



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

Modificações Genéticas em Leveduras para Expressão de Celulases

Juliana de Amorim Araújo

Orientador: Prof. Fernando Araripe G. Torres

Brasília, dezembro de 2012.



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

Modificações Genéticas em Leveduras para Expressão de Celulases

Juliana de Amorim Araújo

Orientador: Prof. Fernando Araripe G. Torres

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

Brasília, dezembro de 2012

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular,
Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Fernando Araripe G. Torres

Banca Examinadora:

Prof. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)
Examinadora Externa

Pesquisador Dr. João Ricardo Moreira de Almeida (Embrapa/Agroenergia)
Examinador

Prof. Dr^a. Janice Lisboa De Marco (UnB)
Examinadora

Prof. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista (UnB)
Examinadora

Prof. Dr^a. Lidia Maria Pepe de Moraes (UnB)
Suplente

**Se as coisas são inatingíveis... ora! □
Não é motivo para não querê-las... □
Que tristes os caminhos, se não fora □
A presença distante das estrelas!**

Mario Quintana

*Para minha “Sweet Caroline”, bons tempos
nunca pareceram tão bons.*

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres, pelo constante apoio e pela confiança depositada na realização desse projeto.

À professora Lídia Maria Pepe Moraes, por todos os conselhos, ajuda e ensinamentos.

À Banca de qualificação, pelas críticas e sugestões valiosas.

Aos meus pais (Edwin e Solange) que partilham comigo todos os momentos da vida, pelo amor incondicional, carinho e incentivo.

Ao Isnard (Vi)... pela presença em minha vida.

À minha filha Caroline por cada sorriso.

Ao meu irmão e a meus familiares, que sempre me apoiaram durante toda a vida.

À família Queiroz: Isnard, Ângela e Catherine pelo acolhimento e carinho.

Ao amigo querido Tulio Gabiru pela amizade e grande ajuda na finalização do trabalho.

Aos amigos Marciano e Theyssa pela grande amizade e ajuda no laboratório.

Aos amigos do Lab 2, que tornaram o trabalho no laboratório mais prazeroso, por toda ajuda, por todas as conversas e pelo carinho: Karen, Nádia, Carolina, Osmar, Viviane, Maritza, Bruno B, Theyssa, Janice, Gisele, Cris, Alyson, Zé Carlos, Fernanda, Túlio, Bruno.

Aos amigos Luane, Nádia, Alexsandro, Camila e Saulo que me receberam no laboratório, por toda a ajuda, paciência, força e ensinamentos.

Aos amigos de Recife por todas as férias.

Aos amigos de Brasília pelos momentos de distração.

Aos funcionários da Biomol, Ivanildes e Fátima pelo apoio técnico.

Aos demais Professores do laboratório de Biologia Molecular: Marcelo Brígido, Andréa Maranhão, Élide Campos, Márcio Poças, Ildinete Pereira e Maria Sueli S. Felipe pelo apoio durante o tempo no laboratório.

Ao Prof. João Atílio Jorge por fornecer algumas linhagens utilizadas nesse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Abreviaturas e Símbolos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. Introdução	
1.1 Etanol como alternativa energética	1
1.2 Etanol de segunda geração	3
1.3 Composição da lignocelulose	4
1.3 Bioprocesso para produção de etanol de segunda geração	7
1.5 Enzimas celulolíticas	11
1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema de expressão heteróloga	18
1.7 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão heteróloga	24
1.8 Desenvolvimento de linhagens produtoras de celulasas <i>in house</i>	26
2. Objetivos	
2.1 Geral	31
2.2. Específicos	31
4. Estratégias	
4.1 Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> produtora de celulasas	32
4.2 Linhagem de <i>Pichia pastoris</i> produtora de celulasas	33
4. Material	
4.1 Micro-organismos utilizados	34
4.1.1 Bactérias	34
4.1.2 Leveduras e fungos	34
4.2 Enzimas	35
4.3 Marcadores	35
4.4 <i>Kits</i>	36
4.5 <i>Primers</i>	36
4.6 Ferramentas de bioinformática	38
4.7 Vetores	38

4.7.1 Vetores de clonagem	38
4.7.2 Vetores de expressão para <i>S. cerevisiae</i>	39
4.7.3 Vetores de expressão para <i>P. pastoris</i>	40
4.7.4 Vetores para obtenção de genes de interesse	40
4.8 Meios de cultura e soluções	40
4.8.1 Meios para bactérias	41
4.8.2 Meios para leveduras	41
4.8.3 Meios para fungos	44
4.8.4 Tampões	44
4.9 Transformação de bactéria	45
4.10 Extração de DNA plasmidial	45
4.11 Análise de DNA em gel de agarose	46
4.12 Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	46
4.13 Análise de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	46
4.14 Revelação de proteínas com <i>Coomassie blue</i>	48
4.15 Extração de DNA genômico de levedura	49
4.16 Soluções para ensaios de atividade enzimática	49
5. Metodologia	
5.1 Extração de RNA total	50
5.2 Síntese de cDNA – Transcrição reversa	50
5.3 Extração de DNA total de levedura	50
5.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR)	51
5.5 Sequenciamento de DNA	51
5.6 Análise em gel de agarose	51
5.7 Purificação e eluição de fragmentos de DNA	52
5.8 Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)	52
5.9 Digestão de DNA com enzimas de restrição	52
5.10 Desfosforilação de vetores linearizados	52
5.11 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico	53
5.12 Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	53
5.13 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep)	53
5.14 Preparação de DNA plasmidial em media escala (midi-prep)	54

5.15	Transformação de levedura	54
5.15.1	<i>S. cerevisiae</i>	54
5.15.2	<i>P. pastoris</i>	55
5.16	Seleção de clones recombinantes	55
5.16.1	<i>S. cerevisiae</i>	55
5.16.2	<i>P. pastoris</i>	56
5.17	Expressão de recombinantes em frasco	56
5.17.1	<i>S. cerevisiae</i>	56
5.17.2	<i>P. pastoris</i>	57
5.18	Análise de atividade das enzimas endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase	57
5.18.1	Determinação de atividade sobre CMC	57
5.18.2	Determinação de atividade sobre CMC em placa	58
5.18.3	Determinação de atividade sobre pNPC	58
5.18.4	Determinação de atividade sobre pNPG	59
5.18.5	Determinação de atividade sobre MUC	59
5.18.6	Determinação de atividade sobre Sigmacel	59
5.18.7	Determinação de atividade sobre papel de filtro	60
5.19	Crescimento aeróbico em celobiose ou CMC	61
5.20	Crescimento anaeróbico em celobiose	61
5.21	Análise dos produtos de fermentação por HPLC	61
5.22	Preparo das amostras para SDS-PAGE	62
5.23	Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	62
5.24	Coloração com <i>Coomassie brilliant blue</i>	62
5.25	Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma)	62
6.	Resultados	
6.1	Isolamento dos genes	64
6.1.1	Endoglicanase de <i>Trichoderma reesei</i>	64
6.1.2	Exoglicanase (celobiohidrolase) de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	65
6.1.3	β -Glicosidase de <i>Humicola grisea var thermoidea</i>	66
6.1.4	β -Glicosidase de <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	67
6.1.5	β -Glicosidase de <i>Neurospora crassa</i>	68
6.1.6	Transportador de celodextrinas de <i>Neurospora crassa</i>	69
6.1.7	Sequenciamento dos genes isolados.	70

6.2	Construção dos vetores episomais de expressão em <i>S. cerevisiae</i>	70
6.2.1	Vetores com genes nativos	70
6.2.2	Vetores com genes com peptídeo sinal do fator α	72
6.2.3	Vetores com genes fusionados a porção C-terminal da α -aglutinina	73
6.3	Construção de vetor episomal com duplo cassete de expressão em <i>S. cerevisiae</i>	75
6.4	Transformação de <i>S. cerevisiae</i> com vetores episomais e detecção da atividade enzimática	80
6.4.1	Endoglicanase e celobiohidrolase	80
6.4.2	β -Glicosidade 1 e β -glicosidase 4	84
6.4.3	Sistema β -glicosidade GH1-1 e transportador CDT-1	87
6.5	Construção de linhagem com duas classes de celulases	93
6.5.1	Construção com a região autoclivável 2 ^a	93
6.5.2	Construção com o sítio para a endoprotease Kex2p	96
6.5.3	Transformação e detecção da atividade enzimática	99
6.6	Construção de linhagem com as três classes de celulases	103
6.7	Construção do vetor de expressão induzida em <i>P. pastoris</i>	109
6.8	Transformação de <i>P. pastoris</i> com vetores de expressão induzida e detecção da atividade enzimática	111
7.	Discussão	
7.1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> produtoras de celulases	120
7.1.1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> produtoras das três classes de celulases isoladamente	120
7.1.2	Construção de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> co-expressando a fusão gênica <i>cbhI.1-linker-eglIII</i>	127
7.1.3	Construção de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> co-expressando as fusões gênicas <i>cbhI.1-linker-eglIII</i> e o sistema GH1/cdt1	129
7.2	Expressão das celulases EGLII e CBHI.1 em <i>Pichia pastoris</i>	132
8.	Conclusões	136
9.	Perspectivas	139
10.	Referências bibliográficas	140
11.	Anexos	
	Anexo 1. Padrão dos marcadores de massa molecular.	162

Anexo 2. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM-T.	163
Anexo 3. Representação esquemática do mapa físico do vetor pBluescript II KS.	164
Anexo 4. Representação esquemática do mapa físico do vetor pIJ2925.	165
Anexo 5. Representação esquemática do mapa físico do vetor Y1PGK1.	166
Anexo 6. Representação esquemática do mapa físico do vetor YADH-Hind-.	167
Anexo 7. Representação esquemática do mapa físico do vetor YEp351PGK1.	168
Anexo 8. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9.	169
Anexo 9. Curva padrão de glicose.	170
Anexo 10. Curva padrão de pNP.	171
Anexo 11. Artigo científico publicado.	172

LISTA DE FIGURAS

i

Figura 1. Polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos.	5
Figura 2. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose.	6
Figura 3. Formas de conversão de biomassas lignocelulósicas a etanol.	9
Figura 4. Esquema simplificado da hidrólise enzimática da celulose catalisada pelo sistema celulolítico.	15
Figura 5. Modelos 3D de CBHI e CBHII.	17
Figura 6. Representação simplificada do catabolismo anaeróbio de <i>S. cerevisiae</i> .	19
Figura 7. Estratégia para construção de linhagem celulolítica de <i>S. cerevisiae</i> .	32
Figura 8. Estratégia para construção de linhagem celulolítica de <i>P. pastoris</i> .	33
Figura 9. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao gene <i>eglIII</i> de <i>T. reesei</i> .	64
Figura 10. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao gene <i>cbhI.1</i> de <i>P. chrysosporium</i> .	65
Figura 11. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao gene <i>bgl4</i> de <i>H. grisea</i> .	66
Figura 12. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao gene <i>bgl1</i> de <i>S. fibuligera</i> .	68
Figura 13. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao gene <i>cdt-1</i> de <i>N. crassa</i> .	69
Figura 14. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores Y1PGK1 contendo o gene de interesse.	71
Figura 15. Análise de restrição para confirmação dos vetores Y1PGK1- <i>eglIII</i> , Y1PGK1- <i>cbhI.1</i> e Y1PGK1- <i>Bgl1</i> .	72
Figura 16. Análise de restrição para confirmação dos vetores Y1PGK1- α <i>bgl1</i> e Y1PGK1- α <i>bgl4</i> .	73
Figura 17. Análise de restrição para confirmação do vetor Y1PGK1- <i>bgl1Aglu1</i> .	74
Figura 18. Análise de restrição para confirmação do vetor YADH- <i>bgl4Aglu1</i> .	75
Figura 19. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção	76

do vetor YEp351PGK-GH1/cdt1.

Figura 20. Análise de restrição para confirmação do vetor YADH-cdt1.	77
Figura 21. Análise de restrição para confirmação do vetor YEp351PGK-GH1/cdt.	78
Figura 22. Análise de restrição para confirmação do vetor YEp351PGK-GH1/cdt.	79
Figura 23. Análise de formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo CMC 0,5%.	81
Figura 24. Análise de formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo CMC 0,5%.	82
Figura 25. Cinética de produção enzimática dos clones EGLII e CBHI.1.	83
Figura 26. Análise de crescimento de clones transformantes em placa com celobiose como única fonte de carbono.	84
Figura 27. Análise de crescimento em meio mínimo com celobiose como única fonte de carbono.	85
Figura 28. Análise de crescimento em meio mínimo com celobiose como única fonte de carbono.	86
Figura 29. Análise de crescimento em meio mínimo com celobiose como única fonte de carbono.	86
Figura 30. Análise de crescimento em placa com celobiose como única fonte de carbono.	87
Figura 31. Análise de crescimento em placa com celobiose como única fonte de carbono.	88
Figura 32. Teste de atividade com o substrato pNPG.	89
Figura 33. Análise de crescimento aeróbico em meio líquido com celobiose ou glicose como fonte de carbono.	90
Figura 34. Análise de crescimento anaeróbico em meio líquido com celobiose.	92
Figura 35. Análise de HPLC da composição de açúcares após crescimento do GH1/cdt em condições de anaerobiose.	93
Figura 36. Alinhamento e tradução predita das sequências de nucleotídeos nativa e otimizada da região 1D-2A do vírus FMDV.	94
Figura 37. Representação esquemática da estratégia utilizada para fusão dos genes <i>cbhI.1</i> e <i>eglIII</i> com o <i>linker</i> 2A.	95

Figura 38. Amplificação dos fragmentos de DNA relativos ao gene <i>cbhI.1</i> e <i>2A-eglIII</i> .	95
Figura 39. Representação esquemática da estratégia utilizada para fusão dos genes <i>cbhI.1</i> e <i>eglIII</i> com o <i>linker</i> Kex.	97
Figura 40. Amplificação de fragmento de DNA relativo Kex- <i>eglIII</i> .	97
Figura 41. Análise de restrição para confirmação dos vetores Y1PGK1-Fus2A e Y1PGK1-FusKex.	98
Figura 42. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo 0,5% CMC.	100
Figura 43. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo 0,5% CMC.	101
Figura 44. Cinética de produção enzimática dos clones Fus2A e FusKex.	102
Figura 45. Análise de restrição para confirmação dos vetores Y1PGK1-Fus2AG418 e Y1PGK1-FusKexG418.	104
Figura 46. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo 0,5% CMC.	105
Figura 47. Análise fenotípica dos clones selecionados FusKex-GH1/cdt e Fus2A-GH1/cdt.	106
Figura 48. Cinética de produção enzimática do clone Fus2A-GH1/cdt.	107
Figura 49. Análise de crescimento e produção de etanol do Clone GH1-Fus2A.	108
Figura 50. Curva de crescimento em meio complexo com celulose YP-CMC como fonte de carbono.	109
Figura 51. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores pPIC9 contendo os genes de interesse.	110
Figura 52. Análise de restrição para confirmação dos vetores pPIC9-Fus2A.	111
Figura 53. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio MM-CMC-Ágar Tamponado de transformantes com o vetor pPIC9-Fus2A e pPIC9 (C-).	112
Figura 54. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio MM-CMC-Ágar Tamponado do transformantes selecionado FusAOX.	113
Figura 55. Cinética de produção enzimática do clone FusAOX .	114
Figura 56. Amplificação de fragmento de DNA relativo à fusão gênica <i>cbhI.1-2A-eglIII</i> no genoma do clone FusAOX de <i>P. pastoris</i> .	115

Figura 57. Ensaio qualitativo de atividade com o substrato sintético MUC.	116
Figura 58. Ensaio de formação de halo de hidrólise em placa contendo 0,5% de CMC.	117
Figura 59. Análise do perfil proteico do sobrenadante da cultura do clone FusAOX.	118
Figura 60. Zimograma com o sobrenadante de cultura do recombinante de <i>P. pastoris</i> FusAOX.	119
Figura 61. Representação esquemática do modo de ação da levedura <i>S. cerevisiae</i> recombinante construída neste trabalho.	131

Tabela 1. Classificações das enzimas celulolíticas segundo <i>Enzyme Commission</i> e a IUBMB - <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> .	12
Tabela 2. Exemplos de celulasas produzidas por expressão heteróloga em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	20
Tabela 3. Breve resumo de experimentos de produção direta de etanol a partir de fontes de celulose.	23
Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento e sítios de restrição (sublinhado).	37
Tabela 5. Genes isolados e referências no banco de dados.	70
Tabela 6. Vetores de expressão constitutiva em <i>S. cerevisiae</i> .	79
Tabela 7. Substratos consumidos e produtos formados após 120 horas de crescimento aeróbico em celobiose.	91
Tabela 8. Vetores de expressão constitutiva em <i>S. cerevisiae</i> com as fusões gênicas.	99
Tabela 9. Vetores de expressão em <i>S. cerevisiae</i> contendo a marca dominante G418.	104

ADP	adenosina difosfato
Amy	α -amilase
APS	persulfato de amônio
ATP	adenosina trifosfato
BG	β -glicosidase
CBD	domínio de ligação a celulose (<i>cellulose binding domain</i>)
CD	domínio catalítico (<i>catalytic domain</i>)
cDNA	DNA complementar
CENPES	Centro de Pesquisa – Petrobrás – Rio de Janeiro
cm	centímetro
CMC	carboximetilcelulose
Da	Daltons
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNS	ácido dinitrosalicílico
dNTP	deoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTT	ditiotretitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EG	endoglicanase
EUA	Estados Unidos da América
ExG	exoglicanase
g	grama
g	força gravitacional
GFP	proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>)
GRAS	geralmente reconhecido como seguro (<i>generally recognized as safe</i>)
GP	grau de polimerização
h	hora
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
kb	quilo base (1000 pb)
kDa	quilo Daltons

Ki	constante de inibição
Km	constante de Michaelis
kV	quilo Volts
L	litro
M	molar
mA	miliampères
min	minutos
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ms	milisegundos
MUC	4-metil-umbeliferil- β -D-celobiosídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD₆₀₀	densidade óptica a 600 nm
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
PASC	celulose regenerada com ácido fosfórico (<i>phosphoric acid-swollen cellulose</i>)
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia de polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PIB	produto interno bruto
pNP	<i>p</i> -nitrofenil
pNPC	<i>p</i> -nitrofenol- β -D-celobiosídeo
pNPG	<i>p</i> -nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo
p/v	peso/volume
RNAse	ribonuclease
rpm	rotações por minuto

RT	transcriptase reversa (<i>reverse transcriptase</i>)
s	segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
TAE	tampão Tris-acetato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tm	Temperatura de anelamento
U	unidade
UI	unidades Internacionais
UNICA	União da Indústria de cana-de-açúcar
UV	ultravioleta
v	volume
V	Volts
v/v	volume/volume
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
°C	graus Celsius
μF	microFaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar

A produção de etanol lignocelulósico transformou-se em um grande desafio para a indústria de energia renovável. A celulose presente nos resíduos lignocelulósicos representa uma fonte abundante de açúcares, mas estes só se tornam disponíveis para fermentação após a etapa de hidrólise enzimática. As grandes quantidades de enzimas necessárias impactam severamente a relação custo-eficácia desta tecnologia. No sentido de buscar novas alternativas, conduzimos o trabalho com o intuito de construir linhagens das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* capazes de produzir celulasas (endoglicanase, celobiohidrolase e β -glicosidase). A primeira etapa para a produção de uma linhagem de *S. cerevisiae* produtora de celulasas, foi a expressão isolada de genes celulolíticos. A expressão da endoglicanase II (*eglII*) de *Trichoderma reesei* e da celobiohidrolase I.1 (*cbhI.1*) de *Phanerochaete chrysosporium* em *S. cerevisiae* linhagem MFL gerou clones produtores de enzimas funcionais no sobrenadante do cultivo. Em ambos os clones selecionados para cada enzima, foi detectada atividade enzimática a partir de 24 h de cultivo, atingindo maior atividade após 96 h. Várias estratégias para expressão de β -glicosidases em *S. cerevisiae* foram abordadas: i) a expressão da BGL1 de *Sacharomycopsis fibuligera* em sua forma nativa, ii) fusionada ao C-terminal da α -aglutinina e, iii) com o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*. As duas últimas estratégias também foram realizadas com a BGL4 do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Testou-se, ainda, a co-expressão da β -glicosidase intracelular GH1-1 e do transportador de celodextrinas CDT-1 de *Neurospora crassa*. Dentre todos os genes e estratégia utilizados, apenas o sistema envolvendo a co-expressão da GH1-1 e do CDT-1 apresentou resultado satisfatório. O sistema provou ser eficiente permitindo que a levedura crescesse na presença de celobiose em condições aeróbicas e anaeróbicas, com produção de etanol na segunda condição. A co-expressão dos genes *eglII* e *cbhI.1* foi em seguida testada na forma de “fusões gênicas” utilizando dois sistemas de clivagem *in vivo*: a sequência autoclivante 2A do vírus FMDV, e o sítio para a endoprotease Kex2p. Os dois sistemas resultaram em enzimas funcionais, no entanto as atividades foram menores do que aquelas obtidas quando as enzimas foram expressas separadamente (possivelmente devido ao saturamento da via de secreção). Finalmente, no sentido de obter uma linhagem de *S. cerevisiae* que expressasse as três celulasas, foi feita a co-expressão das fusões gênicas com o sistema β -glicosidase/transportador. O clone selecionado GH1-Fus2A apresentou atividade enzimática sobre os substratos CMC e pNPC, capacidade de crescimento em celobiose e seu consumo, e produção de etanol, indicando a produção das três enzimas celulolíticas funcionais na mesma levedura. Para a obtenção de uma linhagem de *P. pastoris* recombinante produtora de celulasas, os genes dessas enzimas foram clonados sob o controle do forte promotor induzível *AOX1*, em vetores integrativos. Foram utilizados os genes *eglII* e *cbhI.1* em fusão gênica com a sequência 2A. As atividades sobre CMC, Sigmacel e papel de filtro foram detectadas no sobrenadantes da linhagem recombinante, nas primeiras horas de indução, sendo os maiores níveis encontrados após 72 h, confirmando a atividade das enzimas EGLII e CBHI.1. A atividade sobre CMC do clone recombinante de *P. pastoris* foi aproximadamente 8 vezes superior

àquela obtida com o clone recombinante de *S. cerevisiae* expressando a mesma fusão gênica. A análise do sobrenadante do cultivo por SDS-PAGE mostrou a clivagem da proteína de fusão pelo peptídeo 2A gerando proteínas independentes. Por fim, demonstrou-se a construção de linhagens de *S. cerevisiae* e de *P. pastoris* produtora de celulases necessárias para a degradação da celulose. Essas leveduras são apontadas como uma interessante plataforma para a produção de proteínas heterólogas, e com isso diminuir a quantidade de enzimas comerciais necessárias para hidrolisar o substrato, contribuindo para a redução da dependência da importação das enzimas.

ABSTRACT

v

The production of lignocellulosic ethanol become a great challenge for the renewable energy industry. Cellulose present in the lignocellulosic residues represents an abundant source of sugars, but these are only available for the fermentation process after an enzymatic hydrolysis step. The large amount of enzymes required severely impacts the overall cost-efficacy relation of this technology. In an effort to pursue new alternatives, we performed this work aiming to construct strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* able to produce cellulases (endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase). The first step for the production of the *S. cerevisiae* strain that produces cellulose was the isolated expression of cellulolytic genes. The single expression of the endoglucanase II of *Trichoderma reesei* and of the cellobiohydrolase I.1 of *Phanerochaete chrysosporium* in *S. cerevisiae* MFL generated clones producing functional enzymes on the culture supernatant. In both selected clones for each enzyme, the enzymatic activity was detected after 24 h of cultivation, reaching the highest activity after 96 h. Many strategies for the expression of β -glucosidases in *S. cerevisiae* were performed: i) the expression of BGL1 de *Sacharomycopsis fibuligera* in its native form, ii) fused to C-terminal of α -agglutinin and, iii) with the signal peptide form the *S. cerevisiae* α -factor. The last two strategies were also performed with BGL4 from the fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. It was also tested the co-expression of the intracellular β -glucosidase GH1-1 and the cellobextrins transporter CDT-1 of *Neurospora crassa*. Of all those strategies, only the system involving the co-expression of GH1-1 and CDT-1 showed satisfactory results. The system showed to be efficient allowing the growth of the yeast in the presence of cellobiose both in aerobic and anaerobic conditions, with ethanol production in the latter. Then, the co-expression of *eglIII* and *cbhI.1* genes was tested in the form of “gene fusions” using two *in vivo* cleavage systems: the auto-cleavage 2A sequence from the FMDV virus, and the cleavage site for the Kex2p protease. Both systems result in functional enzymes, however the activities were lower than those obtained when the enzymes were expressed separately, possibly due the saturation of the secretion pathway. Finally, in an effort to obtain a *S. cerevisiae* strain that expresses the three cellulases, it was made the co-expression of gene fusion with the β -glucosidase/transporter system. The selected clone GH1-Fus2A showed enzymatic activity with the substrates CMC and pNPC, capacity of growing in cellobiose and consumes it, and ethanol production, indicating the production of the three functional cellulolytic enzymes in the same yeast. To obtain a recombinant *P. pastoris* strain producing cellulases, the genes of these enzymes were cloned into an integrative vector under the control of the strong inducible promoter *AOX1*. It was used the *eglIII* and *cbhI.1* genes in a gene fusion with the autocleavable 2A sequence. Enzymatic activities with the substrates CMC, Sigmacel and filter paper were detected on the supernatant of the recombinant strain, confirming the enzymes activities of EGLII and CBH.1. The enzymatic activities were detected during the first hours of induction, where the highest levels occurred after 72h. The activity with CMC of the recombinant clone of *P. pastoris* was approximately 8-fold higher than that obtained with the recombinant clone in *S. cerevisiae* expressing the same gene fusion. Analysis

of the culture supernatant through SDS-PAGE showed the protein fusion cleavage by the 2A peptide generating independent proteins. Finally, it was shown the construction of *S. cerevisiae* and *P. pastoris* strains producing cellulases necessary for the cellulose degradation. These yeasts are pointed out as an interesting platform for heterologous protein production and diminishing the amount of commercial enzymes needed to hydrolyze the substrate contribute to the decrease of the dependence of enzymes importation.

1.1 Etanol como alternativa energética

Atualmente, o sistema energético internacional é fortemente dependente de combustíveis fósseis, pois 80% do consumo de energia se originam dessas fontes. A demanda projetada de energia no mundo aumentará 2% ao ano, e estima-se que alcançará 15,3 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo em 2030 de acordo com o cenário traçado pelo Instituto Internacional de Economia (Ogeda & Petri, 2010). O uso indiscriminado destes hidrocarbonetos, além de ocasionar uma diminuição das reservas e um aumento excessivo dos preços de seus derivados, tem gerado altos índices de contaminação ambiental, causando um aumento na temperatura mundial e conduzindo a mudanças climáticas (Dashtban *et al.*, 2009). Estes fatores têm motivado a busca por alternativas energéticas e industriais nas quais os derivados de petróleo sejam substituídos.

O conceito de energia alternativa é atualmente sinônimo de energia renovável. As energias renováveis têm potencial para atender grande parte da crescente demanda energética mundial, independente da sua origem. No entanto, existem três aspectos importantes a considerar a seu respeito: a viabilidade econômica, a sustentabilidade de cada fonte e a disponibilidade destes recursos para geração de energia.

Como principal opção de fonte de energia alternativa ao petróleo em curto prazo, o etanol ganha importância no cenário mundial. Esse combustível apresenta baixo custo de produção, baixos níveis de poluição e, em relação à sua matéria-prima, é considerado renovável (Tokarski, 2005). Em relação aos derivados do petróleo, o etanol possui ainda algumas vantagens que justificam sua importância: maior octanagem (resistência à compressão sem entrar em combustão), maior eficiência de combustão, menor produção de fumaça e resíduos provenientes da queima e, além disso, contribui para a redução da emissão de CO₂ na atmosfera, como determina o Protocolo de Kyoto, uma vez que o gás carbônico emitido pela combustão foi originalmente absorvido do ar pelas plantas utilizadas como matéria-prima (Demain *et al.*, 2005; Lin & Tanaka, 2006; Buckeridge & Goldman, 2011).

O etanol é principalmente produzido pelo processo de fermentação usando como substratos açúcares facilmente extraídos de cana-de-açúcar, milho, beterraba, trigo, mandioca, etc (Gray *et al.*, 2006; Liu & Shen, 2008). Em termos gerais, o processo de produção de etanol começa com a matéria-prima sendo submetida a um pré-tratamento

1.INTRODUÇÃO

ou uma adequação (física, química ou enzimática) para liberação dos carboidratos na sua forma monomérica. Uma vez disponibilizados, é realizada a fermentação alcoólica, em condições anaeróbicas, utilizando mais comumente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O etanol produzido pelo processo fermentativo é então separado por destilação.

No Brasil, o processo de produção do etanol a partir de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração) inicia-se com a moagem da cana, onde se obtém o caldo de cana-de-açúcar com alto teor de açúcar. O caldo é então aquecido para se produzir o melaço com 40% de sacarose em massa. Parte da sacarose se cristaliza formando um açúcar escuro que é refinado e dá origem ao açúcar comum, e com o melaço, faz-se a fermentação adicionando-se leveduras que transformam a sacarose em etanol. O mosto fermentado obtido após a fermentação contém 12% em volume de etanol. O mosto sofre, então, destilação fracionada e assim se obtém uma solução com 96% de etanol e 4% de água em volume.

O Brasil e os EUA são atualmente responsáveis por 70% da produção mundial de etanol. O processo de produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar (substância sacarínea) predomina no Brasil e é considerado o mais econômico em escala mundial – o custo médio de produção de um litro de etanol no Brasil é de US\$ 0,20 enquanto que nos EUA e na Europa esses valores são de US\$ 0,47 (produzido a partir de milho) e US\$ 0,53 (produzido a partir de grãos), respectivamente (Pereira Jr. *et al.*, 2009). Além disso, estudos demonstraram que o etanol de cana-de-açúcar produz 8 unidades de energia renovável para cada unidade de combustível fóssil utilizada em seu ciclo de produção enquanto que o balanço energético de outras matérias-primas raramente passa de duas unidades (Macedo *et al.*, 2008; Buckeridge & Goldman, 2011).

Nos anos 70, o Brasil começou um extensivo programa de incentivos, o Proálcool, para substituir a gasolina pelo etanol a fim diminuir a dependência política e econômica nos períodos de alta dos preços de petróleo. Neste programa, a cana-de-açúcar foi escolhida como a matéria-prima para produção de etanol e, conseqüentemente, os estudos agrícolas e tecnológicos foram intensificados, levando o Brasil a uma posição mais favorável nos termos de segurança energética. O Proálcool fez do etanol parte integrante da matriz energética brasileira. O programa enfrentou desafios ao longo dos anos, mas devido aos altíssimos preços da gasolina, as

preocupações ambientais e a introdução dos veículos *flex fuel* (atualmente, 85% dos automóveis no país são *flex*) o programa cresceu novamente.

O etanol hoje é utilizado como combustível no país tanto na sua forma hidratada como misturado à gasolina (Soccol *et al.*, 2010). Atualmente, mais de 50% do consumo de gasolina no país é substituído por etanol que é processado em cerca de 430 unidades de produção e utilizando apenas 1% das terras cultiváveis do Brasil (3,4 milhões de hectares) (Abramovay, 2009). Segundo dados da UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar) foi evitada a emissão de $25,8 \times 10^6$ toneladas de CO₂ na atmosfera devido ao uso de etanol (Desplechin, 2008). Só nos últimos sete anos, o uso de etanol na frota brasileira evitou a emissão de $103,5 \times 10^3$ toneladas de CO₂ (divulgado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia no Jornal Cana, 2011).

1.2 Etanol de segunda geração

É preciso considerar que apenas uma pequena parte da cana-de-açúcar produzida é utilizada para a produção de bioenergia. Com a demanda cada vez maior, um aumento significativo na produção de etanol seria possível se fossem desenvolvidas tecnologias para converter os polissacarídeos das folhas, das palhas e do bagaço (que representam dois terços da biomassa total) a etanol. O etanol obtido dessa forma é dito de 2^a geração ou lignocelulósico. Tal tecnologia enquadra-se no conceito de biorrefinarias celulósicas, as quais visam o aproveitamento integral e integrado dos resíduos agroindustriais gerados, de modo a agregar valor aos mesmos (Abramovay, 2009).

O bagaço da cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico, proveniente da indústria sucro-alcooleira que compõe, em média, 28% do peso seco da cana-de-açúcar. Durante muito tempo o bagaço foi considerado no Brasil um resíduo industrial, sendo aproximadamente 50% queimado nas caldeiras das usinas, para a cogeração de energia. Com a colheita mecanizada, que está progredindo rapidamente no Brasil, a quantidade disponível de tais materiais tem aumentado. A indústria sucro-alcooleira, que participa com cerca de 2,3% do PIB brasileiro e consome cerca de 340 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, gera como subproduto dessa atividade o bagaço de cana que chega a totalizar até 95 milhões de toneladas por ano (Buckeridge & Goldman, 2011).

Como a matéria-prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção de etanol, havendo casos em que pode representar até 75% desses custos, há

um crescente interesse no aproveitamento destes resíduos agro-industriais como matérias-primas para a produção, não somente de etanol, mas de uma grande gama de substâncias químicas de interesse comercial (xilitol, ácido succínico, ácido lático) (Pereira Jr., 1991). Resíduos lignocelulósicos podem ainda ser obtidos a partir de resíduos municipais e das indústrias de papel, que contribuem, juntamente com os resíduos agrícolas (Demain *et al.*, 2005; Lin & Tanaka, 2006).

Portanto, a tendência dos estudos atuais é de desenvolver processos que permitam um maior aproveitamento do material lignocelulósico gerado da própria atividade agrícola e agro-industrial por meio da produção biotecnológica de substâncias de interesse industrial como o etanol. No caso do Brasil, estima-se que o bagaço excedente, se fosse utilizado na produção de etanol, permitiria duplicar a produção deste combustível sem aumentar as áreas de plantio (CTBE-MCT, 2010; Buckeridge & Goldman, 2011; Cardorna *et al.*, 2010).

1.3 Composição da lignocelulose

A biomassa vegetal é gerada a partir da fixação do dióxido de carbono do ar por plantas verdes pelo processo de fotossíntese. Essa fixação consome anualmente 15% do carbono da atmosfera, e, desse carbono assimilado, metade entra na composição da lignocelulose, que compõem a parede celular das plantas (Sandgren *et al.*, 2005).

A lignocelulose é, portanto, um material orgânico e o maior componente estrutural da parede celular de todas as plantas. É formada por estruturas duras e fibrosas, constituídas por três principais frações poliméricas: duas frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) entremeadas por uma macromolécula composta de álcoois aromáticos (a lignina), além de poucas quantidades de outros materiais, como proteínas e pectina (Figura 1) (Castro, 2006).

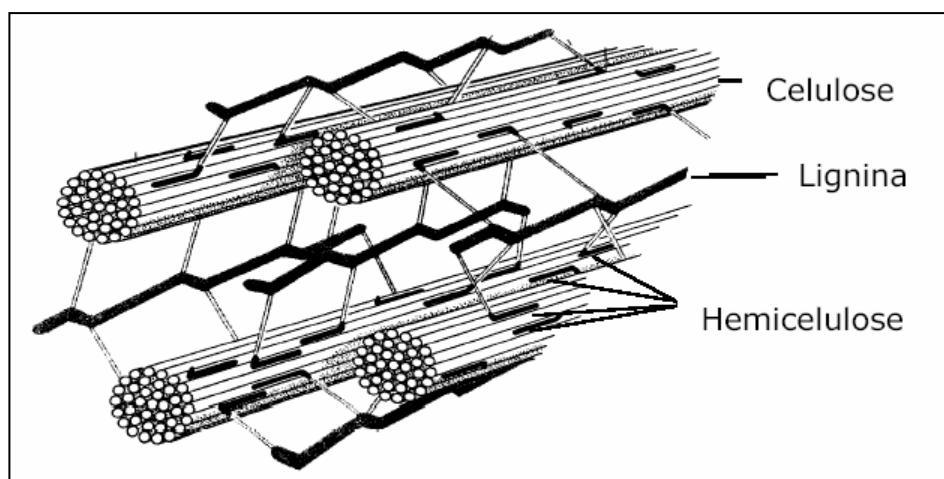


Figura 1. Polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos. Fonte: Pereira Jr., (2005).

Essas frações majoritárias são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais. Dependendo do tipo de planta e de seu estágio de crescimento, 35 a 50% do seu peso seco é composto por celulose, 25 a 35% de hemicelulose e 5 a 30% de lignina (Lynd *et al.*, 2002). O bagaço de cana-de-açúcar contém aproximadamente 46% celulose, 25% hemicelulose, e 21% lignina como principais componentes (Carrot & Carrot, 2007; Abramovay, 2009).

A hemicelulose situa-se entre a celulose e a lignina, apresentando natureza heteropolissacarídica ramificada, formada, principalmente, por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila (Szengyel, 2000). Na estrutura da parede celular, as hemiceluloses mantêm interações covalentes com as moléculas de lignina e não-covalentes com as moléculas de celulose, atuando como um elo químico entre essas frações e mantendo a flexibilidade da parede celular (Carpita, 1996; Polizeli *et al.*, 2005).

A lignina é um polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis que, juntamente com a hemicelulose, reveste a celulose e fornece à parede celular rigidez e proteção contra ataques químicos e enzimáticos. É constituída de unidades de fenil-propano não fermentáveis, e está diretamente envolvida nas ligações cruzadas entre moléculas de xilana e outros polissacarídeos. Apesar de ser um composto macromolecular aromático, a lignina não possui ligações repetitivas entre os resíduos monoméricos constituintes (D’Almeida, 1988).

1.INTRODUÇÃO

De um ponto de vista tecnológico, no entanto, o composto alvo para a produção do etanol de segunda geração é a celulose. A celulose, o polímero orgânico mais abundante do planeta e o maior componente da biomassa vegetal, tem uma estrutura relativamente simples, sendo formada por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e duas pontes de hidrogênio entre O3-O5' e O6-O2'. É um polímero de cadeia longa de peso molecular variável, com a fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$. Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando assim a celobiose, a subunidade repetitiva do polímero (Sandgren *et al.*, 2005) (Figura 2).

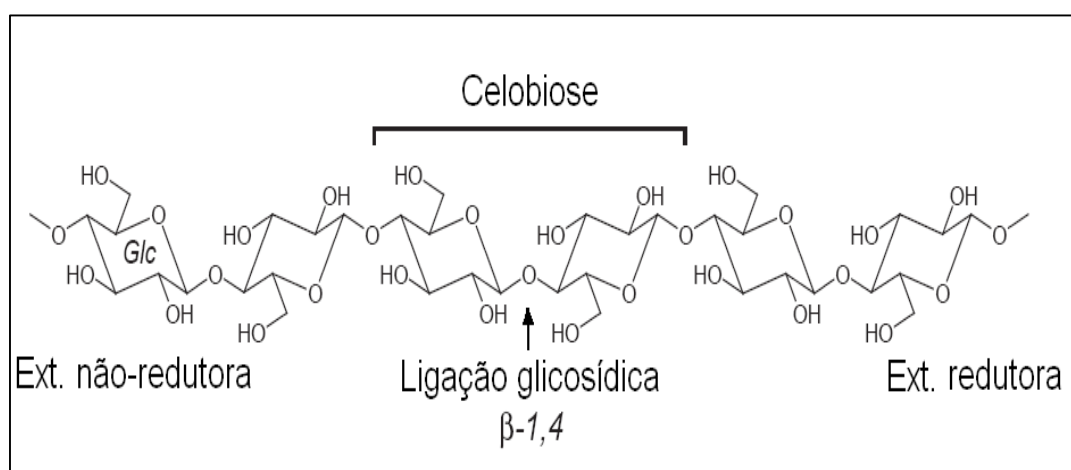


Figura 2. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren, 2005).

Cada microfibrila de celulose é sintetizada independentemente e contém entre 2000 e 20000 resíduos de D-glicose. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose cujo carbono anomérico está livre é chamada extremidade redutora e a outra extremidade em que o carbono está ligado, é chamada não-redutora (Sandgren *et al.*, 2005). A orientação das microfibrilas pode ser paralela ou antiparalela, formando a celulose do tipo I (mais abundante na natureza) ou do tipo II, respectivamente. A união de 30 microfibrilas forma uma fibrila, que reunidas em unidades maiores formam as fibras de celulose (Lodish *et al.*, 2001).

A característica mais importante das fibras de celulose é sua estrutura cristalina: as fibrilas são unidas por ligações de hidrogênio tanto intra- quanto inter-cadeias de celulose. Cada camada adjacente de celulose é ainda unida por forças de van der Waals.

Isso resulta em uma fibra compacta de tal forma que enzimas e até moléculas pequenas, como a água, não conseguem penetrá-la. No entanto, as regiões cristalinas da celulose (~200 resíduos de glucose) são intermediadas por regiões menos compactas, chamadas amorfas, em que as fibras apresentam maior distância uma das outras, com menos ligações de hidrogênio entre si, e entre as moléculas de celulose (Lynd *et al.*, 2002), sendo que, cada parede celular apresenta um grau de cristalização diferente (Klemm *et al.*, 2005).

1.4 Bioprocesso para produção de etanol de segunda geração

Embora a produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar seja relativamente simples, o processo utilizando a celulose presente no bagaço é mais complexo. O processo convencional em desenvolvimento inclui quatro etapas principais:

1) Pré-tratamento. Consiste na quebra da estrutura da matriz lignocelulósica, diminuindo a interação entre os componentes e permitindo a recuperação máxima da fonte de carbono (celulose) para sacarificação e fermentação. É uma das etapas chave para a conversão bem sucedida destes materiais a etanol devido à associação próxima que existe entre os três componentes principais da parede celular das plantas (Gámez *et al.*, 2006). O desafio dos processos de pré-tratamento, é a geração de componentes inibitórios, produzidos como consequência das condições extremas de pH e temperatura utilizados, que podem influenciar negativamente a ação de enzimas e micro-organismos (Olsson *et al.*, 2004). Os métodos de pré-tratamento podem ser categorizados em três grupos: químico (ácido ou base), físico-químico (trituração física ou explosão físico-química a vapor) ou pré-tratamento biológico por micro-organismos (Castro & Pereira Jr., 2010). Não havendo, no entanto, um procedimento geral de pré-tratamento para todos os resíduos lignocelulósicos, devendo cada pré-tratamento ser cuidadosamente escolhido para cada matéria-prima.

2) Hidrólise da celulose. Etapa em que ocorre a despolimerização da celulose à açúcares monoméricos solúveis (glicose) (Dashtban *et al.*, 2009). Em processos de sacarificação é possível aplicação de hidrólise química (ácida ou alcalina) ou hidrólise

catalisada por enzimas. A exigência de condições drásticas relacionadas à hidrólise química da celulose, que leva a formação de compostos inibidores da etapa fermentativa (hidroximetilfurfural) e a degradação de parte dos açúcares liberados, torna preferível a utilização da hidrólise enzimática, comumente conduzida nas condições ótimas de pH e temperatura das enzimas, o que torna a produção de subprodutos insignificantes (Mielenz, 2001).

3) Fermentação. Corresponde à conversão da glicose a etanol, realizada geralmente por leveduras. Os requisitos gerais para um organismo ser utilizado como fermentador na produção de etanol são: altos rendimentos, alta produtividade e alta tolerância ao etanol (Olofsson *et al.*, 2008). Diversos organismos vêm sendo estudados, mas a levedura *S. cerevisiae* continua sendo a principal espécie utilizada para este fim (Bai *et al.*, 2008). Este organismo produz etanol com um alto rendimento (superior a 0,45 g/g) e a uma alta produtividade específica (até 1,3 g/g de célula/hora), além de tolerar altas concentrações de etanol (mais de 100 g/L) (Fukuda *et al.*, 2009).

4) Destilação. Por fim, após os processo fermentativo, o líquido resultante é destilado com o intuito de concentrar o etanol até um nível determinado ou até o limite possível, o azeótropo etanol água (95,5% de etanol) (Margeot *et al.*, 2009). Este azeótropo é comumente comercializado como etanol hidratado, sendo possível a sua utilização direta nos motores automotivos. No entanto, para ser misturado à gasolina, o etanol necessita estar na sua forma anidra, cuja obtenção se dá por meio de processos de desidratação, como o arraste com benzeno ou o uso de absorventes regeneráveis (Pereira Jr., 1991).

Durante o processo de produção de etanol a partir de celulose, podem existir formas de integração das etapas de conversão. A hidrólise enzimática pode ser realizada separadamente da fermentação alcoólica, um processo conhecido como hidrólise e fermentação em separado (SHF - *Separate Hydrolysis and Fermentation*) ou ambos os processos podem ocorrer simultaneamente na sacarificação e fermentação simultânea (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) (Viikari *et al.*, 2012) (Figura 3).

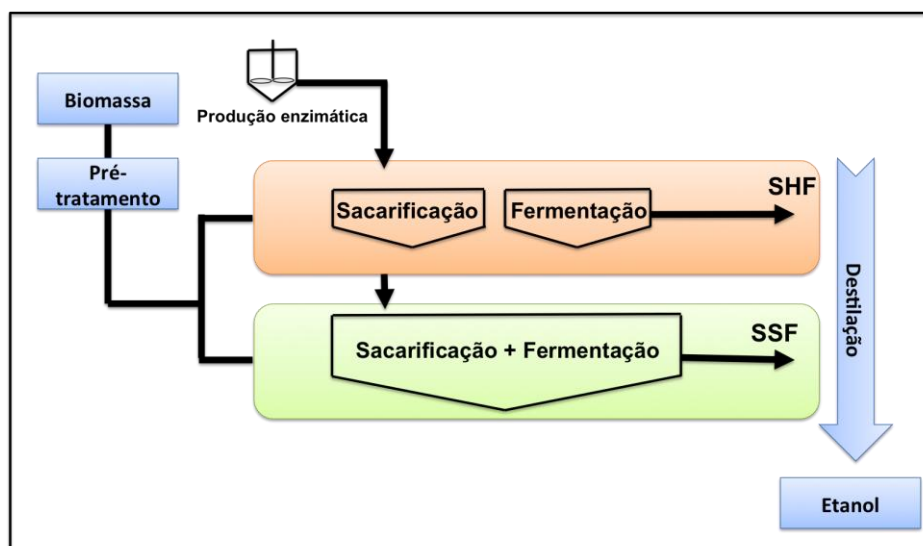


Figura 3. Formas de conversão de biomassas lignocelulósicas a etanol. SHF: Hidrólise e fermentação em separado; SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas.

Atualmente, o processo mais comum para a obtenção de etanol lignocelulósico é o SHF. No SHF, a etapa de pré-tratamento e a hidrólise do material lignocelulósico ocorrem em um estágio separado da fermentação. Uma vez terminada a hidrólise, o resíduo sólido é separado e o sobrenadante é empregado para fermentação pelo micro-organismo escolhido. Nesta estratégia, a etapa de hidrólise pode ser realizada química ou enzimaticamente. Ao ser utilizado um agente químico como catalisador da clivagem, são formados compostos inibidores da fermentação e, dependendo da severidade da hidrólise, podem ser requeridas etapas de destoxificação, o que não permite fermentação simultânea. A hidrólise enzimática, geralmente, é conduzida nas condições ótimas de pH e temperatura das celulases. A dificuldade deste processo reside no acúmulo de glicose e polissacarídeos, provenientes da própria hidrólise enzimática, que atuam como inibidores das enzimas celulolíticas envolvidas, levando a uma hidrólise incompleta da celulose (Wingren *et al.* 2003; McMillan, 2004).

O SSF é uma das configurações mais promissoras do processo de converter biomassa lignocelulósica a etanol. No SSF, a sacarificação e a fermentação da fração celulósica ocorrem em uma única etapa, sendo realizada enzimaticamente a hidrólise da macromolécula, evitando a formação de inibidores, e possibilitando o sinergismo com o micro-organismo fermentador. A glicose produzida pela hidrólise da celulose, que poderia inibir as β -glicosidases e interromper o processo hidrolítico, é consumida pelo

micro-organismo, que ao utilizar essa glicose, reativa o processo enzimático e o produto desejado é obtido no processo fermentativo. Apesar da necessidade de reduzir a temperatura do processo aos níveis ótimos para que as enzimas acomodem organismos fermentadores disponíveis até agora (28-35°C), foi mostrado que o SSF consegue taxas, rendimentos, e concentrações do produto final mais elevados do que o SHF (Soccol *et al.*, 2009), devido principalmente a: redução da inibição enzimática pela glicose formada, o que permite diminuir a quantidade de enzima adicionada ao processo; o alcance de maiores índices de conversão a glicose, pois as reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida; a minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre no meio; e a diminuição da complexidade e do custo do processo pela existência de uma única etapa (Hasunuma & Kondo, 2012).

Considerando-se globalmente a conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol, a conversão pode ainda ser constituída por uma etapa de fermentação de pentoses, proveniente da fração hemicelulósica das matérias-primas. A realização da fermentação de pentoses e hexoses em apenas um reator é chamada de co-fermentação e a condução desta co-fermentação com a hidrólise das frações celulósicas e hemicelulósicas compreende o processo SSCF - Sacarificação simultânea à co-fermentação (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*) (Castro & Pereira Jr., 2010).

A estratégia mais promissora para conversão do material lignocelulósicos, no entanto, envolve a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, hidrólise da biomassa e a conversão de açúcares resultantes aos produtos desejados em um processo de única etapa através de um micro-organismo celulolítico, ou de um consórcio. Tal bioprocessamento consolidado (CBP – *Consolidated Bioprocessing*) pode oferecer reduções de custo se os micro-organismos puderem ser projetados para possuir a combinação de propriedade de utilização do substrato e formação do produto (Lynd *et al.*, 2002). O CBP é o processo de concepção mais complexo devido ao envolvimento de, pelo menos, 3 das etapas em um único equipamento. Para este processo é necessário recorrer à engenharia genética, com o objetivo de se obter um micro-organismo que consiga produzir diversas enzimas que permitam a clivagem dos complexos hemicelulósico e celulósico, e alta habilidade fermentativa, tanto de pentoses quanto de hexoses (Wilson *et al.*, 2009).

A tecnologia para o aproveitamento da celulose já vem sendo desenvolvida em várias partes do mundo. Estima-se que o custo de produção de produção do etanol a partir de resíduos lignocelulósicos varie entre US\$ 0,28-1,010/L em escala de laboratório (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Para uma produção economicamente viável do etanol em escala industrial, torna-se necessário, um alto rendimento da sua produção, que pode ser obtido pelo desenvolvimento técnico científico em várias etapas do processo de produção, desde melhoramentos na coleta, no transporte e estoque dos resíduos, como nos métodos de processamentos da biomassa, integração dos processos, melhoramento dos micro-organismos utilizados e da hidrólise enzimática (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Stephanopoulos, 2008; Wiedemann & Boles, 2008).

1.5 Enzimas celulolíticas

A celulose é uma molécula muito estável a temperatura ambiente, com meia vida de milhões de anos para a ligação *O*-glicosídica, o que implica que praticamente toda a degradação da celulose envolve a ação de enzimas (Zhang *et al.*, 2006).

As enzimas celulolíticas podem ser produzidas por uma grande variedade de organismos, que inclui bactérias, fungos filamentosos, leveduras, plantas e animais (Lynd *et al.*, 2002; Palomer *et al.*, 2004; Castro, 2006), complexadas na superfície das células (celulossomas), ou secretadas no meio (Pérez *et al.*, 2002; Wen, 2009; Lynd *et al.*, 2002). Micro-organismos que possuem celulossomas incluem diferentes espécies de bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Ruminococcus*, que são encontradas em ambientes anaeróbicos. O celulossoma permite que as enzimas atuem nas proximidades da célula e diminui a difusão dos produtos de hidrólise (Lynd *et al.*, 2002). Os fungos celulolíticos e outras bactérias (geralmente aeróbicas) produzem celulasas que, na sua maioria, são secretadas pelas células para fazer a degradação do substrato (Pérez *et al.*, 2002). Esse sistema de degradação de celulose é bastante caracterizado pelos estudos realizados com os fungos aeróbicos, principalmente o *Trichoderma reesei* (Béguin & Aubert, 1994).

O complexo celulolítico é um sistema enzimático induzível. Apesar dos micro-organismos estudados terem produzido níveis mais elevados de celulasas quando crescidos em meio com celulose, a expressão do sistema celulolítico também pode ocorrer pela presença de outros compostos como celobiose, lactose ou sofrorose no meio de cultura. Dessa forma há uma considerável variação no nível de transcrição e no tipo

1.INTRODUÇÃO

de genes de celulases que serão transcritos dependendo da fonte de carbono usada para o crescimento. Por outro lado, a repressão catabólica de carbono é um mecanismo regulatório onde o produto final da hidrólise da celulose interage com proteínas celulares que impede a transcrição dos genes celulolíticos (Rojas Rejon *et al.*, 2007).

As celulases pertencem a família das *O*-glicosil hidrolases (EC 3.2.1.n), que consiste em um grupo de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e um não-carboidrato (Henrissat, 1991; Bourne & Henrissat, 2001). O mecanismo de ação para todas as celulases envolve doação parcial de próton pelo grupo ácido carboxílico da enzima. A hidrólise ocorre com retenção ou inversão da configuração do carbono anomérico, dependendo da natureza do nucleófilo. Se o nucleófilo é um grupo carboxilato da enzima, então um mecanismo de duplo deslocamento ocorre (Lynd *et al.*, 2002).

A hidrólise da celulose envolve a ação de três tipos principais de celulases: as endoglicanases (EG), as exoglicanases (ExG), e as β -glicosidases (BG) (Sun & Cheng, 2002). A Tabela 1 apresenta as classificações das enzimas celulolíticas.

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

Celulase	Enzyme Commission	IUBMB
Endoglicanases	EC 3.2.1.4	1,4- β -D-glicana-4-Glicanoidrolases
Exoglicanases	EC 3.2.1.91	1,4- β -D-glicana-4-Glicanoidrolases
β-Glicosidases	EC 3.2.1.21	β -glicosídeo glicohidrolases

As enzimas do sistema celulolítico foram classificadas com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose (Figura 4). As principais classes são discutidas abaixo:

a) Endoglicanases (EG)

As endoglicanases clivam randomicamente as ligações internas das microfibrilas que se encontram nas regiões menos cristalinas (amorfas), diminuindo o comprimento

das mesmas e, conseqüentemente, gerando novas extremidades livres. Essas enzimas são responsáveis pela solubilização do polímero celulósico devido a sua fragmentação em oligossacarídeos (Castro, 2006). O sítio ativo das endoglicanases possui geralmente a forma de fenda, possibilitando a ação das enzimas ao longo da cadeia de celulose. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas da cadeia.

As endoglicanases são geralmente monômeros sem ou com baixa glicosilação. Em sua maioria, atuam em situações ótimas de pH entre 4,0 e 5,0 e de temperatura entre 50 e 70°C. Estudos mostram que muitos fungos produzem múltiplas endoglicanases como, por exemplo, o *Trichoderma reesei*, que produz ao menos cinco EG (EGI/Cel7B, EGII/Cel5A, EGIII/Cel12A, EGIV/Cel61A e EGV/Cel45A).

b) Exoglicanases (ExG) ou celobiohidrolases (CBH)

As celobiohidrolases agem de maneira progressiva nas extremidades redutoras (CBHI) e não-redutoras (CBHII) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, produzindo uma redução lenta e gradual no grau de polimerização pela liberação de glicose e principalmente, celobiose como produto. O sítio ativo das celobiohidrolases possui geralmente forma de túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise (celobiose) (Martins, 2005).

Similares às EG, as CBH são geralmente monômeros sem ou com baixa glicosilação, com situações ótimas de pH entre 4,0 e 5,0, no entanto, com temperatura ótima de atuação variando entre 37 e 60°C.

c) β -glicosidases (BG)

As β -glicosidases atuam nos resíduos de celodextrina (GP<7) e principalmente celobiose, e os hidrolisam a glicose. São os componentes que regulam a velocidade do processo, pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (Lynd *et al.*, 2002).

1.INTRODUÇÃO

As BG são as celulases com maior variabilidade em relação a sua estrutura e localização. Enquanto algumas BG são monoméricas simples com massa molecular de ~35 kDa (por exemplo, a Bgl de *Pleurotus ostreatus*) outras têm estrutura dimérica (por exemplo, a Bgl de *Sporobolomyces singularis*) com 146 kDa ou mesmo estrutura trimérica com ~450 kDa (por exemplo, a Bgl de *Pisolithus tinctorius*). Além disso, a maioria das BG são glicosiladas e em alguns casos, como a BG monomérica de 300 kDa do fungo *Trametes versicolor*, o grau de glicosilação é de até 90%. Com relação à localização celular, as BG podem ser agrupadas em três diferentes classes: intracelulares, associadas à parede celular ou extracelulares. Não surpreendentemente, as condições ótimas de pH das enzimas variam de acordo com o local de atuação, entretanto, as temperaturas ótimas de atuação variam entre 45 e 75°C (Lynd *et al.*, 2002).

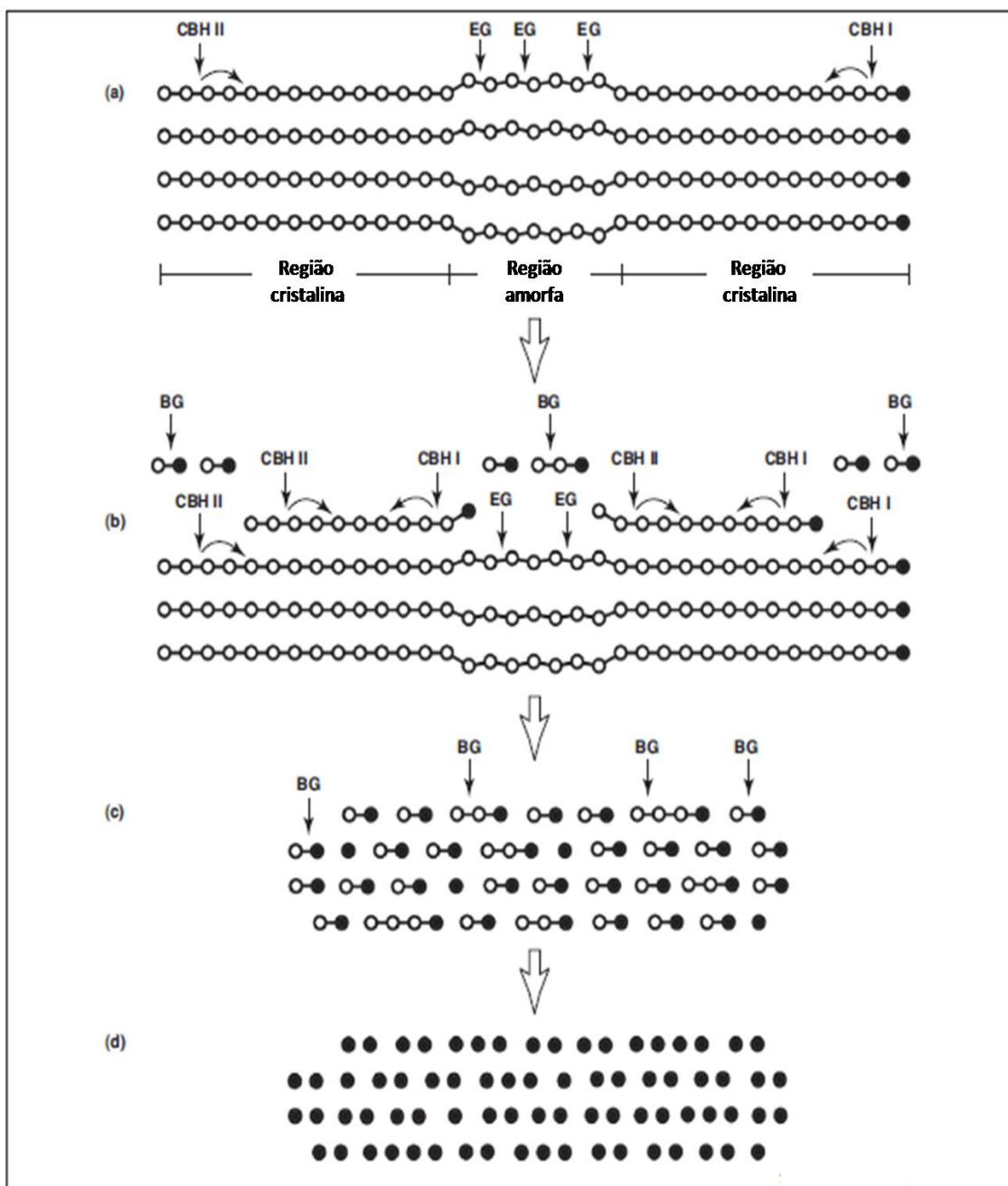


Figura 4. Esquema simplificado da hidrólise enzimática da celulose catalisada pelo sistema celulolítico. (a) Estrutura inicial da celulose; (b) Celulose parcialmente hidrolisada; (c) Solução exterior contendo celobiose como principal produto intermediário; (d) Solução final de glicose. EG) endoglicanases; CBHI e CBH II) exoglicanases; BG) β -glicosidasases (BG) (adaptado de Gusakov *et al.*, 2011).

As enzimas do complexo celulolítico atacam o substrato de forma sinérgica. O sinérgismo resulta em um aumento de eficiência pela ação de dois ou mais componentes de um sistema quando comparado à ação de cada um deles isoladamente. No caso das

celulases, esse sinergismo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação das enzimas isoladas, mesmo entre celulases produzidas por espécies diferentes de microorganismos (Klyosov, 1995). Esse sinergismo foi comprovado a partir de estudos de cada uma das enzimas, separadas e conjuntamente. Endoglicanases hidrolisam as ligações internas nas regiões mais acessíveis (amorfas) da celulose gerando novas extremidades livres. Celobiohidrolases conseguem penetrar nas regiões cristalinas das microfibrilas degradando o polímero de celulose a partir das extremidades geradas pelas endoglicanases. As β -glicosidases complementam a degradação clivando os celooligosacarídeos e celobiose gerados pelas celobiohidrolases. O sinergismo ocorre também entre os diferentes subtipos de celobiohidrolases, uma vez que há enzimas que atacam as extremidades redutoras (CBHI) e outras que atacam as extremidades não-redutoras (CBHII) das fibras de celulose (Lynd *et al.*, 2002).

Com relação a estrutura, a maioria das endoglicanases e exoglicanases de microorganismos celulolíticos possui dois domínios distintos, o domínio de ligação a celulose (CBD - *Cellulose Binding Domain*) e o domínio catalítico (CD - *Catalytic Domain*), que abriga o sítio ativo (Figura 5). Esses domínios estão ligados por meio de uma cadeia polipeptídica flexível (*linker*) O-glicosilada e rica em prolinas, serinas e treoninas. O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato. A função do domínio de ligação ao substrato está associada à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulases na superfície da celulose, por meio de interações não-covalentes, como ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (Martins, 2005). Celulases possuindo apenas o domínio catalítico, sem CBD, são capazes de se ligar a celulose, mas a afinidade de ligação é menor do que aquela encontrada em enzimas com os dois domínios. Há também estudos que mostram que a atividade enzimática é prejudicada quando o *linker* é reduzido ou deletado, sugerindo que seu comprimento é importante para garantir flexibilidade e ação independente dos dois domínios (Srisodsuk *et al.*, 1993).

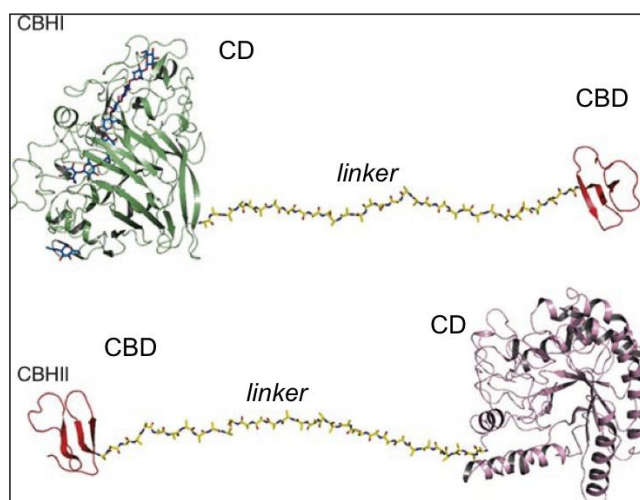


Figura 5. Modelos 3D de CBHI e CBHII. O domínio catalítico (CD, domínios maiores) é ligado por um longo *linker* ao domínio de ligação a celulose (CBD, domínios menores) (adaptada de Buckeridge & Goldman, 2011).

As celulasas ocupam o terceiro lugar no *ranking* mundial das enzimas produzidas industrialmente devido à sua utilização no processamento de algodão, reciclagem de papel, formulação de detergente, extração de sucos, bioestonagem e biopolimento de tecidos, extração de óleo vegetal, entre outras (Dillon, 2004, Wilson, 2009). Os fungos filamentosos são os organismos mais utilizados industrialmente na produção destas enzimas, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* e *Phanerochaete* (Singhania *et al.*, 2010). As empresas, Novozymes e Genencor Danisco, consagradas na produção comercial de enzimas, se destacam na produção de celulasas para conversão de biomassa (Singhania *et al.*, 2010).

As celulasas comerciais são relativamente caras e difíceis de serem produzidas em grandes quantidades, representando uma fração significativa no custo de produção do etanol de 2^a geração, podendo refletir em até 18% do custo operacional de uma planta (Kirk *et al.*, 2002; Cherry & Fidantsef, 2003).

Portanto, a quebra dos polissacarídeos pelo processo enzimático é ainda o maior gargalo econômico e biotecnológico na produção de biocombustíveis. Esta etapa tem sido estudada durante vários anos e apresenta-se como solução para a conversão de biomassa a etanol (Klyosov, 1995, Mielenz, 2001). Além disso, a produção das enzimas hidrolíticas se feita durante o próprio processo de fermentação conduzido por um micro-organismo capaz de produzir não apenas o etanol, mas também todas as enzimas necessárias à hidrólise da celulose, ou um micro-organismo que apresentasse alta

produção *in house* destas enzimas, representaria uma economia no custo total do processo de produção.

1.6 *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expressão heteróloga

S. cerevisiae é um organismo unicelular que se reproduz assexuadamente por brotamento, é anaeróbico facultativo e apresenta fenótipo Kluyver positivo, ou seja, é capaz de produzir etanol na presença de oxigênio em altas concentrações de glicose (0,15 g/L) (Cot *et al.*, 2006; Kingsman & Kingsman, 1988; Leite *et al.*, 2008).

A principal via metabólica envolvida na fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* é a via da glicólise (via Embden-Meyerhof), na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Tal processo bioquímico envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Este aparato está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região que se processa a fermentação alcoólica. Em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de CO₂ (Figura 6). A reação envolve a produção de 2 moles de etanol, 2 moles de CO₂, e 2 moles de ATP por mol de glicose fermentada. Com base em massa, cada grama de glicose pode, teoricamente, produzir 0,51 grama de álcool e 0,49 gramas de CO₂ (Bai *et al.*, 2008). Entretanto, na prática, o rendimento de etanol produzido não excede usualmente 90-95% do valor teórico devido ao requerimento celular de nutrientes para a síntese de nova biomassa celular e outras demandas relacionadas com a manutenção celular, além de reações laterais (normalmente a formação de glicerol e ácido succínico) que podem consumir até 4-5% do substrato total (Basso *et al.*, 2008).

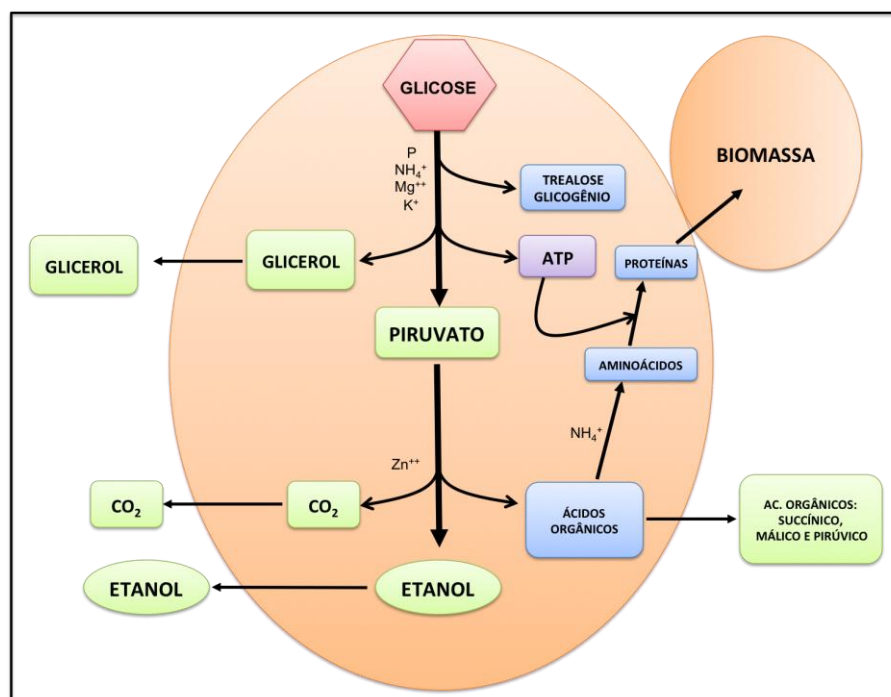


Figura 6. Representação simplificada do catabolismo anaeróbico de *S. cerevisiae*.

A fermentação ocorre em resposta a duas condições: anaerobiose (baixa concentração de oxigênio) e concentrações de glicose (acima de 0,15 g/L de glicose) mesmo na presença de oxigênio, sendo a concentração de glicose o fator primário no controle da fermentação. Quando as leveduras são crescidas na presença de oxigênio, com baixa concentração de açúcar, ou quando a captação de açúcar pelas células é lenta, o complexo da enzima piruvato desidrogenase direciona o fluxo glicolítico para a respiração, já em anaerobiose, ou em altas concentrações de açúcar, a fermentação é favorecida, pois o carbono excedente não direcionado para a respiração é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase favorecendo a fermentação (Badotti, 2005; Ferea *et al.*, 1999; Postma *et al.*, 1989). Em anaerobiose, a atividade da via glicolítica aumenta em até 8 vezes para compensar a baixa produção de ATP. O objetivo primordial da levedura ao metabolizar o açúcar, é gerar o ATP (energia química) que será empregada na realização dos trabalhos fisiológicos e biossínteses necessários à manutenção e reprodução da célula. O etanol e o CO₂ resultantes constituem produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula (Bai *et al.*, 2008).

A levedura *S. cerevisiae* apresenta várias características desejáveis para a obtenção de produtos de base (*commodities*), incluindo robustez em ambientes industriais, ser um organismo seguro (GRAS – *Generally Regarded as Safe*)

1.INTRODUÇÃO

(Ostergaard *et al.*, 2000) e facilmente manipulado geneticamente pela tecnologia do DNA recombinante. A expressão heteróloga em *S. cerevisiae* é facilitada por possuir um protocolo de transformação simples e uma taxa de recombinação homóloga muito eficiente *in vivo*, além de a levedura possuir um plasmídeo natural, o 2 μ , que permite a construção de vetores para a transferência de genes e sistemas de expressão (Brandão, 1996). A levedura secreta apenas 0,5% de suas proteínas, podendo este nível ser aumentado pela secreção de uma proteína heteróloga. Durante as últimas décadas os estudos em engenharia genética têm permitido criar linhagens de *S. cerevisiae* capazes de produzir proteínas de interesse em grandes quantidades.

As enzimas do sistema celulolítico de diversos micro-organismos já foram expressas em *S. cerevisiae* como exemplificado na Tabela 2. A maioria dos trabalhos relata bons níveis de produção e secreção para o meio de cultura quando o gene da enzima recebe um peptídeo sinal. Segundo Minamiguchi *et al.* (1995), os níveis de glicosilação da enzima, quando existentes, não aumentam significativamente a massa molecular da enzima em relação ao tamanho da nativa e não interferem na atividade enzimática.

Tabela 2. Exemplos de celulasas produzidas por expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae*.

Celulase	Origem	Referência
Cel7B e Cel5A	<i>Penicillium decumbens</i>	Wei <i>et al.</i> (2010)
Endoglicanase 1 e 3	<i>Thichoderma longibrachiatum</i>	Lynd <i>et al.</i> (2002)
Endoglicanase	<i>Clostridium thermocellum</i>	Jeon <i>et al.</i> (2009a)
EGII e CBHII	<i>Thichoderma reesei</i>	Fujita <i>et al.</i> (2004)
CBHI	<i>Thichoderma reesei</i>	Den Haan <i>et al.</i> (2007)
CBH1	<i>Talaromyces emersonii</i>	Ilmén <i>et al.</i> (2011)
C4cel7	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	Ilmén <i>et al.</i> (2011)
β -Glicosidase	<i>Cellulomonas biazotea</i>	Rajoka <i>et al.</i> (2003)
BGL1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	McBride <i>et al.</i> (2005)
		Jeon <i>et al.</i> (2009a,b)
		Shen <i>et al.</i> (2008)
BGL4	<i>Humicola grisea</i>	Benoliel <i>et al.</i> (2010)
BGL1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Tokuhiro <i>et al.</i> (2008)

No entanto, diferentemente das endoglicanases e celobiohidrolases que são facilmente secretadas pela *S. cerevisiae*, as β -glicosidases, em sua maioria, apresentam certa dificuldade, permanecendo intracelular ou no espaço periplasmático. Para contornar esse problema diversos trabalhos tem optado por meio da engenharia de superfícies de células (YSD - *Yeast Surface Display*), ancorar essas enzimas na parede celular da levedura *S. cerevisiae* por meio, principalmente, da fusão genética das enzimas com a porção C-terminal da α -aglutinina, proteína naturalmente ancorada na parede celular da levedura, sem perda das suas funções. Dessa forma, tem-se conseguido construir linhagens de *Saccharomyces* capazes de crescer em meio com celobiose como única fonte de carbono (Katahira *et al.*, 2006; van Rooyen *et al.*, 2005; McBride *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2004; Yanase *et al.*, 2010). Ancorar a BGL1 de *S. fibuligera* na superfície celular de *S. cerevisiae* através da fusão da proteína madura com a região de ancoragem da α -aglutinina permitiu que a linhagem recombinante crescesse em celobiose a uma taxa praticamente igual ao crescimento em glicose em condições anaeróbias (van Rooyen *et al.*, 2005). Uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante expressando BGL1 de *S. fibuligera* também ancorada à parede celular, utilizou 5,2 g/L de celobiose e produziu 2,3 g/L de etanol em 48 h, enquanto que *S. cerevisiae* secretando BGL1 para o meio de cultura utilizou apenas 3,6 g/L de celobiose e produziu 1,5 g/L de etanol durante o mesmo período (Guo *et al.*, 2011).

Recentemente, uma nova estratégia vem sendo abordada para permitir o crescimento da levedura em celobiose. Tal estratégia consiste na expressão de transportadores de celodextrinas, além da expressão de uma β -glicosidase intracelularmente (Galazka *et al.*, 2010; Ha *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2011). Galazka *et al.* (2010) construíram uma *S. cerevisiae* recombinante capaz de expressar a β -glicosidase intracelular GH1-1 e o transportador de celodextrinas CDT-1, ambos do fungo *Neurospora crassa*, e crescer em celobiose. Guo *et al.* (2011), utilizando a mesma estratégia, mostraram que uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* co-expressando a BGL1 de *S. fibuligera* e uma β -glicosil permease de *Bacillus subtilis* cresceu em celobiose, sendo mais eficiente do que a expressão da mesma β -glicosidase ancorada a parede celular ou secretada para o meio de cultura.

A produção direta de etanol a partir de celulose tem também sido relatada através da co-expressão de genes de celulasas envolvidos na reação de hidrólise da

1.INTRODUÇÃO

celulose na levedura *S. cerevisiae*, como mostrado na Tabela 3. Fujita *et al.* (2004) produziram etanol a partir de PASC, sem a adição de celulases, utilizando uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* ancorando na superfície da célula as celulases EGII e CBHII de *T. reesei* e BGL1 de *A. aculeatus*. O rendimento de etanol produzido a partir de PASC consumido foi de 0,45 g/g, o que corresponde a 88,5% do rendimento teórico.

1.INTRODUÇÃO

Tabela 3. Exemplos recentes de produção direta de etanol a partir de fontes de celulose e celobiose por linhagens de *S. cerevisiae* expressando enzimas celulolíticas.

Enzimas	Localização	Substrato	Produção de etanol	Tempo	% do valor teórico	Referência
EngD - <i>C. cellulovorans</i> BGL1 - <i>S. fibuligera</i>	Extracelular	β -glicana 20 g/L CMC 20 g/L Celobiose 50 g/L	9,15 g/L 11,03 g/L 7,5 g/L	40 h 40 h 50 h	80,3% - -	Jeon <i>et al.</i> , 2009b
EGLII e CBH II - <i>T. reesei</i> BGL1 - <i>A. aculeatus</i>	Parede celular	PASC 10 g/l	2,9 g/L	40 h	88,5%	Fujita <i>et al.</i> , 2003
EGLII - <i>T. reesei</i> BGL1 - <i>S. fibuligera</i>	Secretada	PASC 10 g/l	1 g/L	192 h	73%	Den Haan <i>et al.</i> , 2007
EGLII e CBHII - <i>T. reesei</i> BGL1 - <i>A. aculeatus</i>	Parede celular Extracelular	PASC 10 g/L PASC 10 g/L	2,1 g/L 1,6 g/L	60 h 60 h	-	Yanase <i>et al.</i> , 2010
Endoglicanase - <i>C. thermocellum</i> BGL1 - <i>S. fibuligera</i>	Extracelular	β -glicana 20 g/L CMC 20 g/L PASC 10 g/L	9,67 g/L 8,56 g/L 7,16 g/L	16 h 28 h 36 h	- - -	Jean <i>et al.</i> , 2009a
BGL1 - <i>S. fibuligera</i> Permease - <i>B. subtilis</i>	Intracelular	Celobiose 10 g/L	0,414 g/L	96 h	94%	Guo <i>et al.</i> , 2011
EGLII e CBHII - <i>T. reesei</i> BGL1 - <i>A. aculeatus</i>	Extracelular	10% Palha de milho (Peso seco/v)	2,6 % v/v	120 h	63%	Khramtsov <i>et al.</i> , 2011
BGL1 Enzimas de assimilação da xilose	Parede celular Extracelular	Celobiose 90 g/L e Xilose 60 g/L	57,4 g/L	48 h	73,8%	Saitoh <i>et al.</i> , 2010
EGL/CBH/BGL	Parede celular	PASC 20 g/L	7,6 g/L	72 h	75%	Yamada <i>et al.</i> , 2011
GH1-1 e transportador CDT-1 <i>N. crassa</i>	Intracelular	Celobiose 20g/L	8,8 g/L	96 h	86,3%	Galazka <i>et al.</i> , 2010

1.7 *Pichia pastoris* como sistema de expressão heteróloga

P. pastoris por oferecer economia, fácil manipulação e altos níveis de expressão é um hospedeiro adequado para a síntese de celulases recombinantes, para ser utilizada na produção de etanol de 2^a geração. Como as celulases comercializadas são um produto de alto custo, a produção *in house* destas enzimas diminuiria os custos do processo.

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica muito utilizada na expressão de proteínas heterólogas para pesquisa básica e uso industrial. Usando este sistema, mais de 400 proteínas já foram expressas com graus variados de sucesso (Cregg *et al.*, 2001). Dentre as características vantajosas de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga, destacam-se as seguintes: a levedura desfruta do status GRAS, é de fácil manipulação genética, expressa proteínas em altos níveis, e possui uma via eucariótica de secreção capaz de promover modificações pós-traducionais como formação de pontes dissulfeto, *O*- e *N*-glicosilação e processamento de sequências sinais (Hohenblum *et al.*, 2004). Além disso, nesta levedura as proteínas são glicosiladas de forma mais semelhante aos metazoários (em média, 8-14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos) (Bretthauer & Castellino, 1999). Esse sistema é também considerado de uso rápido, fácil, e mais econômico que os sistemas de expressão derivados de eucariotos superiores, como os sistemas baseados em cultura de células de mamíferos (Gellissen, 2000).

O eficiente e altamente regulável promotor do gene codificador da álcool oxidase 1 (*AOX1*) é o mais usado em vetores de expressão comerciais para dirigir a expressão de genes heterólogos. A expressão de álcool oxidase 1 é controlada em nível transcricional: em células crescidas em metanol ~5% do RNA poliA⁺ provém da transcrição do gene *AOX1* enquanto que em células crescidas em outras fontes de carbono, o mensageiro *AOX1* é indetectável (Cregg *et al.*, 2002). A regulação do gene é controlada por dois mecanismos: um envolvendo repressão/desrepressão e outro, indução. O promotor *AOX1* é fortemente reprimido quando as células crescem em glicose e na maioria das outras fontes de carbono. Contudo, a ausência de uma fonte de carbono repressora no meio não resulta em uma transcrição substancial do *AOX1*, sendo, a presença de metanol como única fonte de carbono, essencial para a indução de

altos níveis de proteína (constituindo mais de 30% do total de proteínas solúveis) (Tschopp *et al.*, 1987).

As técnicas requeridas para a manipulação molecular de *P. pastoris*, tais como: transformação, substituição gênica e clonagem por complementação funcional, são semelhantes às descritas para *S. cerevisiae* (Cregg & Cereguino, 2001). A expressão de proteínas heterólogas embora possa ser realizada em culturas de frascos, níveis proteicos são tipicamente maiores em culturas de fermentadores. Uma vez que o meio definido de sais para *P. pastoris* (contendo apenas glicerol ou metanol, biotina, sais, elementos traços e água) é econômico e bem definido, esta levedura é ideal para produção em larga escala (Cregg *et al.*, 2001).

Assim como em *S. cerevisiae*, genes de celulasas de diversos micro-organismos têm sido rotineiramente clonados e expressos nesta levedura para a produção em escala industrial. Desta forma, utilizando fungos filamentosos como doadores de genes, Ding *et al.* (2001), isolaram um gene de endoglicanase de *Volvariella volvacea*, e expressaram em *P. pastoris*. A atividade enzimática específica alcançou valores de 241 U/mg de proteína. Da mesma forma, o gene da endoglicanase *cel12* isolado de *Fomitopsis palustri*, apresentou atividade enzimática quando expresso em *P. pastoris* de 118,21 U (Byeong-Cheo *et al.*, 2008). Uma endoglicanase do fungo *Penicillium decumbens* foi também expressa em *Pichia* e apresentou atividade sobre celulose amorfa (PASC) obtendo como principais produtos de hidrólise: celobiose, celotriose e celotetrose (Liu *et al.*, 2010). A β -glicosidase termotolerante (BGL1) isolada do fungo endofítico *Periconia* sp., foi expressa com sucesso em *P. pastoris* e apresentou as mesmas situações ótimas de temperatura e pH quando comparada à enzima nativa (Harnpicharnchai *et al.*, 2009). Mais recentemente, Samanta *et al.* (2012) isolaram o gene da endoglicanase II de *T. reesei* e expressaram em *P. pastoris* sob o controle do promotor *AOX1*. A atividade específica da endoglicanase II foi de 220,57 U/mg de proteína, no entanto, foi observado um aumento da massa molecular provavelmente devido a hiperglicosilação, o que não alterou a temperatura ou o pH ótimo da enzima quando comparada a nativa. Genes de leveduras também foram expressos em *P. pastoris*. Uma carboximetilcelulase da levedura *Cryptococcus* sp. (CSCMCCase), foi expressa com sucesso sob o controle do promotor *AOX1*. A produção heteróloga foi 657 vezes maior do que a produção pela levedura nativa (Thongekkaew *et al.*, 2008). A β -glicosidase 1 da levedura *S. fibuligera* foi também eficientemente expressa no

sobrenadante da levedura *P. pastoris*, alcançando 47 U/mL no meio de cultivo (Shao *et al.*, 2005).

Uma estratégia que está sendo muito utilizada para aumentar a expressão de genes em *P. pastoris* é a otimização dos códons do gene de interesse pelos códons preferenciais utilizados pela levedura. A endoglicanase 1 (E1) de *Acidothermus cellulolyticus*, usada extensivamente nas pesquisas sobre celulasas, teve os códons otimizados para expressão em *Pichia* e alcançou 550 mg/L no sobrenadante da cultura. A endoglicanase (EGL) do fungo *Aspergillus niger* foi também expressa em *P. pastoris* após otimização dos códons e apresentou 220,7 U/mL de atividade sobre CMC 1% quando cultivada em biorreator (Shumiao *et al.*, 2010). O gene para a 1,3-1,4- β -D-glicanase de *Fibrobacter suc.* truncado foi otimizado e expresso em *P. pastoris*, utilizando a sequência do peptídeo sinal de *S. cerevisiae* (fator α). A produção da endoglicanase resultante foi surpreendentemente alta chegando a 3 g/L (Huang *et al.*, 2008). Mellitzer *et al.* (2012), expressaram com códon otimizado a CBHII do fungo *T. reesei* e conseguiram o alto rendimento de 5,984 g/L de enzima.

Apesar de existirem poucos exemplos de expressão de proteínas de ≥ 10 g/L, existem muitos exemplos de expressão de ≥ 1 g/L, elevando *P. pastoris* para um dos mais produtivos sistemas de expressão eucariótica disponíveis (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Por tudo isso, o sistema de expressão de *P. pastoris* tem sido cada vez mais utilizado e tem-se mostrado como uma atraente alternativa para a hiperexpressão de genes heterólogos para fins biotecnológicos.

1.8 Desenvolvimento de linhagens de leveduras produtoras de celulasas *in house*

Desde 2004, a Petrobras tem desenvolvido pesquisas junto a universidades públicas para viabilizar a produção de etanol lignocelulósico, considerado a segunda geração de biocombustíveis como alvo estratégico da empresa. No dia 25/10/2007, a empresa inaugurou no seu Centro de Pesquisa (CENPES), localizado no Rio de Janeiro, a primeira unidade experimental brasileira para a produção, em escala-piloto, de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar pelo processo de SSF. No entanto, o impedimento central a uma utilização mais difundida do SSF é ainda o alto custo e o baixo rendimento na produção de etanol. As celulasas empregadas nas etapas iniciais do SSF

na hidrólise da celulose são produzidas separadamente, fato este que aumenta significativamente os custos do processo.

Tradicionalmente, proteínas são co-expressas em micro-organismos recombinantes pela criação de simples fusões, onde o produto primário contém sequências *linkers* de clivagem tais como sítios de reconhecimento de proteases ou de clivagem proteolítica (de Felipe *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2010; Osborn *et al.*, 2005). Para reduzir a quantidade de construções para a expressão das três celulases necessárias para a degradação da celulose, e permitir futuramente que possa ser realizado um ajuste estequiométrico das celulases produzidas, os genes para duas enzimas celulolíticas serão arranjados *in tandem*, separados pela sequência 2A ou pelo sítio de reconhecimento da endoprotease Kex2p.

O gene *KEX2* de *S. cerevisiae* codifica para uma endoprotease de membrana que é responsável pela clivagem sítio-específica de um par de resíduos de aminoácidos (Lys-Arg) no precursor do fator α . A enzima Kex2p é uma serina-protease dependente de íons cálcio presente no complexo de Golgi, destinada a processar as proteínas na via secretória. A proteólise sítio específica é um aspecto na maturação de proteínas e tem uma ação crucial na ativação de muitas delas. A incorporação de sítios de clivagem para a endopeptidase KEX2 é um recurso muito utilizado para criar fusões gênicas que serão clivadas *in vivo* quando passarem pelo complexo de Golgi, secretando proteínas independentes para o meio. Tem sido extensivamente utilizada para expressão heteróloga de fusões gênicas em leveduras e fungos (Broekhuijsen *et al.*, 1993; Bae *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2004).

O uso da sequência 2A do vírus da febre aftosa (FMDV - *Foot-and-Mouth Disease Virus*) é uma estratégia alternativa que vem sendo recentemente utilizada para criar construções multicistronicas capazes de gerar múltiplas proteínas a partir do mesmo transcrito (Osborn *et al.*, 2005).

Estudos iniciais revelaram que a sequência 2A - compreendendo a região de 18 resíduos de aminoácidos de 2A assim como a prolina do N-terminal da proteína 2B (imediatamente após 2A) - é capaz de mediar a clivagem de forma co-traducional, ou seja, na passagem pelo ribossomo, em seu próprio C-terminal. Quando esta sequência de oligopeptídeo é introduzida entre proteínas repórteres para criar uma poliproteína artificial, as proteínas são clivadas eficientemente de forma análoga ao vírus, com 90% do produto sendo traduzido na forma clivada (Ryan & Drew, 1994). Mais recentemente

foi comprovado que a adição de sequências ao N-terminal de 2A (14 resíduos de aminoácidos, ou mais, da proteína do capsídeo 1D) aumenta a atividade de auto-clivagem para 99% (Donnelly *et al.*, 2001a). A sequência 2A, após a clivagem, fica localizada como uma extensão C-terminal da proteína *upstream* desta sequência e todos os produtos de segmentação *downstream* de 2A contêm uma prolina no N-terminal (Donnelly *et al.*, 2001b).

A segmentação mediada por 2A já foi demonstrada em todas as células eucarióticas testadas até agora (mamífero, inseto, leveduras, fungo, planta). Genes fusionados utilizando o peptídeo 2A foram expressos com sucesso sendo o transcrito clivado em proteínas independentes e funcionais quando expressas nas leveduras *S. cerevisiae* e *P. pastoris* (de Felipe *et al.*, 2003; Roongsawang *et al.*, 2010).

O presente projeto, que é apoiado financeiramente pela Petrobras, visa abordar este problema pelo desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae*, modificada geneticamente que possa fornecer quantidades constantes de celulases (atividade de endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase) durante todo o processo fermentativo, reduzindo o efeito inibitório da celobiose e da glicose e tornando o SSF mais produtivo. Assim como, a construção de uma linhagem da levedura *P. pastoris*, conhecida por expressar grandes quantidades de proteínas heterólogas, capaz de produzir celulases, para complementar a produção pela levedura fermentadora, evitando a necessidade da importação de enzimas.

As celulases escolhidas para serem utilizadas neste trabalho são celulases de fungos com sistema celulolítico já caracterizados, e conhecidas por terem alta atividade sobre seus substratos:

- **Endoglicanase II do fungo *T. reesei* (Cel5A).** É uma das mais abundantes enzimas secretadas pelo fungo (10% do total de proteínas secretadas) (Goyal *et al.*, 1991). É a enzima com maior atividade hidrolítica, sendo responsável por grande parte da atividade de endoglicanase (55%) produzida por *T. reesei* (Suominen *et al.*, 1993). Possui um domínio de ligação a celulose (CBD), pH de atuação ótimo em torno de 4,6-4,8, temperatura ótima entre 50-55°C e 40 kDa. Já foi extensivamente expressa em *S. cerevisiae* mostrando-se ativa e com características semelhantes a nativa (Qin *et al.*, 2008).

- **Celobiohidrolase I.1 do fungo *P. chrysosporium*.** Corresponde a celobiohidrolase CBH1.3 descrita por Covert *et al.*, (1992). É a celobiohidrolase mais secretada pelo fungo quando na presença de celulose. Apresenta domínio de ligação a celulose na região C-terminal. Quando expressa na levedura *S. cerevisiae* MFL apresentou 95-98% do total da atividade no meio de cultura, pI 4,7, e massa molecular estimada em ~70 kDa, provavelmente devido a glicosilação já que sua massa predita é de 54,9 kDa.
- **β -Glicosidase 4 do fungo *H. grisea* var *thermoidea*.** A BGL4 é a enzima que mostrou maior atividade sobre a celobiose dentre todas as seis β -glicosidases purificadas do fungo *H. grisea* (Takashima *et al.*, 1999). Quando expressa em *S. cerevisiae*, a enzima recombinante caracterizada apresentou pH ótimo de 6,0, temperatura ótima de 40°C (próxima à temperatura ideal de fermentação) e, em especial, tolerância à inibição competitiva por glicose, apresentando um K_i de 70 mM, alto em comparação com os valores de K_i geralmente encontrados 5-10 mM. Porém, quando o gene *bgl4* foi expresso em uma linhagem laboratorial de levedura, a enzima, apesar de funcional, mostrou-se retida no periplasma, tornando a levedura incapaz de usar celobiose como fonte de carbono (Benoliel *et al.*, 2010).
- **β -Glicosidase BGL1 de *S. fibuligera*.** A BGL1 é uma das duas β -glicosidases produzidas por este fungo, e a única com atividade de hidrólise de celobiose. Apresenta 220 kDa, temperatura e pH ótimos de 50°C e 4,8, respectivamente (Chi *et al.*, 2009). Diversos trabalhos já expressaram com sucesso a BGL1 em *S. cerevisiae*. As leveduras recombinantes foram capazes de secretar a enzima e crescer em meio contendo celobiose como única fonte de carbono (McBride *et al.*, 2005; Den Haan *et al.*, 2007; van Rooyen *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que quando ancorada a parede celular permite o crescimento da levedura em celobiose (Zhang *et al.*, 2012).
- **β -Glicosidase intracelular GH1-1 do fungo *N. crassa* e transportador de celodextrinas *cdt-1*.** A β -glicosidase GH1-1 é a enzima intracelular mais relevante produzida pelo fungo *N. crassa* quando induzido por celulose

(Znameroski *et al.*, 2012). Apresenta 55 kDa e é capaz de degradar celobiose, celotriose e celotetraose (Ha *et al.*, 2010). Embora pouco caracterizada, esta enzima vem sendo utilizada em trabalhos recentes, juntamente com o transportador CDT-1 (NCU00180). O transportador CDT-1 é um dos sete transportadores que tem sua transcrição aumentada quando o fungo é crescido em meio com celulose. Sua deleção impede o consumo de celobiose, celotriose e celotetraose pelo fungo. Embora tenha alta afinidade por celobiose (K_m de $4,0 \pm 0,3 \mu M$), celodextrinas são também transportadas, nos dois sentidos (Galazka *et al.*, 2010).

A linhagem de *S. cerevisiae* escolhida para o trabalho, a MFL, possui algumas características desejáveis do ponto de vista industrial como alta produtividade de etanol, resistência a estresses e tolerância ao etanol. A linhagem MFL é considerada “semi-industrial”, pois é um mutante auxotrófico da linhagem FTPT472 isolada de um fermentador industrial da Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello em Campinas (São Paulo).

A levedura *P. pastoris*, que não secreta nenhuma enzima lignocelulósica endógena em quantidades significantes, permite a produção de preparações de enzimas celulolíticas heterólogas quase puras sem a necessidade de processamentos caros e custosos. Além disso, o requerimento de meios simples e facilidade de utilização em biorreatores permitem produção em larga escala com baixo custo (Mellitzer *et al.*, 2012).

O presente projeto apresenta um forte apelo de inovação tecnológica com imediatas aplicações em uma das áreas mais estratégicas da economia nacional, a produção de biocombustíveis. O projeto foi conduzido a fim de desenvolvermos estratégias para a produção de celulasas em leveduras, o primeiro passo para viabilizar a produção de etanol lignocelulósico. Espera-se, portanto, reduzir os custos inerentes à importação de enzimas, tornando viável a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

2.1 Geral

Desenvolver linhagens recombinantes das leveduras *S. cerevisiae* e *P. pastoris* produtoras de enzimas celulolíticas a fim de serem empregadas em processos para a produção de etanol a partir de celulose.

2.2 Específicos para construção de linhagens de *S. cerevisiae*

- Construir linhagens da levedura *S. cerevisiae* que expressem os genes das três classes de celulasas (endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase), separadamente, e avaliar as atividades enzimáticas produzidas;
- Criar fusões gênicas com os genes da endoglicanase e da exoglicanase utilizando a sequência 2A e o sítio de clivagem para a protease Kex2p como sequências *linkers* de clivagem;
- Construir linhagens da levedura *S. cerevisiae* que expressem as duas diferentes fusões gênicas e comparar os sistemas quanto às atividades enzimáticas produzidas;
- Co-expressar os genes das três classes de celulasas em uma única linhagem de *S. cerevisiae* e avaliar as atividades enzimáticas produzidas.

2.3 Específicos para construção da linhagem de *P. pastoris*

- Clonar os genes em fusão gênica em vetor integrativo de expressão induzida (promotor *AOX1*) em *P. pastoris*;
- Construir linhagem de *P. pastoris* GS115 (expressão induzida) que expresse as celulasas EGLII e CBHI.1 e selecionar o transformante com maior produção;
- Analisar a atividade enzimática.

3. ESTRATÉGIAS

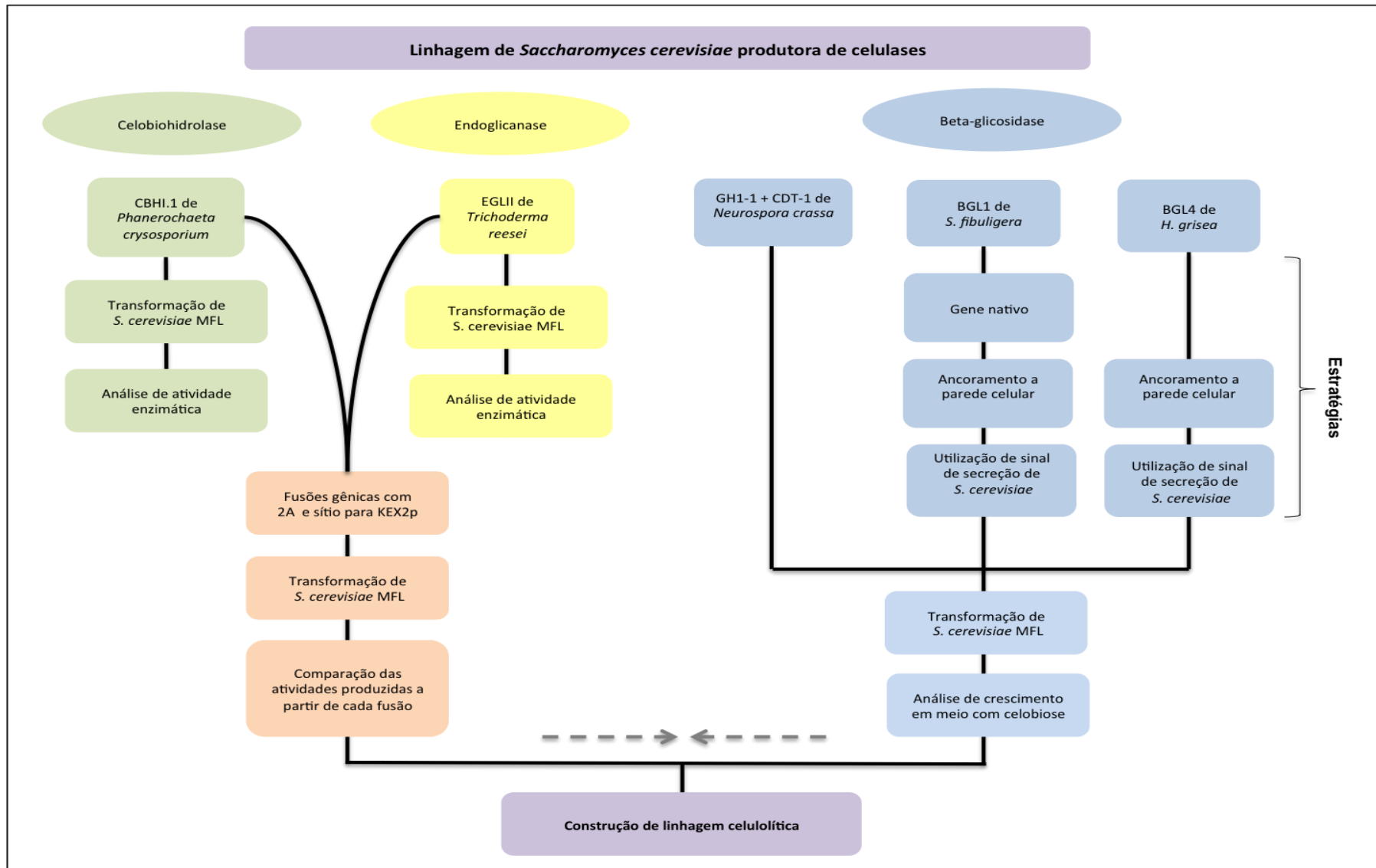


Figura 7. Estratégia para construção de linhagem celulolítica de *S. cerevisiae*.

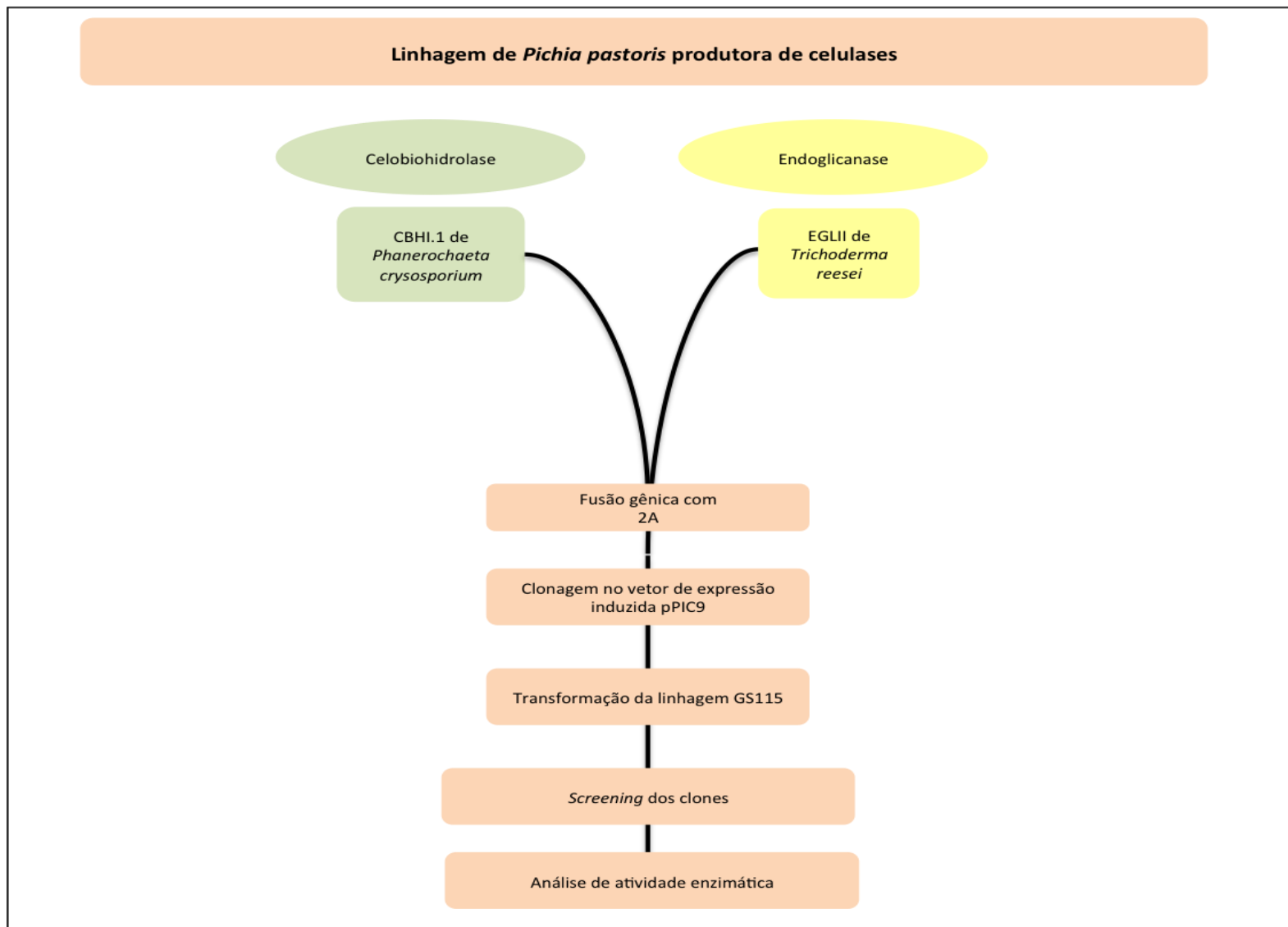


Figura 8. Estratégia para construção de linhagem celulolítica de *P. pastoris*.

4.1 Micro-organismos utilizados

4.1.1 Bactérias

Escherichia coli linhagem DH5 α (Gibco BRL) – *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) IU169 dcoR phoA.*

4.1.2. Leveduras e fungos

Saccharomyces cerevisiae linhagem MFL – *leu2*.

A MFL é considerada uma linhagem semi-industrial, pois é um mutante auxotrófico para o gene *LEU2* da linhagem FTPT472 isolada de um fermentador industrial na Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello em Campinas (São Paulo).

Trichoderma reesei linhagem RUT C-30 (ATCC 56765).

Linhagem hipersecretora mais amplamente utilizada para produção de enzimas celulolíticas, obtida após três rodadas de mutações aleatórias da linhagem selvagem QM6a.

Saccharomycopsis fibuligera linhagem selvagem DSM-70554. Cedida gentilmente pelo Prof. João Atílio Jorge, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Neurospora crassa linhagem selvagem FGSC 424. Cedida gentilmente pelo Prof. João Atílio Jorge, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Pichia pastoris linhagem GS115 *his4* (Invitrogen).

As linhagens *his4* possuem uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) para permitir a seleção do vetor de expressão contendo o gene *HIS4* após transformação.

4.2 Enzimas

Taq DNA polimerase – *Phusion High Fidelity* (New England Biolabs) utilizada como indicado pelo fabricante.

Enzimas de restrição

As enzimas NotI, BglII, BamHI, XbaI, EcoRV, SacI, BstEII, SalI e HindIII foram obtidas da New England Biolabs e Fermentas Life Sciences e utilizadas como indicado pelo fabricante.

Enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) – utilizada na concentração de 40 U/L nas reações de ligação.

RNase A

RNase A (“DNase-free”) 10 mg/mL

Acetato de sódio pH 4,8 50 mM

Fervida em banho-maria por 10 minutos

Novozyme (Novo Biolabs) – utilizada na concentração 100 mg/mL para extração de DNA total de leveduras.

Fosfatase Antartica (New England Biolabs) – fosfatase alcalina utilizada para a remoção de grupos fosfato 5’ de vetores previamente digeridos com enzima de restrição.

4.3 Marcadores

Marcadores de DNA (Anexo 1)

O’GeneRuler 1kb Plus DNA *Ladder* Invitrogen;

Ladder 1kb Gibco;

2 log DNA *Ladder* New England Biolabs;

DNA de fago λ digerido com EcoRI e HindIII (λ *Eco/Hind*) ou *BstE II* (λ *BstEII*).

Marcadores de proteínas

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences);

4.4 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) – utilizado para extração e purificação de DNA de gel de agarose.

Superscript III First-strand Synthesis Systems for RT-PCR (Invitrogen) – utilizado para a construção de cDNAs.

RNAeasy Mini kit (Quiagen) – utilizado para extração de RNA de fungo.

MegaBACE Dye Terminator - utilizado no sequenciamento de DNA.

4.5 Iniciadores (*Primers*)

Os *primers* utilizados foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*) (Tabela 4).

4.MATERIAL

Tabela 4. Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento e sítios de restrição (sublinhado).

Produto	Primer	Sequência (5' → 3')	Tm (°C)	Sítio
Endoglicanase <i>T. reesei</i>	EglIII-F	<u>GGGATCC</u> AAAATGAACAAGTCCGTGGCTC CATTG	64,9	BamHI
	EglIII-R	GG <u>CGGCCG</u> CTTACTTTCTTGCGAGACACG AGCT	69,8	NotI
Exoglicanase <i>P. cryosporium</i>	CbhI.1-F	<u>GGGATCC</u> AAAATGTTCCGCACTGCTACTT TG	62,8	BamHI
	CbhI.1-RS	GG <u>CGGCCG</u> CTTAGTAGCACTGGGAGTAGT ATG	66,8	NotI
	CbhI.1-R	<u>GTCTAGAG</u> TAGCACTGGGAGTAGTATGGG T	61,2	XbaI
2A- Endoglicanase <i>T. reesei</i>	2A-EglIII-F	<u>GTCTAGAGA</u> AGCTAGACATAAAACAAAAG ATTGTTGCTCCAGTTAAACAAACTTTGAA CTTTGATTTGTTGAAATTGGCTGGTGATGT TGAATCTAATCCAGGGCCCATGAACAAGT CCGTGGCTCCATTG	71,3	XbaI
Kex2- Endoglicanase <i>T. reesei</i>	EglIII-F1	<u>GTCTAGAC</u> CGAATGGATAAAAGGGCACAG CAGACTGTCTGGGGCCA	69,8	XbaI
β-Glicosidase <i>H. grisea</i>	Betaglu-F	<u>GGAATTC</u> GGGCCGTCCATCTGGGACA	62,7	EcoRI
	Betaglu-R	<u>GGAATTC</u> GGATCCTTACTCCTTGCGAATC AAGCTATC	62,8	EcoRI / BamHI
	AGLUBGL4- F	<u>GGAATTC</u> AAGCTTATCATGTCTCTTCTCC GGA	60,0	EcoRI / HindIII
	AGLUBGL-R	<u>GGAATTC</u> CTCCTTGCGAATCAAGCTATC	62,0	EcoRI
β-Glicosidase <i>S. fibuligera</i>	Bgl1PS-F	<u>GGGATCC</u> AAAATGTTGATGATAGTACAGC TTTTG	59,3	BamHI
	Bgl1-R	<u>TGCGGCCG</u> CTCAAATAGTAAACAGGACAG ATGT	65,2	NotI
	Bgl1-F	<u>GGAATTC</u> GTCCCAATTCAAAACATAACCC A	58,8	EcoRI
	Bgl1Aglu-F	<u>GCCATGGA</u> AGCTTAAAATGTTGATGATAG TACAGCTT	61,4	NcoI / HindIII
	Bgl1Aglut-R	<u>TGAATTC</u> AATAGTAAACAGGACAGATGTC TT	56,3	EcoRI
Transportador cdt-1 <i>N. crassa</i>	celtt-F	<u>TACAAGCT</u> TATGGCTCACAGCATAAACGA AAAG	72,7	HindIII
	celtt-R	<u>AACAAGCT</u> TCTAAATTGTAACCTTCTCGTC ATCC	70,1	HindIII
Gene de resistência a G418	Zeo-BlasF3	CGGATCCATAACTTCGTATAATGTATGCT ATACGAAGTTAT <u>AGATCT</u> CCCACACACCA TAGCTTCAAAATG	66,1	BglII
	Zeo-BlasR3	CGGATCCATAACTTCGTATAGCATAACATT ATACGAAGTTAT <u>AGATCT</u> AGCTTGCAAAT TAAAGCCTTCGAG	66,6	BglII

4.6 Ferramentas de bioinformática

Busca das sequências: GenBank (NCBI) - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Cálculo do conteúdo de G+C: “Genomics %G~C Content Calculator” – (http://www.sciencebuddies.org/mentoring/project_ideas/Genom_GC_Calculator.shtml).

Tradução conceitual: “Molecular Toolkit” - (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/index.html>).

Análises de restrição: NEBcutter V2.0 - (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

Alinhamento: ClustalW - (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Análise da qualidade do sequenciamento: PHRED e PHRAD - (<http://www.unb.br/ib/cel/biomol>).

4.7 Vetores

Os mapas dos vetores utilizados encontram-se nos anexos (Anexos 2-8).

4.7.1 Vetores de clonagem

pBluescript II KS (Stratagene) - utilizado para clonar os produtos de PCR. Possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, origem de replicação do fago f1, parte do gene *lacZα* que codifica o fragmento amino terminal da enzima β-galactosidase, sítio múltiplo de clonagem e sítios para os *primers* T7, SP6 e M13 Universal e M13 Reverso, flanqueando a região de clonagem (Anexo 2).

pGEM-T (Promega) - utilizado para clonar os produtos de PCR. Possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, origem de replicação do fago f1, parte do gene *lacZα* que codifica o fragmento amino terminal da enzima β-

galactosidase, sítio múltiplo de clonagem e sítios para os *primers* T7, SP6 e M13 Universal e M13 Reverso, flanqueando a região de clonagem (Anexo 3).

pGEM-Aglu1 - utilizado para clonar genes de interesse fusionados a porção C-terminal da α -aglutinina de *S. cerevisiae*. Vetor pGEM-T com a porção C-terminal do gene da α -aglutinina e região terminadora (1409 pb) clonado no sítio EcoRV do sítio múltiplo de clonagem. Vetor construído em nosso laboratório.

pIJ-Aglu1 - utilizado para clonar genes de interesse fusionados a porção C-terminal da α -aglutinina de *S. cerevisiae*. Vetor pIJ derivado do pUC18 que tem o sítio BglII flanqueando o sítio múltiplo de clonagem modificado. Possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, origem de replicação do fago f1, parte do gene *lacZ α* que codifica o fragmento amino terminal da enzima β -galactosidase, e sítios para os *primers* T7, SP6 e M13 Universal e M13 Reverso, flanqueando a região de clonagem (Janssen & Bibb, 1993). Construído em nosso laboratório, possui a porção C-terminal do gene da α -aglutinina de *S. cerevisiae* (920 pb) clonado nos sítios EcoRI e HindIII do sítio múltiplo de clonagem (Anexo 4).

4.7.2 Vetores de expressão para *S. cerevisiae*

Y1PGK1 – vetor epissomal com origem de replicação em levedura baseado no 2 μ , utilizado para expressão de genes de interesse em *S. cerevisiae*. Possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção em bactéria e o gene *LEU2* como marca de seleção para levedura. O promotor e a região terminadora são do gene *PGK1* da levedura *S. cerevisiae* (modificado de Moraes *et al.*, 1995) (Anexo 5).

YEp351PGK – vetor epissomal com origem de replicação em levedura baseado no 2 μ , utilizado para expressão de genes de interesse em *S. cerevisiae*. Possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção em bactéria e o gene *LEU2* como marca de seleção para levedura. O promotor e a região terminadora são do gene *PGK1* da levedura *S. cerevisiae* (Moraes *et al.*, 1995) (Anexo 6).

YADH351-Hind- – vetor epissomal com origem de replicação em levedura baseado no 2 μ , utilizado para expressão de genes de interesse em *S. cerevisiae*. Possui o gene

de resistência a ampicilina como marca de seleção em bactéria e o gene *LEU2* como marca de seleção para levedura. O promotor e a região terminadora são do gene *ADHI* da levedura *S. cerevisiae* (modificado de Moraes *et al.*, 1995) (Anexo 7).

4.7.3 Vetores de expressão para *P. pastoris*

pPIC9 (Invitrogen) – utilizado para expressão induzível de genes de interesse em *P. pastoris*. Possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção em bactéria e o gene *HIS4* como marca de seleção para levedura. O promotor e a região terminadora da transcrição são do gene *AOXI* (Anexo 8).

4.7.4 Vetores para obtenção de genes de interesse

pUEXO – utilizado como molde para isolamento do gene *cbhI.1* de *P. cryosporium*. Vetor pBlueScript II KS com o gene *cbhI.1* clonado, construído por Brandão (1999).

YBG4 – utilizado como molde para isolamento do gene *bgl4* de *H. grisea*. Vetor YEp351PGK (Moraes *et al.*, 1995) com o gene *bgl4* clonado por Benoliel *et al.* (2010).

pPICK – utilizado para isolamento do gene da canamicina. Vetor pPIC9 que contém o gene *kanMX* de *Escherichia coli* transposon Tn903 que confere resistência ao antibiótico G418 (Reis *et al.*, 2012). Devido a presença dos sítios *loxP* flanqueando o gene *kanMX* a deleção da marca pode ser feita expressando-se a recombinase Cre (Güldener *et al.*, 1996).

4.8 Meios de cultura e soluções

Os meios e soluções foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C. Algumas soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração usando-se membranas de 0,22 µm. Quando necessário foram adicionados os devidos antibióticos nas seguintes concentrações: ampicilina 100 µg/mL e canamicina 100 µg/mL para bactérias; e G418 150 µg/mL para

4.MATERIAL

leveduras. As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia a qual foram empregadas.

4.8.1 Meios para bactérias

Meio LB (Luria – Bertani)

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona de caseína	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)
pH ajustado para 7,2.	

Meio LB-Ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico 1,5% (p/v).

Meio SOB

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona de caseína	2% (p/v)
NaCl	0,0584% (p/v)
KCl	0,0186% (p/v)
pH ajustado para 7,2.	

4.8.2 Meios para leveduras

Meio YPD (Meio extrato de levedura peptona glicose)

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

Meio YPD-Ágar

Meio YPD adicionado de ágar bacteriológico 2% (p/v).

Meio YPDS-Ágar (Meio extrato de levedura peptona glicose com sorbitol)

Extrato de levedura	1% (p/v)
---------------------	----------

4.MATERIAL

Peptona de caseína	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)
Sorbitol	1 M
Ágar bacteriológico	2% (p/v)

Meio YPC (Meio extrato de levedura peptona celobiose)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona de caseína	2% (p/v)
Celobiose	1% (p/v)

YP-CMC Tamponado (Meio extrato de levedura peptona carboximetilcelulose)

YNB	0,67% (p/v)
CMC	0,5% (p/v)
Tampão Asp-Glu (pH 5,5)	0,4% (p/v)

SD (Meio mínimo com glicose)

YNB (yeast nitrogen base without aminoacids – DIFCO)	0,67% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

SC-Tamponado (Meio mínimo com celobiose)

YNB	0,67% (p/v)
Celobiose	1% (p/v)
Tampão Asp-Glu (pH 5,5)	0,4% (p/v)

SD-Ágar e SC-Ágar Tamponado

Meio SD (ou SC-Tamponado) adicionado de ágar bacteriológico 2% (p/v).

SD-CMC-Ágar Tamponado (Meio mínimo com glicose e CMC)

YNB	0,67% (p/v)
Glicose	2% (p/v)
CMC	0,5% (p/v)
Tampão Asp-Glu (pH 5,5)	0,4% (p/v)

4.MATERIAL

Ágar	1% (p/v)
------	----------

MD (Meio mínimo com glicose)

Biotina	4 x 10 ⁻⁵ % (p/v)
YNB	1,34% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

MD-Ágar

Meio MD adicionado de ágar bacteriológico 2% (p/v).

MM (Meio mínimo metanol)

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4 x 10 ⁻⁵ % (p/v)
Metanol	0,5% (v/v)

MM-Ágar

Meio MD adicionado de ágar bacteriológico 2% (p/v).

MD-CMC-Ágar Tamponado e MM-CMC-Ágar Tamponado

Meio MD-Ágar e MM-Ágar adicionado de carboximetilcelulose (CMC *low viscosity* - Sigma) 0,5% (p/v) e 100 mM de Tampão Fosfato de Potássio (pH 6,0).

Meio BMGY (Meio complexo tamponado com glicerol)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona de caseína	2% (p/v)
Tampão fosfato (pH 6,0)	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4 x 10 ⁻⁵ % (p/v)
Glicerol	1% (v/v)

Meio BMMY (Meio complexo tamponado com metanol)

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

4.MATERIAL

Tampão fosfato (pH 6,0)	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4 x 10 ⁻⁵ % (p/v)
Metanol	0,5% (v/v)

4.8.3 Meios para fungos

Meio de indução de celulases

CMC	1% (p/v)
Sigmacel	1% (p/v)
Solução de Sais	7,5% (v/v)

Solução de Sais

Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,004% (p/v)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1% (p/v)
KH ₂ PO ₄	7,6% (p/v)
Solução de Elementos Traço	5% (v/v)

Elementos traço

KCl	0,0026% (p/v)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,04% (p/v)
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,0714% (p/v)
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,08% (p/v)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0008% (v/v)

4.8.4 Tampões

Tampão Asp-Glu 20X

Ácido Aspártico	8% (p/v)
Ácido Glutâmico	8% (p/v)
pH ajustado para 5,5.	

4.MATERIAL

Tampão Fosfato de Potássio 1 M

K_2HPO_4	4,43% (p/v)
KH_2PO_4	8,25% (p/v)
pH ajustado para 6,0.	

4.9 Transformação de bactéria

Tampão de Transformação I

RbCl	12 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	9,9 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,5 g/L
Glicerol PA	150 mL
Acetato de Potássio 1 M (pH 7,5)	30 mL

O pH da solução foi ajustado para 5,8.

Solução esterilizada por filtração.

Tampão de Transformação II

RbCl	1,2 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,5 g/L
Glicerol P.A.	150 mL
MOPS 1 M (pH 6,8)	20 mL

Solução esterilizada por filtração.

4.10 Extração de DNA plasmidial

Solução I (Tampão Tris – EDTA)

Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
EDTA	10 mM
Glicose	50 mM

Solução II (Solução de Lise alcalina)

NaOH	0,2 M
------	-------

4.MATERIAL

SDS 1% (p/v)

Preparada no momento do uso.

Solução III (Solução de Neutralização)

Acetato de sódio 3 M

Ácido acético 2 M

pH ajustado para 4,8-5,0

4.11 Análise de DNA em gel de agarose

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 1X

Tris-Acetato 40 mM

EDTA 1 mM

pH ajustado para 8,5

Tampão de amostra para gel de agarose (1X)

TAE 20X 50% (v/v)

Glicerol 30% (v/v)

Azul de bromofenol 0,25% (p/v)

4.12 Transformação de *S. cerevisiae*

Tampão *One-step*

Acetato de Lítio 0,2 M

PEG 4000 40% (p/v)

DTT 100 mM

Soluções preparadas separadamente e misturadas no momento do uso.

4.13 Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Tampão de amostra 2X

Tris-HCl 1 M (pH 6,8) 200 mM

4.MATERIAL

SDS	4% (p/v)
β -Mercaptoetanol	4% (v/v)
Glicerol	20% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

Tampão de corrida – Tris-glicina 5X (Estoque)

Trizma base	125 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,5% (p/v)

Ácido tricloroacético (TCA)

A um frasco fechado contendo 100 g de TCA foi adicionado 45,4 mL de água. A solução resultante corresponde a TCA 100% (p/v), estocado a 4°C.

Gel concentrador 5%

Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0,8)	2,5 mL
Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	5 mL
Água destilada	12,15 mL
SDS 10% (p/v)	0,2 mL
APS 10% (p/v)	0,150 mL
TEMED (Gibco BRL)	0,015 mL

Gel separador 12,5 %

Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0,8)	12,5 mL
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	3,75 mL
Água destilada	13,21 mL
SDS 10% (p/v)	0,3 mL
APS 10% (p/v)	0,225 mL
TEMED (Gibco BRL)	0,015 mL

4.MATERIAL

4.14 Revelação de proteínas com *Coomassie blue*

Solução corante

<i>Coomassie brilliant blue</i> G-250	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

Solução descorante

Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

4.15 Extração de DNA genômico de levedura

Tampão SE

Sorbitol	0,9 M
EDTA	100 mM

pH ajustado para 7,5.

TE₂₀

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
EDTA	20 mM

Clorofane

Fenol	1v
Clorofórmio	1v

Homogeneizado com solução de equilíbrio.

TE

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
EDTA	1 mM

4.16 Soluções para ensaios de atividade enzimática

Reagente DNS (Miller, 1959)

Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	1% (p/v)
NaOH 2 M	20% (v/v)
Tartarato de Sódio e Potássio	30% (p/v)

O tartarato de sódio e potássio foi dissolvido em 500 ml de água destilada aquecida e adicionado ao DNS previamente dissolvido em NaOH também aquecido. A solução foi agitada sob aquecimento até ser observada a completa dissolução dos reagentes. O volume foi então completado para 1000 mL com água destilada.

Tampão Acetato de Sódio 1 M (pH 5,5)

Acetato de Sódio	7,45% (p/v)
Ácido acético	0,53% (v/v)
pH ajustado para 5,5	

5.1 Extração de RNA total

Os fungos *T. reesei* e *N. crassa* foram cultivados em meio de indução de celulasas e incubados a 30°C a 220 rpm por 48 horas. O micélio dos fungos foi coletado por filtração em papel de filtro estéril. Uma quantidade de 2 a 5 g (peso úmido) foi utilizada para a extração de RNA utilizando o kit comercial *RNAeasy Mini kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

5.2 Síntese de cDNA – Transcrição reversa

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído, utilizando-se o kit comercial *Superscript III First-strand Synthesis Systems for RT-PCR* (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante.

5.3 Extração de DNA total de levedura (modificado de Burke *et al.*, 2000)

As leveduras foram inicialmente cultivadas em 40 mL de meio completo YPD a 30°C e 200 rpm por 48 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 5 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em 3 mL de tampão SE. Após a adição de 100 µL de uma solução de Novozyme 100 mg/mL (Novo Biolabs), o sistema foi misturado e incubado a 37°C por 60 minutos. A suspensão foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos, e em seguida, as células foram ressuspensas em 3 mL de TE₂₀. Após adição de 0,5 mL de SDS 10%, incubou-se a suspensão a 65°C por 30 minutos. Foi adicionado 1,5 mL de acetato de potássio 5 M (pH 8,9) ao sistema, que foi então misturado gentilmente e incubado no gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 10000 g por 10 minutos a 4°C, foi adicionado 1 volume de clorofane ao sobrenadante, previamente transferido para um tubo limpo, para a extração por inversão dos tubos. Depois de centrifugar a 3000 g por 10 minutos, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, centrifugado a 10000 g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado uma vez com etanol 70%, seco e ressuspensado com 200 de µL TE + RNase (1µg de

RNase A a 10 mg/mL para cada 100 µL de TE). A concentração de DNA foi determinada em gel de agarose, e o mesmo guardado a 4°C até o uso.

5.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para a amplificação de DNA por meio de PCR os sistemas foram montados com um volume final de 50 µL, como descrito: 10 ng de DNA genômico como molde (ou cerca de 0,1-1 ng de DNA plasmidial), 0,2 µM de cada um dos *primers* (Tabela 4), 0,2 mM de dNTPs; tampão da DNA polimerase para uma concentração final de 1X, já adicionado de 2 mM de cloreto de magnésio e 2U da enzima *Phusion* DNA polimerase. A amplificação foi executada por 30 ciclos onde o DNA foi desnaturado a 94°C por 1 minuto, anelado a temperatura ideal para cada par de *primers* (indicado na Tabela 4) por 1 minuto e alongado a 72°C por 1-2 minutos. Após a amplificação, 1/5 do sistema de reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

5.5 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas com 100 a 200 ng de plasmídios quantificados por espectrofotometria utilizando o GeneQuant RNA/DNA Calculator pro (Biochrom, UK) e analisadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics) utilizando-se o kit *MegaBACE Dye Terminator*. A análise da qualidade do sequenciamento foi realizada pelos programas PHRED e PHRAD (www.unb.br/ib/cel/biomol), e a análise das sequências foi feita por comparação com as sequências depositadas em banco de dados, com o auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

5.6 Análise em gel de agarose (Sambrook *et al.*, 2001)

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise dos fragmentos de DNA. A agarose foi preparada na concentração de 0,8% (p/v) em tampão de corrida TAE 1X e foi adicionado brometo de etídeo (análogo de base que se intercala na molécula de DNA e emite fluorescência violeta quando excitado com luz ultravioleta) para concentração final de 0,5 µg/mL. O tampão de amostra foi diluído para a concentração final de 1X nas amostras de DNA a serem analisadas. As amostras e os

marcadores moleculares foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese com a corrente e voltagem adequadas (1-5 V/cm). Para visualização da amostra de DNA o gel foi exposto à luz ultravioleta

5.7 Purificação e eluição de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA de interesse, após análise em gel de agarose, foram recortados do gel e purificados utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), conforme as especificações do fabricante.

5.8 Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)

Os sistemas de ligação foram realizados de modo que a razão molar entre vetor e inserto fosse de 1:5. A enzima T4 DNA Ligase foi utilizada com o tampão de reação fornecido pelo fabricante. Os sistemas foram incubados a 4°C por, pelo menos, 14 horas antes de serem utilizados para transformação de bactérias.

5.9 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas conforme instruções dos fabricantes das enzimas. O tempo de incubação, os tampões, as temperaturas de reação, as concentrações de DNA e enzima variaram de acordo com o material a ser digerido e a eficácia da enzima. Geralmente foram utilizadas 10 U de enzima para cada 5 µg de DNA, incubados a 37°C por 2 horas. O volume de enzima utilizado não ultrapassou 10% do volume final da reação para evitar a degradação inespecífica do DNA pela enzima.

5.10 Desfosforilação de vetores linearizados

Os vetores linearizados com apenas uma enzima de restrição foram desfosforilados com a enzima *Fosfatase Antartica* para evitar sua religação. A reação de desfosforilação foi realizada utilizando-se 100 ng de DNA, 1 U da enzima *Antarctica Phosphatase* (New England Biolabs) e tampão fornecido pelo fabricante.

O sistema foi incubado a 37°C por 25 minutos e depois, para inativação da enzima, a 65°C por 5 minutos.

5.11 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por Hanahan (1983) com modificações. As células da linhagem de *E. coli* desejada foram crescidas em 5 mL de meio SOB e incubadas a 37°C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Um mililitro do pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio SOB e essa cultura incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) até atingir OD₆₀₀ de 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em 16 mL de Tampão de transformação I. Após 15 minutos de incubação no gelo as células foram submetidas a uma nova centrifugação sob as mesmas condições e então ressuspendidas em 4 mL de Tampão de transformação II. As células foram aliqüotadas em tubos de 1,5 mL (100 µL/tubo) e estocadas a -80°C.

5.12 Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico

Uma alíquota de 100 µL de células competentes previamente preparada foi utilizada para cada sistema de ligação. As células retiradas do freezer a -80°C foram deixadas no gelo até que descongelassem. Adicionaram-se 5 µL do sistema de ligação às células, e as mesmas foram novamente incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a 37°C, por 5 minutos e, após adição de 900 µL de meio LB, o sistema foi incubado a 37°C por 1 hora. As células foram espalhadas em placas contendo LB-ágar e o antibiótico adequado seguindo-se incubação a 37°C durante a noite.

5.13 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep) (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

Uma colônia de bactéria transformada foi inoculada em 3 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado e cultivada a 37°C por 16 horas. Estas células foram coletadas através de centrifugação a 12000 g por 2 minutos a 4°C, e ressuspendidas em 200 µL de solução I. Em seguida, foram adicionados 360 µL de solução II,

preparada na hora, e a amostra foi homogeneizada, com cuidado, por inversão rápida do tubo. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados ao lisado 300 µL de solução III gelada, procedendo-se nova homogeneização por inversão do tubo, gentilmente. A solução foi então incubada no gelo por 5 minutos e coletada a 12000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 750 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova centrifugação a 12000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200 µL de TE. Foram adicionados 100 µL de clorofane. Após forte agitação, o sistema foi coletado a 6000 g por 3 minutos. A fase aquosa foi recuperada em um tubo limpo, onde foram adicionados 750 µL de etanol 100% gelado. A mistura foi centrifugada a 12000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de TE contendo RNase A (1 µL RNase 10 mg/mL para 100 µL de TE). O DNA plasmidial foi estocado a -20°C até o uso.

5.14 Preparação de DNA plasmidial em média escala (midi-prep) (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

O procedimento foi o mesmo do descrito para a preparação de plasmídios em pequena escala. Apenas os volumes das soluções utilizadas foram ajustadas ao volume de cultura de 50 mL. A análise e a estocagem do material, também seguiram os procedimentos da mini-preparação.

5.15 Transformação de levedura

5.15.1 *S. cerevisiae*

As transformações da levedura *S. cerevisiae* com os vetores de expressão foram realizadas utilizando o método de transformação em fase estacionária descrito por Chen *et al.* (1992). A levedura foi crescida durante a noite em meio YPD a 30°C sob agitação de 200 rpm até atingir a fase estacionária. Um volume de 200 µL de células foram coletados por centrifugação a 10000 g por 10 segundos sendo ressuscitado em tampão *One Step*, ao qual foram adicionados de 50 a 1000 ng de

DNA plasmidial, para um volume final de 100 μ L. As células foram incubadas a 45°C durante uma hora e semeadas em placas de meio mínimo SD. No caso da seleção com G418, após incubação a 45°C foi adicionado 1 mL de meio YPD ao sistema e após 2 horas incubado em *shaker* a 30°C, as células foram semeadas em placas de meio mínimo SD adicionado de G418 (150 μ g/mL). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas.

5.15.2 *P. pastoris*

Uma colônia da levedura *P. pastoris*, foi crescida em 5 mL de meio YPD por 24 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. Cerca de 0,2-0,5 mL do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio YPD. As células foram crescidas durante a noite, até uma OD₆₀₀ ~1,3-1,5. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 100 mL de água estéril gelada (4°C). As células foram coletadas como anteriormente, e ressuspensas em 50 mL de água estéril gelada. Após a repetição deste último procedimento, as células foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1 M gelado. Após centrifugação nas mesmas condições anteriores, as células foram ressuspensas em 0,8 mL de sorbitol 1 M gelado. Para a eletroporação, 80 μ L das células foram misturadas a 5-10 μ g do DNA plasmidial (previamente linearizado) e 320 μ L de sorbitol 1 M gelado, e então transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada. As células foram submetidas a eletroporação em eletroporador (Gene Pulser II[®] da Bio-Rad) a 7,5 kV/cm, 25 μ F e 400 Ω . Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M gelado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo de 1,5 mL estéril. As células foram semeadas em placas de meio mínimo MD sem histidina, para seleção dos transformantes com o vetor contendo a marca auxotrófica *HIS4*. As placas foram incubadas em estufa a 30°C até o aparecimento de colônias recombinantes, em torno de 72 horas.

5.16 Seleção de clones recombinantes

5.16.1 *S. cerevisiae*

Endo e exoglicanase

Clones transformantes que cresceram nas placas de meio seletivo, foram posteriormente semeados em placas de meio mínimo SD-CMC-Ágar Tamponado e incubados em estufa a 30°C por 48 horas e depois a 50°C por 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada para remover as células e coradas com solução de *Congo Red* 0,1% (p/v). As placas foram descoradas com solução NaCl 1 M por 15 minutos e os clones transformantes foram detectados pela formação de halo de hidrólise na área de crescimento da colônia, indicando a degradação do substrato.

β-Glicosidase

Clones transformantes que cresceram nas placas de meio seletivo, foram posteriormente semeados em placas de meio mínimo com celobiose (SC-Tamponado) e incubados em estufa a 30°C por 72 horas. Os clones transformantes foram detectados pela capacidade de crescimento no meio.

5.16.2 *P. pastoris*

Os clones transformantes com o vetor pPIC9 foram crescidos por 72 horas a 30°C em placa de meio mínimo MM-CMC-Ágar Tamponado. A cada 24 horas foram adicionados 100-200 µL de metanol 100% na parte interna da tampa da placa para indução do promotor *AOXI*. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada para remover as células e coradas com solução de *Congo Red* 0,1% (p/v) por 15 minutos. As placas foram descoradas com solução NaCl 1 M por 15 minutos e os clones transformantes foram detectados pela formação de halo de hidrólise na área de crescimento da colônia, indicando a degradação do substrato.

5.17 Expressão de recombinantes em frasco

5.17.1 *S. cerevisiae*

Para cada clone selecionado foi preparado um pré-inóculo em 3 mL de meio mínimo (SD), ou meio complexo (YPD). Os pré-inóculos foram crescidos por 24 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C. Após a leitura da densidade celular (OD₆₀₀), uma concentração de células suficiente foi adicionada a 100 mL de meio mínimo, em frasco de 1L, para que a OD₆₀₀ inicial estivesse em torno de 0,2. A cultura foi

incubada a 30°C por 96 horas sob agitação de 200 rpm. A cada 24 horas uma alíquota de 2 mL foi coletada. As células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 8000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para fazer a determinação das atividades enzimáticas.

5.17.2 *P. pastoris*

Usando uma colônia isolada do clone selecionado, fez-se um pré-inóculo em 25 mL de meio BMGY em um frasco de 250 mL. Crescidas a 30°C sob agitação de 200 rpm as células foram coletadas por centrifugação a 1500 g por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspensas em frascos aletados de 1L com 100 mL de meio de indução BMMY (para os transformantes com o vetor pPIC9), e retornadas a agitação para continuar o crescimento. Adicionou-se metanol 100% para uma concentração final de 0,5% ao meio BMMY, a cada 24 horas de crescimento para manter a indução dos transformantes. A cada tempo de indução foram retirados 5 mL de cada cultura. Após centrifugação e descarte das células, o sobrenadante foi utilizado para medição da atividade enzimática e análise do perfil proteico em gel SDS-PAGE.

5.18 Análise de atividade das enzimas endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase

5.18.1 Determinação de atividade sobre CMC

A atividade foi determinada por ensaio colorimétrico de detecção de açúcares redutores gerados pela hidrólise do substrato CMC. Para a detecção de açúcares redutores em solução foi utilizado o reagente DNS (Miller, 1959).

Os ensaios de atividade foram realizados nas seguintes condições: 50 μ L de CMC 2% (p/v), em tampão acetato de sódio 200 mM (pH 6,0) e 50 μ L de amostra contendo a enzima (sobrenadante da cultura). A mistura foi incubada a 50°C por 30-120 minutos e em seguida adicionou-se 400 μ L de reagente DNS. As amostras foram fervidas por 10 minutos e 100 μ L foram diluídos em 800 μ L de água e então a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram convertidas em quantidade de equivalente de glicose, por meio da curva de calibração

obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações de glicose (10 a 100 µg) com o reagente DNS (Anexo 9). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco a solução contendo 50 µL do tampão de reação e 50 µL do substrato (CMC 2%); tratados como descrito anteriormente. Como controle da concentração inicial de açúcares redutores no meio de cultivo, foi realizado também reação com 50 µL da amostra de enzima e 50 µL de tampão de reação sem o substrato CMC e submetidos ao mesmo procedimento. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 µmol de equivalente de glicose por minuto de reação.

5.18.2 Determinação de atividade sobre CMC em placa

Pequenas alíquotas do sobrenadante das culturas (2 µL) foram aplicados em placa de meio mínimo MD-CMC-Ágar Tamponado. Após a penetração do líquido no gel, a placa foi incubada a 30°C por 24 horas. Em seguida, foi corada com solução de *Congo Red* 0,1% (p/v). As placas foram descoradas com solução NaCl 1 M por 15 minutos e a formação de halo de hidrólise no local da aplicação da amostra, foi analisada.

5.18.3 Determinação de atividade sobre pNPC

Os ensaios de atividade utilizando o substrato sintético pNPC (Sigma) foram realizados com 100 µL de pNPC 5 mM, em tampão acetato de sódio 200 mM (pH 5,5) e 100 µL de amostra contendo a enzima (sobrenadante da cultura). A mistura foi incubada a 50°C por 120 minutos e em seguida, foi adicionado 1 mL de Na₂CO₃ 1M. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco a solução contendo: 100 µL do tampão de reação e 100 µL do substrato (pNPC 5 mM); tratados como descrito anteriormente. O pNP liberado foi detectado lendo-se a absorbância a 405 nm. Uma unidade de atividade corresponde a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol nestas condições. Como controle, foi realizado mesmo procedimento adicionando-se água à reação, foi realizado também reação com 100 µL da amostra da enzima 100 de tampão de reação sem o substrato pNPC. As leituras de absorbância foram convertidas em quantidade de equivalente de pNP, por

meio da curva de calibração obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações de pNP (Anexo 10).

5.18.4 Determinação de atividade sobre pNPG

Os ensaios de atividade utilizando o substrato sintético pNPG (Sigma), apenas qualitativo, foram realizados com 100 μL de pNPG 5 mM, em tampão Acetato de sódio 200 mM pH 5,5, e 100 μL de amostra contendo a enzima (sobrenadante da cultura ou extrato celular diluído em água para OD_{600} de 2). A mistura foi incubada a 50°C por 60 minutos e em seguida foi adicionado 1 mL de Na_2CO_3 1 M. A análise qualitativa foi feita pela presença de cor amarelada decorrente da liberação de pNP.

5.18.5 Determinação de atividade sobre MUC

Os ensaios de atividade utilizando o substrato sintético MUC foram realizados com 100 μL de MUC 5 mM, em tampão acetato de sódio 200 mM (pH 5,5) e 100 μL do sobrenadante das culturas a serem analisadas. A mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos e em seguida foi adicionado 1 mL de Na_2CO_3 1 M. As reações foram visualizadas com luz ultravioleta, pois a degradação do substrato é observada pela emissão de fluorescência violeta. Como branco, foi realizado mesmo procedimento adicionando-se água à reação ao invés do sobrenadante da cultura.

5.18.6 Determinação de atividade sobre Sigmacel

A atividade foi determinada por ensaio colorimétrico de detecção de açúcares redutores gerados pela hidrólise da celulose microcristalina Sigmacel (Sigma). Para a detecção de açúcares redutores em solução foi utilizado o reagente DNS (Miller, 1959).

Os ensaios de atividade foram realizados nas seguintes condições: 50 μL de Sigmacel 2% (p/v), em tampão acetato de sódio 200 mM (pH 5,5) e 50 μL de amostra contendo a enzima (sobrenadante da cultura). A mistura foi incubada a 50°C por 120 minutos e em seguida adicionou-se 400 μL de reagente DNS. As amostras foram fervidas por 10 minutos e 100 μL foram diluídos em 800 μL de água e então a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram

convertidas em quantidade de equivalente de glicose, por meio da curva de calibração obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações de glicose (10 a 100 µg) com o reagente DNS (Anexo 9). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco a solução contendo 50 µL do tampão de reação e 50 µL do substrato (Sigmacel 2%); tratados como descrito anteriormente. Como controle da concentração inicial de açúcares redutores no meio de cultivo, foi realizado também reação com 50 µL da amostra de enzima e 50 µL de tampão de reação sem o substrato Sigmacel e submetidos ao mesmo procedimento. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 µmol de equivalente de glicose por minuto de reação.

5.18.7 Determinação de atividade sobre papel de filtro

A atividade sobre papel de filtro foi determinada por ensaio colorimétrico de detecção de açúcares redutores gerados pela hidrólise papel filtro. Para a detecção de açúcares redutores em solução foi utilizado o reagente DNS (Miller, 1959).

Os ensaios de atividade foram realizados nas seguintes condições: 50 µL de papel de filtro (2 x 0,5 cm), em tampão acetato de sódio 200 mM (pH 5,5) e 50 µL de amostra contendo a enzima (sobrenadante da cultura). A mistura foi incubada a 50°C por 120 minutos e em seguida adicionou-se 400 µL de reagente DNS. As amostras foram fervidas por 10 minutos e 100 µL foram diluídos em 800 µL de água e então a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram convertidas em quantidade de equivalente de glicose, por meio da curva de calibração obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações de glicose (10 a 100 µg) com o reagente DNS (Anexo 9). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco a solução contendo 50 µL do tampão de reação e 50 µL do substrato (papel de filtro em tampão); tratados como descrito anteriormente. Como controle da concentração inicial de açúcares redutores no meio de cultivo, foi realizado também reação com 50 µL da amostra de enzima e 50 µL de tampão de reação sem o substrato e submetidos ao mesmo procedimento. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 µmol de equivalente de glicose por minuto de reação.

5.19 Crescimento aeróbico em celobiose ou CMC

Clones transformantes foram analisados quanto a capacidade de crescimento em meio com celobiose 1% ou CMC 2% como única fonte de carbono. Para cada clone selecionado foi preparado um pré-inóculo em 3 mL de meio complexo (YPD) que foram crescidos por 24 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C. Após a leitura da densidade celular (OD_{600}), uma concentração de células suficiente foi adicionada a 50 mL de meio (SC-Tamponado, YPC ou YP-CMC), em frasco de 250 mL, para que a OD_{600} inicial estivesse em torno de 1. A cultura foi incubada a 30°C por 120 horas sob agitação de 200 rpm e a capacidade de crescimento foi analisada através da leitura da OD_{600} a cada 24 horas. Como controle o clone analisado foi também crescido em meio com glicose 2% (SD ou YPD) sob as mesmas condições descritas.

5.20 Crescimento anaeróbico em celobiose

A fermentação das leveduras recombinantes foi realizada de acordo com o método descrito por Parachin (2010). O cultivo anaeróbico foi feito em garrafas de 100 mL contendo 80 mL de meio YPC, vedadas com rolhas de silicone. O CO_2 produzido foi liberado por meio de agulha colocada através da rolha. As amostras foram coletadas através de uma cânula de borracha introduzida no meio e conectada ao ambiente por uma seringa. Foram inoculadas células para OD_{600} inicial de 1. O cultivo foi realizado a 30°C sob agitação de 200 rpm por 96 horas.

5.21 Análise dos produtos de fermentação por HPLC

Os substratos e os produtos dos cultivos aeróbicos e anaeróbicos foram analisados por HPLC com a coluna Aminex HPX-87P 300 x 7,8 mm (Bio-Rad). O sobrenadante do cultivo, após filtrado em membrana tipo Millipore de 0,22 μ m, foi aplicado à coluna. A eluição foi realizada a 80°C com água como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/min e a detecção foi feita pelo índice de refração RID (Shimadzu).

5.22 Preparo das amostras para SDS-PAGE

As amostras proteicas obtidas durante os cultivos foram concentradas por ultracentrifugação, utilizando-se uma membrana com retenção de 10 kDa (Centriplus – YM 10). O sistema foi mantido a 4°C durante o processo de filtração.

5.23 Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel de poliacrilamida desnaturante segundo a descrição de Laemmli (1970) em um sistema de eletroforese da Amersham Biosciences. Antes da aplicação no gel as amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X com uma voltagem constante de 100 V.

5.24 Coloração com *Coomassie brilliant blue*

As bandas proteicas presentes foram visualizadas após a incubação do gel durante 1 hora, sob agitação, na solução corante preparada com *Coomassie brilliant blue*, seguida pela descoloração, após incubação na solução descorante.

5.25 Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma)

Após o processo de eletroforese, o gel SDS-PAGE 12,5% contendo 0,15% de CMC, foi tratado para revelar a atividade enzimática conforme descrito por Sun *et al.* (2008) (com modificações). O gel foi retirado do sistema de eletroforese e lavado duas vezes em solução de isopropanol 25% em tampão acetato de sódio 100 mM pH 6,0 durante 20 minutos, para remover o SDS. Para a renaturação da enzima o gel foi lavado com água destilada, e posteriormente incubado em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,0) adicionado de 5 mM de β -mercaptoetanol (pequenas quantidades auxiliam no dobramento de proteínas complexas) a 4°C durante a noite. Decorrido este tempo foi descartada a solução, e o gel foi lavado em água destilada por duas vezes durante 2 minutos. Em seguida o gel foi transferido para uma nova solução de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,0) e deixado à temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente incubado por 3 horas a 50°C em banho pré-aquecido. A

5.METODOLOGIA

atividade enzimática foi detectada corando-se o gel com solução de *Congo Red* 0,1% (p/v) durante 30 minutos, seguido de descoramento com cloreto de sódio 1 M, até a detecção da região de degradação do substrato no gel.

6.1 Isolamento de genes

6.1.1 Endoglicanase de *Trichoderma reesei*

A primeira etapa deste estudo foi o isolamento dos genes que seriam expressos em leveduras. Como os genes que foram utilizados têm origem eucariótica, optamos pela expressão do cDNA, a versão sem íntrons.

Para obter o gene da endoglicanase II (*egII*) de *T. reesei*, o fungo foi inicialmente cultivado em meio com carboximetilcelulose (CMC) para promover a indução de seu sistema celulolítico. Decorridas ~16 horas de cultivo, procedeu-se com a extração do RNA total. A partir do RNA total extraído foram obtidos os cDNA por meio da técnica de RT-PCR. Com base na sequência obtida do GenBank (nº. de acesso DQ178347), foram desenhados os *primers* EglII-F e EglII-R para amplificação do gene de 1257 pb, incluindo o peptídeo sinal nativo, requerido para a secreção da proteína, além da sequência codante para a proteína madura (Figura 9). Os sítios de restrição para as enzimas BamHI e NotI foram adicionados às extremidades dos *primers* EglII-F e EglII-R, respectivamente, para facilitar a clonagem nos vetores de expressão.

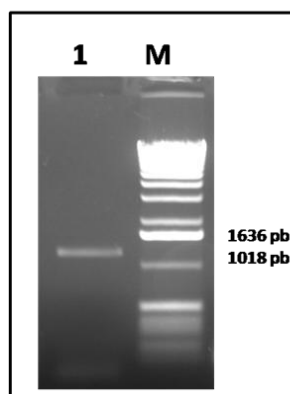


Figura 9. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao gene *egIII* de *T. reesei*. Análise feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. 1) reação de PCR; M) Marcador 1 kb Ladder (Gibco).

O fragmento correspondente ao gene *egIII* obtido da reação de PCR, após purificação, foi ligado ao vetor de clonagem pBluescript II KS. A confirmação da clonagem foi realizada pela análise do DNA plasmidial digerido com as enzimas de

restrição cujos sítios estavam presentes nos *primers*. Após confirmação da clonagem, esse vetor foi denominado **pBlue-eglII**.

6.1.2 Exoglicanase (celobiohidrolase) de *Phanerochaete chrysosporium*

O gene da celobiohidrolase I.1 (*cbhI.1*) do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, isolado por Brandão (1996) já se encontrava disponível em nosso laboratório na sua forma de cDNA. Este cDNA foi amplificado por PCR utilizando os *primers* Cbh-F e Cbh-RS usando como molde o vetor pUEXO. Os *primers* foram desenhados com base na sequência depositada no banco de dados (nº. de acesso Z22528), com a finalidade de amplificar as sequências codificadoras da proteína madura com o peptídeo sinal nativo (1601 pb) (Figura 10). Os sítios para as enzimas de restrição, BamHI e NotI foram adicionados às extremidades dos *primers* Cbh-F e Cbh-R, respectivamente, para facilitar nas etapas de clonagem nos vetores de expressão.

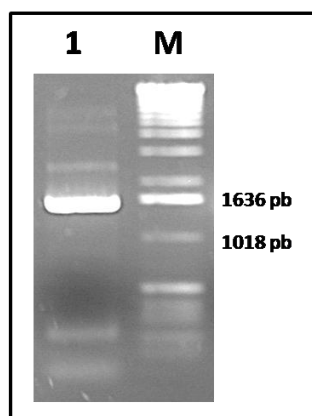


Figura 10. Amplificação de fragmento de cDNA relativo ao gene *cbhI.1* de *P. chrysosporium*. Análise feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. 1) reação de PCR; M) Marcador 1kb Ladder (Gibco).

O fragmento obtido por PCR correspondente ao gene *cbhI.1*, após purificado, foi ligado ao vetor de clonagem pBluescript II KS. A confirmação da clonagem foi realizada pela análise de restrição do DNA plasmidial extraído de clones transformantes. As análises confirmaram a presença do inserto assim como a integridade do vetor. Esse vetor foi denominado **pBlue-cbhI.1RS**.

6.1.3 β -Glicosidase de *Humicola grisea* var *thermoidea*

Duas diferentes estratégias foram adotadas para expressão da β -glicosidase 4 (BGL4) do fungo *H. grisea*: a troca do peptídeo sinal nativo, pelo sinal de secreção do fator α de *S. cerevisiae*, e o ancoramento da enzima à parede celular (*Yeast Surface Display*), utilizando a porção C-terminal da α -aglutinina também de *S. cerevisiae*.

Inicialmente, baseado na sequência depositada no banco de dados (nº. de acesso AB003109.1) foram construídos os *primers* BGL4-F e BGL4-R para amplificação do gene *bgl4* por PCR sem a sequência nativa do peptídeo sinal (~1,3 kb) e utilizando o vetor YBG4, construído por Benoliel *et al.* (2010), como molde (Figura 11A). Foram adicionadas às extremidades dos *primers* sítios para a enzima de restrição EcoRI para facilitar as etapas de clonagem.

Para a fusão da BGL4 com a porção C-terminal da α -aglutinina de *S. cerevisiae* foi realizada uma PCR utilizando os *primers* AGLUBGL4-F e AGLUBGL4-R para amplificar o gene *bgl4* com as sequências codificadoras do peptídeo sinal nativo, mas sem o códon de parada da tradução (~1,4 kb) (Figura 11B). Os sítios para as enzimas de restrição, EcoRI e HindIII, foram adicionados ao *primer* AGLUBGL4-F e o sítio para EcoRI ao *primer* AGLUBGL4-R.

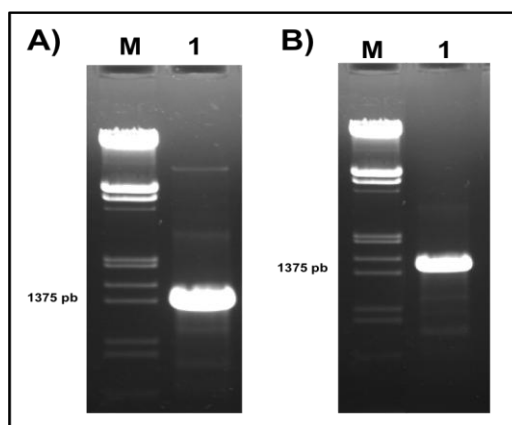


Figura 11. Amplificação de fragmento de cDNA relativo ao gene *bgl4* de *H. grisea*. Análise feita por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A. M) Marcador λ Eco/Hind; 1) reação de PCR para amplificação do gene *bgl4* sem peptídeo sinal. B. M) Marcador λ Eco/Hind; 1) resultado da reação de PCR para amplificação do gene *bgl4* sem o códon de parada da tradução.

Os fragmentos amplificados por PCR foram ligados, após purificação, ao vetor de clonagem pGEM-T e usados para transformação de *E. coli*. Para confirmar a clonagem, após procedimento de extração de DNA plasmidial foi realizada digestão com as enzimas de restrição presente nos *primers*. Após a confirmação, esses vetores foram denominados **pGEM-bgl4RS** (gene sem peptídeo sinal) e **pGEM-bgl4R** (gene sem o códon de terminação).

6.1.4 β -Glicosidase de *Saccharomycopsis fibuligera*

Para a expressão do gene *bgl1* que codifica para a β -glicosidase 1 (BGL1) do fungo *S. fibuligera* três construções foram testadas: enzima completa, enzima com sinal de secreção do fator α de *S. cerevisiae*, e a fusão da proteína nativa com a porção C-terminal da α -aglutinina.

Para o isolamento do gene *bgl1* (~2,6 kb), o DNA total do fungo foi extraído, e utilizado diretamente como molde para as reações de PCR já que não foram identificados íntrons na versão genômica do gene. Para reação de PCR os *primers* SfPS-F e Sf-R foram desenhados com base na sequência do GenBank (nº. de acesso M22475) para amplificar o peptídeo sinal e toda a região codante para a proteína madura (enzima nativa); os *primers* Sf-F e Sf-R para amplificar a região codante (para a proteína madura sem o peptídeo sinal a fim de se testar a secreção desta proteína utilizando o peptídeo sinal do fator α); e os *primers* Bgl1Aglu-F e Bgl1Aglu-R para amplificar o gene *bgl1* com peptídeo sinal nativo e sem o códon de parada da tradução, para fusão com a região C-terminal da α -aglutinina (Figura 12A e B).

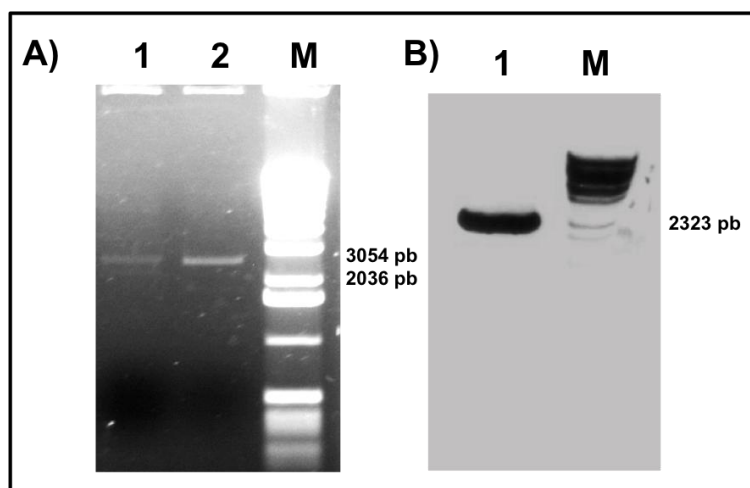


Figura 12. Amplificação de fragmento de DNA relativo ao gene *bgl1* de *S. fibuligera*. Análise feita por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A. 1) reação de PCR para amplificação do gene *bgl1* sem peptídeo sinal; 2) reação de PCR para amplificação do gene *bgl1* com peptídeo sinal; M) Marcador 1 kb Ladder Gibco. B. 1) reação de PCR para amplificação do gene *bgl1* sem o códon de parada da tradução; M) Marcador 1 kb Ladder Gibco.

Os fragmentos obtidos por PCR, foram ligados separadamente, ao vetor pGEM-T. A confirmação da clonagem foi realizada a partir do DNA plasmidial extraído de clones transformantes e digeridos com as enzimas de restrição presentes nos *primers*. Após confirmação, os vetores foram denominados **pGEM-bgl1PS** (gene com peptídeo sinal nativo), **pGEM-bgl1RS** (gene sem peptídeo sinal) e **pGEM-bgl1R** (gene sem códon de parada da tradução).

6.1.5 β -Glicosidase de *Neurospora crassa*

Com base na sequência do cDNA obtida do GenBank (nº. de acesso XM_951090.1), o gene para a β -glicosidase intracelular (GH1-1), de 477 resíduos de aminoácidos, do fungo *N. crassa*, foi sintetizado quimicamente pela empresa Epoch Biosciences (EUA) que o enviou clonado no sítio de EcoRV do vetor pBluescriptII SK (Stratagene), vetor **pBlue-GH1-1**. O gene sintetizado corresponde a toda a sequência codante para a proteína madura. Foi verificado se não conteria sítios para enzimas de restrição utilizadas nas estratégias de clonagem, no entanto, todas as mudanças que foram realizadas caracterizaram mutações silenciosas no gene nativo,

codificando proteína com estrutura primária idêntica à original. O sítio de restrição para a enzima BamHI foi adicionado às extremidades 5' e 3' do gene para facilitar a clonagem nos vetores de expressão.

6.1.6 Transportador de celodextrinas de *Neurospora crassa*

Para o isolamento do transportador CDT-1 de *N. crassa*, inicialmente, o fungo foi cultivado em meio mínimo com glicose e, decorridas 72 horas de crescimento, procedeu-se com a extração do RNA total. A partir do RNA foram obtidos os cDNAs, por meio da técnica de RT-PCR, que foram utilizados como molde na reação de PCR para o isolamento do gene *cdt-1* de 1645 pb (Figura 13). Os *primers* (celtt-F e celtt-R) foram construídos com base na sequência do banco de dados GenBank (nº. de acesso XM_959259.1) adicionando-se o sítio para a enzima de restrição HindIII às extremidades para facilitar as etapas de clonagem.

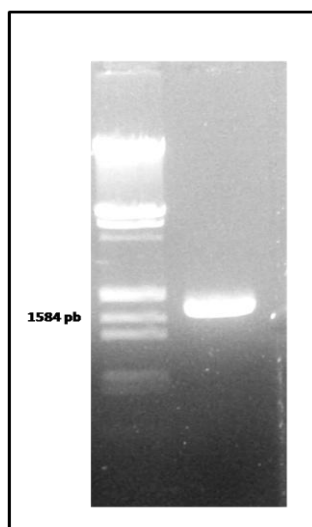


Figura 13. Amplificação de fragmento de cDNA relativo ao gene *cdt-1* de *N. crassa*. Análise feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. M) Marcador λ Eco/Hind; 1) reação de PCR.

O fragmento obtido por PCR após purificação, foi ligado ao vetor pGEM-T. A confirmação da clonagem foi realizada a partir do DNA plasmidial extraído de clones transformantes e digeridos com a enzima de restrição com sítios presentes nos *primers*. A análise confirmou a presença do inserto assim como a integridade do vetor. Esse vetor foi denominado **pGEM-cdt1**.

6.1.7 Sequenciamento dos genes isolados

Para confirmar as sequências obtidas das reações de PCR os vetores construídos foram submetidos a sequenciamento automático utilizando os *primers* M13 Universal e M13 Reverso, que anelam em regiões específicas dos vetores pBluescript II KS e pGEM-T. As sequências resultantes foram submetidas ao programa BLAST, e comparadas com as sequências presentes no banco de dados GenBank, confirmando assim o isolamento dos genes de trabalho (Tabela 5).

Tabela 5. Genes isolados e referências no banco de dados.

Gene	Micro-organismo de origem	Vetor de clonagem	Referência no banco de dados
<i>eglII</i>	<i>T. reesei</i>	pBlue-eglII	Samanta <i>et al.</i> (2005)
<i>cbhI.1</i>	<i>P. chrysosporium</i>	pBlue-cbhI.1RS	Sims <i>et al.</i> (1994)
<i>bgl4</i>	<i>H. grisea</i>	pGEM-bgl4RS e pGEM-bgl4R	Takashima <i>et al.</i> (1999)
<i>bgl1</i>	<i>S. fibuligera</i>	pGEM-bgl1PS, pGEM-bgl1RS e pGEM-bgl1R	Machida <i>et al.</i> (1988)
<i>gh1-1</i>	<i>N. crassa</i>	pBlue-GH1-1	Galagan <i>et al.</i> (2003)
<i>cdt-1</i>	<i>N. crassa</i>	pGEM-cdt1	Galagan <i>et al.</i> (2003)

6.2 Construção dos vetores episomais de expressão em *S. cerevisiae*

6.2.1 Vetores com genes nativos

Para analisar a expressão dos genes celulolíticos isolados anteriormente em *S. cerevisiae* sob controle do promotor constitutivo *PGK1*, foi utilizado o vetor episomal Y1PGK1 (Anexo 5), que, além da região terminadora da transcrição do gene *PGK1*, contém a marca de seleção *LEU2*. A estratégia geral para a construção destes vetores é mostrada na Figura 14.

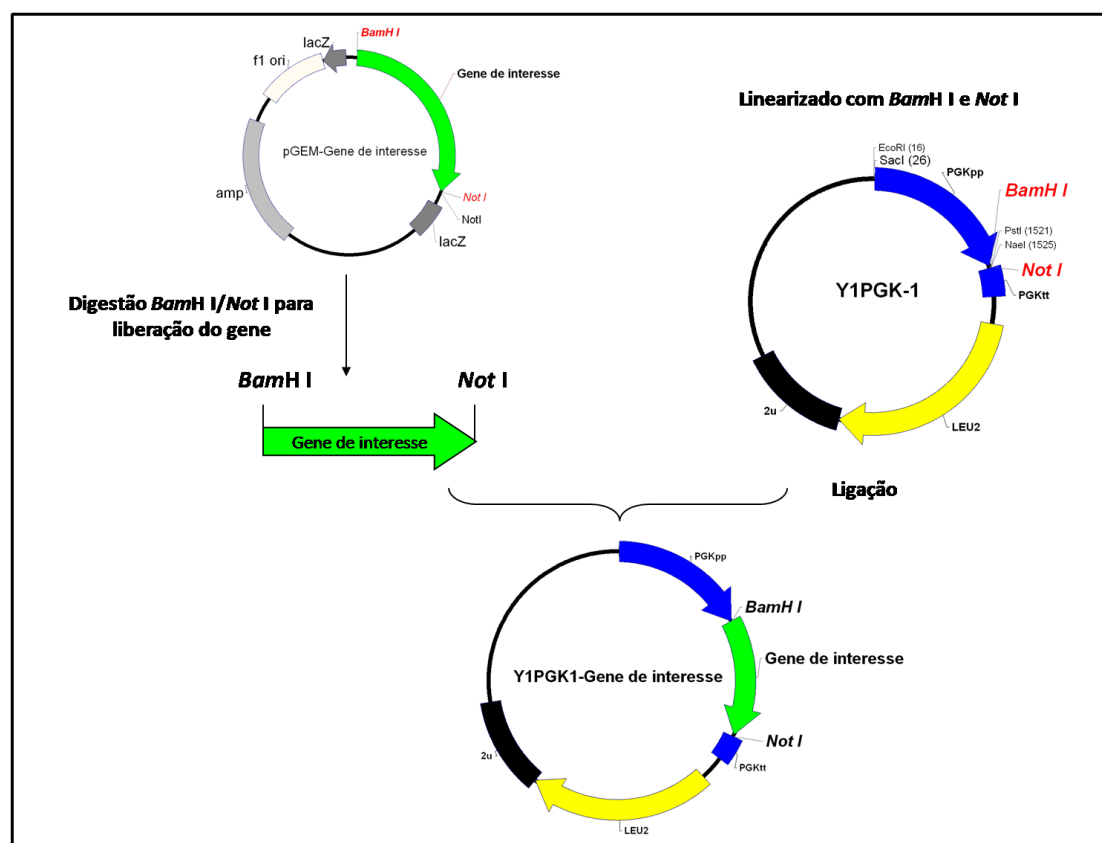


Figura 14. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores Y1PGK1 contendo o gene de interesse.

Inicialmente, os vetores **pBlue-eglIII**, **pBlue-cbhI.1RS** e **pGEM-bgl1PS** foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e NotI para liberar os fragmentos correspondentes aos genes de interesse. Após purificação, esses fragmentos foram ligados ao vetor Y1PGK1 previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição seguindo-se transformação de *E. coli*. Após extração dos plasmídios, a presença do inserto foi confirmada por análise de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem. Esperava-se a liberação de um fragmento de 7,4 kb correspondente ao vetor, e outro fragmento de ~1,2 kb para o gene *eglII*, ~1,6 kb para o gene *cbhI.1* e ~2,6 kb para o gene *bgl1* (Figura 15). Todas as análises confirmaram a presença dos insertos assim como a integridade dos vetores. Os vetores resultantes foram denominados **Y1PGK1-egl**, **Y1PGK1-cbh** e **Y1PGK1-bgl1**.

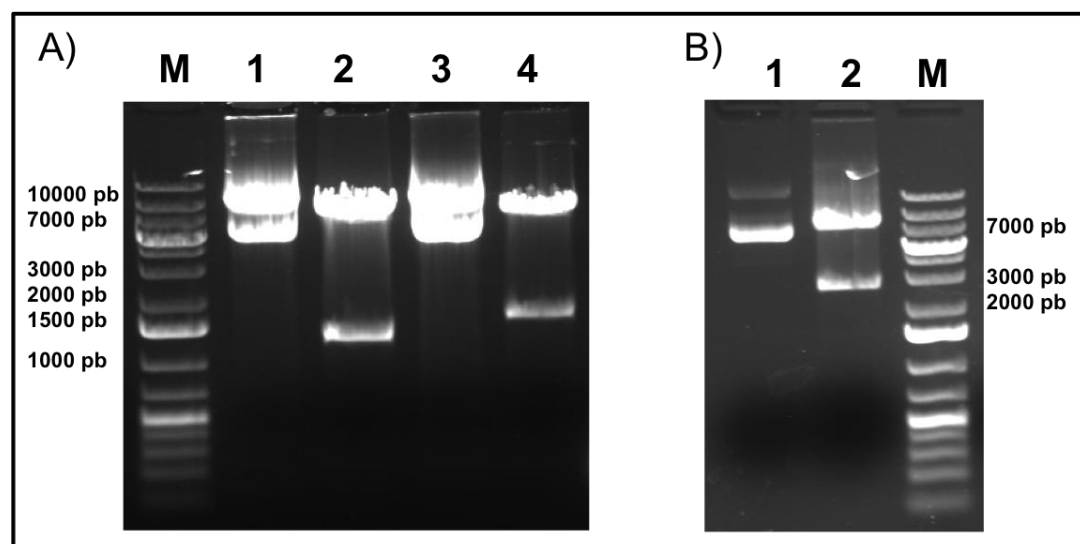


Figura 15. Análise de restrição dos vetores Y1PGK1-eglII, Y1PGK1-cbhI.1 e Y1PGK1-BglI. Análise feita em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A. M) Marcador O'Gene Ruler 1 kb Plus Ladder; 1) Y1PGK1-eglII; 2) Y1PGK1-eglII digerido com BamHI e NotI; 3) Y1PGK1-cbhI.1RS; 4) Y1PGK1-cbhI.1RS digerido com BamHI e NotI. B. 1) Y1PGK1-bgl1; 2) Y1PGK1-bgl1 digerido com BamHI e NotI; M) Marcador O'Gene Ruler 1 kb Plus Ladder.

6.2.2 Vetores com genes com peptídeo sinal do fator α

Para analisar a expressão dos genes *bgl4* e *bgl1* com peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* os genes foram inicialmente liberados dos vetores de clonagem e ligados ao vetor pPIC9 (que contém a sequências codificadoras do peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*). Os vetores construídos, pPIC9-bgl1 e pPIC9-Bgl4, foram então digerido com as enzimas de restrição BamHI e NotI (para o gene *bgl1*) e BamHI (para o gene *bgl4*) para liberar o fragmento corresponde aos genes de interesse em fase com os sinais de secreção do fator α .

A mesma estratégia para clonagem no vetor Y1PGK1 foi utilizada (Figura 14) para o gene *bgl1*. Para confirmar a construção do vetor de expressão esperava-se um fragmento de 7,4 kb correspondente ao vetor Y1PGK1 e outro de ~2,6 kb corresponde ao gene *bgl1* após digestão com as enzimas utilizadas para clonagem (Figura 16A).

O gene *bgl4* após liberação do vetor de clonagem, foi ligado ao vetor YEp351PGK previamente digerido com a enzima de restrição BglII (compatível com BamHI) e desfosforilado com fosfatase alcalina (para evitar o religamento). A enzima

BstEII foi utilizada para confirmar a clonagem e orientação do fragmento no vetor. Eram esperados fragmentos de ~6,8 e ~2,4 kb (Figura 16B). Todas as análises confirmaram a presença do inserto assim como a integridade dos vetores, esses vetores foram denominados **Y1PGK1-*abgl1*** e **Y1PGK1-*abgl4***.

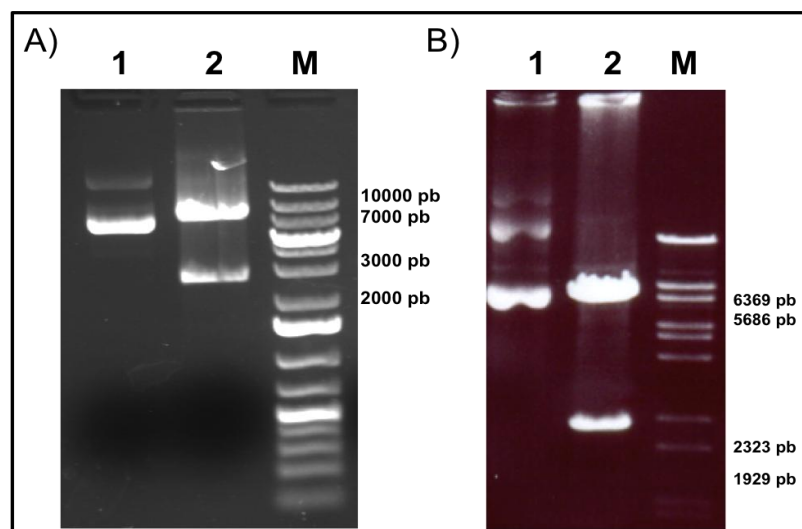


Figura 16. Análise de restrição dos vetores Y1PGK1-*abgl1* e Y1PGK1-*abgl4*. Análise em em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A. 1) Y1PGK1-*abgl1*; 2) Y1PGK1-*abgl1* digerido com BamHI e NotI; M) Marcador O'Gene Ruler 1 kb Plus Ladder. B. 1) Y1PGK1-*abgl4*; 2) Y1PGK1-*abgl4* digerido com BstEII; M) Marcador λ BstEII.

6.2.3 Vetores com genes fusionados a porção C-terminal da α -aglutinina

Para a fusão com a porção C-terminal da α -aglutinina, os genes *bgl1* e *bgl4* após liberação do vetor de clonagem foram primeiramente clonados nos vetores pGEM-Aglu1 e pIJ-Aglu1, respectivamente, que contêm o fragmento C-terminal da α -aglutinina. Para a clonagem da fusão *bgl1-Aglu1* no vetor de expressão Y1PGK1, o vetor pGEM-*bgl1Aglu1* foi digerido com a enzima de restrição NotI presente nos *primers* e após purificação foi ligada ao vetor Y1PGK1 previamente digerido com a mesma enzima e desfosforilado com fosfatase alcalina. Após transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial, os vetores foram digeridos com a enzima de restrição NotI para confirmar a clonagem e com a enzima BstEII para confirmar a orientação desejada do fragmento no vetor (para entrar em fase com o promotor *PGK1* presente no vetor). Era esperado um fragmentos de 7,4 kb correspondente ao

6.RESULTADOS

vetor e outro de ~4,0 kb correspondente a fusão *bgl1Aglu* para a digestão com *NotI*, e um fragmento de ~9 kb e outro de ~2,5 kb para a digestão com *BstEII* (Figura 17A e B). As análises confirmaram a presença do inserto na orientação desejada, assim como a integridade do vetor. Esse vetor foi denominado **Y1PGK1-*bgl1Aglu1***.

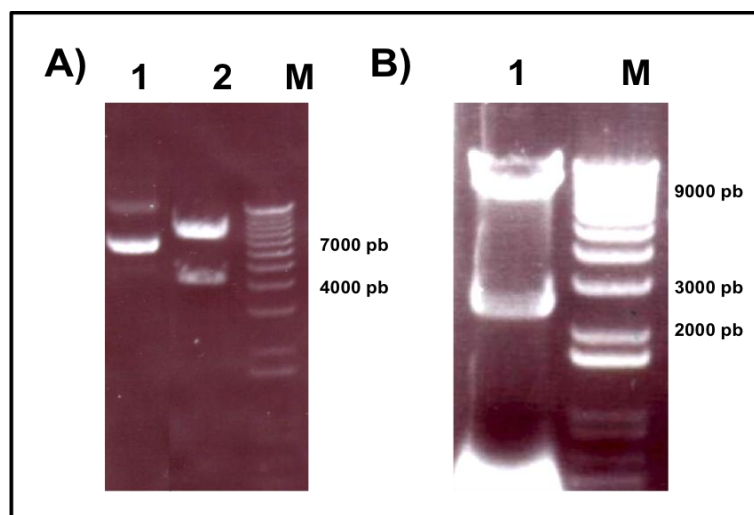


Figura 17. Análise de restrição do vetor Y1PGK1-*bgl1Aglu1*. Análise em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A. Digestão para confirmar clonagem. 1) Y1PGK1-*bgl1Aglu1*; 2) Y1PGK1-*bgl1Aglu1* digerido com *NotI*; M) Marcador 1 kb Ladder Plus (Invitrogen). B. Digestão para confirmar orientação desejada. 1) Y1PGK1-*bgl1Aglu1* digerido com *BstEII*; M) Marcador 1 kb (Gibco).

Para a construção do vetor de expressão com o gene *bgl4* fusionado a porção C-terminal da α -aglutinina, inicialmente o vetor pIJ-*bgl4Aglu1* foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* para liberação da fusão *bgl4Aglu1*. Após purificação, esse fragmento foi ligado ao vetor de expressão YADH-*HindIII*- (vetor de expressão em *S. cerevisiae* com o promotor *ADHI*) linearizado com a mesma enzima de restrição e desfosforilado com fostase alcalina. Após transformação bacteriana e procedimento de extração plasmidial dos transformantes, para confirmar a clonagem e a orientação desejada (para entrar em fase com o promotor *ADHI* presente no vetor) foi realizada digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *SalI*, respectivamente. Era esperado um fragmento de 5,6 kb correspondente ao vetor YADH-*HindIII*- e outro de ~2,3 kb correspondente a fusão *bgl4Aglu1* para a digestão com *HindIII* e fragmentos de ~1,8 kb e ~8,1 kb para a digestão com *SalI* (Figura 18A e B). Todas as análises

confirmaram a presença do inserto na orientação desejada assim como a integridade do vetor. Esse vetor foi denominado **YADH-bgl4Aglu1**.

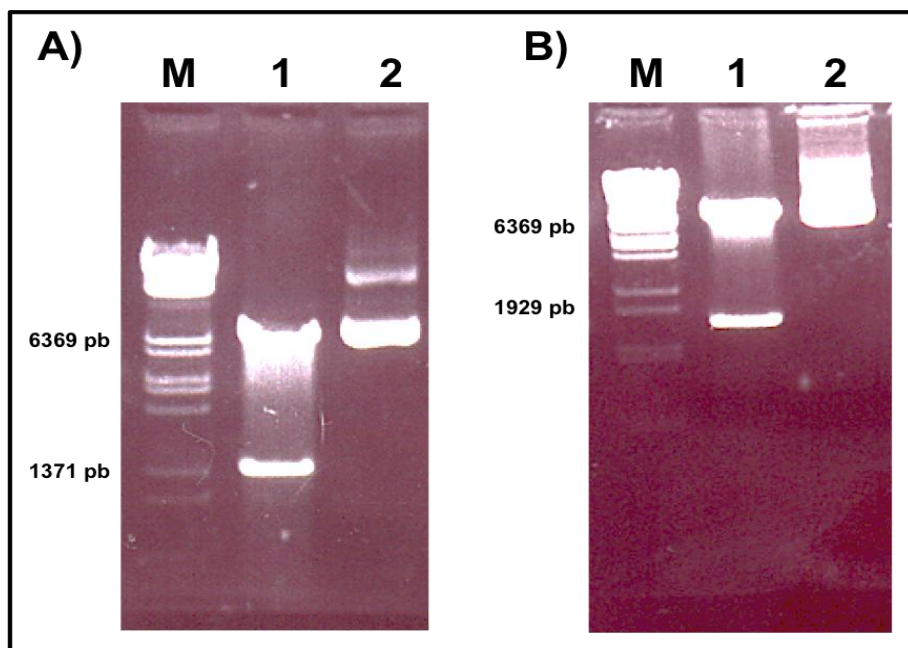


Figura 18. Análise de restrição do vetor YADH-bgl4Aglu1. Análise em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A. Digestão para confirmar clonagem. M) Marcador λ BstEII; 1) YADH-bgl4Aglu1 digerido com HindIII; 2) YADH-bgl4Aglu1. B. Digestão para confirmar orientação desejada. 1) YADH-bgl4Aglu1; 2) YADH-bgl4Aglu1 digerido com Sall; M) Marcador λ BstEII.

6.3 Construção de vetor episossomal com duplo cassete de expressão em *S. cerevisiae*

Para analisar a expressão dos genes *gh1.1* e *cdt-1* conjuntamente, foi construído um vetor episossomal com dois cassetes de expressão. A estratégia geral para a construção deste vetor é mostrada na Figura 19.

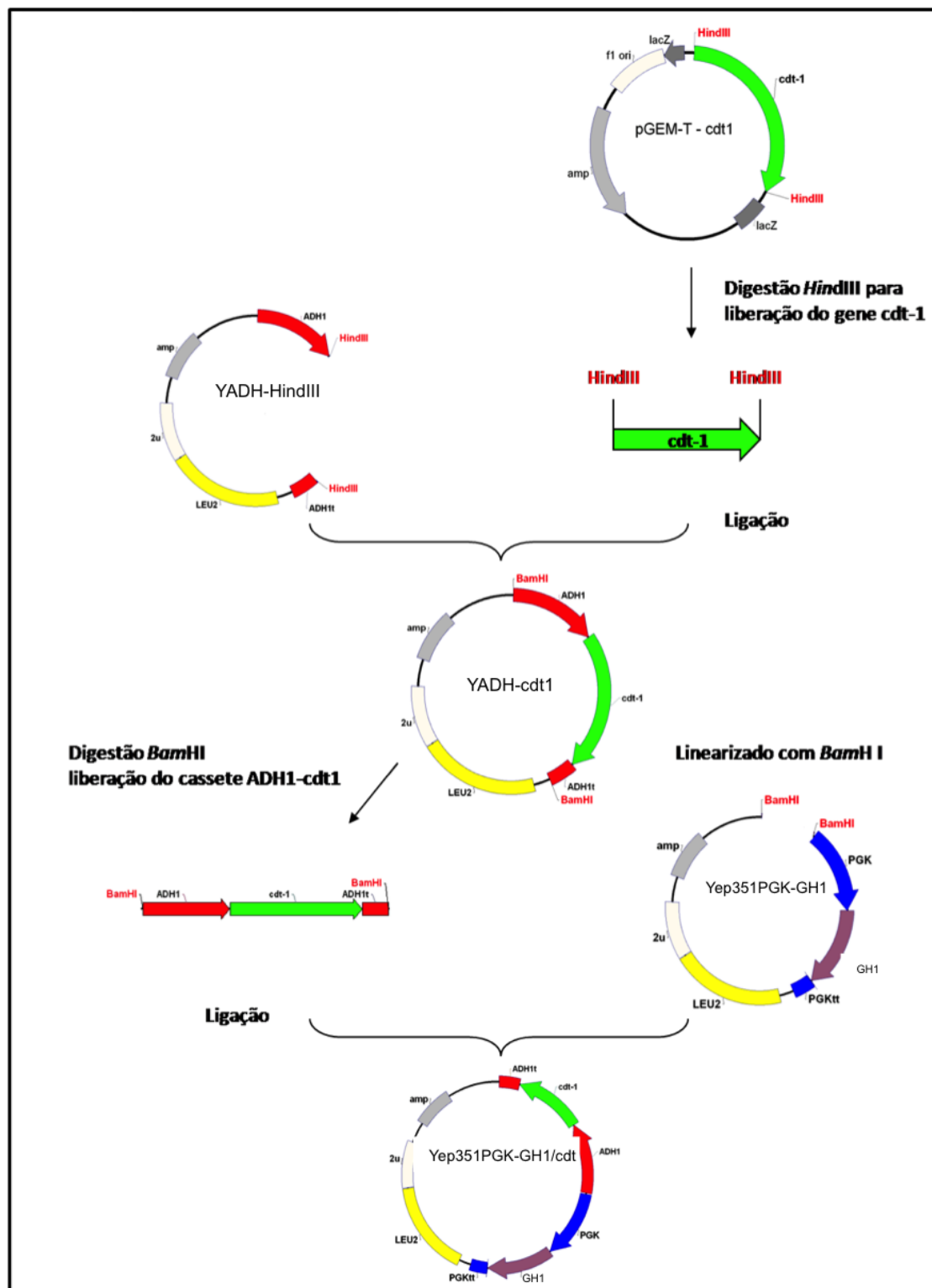


Figura 19. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor YEp351PGK-GH1/ctd1.

Inicialmente, o vetor pGEM-ctd1 foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* para liberar o fragmento correspondente ao gene *ctd-1*. Após purificação, esse

6.RESULTADOS

fragmento foi ligado ao vetor YADH351-HindIII previamente linearizado com a mesma enzima e desfosforilado com fosfatase alcalina. Após transformação bacteriana e extração dos plasmídios, a presença do inserto foi confirmada por análise de restrição com a enzima HindIII e a orientação desejada (gene *cdt-1* em fase com o promotor *ADHI*) com a enzima de restrição Sall (Figura 20). Para o vetor com o inserto esperava-se a liberação de um fragmento de ~5,6 kb correspondente ao vetor, e outro fragmento de ~3,8 kb correspondente ao cassete de expressão com o gene *cdt-1*. Para o vetor com o inserto na orientação desejada esperava-se fragmentos de ~7,8 kb e ~1,6 kb. Todas as análises confirmaram a presença do inserto assim como a integridade do vetor e a orientação desejada. Esse vetor foi denominado: **YADH-cdt1**.

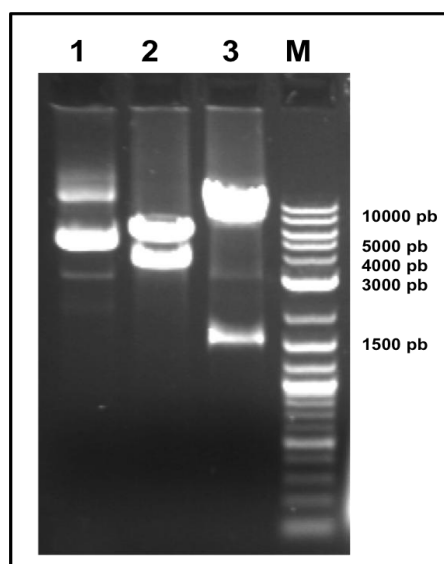


Figura 20. Análise de restrição do vetor YADH-cdt1. Análise realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. 1) YADH-cdt; 2) YADH-cdt digerido com BamHI; 3) YADH-cdt digerido com Sall; M) Marcador 2 log.

Para a clonagem do gene *ghl-1* no vetor de expressão, o vetor pGEM-GH1 foi digerido com a enzima de restrição BamHI para liberar o fragmento correspondente ao gene e, após purificação, esse fragmento foi ligado ao vetor YEp351PGK previamente linearizado com a enzima de restrição BglII (com extremidades compatíveis para ligação de fragmentos digeridos com a enzima de restrição BamHI), e desfosforilado com fosfatase alcalina.

6.RESULTADOS

Após transformação bacteriana e extração dos plasmídios, a presença do inserto e a orientação desejada foi confirmada por análise de restrição com a enzima EcoRV. Para confirmar a clonagem esperava-se a liberação de fragmentos de ~8 kb e 1,6 kb (Figura 21). A análise confirmou a presença do inserto assim como a integridade dos vetores. O vetor foi denominado **YEp351PGK-GH1**.

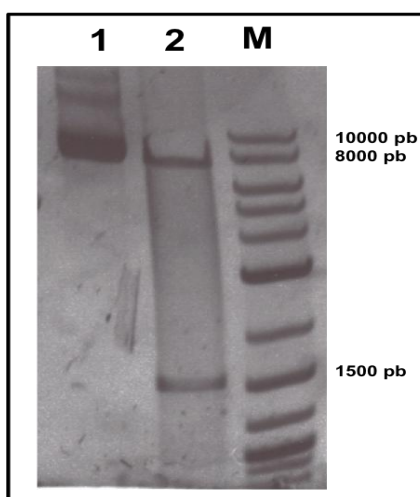


Figura 21. Análise de restrição do vetor YEp351PGK-GH1. Análise realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. 1) YEp351PGK-GH1; 2) YEp351PGK-GH1 digerido com EcoRV; M) Marcador 2 log.

Posteriormente, o vetor YADH-*cdt1* foi digerido com a enzima de restrição BamHI para liberar o cassete de expressão, contendo o promotor *ADHI*, o gene *cdt-1* e o terminador de transcrição *ADHI*. Após purificação, este fragmento foi ligado ao vetor YEp351PGK-GH1 digerido com a mesma enzima de restrição e desfosforilado com fosfatase alcalina. Após transformação bacteriana e extração dos plasmídios, a presença do inserto foi confirmada por análise de restrição com a mesma enzima utilizada para clonagem (Figura 22). Para confirmar a clonagem esperava-se a liberação de fragmentos de ~9,6 kb e 3,8 kb. A análise confirmou a presença do inserto assim como a integridade do vetor. O vetor foi denominado **YEp351PGK-GH1/*cdt***.

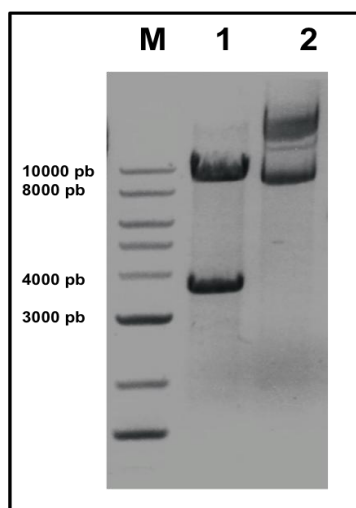


Figura 22. Análise de restrição do vetor YEp351PGK-GH1/cdt. Análise realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. M) Marcador 2 log; 1) YEp351PGK-GH1/cdt digerido com BamHI; 2) YEp351PGK-GH1/cdt.

A Tabela 6 resume a descrição dos vetores de expressão construídos nesta etapa.

Tabela 6. Vetores de expressão constitutiva em *S. cerevisiae*.

Proteína	Micro-organismo de origem	Vetor de clonagem	Vetor de expressão	Estratégia
EGL II	<i>T. reesei</i>	pBlue-eglII	Y1PGK1-eglII	Gene completo
CBH I.1	<i>P. chrysosporium</i>	pBlue-cbhI.1RS	Y1PGK1-cbhI.1	Gene completo
BGL1	<i>S. fibuligera</i>	pGEM-bgl1PS	Y1PGK1-bgl1	Gene completo
BGL1	<i>S. fibuligera</i>	pGEM-bgl1RS	Y1PGK1-αbgl1	Gene com PS do fator α
BGL1	<i>S. fibuligera</i>	pGEM-bgl1R	Y1PGK1-bgl1Aglu1	Gene fusionado a α -aglutinina
BGL4	<i>H. grisea</i>	pGEM-bgl4RS	Y1PGK1-αbgl4	Gene com PS do fator α
BGL4	<i>H. grisea</i>	pGEM-bgl4R	YADH-bgl4Aglu1	Gene fusionado a α -aglutinina
GH1-1 e CDT-1	<i>N. crassa</i>	pBlue-cdt1 pBlue-GH1-1	YEp351PGK-GH1/cdt	Genes nativos

6.4 Transformação de *S. cerevisiae* com vetores episomais e detecção da atividade enzimática

A linhagem MFL de *S. cerevisiae* foi transformada com os vetores de expressão construídos na etapa anterior, separadamente, para confirmar a produção de enzimas funcionais. Devido à presença do gene essencial β -isopropilmalato desidrogenase (*LEU2*) nos vetores, que complementam a mutação auxotrófica *leu2* da linhagem MFL, os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo-ágar (SD-ágar) sem leucina. O vetor Y1PGK1 foi também utilizado para transformar a mesma linhagem de *S. cerevisiae* e servir como controle negativo.

6.4.1 Endoglicanase e celobiohidrolase

Cada transformação com os vetores Y1PGK1-eglIII e Y1PGK1-cbhI.1, resultou entre 200-300 transformantes. Para *screening* dos clones expressando as enzimas celulolíticas endoglicanase e celobiohidrolase, 10 clones de cada sistema, assim como uma colônia do controle negativo, foram selecionados aleatoriamente e submetidos a crescimento em placa de Petri com meio mínimo adicionado de CMC, indicado para detecção de atividade celulolítica. Os transformantes expressando as enzimas recombinantes foram detectados pela presença de halo de hidrólise após coloração com *Congo Red* (Figura 23). Como pode ser observado, todos os transformantes analisados apresentaram halos de hidrólise de tamanhos similares dentro de cada sistema, com exceção do controle negativo, que não apresentou halo, confirmando assim atividade celulolítica.

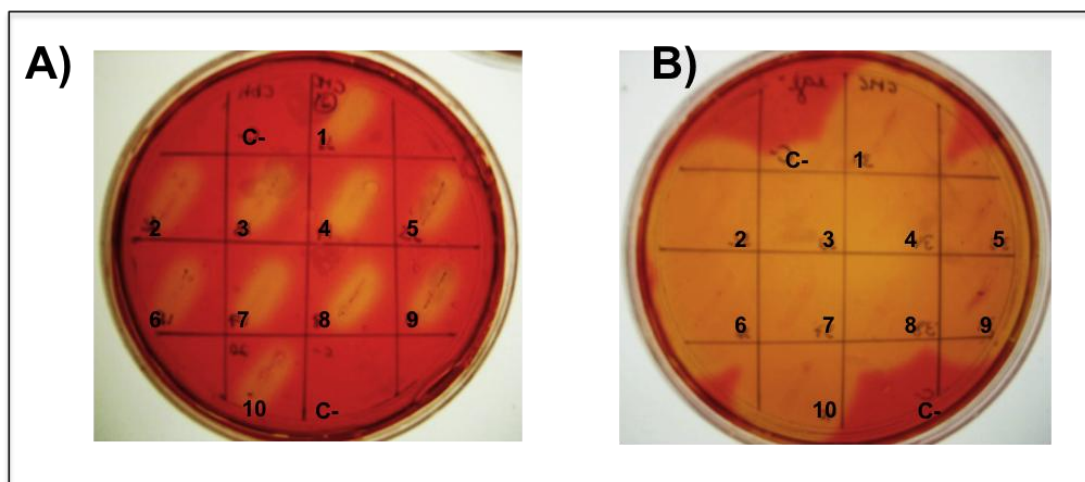


Figura 23. Análise de formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo CMC 0,5%. 1) Clones de *S. cerevisiae* transformados com o vetor Y1PGK1-cbhI.1 (1-10) e Y1PGK1 (C-); 2) Clones de *S. cerevisiae* transformados com o vetor Y1PGK1-eglII (1-10) e Y1PGK1 (C-).

Uma colônia de cada construção foi escolhida aleatoriamente (já que não foi observada diferença nos tamanhos dos halos de hidrólise entre os clones), para as análises posteriores. Esses clones foram denominados Clone C- (clone transformado com o vetor Y1PGK1), Clone EGLII (clone transformado com o vetor Y1PGK1-eglII) e Clone CBHI.1 (clone transformado com o vetor Y1PGK1-cbhI.1) (Figura 20). Como esperado, o clone expressando a enzima CBHI.1 apresentou halo de hidrólise sobre CMC menor do que aquele encontrado no clone expressando a EGLII, já que a atividade de exoglicanase é descrita como sendo baixa sobre celulose amorfa, ao contrário das endoglicanases que apresentam alta atividade sobre esse substrato (Figura 24).

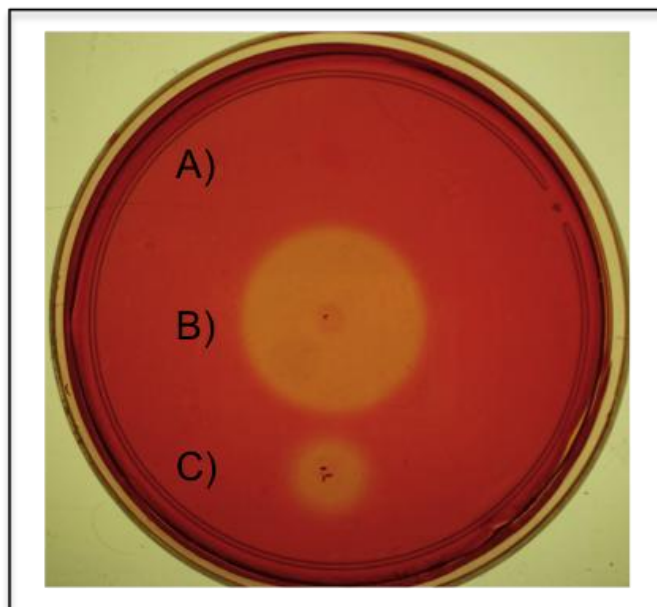


Figura 24. Análise de formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo CMC 0,5%. (A) Clone controle negativo; (B) Clone EGLII e (C) Clone CBHI.1.

Para análise de expressão em meio líquido foram realizadas culturas paralelas em meio mínimo SD dos clones anteriormente selecionados, assim como do clone controle negativo. Alíquotas foram retiradas diariamente dessas culturas para a determinação da atividade em termos de U/mL, sobre os substratos CMC e pNPC, respectivamente. A cultura controle e os clones EGLII e CBHI.1 apresentaram o mesmo perfil de crescimento e densidade celular. Como pode ser observado na Figura 25, a produção das enzimas heterólogas aumentou proporcionalmente. Foi detectada atividade após as primeiras 24 horas de crescimento com um aumento gradual nos níveis de atividade e maior produção no último ponto analisado, após 96 horas. O clone expressando a EGLII apresentou atividade quando utilizado o substrato CMC (celulose amorfa) sobre a qual as endoglicanases têm maior atividade atingindo 0,049 U/mL após 96 horas, e baixa atividade sobre o substrato pNPC atingindo 0,0065 U/mL após 96 horas. O clone expressando a CBHI.1 apresentou atividade apenas quando utilizado o substrato pNPC atingindo 0,1954 U/mL após 96 horas. Embora o clone CBHI.1 tenha apresentado halo de hidrólise em placa de CMC, não apresentou atividade quando utilizado o sobrenadante da cultura provavelmente devido a baixa concentração da enzima. Não foi detectada atividade no sobrenadante do controle negativo.

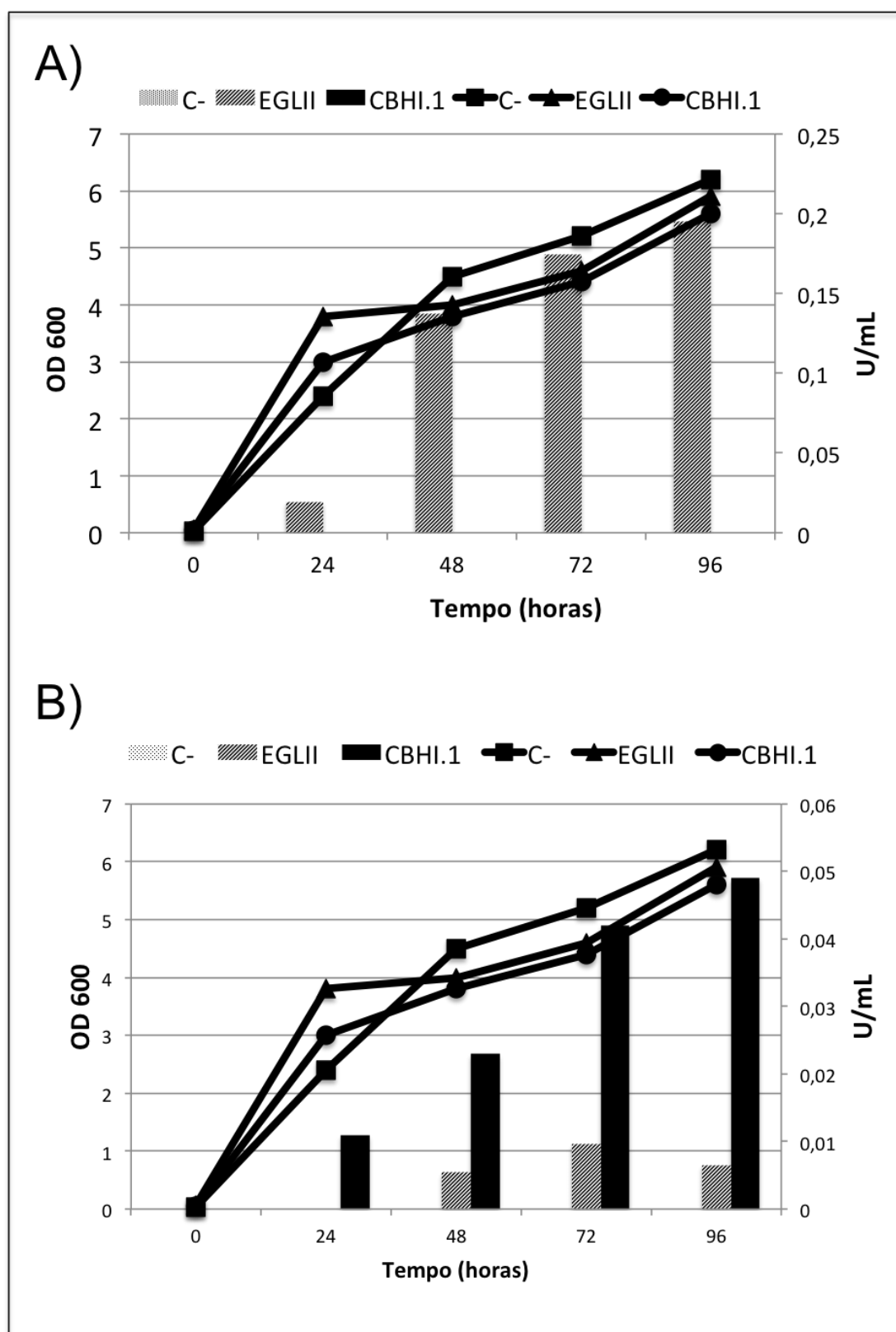


Figura 25. Cinética de produção enzimática dos clones EGLII e CBHI.1. Linhas inteiras representam a densidade ótica e as barras as atividades. A) Curva de

crescimento e atividade sobre CMC. B) Curva de crescimento e atividade sobre pNPC. C-: controle negativo

6.4.2 β -Glicosidase 1 e β -glicosidase 4

A transformação com os vetores Y1PGK1-bgl1, Y1PGK1- α bgl1, Y1PGK1-bgl1Aglu1, Y1PGK1- α bgl4 e YADH-bgl4Aglu1, resultou entre 100-300 transformantes, para cada sistema. A seleção dos transformantes foi realizada pela capacidade de crescimento em meio mínimo com celobiose como única fonte de carbono após 72 horas de incubação. Clones selecionados aleatoriamente de cada sistema, foram semeados em placa de meio SC-tamponado, no entanto, não houve diferença no crescimento das colônias quando comparado ao clone controle, em nenhuma das construções, como exemplificado na Figura 26 com clones transformantes com o vetor Y1PGK1-bgl1Aglu1.

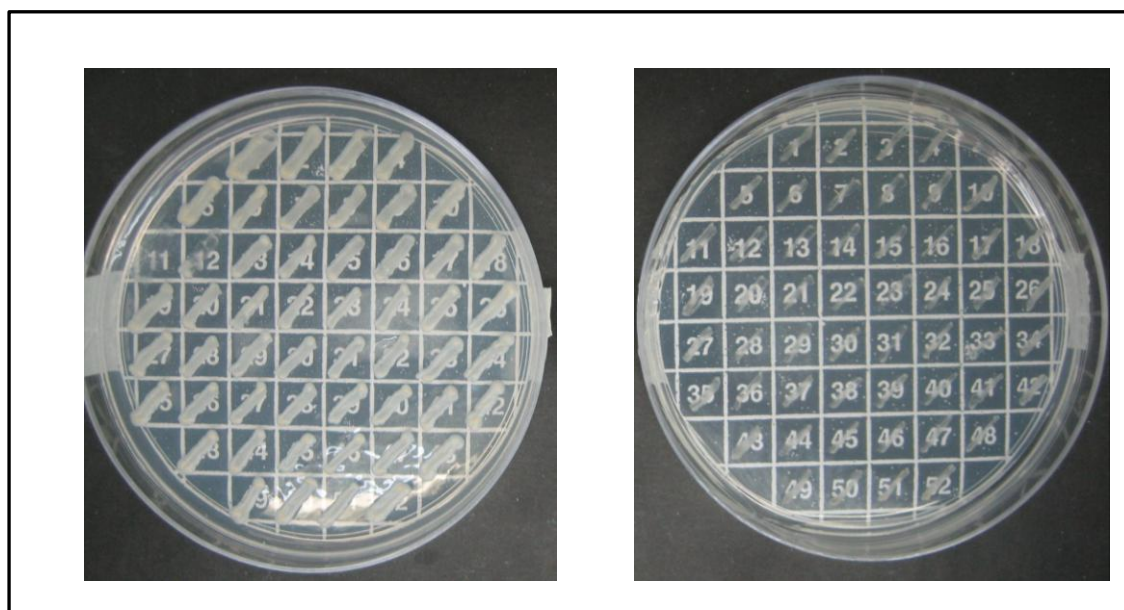


Figura 26. Análise de crescimento de clones transformantes em placa com celobiose como única fonte de carbono. A) Placa de meio mínimo com glicose (SD); B) Placa de meio mínimo com celobiose (SC-Tamponado). 1-50: clones transformantes; 51-52: controles negativos.

Ainda, transformantes de todos os sistemas, selecionados aleatoriamente, foram crescidos em meio SC-Tamponado líquido. Como controle positivo do

6.RESULTADOS

crescimento, um clone selecionado foi crescido em meio com glicose como fonte de carbono (SD). Esperava-se que os clones secretores de β -glicosidase fossem capazes de degradar a celobiose do meio, consumir a glicose e crescer. No entanto, como pode ser observado nos gráficos de crescimento das Figuras 27, 28 e 29, nenhum dos clones analisados apresentou crescimento diferenciado do controle negativo durante as 72 horas de cultivo.

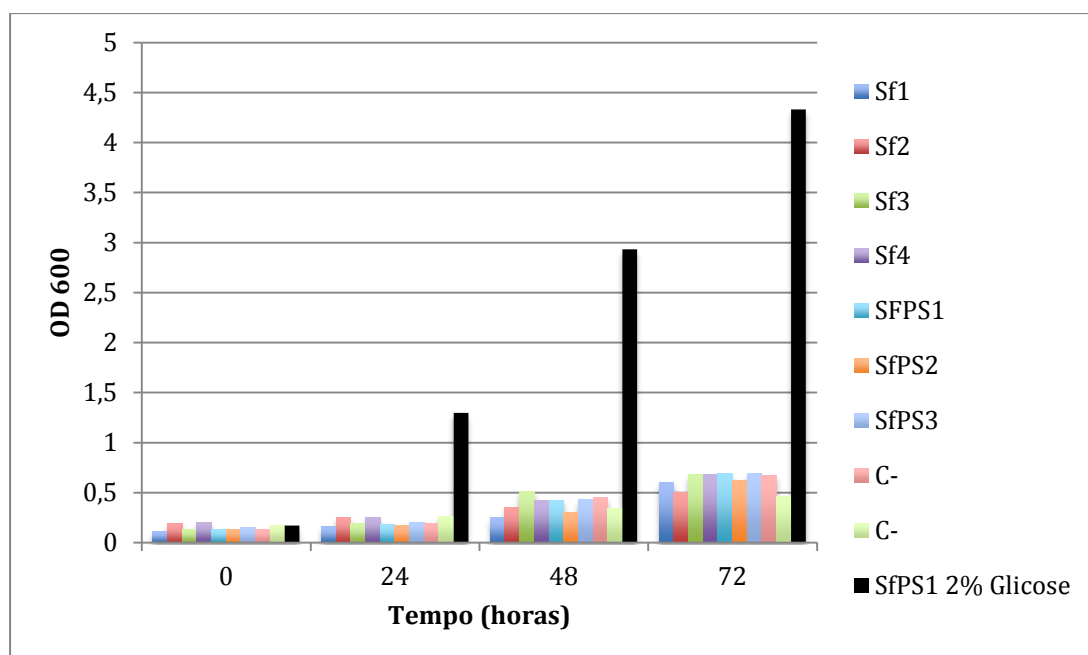


Figura 27. Análise de crescimento em meio mínimo com celobiose como única fonte de carbono. Clones transformantes de *S. cerevisiae* com o vetor Y1PGK1-bgl1 (SfPS1, SfPS2, SfPS3) e com o vetor Y1PGK1-abgl1 (Sf1, Sf2, Sf3 e Sf4). Dois controles negativos também foram utilizados (C-). Como controle do crescimento o clone SfPS1 foi crescido em meio com 2% glicose.

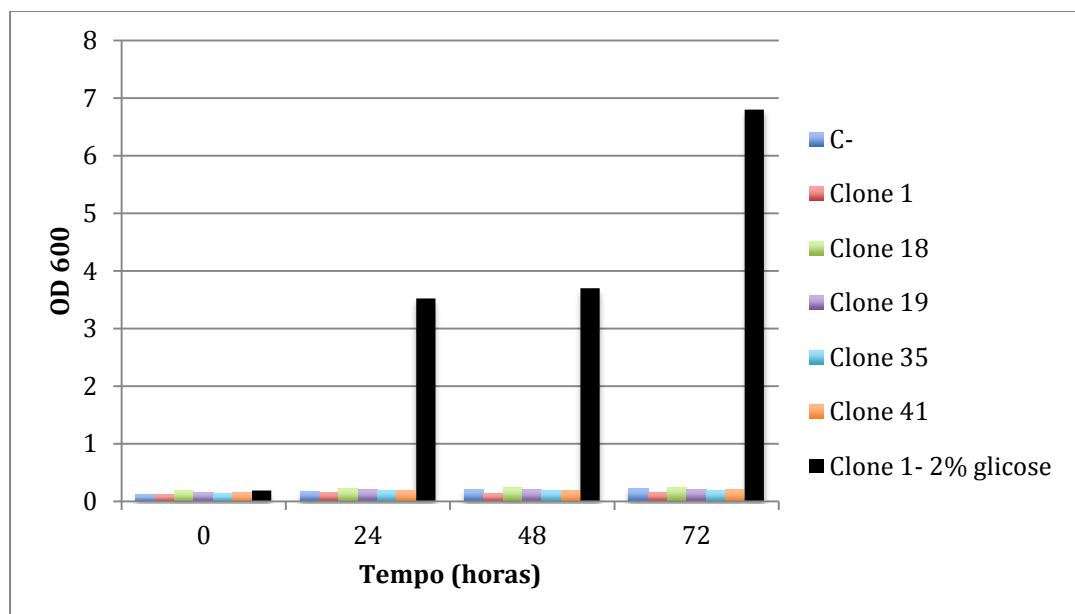


Figura 28. Análise de crescimento em meio mínimo com celobiose como única fonte de carbono. Clones transformantes de *S. cerevisiae* com o vetor Y1PGK1-bgl1Aglu1 (1, 18, 19, 35 e 41). O clone controle negativo também foi utilizado (C-). Como controle do crescimento o clone 1 foi crescido em meio com glicose 2%.

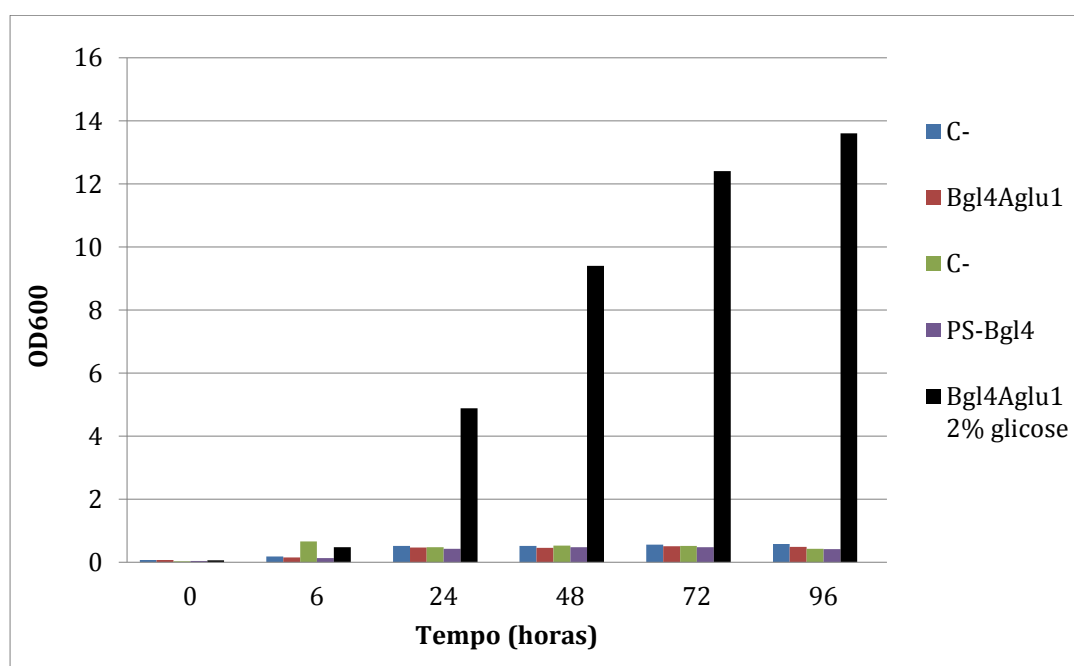


Figura 29. Análise de crescimento em meio mínimo com celobiose como única fonte de carbono. Clones transformantes de *S. cerevisiae* com os vetores YEp351PGK-bgl4 (PS-Bgl4) e YADH-bgl4Aglu1 (Bgl4Aglu1). Dois controles negativos (C-) também foram utilizados. Como controle do crescimento o clone Bgl4Aglu1 foi crescido em meio com glicose 2%.

6.4.3 Sistema β -glicosidase GH1-1 e transportador CDT-1

A transformação com o vetor Y1PGK1-GH1/cdt contendo os genes da β -glicosidase intracelular GH1-1 e do transportador de celodextrinas CDT-1 resultou em ~200 transformantes. Como controle a mesma linhagem de *S. cerevisiae* foi também transformada com o vetor Y1PGK1-GH1 que expressa apenas a β -glicosidase, sem o transportador. Para *screening* dos transformantes, 45 clones do sistema Y1PGK1-GH1/cdt e dois clones do sistema Y1PGK1-GH1, foram selecionados aleatoriamente e analisados quanto à capacidade de crescimento em meio mínimo com celbiose (SC-tamponado) como única fonte de carbono. Como controle negativo foi utilizado um clone transformado com o vetor Y1PGK1 (C-). Como pode ser observado na Figura 30, após 72 horas de incubação a 30°C, alguns clones analisados apresentaram crescimento na placa de celbiose, comparável ao crescimento na placa com glicose. O Clone 4 se destacou pelo crescimento mais significativo. Os dois clones expressando apenas a β -glicosidase intracelular não foram capazes de crescer, assim como o clone controle.

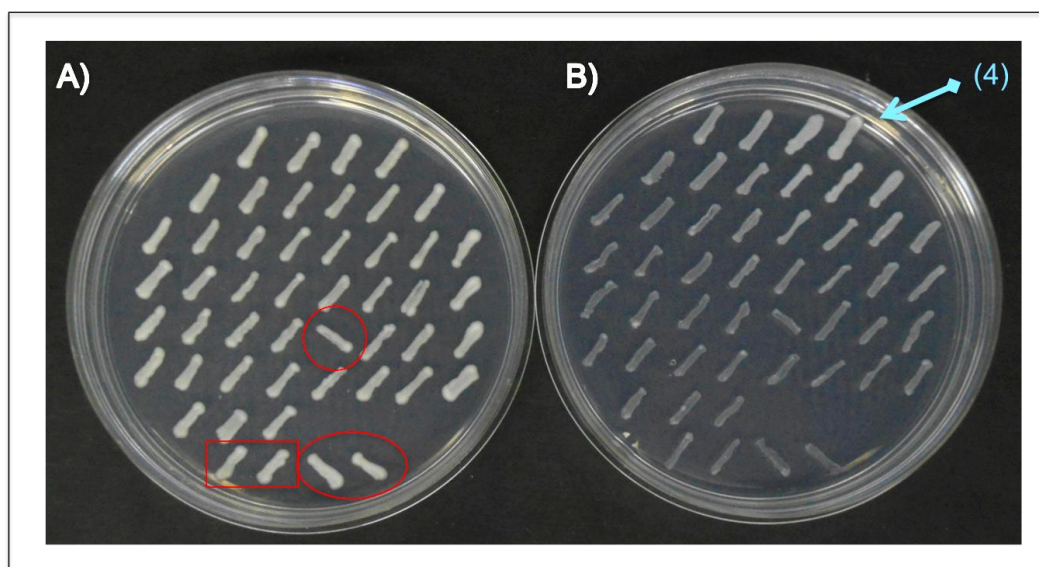


Figura 30. Análise de crescimento em placa com celbiose como única fonte de carbono. A) Placa de meio mínimo com glicose (SD); B) Placa de meio mínimo com celbiose (SC-Tamponado). Controles negativos circulado em vermelho. Destacado com um quadrado os clones transformados com o vetor Y1PGK1-GH1. Indicado com seta azul o Clone 4.

O Clone 4 foi então selecionado e denominado Clone GH1/cdt para as análises posteriores (Figura 31).



Figura 31. Análise de crescimento em placa com celobiose como única fonte de carbono. A) Controle negativo; B) Clone EGLII; C) Clone GH1/cdt e D) Clone CBHI.1.

A presença de atividade de β -glicosidase do Clone GH1/cdt foi confirmada por teste utilizando o substrato sintético pNPG. Para este teste foi utilizado o extrato celular e o sobrenadante do Clone GH1/cdt após 96 horas de crescimento em meio mínimo SC. O mesmo foi realizado com o clone controle. Como pode ser observada na Figura 32 a coloração amarela adquirida pela liberação do pNP comprovou a atividade de β -glicosidase no extrato celular do Clone GH1/cdt, embora também tenha sido observado atividade no sobrenadante do cultivo (menor intensidade que no extrato celular). O clone controle não apresentou atividade sobre o substrato.

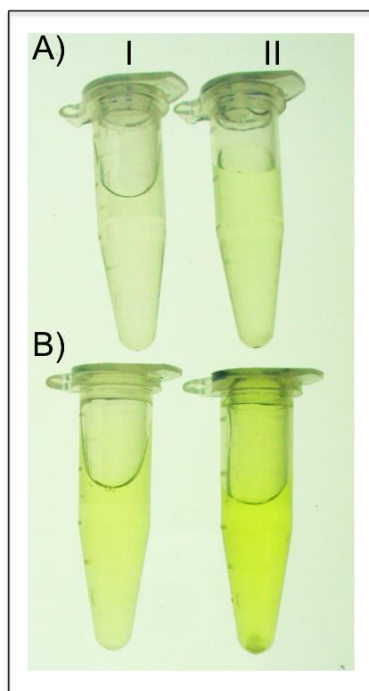


Figura 32. Teste de atividade sobre o substrato pNPG. A) Controle negativo. I. Sobrenadante; II. Extrato celular. B) Clone 4. I. Sobrenadante; II. Extrato celular.

Para confirmação da efetividade do sistema foi realizado crescimento aeróbico em meio líquido complexo com celobiose como única fonte de carbono (YPC) utilizando o Clone GH1/cdt, além de um clone apenas com a β -glicosidase intracelular, sem o transportador (Clone S/T), e do controle negativo (C-). Como controle do crescimento foi realizado o cultivo do Clone GH1/cdt em meio com glicose (YPD) sob as mesmas condições. Alíquotas foram recolhidas ao longo do tempo para análise do crescimento celular, consumo do substrato e produtos formados.

Como pode ser observado na curva de crescimento da Figura 33A, o Clone GH1/cdt foi capaz de crescer em meio com celobiose, após uma etapa de adaptação (48 horas), atingindo OD_{600} similar a do crescimento em glicose após 96 horas. O consumo do substrato pelo Clone GH1/cdt pode ser observado na Figura 33B, tendo ocorrido o esgotamento da fonte de carbono após 96 horas para o crescimento em celobiose e após 24 horas para crescimento em glicose. O transformante apenas com a β -glicosidase sendo expressa intracelularmente não apresentou crescimento, embora tenha consumido 5,7 g/L de celobiose, assim como o controle negativo.

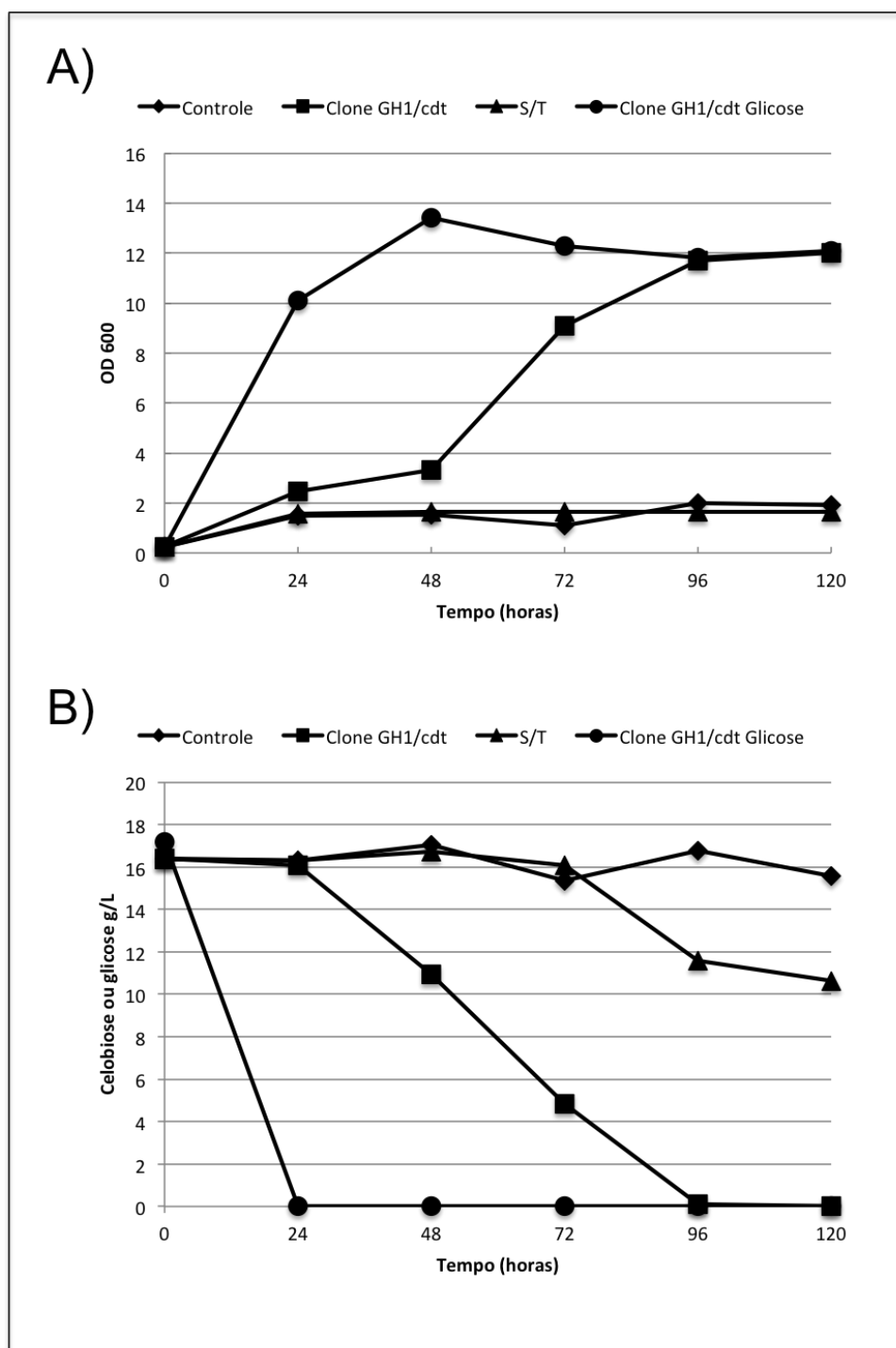


Figura 33. Análise de crescimento aeróbico em meio líquido com celobiose ou glicose como fonte de carbono. A) Curva de crescimento. B) Consumo da fonte de carbono. Controle negativo (C-), Clone GH1/cdt (em celobiose), Clone S/T (apenas com a β -glicosidase) e Clone GH1/cdt Glicose (em glicose).

A análise dos produtos formados durante o crescimento, utilizando HPLC, detectou a formação do subproduto glicerol no meio de cultivo do crescimento do

6.RESULTADOS

Clone GH1/cdt, tanto no crescimento em celobiose como no crescimento em glicose, no entanto, etanol foi detectado apenas no crescimento em glicose Tabela 7.

Tabela 7. Substratos consumidos e produtos formados após 120 horas de crescimento aeróbico em celobiose.

Clone	Celobiose ou glicose consumida g/L	Glicerol produzido g/L	Etanol produzido g/L
C-	0,73986	0	0
Clone GH1/cdt	16,09106	0,636	0
S/T	5,73198	0	0
Clone GH1/cdt (em glicose)	17,169	0,951	0,613

Como as condições de cultivo do experimento anterior não foram adequadas para a produção de etanol (aerobiose), foi realizado um experimento simplificado em anaerobiose. Este crescimento foi realizado com o Clone controle (C-) e o Clone GH1/cdt, em 70 mL de meio complexo com celobiose (YPC), com OD₆₀₀ inicial de 1. Foram retiradas alíquotas para análise por HPLC do consumo do substrato e produtos formados (Figura 34).

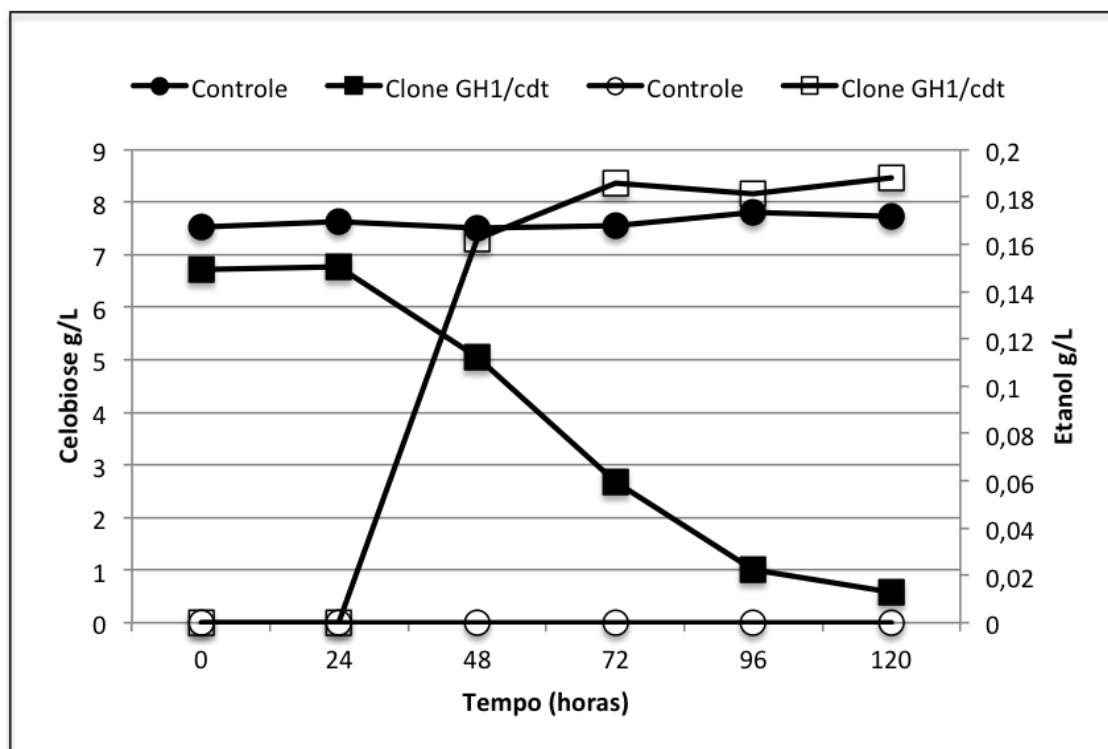


Figura 34. Análise de crescimento anaeróbico em meio líquido com celobiose. Consumo da fonte de carbono e produção de etanol. Marcadores fechados referem-se ao consumo de celobiose. Marcadores abertos referem-se à produção de etanol.

As análises mostraram que quase toda a celobiose inicial (6,7 g/L) foi consumida pelo Clone GH1/cdt após 120 horas de fermentação, enquanto que a produção de etanol atingiu o valor de 0,188 g/L, que corresponde a 0,030 g/g de célula. O clone controle não consumiu celobiose e não produziu etanol. O subproduto glicerol não foi detectado sob essas condições de crescimento (anaerobiose) até onde foram realizadas as análises. No entanto, foi observado no decorrer do cultivo do Clone GH1/cdt acúmulo de celotriose no meio (Figura 35).

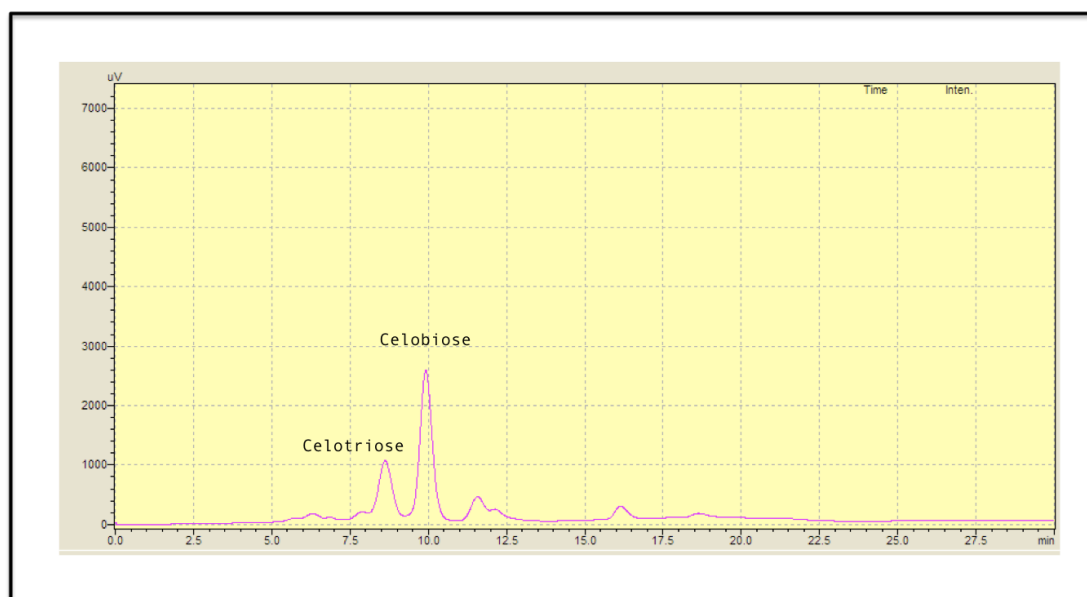


Figura 35. Análise de HPLC da composição de açúcares após crescimento do GH1/cdt em condições de anaerobiose. Cromatograma de HPLC após 72 horas de cultivo.

6.5 Construção de linhagem com duas classes de celulases

Após a confirmação da produção das enzimas celulolíticas na linhagem MFL de *S. cerevisiae*, e confirmação da produção de enzimas funcionais, foi iniciado o trabalho para a construção de uma levedura capaz de secretar endoglicanase e celobiohidrolase. Para construção de um cassete único contendo os genes *egIII* de *T. reesei* e *cbhI.1* de *P. chrysosporium* foram testados e comparados dois sistemas com diferentes sequências *linkers* de clivagem: a fusão gênica com o fragmento corresponde a região autoclivável 2A do vírus FMDV e a fusão gênica com o sítio para a endoprotease Kex2p entre os dois genes.

6.5.1 Construção com a região autoclivável 2A

Com base na sequência correspondente a região 2A obtida do GenBank (nº. de acesso ACC63461.1), adicionados de mais 14 resíduos de aminoácidos do contexto *downtream* do DNA viral (região C-terminal de 1D), foi desenhado um fragmento de 33 resíduos de aminoácidos substituindo-se sistematicamente os códons nativos pelos

6.RESULTADOS

códons preferenciais de *S. cerevisiae* para otimização da expressão nesta levedura (Figura 36).

	E A R H K Q K I V A P V K Q T L N F D L	
2A Nativo	GAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTT	60
2A Otimizado	GAAGCTAGACATAAACAAAGATTGTGCTCCAGTTAAACAACCTTTGAACCTTTGATTTG	60
	***** ** *	
	L K L A G D V E S N P G P	
2A Nativo	CTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCCTGGGCC	99
2A Otimizado	TTGAAATTGGCTGGTGTGTGAATCATAATCCAGGGCCC	99
	* *	

Figura 36. Alinhamento e tradução predita das sequências de nucleotídeos nativa e otimizada da região 1D-2A do vírus FMDV. As bases em vermelho correspondem às modificações introduzidas para otimização dos códons para expressão em *S. cerevisiae*. Sombreado em amarelo a sequência de aminoácidos da região 2A.

A estratégia geral para a amplificação e fusão dos genes é mostrada na Figura 37. O gene *cbhI.1* foi inicialmente amplificado por PCR utilizando os *primers* Cbh-F e Cbh-R, que amplifica o gene com peptídeo sinal e região codante para a proteína madura, no entanto, sem o códon de parada da tradução. Aos *primers* Cbh-F e Cbh-R foram adicionados os sítios para as enzimas de restrição BamHI e XbaI, respectivamente. O gene *eglII* foi amplificado com os *primers* 2A-eglII-F e eglII-R que amplifica a região correspondente ao peptídeo sinal, pois a clivagem pela sequência 2A ocorre co-traducionalmente, assim como a região codante da proteína com o códon de parada da tradução. A sequência 2A foi incluída na porção 5' do *primer* 2A-EglII-F para ser amplificada por PCR fusionada a sequência do gene *eglII*. Aos *primers* 2AEglII-F e EglII-R foram ainda adicionados os sítios para as enzimas de restrição XbaI e NotI, respectivamente, para facilitar nas etapas de clonagem.

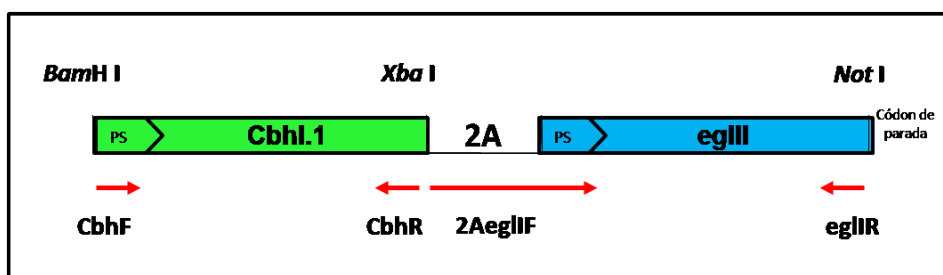


Figura 37. Representação esquemática da estratégia utilizada para fusão dos genes *cbhI.1* e *egIII* com o *linker* 2A. As setas vermelhas indicam os *primers* utilizados para amplificação dos genes.

Os mesmos moldes descritos anteriormente (cDNA de *T. reesei* e vetor pUEXO) foram utilizados nas reações de PCR. Esperava-se fragmentos de ~1,6 kb para a amplificação do gene *cbhI.1* e de ~1,3 kb para a amplificação da 2A-*egIII* (Figura 38A e B, respectivamente).

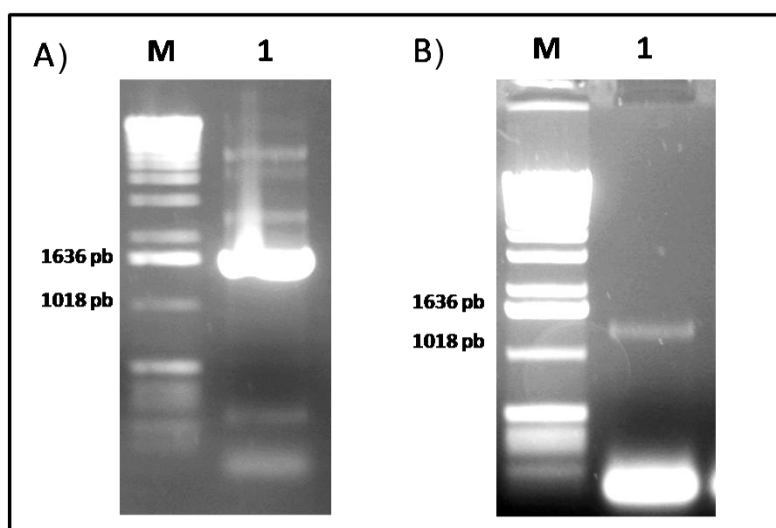


Figura 38. Amplificação dos fragmentos de DNA relativos ao gene *cbhI.1* e 2A-*egIII*. Análise realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A. M) Marcador 1 kb Ladder Gibco; 1) reação de PCR para amplificar o gene *cbhI.1*. B. M) Marcador 1 kb Ladder Gibco; 1) reação de PCR para amplificar 2A-*egIII*.

Os fragmentos obtidos por PCR após purificação, foram ligados ao vetor pGEM-T, separadamente. A confirmação da clonagem foi realizada a partir da análise do DNA plasmidial extraído de clones transformantes digeridos com a enzima de

restrição. A análise confirmou a presença dos insertos assim como a integridade dos vetores. Esses vetores foram denominados **pGEM-cbhI.1R** e **pGEM-2AeglIII**.

Após a confirmação das clonagens o vetor pGEM-2AeglIII foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e NotI, e o fragmento 2A-eglIII de ~1,3 kb foi purificado e ligado ao vetor pGEM-cbhI.1R previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição. A confirmação da clonagem foi realizada a partir da análise do DNA plasmidial extraído de clones transformantes digerido com enzima de restrição. As análises confirmaram a presença do inserto assim como a integridade do vetor. Após a confirmação esse vetor foi denominado **pGEM-Fus2A**.

Para confirmar as sequências amplificadas dos genes *cbhI.1*, *eglIII* e do peptídeo 2A utilizadas nesta estratégia os vetores pGEM-cbhI.1R e pGEM-2AeglIII foram submetidos a sequenciamento automático utilizando os *primers* M13 Universal e M13 Reverso. As sequências resultantes foram submetidas ao programa BLAST, e comparadas com as sequências presentes no banco de dados GenBank, confirmando a sequência do gene *cbhI.1* de *P. chrysosporium*, *eglIII* de *T. reesei*, e da sequência 2A do vírus FMDV.

6.5.2 Construção com o sítio para a endoprotease Kex2p

Para a construção da fusão gênica com o sítio de clivagem para a protease Kex2p como *linker*, o gene *eglIII* foi amplificado com os *primers* Kex-eglIII-F e EglIII-R, que amplifica a região codante da proteína sem a região correspondente ao sinal de secreção, já que a clivagem ocorre apenas no complexo de Golgi. O sítio para a protease Kex2p (Lys-Arg) foi incluído na porção 5' do *primer* Kex-EglIII-F para ser amplificada por PCR fusionada a sequência do gene *eglIII*. Aos *primers* Kex-EglIII-F e EglIIIR foram ainda adicionados os sítios para as enzimas de restrição XbaI e NotI, respectivamente, para facilitar nas etapas de clonagem (Figura 39).

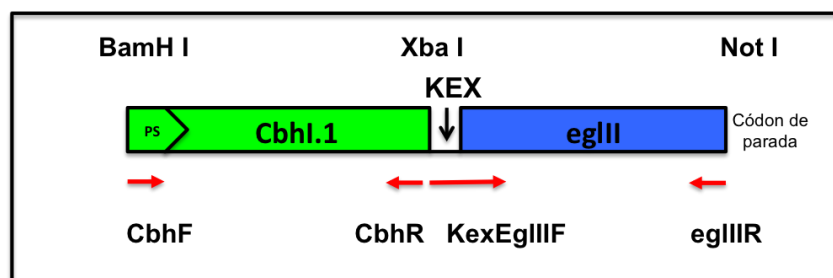


Figura 39. Representação esquemática da estratégia utilizada para fusão dos genes *cbhI.1* e *egIII* com o linker *Kex*. As setas vermelhas indicam os *primers* utilizados para amplificação dos genes.

O vetor pGEM-Fus2A foi utilizado como molde na reação de PCR para amplificação de *Kex-egIII* (~1,2 kb) (Figura 40).

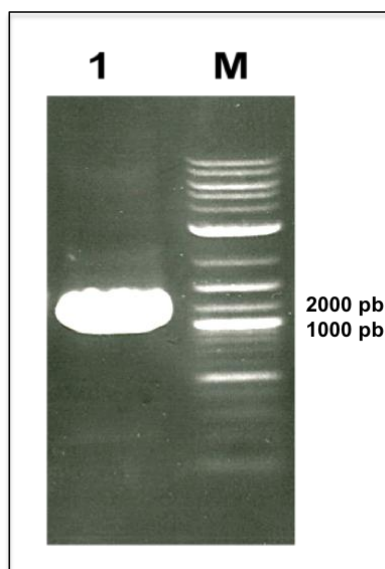


Figura 40. Amplificação de fragmento de DNA relativo *Kex-egIII*. Análise realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. 1) reação de PCR; M) Marcador 2 log.

O fragmento obtido por PCR após purificação, foi também ligado ao vetor pGEM-T. A confirmação da clonagem foi realizada a partir do DNA plasmidial extraído de clones transformantes e digeridos com a enzima de restrição com sítios presentes nos *primers*. A análise confirmou a presença dos insertos assim como a integridade do vetor. Esse vetor foi denominado **pGEM-KexegIII**. A estratégia de clonagem para a fusão com o gene *cbhI.1* foi a mesma utilizada para a construção da

6.RESULTADOS

fusão com o 2A. Após a confirmação da clonagem esse vetor foi denominado **pGEM-FusKex**.

Para analisar a expressão das fusões gênicas *cbhI.1-linker-eglIII* em *S. cerevisiae* sob controle do promotor constitutivo *PGK1*, foi utilizado o vetor episossomal Y1PGK1 utilizando a mesma estratégia descrita anteriormente na Figura 14. Após transformação bacteriana e extração dos plasmídios, a presença dos insertos foram confirmadas por análise de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem (BamHI e NotI). Para confirmar a clonagem esperava-se a liberação de um fragmento de 7,4 kb correspondente ao vetor, e outro fragmento de ~3 kb para a fusão gênica Fus2A, e ~2,9 kb para a fusão gênica FusKex (Figura 41). Todas as análises confirmaram a presença dos insertos assim como a integridade dos vetores. Esses vetores foram denominados **Y1PGK1-Fus2A** e **Y1PGK1-FusKex**.

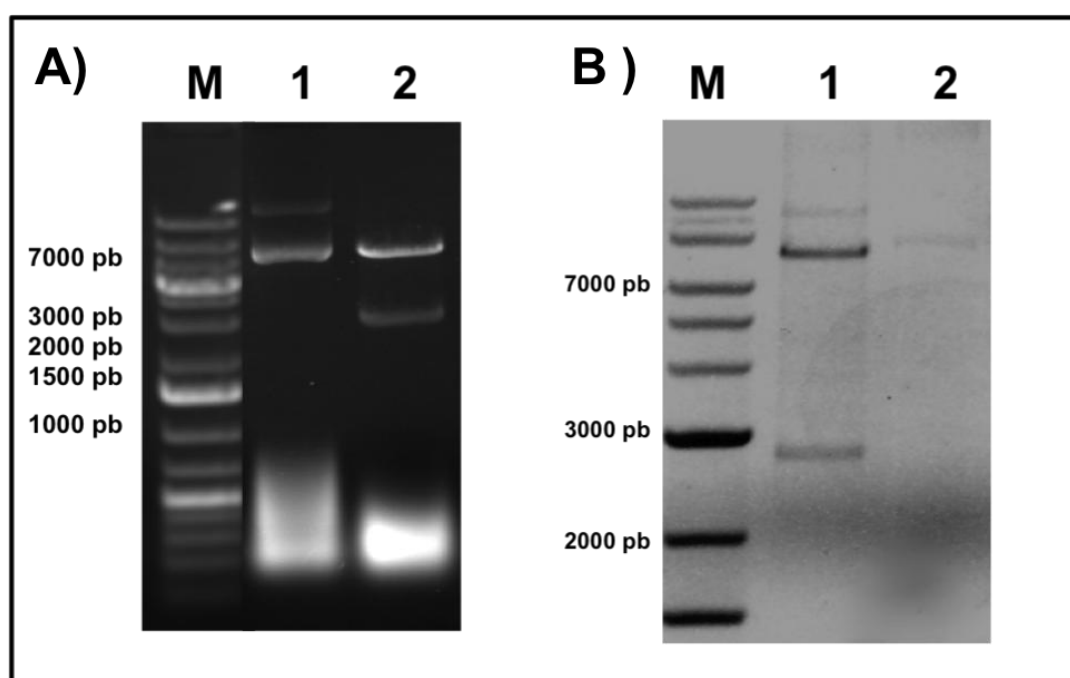


Figura 41. Análise de restrição dos vetores Y1PGK1-Fus2A e Y1PGK1-FusKex. Análise realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A. M) Marcador O'Gene Ruler 1 kb Plus Ladder; 1) Y1PGK1-Fus2A; 2) Y1PGK1-Fus2A digerido com BamHI e NotI. B. M) Marcador 2 log; 1) Y1PGK1-FusKex digerido com BamHI e NotI; 2) Y1PGK1-FusKex.

A Tabela 8 resume os vetores construídos para expressão das fusões gênicas.

Tabela 8. Vetores de expressão constitutiva em *S. cerevisiae* com as fusões gênicas.

Proteína	Micro-organismo de origem	Vetor de clonagem	Sequência Linker	Vetor de expressão
EGLII CBHI.1	<i>T. reesei</i> <i>P. chrysosporium</i>	pBlue-Fus2A	2A	Y1PGK1-Fus2A
EGLII CBHI.1	<i>T. reesei</i> <i>P. chrysosporium</i>	pBlue-FusKex	Kex	Y1PGK1-FusKex

6.5.3 Transformação e detecção da atividade enzimática

A linhagem MFL de *S. cerevisiae* foi utilizada para transformação com os vetores de expressão construídos na etapa anterior, Y1PGK1-Fus2A e Y1PGK1-FusKex. Os transformantes foram igualmente selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo-ágar (SD-ágar) sem leucina.

Para *screening* dos clones expressando as enzimas celulolíticas, 15-24 clones transformantes de cada sistema, assim como o controle negativo, foram selecionados aleatoriamente e submetidos a crescimento em placa de Petri com meio mínimo adicionado de CMC. Os transformantes expressando as enzimas recombinantes foram detectados pela presença de halo de hidrólise após coloração com *Congo Red* (Figura 42). Como pode ser observado, todos os clones analisados apresentaram halos de hidrólise de tamanhos similares dentro de cada sistema (Fus2A e FusKex), com exceção do controle negativo, que não apresentou halo, confirmando assim atividade celulolítica nos transformantes analisados.

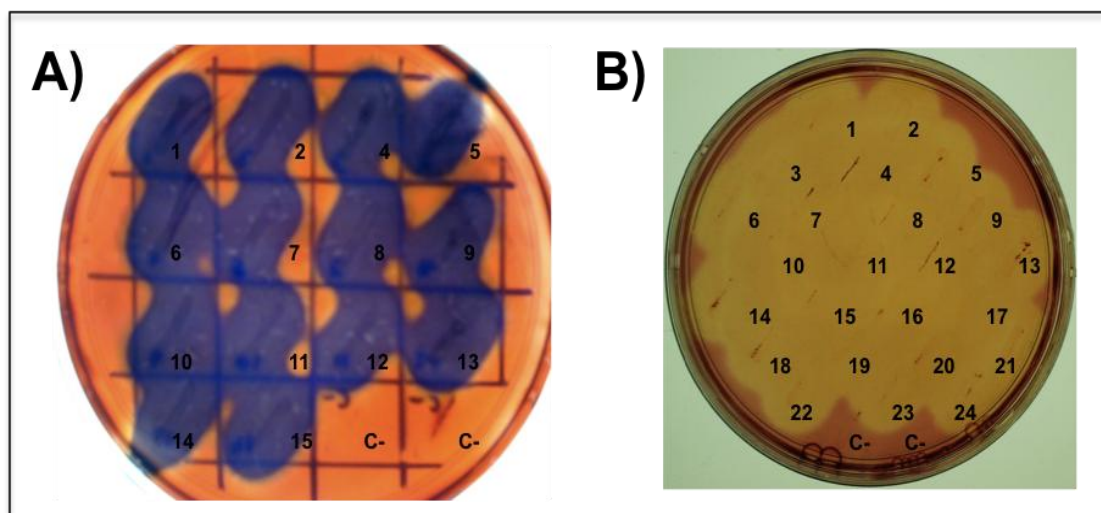


Figura 42. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo 0,5% CMC. A) Halos de hidrólise de transformantes com o vetor Y1PGK1-Fus2A (1-15) e Y1PGK1 (C-); B) Halos de hidrólise de transformantes com o vetor Y1PGK1-FusKex (1-24) e Y1PGK1 (C-).

Um clone de cada sistema foi selecionado aleatoriamente, denominados Fus2A e FusKex, já que não foi observada diferença entre os halos de hidrólise, e fez-se testes de comparação. Primeiramente em placa de hidrólise de CMC, como pode ser observado na Figura 43, não foi possível detectar diferença entre os halos de hidrólise, no entanto, pode-se observar que os halos de hidrólise dos clones com a fusões gênicas são menores do que aquele formado pelo Clone EGLII.

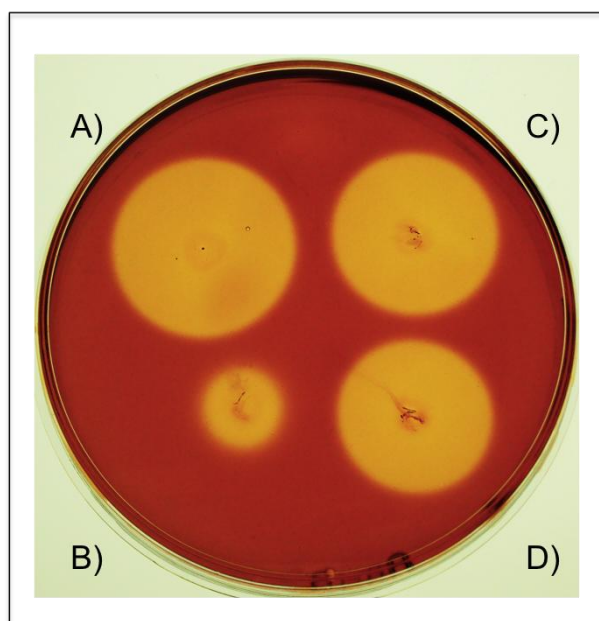


Figura 43. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo 0,5% CMC. (A) Clone EGLII; (B) Clone CBHI.1; (C) Clone Fus2A; (D) Clone FusKex.

Para análise de expressão em meio líquido foram realizadas culturas paralelas em meio mínimo SD dos clones anteriormente selecionados, assim como do clone controle negativo. Alíquotas foram retiradas diariamente dessas culturas para a determinação da atividade em termos de U/mL, sobre os substratos CMC e pNPC, respectivamente. A cultura controle e os clones Fus2A e FusKex apresentaram o mesmo perfil de crescimento e densidade celular. Como pode ser observado na Figura 44, as atividades enzimática das enzimas heterólogas cresceram proporcionalmente nos dois clones analisados. Assim como a expressão das enzimas separadamente, foi detectada atividade logo após 24 horas de crescimento para o substrato pNPC e 48 horas para o substrato CMC, com um aumento gradual nos níveis de atividade e maior produção após 96 horas de crescimento (Fus2A apresentando atividades de 0,1331 e 0,038 U/mL sobre CMC e pNPC, respectivamente; e FusKex 0,1414 e 0,045 U/mL sobre CMC e pNPC, respectivamente), último ponto analisado. Os dois clones apresentaram atividade sobre os dois substratos testados, demonstrando assim a atividade das duas enzimas em cada um dos clones. Uma sutil diferença na atividade sobre CMC e pNPC foi observada, demonstrando que o clone FusKex apresenta maior atividade sobre os substratos testados. No entanto, as atividades encontradas

6.RESULTADOS

correspondem a ~70% das atividades dos clones expressando as enzimas separadamente.

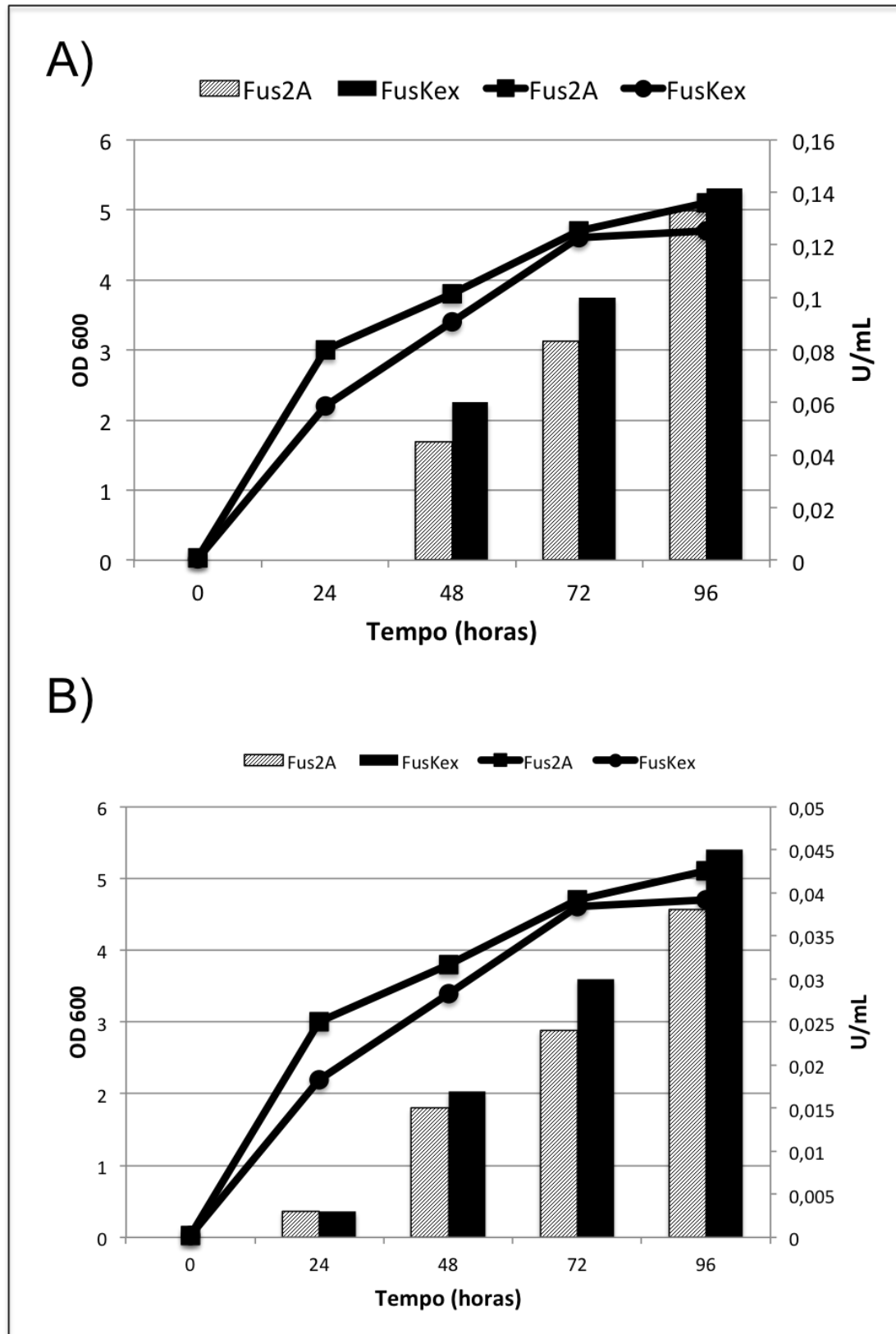


Figura 44. Cinética de produção enzimática dos clones Fus2A e FusKex. Linhas inteiras representam a densidade ótica e barras as atividades. A) Curva de crescimento e atividade sobre CMC. B) Curva de crescimento e atividade sobre pNPC.

6.6 Construção de linhagem com as três classes de celulases

Após confirmar a efetividade das fusões gênicas, para a construção de uma levedura *S. cerevisiae* MFL com as três classes de celulases foi necessária a clonagem de uma nova marca de seleção nos vetores Fus2A e FusKex para que pudessem ser utilizados para transformação do Clone GH1/cdt que já contém o vetor YEp351PGK-GH1/cdt com a marca *LEU2*. A marca escolhida foi o gene de resistência a droga G418, a qual a linhagem MFL apresenta resistência a 100 µg/mL (Reis, 2012).

Os vetores Y1PGK1-Fus2A e Y1PGK1-FusKex, foram digeridos com a enzima de restrição EcoRV, com sítio presente no gene *LEU2*, para linearizá-los expondo extremidades abruptas. Aos vetores foram ligados os fragmento da PCR realizada com os *primers* ZeoBlasF3 e ZeoBlasR3 que amplifica o gene que confere resistência a droga G418 utilizando o vetor pPICK (Reis *et al.*, 2012) como molde.

Após transformação bacteriana, os clones resultantes foram analisados quanto a presença do inserto através da digestão com a enzima de restrição BglII presente nos *primers* (Figura 45A e B). Para os vetores com inserto esperava-se a liberação de um fragmento de ~1,6 kb correspondente ao gene G418, e outro fragmento de ~10,3 kb e 10,2 kb para os vetores Y1PGK1-Fus2A e Y1PGK1-FusKex, respectivamente. Todas as análises confirmaram a presença dos insertos assim como a integridade dos vetores. Os novos vetores passam a conter, portanto, apenas a marca de seleção G418 já que a marca auxotrófica *LEU2* foi rompida. Esses vetores foram denominados: **Y1PGK1-Fus2AG418** e **Y1PGK1-FusKexG418**.

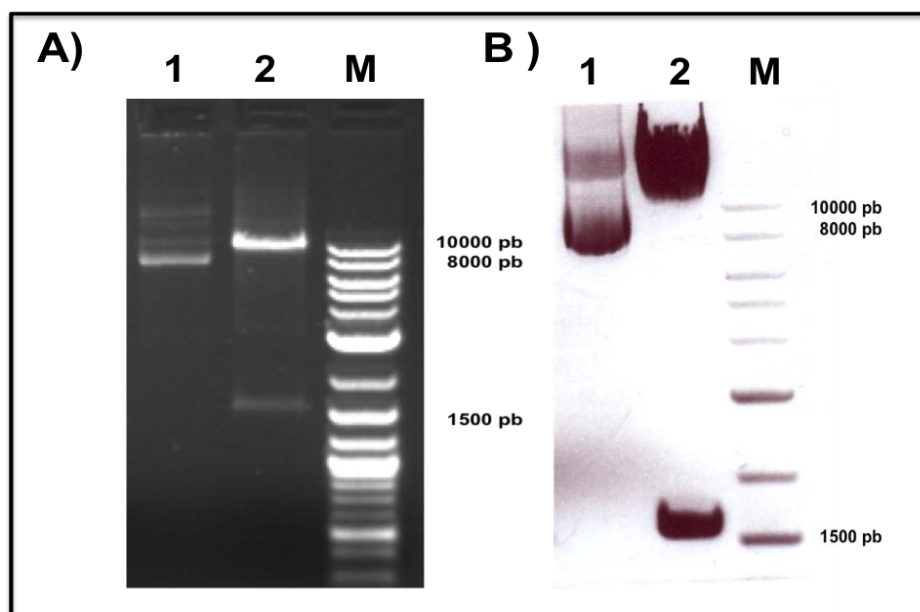


Figura 45. Análise de restrição dos vetores Y1PGK1-Fus2AG418 e Y1PGK1-FusKexG418. Análise realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. A. 1) Y1PGK1-Fus2AG418; 2) Y1PGK1-Fus2AG418 digerido com BglII; M) Marcador 2 log. B. 1) Y1PGK1-FusKexG418; 2) Y1PGK1-FusKexG418 digerido com BglII; M) Marcador 2 log.

A Tabela 9 resume os vetores construídos com a marca de seleção G418.

Tabela 9. Vetores de expressão em *S. cerevisiae* contendo a marca dominante G418.

Vetores de expressão	Vetor de expressão com G418
Y1PGK1-Fus2A	Y1PGK1-Fus2AG418
Y1PGK1-FusKex	Y1PGK1-FusKexG418

A linhagem MFL de *S. cerevisiae*, clone GH1/cdt, expressando a β -glicosidase GH1-1 e o transportador CDT-1, foi utilizada para transformação com os vetores construídos na etapa anterior. Devido à presença do gene *LEU2* no vetor já transformado (Y1PGK1-GH1/cdt) e do gene de resistência à droga G418 nos vetores

6.RESULTADOS

utilizados para a nova transformação, os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo-ágar (SD-Ágar) sem leucina contendo 150 µg/mL G418.

Os transformantes expressando as enzimas recombinantes foram detectados em placas de meio mínimo contendo CMC e G418 pela presença de halo de hidrólise após coloração com *Congo Red* (Figura 46). Como pode ser observado, nem todos os clones analisados apresentaram halos de hidrólise, tendo ocorrido a presença de falsos positivos, diferentemente do que ocorreu na transformação com a marca auxotrófica *LEU2*. Tamanhos de halos diferentes também foram encontrados dentro de cada sistema. Assim aquele que apresentou o maior halo de hidrólise foi selecionado para os testes posteriores e denominados GH1-Fus2A e GH1-FusKex.

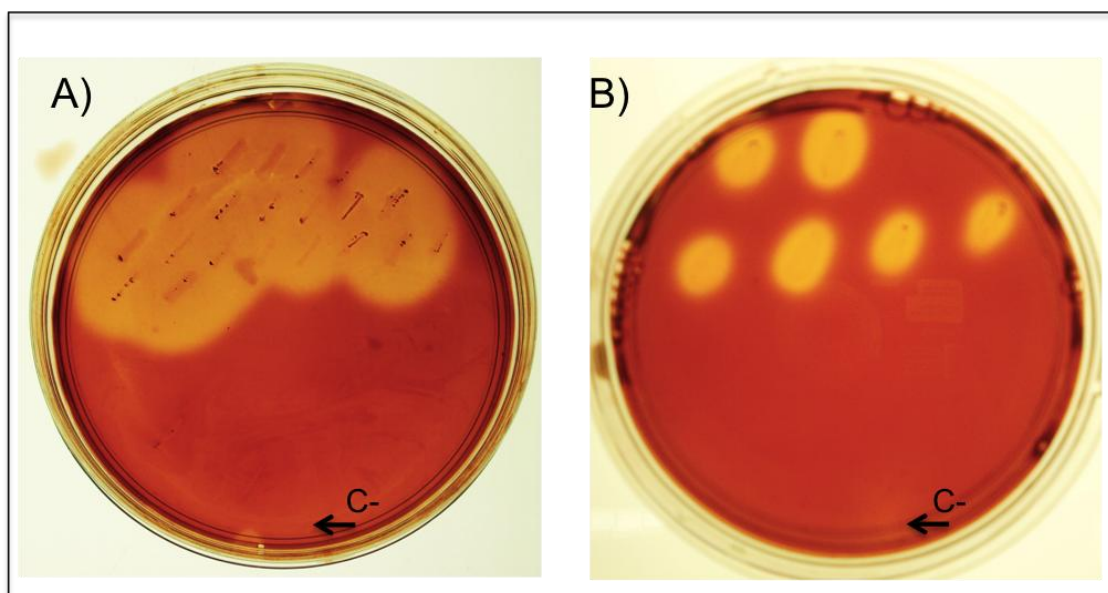


Figura 46. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio mínimo contendo 0,5% CMC. A) Transformantes com o vetor Y1PGK1-Fus2AG418; B) Transformantes com o vetor Y1PGK1-FusKexG418. As setas indicam os controles negativos.

Os clones selecionados foram então crescidos em placa de celobiose (SC-Tamponado) e em placa de SD-CMC Tamponado para análise comparativa. Como pode ser observado, embora o clone GH1-FusKex tenha apresentado crescimento em celobiose comparável ao crescimento do clone GH1-Fus2A, o halo de hidrólise sobre CMC foi bem menor (Figura 47).

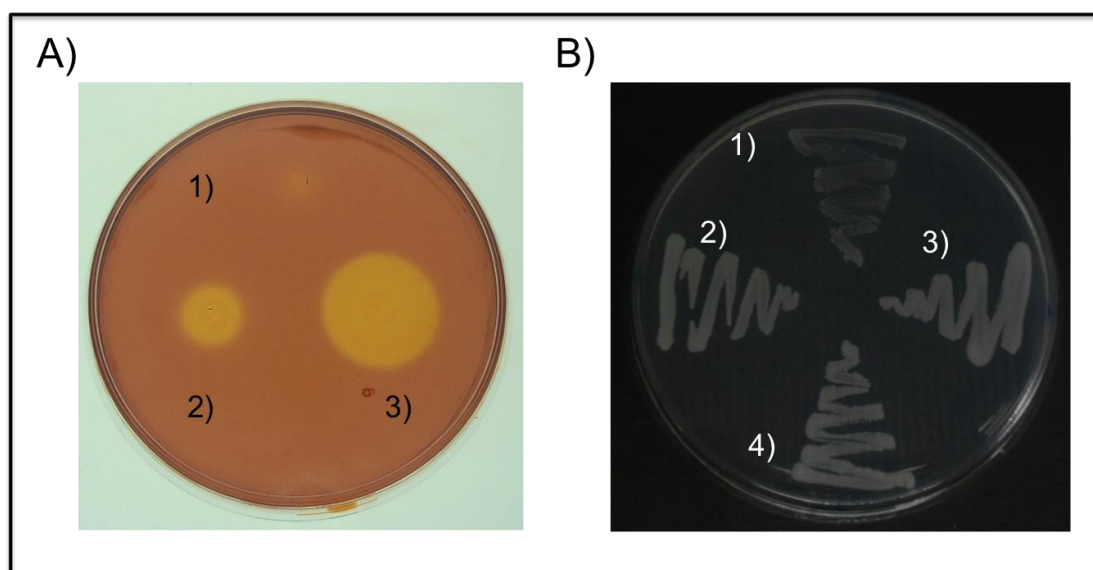


Figura 47. Análise fenotípica dos clones selecionados GH1-Fus2A e GH1-FusKex. A) Formação de halo de hidrólise em placa com CMC 0,5%. Clones: 1) Clone controle negativo; 2) Clone GH1-FusKex e 3) GH1-Fus2A. B) Crescimento em placa de celobiose como fonte de carbono. Clones: 1) Clone controle negativo; 2) Clone GH1-FusKex; 3) Clone GH1-Fus2A e 4) Clone GH1/cdt.

Para análise da cinética de produção enzimática dos clones foi realizada cultura em meio mínimo SD com o clone GH1-Fus2A. Alíquotas foram retiradas diariamente dessas culturas para a determinação da atividade em termos de U/mL, sobre os substratos CMC e pNPC. Como pode ser observado na Figura 48, a atividade enzimática das enzimas heterólogas cresceu proporcionalmente, assim como também foi observado no cultivo do Clone Fus2A a atividade foi detectada logo após 24 horas de crescimento para o substrato pNPC e 48 horas para o substrato CMC, com um aumento gradual nos níveis de atividade e maior produção após 96 horas de crescimento, último ponto analisado. Portanto, foi confirmado a produção de enzimas (EGLII e CBHI.1) funcionais e sua secreção para o meio.

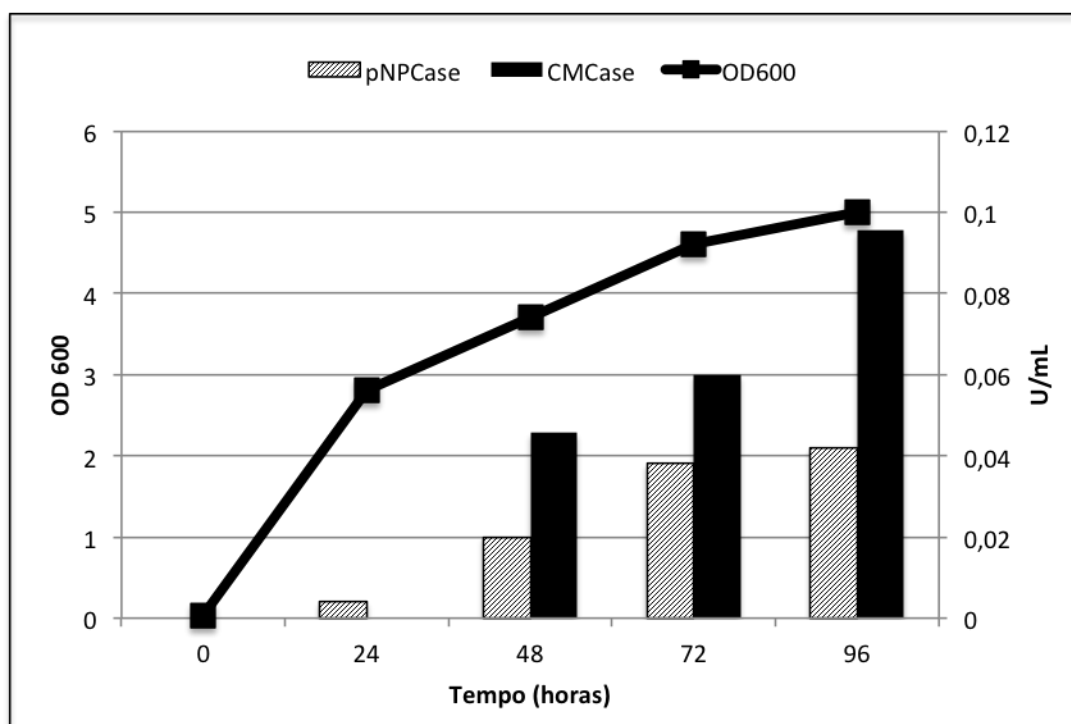


Figura 48. Cinética de produção enzimática do clone GH1-Fus2A. Linha inteira representa a densidade ótica e as barras as atividades.

O Clone GH1-Fus2A foi também submetido a um crescimento em anaerobiose. Este crescimento foi realizado em 70 mL de meio complexo com celobiose (YPC), com OD_{600} inicial de 1. Foram retiradas alíquotas para análise por HPLC do consumo do substrato e produtos formados. Como pode ser observado na Figura 49, toda a celobiose foi consumida após 120 horas e a produção de etanol ocorreu após 24 horas de cultivo, assim como ocorreu com o Clone GH1/cdt.

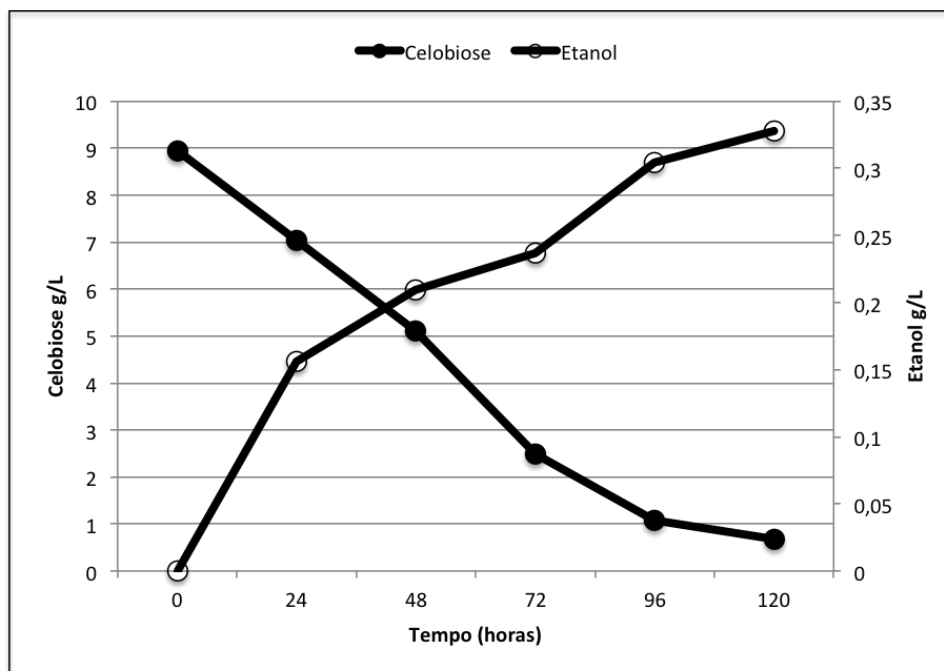


Figura 49. Análise de crescimento e produção de etanol do Clone GH1-Fus2A. As células foram crescidas em condições de anaerobiose em meio líquido com celobiose (YPC).

Após a confirmação da expressão dos três genes celulolíticos na mesma linhagem foi realizado um crescimento aeróbico em meio líquido complexo com CMC com OD_{600} inicial de ~6 para análise de crescimento utilizando o clone GH1-Fus2A e o controle negativo. Como pode ser observado, durante o tempo em que foram feitas as análises de crescimento não foi observado crescimento significativo do clone GH1-Fus2A, assim como no clone controle (Figura 50).

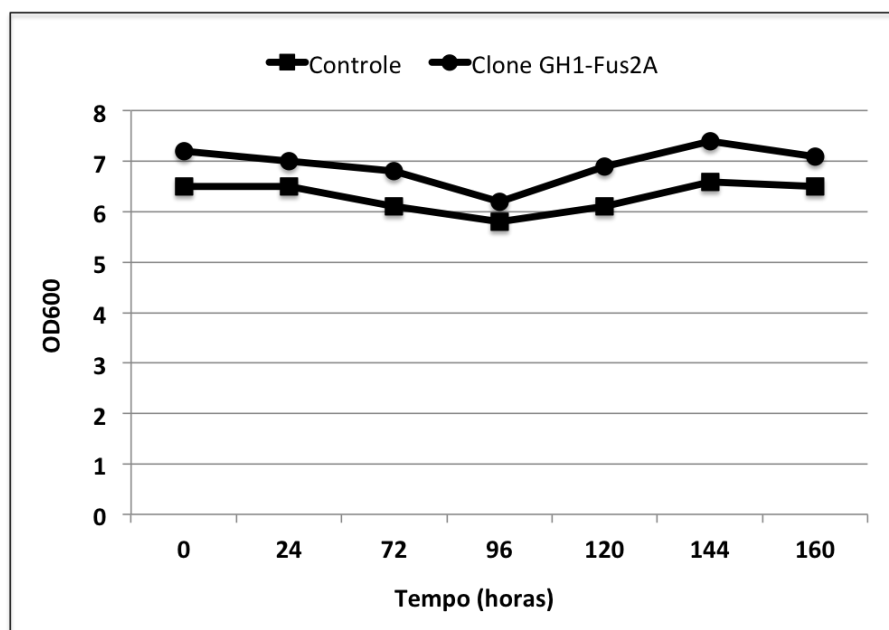


Figura 50. Curva de crescimento do Clone GH1-Fus2A em meio complexo com celulose YP-CMC como fonte de carbono.

6.7 Construção de vetor de expressão induzida em *P. pastoris*

Para a construção da levedura *Pichia pastoris* capaz de expressar as celulasas EGLII e CBHI.1 foi utilizada a fusão gênica com o *linker* 2A. Para a expressão sob controle do promotor induzível *AOXI*, foi utilizado o vetor de expressão pPIC9. A estratégia geral para a construção destes vetores é mostrada na Figura 50.

Inicialmente, para construção dos vetores de expressão utilizando o pPIC9 (Figura 51A), o vetor de clonagem pGEM-Fus2A, foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e NotI para liberar o fragmento correspondente a fusão gênica. Após purificação, o fragmento foi ligado ao vetor pPIC9 previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição e utilizados para transformação de *E. coli*.

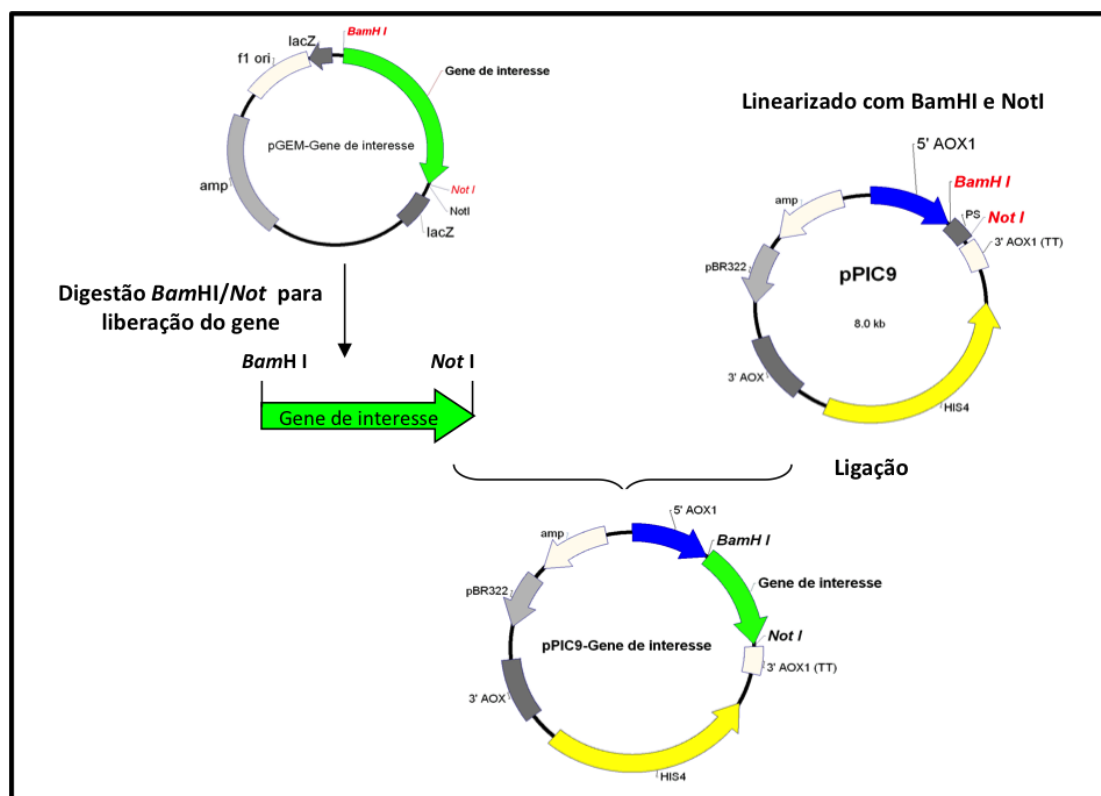


Figura 51. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos vetores pPIC9 contendo os genes de interesse.

Após transformação bacteriana e extração dos plasmídios dos clones transformantes, a presença do inserto foi confirmada pela análise de restrição com as enzimas utilizadas para clonagem (BamHI e NotI). Para o vetor com o inserto esperava-se a liberação de um fragmento de 8 kb correspondente ao vetor, e outro fragmento de ~3 kb para a fusão *cbhI.1-2A-eglIII* (Figura 52). As análises de restrição comprovaram a presença do inserto e a integridade do vetor. Esse vetor foi denominado: **pPIC9-Fus2A**.

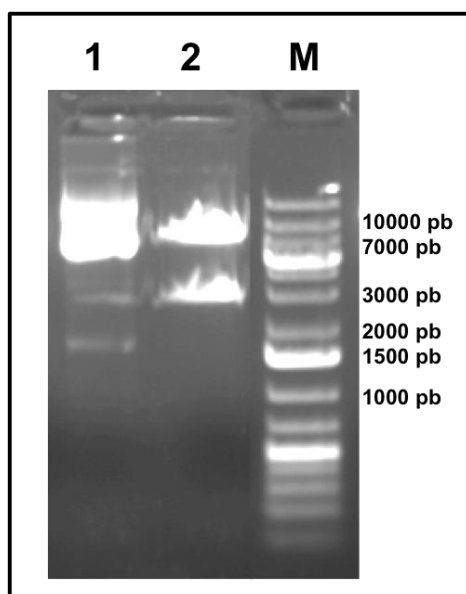


Figura 52. Análise de restrição para confirmação dos vetores pPIC9-Fus2A. Análise realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. 1) pPIC9-Fus2A; 2) pPIC9-Fus2A digerido com BamHI e NotI; M) Marcador O'Gene Ruler 1 kb Plus Ladder.

Para integração no genoma de *P. pastoris*, o vetor da série pPIC9 foi digerido com a enzima de restrição BglII para liberação do cassete de integração. Após a digestão, o fragmento, que contém o cassete de expressão e a marca *HIS4*, expõe nas extremidades sequências do *locus AOX1* para direcionar a integração, que pode ocorrer no *locus HIS4* assim como no *locus AOX1* por substituição ou inserção. Para controle negativo da expressão o vetor pPIC9 original foi digerido com a enzima BglII e usado para transformação de *P. pastoris*.

6.8 Transformação de *P. pastoris* com vetor de expressão induzida e detecção da atividade enzimática

A linhagem GS115 de *P. pastoris* foi transformada com o vetor de expressão construído na etapa anterior devidamente linearizado como descrito anteriormente. Devido à presença do gene histinol desidrogenase (*HIS4*) nos vetores pPIC9 que complementam a mutação auxotrófica *his4* da linhagens GS115, os transformantes com os vetores pPIC9 e pPIC9-Fus2A, foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo-ágar (MD-Ágar) sem histidina.

6.RESULTADOS

A transformação resultou entre 100-200 transformantes. Para *screening* dos clones expressando as enzimas EGLII e CBHI.1, alguns clones foram selecionados aleatoriamente e submetidos a crescimento em placa de Petri com meio mínimo adicionado de CMC, adicionando-se metanol a cada 24 horas para promover a indução do promotor. Os transformantes expressando as enzimas recombinantes foram detectados pela formação de halos de hidrólise após coloração com *Congo Red* (Figura 53A e B). Como pode ser observado, nem todos os transformantes com o vetor pPIC9-Fus2A analisados apresentaram halos, e os halos encontrados apresentaram tamanhos variados.

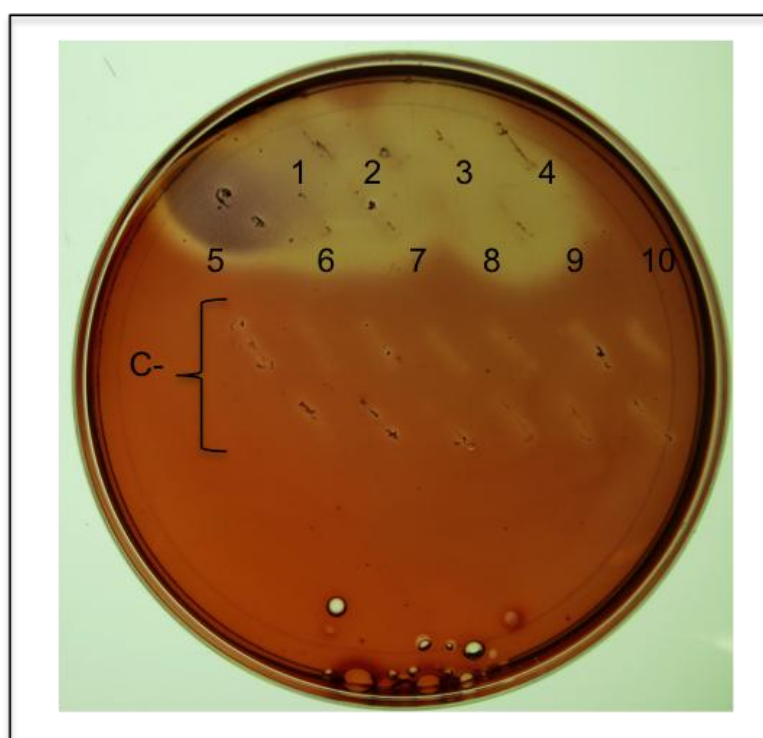


Figura 53. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio MM-CMC-Ágar Tamponado de transformantes com o vetor pPIC9-Fus2A. O controle negativo (C-) é representado pelas células transformadas com o vetor pPIC9.

O clone transformante que apresentou o maior halo de hidrólise foi selecionado para as análises posteriores e denominado Clone FusAOX (Figura 54).



Figura 54. Análise da formação de halo de hidrólise em placa de meio MM-CMC-Ágar Tamponado do transformante selecionado FusAOX.

Para cinética de produção da enzima foi realizado crescimento em meio de indução BMMY com o clone selecionado e o controle negativo durante 72 horas (Figura 55A, B e C). Alíquotas foram retiradas diariamente dessas culturas para a determinação da atividade sobre CMC, Sigmacel e papel de filtro em termos de U/mL.

O clone controle e o clone selecionado FusAOX apresentaram o mesmo perfil de crescimento e densidade celular. O crescimento em metanol foi lento e a produção da enzima heteróloga cresceu proporcionalmente. Como esperado, não foi detectada atividade enzimática superior ao controle nas culturas não induzidas (pré-inóculo e tempo 0). No entanto, com a troca do meio com glicerol pelo meio com metanol (como fonte de carbono), o promotor *AOXI* foi induzido, sendo detectada atividade nas primeiras 24 horas de crescimento. Depois disso, com o progresso da fase de indução houve um aumento gradual nos níveis de atividade. A maior produção foi encontrada no último ponto analisado, após 72 horas de indução.

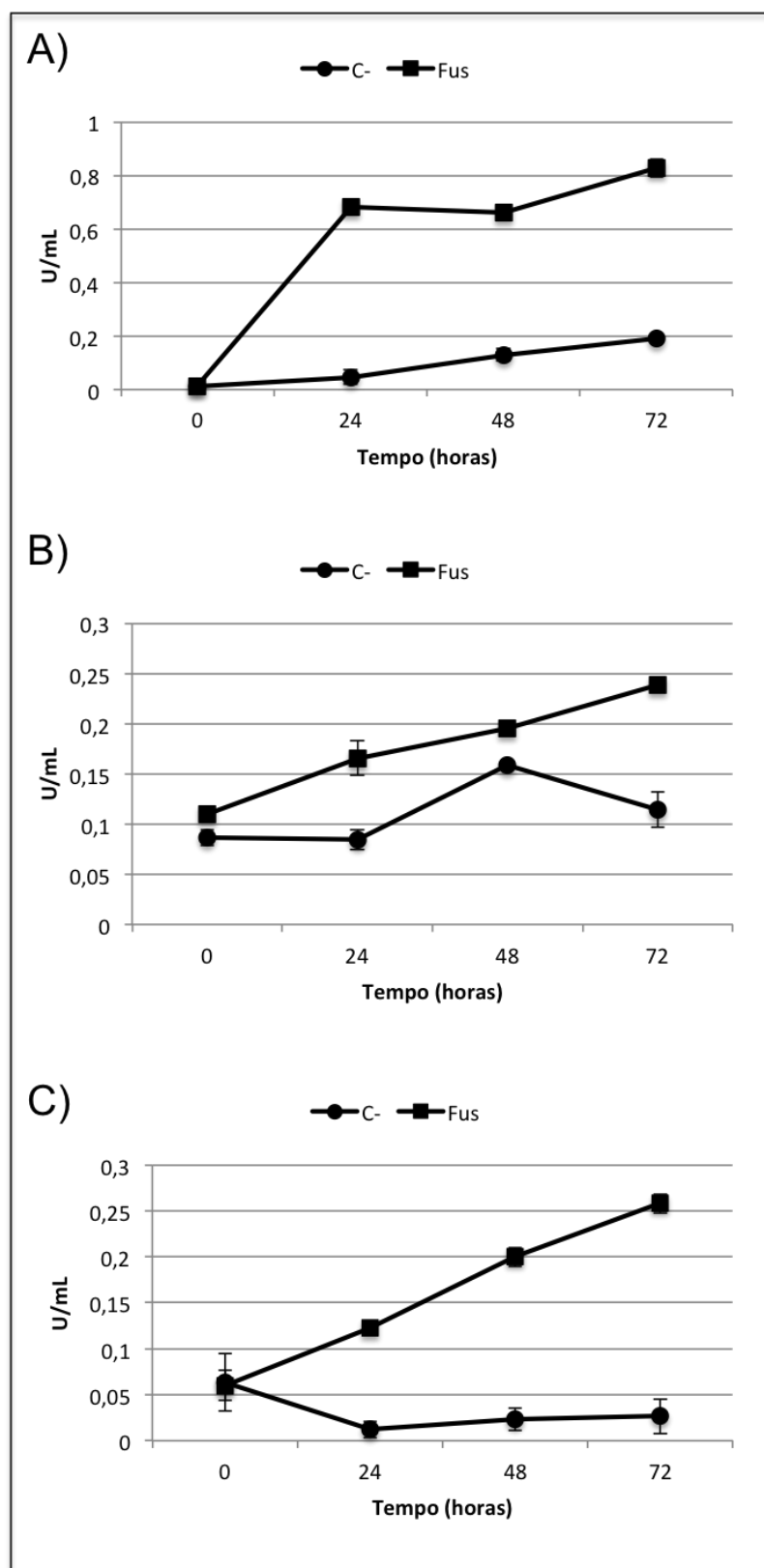


Figura 55. Cinética de produção enzimática do clone FusAOX. (C-). A) Curva de atividade sobre CMC (U/mL); B) Curva de atividade sobre Sigmacel (U/mL); C) Curva de atividade sobre papel de filtro (U/mL). Ensaio realizado com os sobrenadantes da indução com metanol nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Para confirmar a integração da fusão gênica *cbhI.1-2A-eglIII* no genoma do transformante, foi realizada uma reação de PCR utilizando o DNA total extraído do clone controle e do clone FusAOX como moldes e os *primers* CbhI.1-F e EglIII-R que amplificam a fusão gênica. Como pode ser visto na Figura 56, a reação gerou um fragmento de ~3 kb apenas quando utilizado o DNA genômico do clone FusAOX, que corresponde ao tamanho esperado da amplificação da fusão gênica, confirmando assim sua integração.

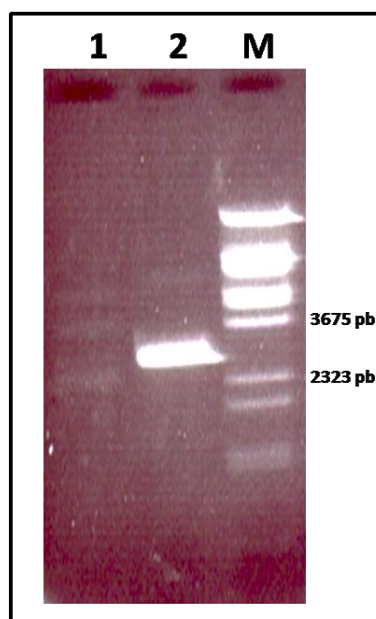


Figura 56. Amplificação de fragmento de DNA relativo à fusão gênica *cbhI.1-2A-eglIII*. Foi utilizado como *template* DNA genômico do clone FusAOX de *P. pastoris*. Análise realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. 1) 1 reação de PCR utilizando o DNA genômico extraído do controle negativo como molde; 2) reação de PCR utilizando o DNA genômico extraído do clone FusAOX como molde; M) Marcador λ BstEII.

Uma análise qualitativa foi realizada utilizando o substrato MUC. O sobrenadante da indução foi utilizado na reação, e a atividade sobre esse substrato foi detectada pela formação de fluorescência quando a reação foi exposta a luz ultravioleta resultante da degradação do substrato. Como pode ser observado na Figura 58, houve uma produção gradual de fluorescência no decorrer do tempo de

indução do clone FusAOX superior a fluorescência produzida pelo reação com o sobrenadante da cultura do controle negativo (Figura 57).

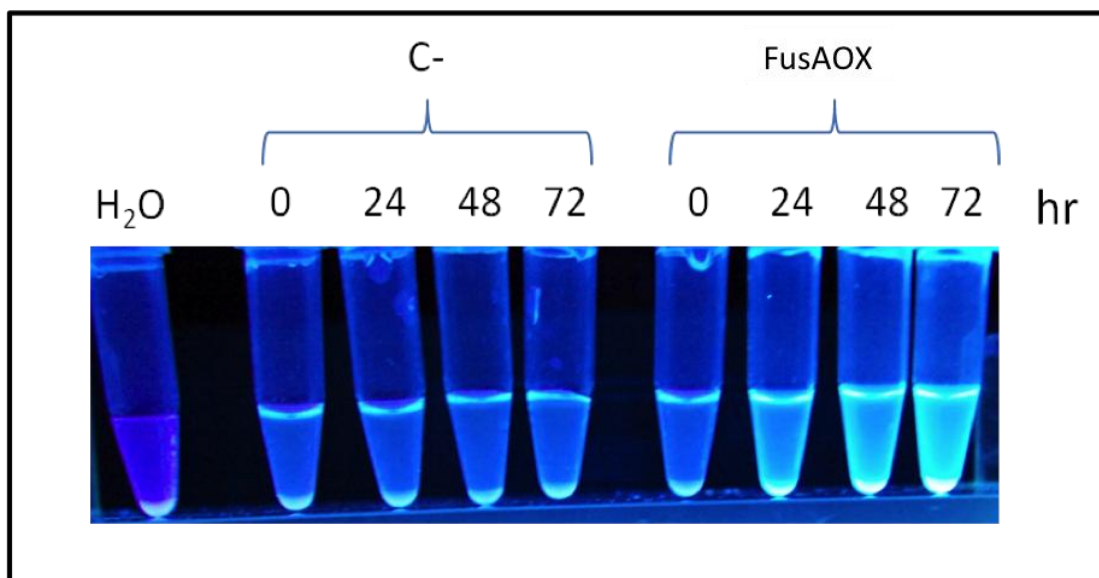


Figura 57. Ensaio qualitativo de atividade com o substrato sintético MUC. Reação enzimática realizada com os sobrenadantes da cultura (0, 24, 48 e 72 horas de indução) dos clones C- e FusAOX e 5 mM do substrato MUC. O controle da reação foi feito utilizando água ao invés dos sobrenadantes da cultura. A atividade foi detectada pela emissão de fluorescência após exposição à luz ultravioleta.

Na placa de hidrólise, também ficou evidente a detecção de atividade sobre CMC presente no sobrenadante da cultura (Figura 58). No perfil do clone FusAOX, a partir de 24 horas, já pôde ser detectado halos de hidrólise de tamanhos crescentes proporcionalmente ao tempo, e maiores do que os halos encontrados no sobrenadante do cultivo do controle negativo.

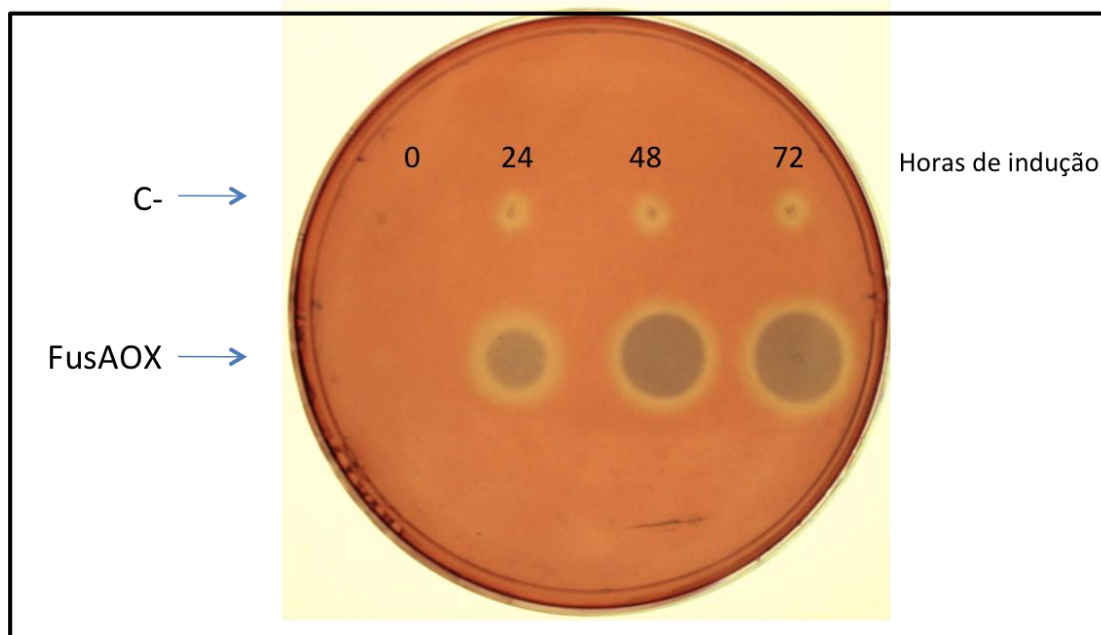


Figura 58. Ensaio de formação de halo de hidrólise em placa contendo 0,5% CMC. A revelação foi feita com *Congo Red*. Sobrenadante (2 µL) das culturas de indução dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de indução dos clones C- e FusAOX.

A fim de detectar as enzimas recombinantes, determinar suas massas moleculares e confirmar a clivagem da proteína de fusão EGLII-2A-CBHI.1, para produzir proteínas independentes, as proteínas presentes no sobrenadante das culturas, no tempo que apresentou maior atividade enzimática (72 horas de indução), foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE. Como controle foi usado o sobrenadante da linhagem controle após o mesmo tempo de indução. A partir do perfil de migração das proteínas no gel foi possível identificar duas bandas correspondentes às enzimas recombinantes de *P. pastoris* no sobrenadante do clone FusAOX e que não está presente no perfil do controle negativo (Figura 59). A massa molecular destas proteínas foram estimadas em 50 kDa e 70 kDa que correspondente à massa molecular predita para as proteínas EGLII e a massa encontrada quando a CBHI.1 foi expressa em *S. cerevisiae*, respectivamente, confirmando assim a clivagem da proteína de fusão pelo peptídeo 2A.

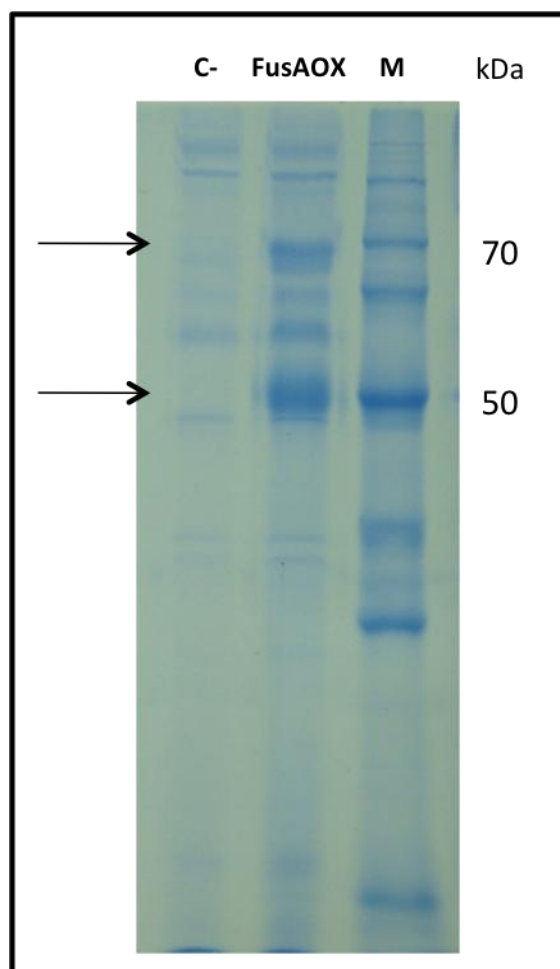


Figura 59. Análise do perfil proteico do sobrenadante da cultura do clone **FusAOX**. Análise realizada em gel SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie blue*. C-) Sobrenadante do controle negativo após 72 horas de indução; FusAOX) Sobrenadante do clone FusAOX após 72 horas de cultura; M) Marcador *Unstained Protein Marker Fermentas*. As setas indicam a posição das bandas de ~70 kDa e 50 kDa correspondente as enzimas CBHI.1 e EGLII, respectivamente.

Para confirmação da banda correspondente as enzimas celulolíticas foi realizado um zimograma com os mesmos sobrenadantes utilizados anteriormente, sendo a eletroforese realizada em condições desnaturantes, na presença de 0,15% de CMC no gel. Após a corrida o gel foi tratado de forma a promover a renaturação das proteínas, corado com *Congo Red* e descorado com solução de NaCl, evidenciando um halo de hidrólise correspondente à atividade da proteína EGLII que não apareceu no perfil do controle negativo (Figura 60). Não foi possível observar halo de degradação do substrato específico para a CBHI.1 pois o sobrenadante do cultivo do

controle negativo, apresentou halo de degradação, na posição em que se encontraria a proteína CBHI.1.

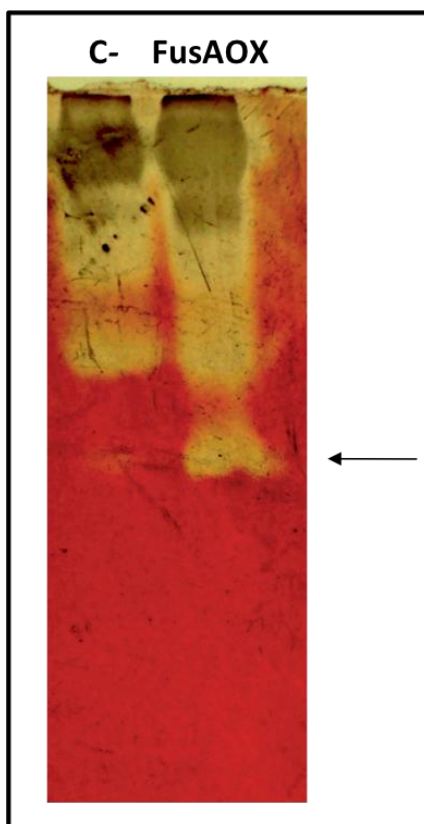


Figura 60. Zimograma com o sobrenadante de cultura do recombinante de *P. pastoris* **FusAOX**. Análise realizada em gel SDS-PAGE contendo 0,15% CMC. A proteína foi renaturada e o gel corado com uma solução de 0,1% de *Congo Red*, como descrito em métodos. A seta indica degradação na altura de aproximadamente 50 kDa que coincide com a massa molecular teórica estimada para a EGLII de *T. reesei*.

7.1 Linhagens de *S. cerevisiae* produtoras de celulasas

A produção de etanol lignocelulósico transformou-se em um grande desafio para a indústria de energia renovável. A celulose presente nos resíduos lignocelulósicos representa uma fonte abundante de açúcares, mas estes só se tornam disponíveis para fermentação após a etapa de hidrólise (Sun & Cheng, 2002). As grandes quantidades de enzimas necessárias para a conversão enzimática de celulose em açúcares fermentáveis impacta severamente sobre a relação custo-eficácia desta tecnologia. Atualmente existe um esforço no campo do etanol combustível no sentido de expandir o espectro de substratos utilizados pela levedura *S. cerevisiae* para produção de etanol, pois, mesmo pequenos aumentos no rendimento de etanol podem significar grandes aumentos em termos de lucratividade do processo de conversão, já que cerca de 60% do custo de produção de etanol é referente a matéria-prima.

Um dos processos em desenvolvimento no Brasil para utilização da celulose contida no bagaço da cana-de-açúcar, o SSF, diminui a complexidade da conversão de celulose a etanol, pois o equilíbrio das reações enzimáticas é deslocado no sentido de formação do produto, visto que a glicose gerada na hidrólise é constantemente consumida pela levedura. No entanto, a estratégia ideal envolve a produção de enzimas celulolíticas e a conversão dos açúcares resultantes (hexoses) aos produtos desejados em um processo de única etapa através de um micro-organismo celulolítico (Shen *et al.*, 2008). Neste sentido, conduzimos o trabalho com o intuito de construir uma levedura que produzisse três tipos de celulasas, endoglicanase, celobiohidrolase e β -glicosidase, necessários para a degradação da celulose.

7.1.1 Linhagens de *S. cerevisiae* produtoras das três classes de celulasas isoladamente

A primeira etapa para a produção de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de degradar celulose foi a expressão isolada dos genes celulolíticos escolhidos para confirmar a expressão de enzimas funcionais pela levedura recombinante. Os promotores utilizados para a expressão dos genes, P_{PGKI} (expressão dos genes *egIII*, *cbhI.1*, *bgl1*, *bgl4* e *egh1-1*), e o P_{ADHI} (expressão dos genes *cdt-1* e *bgl4* fusionado a α -aglutinina), são aqueles que em *S. cerevisiae* transcrevem os genes codificadores das

enzimas 3-fosfoglicerato quinase e álcool desidrogenase I, respectivamente, ambos da via glicolítica. Esses promotores estão entre os mais eficientes de levedura e são utilizados quando um nível elevado de expressão constitutiva do gene é requerido (Romanos *et al.*, 1992).

Os substratos para as análises de atividade enzimática foram escolhidos de forma a permitir a caracterização individual de cada enzima nos experimentos de co-expressão. A CMC (carboximetilcelulose), uma celulose amorfa é tradicionalmente utilizada para quantificar atividade das endoglicanases, existindo pouca ou nenhuma atividade das celobiohidrolases sobre esse substrato. O pNPC, um substrato sintético formado pela ligação do composto colorido pNP ao carbono anomérico da celobiose por uma ligação β -1,4-glicosídica, é comumente utilizado como substrato para quantificar a atividade das celobiohidrolases (Zhang *et al.*, 2011; Lahjouji *et al.*, 2007; Taipakova *et al.*, 2011; Banerjee *et al.*, 2010; Verchot & Borelli, 2005).

A expressão individual da endoglicanase II de *T. reesei* e da celobiohidrolase I.1 de *P. chrysosporium* na *S. cerevisiae* MFL apresentou perfis semelhantes de produção. Os dois sistemas de transformação mostraram-se eficientes gerando vários transformantes onde todos os clones analisados apresentaram atividade (Figura 23). Não foi observada qualquer atividade enzimática no sobrenadante do controle negativo o que mostra que as atividades encontradas pelos transformantes só podem ser atribuídas à expressão dos genes celulolíticos. Além disto, os resultados mostraram que as enzimas secretadas no meio são funcionalmente ativas.

Diversos trabalhos na literatura têm relatado a expressão bem sucedida do gene *eglIII* de *T. reesei* em *S. cerevisiae* (Fujita *et al.*, 2004; Yanase *et al.*, 2010; Khramtsov *et al.*, 2011). A linhagem MFL selecionada, transformada com o vetor contendo o gene *eglIII*, como esperado, apresentou atividade sobre o substrato CMC (alcançando 0,19 U/mL após 96 horas de cultivo) e baixa atividade sobre o substrato sintético pNPC (apenas 13% da atividade encontrada no clone CBHI.1, após 96 horas de cultivo). As endoglicanases atuam especificamente sobre as regiões internas da celulose amorfa, e o pNPC, por ser um composto pequeno análogo da celotriose, não é substrato ideal para esta enzima.

A expressão das celobiohidrolases representa um desafio particular, pois a atividade específica dessas enzimas é menor do que a de outras celulases. Quantidades maiores de proteínas devem ser produzidas, pois baixos níveis de expressão podem dificultar a detecção da atividade. Os exemplos de expressão de

CBH em *S. cerevisiae* incluem a CBH1 e CBH2 de *T. reesei*, CBHB de *A. niger*, CBH1-4 de *P. chrysosporium*, dentre outros (Ilmén *et al.*, 2011; Den Haan *et al.*, 2006).

A celobiohidrolase CBHI.1 do fungo *P. chrysosporium*, foi anteriormente expressa em *S. cerevisiae* por Brandão (1996), e apresentou-se ativa no sobrenadante da cultura, quando foi expressa a partir de vetores epissomais e integrativos. Testamos, portanto, a expressão funcional dessa enzima na linhagem semi-industrial MFL para confirmar sua expressão. O transformante primeiramente selecionado em placa de CMC expressando a enzima CBHI.1, apresentou maior atividade sobre o substrato sintético pNPC quando foi usada enzima coletada no tempo de 96 horas, onde os valores de atividade enzimática foram de 0,049 U/mL. Nenhuma atividade sobre CMC foi detectada já que celobiohidrolases têm baixa atividade sobre esse tipo de celulose, sendo mais específica para a celulose cristalina. Sendo assim, ficou demonstrada a funcionalidade de CBHI.1 no sobrenadante do cultivo da linhagem MFL.

Diversos trabalhos, com o objetivo de construir linhagens de *S. cerevisiae* capazes de crescer em celobiose, isolaram e expressaram na levedura genes de diferentes β -glicosidases de fungos celulolíticos (*A. niger*, *C. peliculosa*, *S. fibuligera*, *K. lactis*, *A. kawakii*, *T. reesei*, *H. grisea*, *C. wickerhamii*). No entanto, em sua maioria, as enzimas expressas ficaram retidas no espaço periplasmático ou no citossol, não sendo possível o crescimento das células em meio contendo celobiose (Lynd *et al.*, 2002; van Rooyen *et al.*, 2005; Kohchi & Toh-e, 1986; Benoliel *et al.*, 2010). Apenas os transformantes expressando o gene da β -glicosidase 1 de *S. fibuligera* e de *A. aculeatus* secretaram as enzimas e foram capazes de crescer em meio contendo celobiose como única fonte de carbono (McBride *et al.*, 2005; Gurgu *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2008). No entanto, utilizando a técnica de *Yeast Surface Display* (YSD), que envolve o ancoramento de proteínas na superfície externa da parede celular da levedura (Kondo & Ueda, 2004), foi obtido um relativo sucesso na expressão de algumas β -glicosidases. Genes codificadores de β -glicosidase de *A. aculeatus*, *S. fibuligera*, *A. kawachii* e *A. oryzae* fusionados ao C-terminal da α -aglutinina de *S. cerevisiae* foram expressos para que as proteínas de fusão ficassem ancoradas na superfície celular. Desta forma, as leveduras resultantes foram capazes de crescer aeróbica e anaerobicamente em celobiose (van Rooyen *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2004; Katahira *et al.*, 2006; Den Hann *et al.*, 2007).

Recentemente, uma nova estratégia vem sendo abordada para permitir o crescimento da levedura em celobiose como fonte de carbono. Tal estratégia consiste na expressão de transportadores de celodextrinas, além da expressão de uma β -glicosidase intracelular (Galazka *et al.*, 2010; Ha *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2011).

Neste trabalho utilizamos várias abordagens para expressar β -glicosidase em *S. cerevisiae*. Testou-se a expressão da enzima BGL1 de *S. fibuligera* em sua forma nativa, fusionada ao C-terminal da α -aglutinina (proteína envolvida na adesão sexual entre células de sexos diferentes de *S. cerevisiae*) e com o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* (sinal de secreção mais utilizado para expressão de genes heterólogos em *S. cerevisiae*). Também foi testada a expressão da BGL4 do fungo *H. grisea* fusionada ao C-terminal da α -aglutinina e com peptídeo sinal de *S. cerevisiae*, já que a forma nativa, quando expressa na linhagem MFL, ficou retida no espaço periplasmático como relatado por Benoliel *et al.* (2010). Outra abordagem testada foi a da co-expressão da β -glicosidase intracelular GH1-1 e do transportador de celodextrinas CDT-1 de *N. crassa*. Em todos os casos, a seleção utilizada foi apenas a capacidade de crescimento em meio com celobiose como única fonte de carbono.

Dentre todos os genes e estratégia utilizados, apenas o sistema envolvendo a co-expressão dos genes *gh1-1* e *cdt-1* apresentou um resultado satisfatório. Dentre os clones analisados, apenas 20% dos transformantes foram capazes de crescer em celobiose (Figuras 26 e 30). A atividade de β -glicosidase foi detectada no extrato celular, embora alguma atividade sobre o substrato pPNG tenha sido também encontrada no sobrenadante da cultura, podendo ser decorrente da morte celular e difusão da enzima para o meio, já que o teste foi realizado após 96 horas de cultivo (Figura 32). A levedura expressando a β -glicosidase intracelular, e sem o transportador, não foi capaz de crescer em celobiose, confirmando que a expressão do transportador CDT-1 é fundamental para o crescimento da levedura em celobiose.

A constatação de que as enzimas analisadas nesse trabalho, secretadas ou ancoradas à parede celular, não propiciaram crescimento celular em celobiose é intrigante uma vez que há relatos de expressão bem sucedida descritos na literatura (Katahira *et al.*, 2006; van Rooyen *et al.*, 2005; McBride *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2004; Yanase *et al.*, 2010). Especulamos que a linhagem utilizada nesse trabalho, por se tratar de uma linhagem semi-industrial, apresente alguma diferença nas propriedades estruturais de sua parede celular quando comparada às linhagens de

laboratório utilizadas nos trabalhos descritos na literatura. Isso poderia explicar a dificuldade para a secreção das enzimas e para o ancoramento da α -aglutinina em sua parede. Além disso, pode-se também sugerir que o insucesso observado tenha sido devido a limitados níveis de atividade das β -glicosidases produzidos pelas leveduras transformantes, insuficientes para degradar a celobiose, não permitindo, portanto, que a levedura pudesse utilizar de forma eficiente a fonte de carbono e produzir energia para suportar o ciclo de metabolismo e manutenção celular.

O sistema utilizando a β -glicosidase intracelular e o transportador de celodextrinas, no entanto, provou ser eficiente permitindo que a levedura crescesse em celobiose em condições aeróbicas e anaeróbicas (Figuras 33 e 34), embora a produção de etanol a partir desse substrato tenha sido observada apenas na segunda condição. O crescimento em celobiose foi mais lento do que o crescimento em glicose devido, provavelmente, à necessidade de uma etapa adicional, a quebra da celobiose. Observou-se uma fase de adaptação ao substrato com baixo crescimento nas primeiras 48 horas de cultivo, o que foi também relatado nos experimentos realizados por Galazka *et al.* (2010) expressando GH1-1 e o transportador CDT-1.

Nas condições aeróbicas, foi possível o crescimento celular do clone selecionado GH1/cdt1 em meio com celobiose, como fonte de carbono e, embora não tenha sido detectada a formação de etanol, foi verificada a produção de glicerol. A formação de glicerol, o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação, está acoplada à manutenção do equilíbrio redox celular (Jennings *et al.*, 1984). Segundo Converte *et al.* (1995), quando se tem acúmulo de glicerol no caldo fermentado, ocorre um decréscimo lento e linear da produtividade específica máxima de etanol. A produção de glicerol em condições fermentativas pode ser eliminada pela presença de baixas concentrações de oxigênio (condições microaeróbicas).

No experimento em anaerobiose foi observado o consumo da celobiose e a produção de etanol, não tendo sido detectado a presença de glicerol. Embora as taxas de etanol tenham sido baixas em relação aos trabalhos já publicados utilizando o mesmo sistema de expressão - Ha *et al.* (2010) produziram ~10 g/L de etanol após 120 horas de cultivo que corresponde a 0,441 g de etanol por g de glicose - ficou comprovado a produção de etanol pela levedura recombinante em condições anaeróbicas utilizando celobiose como substrato. As baixas concentrações de etanol podem ser associadas à evaporação, desvio da produção para geração de outros subprodutos, ou às condições de cultivo não-controladas. A produção de etanol a

partir de glicose, embora maior que a encontrada em celobiose, também foi baixa, 1,084 g/L de etanol nas primeiras 24 horas, que corresponde a rendimento de 0,048 g etanol/g glicose consumida, apenas 9,4% do valor teórico, indicando que realmente as condições de cultivo não foram adequadas. Uma fermentação em biorreator deve ser realizada para se ter um controle mais apurado das condições de fermentação e, assim, permitir que se analise a eficiência de produção de etanol pela levedura recombinante. Como relatado por Li *et al.* (2010), em culturas em frascos com baixo controle do processo fermentativo, 83% da celobiose foi consumida em 96 horas produzindo 0,28 g etanol/g açúcar, enquanto que o mesmo clone, quando cultivado em biorreator e sob condições mais bem controladas, consumiu a celobiose em apenas 48 horas, e a produção de etanol foi de 0,39 g/g de açúcar.

Nos cultivos em celobiose, tanto em modo aeróbico como anaeróbico, foi detectada a presença de celotriose no meio durante o curso do experimento entre 24 e 120 horas (Figura 35). É provável que a celotriose acumulada tenha sido gerada pela atividade de transglicosilação da β -glicosidase GH1-1, e secretada pelo transportador CDT-1, o qual facilita o transporte de celodextrinas em ambas as direções (intracelular \leftrightarrow extracelular). Ha *et al.* (2010) utilizando o mesmo sistema de expressão de β -glicosidase/transportador, observaram que esse acúmulo é transitório, não reduzindo a produção do produto, pois as celodextrinas acumuladas foram consumidas após a depleção da celobiose. No entanto, a síntese de celodextrinas pode diminuir a produtividade de etanol, pois as taxas de transporte de celotriose podem ser mais lentas do que a de celobiose. Como sugerido pelos autores, deve-se pensar em uma otimização do transportador e dos níveis de GH1 ou a identificação de β -glicosidases com atividade de transglicosilação reduzidas.

O sistema de expressão da β -glicosidase com o transportador apresenta algumas vantagens em relação às outras estratégias. O ambiente intracelular de levedura, onde a maioria das atividades metabólicas é realizada, é um espaço limitado, o que torna mais fácil a ligação da enzima a seu substrato, além disso, o ambiente comparativamente estável pode facilitar a reação de hidrólise. A eficiência da hidrólise de celobiose por uma β -glicosidase secretada é, provavelmente, dificultada quando a concentração de etanol está elevada, assim, altos níveis de β -glicosidase são exigidos para a eficiente quebra da celobiose.

As leveduras que expressam um sistema de transporte de celodextrinas podem melhorar a eficiência do processo SSF por meio da redução da concentração de

celobiose e glicose no meio, reduzindo, assim, o efeito inibitório desses compostos sobre as celulasas. Isso reduz o risco de contaminação por organismos glicose-dependentes e, conseqüentemente, leva a um aumento da taxa de produção de etanol. Além disso, o transportador CDT-1 tem maior afinidade aparente pela celobiose ($K_m \sim 3-4$ mM), quando comparado com as β -glicosidases fúngicas secretadas ($K_m \sim 100-1000$ mM) e dos transportadores de hexoses de *S. cerevisiae* ($K_m \sim 1000$ a 10.000 mM), o que deve manter mais eficazmente os níveis de açúcar solúveis abaixo da concentração em que eles inibem as celulasas fúngicas – constante de inibição (K_i) de celobiose $\sim 19-410$ mM (Ha *et al.*, 2010).

Estudos recentes realizados na UFRJ mostram que uma etapa limitante no processo SSF é o acúmulo de celobiose, que inibe a atividade das celulasas usadas nas etapas iniciais de hidrólise (Vásquez *et al.*, 2007). Com adição de mais β -glicosidase durante o SSF, observou-se redução da inibição das celulasas e uma maior eficiência nas taxas de produção de etanol. Todavia, os custos do processo aumentaram proporcionalmente e ainda foi observada celobiose não-consumida no meio. Mutreja *et al.* (2011) também mostraram a necessidade de complementar as celulasas comerciais utilizadas com a adição de quantidades adicionais de β -glicosidase durante o processo SSF para reduzir a concentração de celobiose acumulada. Isto pode ser explicado pelo baixo conteúdo de β -glicosidases nos coquetéis enzimáticos comerciais comumente utilizados, assim como pela inibição da enzima pela glicose (Mais *et al.*, 2002).

Como os tradicionais coquetéis de celulasas fúngicas exigem a adição de β -glicosidase para conversão total de celobiose em glicose durante a fermentação, o desenvolvimento da levedura recombinante neste trabalho mostra que a suplementação desta enzima pode ser reduzida, contribuindo dessa forma para a redução dos custos associados com o processo de sacarificação da celulose.

7.1.2 Construção de linhagens de *S. cerevisiae* co-expressando a fusão gênica *cbhI.1-linker-egIII*

Os genes codificadores das enzimas endoglicanase II e celobiohidrolase I.1 foram clonados e expressos com sucesso. Neste trabalho buscamos uma estratégia que envolvesse a expressão simultânea desses genes em um único vetor a fim de reduzir o número de construções necessárias para a produção de leveduras celulolíticas. A utilização de vetores de expressão bicistrônica é o método de escolha quando um controle estequiométrico das enzimas envolvidas é necessário (Dzivenu *et al.*, 2004). As várias enzimas celulolíticas interagem sinergisticamente, tornando importante que as quantidades das celulasas sejam apropriadamente balanceadas para alcançar a maior taxa de hidrólise (Yamada *et al.*, 2011). Utilizando os sistemas de sequências *linkers* a quantidade de enzimas produzidas poderá ser controlada pela quantidade de genes inseridos nos cassetes de expressão.

Neste trabalho foi testada a co-expressão dos genes de celulasas na forma de “fusões gênicas” utilizando dois sistemas de clivagem *in vivo*. Um dos sistemas envolve o uso de uma sequência autoclivante 2A do vírus FMDV enquanto que no outro as proteínas são separadas por um sítio para a endoprotease Kex2p. A posição em que os genes foram fusionados foi propositalmente determinada: *cbhI.1* na posição 5' com relação a *egIII* (Figuras 37 e 39). Isso foi feito para que a produção e secreção da proteína localizada *downstream* pudesse ser detectada, pois o halo de hidrólise das endoglicanases em placas com CMC é maior do que aquele produzido pelas celobiohidrolases. Dessa forma, a simples verificação da formação de um halo de hidrólise com tamanho significativo representa um indício de que a primeira enzima, a CBHI.1, foi efetivamente produzida já que os genes formam uma fusão traducional, assim como a segunda enzima EGLII.

Os dois sistemas testados (uso da sequência *linker* 2A e sítio para Kex2p) resultaram em enzimas funcionais (Figura 44). No entanto, como pode ser observado, a utilização do sistema de clivagem com o sítio para a protease Kex2p apresentou resultados melhores, mesmo quando analisada a expressão em termos de atividade/g de célula: 36,96 U/g e 42,84 U/g de célula de atividade sobre CMC e 10,55 U/g e 13,64 U/g de célula de atividade sobre pNPC para as fusões com o *linker* 2A e com o sítio para a Kex2p, respectivamente.

Até agora, há somente dois relatos nos quais a presença do *linker* 2A na extensão C-terminal conduziu a uma pequena redução na atividade enzimática da proteína *upstream* (Ma & Mitra, 2002; Ansari *et al.*, 2004). Como a sequência 2A, após a clivagem, fica localizada como uma extensão C-terminal na proteína *upstream* desta sequência (Donnelly *et al.*, 2001b), especulamos que a presença dos 33 resíduos de aminoácidos referentes à sequência 2A possam ter afetado a atividade da CBHI.1 pois o sítio de ligação a celulose, CBD, está localizado na porção C-terminal da enzima. A eficiência de ligação de celulasas ao substrato é consideravelmente aumentada pela presença do CBD e o aumento da ligação ao substrato claramente está correlacionado com uma melhor atividade (Limon *et al.*, 2001). Alguns trabalhos já demonstraram que diversas proteínas fusionadas utilizando o peptídeo 2A foram processadas com sucesso em proteínas independentes e funcionais quando expressas na levedura *S. cerevisiae*. O sistema mostrou-se eficiente quando foram co-expressas uma β -glucoronidase e a proteína repórter GFP (de Felipe *et al.*, 2003). A expressão de celulasas (β -glicosidase B e endoglicanase Cel5A de *Thermotoga maritima*, exoglicanase E3 de *Thermomonospora fusca* e a xilanase II de *T. reesei*) separadas pelo *linker* 2A foi relatada apenas em plantas de tabaco mostrando-se eficiente clivagem das enzimas (Lee *et al.*, 2012).

A co-expressão das celulasas EGLII e CBHI.1 gerou clones transformantes com atividades sobre os dois substratos testados CMC e pNPC, no entanto, as atividades encontradas foram menores do que aquelas quando as enzimas foram expressas separadamente na levedura. As atividades sobre CMC correspondem a 72,3% e 68,11% da atividade apresentada pelo Clone EGLII, com as fusões com os *linkers* Kex2p e 2A, respectivamente, assim como, as atividades sobre pNPC encontradas correspondem a 91,8% e 77,55% das atividades apresentadas pelo Clone CBHI.1, com as fusões com o *linkers* Kex2p e 2A, respectivamente (Figuras 25 e 44). Podemos atribuir esses resultados a fatores como saturamento da via de secreção ou esgotamento de fatores de transcrição, pois a produção de proteínas secretadas requer que as mesmas sejam capazes de entrar na via secretória, sejam corretamente dobradas e processadas e, finalmente, secretadas em uma forma ativa no meio extracelular. É sabido que a expressão de proteínas heterólogas é limitada por reações de estresse celular que podem influenciar a produtividade. A maquinaria necessária para o dobramento de cada proteína pode ser saturada quando proteínas heterólogas

são super-expressas, causando acúmulo de proteínas dobradas incorretamente ou proteínas agregadas no retículo endoplasmático (Ilmén *et al.*, 2011).

O fenômeno da co-expressão de enzimas segregadas que apresentam atividades mais baixas do que aquelas obtidas quando são expressas em separado já foi relatado anteriormente. Jeon *et al.* (2009a) quando co-expressaram os genes da β -glicosidase 1 de *S. fibuligera* e endoglicanase E de *Clostridium thermocellum* houve um decréscimo de 23,8% para a atividade BGase e 33,11% para a atividade sobre CMC em comparação com a expressão das enzimas separadamente. Den Hann *et al.* (2006) também observaram um decréscimo de 37,67% e 36,17% quando co-expressaram a β -glicosidase 1 de *S. fibuligera* e a endoglicanase I de *T. reesei*, respectivamente, quando comparado a expressão das enzimas separadas. No entanto, também foi observado que a co-expressão não foi diferente da expressão individual (Katahira *et al.*, 2006), ou que apresentou pouca diferença (Wen *et al.*, 2009). Há relatos até de um aumento na expressão de enzimas quando co-expressas. Fujita *et al.* (2004) observou que a atividade da β -glicosidase 1 de *Aspergillus aculeatus* quando co-expressa com a endoglicanase II e a celobiohidrolase II de *T. reesei*, foi 2 vezes maior e 1,6 maior do que quando expressa sozinha ou com o gene EGLII, respectivamente.

7.1.3 Construção de linhagens de *S. cerevisiae* co-expressando as fusões gênicas *cbhI.1-linker-egIII* e o sistema GH1/cdt1

A produção direta de etanol a partir de celulose tem sido alcançada através da co-expressão de genes de celulasas envolvidos nas reações sequenciais da hidrólise da celulose. Por exemplo, Den Haan *et al.* (2006) co-expressaram dois genes de celulasas, uma endoglicanase de *T. reesei* e a β -glicosidase 1 de *S. fibuligera* em *S. cerevisiae*. A levedura resultante cresceu em celulose PASC como única fonte de carbono com concomitante produção de etanol. Fujita *et al.* (2004) produziram etanol a partir de fontes de celulose, tais como β -glicana e PASC, sem a adição de celulasas comerciais utilizando uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* na qual estavam ancoradas as enzimas EGII e CBHII de *T. reesei* e BGL1 de *A. aculeatus* na superfície da célula. O rendimento de etanol produzido a partir de PASC consumido foi de 0,45 g/g que corresponde a 88,5% do rendimento teórico. Jeon *et al.* (2009b) co-expressaram a proteína bacteriana EngD de *C. cellulovorans* e a BGL1 de *S.*

fibuligera em *S. cerevisiae* de modo que a levedura recombinante foi capaz de hidrolisar eficientemente substratos celulósicos tais como CMC e β -glicana e produzir etanol. A quantidade de etanol produzida a partir de 20 g/L de β -glicana foi de 9,15 g/L, o que correspondeu a 80,3% do rendimento teórico. Recentemente, os genes que codificam para a endoglicanase II (EGII) e celobiohidrolase II (CBHII) de *T. reesei* e a β -glicosidase 1 (BGL1) de *A. aculeatus* foram integrados no cromossomo de *S. cerevisiae* e a linhagem resultante produziu etanol a partir de celulose de palha de milho pré-tratada sem a adição de enzimas produzidas exogenamente (Khrantsov *et al.*, 2011).

Para a construção de uma levedura que expressasse as três classes de celulasas, novos vetores com as fusões gênicas (*cbhI.1-2A-eglIII* e *cbhI.1-Kex-eglIII*) foram construídos com a marca de seleção G418 (Figura 45). Esses vetores foram utilizados para transformação do clone GH1/cdt1 (que expressa a β -glicosidase e o transportador), já que nem todos os transformantes com o GH1-cdt apresentaram atividade (Figura 30).

Diferentemente do ocorrido com a seleção utilizando a marca auxotrófica *LEU2*, os transformantes com a marca dominante G418 apresentaram halos de hidrólise de tamanhos variados assim como falso-positivos, que não apresentaram halos sobre CMC (Figura 46). O clone selecionado apresentou atividade sobre os substratos CMC e pNPC (Figura 48). A capacidade de crescimento em celobiose, seu consumo, e produção de etanol, foram comprovados (Figura 49) com perfil semelhante ao apresentado pelo clone GH1/cdt1. Sendo assim, ficou demonstrada a funcionalidade das enzimas celulolíticas na linhagem MFL. No entanto, quando cultivados em meio com celulose como fonte de carbono (CMC), não apresentaram crescimento (Figura 50). O crescimento em CMC pode não ter ocorrido pela baixa concentração celular inicial ($OD_{600} = 6$), pela produção insuficiente de enzimas, ou pelas condições de cultivo, tornando necessária a realização de experimentos em biorreatores sob condições mais bem controladas.

Além disso, podemos supor que a seleção (por maior halo de hidrólise em placa de CMC) não tenha sido adequada, pois no clone selecionado GH1-Fus2A pode ter ocorrido favorecimento da expressão das endoglicanases em detrimento da expressão das celobiohidrolase e/ou da β -glicosidase. Como já mencionado, as celulasas interagem sinergicamente, tornando importante que as quantidades de

cada uma sejam balanceadas para melhor hidrolisar a celulose (Yamada *et al.*, 2011). Assim, torna-se necessário uma nova seleção com os clones transformantes pela capacidade de crescimento em meio com celulose como fonte de carbono pois assim, pode-se selecionar o clone produtor de concentrações adequadas de cada enzima para permitir a hidrólise de celulose.

Por fim, demonstrou-se a construção de uma levedura produtora dos três tipos de celulasas necessárias para a degradação da celulose (Figura 61). Talvez essa linhagem recombinante não seja capaz de degradar a maior parte da celulose do meio e produzir boa quantidade de etanol, mas pode ser capaz de fornecer celulasas em níveis constantes durante o processo e diminuir a quantidade de enzimas comerciais necessárias para hidrolisar o substrato, e com isso diminuir os custos do processo SSF.

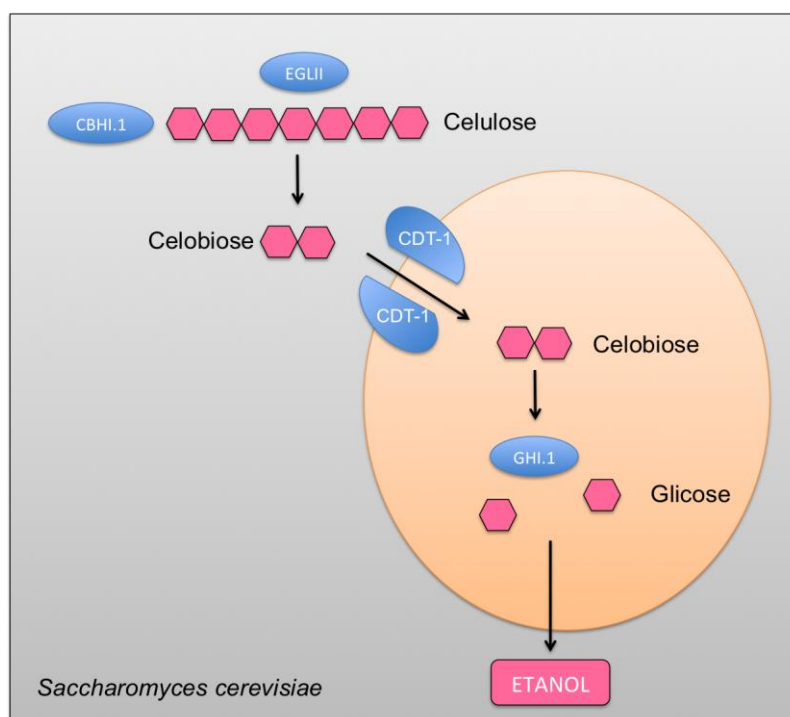


Figura 61. Representação esquemática do modo de ação da levedura *S. cerevisiae* recombinante construída neste trabalho. A levedura recombinante expressa as celulasas endoglicanase II, celobiohidrolase I.1 e β -glicosidase GH1-1, e o transportador de celodextrinas.

7.2 Expressão das celulasas EGLII e CBHI.1 em *Pichia pastoris*

Os principais impedimentos para uma utilização mais difundida do SSF são o alto custo e o baixo rendimento na produção de etanol. As celulasas empregadas nas etapas iniciais do SSF na hidrólise da celulose não são produzidas pelo sistema, fato este que aumenta significativamente os custos do processo. O incremento da ação das celulasas é, pois, de alta relevância para a diminuição dos custos e para um maior aproveitamento da celulose. Portanto, a produção *in-house* das enzimas celulolíticas é uma alternativa para viabilizar economicamente a via enzimática de hidrólise, reduzindo a vulnerabilidade da dependência deste insumo. O presente projeto visa contribuir com estudos que podem levar a uma diminuição dos custos do processo de produção de etanol a partir de celulose. Nesse sentido, uma abordagem empregada nesse trabalho foi a de desenvolver uma linhagem da levedura *Pichia pastoris* capaz de produzir celulasas. Este trabalho avaliou o sistema de expressão de *P. pastoris* baseado no promotor induzível por metanol *AOXI*. Foram utilizados para análise os genes *eglII* e *cbhI.1* em fusão gênica utilizando a sequência 2A.

O promotor induzível *AOXI* é bastante utilizado para dirigir a expressão de diversas proteínas de interesse que podem atingir 30% do total de proteína expressas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). A integração cromossomal é mais desejável do que o uso de sistemas episomais de expressão, pois estes tendem a ter baixo número de cópias em *P. pastoris* além de serem pouco estáveis (Daly & Hearn, 2005). O desenvolvimento de micro-organismos geneticamente estáveis (taxa de perda de menos de 1 % do vetor por geração) é de suma importância na indústria para a manutenção de taxas de produção constantes.

O sistema de transformação mostrou-se eficiente gerando vários transformantes. Em nosso laboratório já havia sido observado que sobrenadantes de *P. pastoris* exibem uma atividade sobre CMC embora a anotação de seu genoma não tenha identificado nenhum gene codificador de celulase. Os clones resultantes da transformação com o vetor pPIC9-Fus2A apresentaram variação quanto ao tamanho dos halos de hidrólise em placa com CMC, havendo transformantes em que não foi possível se detectar halo com tamanho superior ao encontrado nos controles (Figura 53). Isto provavelmente se deve à ausência do vetor de expressão em alguns transformantes His⁺ e parece ser decorrente de eventos de recombinação gênica do

gene *HIS4* presente no vetor e o alelo *his4* no genoma de *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 2000). Estes eventos podem esclarecer o fenótipo de 10-50% de colônias transformantes His⁺ que não apresentam atividade enzimática (Cregg *et al.*, 2001). Já a produção de níveis variados de atividade enzimática nos clones transformantes com o mesmo cassete de expressão é consistente com o uso de vetores integrativos e ao fato de que os diversos eventos de recombinação que governam a integração genômica das construções recombinantes podem também afetar os níveis de expressão heteróloga e levar a variação clonal. Neste caso, a integração de DNA exógeno pode ocorrer em múltiplas inserções e em diferentes *loci* (*AOX1* ou *HIS4*), devido à organização da cromatina nos sítios de integração (Gerasimova & Corces, 2001). No entanto, em alguns clones os halos de hidrólise observados foram superiores aos encontrados nos clones controles mostrando que a atividade de degradação de CMC produzida pelos transformantes é devida unicamente à expressão dos genes heterólogos.

De todos os clones analisados em placa, o clone que destacou-se foi denominado Clone FusAOX. Foi detectada atividade enzimática para os substratos testados a partir de 24 horas de cultura, atingindo o pico em 72 horas (Figura 55). É provável que, se a cultura do clone tivesse sido estendida por mais horas, os níveis proteicos aumentariam ainda mais a atividade enzimática, pois é reportado em diversos trabalhos que, para a produção de proteínas recombinantes usando o promotor *AOX1*, o tempo requerido para atingir o pico de produção enzimática é geralmente muito longo (120-240 horas) (Kuwae *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007). No tempo em que o clone FusAOX apresentou maior atividade (72 horas de indução com metanol) a atividade sobre CMC foi ~8 vezes superior àquela obtida em *S. cerevisiae* após 72 horas de crescimento.

Quando o sobrenadante do cultivo do último ponto de indução (72 horas) do clone FusAOX foi analisado em gel SDS-PAGE (Figura 59), foi possível identificar duas bandas correspondentes as enzimas EGLII e CBHI.1 que não estavam presente no sobrenadante do controle negativo, confirmando assim a clivagem da proteína de fusão pelo peptídeo 2A. Assim como em *S. cerevisiae* (Brandão, 1996), a enzima CBHI.1 quando expressa em *P. pastoris* apresentou massa molecular de ~70 kDa, enquanto que a massa predita por análise da sequência do cDNA tem 54,9 kDa. A maior massa molecular da proteína secretada em relação ao valor esperado pode ser devido a glicosilação de proteínas heterólogas que ocorre comumente em *P. pastoris*

assim como em *S. cerevisiae*, pois o cDNA *cbhI.1* possui três sítios potenciais de N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr). A enzima nativa deve ser naturalmente glicosilada em *P. chysosporium*, além disso, é possível que esteja sendo produzida em *P. pastoris* na forma hiperglicosilada quando comparada à proteína nativa. Em geral, a glicosilação das celulasas está relacionada à separação espacial entre domínio catalítico e domínio de ligação a celulose, e proteção do *linker* de clivagem proteolítica (Srisodsuk *et al.*, 1993; Kleywegt *et al.*, 1997; Hui *et al.*, 2002). É reportado que a levedura *P. pastoris* reconhece as mesmas sequências de glicosilação que outros eucariotos, no entanto, a natureza destas glicosilações é diferente (Cabral *et al.*, 2001). Algumas proteínas secretadas em *P. pastoris* recebem muito mais carboidratos apresentando-se em gel com um padrão de hiperglicosilação (Cregg *et al.*, 2001).

Foi também observado poucas proteínas endógenas de *P. pastoris* no sobrenadante, sendo as enzimas EGLII e CBHI.1 as principais proteínas secretada para o meio. A baixa quantidade de proteínas endógenas encontradas no sobrenadante é um fato interessante, pois certamente contribuirá para uma eficiente purificação das proteínas recombinantes. Mattanovich *et al.*, (2009) caracterizaram o secretoma de *P. pastoris* linhagem DSMZ 70382 crescida em glicose e observaram apenas 20 proteínas como naturalmente secretas em níveis detectáveis. Segundo os autores, o crescimento em metanol não apresenta grandes diferenças no padrão de proteínas secretadas.

A redução no custo da produção da enzima por meio de otimização do meio de fermentação é uma etapa fundamental para uma aplicação industrial. Embora a expressão de proteínas heterólogas possa ser feita em cultura de frascos, os níveis de proteína são tipicamente mais elevados em biorreatores (fermentador). Shumiao *et al.* (2010) desenharam e construíram gene sintético que codifica para a enzima EGL1 de *A. niger*. A expressão em *P. pastoris* alcançou atividade máxima em culturas com alta densidade celular. A produção em frasco alcançou 20,3 U/mL com 1% de β -glicana, e 3 U/mL, com 1% de CMC como substratos *versus* 1270,3 U/mL e 220,7 U/mL para os mesmos substratos quando produzidas em fermentadores de 50 L. Embora o sistema de expressão tenha se mostrado eficiente, é ainda passível de otimização.

Por fim, demonstrou-se a construção de uma levedura *P. pastoris* produtora de dois tipos de celulasas necessárias para a degradação da celulose. Essa levedura é reconhecida como uma interessante plataforma para a produção de proteínas heterólogas, que, no presente caso, poderia complementar a produção de celulasas por

7.DISSCUSSÃO

S. cerevisiae, contribuindo, assim, para a redução da dependência da importação das enzimas.

A partir dos resultados realizados neste trabalho concluímos que:

- Os genes que codificam para a endoglicanase II de *T. reesei* e celobiohidrolase I.1 de *Phanerochaete chrysosporium* foram expressos com sucesso na levedura linhagem semi-industrial de *S. cerevisiae* MFL gerando enzimas funcionais;
- O gene sintético *gh1p1*, que codifica para a β -glicosidase intracelular GH1-1 do fungo *N. crassa*, quando expresso na levedura *S. cerevisiae* MFL conjuntamente com o transportador de celodextrinas CDT-1, permitiu que os transformantes fossem capazes de crescer em meio contendo celobiose como única fonte de carbono.
- A enzima GH1-1 foi produzida eficientemente em *S. cerevisiae* sendo detectada principalmente no espaço intracelular;
- Em condições de aerobiose, a levedura expressando GH1-1 e o transportador CDT-1 foi capaz de consumir toda a celobiose (~16 g/L) após 96 horas de cultivo produzindo glicerol;
- Em condições de anaerobiose, esta linhagem foi capaz de consumir toda a celobiose (~6 g/L) no meio após 120 horas de cultivo produzindo etanol (0,051g/g de célula);
- Foi observado no cultivo aeróbico e anaeróbico o acúmulo de celotriose no meio, provavelmente devido à atividade de transglicosilação de GH1-1 e o transporte para fora da célula pelo transportador CDT-1;
- A co-expressão na levedura *S. cerevisiae* MFL dos genes que codificam para as celulasas EGLII e CBHI.1 na forma de fusão gênica utilizando a sequência *linker* 2A e o sítio para a endoprotease Kex2p resultou na produção de enzimas funcionais com atividade sobre CMC e pPNC;

- A fusão gênica contendo o sítio para a endoprotease Kex2p resultou em maiores taxas de atividade quando comparado com o *linker* 2A;
- As atividades sobre CMC detectadas em *S. cerevisiae* quando as celulases EGLII e CBHI.1 foram co-expressas na forma de fusão gênica, representam ~ 72,3% (fusão com o *linker* Kex2p) e 68,11% (fusão com *linker* 2A) da atividade detectada quando a enzima EGLII foi expressa isoladamente.
- As atividades sobre pNPC detectadas quando as celulases EGLII e CBHI.1 foram co-expressas em fusão gênica, representam ~ 91,8% (fusão com o *linker* Kex2p) e 77,55% (fusão com *linker* 2A) da atividade detectada quando a enzima CBHI.1 foi expressa isoladamente.
- A co-expressão dos genes celulolíticos *egIII*, *cbhI.1* e *ghl-1*, assim como o gene *cdt-1*, em levedura recombinante conferiu a essa a capacidade de crescimento em celobiose como única fonte de carbono secretando enzimas EGLII e CBHI.1 funcionais;
- A co-expressão dos genes celulolíticos *egIII*, *cbhI.1* e *ghl-1*, e do gene *cdt-1* não permitiu o crescimento em meio de celulose amorfa como fonte de carbono;
- A expressão induzida (sob controle do promotor *AOXI*) da fusão gênica *cbhI.1-2A-egIII* em *P. pastoris* resultou em enzimas funcionais no sobrenadante da cultura apresentando atividade sobre os substratos CMC, Sigmacel, MUC e papel de filtro;
- As enzimas EGLII e CBHI.1 foram detectadas em gel SDS-PAGE como proteínas independentes confirmando a autoclivagem da poliproteína mediada pela sequência 2A;

8.CONCLUSÕES

- A expressão induzida da fusão gênica *cbhI.1-2A-eglIII* em *P. pastoris* produziu atividades ~8 vezes superiores às atividades sobre CMC encontradas quando expressa na levedura *S. cerevisiae*.

Os resultados obtidos nesse trabalho abrem as seguintes perspectivas:

- Validar em biorreator os resultados obtidos na fermentação anaeróbica do clone que expressa o sistema β -glicosidase/transportador e determinar as cinéticas de produção de etanol;
- Avaliar a fermentação e sacarificação simultâneas de fontes celulósicas utilizando a linhagem recombinante expressando as três enzimas celulolíticas;
- Avaliar a redução da carga enzimática na produção de etanol de segunda geração utilizando as linhagens de *S. cerevisiae* construídas no trabalho;
- Clonar os genes celulolíticos que produziram enzimas funcionais na linhagem MFL, por meio de integração, no genoma de uma cepa industrial de *S. cerevisiae* e comparar com a cepa construída no trabalho com vetores episomais;
- Otimizar as condições de cultivo dos clones de *P. pastoris* expressando a fusão gênica *cbhI.1-2A-eglIII* para favorecer o aumento da produção das enzimas celulolíticas.

- ABRAMOVAY, R. (2009). Biocombustíveis – a energia da controvérsia. Editora Senac. 1º Edição.
- AHN, J. O.; CHOI, E. S.; LEE, H. W.; HWANG, S. H.; KIM, C. S.; JANG, H. W.; HAAM, S. J.; JUNG, J. K. (2004). Enhanced secretion of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to cellulose-binding domain. *App. Microbiol. Biotechnol.* 64: 833-839.
- ANSARI, I. H.; CHEN, L. M.; LIANG, D.; GIL, L. H.; ZHONG, W.; DONIS, R. O. (2004). Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. *J. Virol.* 78: 9612–9623.
- BADOTTI, F. (2005). Modificando o metabolismo de sacarose em *Saccharomyces cerevisiae*. In: Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (2005). 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BAE, S. C.; YANG, D. S.; CHANG, K. R.; SEONG, B. L.; LEE, J. (2000). Enhanced secretion of human granulocyte colony-stimulating factor directed by a novel hybrid fusion peptide from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* at high cell concentration. *Biotechnol. Bioengineer.* 57: 600-609.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 26: 89-105.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; NIGHAT ASLAM, N.; WALTON, J. D. (2010). Synthetic enzyme mixtures for biomass deconstruction: production and optimization of a core set. *Biotechnol. Bioeng.* 106: 707–720.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 8: 1155-1163.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13(1): 25-58.
- BENOLIEL, B.; POCAS-FONSECA, M. J.; TORRES, F. A. G.; de MORAES, L. M. P. (2010). Expression of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160: 2036-2044.
- BOURNE, Y.; HENRISSAT, B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 593–600.
- BRANDAO, G. O. (1996). Expressão heteróloga do cDNA da Celobiohidrolase (cbhI.1) do fungo *Phanerochaete crhysosporium* em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 193-200.
- BROEKHUIJSEN, M. P.; MATTERN, I. E.; CONTRERAS, R.; KINGHORN, J. R.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. (1993). Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein CAMJJ. *J. Biotechnol.* 31: 135-145.
- BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. (2011). Routes to cellulosic ethanol. Editora Springer. 1º Edição.
- BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. (2000). Methods in yeast genetics. A Cold Spring Harbor laboratory course manual. Cold Spring Harbor laboratory Press: Cold Spring Harbor, (NY) 113-114.

- BYEONG-CHEO, S.; KIM, K.Y.; YOON, J. J.; SIM, S. H.; LEE, K.; KIM, Y. S.; KIM, Y. K.; CHA, C. J. (2008). Functional analysis of a gene encoding endoglucanase that belongs to glycosyl hydrolase family 12 from the brown-rot *Basidiomycete Fomitopsis palustris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 404-409.
- CABRAL, C. M.; LIU, Y.; SIFERS, R. N. (2001). Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 619-624.
- CARDORNA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technol.* 101: 4756-4766.
- CARPITA, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 445-476.
- CARROTT, S.; CARROTT, M. (2007). Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: a review. *Bioresource Technol.* 98, 2301–2312.
- CASTRO, A. M. (2006). Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. (2010). Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* 33: 1-12.
- CHEN, D. C.; YANG, B. C.; KUO, T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* 21: 83-84.
- CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 438–443.
- CHI, Z.; CHI, Z.; LIU, G.; WANG, F.; JU, L.; ZHANG, T. (2009). *Saccharomycopsis*
-

- fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 27(4): 423-431.
- CONVERTI, A.; ZILLI, M.; ROVATTI, M. (1995). Effects of glycerol on alcohol fermentation. Inhibition mechanism and diffusion limitations. *Bioproc. Engineer.* 13: 257-263.
- COT, M.; LORET, M. O.; FRANÇOIS, J.; BENBADIS, L. (2006). Physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *Yeast Res.* 7: 22-32.
- COVERT, S. F.; BOLDUC, J; CULIEN, D. (1992). Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genet.* 22: 407-413.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16: 23-52.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, G. P. L. (2001). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 45-66.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329-332.
- CREGG, J. M.; SUNGA, A. J.; CEREGHINO, J. L.; CEREGHINO, G. P. L. (2001). Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet. Eng. (NY)* 23: 157-169.
- CTBE-MCT. Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – Ministério da Ciência e Tecnologia. <http://www.bioetanol.org.br>. Acesso em junho de 2010.
- D'ALMEIDA, M. L. O. (1988). Celulose e papel: Tecnologia de fabricação do papel. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT. 2ª Edição.

- DALY, R.; HEARN, M. P. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris* and useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119-138.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5(6): 578-595.
- DE FELIPE, P.; HUGHES, L. E.; RYAN, M. D.; BROWN, J. D. (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J. Chem.* 278: 11441–11448.
- DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. D. (2005). Cellulase, Clostridia and Ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(1): 124-154.
- DEN HAAN, R.; ROSE, S. H.; LYND, L. R.; WILLEM, H.; VAN ZYL, W. H. (2007). Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 9: 87–94.
- DE FELIPE, P.; HUGHES, L. E.; RYAN, M. D.; BROWN, J. D. (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J. Chem.* 278: 11441–11448.
- DE FELIPE, P.; LUKE, G. A.; HUGHES L. E.; GANI, D.; HALPIN, C.; RYAN, M. D. (2006). *E unum pluribus*: multiple proteins from a self-processing polyprotein *Trends Biotechnol.* 24: 68-75.
- DEN HAAN, R.; ROSE, S. H.; LYND L. R.; VAN ZYL W. H. (2006). Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 9(1): 87-94.
- DESPLESHIN, E. (2008). Biofuels in developing countries: The Brazilian experience. UNICA.

- DILLON, A. J. P. (2004). Celulasas. In: Enzimas como Agentes Biotecnológicos. Suraia Said, Rosemeire C. L. R. Pietro – Ribeirão Preto, (eds). Legis Summa, 412p.
- DING, S. J.; GE, W.; BUSWELL, J. A. (2001). Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea* purification, characterization, cloning and expression. Eur. J. Biochem. 268: 5687 – 5695.
- DONNELLY, M. L. L.; HUGHES, L. E.; LUKE, G.; MENDOZA, H.; TEN DAM, E.; GANI, D.; RYAN, M. D. (2001a). The ‘cleavage’ activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring ‘2A-like’ sequences. J. Gen. Virol. 82: 1027-1041.
- DONNELLY, M. L. L.; LUKE G.; MEHROTRA, A.; LI, X.; HUGHES L. E.; GANI D.; RYAN M. D. (2001b). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein ‘cleavage’ mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal ‘skip’. J. Gen. Virol. 82: 1013-1025.
- DZIVENU, O. K.; PARK, H. H.; WU, H. (2004). General co-expression vectors for the overexpression of heterodimeric protein complexes in *Escherichia coli*. Prot. Express. Purific. 38 :1–8.
- FANG, B.; LIANG, B.; HE, G. (2007). Synonymous codon usage bias and overexpression of a synthetic gene. Virol. Sinica 22: 226-232.
- FEREA, T. L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; ROSENZWEIG, F. (1999). Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, v.96, p.9721-9726.
- FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. (2004). Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. Appl Environ. Microbiol. 70: 1207-1212.
-

- FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochem. Engineer. J.* 44: 2–12.
- GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; JAFFE, D.; FITZHUGH, W.; MA, L. J.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C. B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; IANAKIEV, P.; BELL-PEDERSEN, D.; NELSON, M. A.; WERNER-WASHBURNE, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; KINSEY, J. A.; BRAUN, E. L.; ZELTER, A.; SCHULTE, U.; KOTHE, G. O.; JEDD, G.; MEWES, W.; STABEN, C.; MARCOTTE, E.; GREENBERG, D.; ROY, A.; FOLEY, K.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMANN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELI, E.; BIELKE, C.; RUDD, S.; FRISHMAN, D.; KRYSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R. L.; PERKINS, D.D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R. J.; OSMANI, S. A.; DESOUZA, C. P.; GLASS, L.; ORBACH, M. J.; BERGLUND, J. A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D. O.; ALEX, L. A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D. J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, MS.; LANDER ES.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422: 859-868.
- GALAZKA, J. M.; TIAN, C.; BEESON, W. T.; MARTINEZ B.; GLASS, N. L.; CATE, J. H. D. (2010). Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* 330: 84-86.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *J. Food Engin.* 74: 78-88.
- GELLISSEN, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 741-750.
-

- GERASIMOVA, T. I.; CORCES, V. G. (2001). Chromatin insulators and boundaries: Effects on transcription and nuclear organization. *Ann. Rev. Genet.* 35: 193-208.
- GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. (1991). Characteristics of fungal cellulases. *Bioresour. Technol.* 36: 37–50.
- GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. (2006). Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141-146.
- GÜLDENER, U.; HECK, S.; FIEDLER, T.; BEINHAUER, J.; HEGEMANN, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids. Res.* 24(13): 2519-2524.
- GUO, Z.; ZHANG, L.; DING, Z.; GU, Z.; SHI, G. (2011). Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose. *Enzyme Microb. Technol.* 49: 105-112.
- GURGU, L.; LAFRAYA, A.; POLAINA, J.; MARÍN-NAVARRO, J. (2011). Fermentation of cellobiose to ethanol by industrial *Saccharomyces* strains carrying the β -glucosidase gene (BGL1) from *Saccharomycopsis fibuligera*. *Bioresour. Technol.* 102: 5229–5236.
- GUSAKOV, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. Cell press.
- HA, S.; GALAZKA, J. M.; KIM, S. R.; CHOI, J.; YANG, X.; SEO, J.; GLASS, N. L.; CATE J. H. D.; JIN, Y. (2010). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *PNAS* 108: 504-509.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. (2007). Bioethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24: 549-556.

- HANAHAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. (2009). A thermotolerant b-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Express. Purif.* 67: 61–69.
- HASUNUMA, T.; KONDO, A. (2012). Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process. Biochem.* 47: 1287–1294.
- HENRISSAT, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- HOHENBLUM, H.; GASSER, B.; MAURER, M.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. (2004). Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 367-375.
- HUANG, H.; YANG, P.; LUO, H.; TANG, H.; SHAO, N.; YUAN, T.; WANG, Y.; BAI, Y.; YAO, B. (2008). High-level expression of a truncated 1,3-1,4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 95-103.
- HUI, J. P. M.; WHITE, T. C.; THIBAUT, P. (2002). Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. *Glycobiology.* 12: 837-849.
- ILMÉN, M.; DEN HAAN, R.; BREVNOVA, E.; MCBRIDE, J.; WISWALL, E.; FROEHLICH, A.; KOIVULA, A.; VOUTILAINEN, S. P.; SIIKA-AHO, M.; GRANGE, D. C.; THORNGREN, N.; AHLGREN, S.; MELLON, M.; DELEAULT, K.; RAJGARHIA, V.; VAN ZYL, W. H.; PENTTILÄ, M. (2011). High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels.* 4: 30.

- JANSSEN, G. R.; BIBB, M. J. (1993). Derivatives of pUC18 that have *Bgl*II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. *Gene* 124: 133-134.
- JENNINGS, D. H. (1984). Polyol metabolism in Fungy. *Adv. Microbial. Physiol.* 25: 149-193.
- JEON, E.; HYEON, J.; SUH, D. J.; SUH, Y. W.; KIM, S. W.; SONG, K. H.; HAN, S. O. K. (2009a). Production of cellulosic ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expressing *Clostridium thermocellum* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* β -glucosidase. *Mol. Gen.* 28: 369-373.
- JEON, E.; HYEON, J.; EUN, L. S.; PARK, B. S.; KIM, S. W.; LEE, J.; HAN, S. O. (2009b). Cellulosic alcoholic fermentation using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of *Clostridium cellulovorans* endoglicanase and *Saccharomycopsis fibuligera* beta-glucosidase. *FEMS Microbiol. Lett.* 301: 130–136.
- JORNAL CANA. 2011. Etanol reduz mais de 103 mi de toneladas de CPs em sete anos . Disponível em: http://www.canaweb.com.br/conteudo/noticia.asp?area=Producao&secao=Exclusiva&ID_Materia=41639.
- KATAHIRA, S.; MIZUIKE, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A.; (2006). Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrollysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1136–1143.
- KHRAMTSOV, N.; MCDADE, L.; AMERIK, A.; YU, E.; DIVATIA, K.; TIKHONOV, A.; MINTO, M.; KABONGO-MUBALAMATE, G.; MARKOVIC, Z.; RUIZ-MARTINEZ, M.; HENCK, S. (2011). Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 102: 8310-8313.

- KINGSMAN, S. M.; KINGSMAN, A. J. (1988). Genetic engineering: an introduction to gene analysis and exploitation in eukaryotes. Blackwell Science Inc.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 345–351.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H-P.; BOHN, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 3358-3393.
- KLEYWEGT, G. J.; ZOU, J. Y.; DIVNE, C.; DAVIES, G. J.; SINNING, I.; STÄHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; TEERI, T. T.; JONES, T. A. (1997). The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 angstrom resolution, and a comparison with related enzymes. *J. Mol. Biol.* 272: 383-397.
- KLYOSOV, A. A. (1995). Industrial Enzyme Engineering. Volume 1: Biomass conversion with cellulases.
- KOHCHI, C.; TOH-E, A. (1986). Cloning of *Candida pelliculosa* beta-glucosidase gene and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 203(1): 89-94.
- KONDO, A.; UEDA, M. (2004). Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 28–40.
- KUWAE, S.; OHYAMA, M.; OHYA, T.; OHI, H.; KOBAYASHI, K. (2005). Production of recombinant human antithrombin by *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 264-271.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

- LAHJOUJI, K.; STORMS, R.; XIAO, Z.; JOUNG, K. B.; ZHENG, Y.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A.; VARIN, L. (2007). Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75(2): 337–346.
- LEITE, F. C. B. (2008). Construção de vetores para modificação genética de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese apresentada na Universidade Federal de Pernambuco. 80 p.
- LEE, D. S.; LEE, K. H.; JUNG, S.; JO, E. J.; HAN, K. H.; BAE, H. J. (2012). Synergistic effects of 2A-mediated polyproteins on the production of lignocellulose degradation enzymes in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 63(13): 4797-4810.
- LI, S.; DU, J.; SUN, J.; GALAZKA, J. M.; GLASS, N. L.; CATE, J. H.; YANG, X.; ZHAO, H. (2010). Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a b- glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. BioSyst.* 6(11): 2129–2132.
- LI, Y.; PARK, J. Y.; SHIROMA, R.; TOKUYASU, K. (2011). Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 111(6): 682-686.
- LIMON, M. C.; MARGOLLES-CLARCK, E.; BENITEZ, T.; PENTILLA, M. (2001). Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 198: 57–63.
- LIN, Y.; TANAKA, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. *App. Microbiol. Biotechnol.* 69: 627-642.

- LIU, R.; SHEN, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Biores. Technol.* 99: 847-854.
- LIU, G.; WEI, X.; QIN, Y.; QU, Y. (2010). Characterization of the endoglucanase and glucomannanase activities of a glycoside hydrolase family 45 protein from *Penicillium decumbens* 114-2. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56: 223-229.
- LODISH H.; BERK, A. S.; ZIPURSKY, L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. (2001). *Molecular Cell Biology*. 4º Ed. 415-417.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. L.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol.* 66: 506-577.
- MA, C.; MITRA, A. (2002). Expressing multiple genes in a single open reading frame with the 2A region of foot-and-mouth disease virus as a linker. *Mol. Breed.* 9: 191-199.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249-270.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. (2008). Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and the prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy* 32: 582-595.
- MACHIDA, M.; OHTSUKI, I.; FUKUI, S.; YAMASHITA, I. (1988). Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular beta-glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 54(12): 3147-3155.

- MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, D. (2002). Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. *App. Biochem. Biotechnol.* 98: 815-831.
- MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 372-380.
- MARTINS, L. F. (2005). Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 121 p.
- MATTANOVICH, D.; GRAF, A.; STADLMANN, J.; DRAGOSITS, M.; REDL, A.; MAURER, M.; KLEINHEINZ, M.; SAUER, M.; ALTMANN, F.; GASSER, B. (2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb. Cell. Fact.* 8: 29.
- McBRIDE, J. E.; ZIETSMAN, J. J.; VAN ZYL, W. H.; LYND, L. R. (2005). Utilization of cellobiose by recombinant β -glucosidase expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression. *Enzyme Microbial. Technol.* 37: 93–101.
- McMILLAN, J. (2004) Biotechnological Routes to Biomass Conversion. Disponível em: www.nrel.gov/docs/gen/fy04/36831g.pdf.
- MELLITZER, A.; WEIS, R.; GLIEDER, A.; FLICKER, K. (2012). Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 11: 61.
- MIELLENZ, J.R. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 324-329.
- MILLER, L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

- MINAMIGUCHI, K.; OOI, T.; KAWAGUCHI, T.; OKADA, H.; MURAO, S.; ARAI, M. (1995). Secretive expression of the *Aspergillus aculeatus* cellulase (FICMCase) by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment.Bioengin. 79(4): 363-366.
- MORAES, L. M. P.; ASTOLFI-FILHO, S.; OLIVER, S. O. (1995). Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express alpha-amylase and glucoamylase separately or as a functional fusion protein. Appl. Microbiol. Biotech. 43(6): 1067-1076.
- MUTREJA, R.; DAS, D.; GOYAL, D.; GOYAL, A. (2011). Bioconversion of agricultural waste to ethanol by SSF using recombinant cellulase from *Clostridium thermocellum*. Enzyme Research, Vol. 2011, Article ID. 340279, 6 pages, 2011. doi: 10.4061/2011/340279.
- OGEDA T. L.; PETRI, D. F. S. (2010). Hidrólise enzimática de biomassa. Quim. Nova, 33: 1549-1558.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnol. Biofuels 1: 7.
- OLSSON, L.; JØRGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROCA C. (2004). Bioethanol production from lignocellulosic material. In: Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. New York: Marcel Dekker Inc. p 957-993.
- OSBORN, M. J.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; MCELMURRY, R. T.; BELL, S. K.; VIGNALI, D. A. A.; RYAN, M. D.; WILBER, A. C.; MCIVOR, R. S.; TOLAR, J.; BLAZAR, B. R. (2005). A picornaviral 2A-like sequence-based tricistronic vector allowing for high-level therapeutic gene expression coupled to a dual-reporter system. Mol. Ther. 12: 569–574.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 60(1): 34-50.

- PALOMER, X.; DOMÍNGUEZ-PUIGJANER E.; VENDRELL, M.; LLOP-TOUS, I. (2004). Study of the strawberry Cell endo-s-(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Plant Science*. 167: 509-518.
- PARACHIN, N. S. (2010). Biocatalyst Engineering. Metabolic engineering, kinetic modeling and metagenomics applied to industrial biotechnology. Division of Applied Microbiology, Lund University, Lund.
- PEREIRA JR., N.; ARANDA, D.; MELO, W. C.; SCHLITTLER, L. A. F. S.; COSTA, A. C. A. (2009). Biocombustíveis Líquidos no Brasil. In: Silvia Daniela Romano. (Org.). Biocombustíveis Líquidos en Iberoamerica. 3 ed. Buenos Aires-Argentina: 2009 Ediciones Cooperativas. 1: 59-86.
- PEREIRA JR., N. (1991). Investigations of D-xylose fermenting yeasts. Tese de Doutorado, University of Manchester. UK.
- PEREIRA JR., N. (2005). Biotechnology of lignocellulosics: trends & challenges. In: VIII Simpósio de hidrólise enzimática de Biomassa. Maringá.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Internat. Microbiol.* 5: 53-63.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. 67: 5577-5591,
- POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. (1989). Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Davis*, v.5, p.159-165.
- QIN, Y.; WEI, X.; LIU, X.; WANG, T.; QU, Y. (2008). Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in
-

- Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. *Protein Expr. Purif.* 58: 162-167.
- RAJOKA, M. I.; SHAUKAT, F.; GHOURI, M. T.; SHAHID, R. (2003). Kinetics of Beta-glucosidase production by *Saccharomyces cerevisiae* recombinants harboring heterologous *bgl* genes. *Biotechnol. Lett.* 25: 945–948.
- REIS, V. C. (2012). Modificações genéticas em linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação de xilose. Tese apresentada na Universidade de Brasília. 181 p.
- REIS V. C.; NICOLA, A. M.; DE SOUZA OLIVEIRA NETO O.; BATISTA, V. D.; DE MORAES, L. M.; TORRES, F. A. (2012). Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39(11): 1673-1683.
- ROJAS REJON, O. A. (2007). Saccharification of cellulosic biomass: Regulation of cellulase and xylanase activities under catabolic repression conditions. *J. Biotechnol.* 131: 28.
- ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast Bognor Regis* 8: 423-488.
- ROONGSAWANG, N.; PROMDONKOY, P.; WONGWANICHPOKHIN, M.; SORNLAKE, W.; PUSEENAM, A.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT, S. (2010). Coexpression of fungal phytase and xylanase utilizing the *cis*-acting hydrolase element in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research* 10: 909–916.
- RYAN, M. D.; DREW, J. (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 13(4): 928–933.

- SAITOH, S.; TANAKA, T.; KONDO, A. (2011). Co-fermentation of cellulose/xylan using engineered industrial yeast strain OC-2 displaying both β -glucosidase and β -xylosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 1553–1559.
- SAMANTA, S.; BASU, A.; MAITI, M. K.; SEN, S. K. (2005). Protein sequence of endoglucanase II of *Trichoderma reesei* from a local isolate. PubMed.
- SAMANTA, S.; BASU, A.; HALDER, U. C.; SEN, S. K. (2012). Characterization of *Trichoderma reesei* endoglucanase II expressed heterologously in *Pichia pastoris* for better biofinishing and biostoning. *J. Microbiol.* 50(3): 518-525.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 3: 249–291.
- SHAO, J. H.; ZHAO, Y.; MAO, A. J.; ZHU, Y. X.; DONG, Z. Y.; JIANG, N. (2005). Expression of B-glucosidase gene of *Sacchromycopsis fibuligera* in *Pichia pastoris*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 45(5): 792-794.
- SHEN, Y.; ZHANG, Y.; MA, T.; BAO, X.; DU, F.; ZHUANG, G.; QU, Y. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -glucosidase. *Biores. Technol.* 99: 5099–5103.
- SHUMIAO, Z.; HUANG, J.; ZHANG, C.; DENG, L.; HU, N.; LIANG, Y. (2010). High-level expression of an *Aspergillus niger* endo-beta-1,4-glucanase in *Pichia pastoris* through gene codon optimization and synthesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(3): 467-473.

- SIMS, P. F. G.; SOARES-FELIPE, M. S.; WANG, Q.; GENT, M. E.; TEMPELAARS, C.; BRODA, P. (1994). Differential expression of multiple exo-cellobiohydrolase I-like genes in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol. Microbiol.* 12: 209-216.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbial. Technol.* 46: 541-549.
- SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M. S.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Biores. Technol.* 101: 4820–4825.
- SRISODSUK, M.; REINIKAINEN, T.; PENTTILÄ, TEERI, T. T. (1993). Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase-I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 268: 20756-20761.
- STEPHANOPOULOS, G. (2008). Metabolic engineering: Enabling technology for biofuels production. *Metab. Eng.* 10: 293-294.
- SUN, Y.; CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Technol.* 83: 1–11.
- SUN, X.; LIU, Z.; ZHENG, K. X. S.; QU, Y. (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme Microbial. Technol.* 42: 560–567.
- SUOMINEN, P. L.; MÄNTYLÄ, A.L.; KARHUNEN, T.; HAKOLA, S.; NEVALAINEN, H. (1993). High frequency one-step gene replacement in

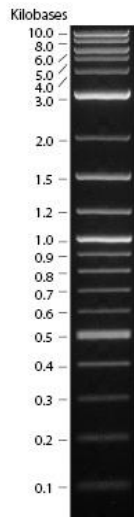
- Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. Mol. Gen. Genet. 241: 523–530.
- SZENGYEL, Z.; ZACCHI, G.; VARGA, A.; RÉCZEY, K. (2000). Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam-pretreated spruce – hydrolytic potential of cellulases on different substrates. Appl. Biochem. Biotechnol. 84–6: 679–691.
- TAIPAKOVA, S.; SMAILOV, B.; STANBEKOVA, G.; BISSENBAEV, A. (2011). Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. J. Cell Mol. Biol. 9(1): 53-61.
- TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZOMI, T. (1999). Molecular cloning and expression of novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. J. Biochem. 125: 728-736.
- THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. (2008). An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus sp.* S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 60(2): 140-146.
- TOKARSKI, M. (2005). O proálcool renasce. Correio Braziliense, Brasília, p. 14, 25 nov.
- TOKUHIRO, K.; ISHIDA, N.; KONDO, A.; TAKAHASHI, H. (2008). Lactic fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying beta-glucosidase on the cell surface. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79(3): 481-488.
- TORRES, V.; BARRA, L.; GARCÉS, F.; ORDENES, K.; LEAL-ORTIZ, S.; GARNER, C. C.; FERNANDEZ, F.; ZAMORANO, P. (2010). A bicistronic lentiviral vector based on the 1D/2A sequence of foot-and-mouth disease virus expresses proteins stoichiometrically. J. Biotechnol. 146(3): 138-142.

- TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. (1987). High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* 5: 1305-1308.
- VAN ROOYEN, R.; HAHN-HAGERDAL, B.; LA GRANGE, D. C.; VAN ZYL, W. H. (2005). Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Biotechnol.* 120: 284–295.
- VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N.; SOUZA, J. R. M. B.; PEREIRA, JR., N. (2007). Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *App. Biochem. Biotechnol.* 137: 141-153.
- VERCHOT, L. V.; BORELLI, T. (2005). Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils. *Soil Biol. Biochem.* 37: 625–633.
- VIIKARI, L.; VEHEMAANPERA, J.; KOIVULA, A. (2012). Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass Bioener.* 46: 13-24.
- WEI, X. M.; QIN, Y. Q.; QU, Y. B. (2010). Molecular cloning and characterization of two major endoglucanases from *Penicillium decumbens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(2): 265-270.
- WEN, F.; NAIR, N. U.; ZHAO, H. (2009). Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 412-419.
- WEN, F.; SUN, J.; ZHAO, H. (2010). Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1251–1260.
- WIEDEMANN, B.; BOLES, E. (2008). Codon-optimized bacterial genes improve L-arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2043-2050.

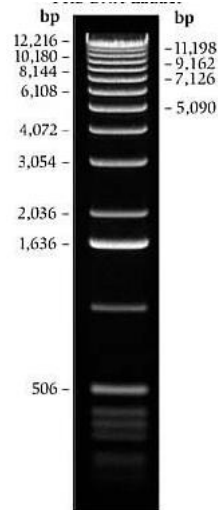
- WILSON, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 295-299.
- WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood – a comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Progr.* 19: 1109-1117.
- YAMADA, R.; TANIGUCHI, N.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. (2011). Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol. Biofuels* 15: 4-8.
- YANASE, S.; YAMADA, R.; KANEKO, S.; NODA, H.; HASUNUMA, T.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. (2010). Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast. *Biotechnol. J.* 5: 449–455.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24: 452-481.
- ZHANG, H.; WANG, L.; SHEN, Q.; WU, B.; GAO, P. (2011). A novel approach for estimating the relationship between the kinetics and thermodynamics of glycoside hydrolases. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 43(5): 409-17.
- ZHANG, L.; GUO, Z.; HONG, J.; DING, Z.; GAO, Z.; HE, Z.; SHI, G. (2012). Expressing β -glucosidase from *Saccharomycopsis fibuligera* in industrial ethanol producing yeast and evaluation of the expressing sufficiency. *Ann. Microbiol.* 62: 539-544.
- ZNAMEROSKI, E. A.; CORADETTI, S. T.; ROCHE, C. M.; TSAI, J. C.; IAVARONE, A. T.; CATE, J. H. D.; GLASSB, N. L. (2012). Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. *App. Biol. Sciences.* 109(16): 6012-6017.
-

Anexo 1. Padrão dos marcadores de massa molecular.

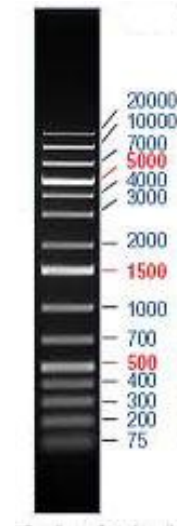
2-Log DNA ladder
(Biolabs)



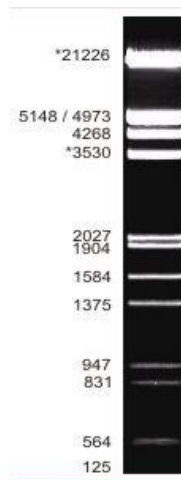
1 kb DNA Ladder
(Gibco/INVITROGEN)



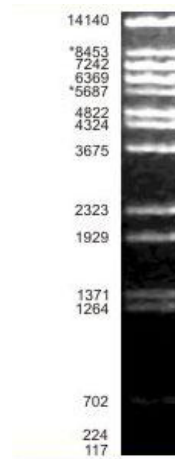
O' Gene Ruler 1
kb Plus
(FERMENTAS)

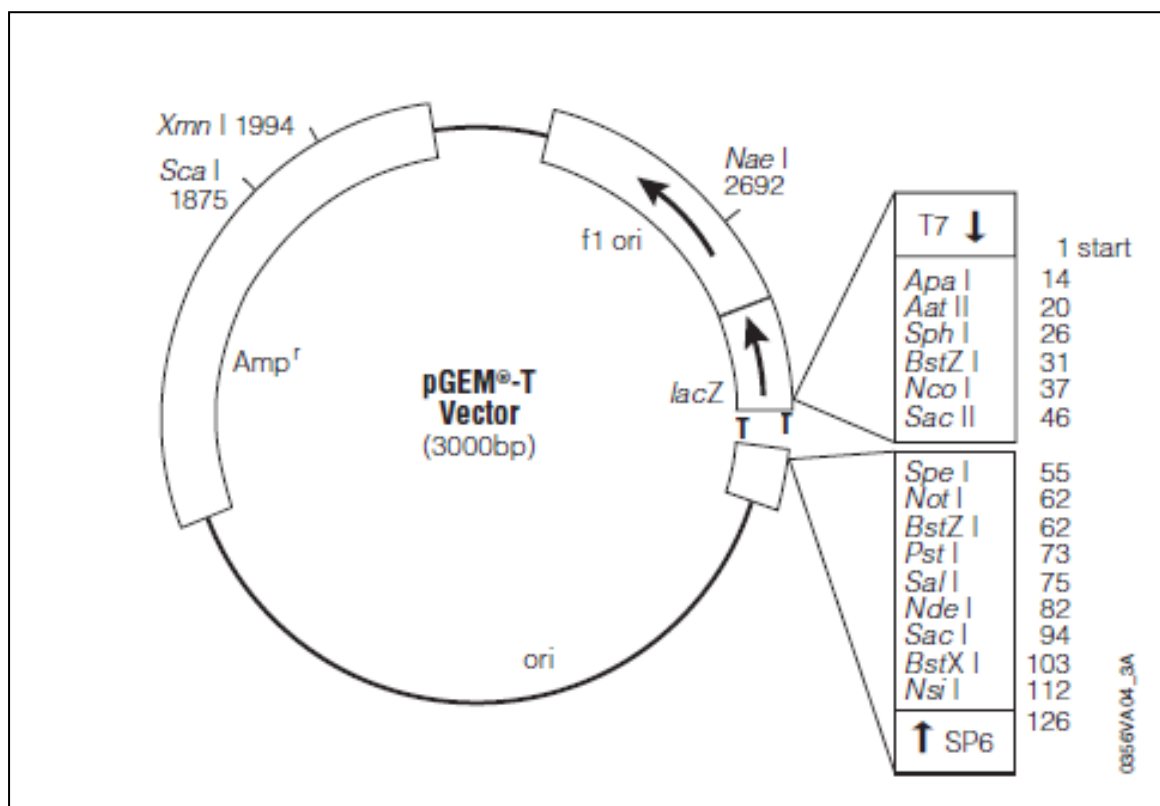


Lambda EcoRI /
HindIII

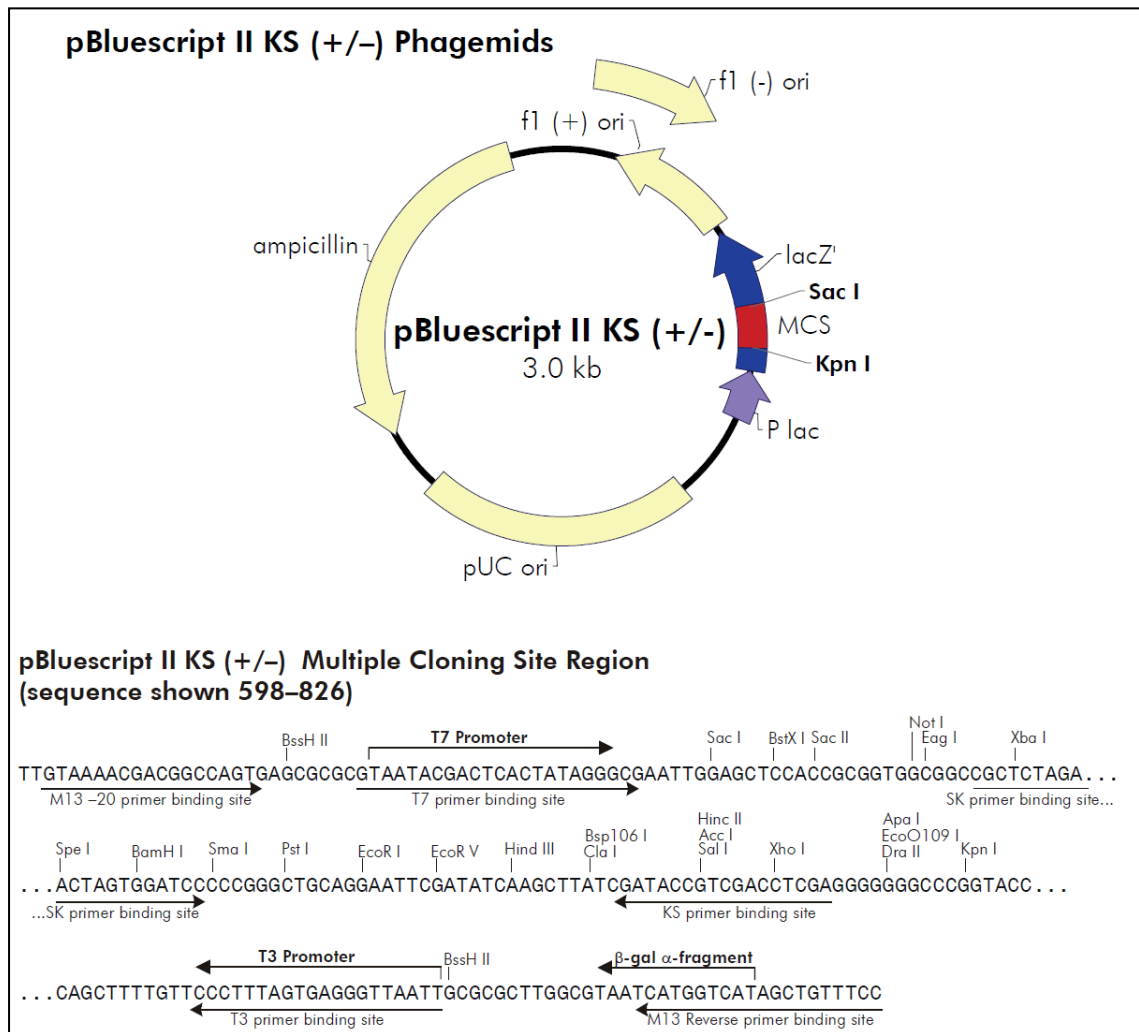


Lambda BstEII

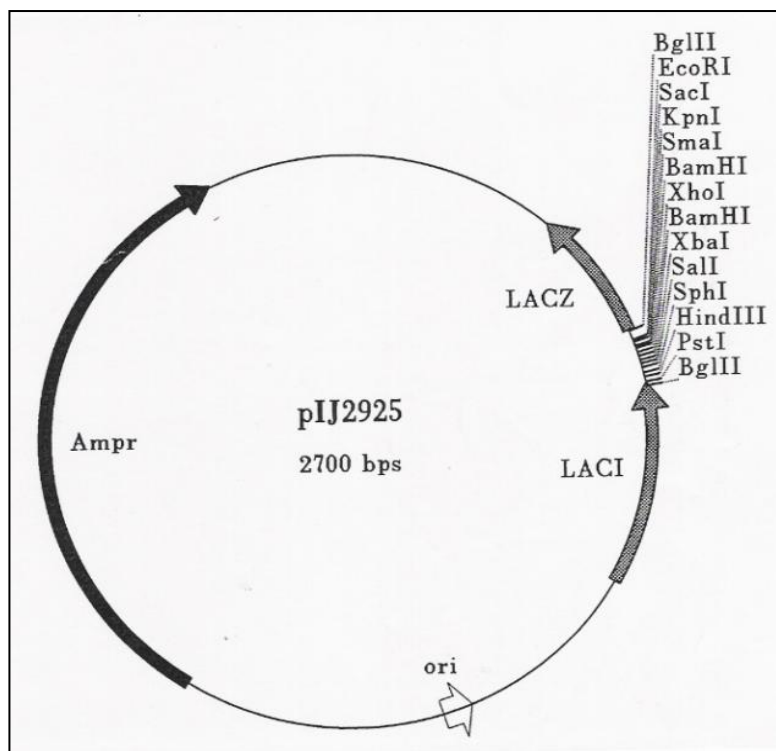


Anexo 2. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM-T (Promega).

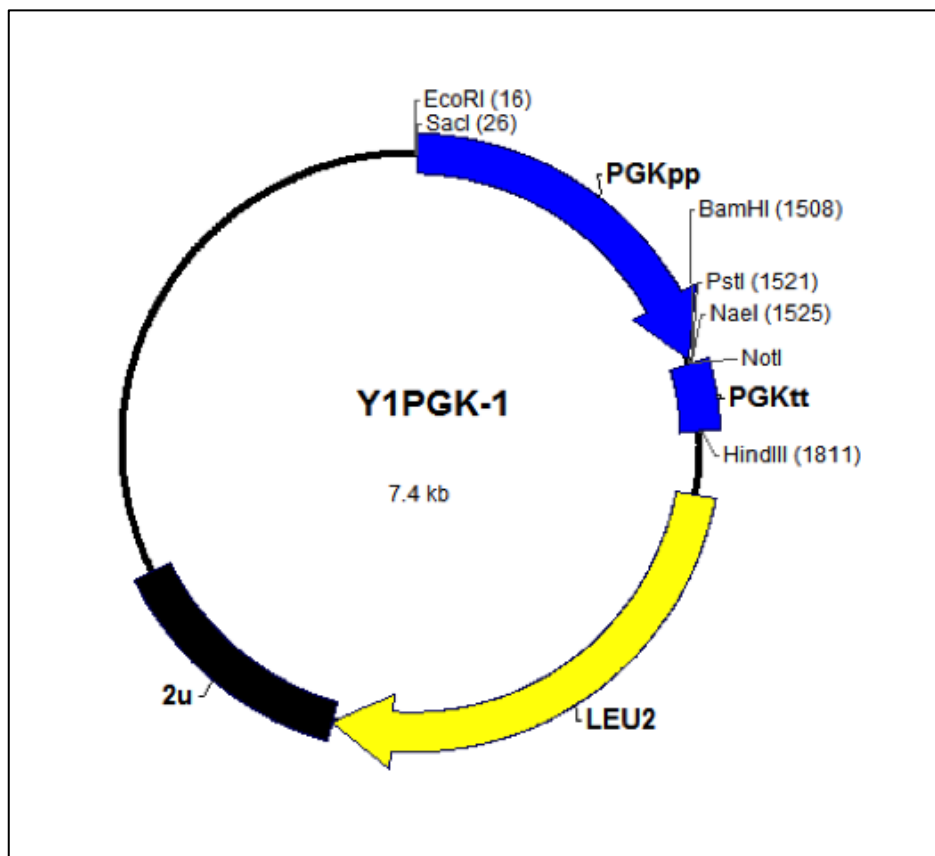
Anexo 3. Representação esquemática do mapa físico do vetor pBluescript II KS (Stratagene).

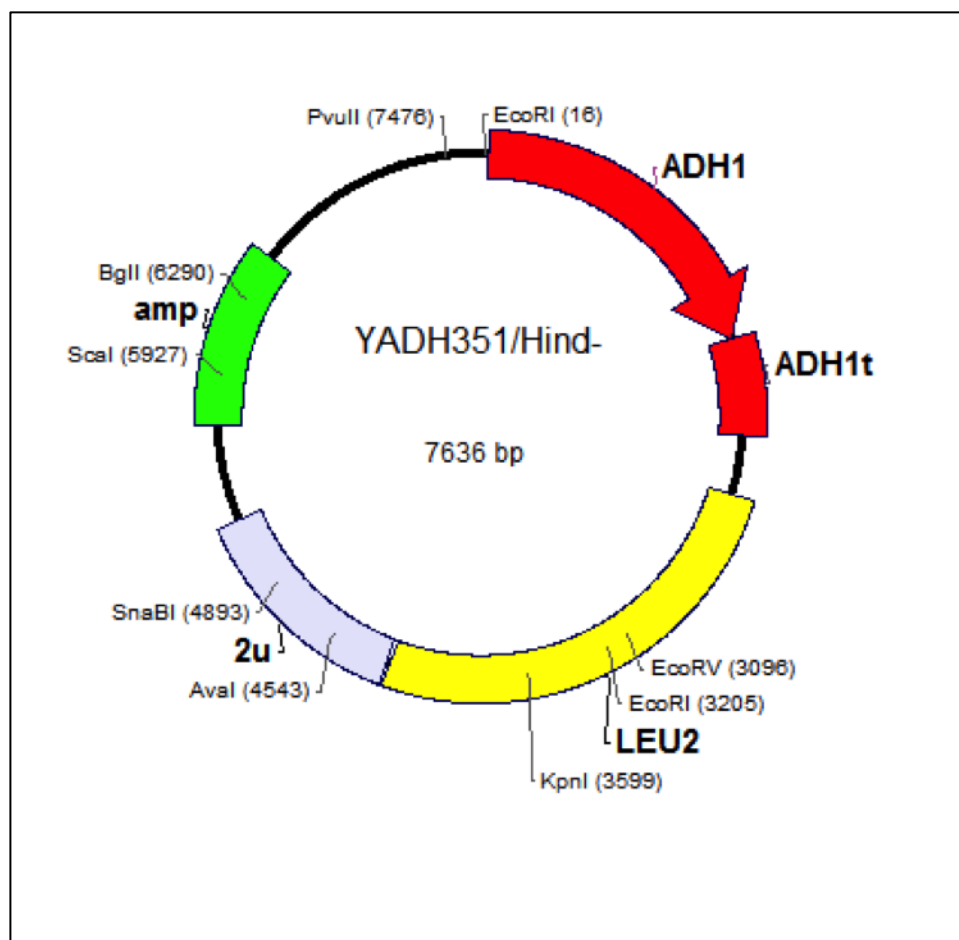


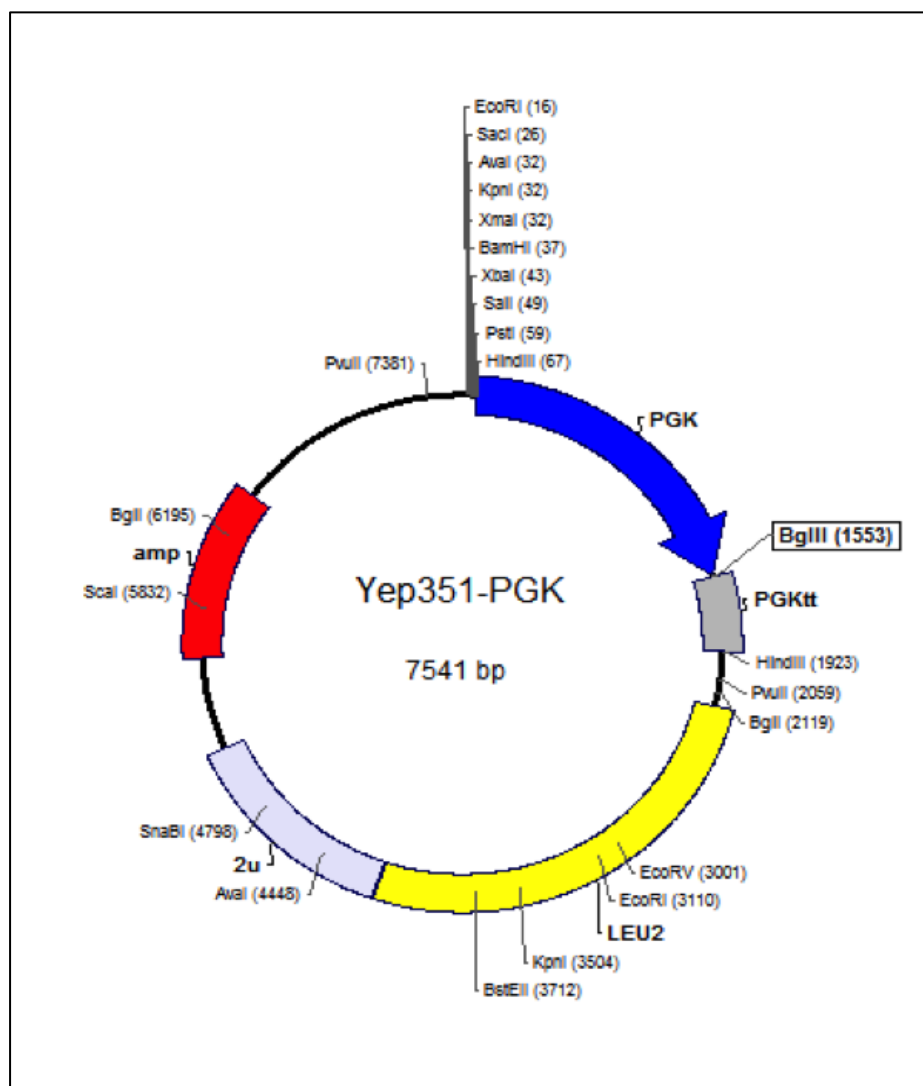
Anexo 4. Representação esquemática do mapa físico do vetor pIJ2925.



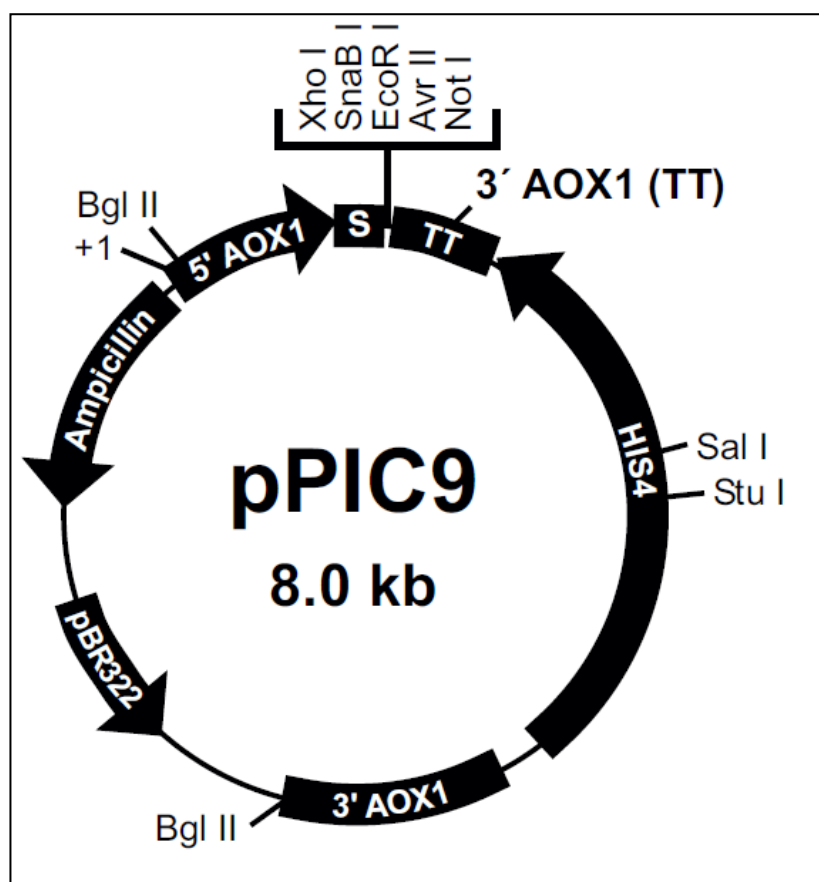
Anexo 5. Representação esquemática do mapa físico do vetor Y1PGK1.



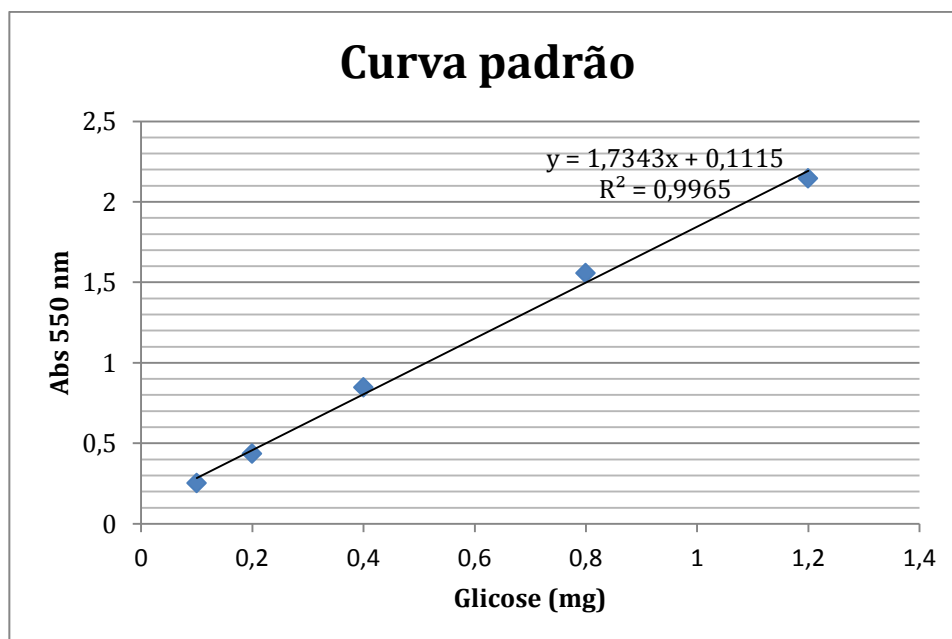
Anexo 6. Representação esquemática do mapa físico do vetor YADH-Hind-.

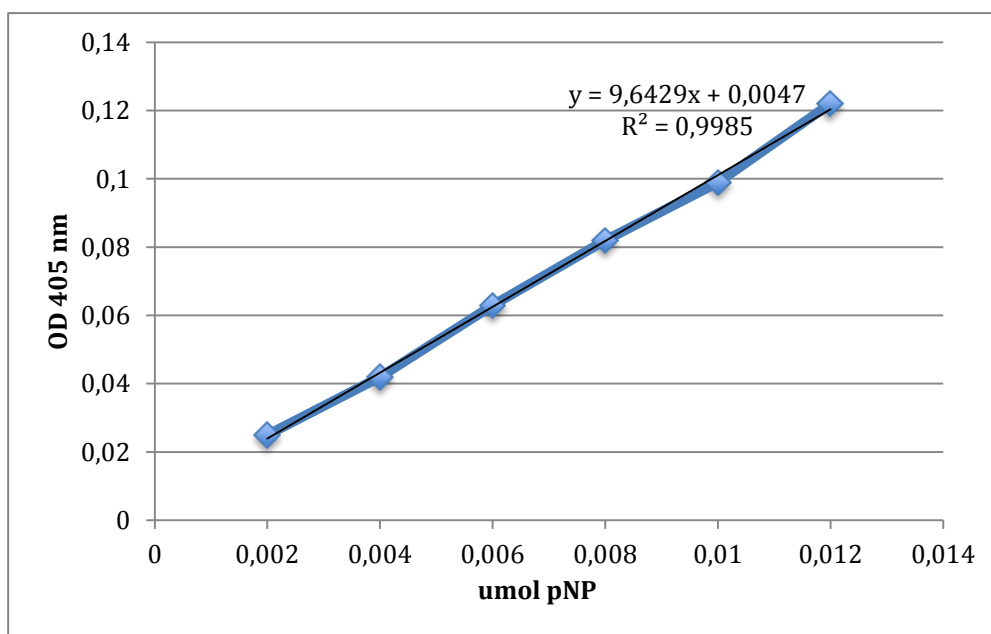
Anexo 7. Representação esquemática do mapa físico do vetor Yep351PGK.

Anexo 8. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9 (Invitrogen).



Anexo 9. Curva padrão de glicose.



Anexo 10. Curva padrão de pNP.

Anexo 10. Aritgo científico publicado.