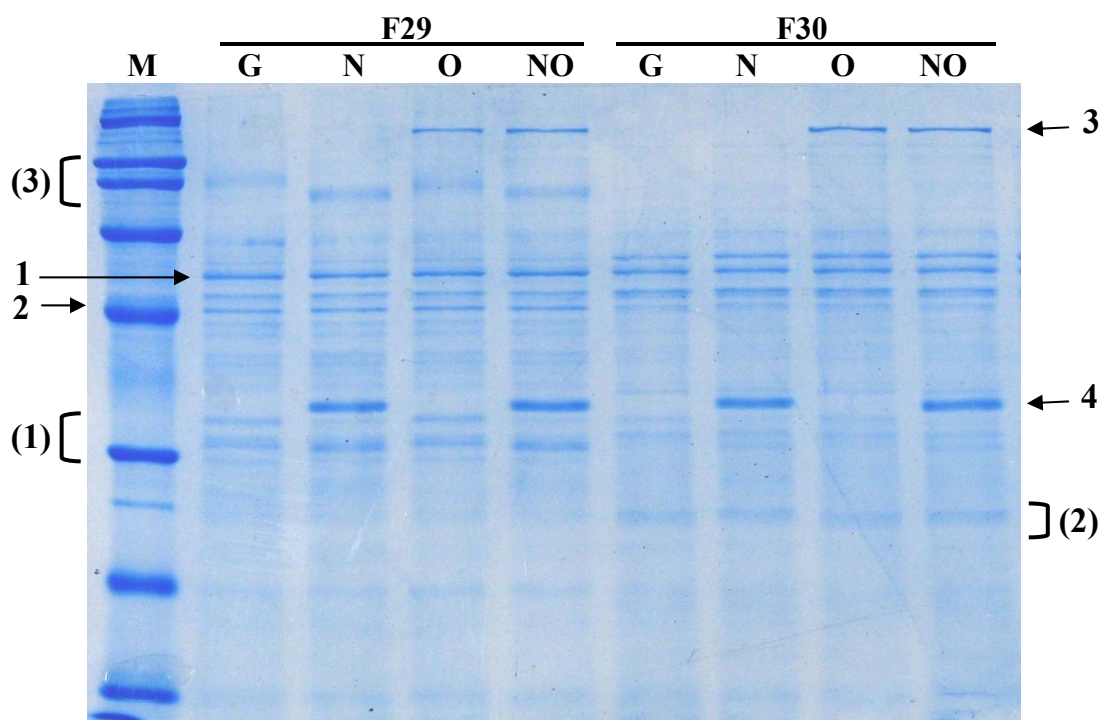


Figura 4.25 – Análise da glicosilação de proteínas de frações purificadas do sobrenadante de cultura do clone *cbhA 4'*. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% das frações 29 e 30 obtidas da cromatografia de troca iônica para o sobrenadante de 48 horas de cultura do clone *cbhA 4'* (G) e frações submetidas a deglicosilação com a enzima PNGase (N), o-glicosidase (O) e ambas as enzimas (NO). Setas indicam: (1) banda putativa da proteína recombinante CBHa (53,99 KDa); (2) duas bandas para β -glicosidases endógenas; (3) enzima O-glicosidase; e (4) enzima PNGase. Os colchetes indicam: (1) conjunto de proteínas N-glicosiladas; (2) proteína O-glicosilada; e (3) proteína com N- e O-glicosilação. M: marcador de peso molecular Broad Range (BIORAD).

Glicosilação é uma das mais frequentes modificações pós-traducionais observadas em organismos eucariotos e pode influenciar sobremaneira a solubilidade, o dobramento, a susceptibilidade à proteólise, a estabilidade térmica e a atividade das proteínas (Çelik & Çalik, 2011). Leveduras são capazes de realizar tanto N- como O-glicosilação, e a via de N-glicosilação no retículo endoplasmático é bastante conservada entre leveduras e eucariotos superiores (Çelik & Çalik, 2011).

Observa-se na Figura 4.25 a existência de proteínas N-glicosiladas (conjunto 1), O-glicosiladas (conjunto 2) e de uma proteína com os dois tipos de glicosilação (conjunto 3), sugerindo que *K. marxianus* UFV-3 é capaz de realizar N- e O-glicosilação. Rocha et al. (2010) e Rocha et al. (2011) mostraram que a enzima GOX de

A. niger e a enzima esterase, expressas heterologicamente em *K. marxianus* SLC 33, sofreram N-glicosilação, com baixos níveis de hiperglicosilação, sendo que a capacidade de O-glicosilação não foi investigada nos trabalhos em questão. Na Figura 4.25, é possível identificar bandas protéicas (conjunto 1) que, estando inicialmente separadas, após a de-glicosilação com PNGase passaram a constituir uma única banda, revelando a existência de mais de uma forma glicosilada da mesma proteína no sobrenadante de cultura. Este resultado permite sugerir que *K. marxianus* UFV-3 pode realizar diferentes tipos ou graus de glicosilação em uma mesma proteína, o que deve contribuir para a diversidade de proteínas observadas no meio extracelular. Resultados semelhantes foram encontrados por Rouwenhorst et al. (1990) para a diversidade de formas glicosiladas de inulinase em *K. marxianus* CBS 6556.

As principais diferenças na via de glicosilação em leveduras surgem após o transporte das glicoproteínas contendo o grupo Man₈GlcNAc₂ para o Complexo de Golgi, onde as proteínas podem sofrer adição de manose (hiperglicosilação) em diferentes graus de acordo com a espécie – *S. cerevisiae* pode adicionar de 50 a 100 resíduos de manose, enquanto *P. pastoris* adiciona até 20 resíduos (Çelik & Çalik, 2011). A pequena diferença observada entre o padrão de migração eletroforética das proteínas glicosiladas e de-glicosiladas (Figura 4.25) sugere que níveis mais baixos de glicosilação, ou pequena extensão de hiperglicosilação, ocorrem em *K. marxianus* quando comparados aos observados para *S. cerevisiae*. Em algumas leveduras, a capacidade de realizar hiperglicosilação tem sido negativamente relacionada com a capacidade de secreção de proteínas. *S. cerevisiae* possui a maior capacidade de hiperglicosilação dentre as leveduras utilizadas para expressão de proteínas recombinantes, levando à reduzida taxa de secreção, isto é, a maior parte das proteínas é retida no periplasma; ao mesmo tempo, *P. pastoris* possui sabidamente menor taxa de hiperglicosilação que *S. cerevisiae* e seu nível de secreção de proteínas é superior ao da mesma levedura (Çelik & Çalik, 2011). O potencial de secreção de proteínas em *K. marxianus* tem sido descrito na literatura (Fonseca et al. 2008), sendo esta afirmação baseada, principalmente, na capacidade de secreção de altos níveis de inulinase observada para esta levedura (Lane et al., 2011). As bases genéticas e fisiológicas para a capacidade diferencial de secreção em *K. marxianus* ainda não foram completamente investigadas, porém, as informações sobre os níveis de glicosilação de proteínas apresentadas no presente trabalho sugerem que a baixa capacidade de realizar

hiperglicosilação pode estar associada à alta capacidade de secreção de proteínas em *K. marxianus* UFV-3, como tem sido observado para outras espécies.

A proteína de 54 KDa (Figura 4.25 – banda 1), putativa para a CBHa recombinante, não apresentou mudança no padrão de migração eletroforética após tratamento com glicosidases, sugerindo que esta proteína não é glicosilada por *K. marxianus*. Este resultado está de acordo com a baixa probabilidade de N- e O-glicosilação calculada para esta enzima nos servidores NetNGlyc e NetOGlyc, respectivamente.

Como um resultado adicional da análise de glicosilação de proteínas (Figura 4.25 - bandas 2), foi possível observar que as duas izoenzimas com capacidade de hidrólise de ligações β -glicosídicas secretadas no sobrenadante de *K. marxianus* UFV-3, e identificadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Molecular, não correspondem a diferentes formas glicosiladas da mesma proteína, devendo então constituir proteínas codificadas por genes diferentes.

4.2.4 – Avaliação do potencial fermentativo de *K. marxianus* *cbhA*-C4'

4.2.4.1 – Fermentação em Glicose

Para avaliar se a cepa recombinante *cbhA* 4', com atividade específica de celobiohidrolase, teria potencial para utilização em sistema de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) do bagaço de cana-de-açúcar, a capacidade fermentativa desta cepa foi comparada àquela da cepa controle UFV-3 no mesmo meio utilizado para SSF (item 3.3.4), porém sem bagaço, contendo glicose a 45 g/L como fonte de carbono. A fermentação foi analisada nas mesmas condições de temperatura (42°C), agitação e pH em que a SSF é realizada em nosso laboratório (Souza et al., 2012), sendo a concentração de glicose inicial escolhida de acordo com a concentração de glicose resultante da pré-hidrólise do bagaço utilizado em SSF (Souza et al., 2012). A Figura 4.26 mostra o perfil de crescimento (g.L^{-1}) e de fermentação para as cepas *cbhA* 4' e UFV-3.

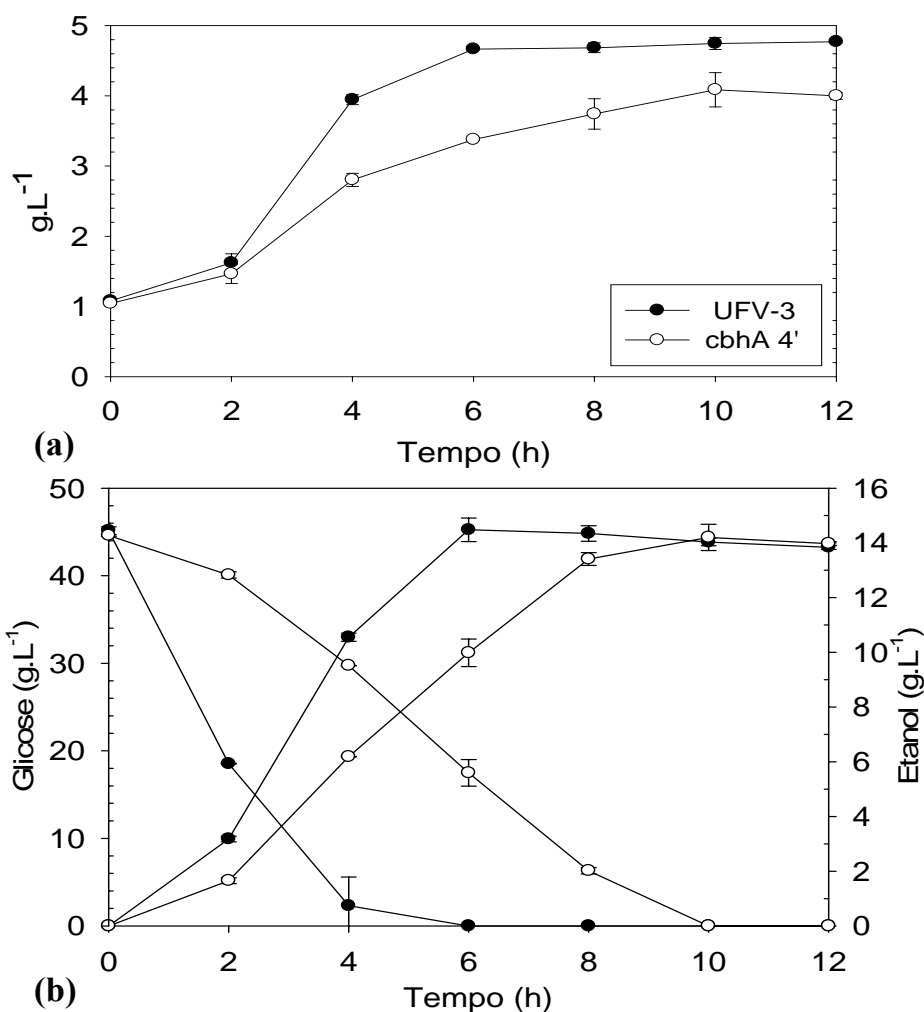


Figura 4.26 – Comparação da capacidade fermentativa da cepa UFV-3 e clone *cbhA* 4'. Comparação das curvas de crescimento (g.L⁻¹) (a) e fermentação (b) de glicose (g.L⁻¹) a etanol (g.L⁻¹) a 42 °C em meio utilizado para SSF entre as cepas UFV-3 (círculos preenchidos) e clone *cbhA* 4' (círculos vazios).

As curvas de crescimento e fermentação para UFV-3 e *cbhA* 4' mostram que estas cepas são capazes de crescer e fermentar ao mesmo tempo, a 42°C, tendo sido observado aumento de 4,8 e 4 vezes da massa de células em 10 horas de fermentação para UFV-3 e *cbhA* 4', respectivamente. *K. lactis* e *K. marxianus* são reconhecidas como leveduras Crabtree negativas, mas têm o potencial de gerar energia via metabolismo respiro-fermentativo (Lane et al., 2011). Estudos recentes mostram que as cepas de *K. marxianus* diferem muito na extensão do efeito Crabtree, sendo que a aplicação de muitas cepas desta espécie na produção de etanol não condiz com a classificação de “Crabtree negativas” (Lane et al., 2011). Estes estudos enfatizam a necessidade de se estudar cada cepa da espécie quanto ao potencial fermentativo. A capacidade de crescimento do clone *cbhA* 4' em ambiente fermentativo e a 42°C -

temperatura compatível com aquela de atuação de celulases - constitui característica importante para aplicação deste clone em sistema de SSF e Bioprocesso Consolidado, pois a expressão da celobiohidrolase recombinante, sob controle do promotor constitutivo PGK, provavelmente está associada ao crescimento da cepa. De acordo com os resultados da Figura 4.26 (b) observou-se valores de rendimento ($Y_{E/G}$) de conversão de glicose (g) em etanol (g) de 0,321 para UFV-3, com 6 horas de fermentação, e de 0,318 para *cbhA 4'*, com 10 horas de fermentação, correspondendo a 62,94 e 62,35 % do valor teórico (0,51) para as duas cepas respectivamente. No entanto, verifica-se que o rendimento em etanol no final da fermentação é o mesmo para as duas cepas, uma vez que a concentração final de etanol é de 14 g.L⁻¹. Esta produção final de etanol para ambas as cepas foi superior a encontrada por Rodrussamee et al. (2011) (10 g.L⁻¹) após 12 horas de fermentação a 40°C utilizando a cepa *K. marxianus* DMKU-1042. Observa-se das curvas de fermentação que as taxas máximas de consumo de glicose, 10,7 e 5,6 g.h⁻¹ para UFV-3 e *cbhA 4'*, são muito superiores à taxa máxima de liberação de glicose (1,07 g.h⁻¹) observadas por Souza et al. (2012) durante a hidrólise de celulose do bagaço a 42 °C, utilizando 15 FPU de celulases. Esta comparação visa enfatizar a importância da melhoria da etapa de hidrólise do bagaço para viabilização da produção de etanol celulósico.

A comparação das curvas obtidas para o clone *cbhA 4'* e a cepa UFV-3 revela que este clone possui menor velocidade aparente de crescimento e de fermentação, apesar de ter o mesmo rendimento final em etanol, que a cepa controle. Esta mudança no metabolismo pode ser consequência do estresse provocado pela expressão e secreção de uma proteína heteróloga e corrobora com as observações de interferência na produção de proteínas endógenas já observadas neste trabalho. Segundo Mattanovich et al. (2004), tem se tornado óbvio que muitos produtos protéicos exercem severo estresse na célula hospedeira quando são expressos, o que pode limitar o rendimento potencial de alguns processos. Segundo os mesmos autores, o conhecimento da fisiologia do estresse em leveduras pode ser largamente empregado na melhoria de processos biotecnológicos industriais, principalmente porque leveduras com estresse pela expressão de proteínas heterólogas têm se mostrado tolerantes a outros tipos de estresse. O trabalho de Hong et al. (2007) mostrou a expressão heteróloga de uma endoglucanase, uma celobiohidrolase e uma β -glicosidase ao mesmo tempo em *K. marxianus* NBRC1777, porém este transformante apresentou baixa capacidade fermentativa. A nossa hipótese é que a expressão de três proteínas heterólogas pode ter

causado uma sobrecarga no metabolismo da cepa obtida por Hong et al. (2007) e, por isso, o presente trabalho adotou a estratégia de transformação de *K. marxianus* UFV-3 com uma endoglucanase e uma celobiohidrolase em separado. A menor capacidade fermentativa da cepa recombinante *cbhA 4'* obtida neste trabalho corrobora para esta hipótese e reforça a nossa idéia de que um consórcio de leveduras selvagens e leveduras expressando os genes de celulases seria a melhor alternativa para produção de celulases associada à hidrólise e fermentação de celulose (Bioprocesso Consolidado).

4.2.4.2 – SSF do bagaço de cana-de-açúcar

Na tentativa de comparar a eficiência fermentativa da cepa *cbhA 4'* e UFV-3 em sistema de SSF do bagaço de cana de açúcar, foram realizadas fermentações do bagaço pré-tratado, sem hidrólise prévia, com adição inicial de quantidades crescentes de um *pull* de celulases comercial (5, 10 e 15 FPU de Celluclast). Aliquotas foram retiradas a cada 5 horas para determinação da concentração de etanol. A variável resposta concentração de etanol (g.L^{-1}) foi avaliada quanto aos fatores quantitativos quantidade inicial de celulases comerciais (FPU) e tempo de fermentação (horas), e quanto ao fator qualitativo cepa de levedura. Para tanto, o fator cepa de levedura foi tratado como variável Dummy, sendo atribuídos valor 0 e 1 para a cepa UFV-3 e *cbhA 4'*, respectivamente. A análise preliminar dos dados mostrou a existência de duas fases na fermentação (0 a 10h e 15 a 30h) onde o comportamento da variável resposta quanto aos fatores analisados era muito diferente. Diante disto, foram ajustados dois modelos polinomiais (Equação 1 e 2), um em cada fase da fermentação, para explicar o comportamento da produção de etanol em sistema SSF e, principalmente, comparar a cepa recombinante e selvagem neste sistema:

$$E = 3,78 + 2,13^* T + 1,1^* F - 0,40^* C - 1,13^* T^2 + 0,96^* T^*F - 0,42^* T^*C - 0,28^* F^*C$$

$$R^2 = 96,55\% \quad (\text{Equação 1})$$

$$E = 9,40 + 1,65^* T + 3,12^* F - 0,94^* C - 1,11^* F^2 \quad R^2 = 93,68\% \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: E = concentração de etanol (g.L^{-1}); T = tempo; F = FPU; e C = cepa. A título de comparação quantitativa dos efeitos de cada termo na equação, os coeficientes são apresentados em unidades codificadas, onde todos os fatores foram analisados segundo uma mesma escala, com igual amplitude segundo as faixas estudadas.

Segundo a ANOVA da regressão, estes modelos podem significativamente (p -valor = 0,000) explicar a resposta produção de etanol (g.L^{-1}), sendo ainda observada a não significância da falta de ajuste (p -valor = 0,287 e 0,978, respectivamente), como desejado, e tendo sido aceitas as pressuposições da ANOVA. As Figuras 4.27 e 4.28 mostram as superfícies de resposta e gráficos de contorno obtidos para a produção de etanol segundo as equações ajustadas 1 e 2. Os gráficos são apresentados em unidades não codificadas (naturais).

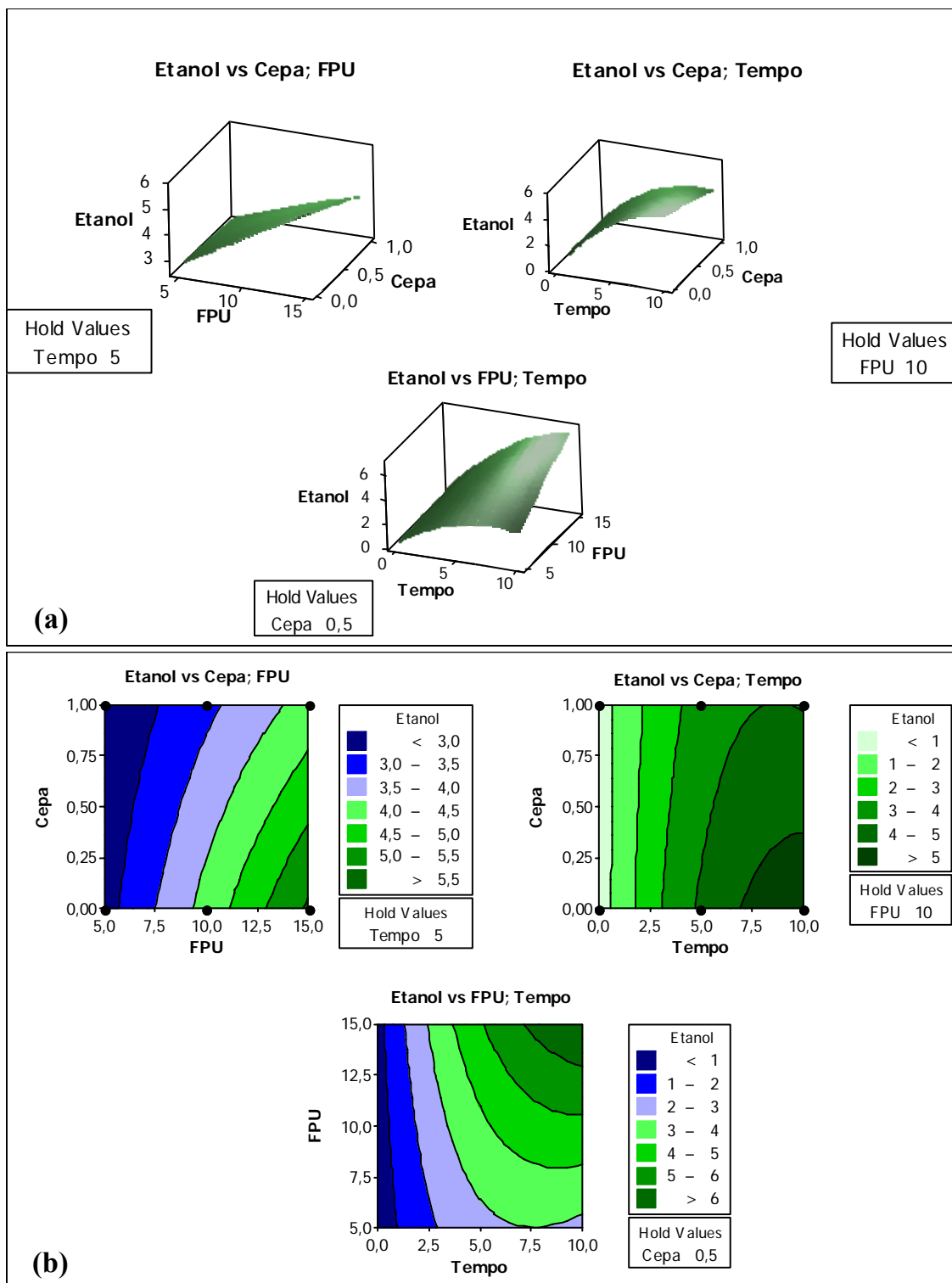


Figura 4.27 – Comparação da produção de etanol de 0 a 10 h de SSF com a cepa UFV-3 e clone *cbhA 4'*. Gráficos de superfície (a) e contorno (b) para a resposta ajustada concentração de etanol (g.L^{-1}) (Anexos 1, 2 e 3) quanto à cepa utilizada ($\text{UFV-3} = 0$ e $\text{cbhA } 4' = 1$), tempo de fermentação (h) e quantidade de celulases adicionada (FPU) segundo modelo da Equação 1.

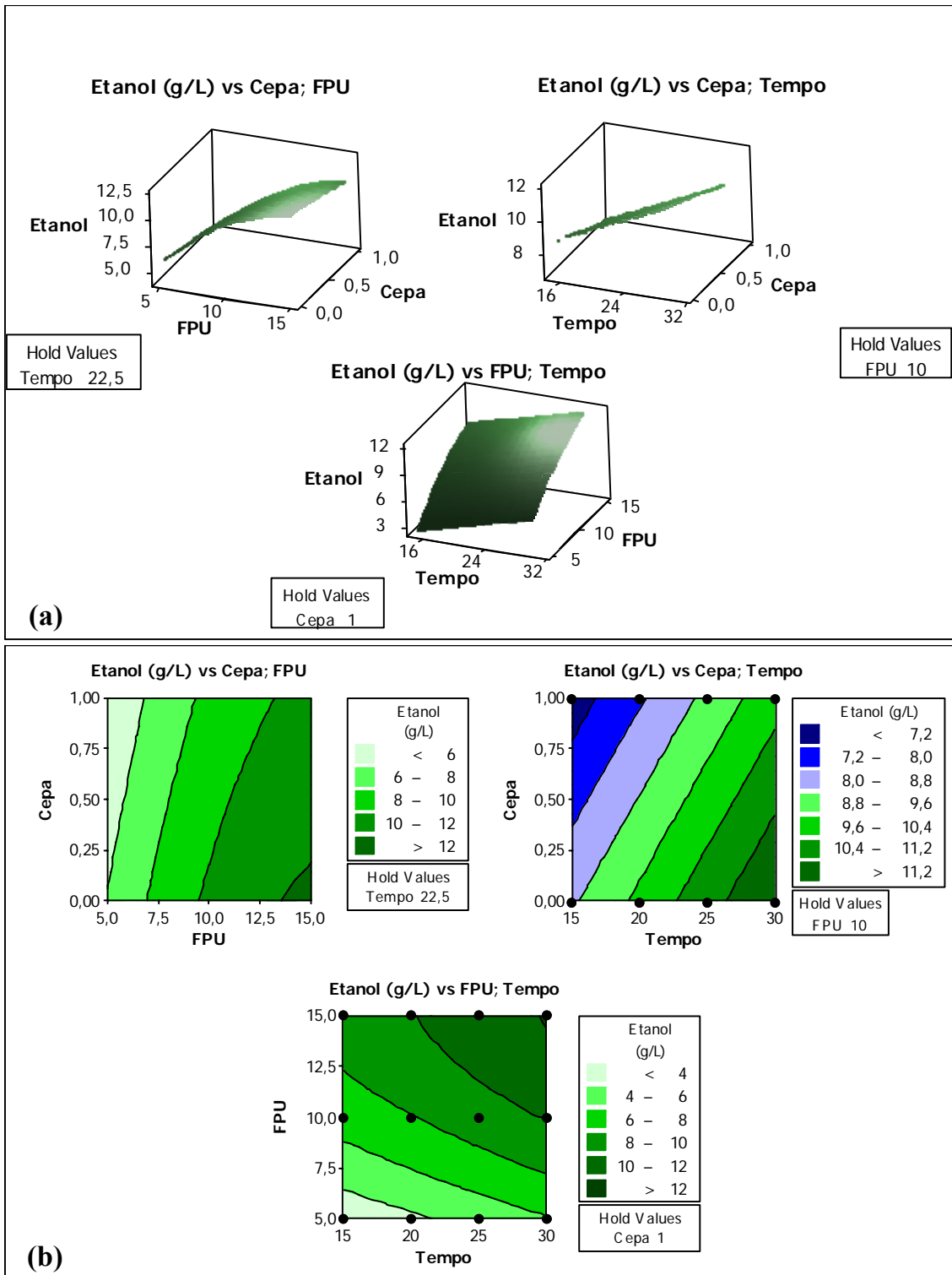


Figura 4.28 – Comparação da produção de etanol de 15 a 30 h de SSF com a cepa UFV-3 e clone *cbhA 4'*. Gráficos de superfície (a) e contorno (b) para a resposta ajustada concentração de etanol (g.L^{-1}) (Anexo 4, 5 e 6) quanto à cepa utilizada (UFV-3 = 0 e *cbhA 4'* = 1), tempo de fermentação (h) e quantidade de celulases adicionada (FPU) segundo modelo da Equação 2.

A tabela contendo os valores observados e estimados de concentração de etanol e os valores residuais para os dois modelos ajustados é apresentada em anexo (Anexos 1 a 6).

A qualidade de ajuste observada para os modelos (Equação 1 e 2) obtidos neste trabalho, revelada pelos altos valores de R^2 e pela alta significância de todos os termos dos modelos (Anexos 2, 3, 5 e 6), permite que este modelo seja utilizado para se estudar o comportamento da resposta concentração de etanol e estimar valores de concentração de etanol de acordo com a cepa, a concentração inicial de enzimas e o tempo de fermentação em SSF do bagaço nas condições experimentais avaliadas.

De acordo com os resultados obtidos para a fermentação do clone *cbhA* em glicose (Figura 4.26) esperava-se que este clone apresentasse menor produção de etanol em SSF que a cepa não transformada UFV-3, ou seja, seria observado um efeito significativo e negativo do fator cepa sobre a produção de etanol em SSF. De fato, de acordo com o modelo ajustado para a segunda fase da fermentação (Equação 2), a cepa 0 (UFV-3) é a cepa de escolha para se alcançar maior produção de etanol. Entretanto, quando se analisa a primeira fase de fermentação (Equação 1), nota-se que o efeito negativo da cepa é menor, em relação àquele observado na segunda fase. Verifica-se ainda que a existência de interação negativa significativa entre os fatores tempo e cepa ($T * C$) e FPU e cepa ($F * C$) faz com que as cepas se tornem iguais à medida que se diminui a concentração de enzimas (FPU) e o tempo de hidrólise. Celobiohidrolases atuam separando as cadeias individuais da celulose e hidrolisando celodextrinas de modo processivo (Nimlos et al., 2007), o que tem forte contribuição para a hidrólise da fibra por aumentar o acesso das outras celulases à mesma. Estas análises permitem sugerir que a atuação da celobiohidrolase recombinante produzida pelo clone *cbhA* 4' pode ter compensado a menor capacidade fermentativa deste clone durante a SSF, o que foi observado somente em baixas concentrações de enzima comercial e no início da fermentação quando não havia saturação da hidrólise da fibra. Estes resultados abrem perspectiva para a utilização das cepas *cbhA* 4' e UFV-3 em consórcio de leveduras para produção de etanol em Bioprocesso Consolidado, visando diminuir o aporte de enzimas e aumentar a viabilidade da produção de etanol celulósico.

Das equações 1 e 2 ajustadas observa-se o forte efeito positivo da concentração de enzimas comerciais sobre a produção de etanol. Porém, de acordo com o segundo modelo, o efeito quadrático do fator FPU revela que o aumento da concentração de enzimas de 10 para 15 FPU causa aumento muito menor na produção de etanol que

aquele observado entre 5 e 10 FPU de enzima. Em concordância com este resultado, os gráficos de superfície e contorno mostram que a mesma concentração de etanol pode ser obtida utilizando-se 10 ou 15 FPU de enzima durante 30 horas de SSF, exemplificando que o ajuste de modelos de superfície como este podem contribuir fortemente para o aumento da viabilidade destes processos, por permitir a combinação de níveis econômicos que resultam em alta eficiência dos mesmos. Segundo Krishnan et al. (2010) o alto custo das celulasas constitui a maior limitação para produção de etanol celulósico, sendo necessário 2,8 Kg de proteína para fermentar 100 Kg de bagaço pré-tratado à etanol. Neste contexto, a terceira parte deste trabalho buscou otimizar as condições de cultivo para a produção de celobiohidrolase recombinante por *K. marxianus* e aumentar o conhecimento para aplicação do clone *cbhA 4'* em Bioprocesso Consolidado.

4.3 – Otimização da produção de celobiohidrolase por *K. marxianus cbhA 4'*

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas usadas para desenvolver, melhorar e otimizar processos em que uma variável resposta é influenciada por vários fatores controláveis ao mesmo tempo (Myers e Montgomery, 1995). A MSR utiliza experimentos fatoriais sequenciais que objetivam: determinar, na etapa de seleção, quais os fatores controláveis são importantes para a otimização, isto é, fatores que têm influência significativa sobre a resposta de interesse e que contribuirão realmente para a otimização; determinar, na etapa de deslocamento, a região de interesse para a otimização para cada um destes fatores; realizar, na etapa de modelagem, o ajuste de modelos lineares de primeiro ou segundo grau que expliquem a relação entre estes fatores e a resposta de interesse; e validar o modelo obtido nas combinações ótimas pela comparação de resultados experimentais e da estimativa proveniente do modelo. Para montagem dos experimentos em cada fase do processo de otimização deve-se levar em consideração todo o conhecimento já estabelecido acerca do processo. No presente trabalho, foram consideradas as informações sobre fatores que influenciam a secreção de proteínas em leveduras e fungos filamentosos.

4.3.1 – Seleção de fatores importantes para a atividade extracelular de celobiohidrolase

Os fatores temperatura (°C), pH, concentração de peptona (%), de extrato de levedura (%), de Tween 80 (%) e de glicose foram investigados quanto à sua influência sobre as respostas crescimento celular (DO₆₀₀) e atividade extracelular de celobiohidrolase (atividade do sobrenadante sobre os substratos pNPG e pNPC) durante a fermentação do clone *cbhA 4'*. O experimento foi realizado segundo o delineamento Fatorial Fracionado de Resolução IV (1/4 de fração), sendo estudadas 17 diferentes combinações de níveis entre os fatores apresentadas na tabela 4.2 juntamente com os valores observados de atividade sobre pNPG e DO₆₀₀ associados a cada tratamento ensaiado. Foram ensaiadas quatro repetições da combinação central (ponto central) para fins de cálculo do erro puro e falta de ajuste.

Tabela 4.2 – Combinações de níveis, segundo Fatorial Fracionado Resolução IV, dos fatores peptona (%), temperatura (°C), extrato de levedura (%), pH, Tween 80 (%) e glicose (%) ensaiadas no experimento com os respectivos valores observados de atividade sobre pNPG (nmol/(mL*min)) e DO₆₀₀.

Peptona (%)	Temperatura (°C)	Extrato (%)	pH	Tween (%)	Glicose (%)	pNPG	DO ₆₀₀
0,5	28	0,25	3	0	1	0	15,68
4	28	0,25	3	0,5	1	0,527	18,04
0,5	37	0,25	3	0,5	4	0	20,12
4	37	0,25	3	0	4	0,048	18,32
0,5	28	2	3	0,5	4	1,677	28,2
4	28	2	3	0	4	0,144	29,48
0,5	37	2	3	0	1	0,910	15,8
4	37	2	3	0,5	1	0,335	13,12
0,5	28	0,25	5,5	0	4	38,565	15,8
4	28	0,25	5,5	0,5	4	0,719	30,8
0,5	37	0,25	5,5	0,5	1	29,462	9,32
4	37	0,25	5,5	0	1	2,156	13,04
0,5	28	2	5,5	0,5	1	0	28,56
4	28	2	5,5	0	1	0	28,64
0,5	37	2	5,5	0	4	50,062	23,72
4	37	2	5,5	0,5	4	0,240	22,08
2,25	32,5	1,125	4,5	0,25	2,5	0,048	23,32
2,25	32,5	1,125	4,5	0,25	2,5	0,240	23,52
2,25	32,5	1,125	4,5	0,25	2,5	*	
2,25	32,5	1,125	4,5	0,25	2,5	0,719	22,36

A análise dos dados revelou que o experimento sofreu pequena variação de fatores aleatórios, sendo os fatores estudados altamente significativos em causar variação nas respostas. Diante disto, Gráficos de Pareto, de priorização de efeitos, foram utilizados para seleção de fatores com menor influência sobre as respostas estudadas. Os Gráficos de Pareto para a primeira e para a última análise de seleção de fatores segundo efeito sobre a atividade em pNPG são mostrados na Figura 4.29. As tabelas 4.3 e 4.4 apresentam os efeitos principais e de interações estimados para a influência destes fatores sobre as respostas atividade sobre pNPG e DO₆₀₀, respectivamente, após a seleção utilizando os gráficos de Pareto. A atividade sobre pNPC também foi investigada, sendo observada atividade (3,30 nmol/(mL*min)) somente para o tratamento 15, marcada em negrito na tabela 4.2.

Os altos valores de R² associados à estimativa dos efeitos mostram a alta significância dos fatores sobre as respostas estudadas. Verifica-se, da comparação dos efeitos estimados sobre as respostas atividade e DO₆₀₀, que os fatores estudados exercem influência diferente sobre a secreção da proteína de interesse e sobre o crescimento da cepa *cbhA 4*'. Para os fatores peptona, temperatura e Tween 80 esta diferença é bastante pronunciada, uma vez que eles exercem efeitos contrários sobre as duas respostas. O fator extrato de levedura exerce efeito sobre o crescimento, mas não sobre a atividade, ao passo que o pH exerce forte efeito na atividade e efeito muito fraco sobre o crescimento. Observa-se ainda a existência de várias interações duplas e triplas significativas para as duas respostas. Sistemas de fermentação são processos complexos, contendo múltiplos componentes e múltiplas fases. Crescimento e produção são afetados por um amplo espectro de parâmetros, incluindo a composição do meio de fermentação, inóculo, pH, temperatura, agitação, dentre outros (Wang et al., 2005). Estes resultados revelam a complexidade do sistema estudado e sugerem que várias respostas, como crescimento, secreção de proteínas e estabilidade da proteína de interesse, contribuem para o resultado final de atividade extracelular de celobiohidrolase.

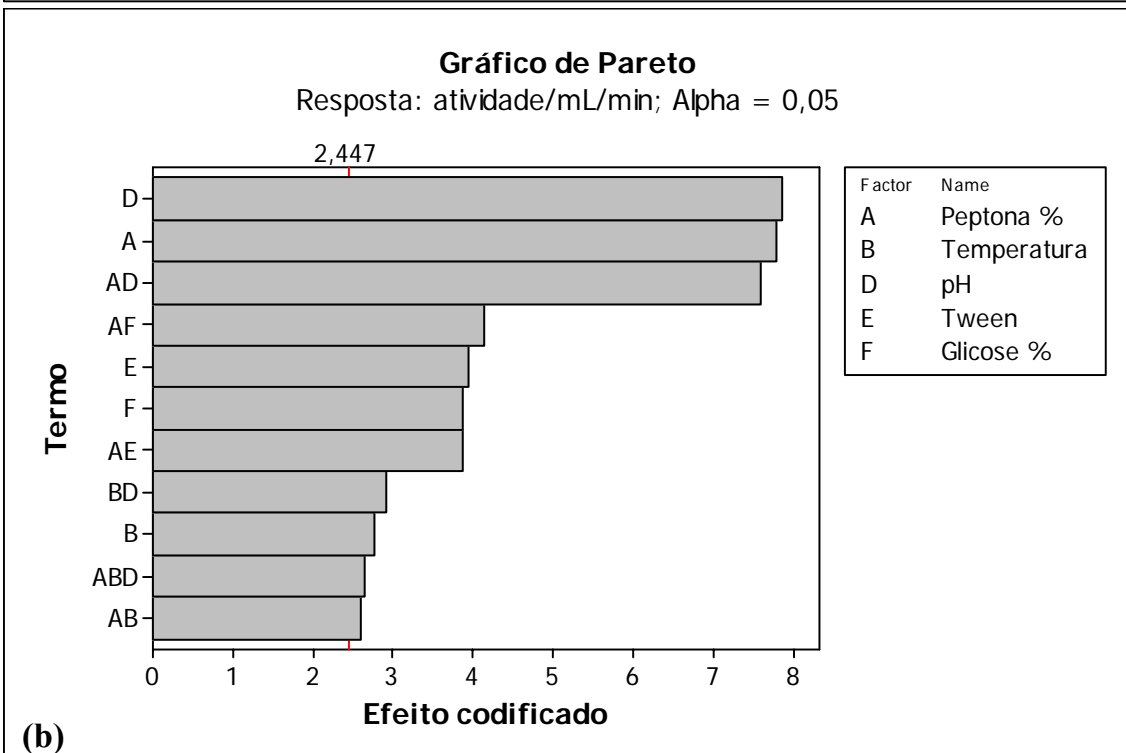
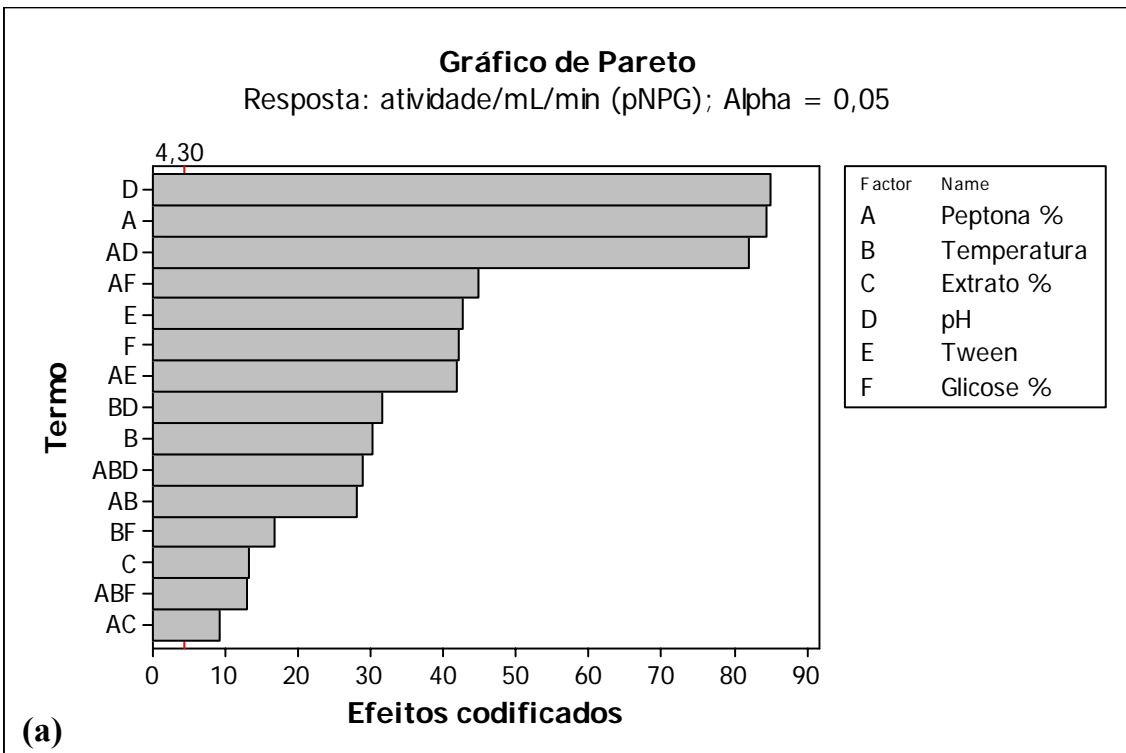


Figura 4.29 – Seleção de fatores com maior efeito sobre a resposta atividade extracelular de celobiohidrolase. Gráficos de Pareto para a primeira (a) e para a última (b) análises de efeitos dos fatores sobre a resposta atividade em pNPG (nmol/(mL*min)), utilizando $\alpha = 0,05$ para comparação dos efeitos.

Tabela 4.3 – Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a atividade em pNPG e respectivos valores calculados do teste t (T) e p-valores (p).

Termo	Efeito	Coefficiente	T	P
Constante		7,803	8,32	0,000
Peptona	-14,564	-7,282	-7,77	0,000
Temperatura	5,198	2,599	2,77	0,032
pH	14,695	7,348	7,84	0,000
Tween	-7,366	-3,683	-3,93	0,008
Glicose	7,258	3,629	3,87	0,008
Peptona *Temperatura	-4,851	-2,425	-2,59	0,041
Peptona *pH	-14,180	-7,090	-7,56	0,000
Peptona *Tween	7,234	3,617	3,86	0,008
Peptona *Glicose	-7,725	-3,862	-4,12	0,006
Temperatura*pH	5,461	2,731	2,91	0,027
Peptona *Temperatura*pH	-4,970	-2,485	-2,65	0,038
Curvatura	-7,467	2,3588	0,019	

$$R^2 = 97,91\%$$

Tabela 4.4 – Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a DO₆₀₀ e respectivos valores calculados do teste t (T) e p-valores (p).

Termo	Efeito	Coefficiente	T	p
Constante		20,670	95,31	0,000
Peptona	2,040	1,020	4,70	0,018
Temperatura	-7,460	-3,730	-17,20	0,000
Extrato	6,060	3,030	13,97	0,001
pH	1,650	0,825	3,80	0,032
Tween	1,220	0,610	2,81	0,067
Glicose	5,790	2,895	13,35	0,001
Peptona *Temperatura	-2,640	-1,320	-6,09	0,009
Peptona *Extrato	-2,780	-1,390	-6,41	0,008
Peptona *pH	2,250	1,125	5,19	0,014
Peptona *Tween	-2,580	-1,290	-5,95	0,010
Peptona *Glicose	1,170	0,585	2,70	0,074
Temperatura*pH	-1,450	-0,725	-3,34	0,044
Temperatura*Glicose	2,450	1,225	5,65	0,011
Peptona %*Temperatura*Glicose	-2,290	-1,145	-5,28	0,013
Ct Pt		2,397	4,39	0,022

$$R^2 = 99,69\%$$

De acordo com a tabela 4.3 e com a figura 4.29, o pH foi o fator com maior efeito sobre a atividade, sendo seguido de perto pela concentração de peptona. Trabalhos recentes têm mostrado o efeito do meio YP, combinação de peptona e extrato de levedura, sobre a atividade extracelular de β -glicosidases em leveduras (Barbosa et al., 2010; Lopes, 2011), porém, poucos trabalhos investigam o efeito de peptona e extrato de levedura sobre a secreção de proteínas de modo independente. De acordo com os resultados deste e dos próximos experimentos (itens 4.3.2 e 4.3.3), a peptona tem efeito negativo sobre a secreção da proteína de interesse. Nossa sugestão é que a diminuição da atividade extracelular, dada pelo aumento da concentração de peptona, pode ser um efeito indireto do aumento da secreção de proteases. Segundo Wang et al. (2005), a formulação de meios quanto aos níveis das fontes de carbono e nitrogênio, buscando regular a secreção de proteases, é de suma importância para a produção de proteínas heterólogas. Outro fator importante para o controle de secreção de proteases é o pH do meio de cultivo. Leveduras crescem bem em valores de pH próximos de 5, porém observa-se uma diminuição da viabilidade celular em valores próximos a 3, resultando em baixa produtividade e rendimento, com significativo aumento da fração de biomassa não produtiva (Mattanovich et al., 2004). Este efeito pode contribuir para o aumento da concentração de proteases no sobrenadante resultante da lise celular.

A Figura 4.30 mostra os gráficos de efeitos, principais e de interação, para as médias de atividade ajustadas.

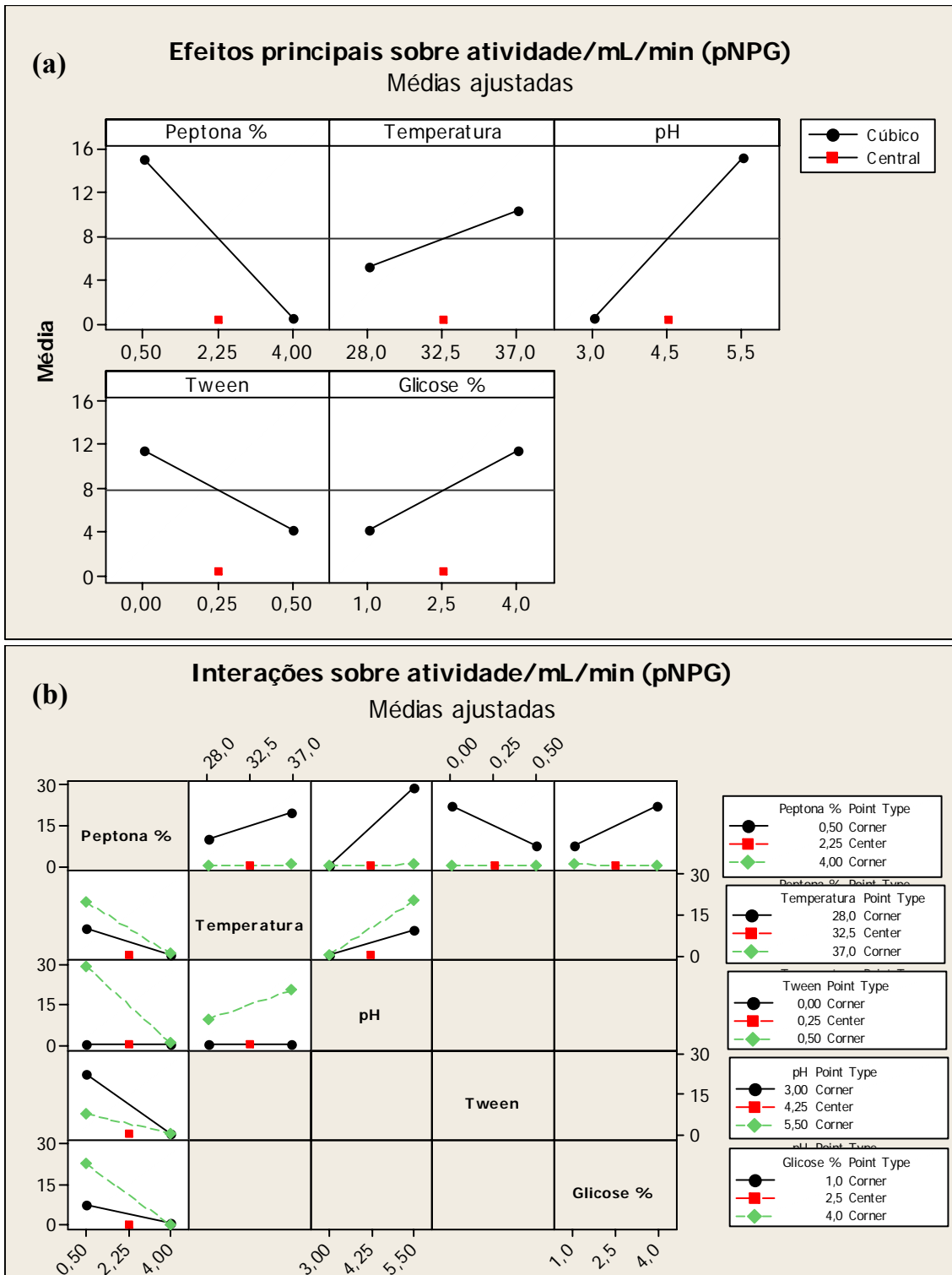


Figura 4.30 – Efeitos dos fatores estudados sobre a atividade extracelular de celobiohidrolase. Gráficos de efeitos principais (a) e de interação (b) dos fatores sobre a resposta atividade em pNPG (nmol/(mL*min)). As médias mostradas foram ajustadas de acordo com os efeitos apresentados na tabela 4.3.

A análise dos gráficos na Figura 4.30 permitiu estabelecer a direção do deslocamento dos níveis de cada fator para seleção da região de modelagem para otimização.

4.3.2 – Deslocamento: seleção das faixas de cada fator para modelagem

Objetivando-se selecionar as faixas dos fatores onde pudessem ser ajustados modelos lineares que explicassem a secreção da proteína de interesse, foram realizados cinco passos de deslocamento dos níveis de cada fator. As combinações de níveis ensaiadas e os respectivos valores observados para as respostas atividade, concentração de proteínas no sobrenadante e crescimento obtidas de 48 h de cultivo do clone *cbhA 4'* são apresentados na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Combinações de níveis dos fatores peptona (%), temperatura (°C), pH, Tween 80 (%) e glicose (%), ensaiadas no experimento de deslocamento, com os respectivos valores observados de atividade sobre os substratos pNPG e pNPC (nmol/(mL*min)), concentração de proteínas (Ptn) (mg/mL) e DO₆₀₀.

Trat (D)	Rept	Pept	Temp	pH	Tween	Gli	pNPG	pNPC	Ptn	DO
1	1	2,25	32,5	4,5	0,25	2,5	0	0	0,192	20,88
1	2	2,25	32,5	4,5	0,25	2,5	0,79	0	0,176	21,24
2	1	1,75	35	5	0,2	3,5	1,08	0	0,181	24,72
2	2	1,75	35	5	0,2	3,5	0,89	0	0,174	25
3	1	1,25	37	5,5	0,15	4,5	10,08	0	0,229	23,6
3	2	1,25	37	5,5	0,15	4,5	11,95	0	0,234	23,52
4	1	0,75	39	6	0,1	5,5	11,33	0,024	0,267	14,76
4	2	0,75	39	6	0,1	5,5	18,13	0,359	0,328	15,52
5	1	0,25	39	6,5	0	6	35,04	1,844	0,440	12,08
5	2	0,25	39	6,5	0	6	38,01	1,844	0,451	12,64

A Figura 4.31 mostra o comportamento das respostas avaliadas diante dos diferentes tratamentos (deslocamentos) realizados. As respostas são apresentadas em função de tratamento porque o número de combinações ensaiadas não permite o desmembramento dos efeitos de cada fator.

Os resultados do ensaio de deslocamento mostram que as respostas comportamento diferente umas das outras quanto à mudança dos níveis dos fatores estudados. Observa-se que as combinações de níveis ensaiadas favorecem a secreção de proteínas e a atividade em pNPG e pNPC ao mesmo tempo. No entanto, o crescimento da cepa é desfavorecido nestas condições, observando-se um ponto de máximo crescimento em torno do segundo deslocamento e contínuo decréscimo no mesmo a partir daí. Resultados semelhantes foram encontrados por Lertwattanasakul et al.

(2011), que demonstraram redução de 30% do crescimento de *K. marxianus* DMKU 3-1042 quando cultivada à 45 °C em relação ao cultivo a 30°C. Entretanto, nota-se que o clone foi capaz de crescer a 39 °C, mesmo que em menor velocidade, apresentando um aumento de 60 vezes na DO₆₀₀ em 48 h de cultivo, o que condiz com a manutenção da termotolerância para esta cepa.

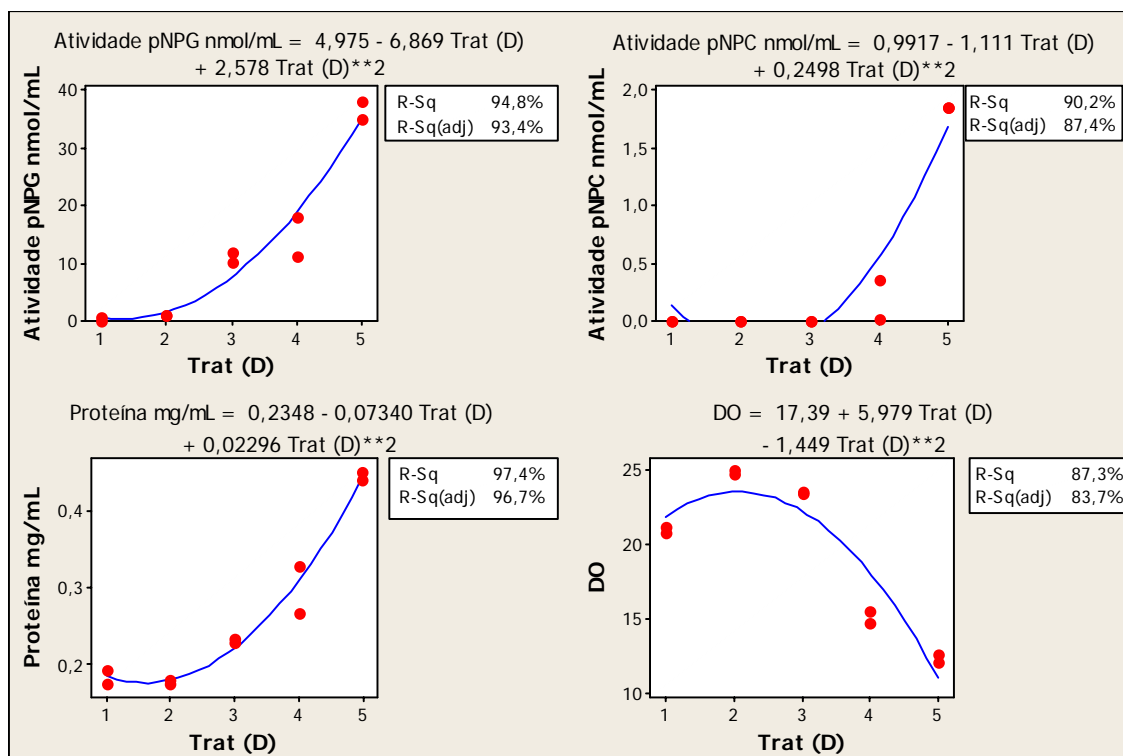


Figura 4.31 – Perfil de resposta da secreção geral, secreção da proteína de interesse e crescimento do clone *cbhA 4'* quanto ao deslocamento de fatores. Ajuste de modelos quadráticos para as respostas atividade em pNPG e pNPC (nmol/(mL*min)), concentração de proteínas (mg/mL) no sobrenadante e crescimento (DO₆₀₀) do clone *cbhA 4'* quanto aos tratamentos (D) apresentados na tabela 4.5.

Verifica-se que o aumento da atividade extracelular está estritamente associado ao aumento da secreção de proteínas e estas variáveis apresentam correlação linear positiva e significativa ($R = 0,989$ e $0,935$ para pNPG e pNPC, respectivamente), o que pode ser também observado nos gráficos da Figura 4.31. Ao mesmo tempo, as variáveis atividade em pNPG e pNPC e a concentração de proteínas apresentam correlação linear negativa e significativa ($R = -0,827$, $-0,779$ e $-0,886$, respectivamente) com o crescimento. Este mesmo comportamento foi observado nos experimentos seguintes de modelagem e otimização (item 4.3.3). Estes resultados mostram que o deslocamento foi conduzido no sentido de favorecer a secreção de proteínas e não somente o crescimento

celular. Os resultados permitem sugerir que o fator limitante, e passível de otimização, na produção da enzima de interesse é a secreção da proteína e não a sua expressão.

As faixas de níveis a serem investigadas para cada fator na etapa seguinte de modelagem foram estipuladas com base nos valores observados das respostas atividade e concentração de proteínas no sobrenadante durante o deslocamento. O fator concentração de Tween 80 foi retirado dos experimentos de modelagem, uma vez que apresentou efeito negativo sobre a atividade extracelular no experimento fatorial e de deslocamento e não havia condições experimentais de abaixar mais seus níveis.

4.3.3 – Modelagem de superfícies para otimização da produção de celobiohidrolase recombinante

Utilizando os resultados obtidos das fases de seleção de fatores e seleção de níveis, foi planejado e executado um Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR), com porção cúbica como um fatorial fracionado de resolução IV (1/2 fração) para se estudar a influência dos fatores pH, temperatura, concentração de peptona e de glicose sobre a atividade extracelular de celobiohidrolase do clone *cbhA 4'*. As combinações de níveis ensaiadas e os respectivos valores de atividade, em pNPG e pNPC, concentração de proteínas no sobrenadante e crescimento obtidas de 48 h de cultivo do clone *cbhA 4'* são apresentados na tabela 4.6.

A análise do erro experimental, realizada de modo a testar as pressuposições da análise de variância (ANOVA), confirmou que as unidades experimentais foram corretamente distribuídas, não havendo favorecimento ou prejuízo de tratamentos de acordo com a ordem de execução do experimento. A análise de variância (ANOVA) da regressão e teste t para os coeficientes da regressão permitiram ajustar as equações apresentadas na tabela 4.7.

Tabela 4.6 – Combinações de níveis dos fatores peptona (%), temperatura (°C), pH e glicose (%), ensaiadas no DCCR, com os respectivos valores observados de atividade sobre os substratos pNPG e pNPC (nmol/(mL*min)), concentração de proteínas (mg/mL) e DO₆₀₀.

Trat	Peptona	pH	Glicose	Temperatura	pNPG	pNPC	Proteína	DO ₆₀₀
1	0,2	6	5,5	37	36,2	0,252	0,432	12,88
2	0,6	6	5,5	41	25,9	0,165	0,301	7,86
3	0,2	7	5,5	41	32,2	0,453	0,366	8,2
4	0,6	7	5,5	37	44,7	0,755	0,736	11,64
5	0,2	6	8,5	41	38,8	0,381	0,343	7,34
6	0,6	6	8,5	37	2,6	0	0,083	12,96
7	0,2	7	8,5	37	20,6	0	0,148	13,5
8	0,6	7	8,5	41	60,0	0	0,470	9,22
9	0	6,5	7	39	2,9	0	0,080	11,54
10	0,8	6,5	7	39	3,7	0	0,080	11,98
11	0,4	5	7	39	2,2	0	0,051	10,3
12	0,4	8	7	39	43,5	0,366	0,246	13,18
13	0,4	6,5	4	39	50,5	0,970	0,920	9,7
14	0,4	6,5	10	39	6,3	0	0,147	12,16
15	0,4	6,5	7	35	7,2	0,022	0,105	14,5
16	0,4	6,5	7	43	24,6	0,022	0,221	4,12
17	0,4	6,5	7	39	4,3	0,036	0,109	11,6
18	0,4	6,5	7	39	4,3	0	0,094	11,28
19	0,4	6,5	7	39	4,2	0,022	0,094	11,4

Tabela 4.7 – Modelos ajustados, com unidades naturais, para a atividade (nmol/(mL*min)) sobre pNPG e pNPC, para a concentração de proteína (mg/mL) e para o crescimento (DO₆₀₀) do clone *cbhA 4*'e os respectivos valores de R².

Variável (Y)	Equação	R ² (%)
pNPG	$y = 285,17 - 796,5^* P - 35,443 \text{ pH} - 37,03^* G + 2,74 T + 2,33^* G^2 + 122,9^* P * \text{pH}$	64,5
pNPC	$y = 1,86 + 9,71^* P - 1,15^* \text{pH} - 0,78^* G + 0,14^* T + 0,67 \text{pH}^2 + 0,054^* G^2 + 0,96^* P * \text{pH} - 0,25^* P * G - 0,37^* P * T$	94,6
Proteína	$y = 5,77 - 8,7^* P - 0,45^* \text{pH} - 0,78^* G + 0,009 T + 0,05^* G^2 + 1,35^* P * \text{pH}$	85,0
DO ₆₀₀	$y = -145,104 - 40,26 P + 0,78^* \text{pH} + 0,30^* G + 9,28^* T - 0,14^* T^2 + 1,04 P * T$	96,1

* Indica os termos significativos da equação (p-valor < 0,05). P: peptona (%); pH:pH; G: glicose (%); T: temperatura (°C).

As Figuras 4.32 e 4.33 mostram os principais gráficos de superfície gerados a partir das equações ajustadas para atividade em pNPG e pNPC e concentração de proteínas e DO₆₀₀, respectivamente.

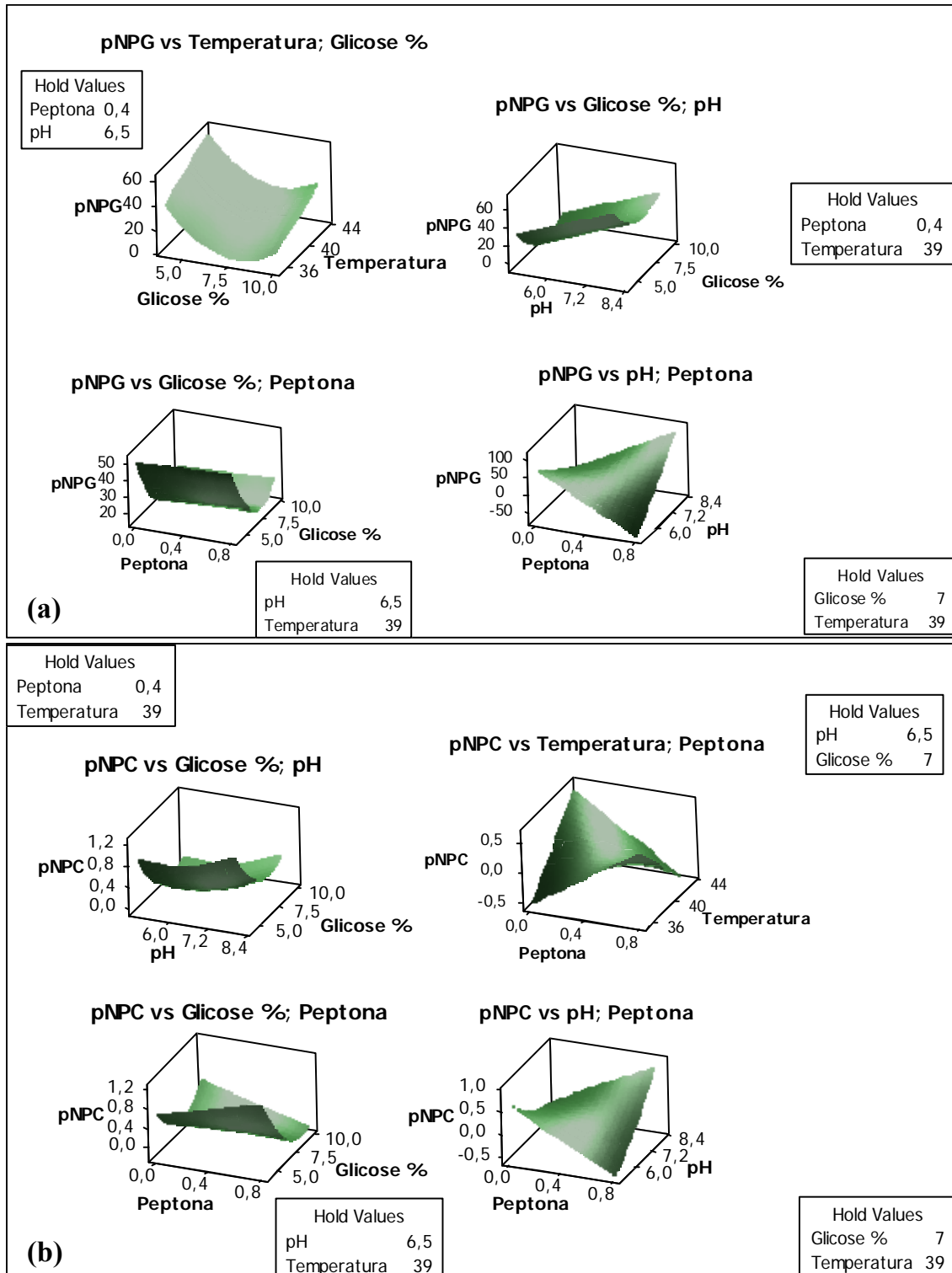


Figura 4.32 – Superfícies de resposta ajustadas para a atividade extracelular do clone *cbhA 4*⁷. Gráficos de Superfícies ajustados para as respostas atividade em pNPG (a) e pNPC (b) (nmol/(mL*min)) quanto aos fatores pH, temperatura (°C), concentração de peptona (%) e concentração de glicose (%).

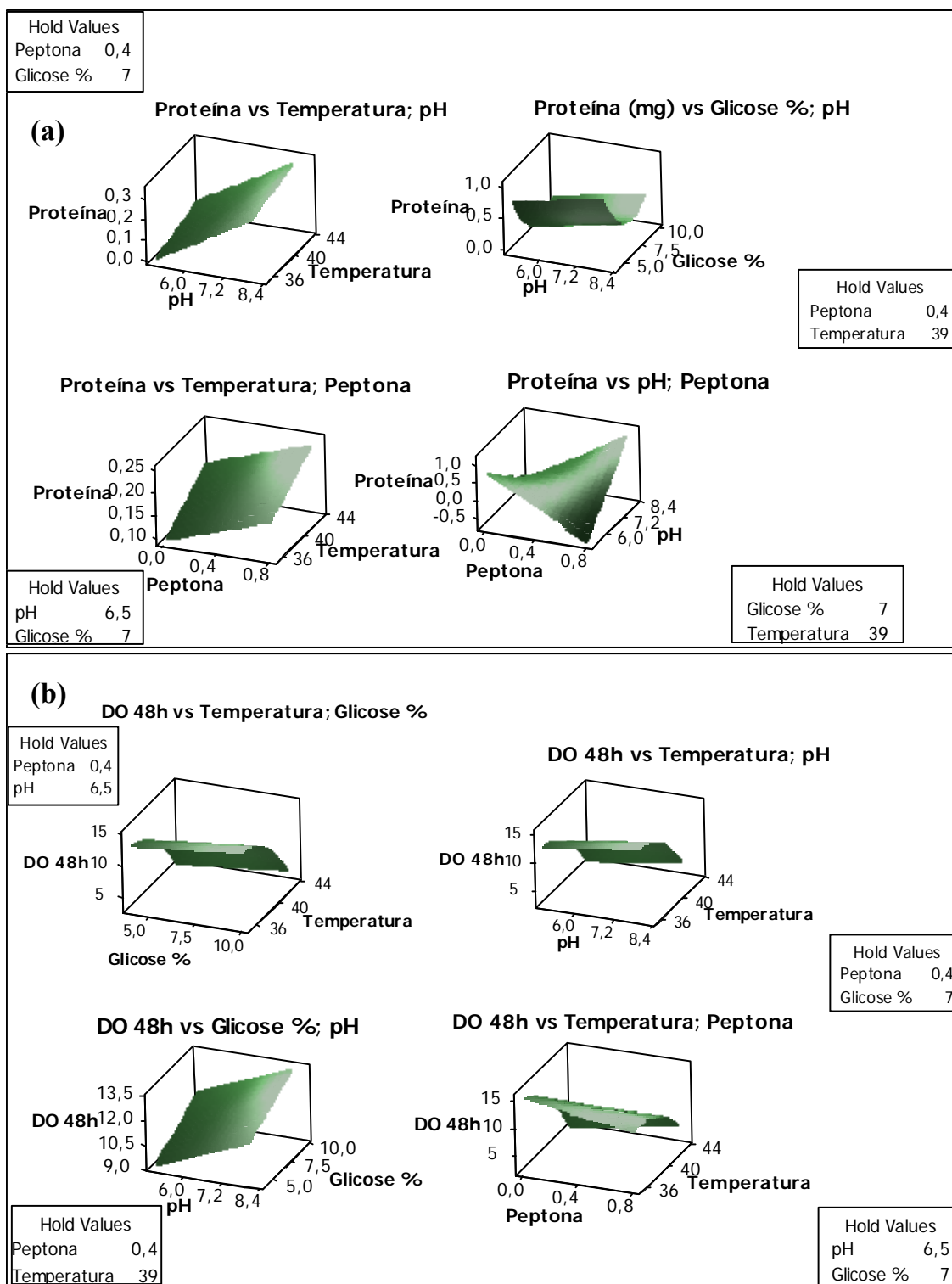


Figura 4.33 – Superfícies de resposta ajustadas para a secreção de proteínas e crescimento do clone *cbhA 4'*. Gráficos de Superfícies ajustados para as respostas concentração de proteínas (mg/mL) (a) e crescimento (DO_{600}) (b) quanto aos fatores pH, temperatura ($^{\circ}C$), concentração de peptona (%) e concentração de glicose (%).

Os valores de R^2 associados às equações ajustadas (tabela 4.7) mostram que os modelos obtidos para as respostas atividade sobre pNPC, secreção de proteínas e

crescimento celular podem ser utilizados para estudo e predição destas variáveis em função dos fatores do modelo dentro das faixas estudadas. O modelo obtido para a atividade sobre pNPG permite estudar a influência dos fatores sobre esta resposta, mas possui baixo poder de predição, como revelado pelo valor de R^2 desta equação.

Observa-se das equações ajustadas e dos gráficos de superfície mostrados (Figuras 4.32 e 4.33) que a existência de interações duplas entre os fatores torna a indicação de níveis para os mesmos complicada, uma vez que a escolha do nível para um fator depende do nível escolhido para outro. Este comportamento é mais proeminente para a atividade sobre pNPC, onde o fator peptona interage significativamente com todos os demais fatores. De certa forma, a existência de interações pode constituir vantagem, pois quando diversas combinações de fatores podem ser utilizadas para se obter a mesma resposta, níveis mais econômicos de fatores que elevam o custo do processo podem ser indicados. Por exemplo, tanto no que diz respeito à atividade enzimática quanto ao crescimento e secreção de proteínas, as análises provenientes da otimização mostram que a quantidade de peptona no meio de cultivo pode ser drasticamente diminuída, levando a formulação de meios mais econômicos de crescimento e produção de proteínas. Em especial para o crescimento celular níveis de peptona em torno de 0,4% podem ser adotados.

Mesmo com a alta qualidade de ajuste derivada destes experimentos, pode-se notar que a atividade enzimática, tanto para pNPG quanto para pNPC, não foi superior àquela observada para o sobrenadante de 48 h de cultura durante a seleção de clones recombinantes para o gene *cbhA* (item 4.1). No entanto, quando se compara os valores de atividade obtidos nos ensaios de otimização, em 24 h de cultivo, com aqueles obtidos para o sobrenadante de 24 h nas condições padrão, foram observados valores até 16 vezes maiores de atividade enzimática (sobre pNPG e pNPC) (Anexo 7). Porém, os resultados obtidos em 24 h do DCCR não foram passíveis de ajuste. Uma possível explicação para este fato é a formação de filamentos observada em 24 h de cultivo, a qual será discutida no item 4.3.4. Estes resultados mostram que a secreção da proteína recombinante ainda não está otimizada, mas os modelos aqui obtidos podem ser de grande valia para o entendimento da secreção de proteínas por *K. marxianus* recombinantes e para o direcionamento de estratégias de otimização.

A análise de correlação linear entre as variáveis mostra que as atividades sobre pNPG e pNPC possuem correlação positiva e significativa ($R = 0,678$), porém com valor inferior ao esperado se a mesma proteína fosse responsável pelas duas hidrólises.

Este resultado sugere que a atividade observada sobre o substrato pNPG pode ser resultado da ação combinada de β -glicosidases endógenas e da CBHa recombinante, ao passo que a atividade sobre pNPC deve advir da ação prioritária da CBHa recombinante. Neste contexto, a secreção da enzima recombinante, aparentemente muito inferior a secreção de proteínas endógenas, deve ser melhorada para viabilizar a utilização do clone *cbhA 4'* em Bioprocesso Consolidado. A correlação positiva e significativa entre a atividade (pNPG e pNPC) e a concentração de proteínas do sobrenadante ($R = 0,8$), e não observância de correlação significativa entre DO e estas variáveis, mostra que as condições ensaiadas estão favorecendo a secreção de proteínas e não somente o crescimento. Porém, este valor de correlação ($R = 0,8$) ainda abre discussão para a possibilidade de o aumento na secreção de proteases estar relacionado com o aumento menos expressivo na atividade do que na secreção de proteínas. A comparação dos valores de atividade e concentração de proteínas em 24 e 48 h de cultivo corrobora para este fato. Ao que parece, existe uma mistura de respostas nas condições observadas: a maior secreção de proteínas em geral resulta na maior secreção da proteína de interesse e na maior secreção de proteases, o que aumenta a atividade no sobrenadante, mas diminui a estabilidade da enzima.

O ajuste da superfície de resposta para a concentração de proteínas no sobrenadante mostra que a temperatura não está exercendo efeito significativo na secreção de proteínas. Isto pode ser um indício de que o aumento significativo da quantidade de proteínas no meio não está relacionado com lise celular. Estes resultados são contrários àqueles observados por Lertwattanasakul et al. (2011), ao quais observaram que a temperatura teve grande influência sobre a secreção de inulinase e *K. marxianus* DMKU 3-1042. Esta divergência de resultados pode ser consequência da grande diversidade encontrada nas cepas de *K. marxianus* (Lane et al., 2011) e do comportamento diferencial de cepas selvagens e transformadas desta levedura, demonstrado no presente trabalho (item 4.2.2), quanto à secreção de proteínas.

As superfícies ajustadas para o crescimento (DO_{600}) mostram que os fatores influenciam o crescimento de forma bem diferente ao que influenciam a atividade, reafirmando que as condições aqui mostradas maximizam a secreção de proteínas. É esperado para células recombinantes, onde a expressão do gene heterólogo está sobre controle de um promotor constitutivo, que os níveis de proteína recombinante produzidos sejam diretamente proporcionais ao crescimento do microorganismo. A não observância desta relação para o clone *cbhA 4'* sugere que o fator limitante para

produção desta proteína recombinante no sobrenadante de cultura seja a secreção da proteína e a sua estabilidade no meio extracelular. Estes resultados direcionam as tentativas de melhoramento do presente sistema de expressão no sentido de buscar condições de cultivo que maximizem a secreção de proteínas e minimizem a produção de proteases. No último caso, engenharia genética pode ser aplicada na obtenção de cepas deletérias para as principais proteases secretadas por *K. marxianus*, estratégia que tem sido utilizada com sucesso em sistemas bacterianos de expressão heteróloga. Para tanto, a análise das proteínas secretadas por *K. marxianus*, como aquela realizada no presente trabalho (item 4.2.2), em diferentes condições de cultivo seria de grande valia.

4.3.4 – Relação entre crescimento micelial e a secreção de proteínas em *K. marxianus cbhA 4'*

Durante os experimentos de otimização, observou-se a formação de estruturas macroscópicas não convencionais no meio de cultura de *K. marxianus cbhA 4'*. A análise destas culturas em lupa (Figura 4.34) e microscópio (Figura 4.35) revelou que elas eram formadas de micélios, recobertos por leveduras, e/ou conjuntos de micélios (estes últimos formavam grandes grumos de células). A Figura 4.34a mostra as estruturas observadas em meio de cultura e as imagens de pequenos micélios visualizados em lupa (Figura 4.34). O crescimento micelial pôde ser observado inicialmente, com 24 h de cultura, em tratamentos (tabela 4.6) com alta atividade e concentração de proteínas no sobrenadante. Em 48 horas de cultura todos os tratamentos mostraram crescimento micelial, em maior ou menor extensão, sendo observados grandes grumos de micélios em todos eles à exceção dos tratamentos 2, 5, 13, 15 e 16.

Alguns trabalhos têm tentado relacionar condições de cultivo com o dimorfismo observado em *K. marxianus* (Walker et al., 1990; O'Shea et al., 2000). O'Shea et al. (2000) mostraram que *K. marxianus* NRRLy2415 possui crescimento leveduriforme em condições ideais de cultivo, em excesso de substrato e oxigênio, e muda, gradativamente, para crescimento micelial em condições limitantes de crescimento.

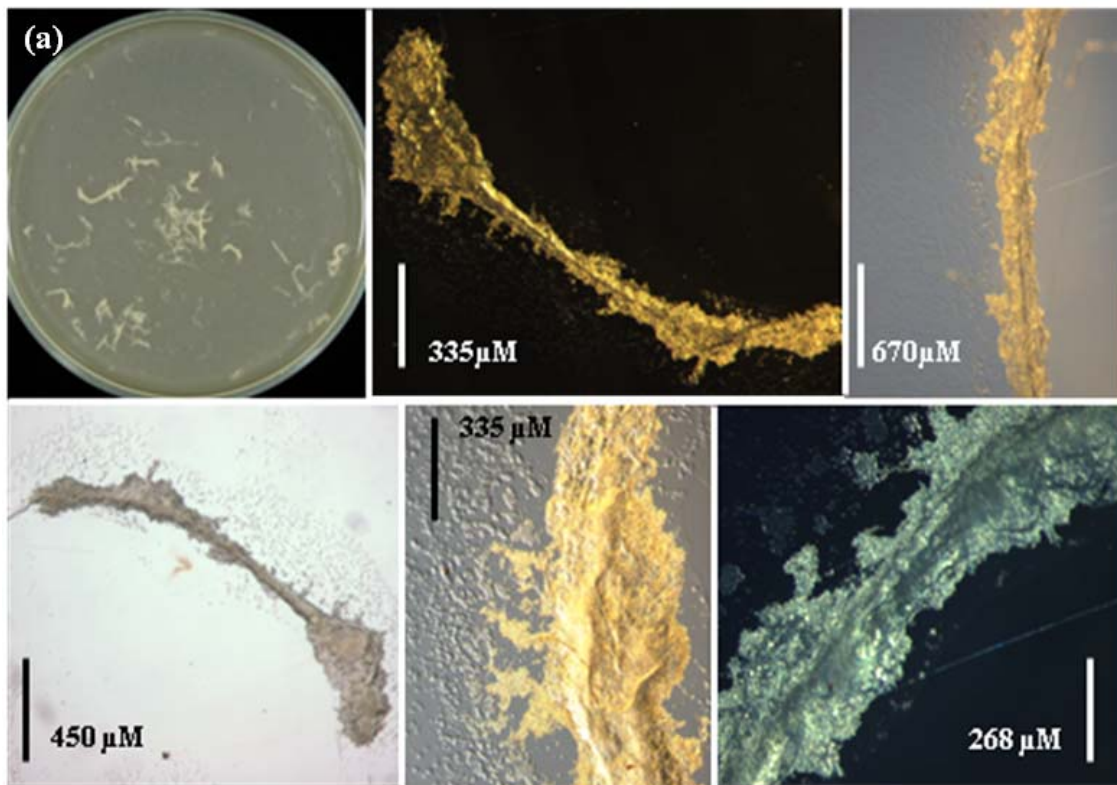


Figura 4.34 – Análise de micélios do clone *cbhA 4'* em lupa. Imagens da cultura líquida vertida em placa de Petri para visualização de micélios (a) e micrografias em lupa de micélios observados. Os tamanhos das estruturas observadas são indicados por barras em cada imagem. Os grupos de células, formados por conjuntos de micélios e leveduras, são visualizados como as maiores estruturas em (a), e filamentos menores (pequenos micélios em (a)) foram visualizados em lupa nas demais imagens.

O dimorfismo em fungos é definido como o processo pelo qual as células passam da forma micelial, habitual de crescimento, para a forma leveduriforme unicelular de acordo com as condições de cultivo. Estes fungos são chamados de *yeast-like*. O contrário ocorre com leveduras dimórficas, como *K. marxianus*, onde a forma habitual de crescimento é a leveduriforme podendo mudar para a forma micelial de acordo com as condições de cultivo (O' Shea et al., 2000). Durante as mudanças de crescimento leveduriforme para micelial, ou vice-versa, vários intermediários morfológicos são encontrados, sendo a palavra diforfismo insuficiente para representar este fenômeno (O' Shea et al., 2000). A Figura 4.35 mostra a diversidade de formas encontradas no mesmo meio de cultura de *K. marxianus cbhA 4'*. Estas mesmas formas puderam ser observadas na cepa selvagem UFV-3 (dados não apresentados).

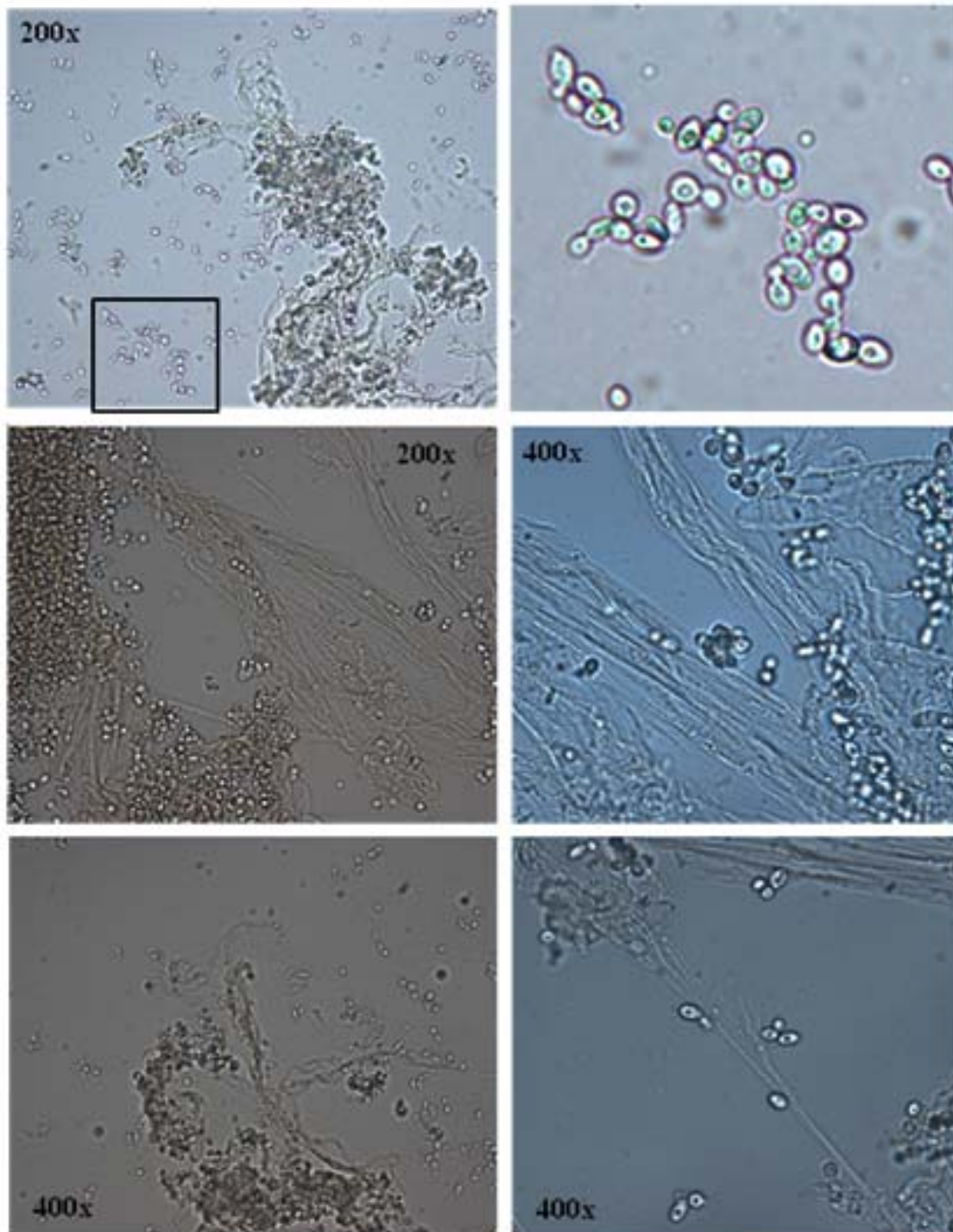


Figura 4.35 – Micrografias da cultura de *K. marxianus cbhA 4'* com crescimento micelial. Micrografias da cultura crescida 48 h sob condições definidas no tratamento 8 (tabela 4.6), em aumento de 200 ou 400 vezes indicados em cada imagem. O segundo quadro mostra em aumento a porção em destaque no quadro 1, evidenciando a existência de diferentes estágios morfológicos entre as formas de hifa e levedura em uma mesma cultura.

A performance da fermentação em fungos é fortemente afetada pela morfologia, sendo o controle e entendimento da morfologia celular em biorreator de suma

importância para o melhoramento deste processo (O'Shea et al., 2000; Wang et al., 2005). A dificuldade de ajuste de superfícies de resposta para a atividade e secreção de proteínas, observada em 24 h de cultivo durante a execução do DCCR, pode estar a mudanças morfológicas da cepa *cbhA 4'*. Comparados àqueles de micro-organismos unicelulares, os processos de fermentação com fungos filamentosos apresentam diferenças fundamentais na otimização e escalonamento, principalmente pela variação na morfologia destes organismos (Wang et al., 2005). Esta variação morfológica, e a variedade de fatores a ela relacionados, que influenciam a secreção e estabilidade dos produtos, pode dificultar muito a obtenção de modelos de otimização precisos, como tem sido observado em alguns trabalhos (Gonçalves et al., 2012). Embora muitos modelos tenham sido propostos para estudar a morfologia em fungos, poucos simultaneamente estudam a influência da morfologia na formação de produtos (Wang et al., 2005). De fato, a relação entre a morfologia e formação de produto é difícil de estudar frente aos muitos fatores que afetam ambas as respostas. Em leveduras, vários trabalhos têm estudado as causas associadas ao comportamento dimórfico, muitas vezes associado à patogenicidade do gênero *Candida* (Verstrepen & Klis, 2006), mas até o nosso conhecimento nenhum destes trabalhos discute a relação do dimorfismo com a secreção de proteínas em leveduras de interesse biotecnológico.

O'Shea et al. (2000) mostraram que sob condições de limitação de oxigênio, *K. marxianus* NRRLy2415 apresentou morfologia heterogênea, sendo observado, ao mesmo tempo, um aumento na produção de etanol. Cruz et al. (2000) observaram que o crescimento leveduriforme de *Debaromyces hansenii* estava associado a alta produção de xiltol, a partir de hidrolisados de farelo de cevada, ao passo que a produção de etanol foi aumentada quando crescimento na forma de hifa foi observado, sob limitação de oxigênio. Este aumento da produção de etanol, nos dois trabalhos citados, deve ser consequência principalmente do favorecimento do metabolismo fermentativo frente à limitação de oxigênio, porém não se pode descartar a possibilidade de haver influência da morfologia no metabolismo da levedura, e conseqüente influência na produção de etanol. Durante a caracterização da cepa recombinante *cbhA 4'*, quanto à capacidade fermentativa (item 4.2.4), foi observado grande aumento na densidade celular e formação de pequenos filamentos e agregados de células, apesar do crescimento micelial não ser claramente observado devido à mistura com o bagaço. Deste modo, torna-se importante a caracterização de cepas de *K. marxianus* quanto a relação da morfologia e da produção de etanol para aplicação industrial desta espécie.

Muitos trabalhos têm relacionado a produtividade em fermentações com fungos como uma função da variação morfológica. Vários autores acreditam que a secreção de proteínas em fungos ocorra principalmente nas extremidades da hifa em crescimento, e que os fatores que aumentam o número de extremidades ativas nas hifas podem aumentar o rendimento da secreção de proteínas (Wang et al., 2005). A análise de imagens é uma ferramenta poderosa e um método acurado de medida de parâmetros morfológicos, sendo recomendada em qualquer estudo onde o desenvolvimento de hifas é importante (Wang et al., 2005). A literatura mostra que a levedura *Arxula adenivorans* apresenta dimorfismo dependente de temperatura, sendo capaz de crescer na forma unicelular ou como micélio (Wartmann et al., 1995), e culturas miceliais são capazes de secretar maior quantidade de proteínas que culturas unicelulares (Wartmann et al., 2000). Nesta mesma levedura, foi observado que a forma micelial é capaz de realizar O-glicosilação e N-glicosilação, ao passo que a forma unicelular realiza apenas N-glicosilação (Wartmann et al., 2002), o que pode ser um aspecto importante para a produção de proteínas heterólogas em leveduras dimórficas. Esta levedura apresenta algumas características em comum com *K. marxianus* como termotolerância, crescimento em um grande espectro de compostos e produção e secreção de várias enzimas extracelulares (Çelik & Çalik, 2011), e podem existir aspectos comuns também em relação aos mecanismos envolvidos no dimorfismo.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, nós sugerimos que, semelhante ao que se observa para fungos filamentosos e para *A. adenivorans*, existe uma relação entre o crescimento micelial e pseudohifal e a maior secreção de proteínas observada na cultura de *K. marxianus cbhA 4'*. Este fenômeno está bem descrito em fungos, mas até nosso conhecimento, é descrito pela primeira vez na levedura de interesse biotecnológico *K. marxianus*.

5.0 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram obtidas leveduras *K. marxianus* UFV-3 recombinantes para os genes *engB* e *cbhA* de *A. niger*, que codificam respectivamente uma endoglucanase e uma celobiohidrolase.

Os resultados aqui apresentados mostram que a técnica *overlap PCR* pode ser eficientemente empregada na construção de cassetes de expressão, diminuindo o tempo e custo associados desta etapa. Ao mesmo tempo, a marca de seleção *kanMX* foi eficiente para a seleção de *K. marxianus* recombinantes, mostrando-se promissora para aplicação em outros trabalhos de manipulação genética desta levedura.

A diversidade fenotípica observada dentre as cepas de *K. marxianus* recombinantes obtidas neste trabalho indica que a integração no genoma desta levedura deve ocorrer, principalmente, de modo ectópico, indicando que marcas de seleção dominantes, como *kanMX*, devem ser, preferencialmente, aplicadas para a seleção de transformantes desta cepa. A alta estabilidade genética observada em *K. marxianus* UFV-3 recombinantes permite que a marca de seleção seja retirada, posteriormente, para aplicação industrial das cepas recombinantes.

A observância de clones *cbhA* com expressão e secreção diferencial, em relação à cepa não transformada, de uma enzima com atividade celobiohidrolase, permite sugerir que o promotor PGK, de *S. cerevisiae*, e o peptídeo sinal α -MF, de *K. lactis*, são reconhecidos pela maquinaria de expressão e secreção de *K. marxianus* UFV-3.

A expressão e secreção de uma proteína heteróloga causam mudanças metabólicas e no perfil de secreção de proteínas em cepas recombinantes de *K. marxianus* UFV-3.

Os modelos obtidos para explicar a secreção de proteínas endógenas e heteróloga em *K. marxianus* direcionam futuras estratégias de produção de proteínas nesta levedura para o controle dos fatores pH, concentração de peptona e concentração de glicose no meio – os quais têm forte efeito sobre a secreção - visando aumentar o rendimento da proteína de interesse e diminuir a secreção de proteases. Adicionalmente, nossos resultados indicam que o crescimento micelial de *K. marxianus*, observado em condições limitantes de crescimento, está altamente relacionado ao aumento da secreção de proteínas nestas condições. Estas informações são de suma importância para aplicação desta levedura na produção de proteínas heterólogas.

O conhecimento aqui apresentado sobre a manipulação genética e condições que favorecem a secreção de proteínas em *K. marxianus* UFV-3 pode ser empregado na obtenção de um consórcio de leveduras recombinantes e selvagens - com capacidade de secreção de celulasas, hidrólise da celulose e fermentação dos açúcares resultantes - para aplicação em Bioprocesso Consolidado na produção de etanol celulósico.

6.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BANAT BMA, NONKLANG S, HOSHIDA H, AKADA R. 2010. Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*; 27: 29–39.

AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, STRUHL K. 2008. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley Current Protocols.

BALL MM, RAYNAL A, GUERINEAU M, IBORRA F. 1999. Construction of efficient centromeric, multicopy and expression vectors for the yeast *Kluyveromyces marxianus* using homologous elements and the promoter of a purine-cytosine-like permease. *J Mol Microbiol Biotechnol*; 1:347–353.

BALDRIAN P, VALASKOKA V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32: 501-521.

BARBOSA AM, GIESE EC, DEKKER RFH, BORSATO D, PEREZ AIB, IRANZO FU. 2010. Extracellular b-glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. *New Biotechnology*; Vol 27 N°4: 374-381.

BELLAVER LH, DE CARVALHO NMB, ABRAHÃO-NETO J, GOMBERT AK. 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Res*; 4:691–698.

BOTHA T, BLOTTNITZ HV 2006. A comparison of the environmental benefits of bagasse-derived electricity and fuel ethanol on a life-cycle basis. *Energy Policy*, 34: 2654–2661.

BRADFORD MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*; 72:248-254.

CAI XP, ZHANG J, YUAN HY. 2005. Secretory expression of heterologous protein in *Kluyveromyces cicerisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 67: 364-369.

ÇELİK E, ÇALIK P. 2011. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*.

CHA-AIM K, FUKUNAGA T, HOSHIDA H, AKADA R. 2009. Reliable fusion PCR mediated by GC-rich overlap sequences. *Gene*; 434: 43-49.

CHERRY JR, FIDANTSET AL. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*; 14: 438-443.

CHO, K. M., Y. J. YOO, AND H. S. KANG. 1999. d-Integration of endo/exoglucanase and b-glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enzyme Microb. Technol.*; 25:23–30.

CHO, K. M., AND Y. J. YOO. 1999. Novel SSF process for ethanol production from microcrystalline cellulose using the d-integrated recombinant yeast, *Saccharomyces cerevisiae* L2612dGC. *J Microbiol Biotechnol*; 9:340–345.

COSTA, D. A. Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico. 63p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

CREGG JM, TOLSTORUKOV I, KUSARI A, SUNGA J, MADDEN K, CHAPPELL T. 2009. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Guide to protein purification*, 463. *Methods in Enzymology*; 2: 169–89.

CRUZ JM, DOMINGUEZ JM, DOMINGUEZ H, PARAJÓ JC. 2000. Dimorphic behavior of *Debaromyces hansenii* grown on barley acid hidrolizates. *Biotechnology Letters*; 22:605-610.

CUBILLOS AF, BILLI E, ZORGO E , PARTS L, FARGIER P, OMHOLT S, BLOMBERG A, WARRINGER J, LOUIS EJ, LITI G. 2011. Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. *Molecular Ecology*; 20: 1401–1413.

DAVIES G, HENRISSAT B. 1995. Structures and mechanism of glycosyl hydrolases. *Current Biology* 3: 853-859.

DINIZ RHS, SILVEIRA WB, FIETTO LG, PASSOS FML. 2011. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek*.

ESTERBAUER H, STEINER W, LABUDOVA I, HERMANN A, HAYN M. 1991. Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol*; 36:51–65.

FONSECA GC, HEINZLE E, WITTMANN C, GOMBERT AK. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*; 79: 339-354.

GONÇALVES DB, TEIXEIRA JA, BAZZOLLI DMS, QUEIROZ MV, DE ARAÚJO EF. 2012. Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium gryseoroseum* T20. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

GRAY KA, ZHAO L, EMPTAGE M 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* , 10, 141–146.

HAAN RD, MCBRIDE JE, LA GRANGE DC, LYND LR, VAN ZYL WH. 2007. Functional expression of cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae* towards one-step conversion of cellulose to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1291–1299.

HAHN-HÄGERDAL B, GALBE M, GORWA-GRAUSLUND MF, LIDÉN G, ZACCHI G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology* Vol.24 No.12.

HENSING M, VROUWENVELDER H, HELLINGA C, BAARTMANS R, VAN DIJKEN JP. 1994. Production of extracellular inulinase in high-cell density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:516–521.

HECKMAN KL, PEASE LR. 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*; 2 N°4: 924-932.

HONG J, TAMAKI H, AKIBA S, YAMAMOTO K, KUMAGAI H. 2001. Cloning of a Gene Encoding a Highly Stable Endo- β -1,4-Glucanase from *Aspergillus niger* and Its Expression in Yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 434-441.

HONG J, WANG Y, KUMAGAI H, TAMAKI H. 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *Journal of Biotechnology*; 130: 114–123.

IBORRA F. 1993. High efficiency transformation of *Kluyveromyces marxianus* by a replicative plasmid. *Curr Genet* 24:181–183.

ITO H, FUKUDA Y, MURATA K, KIMURA A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*; 153:163–168.

JEON E, HYEON J, SUH DJ, SUH YW, KIM SW, SONG KH, HAN SO. 2009. Production of cellulosic ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expressing *Clostridium thermocellum* endoglucanase and *Saccharomyces fibuligera* β -glucosidase genes. *Molecules and Cells*.

KIRK O, BORCHERT TV, FUGLSANG CC. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*;13:345–51.

KUNZE G, KANG HA, GELLISSEN G. 2009. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): biology and applications. *Yeast biotechnology: diversity and applications*.

LANE MM, MORRISSEY, JP. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*.

LANE MM, BURKE N, KARREMAN R, WOLFE KH, O'BYRNE CP, MORRISSEY JP. 2011. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Anton Leeuw*; 100:507-519.

LERTWATTANASAKUL N, RODRUSSAMEE N, SUPRAYOGI, LIMTONG S, THANONKEO P, KOSAKA T, YAMADA M. 2011. Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. *AMB Express*; 1:20.

LODDER J, KREGER van RIJ NWM. 1952. The yeast: a taxonomic study. NPHC, Amsterdam.

LOPES M. L. Construção de vetores para expressão constitutiva de enzimas celulolíticas em *Kluyveromyces marxianus*. Monografia (Bacharelado em Bioquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

LOPES M. L. Identificação e purificação de uma β -glicosidase extracelular e construção de vetores para expressão constitutiva de celulasas em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Dissertação de Mestrado (Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

LYND L, ELANDER R, WYMAN C. 1996. Likely features of a mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biochemistry*; 741–761.

MATTANOVICH D, GASSER B, HOHENBLUM H, SAUER M. 2004. Stress in recombinant protein producing yeast. *J Biotechnol*; 113: 121-135.

MEILHOC E, MASSON JM, TEISSIÉ J. 1990. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *J Biotechnol*; 8:223–227.

MILLER GL, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959).

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*; 96 673-686.

NIMLOS MR, MATTHEWS JF, CROWLEY MF, WALKER RC, CHUKKAPALLI G, BRADY JW, ADNEY WS, CLEARY JM, ZHONG L, HIMMEL ME. 2007. Molecular Modeling Suggests Induced Fit Of Family I Carbohydrate-Binding Modules With A Broken-Chain Cellulose Surface. *Protein Engineering, Design & Selection*; 20:179–187.

NONKLAND S, ABDEL-BANAT BMA, CHA-AIM K, MOONJAI N, HOSHIDA H, LIMTONG S, YAMADA M, AKADA R. 2008. High temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol* 74: 7514-7521.

OLOFSSON K, BERTILSSON M, LIDÉN G. 2008 A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels* 1:7.

OLSEN SN, LUMBY E, McFARLAND K, BORCH K, WESTH P. 2010. Kinetics of Enzymatic High-Solid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass Studied by Calorimetry. *Appl Biochem Biotechnol*.

O'SHEA DG, WALSH PK. 2000. The Effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*; 53: 316-322.

RAYNAL A, GUERINEAU M. 1984. Cloning and expression of a structural gene for β -glucosidase of *Kluyveromyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 195: 108-115.

ROCHA SN, ABRAHÃO-NETO J, CERDÁN ME, GONZÁLEZ-SISO MI, GOMBERT AK. 2010. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Microbial Cell Factories 9:4.

ROCHA SN, ABRAHÃO-NETO J, CERDÁN ME, GOMBERT AK, GONZÁLEZ-SISO MI. 2011. Heterologous expression of a thermophilic esterase in the *Kluyveromyces* yeasts. Appl Microbiol Biotechnol; 89: 375-385.

RODRIGUES, MQRB. Expressão do gene *eng1* de *Aspergillus niger* em *Kluyveromyces marxianus*: uma alternativa para a produção de etanol celulósico. 33p. Monografia (Bacharelado em Bioquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ROUWENHORST R, HENSING M, VERBAKEL J, SCHEFFERS WA, VAN DIJKEN JP. 1990. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Appl Environ Microbiol; 56 N° 11: 3337-3345.

SAMBROOK J, RUSSELL DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ed. CSHL Press. Londres: 2001.

SANTOS A. F. Clonagem do gene *cbhA* de *Aspergillus niger* em vetor para expressão em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Monografia (Bacharelado em Bioquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SHEVCHUK NA, BRYKSIN A, NUSINOVICH YA, CABELLO FC, SUTHERLAND M, LADISCH S. 2004. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. Nucleic Acids Research; 32 N° 2 e19.

SILVEIRA WB, PASSOS FJV, MANTOVANIA HC, PASSOS FML. 2005. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. Enzyme and Microbial Technology 36: 930-936.

SOUZA, C. J. A. Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras termotolerantes. 48p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

SOUZA CJA, COSTA DA, RODRIGUES MQRB, SANTOS AF, LOPES MR, ABRANTES ABP, COSTA PS, SILVEIRA WP, PASSOS FML, FIETTO LG. 2012. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. Bioresource Technology; doi:10.1016/j.biortech.2012.01.024.

TOMÁS-PEJÓ, E.; GARCÍA-APARICIO, M.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; BALLESTEROS, M. 2008. Effect of different cellulase dosages on cell viability and

ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*; 100: 890–895.

WALKER GM, O'NEILL JM. 1990. Morphological and metabolic changes in the yeast *Kluyveromyces marxianus* vr. *Marxianus* NRRLy2415 during fermentation on lactose. *J Chem Tech Biotechnol*; 49: 75-89.

WANG L, RIDGWAY D, GU T, MOO-YOUNG M. 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentation. *Biotechnology Advances*; 23: 115-129.

WARTMANN T, KRUGER A, ADLER K, BUI MD, KUNZE I, KUNZE G. 1995. Temperature dependent dimorphism of the yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Anton Leeuw*; 68:215–23.

WARTMANN T, ERDMANN J, KUNZE I, KUNZEG. 2000. Morphology-related effects on gene expression and protein accumulation of the yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Arch Microbiol*;173:253–61.

WARTMANN T, BOER E, HUARTO PICO A, SIEBER H, BARTELTSEN O, GELLISSEN G. 2002. High-level production of recombinant proteins by the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*. *FEMS Yeast*; 2:363–9.

WYMAN CE. 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *TRENDS in Biotechnology*; Vol.25 No.4.

YANASE S, HASUNUMA T, YAMADA R, TANAKA T, OGINO C, FUKUDA H, KONDO A. 2010. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:381-388.

ZHANG YHP, HIMMEL, ME, MIELENZ, JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24, 452–481.

ZHANG Y-HP, LYND LR. 2004. Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol* 70:1563–9.

ZHANG J, YUAN H, WEN T, XU F, DI Y, HUO K, LI YY. 2003. Cloning of the KcURA3 gene and development of a transformation system for *Kluyveromyces cicerisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 62: 387–391.

ZHOU S, DAVIS FC, INGRAM LO. 2001. Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (celY) and CelZ (celZ) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. *Appl Environ Microbiol*; 67: 6–14.

ZHOU S, YOMANO LP, SALEH AZ, DAVIS FC, ALDRICH HC, INGRAM LO. 1999. Enhancement of expression and apparent secretion of *Erwinia chrysanthemi*

endoglucanase (encoded by *celZ*) in *Escherichia coli* B. *Appl Environ Microbiol*; 65:2439–45.

7.0 - ANEXOS

Anexo 1 – Combinações de níveis dos fatores tempo (h), quantidade de enzima (FPU) e cepa ensaiadas no experimento de SSF em bagaço (0 a 10 h) com os respectivos valores observados (etanol), ajustados (\hat{Y}) e valores residuais (ϵ) para a resposta concentração de etanol (g/L).

Trat	Rept	Tempo	FPU	Cepa	Etanol (g/L)	\hat{Y}	ϵ
1	1	0	5	0	0,51	0,09	0,418
2	1	5	5	0	2,38	2,81	-0,435
3	1	10	5	0	3,07	3,27	-0,197
4	2	0	5	0	0,51	0,09	0,418
5	2	5	5	0	2,50	2,81	-0,313
6	2	10	5	0	3,69	3,27	0,422
7	1	0	10	0	0,51	0,51	-0,003
8	1	5	10	0	3,78	4,19	-0,410
9	1	10	10	0	5,43	5,61	-0,179
10	2	0	10	0	0,51	0,51	-0,003
11	2	5	10	0	3,84	4,19	-0,347
12	2	10	10	0	5,92	5,61	0,311
13	1	0	15	0	0,51	0,93	-0,425
14	1	5	15	0	6,40	5,57	0,827
15	1	10	15	0	7,29	7,94	-0,653
16	2	0	15	0	0,51	0,93	-0,425
17	2	5	15	0	6,28	5,57	0,715
18	2	10	15	0	8,22	7,94	0,276
19	1	0	5	1	0,55	0,69	-0,141
20	1	5	5	1	3,46	2,57	0,891
21	1	10	5	1	2,52	2,18	0,338
22	2	0	5	1	0,55	0,69	-0,141
23	2	5	5	1	1,73	2,57	-0,835
24	2	10	5	1	2,10	2,18	-0,082
25	1	0	10	1	0,55	0,55	0,003
26	1	5	10	1	3,29	3,38	-0,088
27	1	10	10	1	3,40	3,95	-0,556
28	2	0	10	1	0,55	0,55	0,003
29	2	5	10	1	3,39	3,38	0,010
30	2	10	10	1	4,52	3,95	0,570
31	1	0	15	1	0,55	0,40	0,147
32	1	5	15	1	*	*	*

33	1	10	15	1	5,11	5,72	-0,615
34	2	0	15	1	0,55	0,40	0,147
35	2	5	15	1	4,18	4,19	-0,016
36	2	10	15	1	6,09	5,72	0,365

Anexo 2 – ANOVA da regressão para SSF em bagaço (0 a 10 h)

Fonte	GL	SQ	SQ Adj	QM	F	P
Regressão	7	172,904	172,904	24,7006	107,99	0,000
Linear	3	142,038	142,637	47,5455	207,86	0,000
Quadrática	1	10,103	9,594	9,5936	41,94	0,000
Interação	3	20,763	20,763	6,9209	30,26	0,000
Resíduo	27	6,176	6,176	0,2287		
Falta de ajuste	10	2,722	2,722	0,2722	1,34	0,287
Erro puro	17	3,454	3,454	0,2032		
Total	34	179,080				

Anexo 3 – Teste t para os coeficientes codificados estimados para SSF em bagaço (0 a 10 h)

Termo	Coef	SE Coef	T	P
Constante	3,7856	0,14503	26,103	0,000
Tempo	2,1260	0,09762	21,777	0,000
FPU	1,0956	0,10012	10,943	0,000
Cepa	-0,4048	0,08107	-4,993	0,000
Tempo*Tempo	-1,1322	0,17482	-6,476	0,000
Tempo*FPU	0,9570	0,11957	8,004	0,000
Tempo*Cepa	-0,4224	0,09762	-4,327	0,000
FPU*Cepa	-0,2829	0,10012	-2,826	0,009

$R^2 = 96,55\%$ $R^2(\text{adj}) = 95,66\%$

Anexo 4 – Combinações de níveis dos fatores tempo (h), quantidade de enzima (FPU) e cepa ensaiadas no experimento de SSF em bagaço (15 a 30 h) com os respectivos valores observados (etanol), ajustados (\hat{Y}) e valores residuais (ε) para a resposta concentração de etanol (g/L).

Trat	Rept	Tempo	FPU	Cepa	Etanol (g/L)	\hat{Y}	ε
1	1	15	5	0	4,11	4,45	-0,338
2	1	20	5	0	5,72	5,55	0,172
3	1	25	5	0	6,10	6,65	-0,555
4	1	30	5	0	6,01	7,75	-1,747
5	2	15	5	0	4,87	4,45	0,420
6	2	20	5	0	6,19	5,55	0,640
7	2	25	5	0	7,64	6,65	0,986
8	2	30	5	0	8,47	7,75	0,713
9	1	15	10	0	7,97	8,69	-0,719
10	1	20	10	0	9,17	9,79	-0,617
11	1	25	10	0	10,57	10,89	-0,322
12	1	30	10	0	11,44	11,99	-0,552
13	2	15	10	0	8,49	8,69	-0,196
14	2	20	10	0	10,57	9,79	0,778
15	2	25	10	0	11,78	10,89	0,886
16	2	30	10	0	12,79	11,99	0,803
17	1	15	15	0	10,53	10,70	-0,165
18	1	20	15	0	11,15	11,80	-0,646
19	1	25	15	0	11,82	12,90	-1,081
20	1	30	15	0	12,32	14,00	-1,679
21	2	15	15	0	10,81	10,70	0,113
22	2	20	15	0	12,96	11,80	1,163
23	2	25	15	0	13,84	12,90	0,939
24	2	30	15	0	15,00	14,00	1,002
25	1	15	5	1	3,42	2,57	0,851
26	1	20	5	1	3,48	3,67	-0,195
27	1	25	5	1	4,69	4,77	-0,079
28	1	30	5	1	5,50	5,87	-0,370
29	2	15	5	1	2,80	2,57	0,229
30	2	20	5	1	3,63	3,67	-0,043
31	2	25	5	1	4,59	4,77	-0,182
32	2	30	5	1	5,37	5,87	-0,503
33	1	15	10	1	4,97	6,81	-1,835
34	1	20	10	1	7,17	7,91	-0,744

35	1	25	10	1	9,21	9,01	0,200
36	1	30	10	1	10,12	10,11	0,013
37	2	15	10	1	6,73	6,81	-0,078
38	2	20	10	1	8,73	7,91	0,815
39	2	25	10	1	9,90	9,01	0,891
40	2	30	10	1	10,79	10,11	0,676
41	1	15	15	1	8,23	8,82	-0,586
42	1	20	15	1	9,31	9,92	-0,606
43	1	25	15	1	11,44	11,02	0,427
44	1	30	15	1	10,49	12,12	-1,631
45	2	15	15	1	8,93	8,82	0,111
46	2	20	15	1	11,01	9,92	1,092
47	2	25	15	1	11,87	11,02	0,850
48	2	30	15	1	12,81	12,12	0,696

Anexo 5 – ANOVA da regressão para SSF em bagaço (15 a 30 h)

Fonte	GL	SQ	SQ Adj	QM Adj	F	P
Regressão	4	440,494	440,494	110,124	159,28	0,000
Linear	3	427,208	427,208	142,403	205,97	0,000
Quadrática	1	13,286	13,286	13,286	19,22	0,000
Resíduo	43	29,729	29,729	0,691		
Falta de ajuste	19	7,133	7,133	0,375	0,40	0,978
Erro puro	24	22,595	22,595	0,941		
Total	47	470,223				

Anexo 6 – Teste t para os coeficientes codificados estimados para SSF em bagaço (15 a 30 h)

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	9,4006	0,2079	45,223	0,000
Tempo	1,6502	0,1610	10,249	0,000
FPU	3,1231	0,1470	21,247	0,000
Cepa	-0,9406	0,1200	-7,838	0,000
FPU*FPU	-1,1161	0,2546	-4,384	0,000

$R^2 = 93,68\%$ $R^2(\text{adj}) = 93,09\%$

Anexo 7 – Combinações de níveis dos fatores concentração de peptona % (p/v), pH, concentração de glicose % (p/v) e temperatura (°C) com os respectivos valores observados de atividade enzimática (nmol/(mL*min)) para pNPG e pNPC do sobrenadante de 24 h de cultura de *K. marxianus cbhA 4'*.

Trat	Peptona	pH	Glicose %	Temperatura	atividade pNPG	atividade pNPC
1	0,2	6	5,5	37	5,89	0
2	0,6	6	5,5	41	19,11	0,194
3	0,2	7	5,5	41	37,22	0,295
4	0,6	7	5,5	37	5,41	0,022
5	0,2	6	8,5	41	44,60	0,266
6	0,6	6	8,5	37	6,47	0,007
7	0,2	7	8,5	37	36,07	0,252
8	0,6	7	8,5	41	63,19	0,568
9	0	6,5	7	39	22,08	0,093
10	0,8	6,5	7	39	19,02	0,065
11	0,4	5	7	39	4,07	0,093
12	0,4	8	7	39	26,20	0,122
13	0,4	6,5	4	39	19,02	0,079
14	0,4	6,5	10	39	20,65	0
15	0,4	6,5	7	35	8,10	0
16	0,4	6,5	7	43	6,08	0
17	0,4	6,5	7	39	20,94	0,036
18	0,4	6,5	7	39	19,69	0,007
19	0,4	6,5	7	39	19,40	0,036