



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

FERNANDA PINHEIRO DOS SANTOS

**EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE MONOXIGENASES
BACTERIANAS EM *KOMAGATAELLA PHAFII* (*PICHIA
PASTORIS*) PARA UTILIZAÇÃO COMO ENZIMAS ACESSÓRIAS
PARA DESCONSTRUÇÃO DE BIOMASSA**

**GURUPI - TO
2017**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

FERNANDA PINHEIRO DOS SANTOS

**EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE MONOXIGENASES
BACTERIANAS EM *KOMAGATAELLA PHAFII* (*PICHIA
PASTORIS*) PARA UTILIZAÇÃO COMO ENZIMAS ACESSÓRIAS
PARA DESCONSTRUÇÃO DE BIOMASSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Co-orientadora: Dra. Thaís Fabiana Chan Salum

**GURUPI - TO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S237e Santos, Fernanda Pinheiro dos .
EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE MONOXIGENASES BACTERIANAS
EM KOMAGATAELLA PHAFII (PICHIA PASTORIS) PARA UTILIZAÇÃO
COMO ENZIMAS ACESSÓRIAS PARA DESCONSTRUÇÃO DE
BIOMASSA. / Fernanda Pinheiro dos Santos. – Gurupi, TO, 2017.

67 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Biotecnologia, 2017.

Orientador: Dr. Bruno Dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Coorientadora : Dra. Thais Fabiana Chan Salum

1. Komagataella phaffii. 2. Thermobifida fusca. 3. Monoxigenases de
polissacarídeos líticas. 4. Proteína heteróloga. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



Ata de Defesa nº 28/2017

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FERNANDA PINHEIRO DOS SANTOS DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 26 dias do mês de abril do ano de 2017, às 09 horas, no Auditório Macaúba, edifício EMBRAPA Agroenergia, Brasília – DF, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. BRUNO DOS SANTOS ALVES FIGUEIREDO BRASIL da Embrapa Agroenergia, Prof.ª. Dr.ª. Co-Orientadora THAÍS FABIANA CHAN SALUM da Embrapa Agroenergia, Dr.ª. KELLY BARRETO RODRIGUES da Embrapa Agroenergia, Prof. Dr. JOÃO RICARDO MOREIRA DE ALMEIDA da Embrapa Agroenergia e Prof. Dr. FELIX GONÇALVES DE SIQUEIRA da Embrapa Agroenergia, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder à arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FERNANDA PINHEIRO DOS SANTOS, intitulada "**Expressão e produção de monoxigenases bacterianas em *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) para utilização como enzimas acessórias para desconstrução de biomassa**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil
Embrapa Agroenergia / Universidade Federal do Tocantins
Orientador

Prof.ª. Dr.ª. Thaís Fabiana Chan Salum
Embrapa Agroenergia
Co-Orientadora

Prof.ª. Dr.ª. Kelly Barreto Rodrigues
Embrapa Agroenergia
1ª Examinadora

Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida
Embrapa Agroenergia
2º Examinador

Prof. Dr. Felix Gonçalves de Siqueira
Embrapa Agroenergia / Universidade Federal do Tocantins
3º Examinador (Suplente)

Brasília, 26 de abril de 2017.

Prof. Dr. Gessiel Newton Scheldt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

A Deus pelo presente maravilhoso que é a minha vida. Pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho. Pessoas que me inspiraram, me ajudaram, me desafiaram e me encorajaram a ser cada dia melhor.

À minha família, pela compreensão, companheirismo, paciência e amor. Pai, seu exemplo de caráter e honestidade me fazem ser hoje quem eu sou. Mãe, minha princesa, que com carinho me ensinou ser forte e humilde e não desistir jamais. Mana, obrigada por me incentivar a ser cada dia melhor. Minhas vitórias, são nossas vitórias.

Ao meu avô, Ônorio (*in memoriam*), pelas orações a favor de minhas conquistas.

Ao meu amigo e colega Rodrigo, pela honrosa indicação.

Ao Márcio, Renan e todos os colegas de laboratório pela ajuda durante a realização deste trabalho e pelo bom convívio diário.

Às analistas do LPB (Laboratório de Processos Bioquímicos) Thályta e Thais Demarchi, por sempre estarem à disposição e demonstrarem boa vontade em ajudar.

Às amigas que encontrei no caminho desse percurso, Jéssica, Valquíria, Tallyta, Taís, Gleiciane e Patrícia, sem vocês esse trajeto seria bem mais difícil.

Ao prof. Dr. Félix Gonçalves Siqueira por me dar o primeiro voto de confiança para um maior aprendizado.

À Dra. Léia, pela oportunidade de trabalhar em um projeto tão inovador e por suas dicas essenciais.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil e Dra. Thaís F. Chan Salum por serem exemplos de profissionais e me orientarem tão sabiamente.

À pós-doc Kelly, por compartilhar comigo seus conhecimentos.

À Embrapa, pelo auxílio financeiro durante o mestrado e disponibilização de espaço para o desenvolvimento do trabalho.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

A descoberta das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs), que agem em sinergismo com outras enzimas na desconstrução da celulose, gerou um grande interesse da comunidade científica por seu potencial de aplicação na produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos. A busca por essas proteínas auxiliares em microrganismos surgiu como uma estratégia promissora, pois há grande diversidade de isoformas e disponibilidade de sequências genômicas dessas proteínas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo expressar LPMOs recombinantes de origem bacteriana em levedura *Komagataella phaffii*. Foram obtidos clones de *K. phaffii* transformados com 6 genes selecionados a partir de banco de dados. Análises da cinética de expressão proteica por técnica de *western blot* indicaram secreção apenas da LPMO de 25 kDa codificada pelo gene de *Thermobifida fusca* YX. Ensaio de produção da LPMO de *T. fusca* foram realizados em biorreator de 1L e Erlenmeyers de 250 mL e 1000 mL. Nos ensaios em Erlenmeyers houve a detecção da proteína, confirmada por SDS-PAGE e *western blot*, acompanhado de um alto crescimento microbiano. No ensaio em biorreator não houve detecção da proteína de interesse e o crescimento microbiano foi baixo. Com a confirmação da expressão da LPMO nos ensaios em Erlenmeyers, estes foram parcialmente purificados e avaliados por gel de proteínas e *western blot*. Os resultados obtidos mostram que o sistema de expressão de *K. phaffii* foi eficiente, expressando a LPMO de *T. fusca*.

Palavras-chave: *Komagataella phaffii*; *Thermobifida fusca*; monoxigenases de polissacarídeos líticas; proteína heteróloga.

ABSTRACT

The discovery of copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenase (LPMOs), auxiliary proteins which act in synergy with other enzymes on the cellulose degradation, generated a great interest from the scientific community due to their potential application in biofuels production from lignocellulosic residues. The search for these auxiliary proteins in microorganisms has emerged as a promising strategy because there is a great diversity of isoforms and availability of genomic sequences. Thus, the present work aimed to express bacterial LPMOs in *Komagataella phaffii*. Clones of *K. phaffii* transformed with 6 genes selected from database were obtained. Analysis of protein expression kinetics by *western blot* technique showed accumulation only of the LPMO of 25 kDa coded by the gene from *Thermobifida fusca* YX. Production of LPMO from *T. fusca* was tested in 1 L bioreactor and 250 mL and 1000 mL Erlenmeyer flasks. In Erlenmeyer flasks experiments, there was protein detection, confirmed by SDS-PAGE and *western blot*, and a high microbial growth. In the bioreactor assay, there was no target protein detection, and microbial growth was low. After confirmation of LPMO expression in Erlenmeyer flasks assays, protein were partially purified and confirmed by protein gel and *western blot*. Results obtained showed that the expression system of *K. phaffii* was effective, expressing the LPMO from *T. fusca*.

Key words: *Komagataella phaffii*; *Thermobifida fusca*; lytic polysaccharide monooxygenases; heterologous protein.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	A biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de produtos químicos, bioenergia e biocombustíveis	16
3.2	Estrutura da biomassa lignocelulósica	17
3.3	Processo de desconstrução da biomassa lignocelulósica	18
3.4	Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica	20
3.5	Expressão heteróloga em <i>Komagataella phafii</i>	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Seleção de sequências codificadoras para monoxigenases de polissacarídeos bacterianas a partir de bancos de dados	26
4.2	Estratégia de clonagem	26
4.3	Transformação dos plasmídeos contendo os genes das LPMOs bacterianas em <i>Escherichia coli</i>	27
4.3.1	Preparo de células de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetentes	27
4.3.2	Transformação de <i>Escherichia coli</i> por eletroporação	29
4.3.3	Extração de DNA plasmidial	29
4.3.4	Digestão de DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	30
4.4	Transformação dos plasmídeos contendo os genes das LPMOs bacterianas em <i>Komagataella phafii</i>	30
4.4.1	Preparação do DNA plasmidial para transformação de <i>Komagataella phafii</i> por eletroporação	30
4.4.2	Preparação de células de <i>Komagataella phafii</i> eletrocompetentes	31
4.4.3	Transformação de <i>Komagataella phafii</i> por eletroporação	32
4.4.4	Isolamento do DNA genômico de <i>Komagataella phafii</i>	32
4.4.5	Confirmação da inserção das construções gênicas no genoma de <i>Komagataella phafii</i> 33	
4.5	Expressão de LPMOs bacterianas em <i>Komagataella phafii</i>	34
4.5.1	Indução por metanol dos clones transformados de <i>Komagataella phafii</i>	34
4.5.2	Análise da expressão das proteínas recombinantes em <i>Komagataella phafii</i> por SDS-PAGE e <i>western blot</i>	34

4.6	Purificação da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i> YX recombinante produzida em <i>Komagataella phaffii</i>	36
4.7	Produção da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i> YX recombinante em biorreator e em Erlenmeyers	37
4.8	Metodologias de análise.....	38
4.8.1	Crescimento microbiano e pH	38
4.8.2	Viabilidade celular	38
4.8.3	Quantificação de proteínas.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
5.1	Expressão de LPMOs bacterianas recombinantes em <i>Komagataella phaffii</i> ...	40
5.2	Análise da expressão da LPMO	43
5.3	Purificação da enzima LPMO de <i>T. fusca</i> (F1)	45
5.4	Produção da LPMO de <i>T. fusca</i> (F1)	46
5.4.1	Análise da expressão da LPMO produzida e purificada.....	49
6	CONCLUSÕES.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8	ANEXO.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e respectivos volumes para a preparação do gel desnaturante de poliacrilamida 12%.....	355
Tabela 2 - Viabilidade celular de LPMO de <i>Thermobifida fusca</i> , no início (0 h) e final (120 h) da produção em biorreator de 1 L (volume de trabalho: 300 mL), Erlenmeyer de 250 mL (volume de trabalho: 50 mL) e Erlenmeyer de 1000 mL (volume de trabalho: 200 mL).	47
Tabela 3 - Microrganismos capazes de produzir LPMOs recombinantes e suas respectivas condições de crescimento e indução.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da estrutura da matéria lignocelulósica.....	17
Figura 2- Afrouxamento da estrutura da biomassa lignocelulósica causada pelo pré-tratamento.....	19
Figura 3- Ilustração esquemática da ação sinérgica dos diferentes grupos de enzimas na degradação enzimática da celulose.....	22
Figura 4 – Mapa do veto pPICZ α A para expressão em <i>K. phaffii</i>	277
Figura 5 - Extração de DNA plasmidial (Mini prep) dos genes de origem bacteriana e o padrão de DNA plasmidial digerido com as enzimas de restrição <i>Eco</i> RI e <i>Xba</i> I.	41
Figura 6 - Plasmídeos digeridos (linearizados) e íntegros (circulares), respectivamente.	42
Figura 7 - Avaliação por PCR da integração dos genes de interesse no genoma de <i>K. phaffii</i>	433
Figura 8 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i>	455
Figura 9 - SDS-PAGE e imunomarcção da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i> purificada.	466
Figura 10 – Crescimento da levedura produtora da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i> em biorreator de 1 L (volume de trabalho: 300 mL), Erlenmeyer de 250 mL (volume de trabalho: 50 mL) e Erlenmeyer de 1000 mL (volume de trabalho: 200 mL).	48
Figura 11 - Concentração de proteínas totais em cada tempo (0, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 horas) da produção da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i> inserida em <i>K. phaffii</i> em biorreator de 1 L (Azul), Erlenmeyer de 250 mL (Laranja) e Erlenmeyer de 1000 mL (Cinza).	499
Figura 12 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol em biorreator de 1L da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i>	50
Figura 13 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol em Erlenmeyer de 250 mL da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i>	50
Figura 14 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol em Erlenmeyer de 1000 mL da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i>	51
Figura 15 - SDS-PAGE e imunomarcção da LPMO de <i>Thermobifida fusca</i> purificada.	52

1 INTRODUÇÃO

No início do século XX os combustíveis fósseis como carvão mineral, gás natural e petróleo passaram a ser as principais fontes para geração de energia e produção de produtos químicos. No entanto, sabe-se que a queima destes combustíveis gera altos índices de poluição atmosférica e que a utilização de fontes fósseis não é sustentável. Diante disso surgiu o interesse em pesquisas destinadas a desenvolver tecnologias renováveis para substituir as fontes fósseis de carbono. E uma dessas tecnologias é a conversão da biomassa em combustíveis e produtos químicos dentro do contexto de biorrefinaria integrada (BRANDT *et al.*, 2013).

A produção de energia renovável derivada de biomassa é uma alternativa para reduzir o uso intensivo de combustíveis fósseis, diversificar e garantir o suprimento de energia no futuro. No entanto um dos grandes desafios está na desconstrução da biomassa lignocelulósica de forma a aproveitar eficientemente todos os componentes da parede celular vegetal (DING *et al.*, 2012).

A desconstrução da parede celular vegetal inclui basicamente dois passos: o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para aumentar a digestibilidade enzimática ou microbiana de componentes polissacarídicos; e a hidrólise de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis (GALBE *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2002).

No entanto um dos fatores limitantes para etapa de hidrólise enzimática é a recalcitrância da celulose, que impõe a necessidade da adição de elevada carga de enzimas hidrolíticas (LEE *et al.*, 2008). Esta propriedade das matérias-primas vegetais é em grande parte responsável pelo alto custo da conversão de lignocelulose (HIMMEL *et al.*, 2007). Portanto, novas enzimas que tornem a sacarificação mais eficiente e menos onerosa têm sido buscadas.

A descoberta das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs) expandiu o conhecimento sobre a degradação enzimática da celulose. Atualmente é aceito que esta degradação inclui tanto componentes com ação hidrolítica como oxidativa (LEVASSEUR *et al.*, 2013). As monoxigenases de polissacarídeos líticas são consideradas como um dos grupos enzimáticos mais promissores no campo da bioconversão de substratos lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis e produtos químicos, devido ao seu mecanismo único de ação (MURALEEDHARAN *et*

al., 2016). Usadas em combinação com enzimas hidrolíticas, as LPMOs contribuem significativamente para a eficiência da despolimerização enzimática da biomassa (EIBINGER *et al.*, 2014).

Na produção de proteínas recombinantes, os sistemas de expressão mais utilizados são baseados em culturas de bactérias, fungos leveduriformes e células de mamíferos (DEMAIN *et al.*, 2009). O sistema de expressão de enzimas heterólogas baseado em leveduras destaca-se devido ao amplo conhecimento genético e ferramentas moleculares disponíveis para estes organismos, sua rápida multiplicação, capacidade de realizar modificações pós-traducionais e secretar proteínas para o meio extracelular.

A levedura metilotrófica *Komagataella phaffii* (anteriormente denominada *Picchia pastoris*) atualmente é um organismo usual para a geração de proteína recombinante (CREGG *et al.*, 2000). A crescente popularidade deste sistema de expressão pode ser atribuída a vários fatores, dentre eles: a simplicidade das técnicas necessárias para a manipulação genética molecular de *K. phaffii* e sua semelhança com os de *Saccharomyces cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados da biologia moderna; sua forte preferência para o crescimento aeróbico, um traço fisiológico chave que facilita a sua cultura em densidades celulares elevadas e a simples purificação da proteína recombinante, devido aos níveis relativamente baixos de proteínas nativas secretadas (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

Neste contexto, o sistema de expressão utilizando a levedura *K. phaffii*, aplicado neste trabalho tem por objetivo a expressão e secreção de LPMOs de origem bacteriana, para utilização como enzimas acessórias na desconstrução de biomassa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs) de origem bacteriana utilizando o sistema de expressão heteróloga em *Komagataella phaffii*, para utilização como enzimas acessórias na desconstrução de biomassa.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar e sintetizar genes codificadores para LPMOs de origem bacteriana;
- Clonar e expressar genes codificadores para LPMOs de origem bacteriana em *K. phaffii*;
- Produzir e purificar a LPMO expressa heterologamente em *K. phaffii*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de produtos químicos, bioenergia e biocombustíveis

Com a crescente demanda por energia, a volatilidade no preço do petróleo e as mudanças climáticas significativas pelo uso de combustíveis fósseis, nota-se a necessidade de uma busca por alternativas limpas e fontes de energias sustentáveis, como a energia solar, energia hidroelétrica, energia eólica e as bioenergias (CHU *et al.*, 2012).

Neste contexto a biomassa é uma matéria-prima versátil que pode ser usada para produzir calor, energia, combustíveis e bioprodutos. Quando produzida e usada de forma sustentável, é uma transportadora de carbono neutro e pode contribuir amplamente para a redução das emissões de gases de efeito estufa. Além disso, a maioria dos países têm recursos de biomassa disponíveis, ou pode desenvolver tal recurso, fazendo com que a biomassa seja uma opção de fornecimento de energia mais equilibrada em todo o mundo (IEA, 2007).

O Brasil possui uma posição de destaque para o aproveitamento integral das biomassas pelo fato de apresentar grande potencial de cultivo de matérias-primas renováveis, dispondo de vantagens tais como: intensa radiação solar; culturas agrícolas de grande extensão; água em abundância; diversidade de clima e pioneirismo na produção de biocombustível proveniente de biomassa (CGEE, 2010).

Por ser um país com uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, o Brasil possui uma abundância de matérias-primas lignocelulósicas para produção de bioenergia, biocombustíveis e produtos químicos. Dentre estes resíduos destacam-se os derivados das indústrias de papel e celulose (sepiho e pinus), serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana) e, de um modo geral, unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas como a palha de cereais e de milho, cascas de arroz e de aveia, sabugo de milho, dentre outros (RAMOS, 2000).

Segundo Tuck e colaboradores (2012), são gerados anualmente 2×10^{11} toneladas de resíduos lignocelulósicos no mundo, oriundos principalmente de cascas de arroz e bagaço de cana de açúcar, com volumes anuais de 120 e 220 toneladas métricas (Mt),

respectivamente. Um destino apropriado para esses resíduos seria a produção de combustíveis renováveis, produtos químicos e energia, mitigando desta forma uma série de problemas relacionados à emissão de gases causadores do aquecimento global e o acúmulo desses resíduos no meio ambiente (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010).

3.2 Estrutura da biomassa lignocelulósica

Todos os materiais de origem vegetal são compostos majoritariamente por três unidades principais: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), numa proporção geral de 40-50%, 20-30% e 10-25%, respectivamente (KERRISON *et al.*, 2015). Essas três unidades são responsáveis por formar a parede celular das plantas, e sua proporção na biomassa vegetal muda de acordo com o tipo de planta, parte do vegetal e condições climáticas durante o seu crescimento. Células que formam os tecidos dos troncos e raízes dos vegetais tendem a ser mais grossas, apresentando maior teor de lignina na sua constituição, enquanto as células das folhas contém paredes celulares mais finas, com menor concentração de lignina (HASUNUMA *et al.*, 2012).

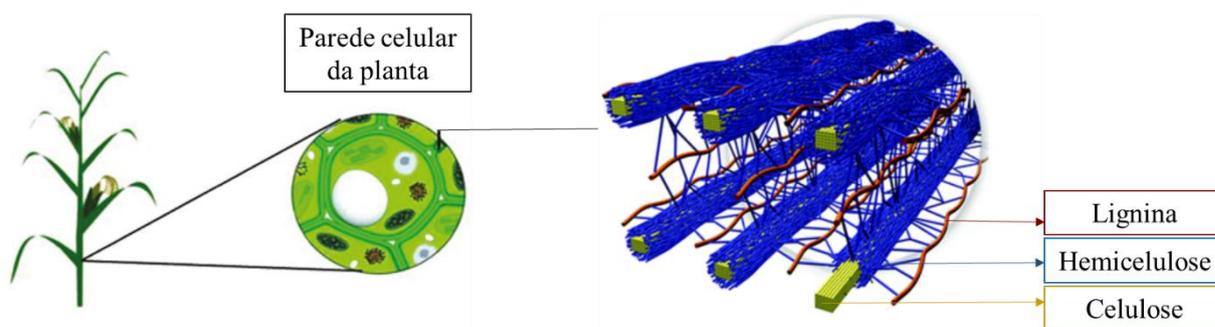


Figura 1- Representação esquemática da estrutura da matéria lignocelulósica (Adaptado de VOLYNETS *et al.*, 2016).

A celulose, considerado o biopolímero mais abundante na terra, corresponde à maior parte da parede celular vegetal, e é a unidade encarregada do sustento e estrutura das plantas (GAO *et al.*, 2015). Possui uma estrutura cristalina formada por longas cadeias de microfibrilas insolúveis e lineares, composta por moléculas de glicose unidas por ligações $\beta(1,4)$. Essa estrutura confere a esta cadeia uma forma longa, fina e relativamente

inflexível, atribuindo rigidez e dificultando a ação de enzimas nas regiões cristalinas (KIM *et al.*, 2013).

A hemicelulose é o segundo biopolímero mais abundante nas biomassas vegetais, mas, diferentemente da celulose, não apresenta uma composição bioquímica homogênea. A composição da cadeia principal da hemicelulose depende da origem da matéria-prima; biomassas provenientes de cana-de-açúcar, palhas e capins são formadas principalmente por cadeias de xilanas, arabinanas e galactanas unidas por ligações $\beta(1,4)$, apresentando ácido glucurônico como ramificação. Madeiras macias, como cedro e pinho, possuem glucomanana como constituinte da hemicelulose (MICHALSKA *et al.*, 2015). Na estrutura vegetal, a hemicelulose tem função estrutural, assim como a celulose, atuando na formação de ligações-cruzadas entre as cadeias de celulose, ligninas e proteínas da parede celular (KIM *et al.*, 2013).

A lignina, mais complexa unidade formadora da parede celular vegetal, é formada por longas cadeias amorfas de monômeros de fenilpropanoides. Durante o crescimento vegetal, os monômeros de fenolpropanoides são liberados na parede celular em formação, sendo polimerizados após sua imersão na matriz polissacarídica, formando estruturas responsáveis pelo transporte de líquidos, suporte para o crescimento vertical e prevenção contra invasões de patógenos e estresse oxidativo (HASUNUMA *et al.*, 2012).

3.3 Processo de desconstrução da biomassa lignocelulósica

Para que a biomassa lignocelulósica possa ser utilizada como matéria-prima para a produção de produtos químicos e biocombustíveis, é necessário que ocorra a separação dos componentes da parede celular. Nesta separação é imprescindível uma etapa de pré-tratamento, a qual contribui com as outras etapas do processo, promovendo o afrouxamento da estrutura complexa da lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina), tornando a celulose/hemicelulose mais acessíveis à hidrólise enzimática ou química (SOUSA *et al.*, 2009). A figura 2 ilustra o que ocorre na matéria lignocelulósica pela influência do pré-tratamento.

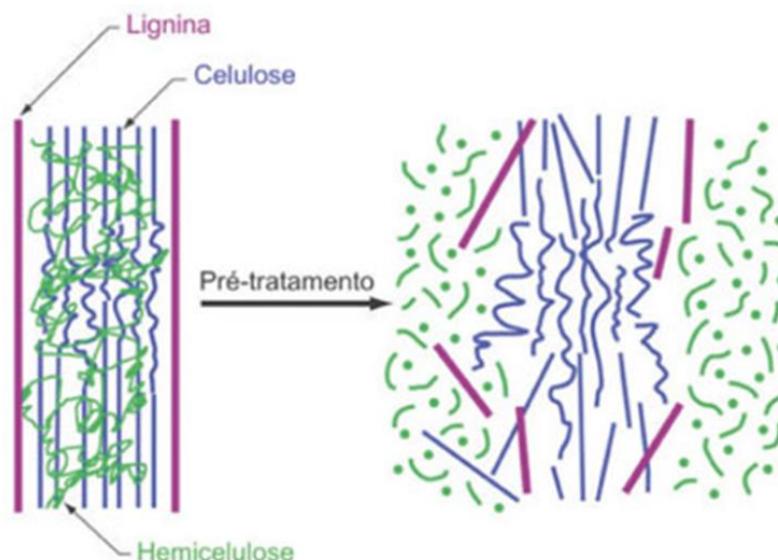


Figura 2- Afrouxamento da estrutura da biomassa lignocelulósica causada pelo pré-tratamento (SANTOS *et al.*, 2012).

Várias tecnologias de pré-tratamento estão disponíveis hoje, as quais podem ser divididas em quatro tipos: físicos (moagem); físico-químicos (explosão a vapor, explosão de fibra de amônia - AFEX); químicos (hidrólise ácida; hidrólise alcalina, ozonólise, organosolv) e biológicos (microbianos ou enzimáticos). A escolha do tipo de pré-tratamento utilizado dependerá, basicamente, da natureza do material a ser tratado, bem como da finalidade do uso do hidrolisado (SUN *et al.*, 2002).

Após o pré-tratamento, a biomassa segue para a etapa de hidrólise, que consiste na transformação da celulose e hemicelulose em monômeros de açúcares, por meio de via ácida ou enzimática (AGUILAR *et al.*, 2002).

O processo de hidrólise ácida emprega geralmente ácido sulfúrico e ácido clorídrico em concentrações de 1-10% usando uma temperatura na faixa de 100 - 150°C, para hidrolisar as cadeias de celulose e hemicelulose (BALAT *et al.*, 2008). Já o processo de hidrólise enzimática utiliza um grupo de enzimas chamadas celulases, as quais operam em condições de pH de 4 a 5 e temperatura na faixa de 40 a 60°C (CASTRO *et al.*, 2010). No entanto, a hidrólise ácida vem sendo abandonada em substituição à hidrólise enzimática, pois o processo com ácidos minerais necessita da utilização de reatores altamente resistentes à corrosão e correção do pH para a etapa de fermentação (SOARES *et al.*, 2011).

Neste contexto, sabe-se que a hidrólise enzimática é uma das etapas mais onerosas no processo de desconstrução da parede celular vegetal, devido ao alto preço dos coquetéis enzimáticos (BANSAL *et al.*, 2009). E por esse motivo há esforços constantes

em pesquisas que visam o aumento da eficiência do processo de hidrólise e a redução dos custos de produção de enzimas, para obtenção de um produto final economicamente viável (SUN *et al.*, 2002).

Após a hidrólise da celulose/hemicelulose, os açúcares obtidos nesta etapa podem ser convertidos quimicamente ou enzimaticamente em vários outros produtos, como etanol, ácidos orgânicos, enzimas, entre outros (PEREIRA *et al.*, 2008).

Já a lignina, dependendo do tipo de pré-tratamento, pode ser usada para gerar calor e energia para plantas industriais. A lignina pode ainda ser transformada para obter produtos de alto valor agregado, tais como: fibras de carbono, emulsionantes, dispersantes, sequestrantes, surfactantes, aglutinantes e aromáticos (LIGNIN INSTITUTE, 2006).

3.4 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Com a finalidade de hidrolisar a biomassa celulósica são utilizados coquetéis enzimáticos. Esses são compostos por diversas enzimas lignocelulolíticas. São elas: Celobio-hidrolases, celodextrinases e β -glicosidases (atuam na despolimerização da celulose); Endoxilanases e β -1,4-xilosidases (atuam na despolimerização da hemicelulose); Lacases e maganês peroxidases (atuam na despolimerização da lignina) (WESTERENG *et al.*, 2013; PARISUTHAM *et al.*, 2014). A atuação desses coquetéis ocorre em um sinergismo idealizado, onde a ação conjunta dessas enzimas visa evitar a formação de compostos inibidores para as demais, otimizando assim a quantidade de açúcares monoméricos obtidos ao final do processo (WESTERENG *et al.*, 2013).

De modo a tornar o processo de conversão enzimática ainda mais eficiente também vêm sendo utilizadas enzimas auxiliares, ou proteínas não-hidrolíticas, as quais atuam afrouxando a molécula de celulose (ARANTES *et al.*, 2010).

Entre as proteínas não hidrolíticas conhecidas por atuarem no afrouxamento de microfibrilas da celulose estão: as celobiose desidrogenases (CDH); os módulos de ligação a carboidratos (CBMs); as expansinas; e as monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs) (FÁVARO *et al.*, 2013).

Celobiose desidrogenase (CDH) é uma enzima extracelular produzida por vários fungos degradantes da madeira (HENRIKSSON *et al.*, 2000). Sua atividade foi descoberta há quase 45 anos por Ulla Westermark e Karl-Erik Eriksson em dois fungos

da podridão branca: *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* (WESTERMARK *et al.*, 1974). Possui atividade oxidativa, oxidando vários açúcares como celobiose, lactose e oligômeros de glicose (SAHA *et al.*, 2008). Os elétrons desta reação de oxidação são transferidos a aceptores de elétrons, como quinonas, citocromos, radicais orgânicos, O₂ molecular, íons Fe⁺³ e Cu⁺² (HENRIKSSON *et al.*, 2000).

Módulo de ligação a carboidrato (CBM) é definido como uma sequência de aminoácidos contida dentro de uma enzima com um discreto dobramento, o qual possui atividade de ligação a carboidrato (SHOSEYOV *et al.*, 2006). Primeiramente foram classificados como domínios de ligação à celulose (CBDs), devido aos primeiros exemplos dessas proteínas terem sido encontrados ligados à celulose cristalina. Mais tarde devido a descoberta de módulos que se ligavam também a outros carboidratos, foram reclassificados com uma terminologia mais abrangente, no caso, módulos de ligação aos carboidratos, para refletir a diversidade das possíveis ligações (PINHEIRO, 2009). Suas principais funções são: concentração da enzima na superfície do substrato/efeito de proximidade, seletividade pelo substrato e rompimento de substratos cristalinos via ação não-hidrolítica (NOTENBOOM *et al.*, 2001).

As expansinas foram descobertas primeiramente em plantas, mas ocorrem também em amebas, mexilhões, fungos e bactérias (KIM *et al.*, 2014), e atuam afrouxando as paredes celulares, permitindo assim o crescimento vegetal sem que haja o rompimento da parede celular (ANDBERG *et al.*, 2015). A atividade das expansinas foi caracterizada pela primeira vez por McQueen-Mason e colaboradores (1992). Estudos comprovaram a relação direta da superexpressão de expansinas no crescimento e desenvolvimento de plantas e no amadurecimento de frutos, visto a influência desta no desenvolvimento e rompimento das ligações não-covalentes entre as microfibrilas de celulose (HUANG *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2003; SAMPEDRO *et al.*, 2005).

Anteriormente classificadas como GH61 e CBM33 no banco de dados CAZy, as LPMOs são enzimas que realizam a clivagem oxidativa de celulose, hemicelulose, amido e quitina, atuando de forma sinérgica com celulasas e outras hidrolases (QUINLAN *et al.*, 2011). A figura 3 mostra a ação sinérgica dos diferentes grupos de enzimas na degradação enzimática da celulose.

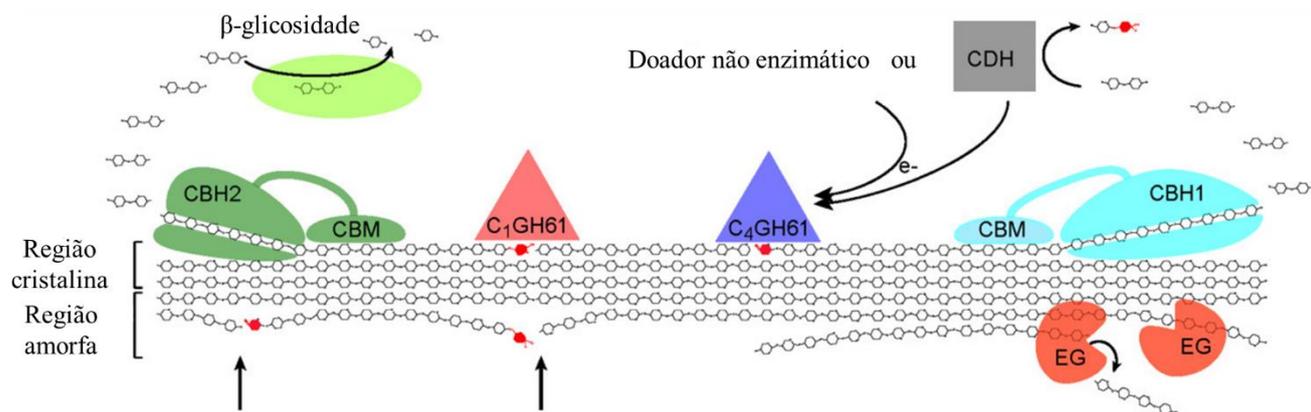


Figura 3- Ilustração esquemática da ação sinérgica dos diferentes grupos de enzimas na degradação enzimática da celulose. EG (endoglucanase); CBH (celobio-hidrolase); CDH (celobiose desidrogenase); CBM (módulo de ligação ao carboidrato); e GH61 (glicosídeo hidrolase 61). Os pontos de cor vermelha representam os açúcares oxidados e as setas indicam uma possível consequência da ação das GH61 (Adaptado de Horn *et al.*, 2012).

Estudos prévios apontaram que, quando purificadas, as LPMOs não são capazes de efetuar a hidrólise na cadeia celulósica, sendo apenas capazes de aumentar a ação de enzimas celulolíticas por meio do seu mecanismo oxidativo (LANGSTONE *et al.*, 2011; HEMSWORTH *et al.*, 2013). Por esta característica, essa classe de proteínas foi recentemente reclassificada no banco de dados do CAZy como Atividades Auxiliares (AAs) das famílias 9, 10, 11 e 13 (VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2017).

As LPMOs tipo AA9 (classificada anteriormente como GH61) e AA11 são exclusivamente de origem fúngica, ativas em celulose, oligossacarídeos, hemiceluloses, quitina e xilana; as LPMOs AA10 (classificada anteriormente como CBM33) são encontradas em grande parte nos genomas bacterianos e são ativas na quitina e celulose; e AA13 são de origem fúngica e ativas em derivados de amido (WALTON *et al.*, 2016).

O mecanismo de reação das LPMOs ainda não é bem claro (VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2017), mas uma visão compartilhada por vários pesquisadores é o sistema CDH / LPMO, que demonstrou melhorar a degradação da celulose em combinação com celulases em vários estudos (LANGSTONE *et al.*, 2011; PHILLIPS, *et al.*, 2011; HORN *et al.*; 2012). Nessa reação proposta, CDH doa um elétron através do seu domínio de citocromo para o cobre de tipo 2 no sítio ativo da LPMO. Lá, o oxigênio é parcialmente reduzido e ataca o anel de piranose das porções de glicose na posição C-1 ou C-4, desestabilizando assim a ligação glicosídica (LEVASSEUR *et al.*, 2013).

A utilização de LPMOs em sacarificação de biomassa já foi reportada por diversos autores. Langstone e colaboradores (2011) relataram aumento de 30% na conversão

hidrolítica da celulose microcristalina comercial (Avicel) após a adição de LPMO de *T. aurantiacus* (TaGH61A). Phillips e colaboradores (2011) apresentaram resultados semelhantes a estes, analisando também o sinergismo da LPMO de *T. Aurantiacus* com a celobiose desidrogenase (CDH) de *N. crassa*, alcançando um rendimento 2 vezes maior na degradação de celulose comercial (Avicel). Outros estudos destacam a utilização das LPMOs não apenas no aumento da taxa de degradação de celulose, mas também como aceleradores deste processo por meio de dois mecanismos: aumento da frequência de terminais redutores e da descristalização, assim como a diminuição da formação de produtos inibitórios, normalmente gerados nas etapas de pré-tratamento (VERMAAS *et al.*, 2015).

3.5 Expressão heteróloga em *Komagataella phaffii*

Algumas espécies de levedura têm sido hospedeiras industriais para a produção de proteínas recombinantes, porque combinam as vantagens de organismos unicelulares (isto é, facilidade de manipulação genética e rápido crescimento) com a capacidade de realizar modificações pós-traducionais (CELIK *et al.*, 2012).

A primeira levedura rotineiramente utilizada para a expressão de proteínas recombinantes foi *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, ao longo dos últimos 23 anos, *Komagataella phaffii* tornou-se a levedura de escolha porque permite níveis mais elevados de expressão de proteína recombinante do que *S. cerevisiae* (BRONDYK, 2009).

Durante a década de 1960, *K. phaffii* foi avaliada como uma potencial fonte de proteínas para ser utilizada como ração animal (Single cell protein, SCP), por ser capaz de utilizar metanol como única fonte de carbono (WEGNER, 1990; CEREGHINO *et al.*, 2000; KRAINER *et al.*, 2012). Como o metanol pode ser obtido a partir do gás natural metano, de forma relativamente barata, despertou assim o interesse da empresa Phillips Petroleum Company, a qual foi a primeira a desenvolver meios e protocolos para cultivar *K. phaffii* em metanol em cultura contínua a densidades celulares elevadas, com o intuito de gerar fonte de proteína (CEREGHINO *et al.*, 2000; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Infelizmente os aumentos nos custos do gás metano (precursor do metanol) durante os anos 70, devido as crises do petróleo, inviabilizaram a produção de SCP pela levedura *K. phaffii* (CEREGHINO *et al.*, 2000).

Em 1980, com o desenvolvimento de técnicas moleculares para manipular genomas de levedura, despertou novamente o interesse da empresa Phillips Petroleum, que juntamente com a Salk Institute Biotechnology iniciaram um programa de pesquisa para utilizar *K. phaffii* como um hospedeiro de expressão de proteína heteróloga (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

Desde seu desenvolvimento no início de 1970, a levedura metilotrófica *K. phaffii* tornou-se um dos sistemas mais amplamente estudados e utilizados na produção e secreção de proteínas heterólogas por apresentar diversas características vantajosas (CREGG *et al.*, 2000). Destaca-se pela velocidade, facilidade e rentabilidade com que pode ser manipulada e propagada em comparação com os outros sistemas de expressão eucarióticos (GURKAN *et al.*, 2005); possui promotores rigorosamente regulados e eficientes, tais como o do gene da álcool oxidase 1 (AOX1) (GURKAN *et al.*, 2005; CREGG *et al.*, 2009); capacidade de executar complexas modificações pós-traducionais que incluem glicosilação, metilação, acilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (POTVIN *et al.*, 2012); reside no status GRAS (*generally regarded as safe*), portanto não apresenta riscos de toxicidade e patogenicidade (WEINACKER *et al.*, 2013; AHMAD *et al.*, 2014); seu sistema de expressão está disponível na forma de kits pela Invitrogen Corporation (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005); permite cultivos a densidades celulares muito altas, por exemplo, 160 g/L de massa seca das células, em meio de cultura simples e de baixo custo (SPADIUT *et al.*, 2014).

A *K. phaffii* é um sistema de expressão que apresenta promotores indutivos e constitutivos. Dentre os indutivos destacam-se o promotor P_{FDL1} (formaldeído desidrogenase), que é induzido pelo metanol e pela metilamina; P_{AOX1} (álcool oxidase) e P_{DHAS} (dihidroxiacetona sintase), os quais são induzidos pelo metanol. E entre os constitutivos, tem-se o P_{GAP} (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e o P_{GK1} (fosfoglicerato quinase), os quais possibilitam simultaneamente a expressão da proteína recombinante e o crescimento celular em meio contendo metanol, glicose ou glicerol (POTVIN *et al.*, 2012). No entanto o promotor AOX1 tem sido o mais amplamente divulgado e utilizado de todos os promotores disponíveis para *K. phaffii* (CEREGHINO *et al.*, 2000).

No genoma da *Komagataella phaffii* existem dois genes que codificam para proteína álcool oxidase, o gene AOX1 e o AOX2. O gene AOX1 é o responsável pela maior parte da atividade da álcool oxidase na célula, enquanto o mesmo regula 85% da atividade da álcool oxidase, o gene AOX2 regula os 15% restantes. E para que ocorra a

ativação do gene AOX1 é necessário a indução de seu promotor por metanol e a desrepressão pela ausência de outras fontes de carbono, como a glicose (CREGG *et al.*, 2000).

De acordo com a capacidade de metabolizar o metanol, *K. phaffii* pode apresentar três fenótipos. O Mut⁺ (Methanol Utilization +) que possui genes AOX1 e AOX2 intactos, sendo portanto capaz de consumir e crescer em metanol. O Mut^s (Methanol Utilization slow), que possui apenas o gene AOX2 intacto, apresentando desta forma uma reduzida taxa de utilização de metanol e crescimento. E o Mut⁻ (Methanol Utilization -), que é deficiente em ambos os genes AOX, sendo assim inviáveis para o crescimento em metanol (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

O sistema de expressão baseado na levedura *K. phaffii* demonstrou ser um sucesso como ferramenta de produção de proteína recombinante em larga escala (CREGG *et al.*, 2000), sendo que a fermentação pode ser facilmente ampliada para atender a demandas maiores, e parâmetros que influenciam a produtividade e a atividade da proteína, tais como pH, aeração e taxa de alimentação da fonte de carbono, podem ser controlados (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). E por preferir um crescimento aeróbico, a levedura *K. phaffii* não é considerada uma forte fermentadora como *S. cerevisiae*, assim os produtos de fermentação como o etanol e o ácido acético não se acumulam rapidamente, levando, portanto, mais tempo para atingir níveis tóxicos à célula (CELIK *et al.*, 2012).

Outra característica de destaque é a purificação simples de proteínas recombinantes, a qual é possível devido aos níveis relativamente baixos de proteínas nativas secretadas no meio extracelular (CELIK *et al.*, 2012). A inserção de um *locus* codificante de uma cauda de histidina na terminação C ou N da enzima heteróloga é uma tecnologia utilizada visando facilitar a purificação pela interação da histidina com a resina de purificação, em geral pela interação desse aminoácido com íons bivalente carregados positivamente na resina ((EDWARDS *et al.*, 2000).

No entanto, esse sistema, possui algumas desvantagens. O metanol, fonte de carbono para a levedura *K. phaffii*, é um produto altamente inflamável e torna-se perigoso o armazenamento de grandes quantidades. Outro fator limitante é que as proteínas recombinantes secretadas podem ser degradadas proteoliticamente no meio de cultura por proteases expressas durante o cultivo de *K. phaffii* (POTVIN *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção de sequências codificadoras para monoxigenases de polissacarídeos bacterianas a partir de bancos de dados

Utilizando a base de dados de domínio público CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database), e de literatura específica, foram selecionados 6 genes codificadores para enzimas monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs) de diferentes bactérias. Os critérios dessa seleção foram: busca por famílias de LPMOs com preferência de atuação em celulose e hemicelulose; análise da biologia, ecologia e taxonomia das espécies; análises de patentes existentes e análise de classificação de risco de biossegurança de bactérias conforme a ANVISA.

A sequência dos genes selecionados foi omitida deste documento, pois estão resguardadas por contratos de confidencialidade. Portanto os mesmos foram codificados como: gene 1 (F1), gene 2 (F2), gene 3 (F3), gene 4 (F4), gene 5 (F5) e gene 6 (F6).

4.2 Estratégia de clonagem

A base de dados de domínio público NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizada para obter as sequências proteicas e nucleotídicas dos genes selecionados (item 4.1). Após análise *in silico*, a sequência do peptídeo sinal nativo para secreção das proteínas foi retirada dos genes selecionados, uma vez que se optou por utilizar a sequência sinal de secreção (denominado α -factor, nativa de *Saccharomyces cerevisiae*) existente no vetor de *K. phaffii*, pPICZ α A (Life Technologies) (Figura 4).

Após a remoção dessas sequências, foi necessário fazer análise destes genes modificados, de forma a garantir a integridade da janela de leitura (*in frame*) das construções após a subclonagem no vetor final (pPICZ α A). Nesta etapa, também foram inseridos dois sítios de restrição: um para a enzima *Eco* RI (extremidade 5') e outro para *Xba* I (extremidade 3').

As construções foram analisadas utilizando o programa Geneious versão 7.1.8., e dois nucleotídeos foram adicionados antes do sítio da enzima de restrição *Xba* I, com o objetivo de manter as construções na janela de leitura correta (*in frame*).

As sequências foram otimizadas na plataforma GeneArt (Life Technologies) para expressão em *K. phaffii*. Todas as construções foram enviadas para síntese em empresa especializada, a Life Technologies.

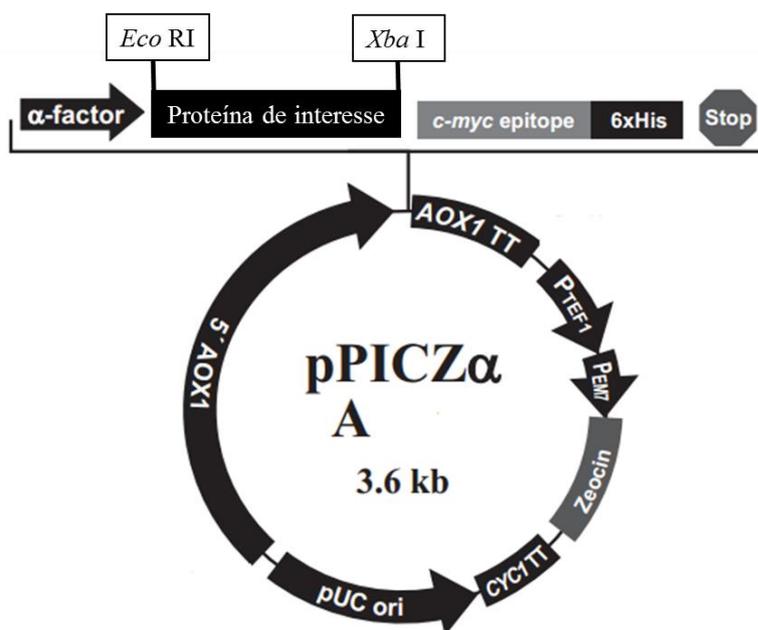


Figura 4 - Mapa do vetor pPICZ α A para a expressão em *Komagataella phaffii*.

4.3 Transformação dos plasmídeos contendo os genes das LPMOs bacterianas em *Escherichia coli*

4.3.1 Preparo de células de *Escherichia coli* eletrocompetentes

Após a seleção dos genes de LPMOs (item 4.1), iniciou-se o processo de transformação bacteriana. Para realizar essa transformação, células de *E. coli*, cepa DH10B (Invitrogen), eletrocompetentes, foram preparadas a partir do protocolo adaptado descrito por Sambrook & Russell (2001) e encontra-se descrito a seguir:

Uma colônia de *E. coli*, cepa DH10B, obtida pelo método de estria em placa, foi inoculada em 10 mL de meio LB (em %: triptona – 1, extrato de levedura – 0,5 e NaCl 1,0, pH 7) por 16-20 h sob agitação de 200 rpm a 37°C. Uma alíquota de 5 mL deste pré-inoculo crescido *overnight* foi inoculado em 200 mL de meio LB e incubado sob as mesmas condições do pré-inóculo, até que fosse atingida uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,4 e 0,6. Depois de atingir essa concentração ideal, as células foram mantidas no gelo por 30 min com posterior centrifugação a 1500 x g por 25 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 25 mL de uma solução aquosa de glicerol 10% gelado. As bactérias foram novamente centrifugadas, mas desta vez a 2000 x g por 15 min a 4°C e o pellet foi ressuscitado em 15 mL de glicerol 10%. Essa etapa de centrifugação foi repetida mais uma vez e o pellet novamente ressuscitado em 500 µL de glicerol 10% gelado. Alíquotas contendo 50 µL de células competentes foram feitas e estocadas a -80°C até a sua utilização.

Para o teste de competência das células DH10B utilizou-se o protocolo para eletroporação adaptado de Sambrook & Russell (2001), o qual encontra-se descrito a seguir:

Algumas alíquotas de células competentes foram descongeladas lentamente em banho com gelo. Logo após foi adicionado 0,1 ng do vetor comercial pUC19 (Invitrogen) em uma alíquota de 50 µL de célula competente e transferiu-as para uma cubeta de eletroporação. Essas células foram submetidas a um pulso elétrico nas seguintes condições: 1,8 kV, 200 Ω e 25 µF. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 800 µL de meio SOC (triptona – 2%, extrato de levedura – 0,5%, NaCl – 10 mmol/L, KCl – 2,5 mmol/L, MgCl₂ – 10 mmol/L e glicose – 20 mmol/L) na cubeta para remover as células, as quais foram transferidas para novo tubo e incubadas a 37°C por 1 h, sob agitação de 200 rpm. Após esse período foram plaqueados 100 µL das células transformadas em meio LB-ágar (em %: triptona – 1,0, extrato de levedura – 0,5, NaCl – 1,0 e ágar bacteriológico – 1,5, pH 7) contendo o antibiótico de seleção, no caso, ampicilina (100 µg/mL), X-Gal (80 µg/mL) e IPTG (0,5 mM). As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 h, até a obtenção de colônias.

A eficiência da transformação das células competentes foi realizada calculando o valor de UFC/µg de DNA, que é obtido pela divisão do número de colônias crescidas na placa (UFC – Unidades Formadoras de Colônias) pela quantidade de microgramas (µg) de DNA utilizado na transformação.

4.3.2 Transformação de *Escherichia coli* por eletroporação

Os 6 genes selecionados (item 4.1), sintetizados pela empresa Life Technologies, foram ressuspensos em 50 μL de Tampão de Eluição (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) e armazenados a -20°C em uma concentração estoque de 100 ng/ μL .

Para a transformação de *E. coli*, o DNA estoque foi diluído para uso na concentração de 10 ng/ μL e o protocolo utilizado para eletroporação foi adaptado de Sambrook & Russel (2001): algumas alíquotas de células competentes foram mantidas em gelo até que estivessem descongeladas. Logo após adicionou-se 2 μL de DNA, na concentração de 10 ng/ μL , a cada 50 μL de célula DH10B competente. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação, a qual foi submetida a um pulso elétrico na condição padrão do eletroporador (BioRad): 1,8 kV, 200 Ω e 25 μF . Imediatamente após o pulso, adicionou-se 800 μL de meio SOC na cubeta para remover as células, as quais foram transferidas para um novo tubo e incubadas a 37°C por 1 h, sob agitação de 200 rpm.

Em placas de petri com meio LB-ágar contendo Zeocina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plaqueou-se 100 μL de meio contendo as células transformadas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 a 20 h.

4.3.3 Extração de DNA plasmidial

Colônias de *E. coli* transformadas, crescidas em placa de petri foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo Zeocina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas a 37°C por 16-20 h, sob agitação de 200 rpm, para obtenção de células para a extração de seu DNA plasmidial. A extração foi realizada utilizando-se o kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), segundo instruções do fabricante.

Alíquotas do DNA extraído foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) em Tampão de corrida TAE1X (Thermo Scientific) e visualizados sob luz UV.

4.3.4 Digestão de DNA plasmidial com enzimas de restrição

Para confirmar se as construções realizadas no item 4.3.2 continham o gene de interesse, o DNA plasmidial extraído no item 4.3.3 foi analisado por padrão de restrição, utilizando os sítios de restrição selecionados para a síntese das sequências (*Eco* RI na extremidade 5' e *Xba* I na extremidade 3'). As digestões, foram realizadas utilizando os seguintes reagentes: tampão – Promega, 50 ng/μL de DNA, *Eco* RI 15 U/μL - Invitrogen, *Xba* I 12 U/μL - Promega e água destilada para um volume final de 10 μL.

Os reagentes foram então misturados e as reações foram incubadas em estufa a 37°C por 16-20 h. A análise foi feita com uma alíquota do material digerido em gel de agarose 1% (conforme descrito no item 4.3.3).

4.4 Transformação dos plasmídeos contendo os genes das LPMOs bacterianas em *Komagataella phaffii*

4.4.1 Preparação do DNA plasmidial para transformação de *Komagataella phaffii* por eletroporação

Após a confirmação das construções por padrão de restrição (item 4.3.4), as colônias transformadas de *E. coli* foram inoculadas em 20 mL de meio LB contendo 25 μg/mL de Zeocina. A extração de DNA foi realizada utilizando kit comercial QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen), obtendo-se quantidade suficiente de DNA (5 a 10 μg) para linearizar e purificar os plasmídeos para a transformação em *K. phaffii*. Segundo instruções do fabricante do kit utilizado para a transformação (EasySelect™ *Pichia Expression* Kit - Invitrogen), esta linearização é necessária para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura. As enzimas que podem ser utilizadas para linearizar o vetor pPicZαA são *Pme* I, *Bst* XI e *Sac* I.

Uma análise *in silico* das sequências foi realizada, utilizando a ferramenta *online* NEBcutter V2.0, para verificar se existia apenas um único sítio de restrição para essas enzimas. Dessa forma, a enzima selecionada para linearizar esses clones foi a *Sac* I (Invitrogen), com exceção do plasmídeo contendo o gene 2 (F2), que foi linearizado com

PmeI (Thermo Scientific), pois apresentou um único sítio de restrição. Portanto, os reagentes utilizados para as restrições dos plasmídeos contendo os genes 1 (F1), 3 (F3), 4 (F4), 5 (F5) e 6 (F6) foram os seguintes: tampão *Sac I* 10X, 3-5 µg de DNA, *Sac I* 10 U/µL e água destilada para um volume final de 100 µL. Já para a restrição dos plasmídeos contendo o gene 2 (F2) os reagentes foram: tampão *FastDigest* 10X, 3-5 µg de DNA, *Pme I* 10 U/µL e água destilada para um volume final de 100 µL.

Os reagentes foram misturados e as reações foram incubadas em estufa a 37°C por 16-20 h. Após este período foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (conforme descrito no item 4.3.3), para confirmar a linearização dos plasmídeos. Dada a confirmação da linearização, os plasmídeos linearizados foram então purificados por precipitação com etanol de acordo com o protocolo de Sambrook & Russell (2001), o qual encontra-se descrito a seguir:

Primeiramente foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3 mol/L e 2,5 vezes o volume de etanol em cada tubo de plasmídeo linearizado, os quais foram misturados e incubados por 1 h a -80°C. Depois as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g, lavadas com 1 mL de etanol 70% e secas em concentrador de amostra a vácuo por 3 min. Essas amostras foram ressuspensas em 10 µL de água destilada, pois este é o volume utilizado na transformação.

4.4.2 Preparação de células de *Komagataella phaffii* eletrocompetentes

Para iniciar o processo de transformação dos plasmídeos contendo os genes das LPMOs bacterianas em *K. phaffii*, foram preparadas células eletrocompetentes da levedura. O protocolo utilizado para o preparo de células de *K. phaffii*, linhagem X-33 do tipo selvagem, eletrocompetentes, foi adaptado do manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit e encontra-se descrito a seguir:

Uma única colônia de *K. phaffii*, linhagem X-33 do tipo selvagem, crescida em placa contendo o meio YPDS (extrato de levedura – 1,0%, peptona – 2,0%, glicose – 2,0%, sorbitol – 1 mol/L e ágar – 2,0%) foi inoculada em 10 mL de meio YPD (em %: extrato de levedura – 1,0, peptona – 2,0 e glicose – 2,0) e incubada a 28°C, 250 rpm, por 20 h. Após este período, uma alíquota de 1 – 3 mL deste pré-inóculo crescido *overnight* foi inoculado em 200 mL de meio YPD e incubado sob as mesmas condições anteriores, até que fosse atingida uma OD_{600nm} entre 1,3 e 1,5. Quando o inóculo atingiu o

crescimento esperado, as células foram então centrifugadas quatro vezes nas mesmas condições: 1500 x g por 5 minutos a 4°C. Na primeira centrifugação as células foram decantadas e o pellet ressuscitado em 200 mL de água mili-Q estéril gelada; na segunda, o pellet foi ressuscitado em 100 mL de água mili-Q estéril gelada; na terceira, em 20 mL de sorbitol 1 mol/L gelado e na última centrifugação as células foram ressuscitadas em 1 mL de sorbitol 1 mol/L gelado.

Alíquotas contendo 80 µL de células competentes foram feitas e mantidas no gelo até a realização da transformação de *K. phaffii*.

4.4.3 Transformação de *Komagataella phaffii* por eletroporação

Após o preparo de células eletrocompetentes (item 4.4.2), iniciou-se o processo de transformação dos plasmídeos contendo os genes das LPMOs bacterianas em *K. phaffii*. Foi utilizado 10 µL de amostra com aproximadamente 5 µg de DNA linearizado, o qual foi misturado às células competentes, obtidas no item 4.4.2. A mistura foi colocada em cubetas e incubada por 5 min no gelo. A eletroporação foi realizada com os seguintes parâmetros: 1500 V, 25 µF, 400 Ω. Imediatamente após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol gelado na cubeta e o conteúdo transferido para um tubo estéril tipo Falcon de 15 mL. Seguiu-se incubação a 30°C, sem agitação, por 2 h. Após esse período foram plaqueados 100 µL de material de cada transformação em YPDS contendo 100 µg/mL de Zeocina. O restante do material da transformação foi centrifugado a 3000 x g por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuscitadas com 100 µL de sorbitol 1 mol/L gelado e plaqueadas em placas de YPDS contendo 100 µg/mL de Zeocina, as quais foram incubadas por 4 a 5 dias a 30°C.

4.4.4 Isolamento do DNA genômico de *Komagataella phaffii*

Para analisar as colônias transformantes por PCR foi necessário realizar o isolamento do DNA genômico dos transformantes, o qual seguiu o protocolo adaptado do manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit.

Colônias de leveduras transformantes, obtidas da transformação por eletroporação foram inoculadas em meio YPD contendo Zeocina a 100 µg/mL. Os inóculos cresceram overnight a 30°C sob agitação de 250 rpm.

Depois do crescimento, 200 µL de cultura foi transferido para tubos de 1,5 mL contendo aproximadamente 0,5 mg de glass beads de 0,5 mm. Foram adicionados às células 2 µL de solução de liticase (500 µg/mL), incubando-se por 1 h a 37°C. As células foram então agitadas em vórtex e incubadas por 30 min a -80°C. Em seguida, foram aquecidas a 90°C por 10 min, novamente agitadas em vórtex e centrifugadas a 3000 x g por 1 min. O sobrenadante (aproximadamente 50 µL) foi transferido para um novo tubo e estocado a uma temperatura de -20°C para posterior uso em PCR.

4.4.5 Confirmação da inserção das construções gênicas no genoma de *Komagataella phaffii*

Para confirmar se os genes de interesse haviam se integrado no genoma da *K. phaffii*, o DNA genômico proveniente da lise das leveduras (item 4.4.4) foi diretamente utilizado como molde em reações de PCR (*polymerase chain reaction*). Para tanto, foram utilizados *primers* específicos que flanqueiam as regiões 5´ e 3´ do promotor *AOX1*, o qual é responsável pela maior parte da atividade álcool oxidase da célula.

Cada reação de PCR continha: 1X de 10X Reaction Buffer (Invitrogen), 3,7 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de dNTPs 10 mmol/L (Invitrogen), 0,8 mmol/L de *primer* 5´*AOX1* Forward, 0,8 mmol/L de *primer* 3´*AOX1* Reverse, 5-20 ng de DNA, 1,0 U de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e água destilada para um volume final de 25 µL.

Para a amplificação, foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento do primer a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 4 minutos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

Após amplificado, o fragmento foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%, nas mesmas condições descritas no item 4.3.3.

4.5 Expressão de LPMOs bacterianas em *Komagataella phaffii*

4.5.1 Indução por metanol dos clones transformados de *Komagataella phaffii*

Confirmada a inserção dos genes no genoma de *K. phaffii* (item 4.4.5), o processo de expressão da enzima foi iniciado. Uma colônia isolada de cada construção foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (extrato de levedura – 1,0%, peptona – 2,0%, fosfato de potássio – 100 mmol/L, YNB – 1,34%, biotina – 4×10^{-5} % e glicerol – 1,0%) em Erlenmeyer estéril de 250 mL e incubada a 30°C e 200 rpm, até atingir uma DO_{600nm} de 2 a 6 (aproximadamente 16-18 horas). Ao mesmo tempo, foi utilizado como controle da expressão e de *background* um clone de *K. phaffii* transformado com vetor pPicZ α A sem inserto.

As células foram então centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em 50 mL de meio BMMY (extrato de levedura – 1,0%, peptona 2,0% fosfato de potássio – 100 mmol/L, YNB – 1,34%, biotina – 4×10^{-5} % e metanol – 0,5%), obtendo-se uma DO_{600nm} final de 1,0. Essas células foram transferidas para novos Erlenmeyers estéreis de 250 mL, e novamente incubadas a 30°C sob agitação de 200 rpm.

A cada 24 horas, foi adicionado metanol absoluto (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 0,5% (ou seja, 250 μ L), para manter a indução dos transformantes. Durante 72 horas de indução, as células foram coletadas em 4 tempos (0, 24, 48 e 72 horas). Em cada tempo, foram coletados 1 mL de cada cultura, os quais foram centrifugadas a 1500 x g por 5 min, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Tanto o pellet quanto o sobrenadante foram armazenados a -80°C para posterior análise da expressão das proteínas por SDS-PAGE e *western blot*.

4.5.2 Análise da expressão das proteínas recombinantes em *Komagataella phaffii* por SDS-PAGE e *western blot*.

Para analisar a expressão das proteínas, ao final de 72 horas de indução, 50 μ L de cada sobrenadante armazenado a -80°C foi aliquoteado em tubos de 1,5 mL, onde foi

adicionado 50 μL do tampão de amostra com β -mercaptoetanol (Tris-HCl – 125 mM, glicerol – 20%, SDS – 4%, azul de bromofenol – 0,01% e β -mercaptoetanol - 1%). Todas as amostras foram submetidas a temperatura de 100°C por 5 min, para que ocorresse a desnaturação das proteínas.

A seguir, os sobrenadantes foram avaliados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%, conforme Sambrook & Russell (2001). Apenas 10 μL do sobrenadante das amostras foram aplicados no gel, que foi feito em duplicada, pois um foi corado com Coomassie Blue e o outro foi utilizado para o *western blot*.

Os reagentes e volumes do gel desnaturante de poliacrilamida 12% está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes e respectivos volumes para a preparação do gel desnaturante de poliacrilamida 12%.

Reagentes	Gel concentrador 4%	*Gel separador 12%
Água	3,5 mL	3,6 mL
Acrilamida/Bis 30%	650 μL	8 mL
*Tris HCl 1,0 mol/L, pH 6,8	1,25 mL	5 mL
SDS 10%	50 μL	200 μL
APS 10%	50 μL	200 μL
TEMED	5 μL	8 μL

*Para o gel separador, utiliza-se o Tris-HCl 1,5M, pH 8,8

Após eletroforese em gel de poliacrilamida, um dos géis foi corado em Coomassie Brilliant Blue R-250 (em %: Azul de Coomassie R-250 – 0,25, metanol – 50 e ácido acético – 10) por 24 horas e descorado com solução descorante (em %: metanol – 30, ácido acético – 10 e água destilada – 60) para ser revelado. O outro gel foi transferido para membrana de nitrocelulose (Axiva), onde foi feita a imunomarcação.

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana foi feita utilizando o equipamento Semidry Electrophoblotter (Thermo Scientific). O gel, a membrana de nitrocelulose e quatro papéis de filtro foram incubados por 10 min no tampão de transferência (Tris-base – 0,025 mol/L, glicina – 0,192 mol/L, metanol – 20% e água destilada – 80%). Em seguida, montou-se o sanduíche, colocando-se dois papéis filtro, o gel, a membrana, e mais dois papéis filtro sobre a membrana. Para a transferência foi utilizada uma corrente de 10 V e amperagem de 120 mA por 40 min. Para conseguir

visualizar a transferência das proteínas, foi utilizado marcador pré-corado Color Protein Standard Broad Range (NEB). Uma vez que se o marcador foi transferido, subentende-se que as proteínas também foram.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de PBS 1X (NaCl – 137 mmol/L, KCl – 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ – 10 mmol/L, KH₂PO₄ – 10 mmol/L, pH 7,4) e leite em pó desnatado 3% por 16-20 h a 4°C.

Para a imunomarcação, foi utilizado o anticorpo primário anti-HIS Tag (GE LifeScience), na diluição 1:3000 em PBS 1X com leite em pó desnatado a 3%, que foi colocado sobre a membrana permanecendo em agitação por 2 h. A membrana foi devidamente lavada (3 lavagens de 5 minutos cada) com PBS-Tween 0,1% e incubada, por mais 1 h em agitação com o anticorpo secundário Anti-mouse IgG, conjugado à peroxidase (Sigma), na diluição 1:5000. Após a lavagem da membrana com PBS-Tween 0,1%, (3 lavagens de 5 minutos cada), a mesma foi revelada misturando-se 66 µL de NBT (Nitro-blue-tetrazolium) com 33 µL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Promega), em 10 mL de tampão alcalino de revelação (Tris-HCl- 0,1 mol/L, NaCl - 0,1 mol/L e MgCl₂ - 50mM, pH 9,5). A membrana foi incubada no escuro, sob agitação, por 10 minutos, para sua posterior revelação.

4.6 Purificação da LPMO de *Thermobifida fusca* YX recombinante produzida em *Komagataella phafii*

Após confirmada a expressão da proteína (item 4.5.2), o experimento de purificação foi iniciado. No último tempo de indução, 72 horas, a cultura foi coletada e centrifugada a 10.000 rpm por 20 min antes de sua aplicação na coluna de níquel (HisTrapTM HP, 5 mL- GE Healthcare), utilizando o equipamento para purificação da proteína, ÄKTATM pure (GE Healthcare).

A amostra previamente centrifugada foi injetada na coluna de níquel por meio do lopping de 150 mL do equipamento. A coluna de níquel foi lavada com 3 a 5 volumes da coluna (CV) de água miliQ, para retirada do etanol 20% em seu interior, pois a mesma é armazenada com este reagente. Em seguida, a coluna foi previamente equilibrada com tampão de ligação (fosfato de sódio – 20 mM e NaCl – 0,5 mol/L). O processo de injeção foi conduzido com fluxo de 5 mL/min. Após a injeção da amostra, lavou-se a coluna com

tampão de ligação até que a absorbância (280 nm) se estabilizasse. As proteínas foram eluídas da coluna no tampão de eluição (fosfato de sódio – 20 mM, NaCl – 0,5 mol/L e imidazol – 0,5 mol/L) por gradiente linear de imidazol (6%, 50% e 100%), com fluxo de 5 mL/min. As frações da proteína eluída foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida 12% e *western blot*, conforme procedimento descrito no item 4.5.2.

4.7 Produção da LPMO de *Thermobifida fusca* YX recombinante em biorreator e em Erlenmeyers

Para avaliar e comparar o comportamento e os níveis de expressão da LPMO recombinante, o cultivo foi realizado em diferentes tipos de frascos e volumes. Para o preparo do pré-inóculo, uma colônia isolada *K. phaffii* transformada com o gene de *Thermobifida fusca* YX foi inoculada em 100 mL de meio BMGY em Erlenmeyer haletado estéril de 1L e incubada em agitador orbital a 30°C e 250 rpm, até atingir uma DO_{600nm} de 2 a 6 (aproximadamente 16-18 horas).

As células foram então centrifugadas a 1500 x g por 5 min a temperatura ambiente e ressuspendidas em 50 mL de meio BMMY, obtendo-se uma DO_{600nm} final de 5. Essas células foram transferidas para três distintos frascos: o biorreator de 1L (DASGIP® Bioblock- Eppendorf) com 300 mL de meio BMMY, o Erlenmeyer de 250 ml com 50 mL de meio e um Erlenmeyer de 1000 mL com 200 mL. Depois disso, todos os frascos foram novamente incubados a 30°C sob agitação de 200 rpm.

A cada 24 horas, foi adicionado metanol absoluto (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 0,5% do volume de meio, para manter a indução dos transformantes. Durante 120 horas de indução, as células foram coletadas em 9 tempos (0, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 horas). Em cada tempo, foram aliqotados 500 µL de cada cultura para acompanhar o crescimento celular e realizar a determinação do pH. O tempo 0 e 120 horas foram utilizados para determinar a viabilidade celular. Outros 500 µL foram aliqotados de cada cultura e centrifugados a 1500 x g por 5 min. Tanto o pellet quanto o sobrenadante foram armazenados a -80°C para posterior quantificação de leveduras e expressão das proteínas por SDS-PAGE e *western blot*, conforme protocolo descrito no item 4.5.2.

4.8 Metodologias de análise

4.8.1 Crescimento microbiano e pH

Para o acompanhamento do crescimento microbiano e determinação do pH, foram utilizadas alíquotas de todos os tempos de indução. A leitura de absorbância das amostras previamente diluídas (100 vezes), foi feita através de um espectrofotômetro a 600 nm, determinando assim a densidade óptica do crescimento celular, que foi multiplicado pelo seu fator de diluição, no caso 100 vezes. Já o pH foi medido por meio de fitas indicadoras de pH.

4.8.2 Viabilidade celular

Para determinação da viabilidade celular analisou-se alíquotas do tempo 0 e 120 horas utilizando a câmara de Neubauer, considerando a leitura de células viáveis e não viáveis. A amostra foi diluída 100 vezes, desta aliquotou-se 1 mL e adicionou mais 1 mL da solução de eritrosina em tampão fosfato 0,1 mol/L. Com o auxílio de um microscópio realizou-se então a contagem de células viáveis, as quais apresentavam aspecto translúcido e as células inviáveis, que apresentavam coloração rósea, nos quatro quadrantes laterais da câmara de Neubauer. A fórmula descrita abaixo foi utilizada para calcular a viabilidade celular:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

4.8.3 Quantificação de proteínas

Após o processo de produção da LPMO de *Thermobifida fusca* YX, foi realizada a determinação da quantidade de proteínas utilizando ácido bicinconínico – BCA, seguindo as instruções do manual do kit da Thermo Scientific- Pierce® BCA – *Protein Assay Kit*.

Primeiramente preparou-se os pontos da curva padrão utilizando as concentrações de 0,05 a 2,0 mg/mL, a solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) 2 mg/mL e a

solução tampão citrato de sódio 0,1 mol/L como diluente. Essas amostras foram homogeneizadas e suas absorvâncias lidas em espectrofotômetro a 562 nm.

Para determinação das proteínas foram utilizadas todas as amostras das induções do biorreator de 1L, Erlenmeyer de 250 mL e 1000 mL, de todos os tempos (0 a 120h). Foram aliqotados 25 μ L de cada amostra previamente diluída (100 vezes) em microplaca e adicionou a cada poço 200 μ L do reagente do kit. A microplaca contendo as amostras foi agitada por 30 segundos; incubada a 37°C por 30 min e logo após o seu resfriamento foi feita a leitura no espectrofotômetro a 562 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Expressão de LPMOs bacterianas recombinantes em *Komagataella phaffii*

Seis sequências gênicas codificadores para possíveis enzimas monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs), gene 1 (F1), gene 2 (F2), gene 3 (F3), gene 4 (F4), gene 5 (F5) e gene 6 (F6), foram obtidos por mineração a partir da base de dados de domínio público CAZy e clonados em vetor pPICZ α A (Life Technologies). Após a sua síntese, foram transformados em bactéria *E. coli*. Para tanto, células eletrocompetentes de *E. coli*, cepa DH10B (Invitrogen), foram preparadas, resultando em uma eficiência de $2,86 \times 10^8$ UFC/ μ g de DNA. Segundo Pope e Kent (1996), uma boa eficiência deve apresentar valores entre 10^5 e 10^{10} UFC/ μ g de DNA (ZAHA *et al.*, 2014), o que significa que as células competentes obtidas neste trabalhos podem ser consideradas eficientes para transformação.

Células de *E. coli*, cepa DH10B, foram transformadas com os 6 genes por eletroporação. Os clones obtidos foram cultivados e submetidos à extração de DNA plasmidial e, posterior digestão com enzimas de restrição para confirmação da presença dos genes esperados.

O resultado da extração de DNA plasmidial, assim como da restrição com enzimas *Eco* RI e *Xba* I, pôde ser visualizado por meio da eletroforese em gel de agarose (Figura 5). Após a digestão do DNA com as enzimas *Eco* RI e *Xba* I podemos observar fragmentos de DNA correspondentes ao vetor (~3000 pb) e outros fragmentos de DNA correspondentes aos genes clonados (~500 pb), confirmando que os plasmídeos possuem o gene de interesse.

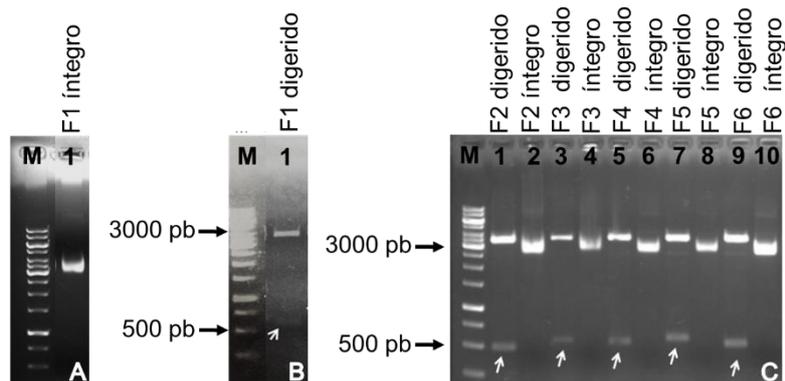


Figura 5 - Extração de DNA plasmidial (Mini prep) dos genes de origem bacteriana e o padrão de DNA plasmidial digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xba* I. As setas indicam o tamanho dos fragmentos de DNA esperados. M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder.

Para dar início ao processo de transformação de *K. phaffii*, as seis diferentes construções gênicas foram linearizadas com enzimas específicas, *Pme* I para o gene 2 (F2) e *Sac* I para os demais genes. Segundo instruções do fabricante do kit utilizado para a transformação (EasySelect Pichia Expression Kit - Invitrogen), esta linearização é necessária para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura, além de afetar positivamente na estabilidade das colônias clonadas, uma vez que esta depende do sítio de linearização o qual deve ser bem determinado (STUCHBURY *et al.*, 2010).

As construções gênicas tratadas com suas respectivas enzimas de restrição (linearizados) apresentaram migração eletroforética distintas dos não tratados (circulares), conforme a Figura 6. Isso ocorre devido à conformação do DNA linearizado, quanto menos condensada a molécula de DNA, mais lenta será sua migração no gel de agarose, causando atraso na migração. Já fragmentos de DNA circulares fechados (íntegros) tem capacidade de migrar mais rapidamente, por se tratarem de moléculas mais compactas ou condensadas. Essa diferença na migração eletroforética indica a ocorrência da linearização da molécula.

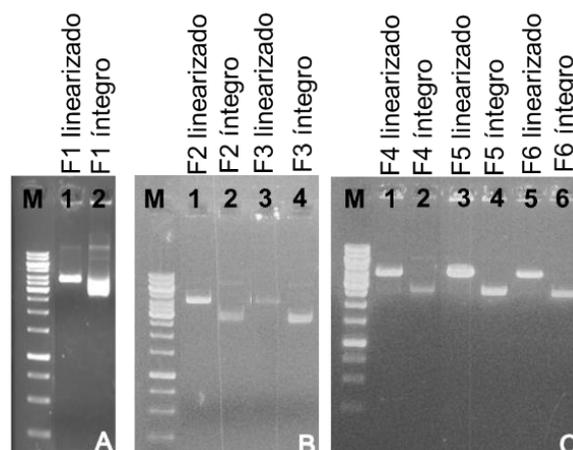


Figura 6 - Plasmídeos digeridos (linearizados) e íntegros (circulares), respectivamente. Em (A) poço 1 e 2: gene 1 (F1); (B) poço 1 e 2: gene 2 (F2), poço 3 e 4: gene 3 (F3); (C) poço 1 e 2: gene 4 (F4); poço 3 e 4: gene 5 (F5) e poço 5 e 6: gene 6 (F6); M- Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder.

Os plasmídeos linearizados foram inseridos em células eletrocompetentes de *Komagataella phaffii*, linhagem X-33 do tipo selvagem, por eletroporação.

Feita a seleção dos transformantes, os mesmos foram cultivados em meio YPD para a extração do seu DNA genômico. Esse DNA proveniente da lise das leveduras foi utilizado para confirmação por PCR da inserção dos genes no genoma da *K. phaffii*. Nessa amplificação foram obtidos clones apresentando fenótipo Mut⁺ nos 6 genes, conforme Figura 7.

De acordo com o manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, quando o padrão de amplificação é Mut⁺ devem ser visualizados dois fragmentos após a PCR: um de aproximadamente 2200 pb, que corresponde ao gene AOX1, e o outro do tamanho do gene de interesse mais 588 pb (no caso do vetor pPICZαA), provenientes do vetor. Este padrão é responsável pela capacidade da linhagem selvagem de *K. phaffii* metabolizar metanol como única fonte de carbono. Dessa forma, linhagens que contêm o gene promotor AOXI íntegro (encarregado por metabolizar o metanol em até 85%) possuem o fenótipo Mut⁺ com uma taxa de crescimento em metanol idêntica ao tipo selvagem, logo, o consumo de metanol será mais rápido (DALY *et al.*, 2005).

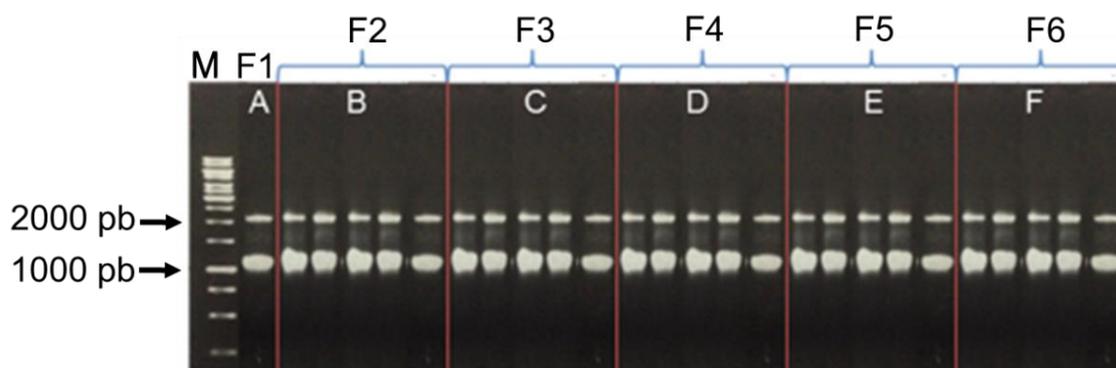


Figura 7 –Avaliação por PCR da integração dos genes de interesse no genoma de *K. phaffii*. Em (A): um clone de *K. phaffii* contendo o gene 1 (F1); (B): cinco clones de *K. phaffii* contendo o gene 2 (F2); (C): cinco clones de *K. phaffii* contendo o gene 3 (F3); (D): cinco clones de *K. phaffii* contendo o gene 4 (F); (E): cinco clones de *K. phaffii* contendo o gene 5 (F5) e (F): cinco clones de *K. phaffii* contendo o gene 6 (F6). M - Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Após confirmação da integração dos genes no genoma da *K. phaffii* com padrão Mut⁺, estes clones foram submetidos à indução por metanol durante o cultivo em frascos Erlenmeyers contendo meio BMMY para verificar a expressão das proteínas. Este álcool tem capacidade de estimular a etapa de transcrição do gene alvo através do controle do promotor gênico AOX1 (TERRAZAS *et al.*, 2014).

5.2 Análise da expressão da LPMO

Para avaliar a expressão das proteínas recombinantes clonadas em *Komagataella phaffii*, alíquotas das amostras retiradas durante a indução foram utilizadas para a análise por SDS-PAGE e *western blot*. Apenas a LPMO do gene 1 (F1), proveniente de *Thermobifida fusca*, foi detectada em ambas as análises, apresentando proteínas com peso molecular aproximado de 25 kDa, conforme Figura 8A e 6B.

As demais LPMOs bacterianas clonadas em *K. phaffii* não foram detectadas durante as análises com SDS-PAGE e *western blot*, onde ambas técnicas são capazes de determinar a presença e o tamanho de uma proteína em uma determinada amostra. Dentre as duas técnicas, SDS-PAGE possui menor sensibilidade quando comparado com *western blot*, o qual é capaz de revelar a proteína em quantidades mínimas de aproximadamente 1-5 η g (MIGUEL *et al.*, 2012).

No entanto é provável que a não detecção das demais LPMOs seja acarretada pela quantidade de proteína produzida, muito baixa (MIGUEL *et al.*, 2012) e, conseqüentemente, não detectável por ambas as técnicas.

Dessa forma, seria viável, em estudos futuros, a substituição do corante Azul de Comassie pelo Nitrato de Prata, que é considerado 100x mais sensível na detecção de baixas concentrações da proteína alvo (WALKER, 2010).

Outra hipótese para explicar este resultado é proposta por Wang (2014), que já demonstrou a ocorrência da degradação de proteínas heterólogas por proteases, o que afeta consideravelmente a detecção de sua secreção. Sendo necessária a utilização de inibidores de proteases para impedir a degradação da proteína alvo (BOLOGNIA *et al.*, 2015).

Sabe-se também que o processamento correto do N-terminal da proteína é crucial na obtenção de uma enzima ativa (LI *et al.*, 2012). Em particular, a escolha do sinal de secreção pode ter uma grande influência, uma vez que esta seqüência precisa ser cortada após a proteína ter sido direcionada para o caminho secretor. Em *K. phaffii*, o sinal de secreção mais comumente usado é o alfa-factor (α -factor) proveniente de *S. cerevisiae*. No entanto, Tanghe e colaboradores (2015) em estudo realizado para expressão recombinante de *Trichoderma reesei* Cel61A (TrCel61A) na levedura *K. phaffii*, compararam vários sinais de secreção, e relataram que o uso do sinal de secreção nativo de TrCel61A em vez do α -factor de *S. cerevisiae* foi considerado crucial, não só para obter altos rendimentos de proteínas (400 mg/L durante a fermentação), mas também para permitir o processamento correto do N-terminal .

Nesse contexto, seria relevante um estudo comparando diferentes sinais de secreção para expressão de LPMOs bacterianas em *K. phaffii*.

Assim, a única seqüência de LMPO bacteriana que foi capaz de produzir a proteína em níveis detectáveis foi a proveniente de *Thermobifida fusca*, detectada pelas análises de SDS-PAGE e *western blot*.

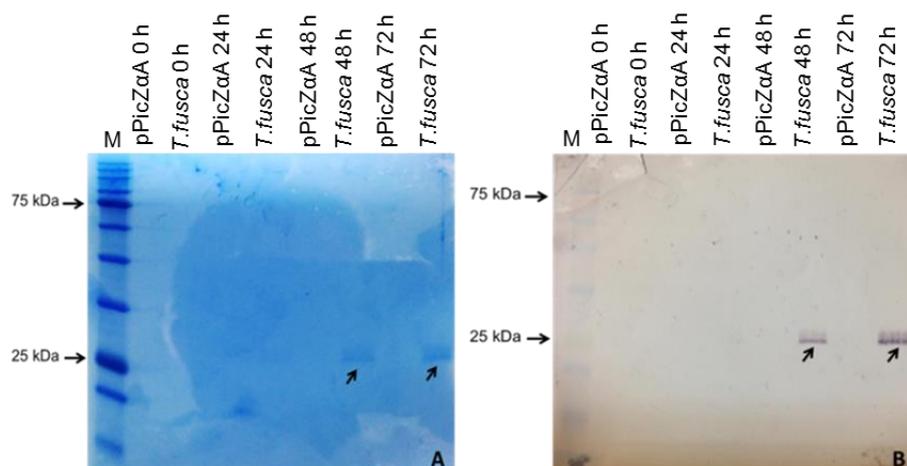


Figura 8 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol da LPMO de *Thermobifida fusca*. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue, mostrando o resultado da indução do controle (vetor pPicZ α A vazio) e de *T. fusca*, nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas. (B) – Membrana de nitrocellulose marcada com anticorpo anti-HisTag, confirmando a expressão da LPMO que está fusionada com cauda de histidina. M – Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

5.3 Purificação da enzima LPMO de *T. fusca* (F1)

Como a expressão da LPMO de *T. fusca* (F1) foi confirmada por SDS-PAGE e *western blot*, a enzima foi assim purificada. O fato de a proteína ter sido expressa fusionada a uma cauda de histidina (HisTag) na sua extremidade C-terminal, possibilitou a purificação por meio do uso de colunas cromatográficas de afinidade contendo níquel.

Este resultado pode ser explicado pela alta afinidade entre grupos naturalmente doadores de elétrons presentes em resíduos de aminoácidos exteriorizados em sua superfície (HisTag) e íons metálicos quelados immobilizados em uma matriz sólida, sendo esta última a coluna cromatográfica de afinidade com o elemento níquel quelado, ou seja, esta cauda inserida confere a interação das proteínas com os multissítios presentes no íon metálico Ni²⁺ (BRESOLIN *et al.*, 2009).

Para avaliar a purificação da proteína, as frações eluídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e por *western blot* (Figura 9).

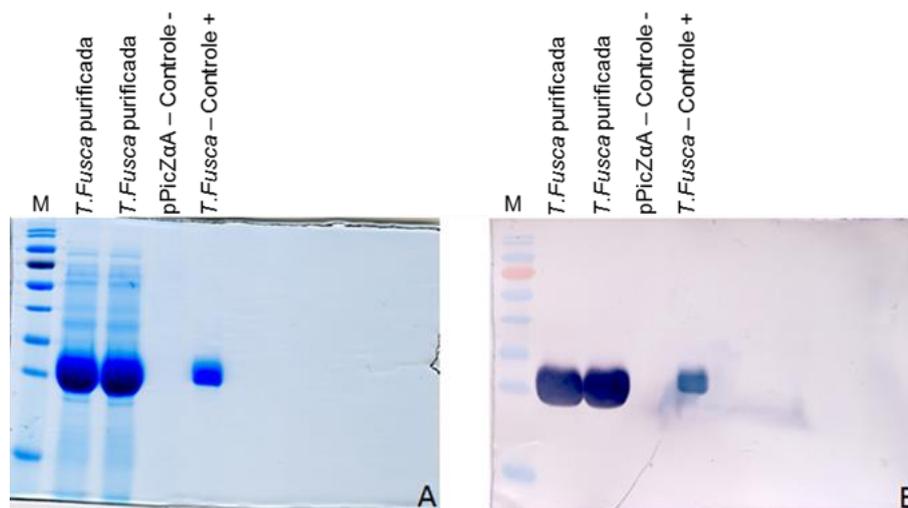


Figura 9 - SDS-PAGE e imunomarcação da LPMO de *Thermobifida fusca* antes e após a cromatografia de afinidade. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue, mostrando o resultado da purificação da LPMO de *T. fusca*, o controle negativo (vetor pPicZ α A vazio) e o controle positivo (indução de *T. fusca* - 72 horas). (B) - Membrana de nitrocellulose marcada com anticorpo anti-HisTag, confirmando a purificação da LPMO que está fusionada com cauda de histidina. M - Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

Como pode ser visualizado no resultado do SDS-PAGE e do *western blot*, o método cromatográfico de afinidade utilizado para a purificação da LPMO foi efetivo, uma vez que a proteína recombinante de *Thermobifida fusca* (F1) foi detectada em uma única banda com alta intensidade de cor, apresentando desta forma uma proteína mais concentrada.

5.4 Produção da LPMO de *T. fusca* (F1)

A produção da LPMO em biorreator e em frascos Erlenmeyers foi realizada com as mesmas condições, 30°C e agitação de 200 rpm, com a finalidade de avaliar seu comportamento para futuramente proporcionar seu escalonamento.

Para avaliar a viabilidade celular, concentração celular e o pH, alíquotas das amostras retiradas durante a indução foram utilizadas. A viabilidade celular (Tabela 2), avaliada no início (0 h) e final (120 h) da produção da LPMO de *T. fusca*, manteve-se próxima a 100%. Esta manutenção da viabilidade acima de 90% observada é importante, principalmente para manter a célula em atividade para produção da proteína heteróloga.

Tabela 2 - Viabilidade celular de LPMO de *Thermobifida fusca*, no início (0 h) e final (120 h) da produção em biorreator de 1 L (volume de trabalho: 300 mL), Erlenmeyer de 250 mL (volume de trabalho: 50 mL) e Erlenmeyer de 1000 mL (volume de trabalho: 200 mL).

	Número de células viáveis	Número de células não viáveis	Viabilidade
Biorreator, Erlenmeyers de 250 mL e 1000 mL – 0 h	191	9	95,5%
Biorreator – 120 h	237	19	92,6%
Erlenmeyer 250 mL – 120 h	303	17	94,7%
Erlenmeyer 1000 mL – 120 h	261	15	94,6%

O crescimento microbiano, acompanhado pela leitura de absorbância, feita em um comprimento de onda de 600 nm das amostras diluídas (100 vezes), iniciou com uma D.O. de 5,0 em todos os ensaios. Porém, com o passar dos dias de indução o experimento do biorreator não apresentou crescimento, diferentemente dos Erlenmeyers que demonstraram um alto acúmulo de biomassa, principalmente no Erlenmeyer de 250 mL (Figura 10). Esse baixo crescimento das células no biorreator pode ser devido a diferença geométrica existente entre o frasco do fermentador e os Erlenmeyers, outra possível explicação seria na sua forma de agitação, a qual é realizada através de “pás agitadoras” (CASTILLO *et al.*, 2011).

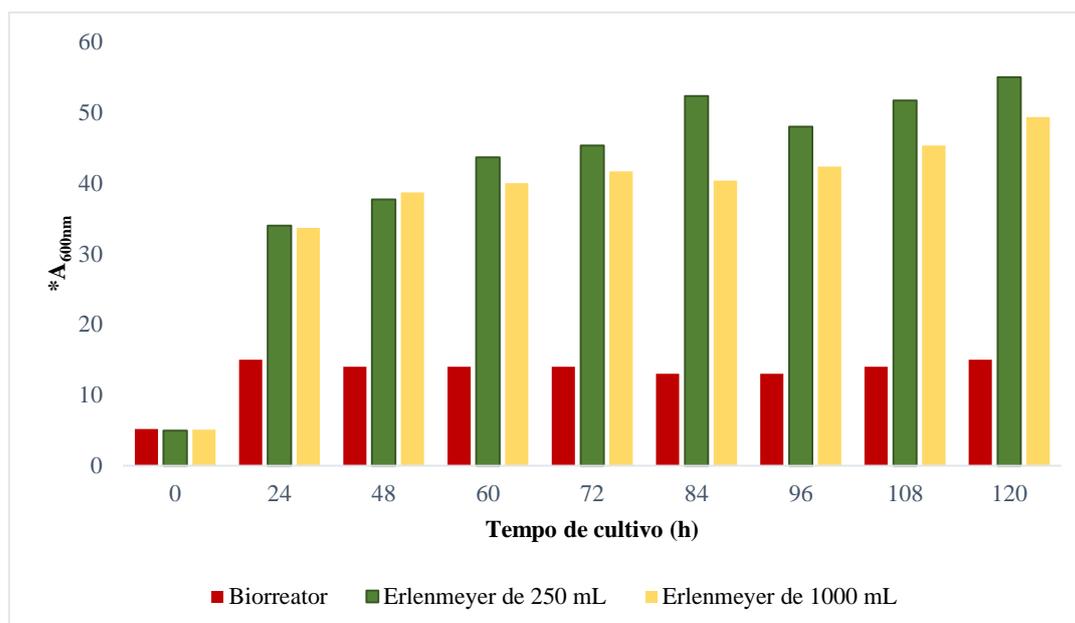


Figura 10 – Crescimento da levedura produtora da LPMO de *Thermobifida fusca* em biorreator de 1 L (volume de trabalho 300 mL), Erlenmeyer de 250 mL (volume de trabalho 50 mL) e Erlenmeyer de 1000 mL (volume de trabalho 200 mL). *A (absorbância) foi lida das amostras diluídas 100 vezes.

Durante todo o período de produção da enzima o pH não variou, apresentando um valor de 6,0. O pH ótimo de atividade das LPMOs se encontra entre 5,5 (AGGER *et al.*, 2014) e 6,0 (PATEL *et al.*, 2016). Assim, o pH constante obtido é considerado ideal, uma vez que é um dos parâmetros mais importantes e sensíveis durante a produção de enzimas, podendo afetar a estabilidade e atividade enzimática.

Para quantificar a proteína foi realizado o método BCA, no qual foram verificadas muitas variações, conforme a Figura 11, que provavelmente se deve pelo fato da pouca quantidade de proteína detectada. Apesar da indicação de uma concentração de proteínas no biorreator, estas podem abranger diversos grupos de enzimas proteolíticas, por exemplo, as proteases e, não necessariamente, a proteína de interesse, a LPMO.

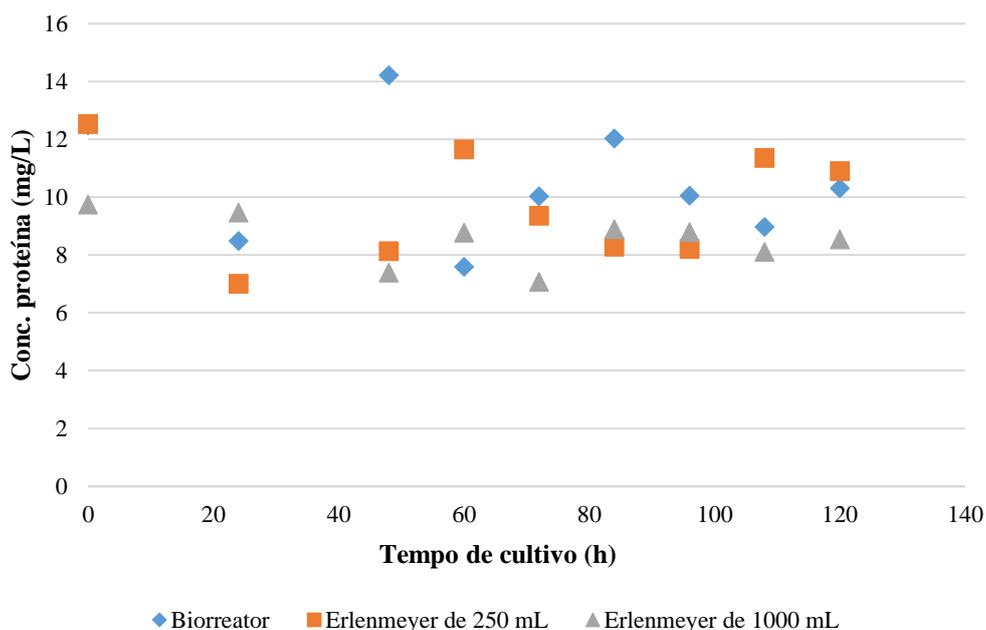


Figura 11 - Concentração de proteínas totais em cada tempo (0, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 horas) da produção da LPMO de *Thermobifida fusca* inserida em *K. phaffii* em biorreator de 1 L (Azul), Erlenmeyer de 250 mL (Laranja) e Erlenmeyer de 1000 mL (Cinza).

5.4.1 Análise da expressão da LPMO produzida e purificada

Para avaliar se houve expressão das proteínas recombinantes durante os cultivos executados no biorreator e nos Erlenmeyers foram feitas análises de SDS-PAGE e *western blot*.

Entretanto, no biorreator, (Figura 12), não foi detectada a presença da LPMO recombinante, nos ensaios em frascos Erlenmeyers com os volumes de trabalho de 50 mL (Figura 13) e 200 mL (Figura 14) pôde-se verificar a expressão de LPMO recombinante em todos os tempos analisados, exceto em 0 h.

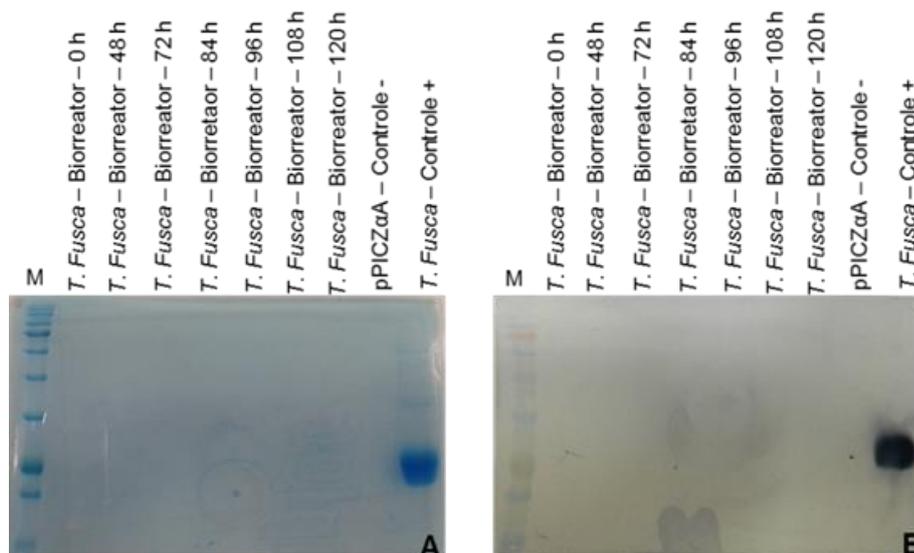


Figura 12 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol em biorreator de 1L da LPMO de *Thermobifida fusca*. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue, nos tempos 0, 48, 72, 84, 96, 108 e 120 horas, o controle negativo (vetor pPicZαA vazio) e o controle positivo (indução de *T. fusca* – 72 horas). (B) – Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-HisTag, confirmando a não expressão da LPMO que está fusionada com cauda de histidina. M – Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

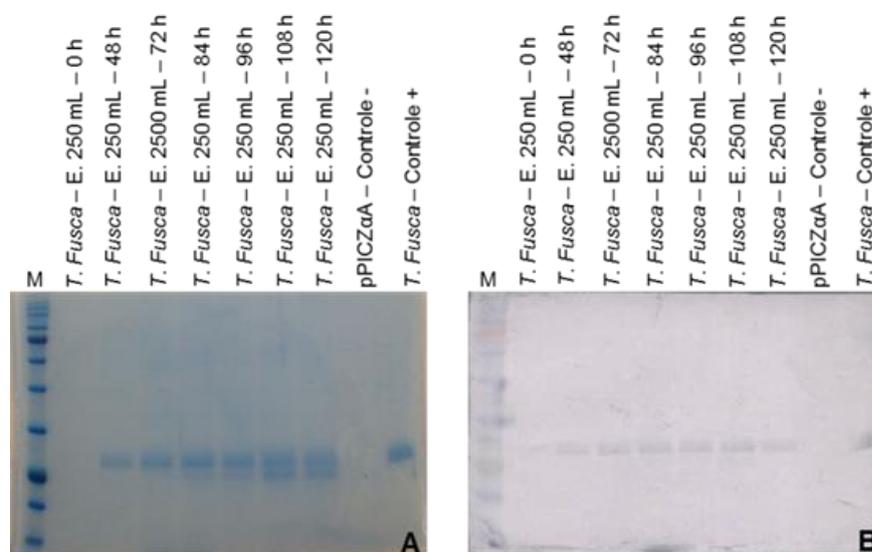


Figura 13 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol em Erlenmeyer de 250 mL da LPMO de *Thermobifida fusca*. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue, nos tempos 0, 48, 72, 84, 96, 108 e 120 horas, o controle negativo (vetor pPicZαA vazio) e o controle positivo (indução de *T. fusca* – 72 horas). (B) – Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-HisTag, confirmando a expressão da LPMO que está fusionada com cauda de histidina. M – Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

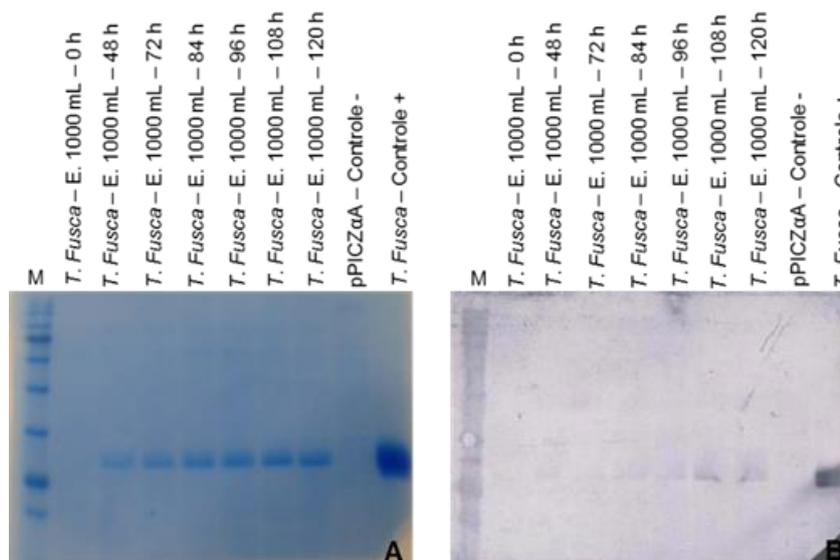


Figura 14 - SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol em Erlenmeyer de 1000 mL da LPMO de *Thermobifida fusca*. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue, mostrando o resultado da indução nos tempos 0, 48, 72, 84, 96, 108 e 120 horas, o controle negativo (vetor pPICZ α A vazio) e o controle positivo (indução de *T. fusca* - 72 horas). (B) - Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-HisTag, confirmando a expressão da LPMO que está fusionada com cauda de histidina. M - Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

A ausência de expressão detectável da LPMO recombinante durante o cultivo realizado no biorreator, possivelmente se deu em decorrência do baixo crescimento apresentado pela levedura (Figura 10), causado provavelmente por condições não ideais ao microrganismo dentro do biorreator. Sem o crescimento considerável das leveduras não houve a detecção de LPMO recombinante em biorreator.

Assim, apenas as amostras obtidas a partir dos cultivos em frascos Erlenmeyers foram submetidas à técnica de purificação por cromatografia de afinidade. Como mostra a Figura 15, as amostras eluídas obtidas na etapa de purificação continham a proteína recombinante.

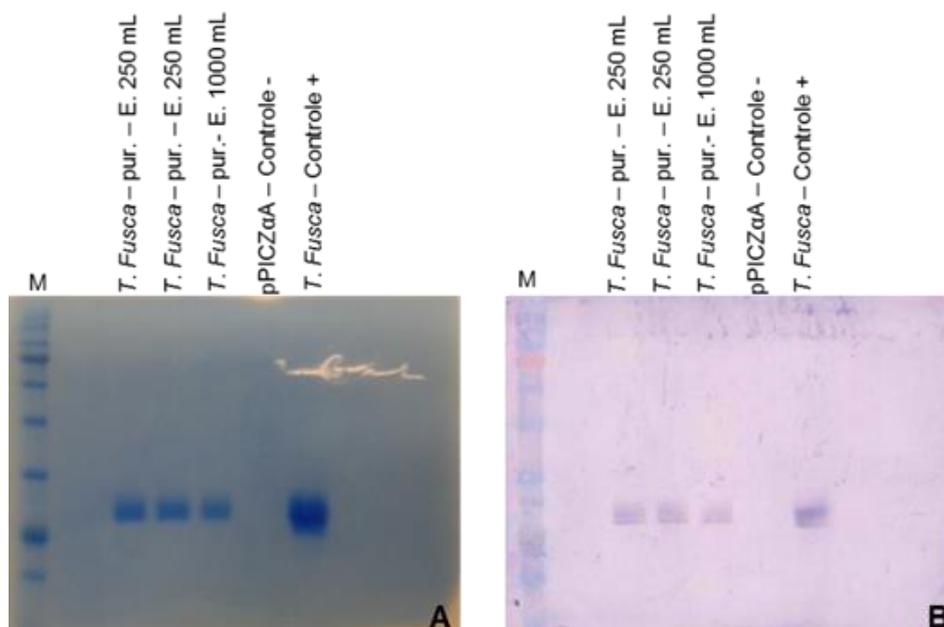


Figura 15 - SDS-PAGE e imunomarcção da LPMO de *Thermobifida fusca* purificada. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue, mostrando o resultado da purificação da LPMO de *T. fusca*, o controle negativo (vetor pPicZαA vazio) e o controle positivo (indução de *T. fusca* - 72 horas). (B) - Membrana de nitrocellulose marcada com anticorpo anti-HisTag, confirmando a purificação da LPMO que está fusionada com cauda de histidina. M - Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

O sucesso na purificação da LPMO pode ser justificado pelo uso de um sistema heterólogo com leveduras, em especial *K. phaffii*, a qual oferece vantagens em processos de purificação de proteínas (FÉLIX, 2008). Além disso, a purificação foi possível também devido à incorporação de cauda de histidina (HisTag) na LPMO a qual não continha naturalmente espécies doadoras de elétrons ou as continham em menor quantidade, dessa forma, conferindo às LPMOs a possibilidade de purificação (BRESOLIN, 2009).

A Tabela 3 mostra a relação de microrganismos que foram capazes de produzir LPMOs de maneira eficiente, e seus respectivos microrganismos hospedeiros. Isso demonstra a biodiversidade a ser explorada para este fim, e também que a levedura *K. phaffii* é uma das abordagens mais bem-sucedidas para expressão de proteínas heterólogas, como as LPMOs. É possível observar que além da utilização de leveduras, há relatos utilizando a bactéria *Escherichia coli* como hospedeira para produção da proteína, porém, a expressão é melhor sucedida em leveduras, pois a mesma secreta a proteína expressa.

Tabela 3 - Microrganismos capazes de produzir LPMOs recombinantes e suas respectivas condições de crescimento e indução.

Microrganismo recombinante	Proteína Heteróloga Expressa	Microrganismo de Origem	Meio de Cultura	Volume e Condições de Fermentação	Indutor	Referência
<i>Komagataella phafii</i> GS115	AkGH61A	<i>Aspergillus kawachii</i>	BMGY 2%	Batelada alimentada biorreator de 2 L; 30°C; 500 rpm.	Metanol 100%	KOSEKI <i>et al.</i> , 2007
<i>K. phafii</i> X-33	PcGH61B e PcGH61E	<i>Penicillium chrysosporium</i>	BMGY 1%	Erlenmeyers de 500 mL; 30°C.	Metanol 0,5% (v/v)	DIMAROGONA <i>et al.</i> , 2012
<i>K. phafii</i> X-33	NcLPMO9C	<i>Neurospora crassa</i>	Meio de sais basal	Biorreator de 7L; 30°C; 800 rpm.	Metanol 0,5% (v/v)	ISAKSEN <i>et al.</i> , 2013
<i>K. phafii</i> X-33	NcLPMO9F	<i>N. crassa</i>	BMGY e BMMY	Batelada alimentada; Biorreator de 7L; 25°C; 4% de OD.	Metanol puro	TAN <i>et al.</i> , 2015.
<i>K. phafii</i> CBS7435	TrCel61A	<i>Trichoderma reesei</i>	BMGY e BMMY	Erlenmeyers de 250 mL; 30° C; 200 rpm.	Metanol 0,5% (v/v)	TANGHE <i>et al.</i> , 2015.
<i>K. phafii</i> X-33	PsLPMO	<i>Pestalotiopsis sp</i>	BMGY contendo 1 mL/L de sais	Batelada alimentada; Biorreator de 2L; 30°C; 600 rpm.	Metanol 100%	PATEL <i>et al.</i> , 2016
<i>E. coli</i>	TfLPMO10B	<i>Thermobifida fusca</i>	Meio de autoindução	Erlenmeyer haletado; 20°C	Canamicina e ampicilina (100 µg/mL)	ARFI <i>et al.</i> , 2014

<i>E. coli</i>	CgAA10-2	<i>Coptotermes gestroi</i>	LB + canamicina (50 µg/mL)	Erlenmeyer; 37°C; 250 rpm	IPTG 0,5 mmol/L	TRAMONTINA, 2016
<i>E. coli</i>	SmAA10A; ScAA10C; TfAA10B; BlAA10A	<i>Serratia marcescens</i> ; <i>Streptomyces coelicolor</i> ; <i>Thermobifida fusca</i> ; <i>Bacillus licheniformis</i>	LB + ampicilina (50 µg/mL)	30°C, 200 rpm	-	FORSBERG <i>et al.</i> , 2014
<i>K. phaffii</i> X-33	PaLPMO	<i>Podospora anserina</i>	BMGY contendo 1 mL/L de sais	Batelada alimentada; Biorreator de 2L; 20°C; 200 rpm.	Metanol 3%	BENNATI-GRANIER <i>et al.</i> , 2015

Um fator que merece destaque em relação a produção de LPMOs em biorreator, como mostrado na Tabela 3 é a utilização de meios para expressão dessas enzimas, os quais, alguns, são enriquecidos com sais como, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato de cálcio, sulfato de ferro, sulfato de zinco, cloreto de cálcio, entre outros. Portanto seria interessante a avaliação da produção da LPMO de *T. fusca* em diferentes concentrações desses e de outros sais no meio de cultura.

Os parâmetros aeração e agitação também podem ter sido fatores importantes para o sistema de cultivo em biorreator, além da utilização do meio de cultura, que poderia ser testado com outros componentes (BENNATI-GRANIER *et al.*, 2015). O cultivo em biorreator necessita de otimização de parâmetros para produção efetiva da LPMO, uma vez que cada microrganismo possui uma exigência metabólica diferente.

No decorrer do trabalho, foi possível explorar de forma eficiente a expressão de LPMO em sistema de levedura, obtendo-se eficiência na expressão, produção e purificação da proteína heteróloga de interesse com sequência original da bactéria *T. fusca* transformada em *K. phaffii*, relatada pela primeira vez no presente estudo.

6 CONCLUSÕES

- A levedura *Komagataella phaffii* revelou ser um sistema de expressão eficiente para produção da proteína heteróloga LPMO proveniente de *Thermobifida fusca*.
- A primeira vez que se relatou a expressão da LPMO de *T. fusca* pela levedura *K. phaffii*, gerando assim um artigo publicado (ANEXO) este ano pela revista Carbohydrate Resarch.
- Nos ensaios de cultivo a LPMO de *T. fusca* foi detectada por SDS-PAGE e *western blot* nos Erlenmeyers de 250 mL e 1000 mL, porém sua expressão não foi detectada no biorreator de 1 L, necessitando portanto de estudos mais detalhados para que ocorra a produção da enzima em sistemas controlados.
- A purificação da LPMO, realizada através de cromatografia de afinidade, aumentou o grau de pureza da proteína, apresentando uma banda de intensa coloração na faixa de peso molecular esperado (25 kDa).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGER, J. W.; ISAKSEN, T.; VÁRNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G. T.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H.; WESTERENG, B. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **PNAS**, v. 111, n. 17, p. 6287–6292, 2014.

AGUILAR, R., RAMIREZ, J. A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Kinetic Study of the Acid Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse. **Journal of Food Engineerin**, v. 55, pp. 309-318, 2002.

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Komagataella phaffii*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5301-5317, 2014.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, p. 4, 2010.

ARFI, Y.; SHAMSHOUM, M.; ROGACHEV, I.; PELEG, Y.; BAYER, E. A. Integration of bacterial lytic polysaccharide monoxygenases into designer cellulosomes promotes enhanced cellulose degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 25, p. 9109-9114, 2014.

ANDBERG, M.; PENTTILA, M.; SALOHEIMO, M. *Swollenin* from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 105 – 113, 2015.

BALAT, M., BALAT, H., OZ, C. “Progress in Bioethanol Processing”, Progress in Energy and Combustion Science, v. 34, pp. 551-573, 2008.

BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 833-848, 2009.

BEESON, W. T.; PHILLIPS, C. M.; CATE, J. H. D.; MARLETTA, M.A. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monoxygenases. **Journal do The American Chemical Society**, v. 134, p. 890-892, 2012.

BENNATI-GRANIER, C.; GARAJOVA, S.; CHAMPION, C.; GRISEL, S.; HAON, M.; ZHOU, S.; FANUEL, M.; ROPARTZ, D.; ROGNIAUX, H.; GIMBERT, I.; RECORD, E.; BERRIN, J. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monoxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for Biofuels**, 8:90, 2015.

BOKINSKY, G.; PERALTA-YAHYA, P. P.; GEORGE, A.; HOLMES, B. M.; STEEN, E. J.; DIETRICH, J.; LEE, T. S.; TULLMAN-ERCEK, D.; VOIGT, C. A.; SIMMONS,

B. A.; KEASLING, J. D. Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 19949-19954, 2011.

BOLOGNIA, J.; SCHAFFER, J. V.; JORIZZO, J. L. Dermatologia. **Elsevier Brasil**, 3ª edição, p. 70, 2015.

BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, 2013.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.

BRONDYK, W. H. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. **Methods Enzymol**, 463, p. 131–147, 2009.

CASTILLO, J. R.; ALVAREZ, M. M. Effect of Different Agitation Systems and Protocols On the Growth of *Nicotiana Tabacum* Cells: Comparison of Growth Kinetics In Erlenmeyer Flasks, Conventional Stirred Tanks, and Eccentrically Agitated Tank Bioreactors. **Conference: AIChE Annual Meeting**. Minneapolis-Minnesota, 2011.

CASTRO, A. M.; PEREIRA N. JR. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33(1), 181-188, 2010.

CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1108–1118, 2012.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*. **FEMS Microbiology Reviews**, 24, p. 45- 66, 2000.

CGEE. Química Verde no Brasil: 2010-2030. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**. Brasília, DF, 2010.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N.; RICHARD, P. Substrate pre-treatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. **Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg, p. 67-93, 2007.

CHOI, D.; LEE, Y.; CHO, H. T.; KENDE, H. Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic in rice plants. **The Plant Cell**, v. 15, p.1386-1398, 2003.

CHU, S.; MAJUMDAR, A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 294-303, 2012.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D.R. Recombinant protein expression in *Komagataella phaffii*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23, 2000.

CREGG, J. M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPELL, T. Expression in the Yeast *Komagataella phaffii*. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 169- 189, 2009.

DA COSTA SOUSA, L.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 339-347, 2009.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Komagataella phaffii*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18: 119 – 138, 2005.

DEMAIN, L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv** 27: 297 - 306, 2009.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; OLSSON, L.; CHRISTAKOPOULOS, P. Lignin boosts the cellulose performance of a GH-61 enzyme. **Bioresource Technology**, v (110), p. 480-487, 2012.

DING, SHI-YOU.; LIU, YU-SAN.; ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; BAYER, E. A. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility?. **Science**, v. 338, n. 6110, p. 1055-1060, 2012.

EASTWOOD, D. C.; FLOUDAS, D.; BINDER, M.; MAJCHERCZYK, A.; SCNEIDER, P.; AERTS, A.; ASIEGBU, F. O.; BAKER, S. E.; BARRY, K.; BENDIKSBY, M.; BLUMENTRITT, M.; COUTINHO, P. M.; CULLEN, D.; DE VRIES, R. P.; GATHMAN, A.; GOODELL, B.; HENRISSAT, B.; IHRMARK, K.; KAUSERUD, H.; KOHLER, A.; LABUTTI, K.; LAPIDUS, A.; LAVIN, J. L.; LEE, Y. H.; LINDQUIST, E.; LILLY, W.; LUCAS, S.; MORIN, E.; MURAT, C.; OQUIZA, J. A.; PARK, J.; PISABARRO, A. G.; RILEY, R.; ROSLING, A.; SALAMOV, A.; SCHMIDT, O.; SCHMUTZ, J.; SKREDE, I.; STENLID, J.; WIEBENGA, A.; XIE, X.; KUES, U.; HIBBETT, D. S.; HOFFMEISTER, D.; HOGBERG, N.; MARTIN, F.; GRIGORIEV, I. V.; WATKINSON S. C. The plant cell wall decomposing machinery underlines the functional diversity of forest fungi. **Science**, v. 333, p. 762-765, 2011.

EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C.H.; CHRISTENDAT, D.; DHARAMSI, A.; FRIESEN, J.D.; GREENBLATT, J. F.; VEDADI, M. Protein production: Feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. **Nat. Struct. Biol. Suppl.**, v. 7, p. 970-972, 2000.

EIBINGER, M.; GANNER, T.; BUBNER, P.; ROŠKER, S.; KRACHER, D.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R.; PLANK, H.; NIDETZKY, B. Cellulose Surface Degradation by a Lytic Polysaccharide Monooxygenase and Its Effect on Cellulase Hydrolytic Efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, 289(52): 35929–35938, 2014.

FÁVARO, L.C.L.; POLETTO, C.M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: Cristina Maria Monteiro Machado. (Org.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. 1ª Ed. Curitiba: Editora Íthala, p. 35-79, 2013.

FEITOSA, V. A. Produção de fragmento recombinante de anticorpo em *Komagataella phafii*. **Dissertação**, USP, 84 p., 2014.

FÉLIX, W. P. Produção heteróloga de frutalina em *Komagataella phafii*. **Tese**, UFC, 114 p., 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, p. 613, 1983.

FERREIRA, G. S. Expressão recombinante e caracterização funcional da β -amilase de banana produzida em *Komagataella phafii*. **Dissertação**, USP, 50 p., 2013.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BOM, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 65-76, 2010.

FORSBERG, Z.; RØHR, A. K.; MEKASHA, S.; KRISTOFFER, K. A.; EIJSINK, V. G. H.; VAAJE-KOLSTAD, G.; SØRLIE, M. Comparative Study of Two Chitin-Active and Two Cellulose-Active AA10-Type Lytic Polysaccharide Monooxygenases. **Biochemistry**, 53, 1647–1656, 2014.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108:41-65, 2007.

GAO, J.; YUANA, W.; KONGB, L.; XIANGA, R.; ZHONG, S. Efficient ethanol production from inulin by two-stage aerate strategy. **Biomass and Bioenergy**, v. 80, p. 10-16, 2015.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 3, p. 211-218, 2002.

GURKAN, C.; ELLAR, D. J. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Komagataella phafii*. **Microbial Cell Factories**, 4:33, 2005.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1207-1218, 2012.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pre-treatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100 (1), p. 10-18, 2009.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Journal of Biotechnology**, 78: 93-11, 2000.

HERMSWORTH, G. R.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J.; WALTON, P. H. Discovery and characterization of a new family of litiv polysaccharide monooxygenases. **Nature**, v. 10, p. 122-129, 2013.

HIMMEL, M. E.; DING, SHI-YOU.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HOFFMANN, F.; VAN DEN HEUVEL; J., ZIDEK, N.; RINAS, U. Minimizando a formação de corpos de inclusão durante a produção de proteína recombinante em *Escherichia coli* em banco e escala de planta piloto. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3, p. 235-241, 2004.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5 (45), p. 1-13, 2012.

HUAND, J.; TAKANO, T.; AKITA, S. Expression of α -expansin gene in young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v. 211, p. 467-473, 2000.

IEA. *Potential contribution of bioenergy to the world's future energy demand*. **IEA Bioenergy**, 2007:02, 2007.

INVITROGEN. **Pichia Expression Kit**. For Expression of Recombinant Proteins in *Komagataella phaffii*. Catalog no. K1710-01, 2009.

ISAKSEN, T.; WESTERENG, B.; AACHMANN, F. L.; AGGER, J. W.; KRACKER, D.; KITTL, R.; LUDWING R.; HALTRICH, D.; EIJSINK, V. G. A C4-oxidizing Lytic Polysaccharide Monooxygenase Cleaving Both Cellulose and Cello-oligosaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289 (5), p. 2632-2642, 2014.

JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C. E. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pre-treatment processes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 81-96, 2000.

KERRISON, P. D.; STANLEY, M. S.; EDWARDS, M. D.; BLACK, K. D.; HUGHES, A. D. The cultivation of European kelp for bioenergy: Site and species selection. **Biomass and Bioenergy**, v. 80, p. 229-242, 2015.

KIM, I. J., LEE, H. J., CHOI, I.-G. & KIM, K. H. Synergistic Proteins for the Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose by Cellulase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8469-8480, 2014.

KIM, T. H.; CHOI, C. H.; OH, K. K. Bioconversion of sawdust into ethanol using dilute sulfuric acid-assisted continuous twin screw-driven reactor pre-treatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource technology**, v. 130, p. 306-313, 2013.

KIM, T. H.; KIM, J. S.; SUNWOO, C.; LEE, Y. Y. Pre-treatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 1, p. 39-47, 2003.

KIM, T. H.; LEE, Y. Y. Fractionation of corn stover by hot-water and aqueous ammonia treatment. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 224-232, 2006.

KIM, T. H.; LEE, Y. Y. Pre-treatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 1-12, p. 81-92, 2007.

KITTL, R.; KRACHER, D.; BURGSTALLER, D.; HALTRICH, D.; LUDWING, R. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Komagataella phaffii* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5 (79), p. 1-14, 2012.

KOSEKI, T.; MESE, Y.; FUSHINOBU, S.; MASAKI, K.; FUJII, T.; ITO, K.; SHIONO, Y.; MURAYAMA, T.; IEFUJI, H. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 1279-1285, 2007.

KRAINER, F. W.; DIETZSCH, C.; HAJEK, T.; HERWIG, C.; SPADIUT, O.; GLIEDER, A. Recombinant protein expression in *Komagataella phaffii* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, 11, p. 22, 2012.

LANGSTONE, J. A.; SHAGHASI, T.; ABBATE, E.; XU, F.; VLASENKO, E.; SWEENEY, M. D. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77 (19), p. 7007-7015, 2011.

LEE, S. K.; CHOU, H.; HAM, T. S.; LEE, T. S.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 556-563, 2008.

LEVASSEUR, A.; ELODIE, D.; LOMBARD, V.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, 6:41, 2013.

LI, X.; BEESON, W. T.; PHILLIPS, C. M.; MARLETTA, M. A.; CATE, J. H. D. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. **Structure**, 20(6), 1051-1061. 2012.

LIGNIN INSTITUTE (2006). Disponível em <http://www.lignin.org/about.html>. Acesso em maio de 2017.

LUNARDI, J. Produção da proteína recombinante estreptoquinase (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) em biorreator utilizando diferentes estratégias de batelada alimentada. **Dissertação**, PUCRS, 79 p, 2011.

LYND, L. R.; ELAMDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 741-761, 1996.

LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H.; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577-583, 2005.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Komagataella phaffii* expression system. **Yeast**, 22, p. 249-270, 2005.

MAZZOLI, R.; LAMBERTI, C.; PESSIONE, E. Engineering new metabolic capabilities in bacteria: lessons from recombinant cellulolytic strategies. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 111-119, 2012.

MCQUEEN-MASON, S., DURACHKO, D. M., & COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **The Plant Cell**, 4(11), 1425-1433, 1992.

MICHALSKA, K.; BIZUKOJĆ, M.; LEDAKOWICZ, S. Pre-treatment of energy crops with sodium hydroxide and cellulolytic enzymes to increase biogas production. **Biomass and Bioenergy**, v. 80, p. 213-221, 2015.

MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B.; ARAÚJO, E. G. *Western Blotting*: a técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1704-1719, 2012.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MURALEEDHARAN, M. N.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; SANDGREN, M. Enhanced release of oxidized sugars by Lytic Polysaccharide Monooxygenases, by the effect of synergistic action with endoglucanases. **38th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, 2016.

NOTENBOOM, V.; BORASTON, A. B.; CHIU, P.; FREELOVE, A. C. J.; KILBURN, D. G.; ROSE, D. R. Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: An X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, n. 4, p. 797-780, 2001.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudoeste**, São Carlos, 2007. Disponível: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>. Acesso em: 10 de março de 2017.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pre-treatment to biofuel production. **Bioresource technology**, v. 161, p. 431-440, 2014.

PATEL, I.; KRACHER, D.; MA, S.; GARAJOVA, S.; HAON, M.; FAULDS, C. B.; BERRIN, JEAN-GUY; LUDWIG, R.; RECORD, E. Salt-responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. NCi6. **Biotechnology of Biofuels**, v. 9 (108), p. 1754-1762, 2016.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; ANNA, L. M. M. S. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, v.2, Rio de Janeiro: UFRJ, Ed. Amiga Digital, 45 p., 2008.

PHILLIPS, C. M.; BEESON, W. T.; CATE, J. H.; MARLETTA, M. A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chemical Biology**, v. 5, p. 1399-1406, 2011.

PINHEIRO, B. A. Novel insight into the mechanism of cellulosome assembly and plant cell wall hydrolysis in anaerobic bacteria. Universidade Técnica de Lisboa. **Tese de doutorado**, 140 p., 2009.

POPE, B.; KENT, H. M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, vol. 24, n. 3, 1996.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Komagataella phaffii*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, 64, p. 91-105, 2012.

QUINLAN, R. J.; SWEENEY, M. D.; LEGGIO, L. L.; OTTEN, H.; POULSEN, J.-C. N.; JOHANSEN, K. S.; KROGH, K. B. R. M.; JORGENSEN, C. I.; TOVBORG. M.; ANTHONSEN, A.; TRYFONA, T.; WALTER, C. P.; DUPREE, P.; XU, F.; DAVIES, G. J.; WALTON, P. H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108(37), 2011.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, W. J. Jr.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. **In:Seminário nacional sobre reuso/reciclagem de resíduos sólidos industriais**. São Paulo: Cetesb, 2000.

SACHS, I. Da civilização do petróleo a uma nova civilização verde. **Estudos avançados**, v. 19, n. 55, p. 195-214, 2005.

SAHA, T.; GHOSH, D.; MUKHERJEE, S.; BOSE, S.; MUKHERJEE, M. Cellobiose dehydrogenase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus*. **Process Biochemistry**, v.43, p. 634 – 641, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, v. 6 (242), p. 1-11, 2005.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, 35(5), 1004-1010, 2012.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1823-1828, 1997.

SHOSEYOV, O.; SHANI, Z.; LEVY, I. Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 70(2):283-295, 2006.

SOARES, I. B., TRAVASSOS, J. A., BAUDEL, H. M., BENACHOUR, M., ABREU, C. A. M. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 33, pp. 670–675, 2011.

SOUSA, L. C.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. Cradle-to-Grave Assessment of Existing Lignocellulose Pretreatment Technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 339-347, 2009.

SPADIUT, O.; CAPONE, S.; KRAINER, F.; GLIEDER, A.; HERWIG, C. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in Biotechnology**, 32(1), p. 54- 60, 2014.

STUCHBURY G, MÜNCH G. Optimização da geração de linhas celulares neuronais estáveis através da digestão com enzima de restrição pré-transfecção do ADN plasmídico. **Cytotechnology**, 62 (3): 189-194, 2010.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource. Technology**, 83, 1-11, 2002.

TAN, T. C.; KRACHER, D.; GANDINI, R.; SYGMUND, C.; KITTL, R.; HALTRICH, D.; HALLBERG, B. M.; LUDWIG, R.; DIVNE, C. Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. **Nature Communications**, v. 6, p. 2041-2053. 2015.

TANGHE, M.; DANNEELS, B.; CAMATTARI, A.; GLIEDER, A.; VANDENBERGHE, I.; DEVREESE, B.; STALS, I.; DESMET, T. Recombinant Expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Komagataella phaffii*: Optimizing Yield and N-terminal Processing. **Molecular Biotechnology**, v. 57(11), p. 1010-1017. 2015.

- TRAMONTINA, R. Characterization of auxiliary (redox) enzymes from the termite *coptotermes gestroi* that cooperate with glycolytic hydrolases. **Tese**, Unicamp, 156 p., 2016.
- TERRAZAS, W. D. M.; AIZEMBERG, R.; GATTÁS, E. A. L. Using *Komagataella phaffii* to produce recombinant glycerol kinase. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 279-284, 2014.
- TUCK, C. O.; PÉREZ, E.; HORVÁTH, I. T.; SHELDON, R. A.; POLIAKOFF, M. Valorization of biomass: deriving more value from waste. **Science**, v. 337, n. 6095, p. 695-699, 2012.
- VAAJE-KOLSTAD, G.; FORSBERG, Z.; LOOSE, J. S. M.; BISSARO1, B.; EIJSINK, V. G. H. Structural diversity of lytic polysaccharide monoxygenases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 44, Pages 67–76, 2017.
- VAZ, M. R. F. Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. Chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator. **Tese**, UFRN, 128 p., 2011.
- VERMAAS, J. V.; CROWLEY, M. F.; BECKHAM, G. T.; PAYNE, C. M. Effects of lytic polysaccharide monoxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulose. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 119, p. 6129-6143, 2015.
- VIDAL, L.; FERRER, P.; ALVARO, G.; BENAIGES, M. D.; CAMINAL, G. Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase production by *Escherichia coli* using the T5 promoter. **Journal of biotechnology**, v. 118, n. 1, p. 75-87, 2005.
- VOLYNETS, B.; EIN-MOZAFFARI, F.; DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. **Green Processing and Synthesis**, v. 6, p. 1–22, 2016. Disponível: <<https://www.degruyter.com/view/j/gps.2017.6.issue-1/gps-2016-0017/gps-2016-0017.xml>> Acesso em: 09 de março de 2017. <https://doi.org/10.1515/gps-2016-0017>.
- VU, V. V.; BEESON, W. T.; PHILLIPS, C. M.; CATE, J. H. D.; MARLETTA, M. A. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monoxygenases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 562-565, 2014.
- WALDRON, K. W. Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass. **Elsevier**, 2010.
- WALKER, J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. **Cambridge University Press**, 7th edition, p. 398, 2010.
- WALTON, P. H., DAVIES, G. J. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monoxygenases. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2016.

WANG, W.; LIU, C.; MA, Y.; LIU, X.; ZHANG, K.; ZHANG, M. Improved production of two expansin-like proteins in *Komagataella phaffii* and investigation of their functional properties. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 84, p. 16-27, 2014.

WEGNER, G. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, 7, p. 279- 283, 1990.

WEINACKER, D.; RABERT, C.; ZEPEDA, A. B.; FIGUEROA, C. A.; PESSOA, A.; FARÍAS, J. C. Applications of recombinant *Komagataella phaffii* in the healthcare industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44 (4), p. 1043-1048, 2013.

WESTERENG, B.; AGGER, J. W.; HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; ASCHMANN, F. L.; STRENSTROM, Y. H.; EIJSINK, V. G. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, p. 144-152, 2013.

WESTERMARK, U.; ERIKSSON, K. E. Cellobiose: quinone oxido reductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. **Acta Chem. Scand.** B 28, 209–214, 1974.

YOO, C. G.; LEE, C. W.; KIM, T. H. Optimization of two-stage fractionation process for lignocellulosic biomass using response surface methodology (RSM). **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 12, p. 4901-4909, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.). **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.

ZHENG, Y.; LIN, H.-M.; TSAO, G. T. Pre-treatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 6, p. 890-896, 1998.

ZIFCAKOVA, L.; BALDRIAN, P. Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. **Fungal Ecology**, v. 5, p. 481-489, 2012.



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carres

Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization

Kelly B. Rodrigues^{a, **}, Jéssica K.A. Macêdo^a, Tallyta Teixeira^{a, b}, Jéssica S. Barros^a, Ana C.B. Araújo^a, Fernanda P. Santos^{a, b}, Betânia F. Quirino^a, Bruno S.A.F. Brasil^a, Thaís F.C. Salum^a, Patrícia V. Abdelnur^{a, c}, Léia C.L. Fávoro^{a, *}

^a Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Agroenergy, W3 Norte, PqEB, 70770-901, Brasília, DF, Brazil

^b Federal University of Tocantins, Campus Gurupi, 77402-970, Gurupi, TO, Brazil

^c Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2017

Received in revised form

7 April 2017

Accepted 7 April 2017

Available online xxx

Keywords:

E7 LPMO

Codon-optimized

Pichia pastoris

Mass spectrometry

ABSTRACT

The discovery of lytic polysaccharides monooxygenases copper dependent (LPMOs) revolutionized the classical concept that the cleavage of cellulose is a hydrolytic process in recent years. These enzymes carry out oxidative cleavage of cellulose (and other polysaccharides), acting synergistically with cellulases and other hydrolases. In fact, LPMOs have the potential for increasing the efficiency of the ligno-cellulosic biomass conversion in biofuels and high value chemicals. Among a small number of microbial LPMOs that have been characterized, some LPMOs were expressed and characterized biochemically from the bacteria *Thermobifida fusca*, using the host *Escherichia coli*. In this work, the E7 LPMO protein of *T. fusca* was expressed both in *E. coli* (native DNA sequence) and *Pichia pastoris* (codon-optimized DNA sequence), for further analysis of oxidative cleavage, with PASC (phosphoric acid swollen cellulose) and Avicel PH-101 substrates, using mass spectrometry analysis. Mass spectra results of Avicel PH-101 and PASC cleavages by purified E7 LPMO expressed in *E. coli* and in *P. pastoris* allowed the visualization of compounds corresponding to oxidized and non-oxidized oligosaccharides. Further optimization of reactions will be performed, since it was found only one degree of polymerization (DP 7). This work demonstrated that it is possible to produce the E7 LPMO from *T. fusca* in the host *P. pastoris*, and the recombinant protein was shown to be active on cellulose. The approach used in the present work could be an alternative to produce this bacterial LPMO for cellulose cleavage.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.