

Avaliação da viabilidade e expressão de proteínas heterólogas em linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii* X-33

Moreschi, L.A.¹, Rodrigues, K. B. ²,Fávaro, L.C ³, Quirino, B.F ⁴, Noronha, E. F ⁵

¹Programa de pós-graduação em biologia microbiana da Universidade de Brasília - leticiamoreschialves@gmail.com

²Embrapa Agroenergia - kellybiobarreto@gmail.com

³Embrapa Agroenergia - leia.favaro@embrapa.br

⁴Embrapa Agroenergia - betania.quirino@embrapa.br

⁵Universidade de Brasília - elinoronha@gmail.com

Resumo

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii* X-33 expressando expansinas e mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), visando à sua futura aplicação em coquetéis enzimáticos voltados à nutrição animal. Foram realizadas a reativação, a preservação e a avaliação da expressão proteica das linhagens recombinantes. 21 linhagens que estavam preservadas por nove anos em ultracongelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram reativadas, e suas viabilidades foram confirmadas em meio YPD suplementado com zeocina (100 $\mu\text{g/mL}$). Todas apresentaram crescimento satisfatório e ausência de contaminação, evidenciando a eficiência do método de conservação e a manutenção da estabilidade genética após longo período de armazenamento. O estoque de trabalho foi refeito a partir de cultivos líquidos adicionados de glicerol 60% como crioprotetor e armazenados novamente em ultrafreezer. Onze dessas 21 linhagens foram avaliadas quanto à produção das proteínas heterólogas, os cultivos foram realizados em meio indutivo (BMGY/BMMY) contendo metanol a 2%, conforme protocolo descrito no *EasySelect™ Pichia Expression Kit Manual*. Após a indução, o sobrenadante foi coletado, concentrado aproximadamente seis vezes em um *Amicon® Stirred Cells* com membrana de 5 KDa e submetido à análise por SDS-PAGE. Os resultados demonstraram que três das linhagens avaliadas produtoras de LPMOs de *Trichoderma reesei*, *Colletotrichum graminicola* e *Botryobasidium botryosum* e quatro linhagens produtoras de expansinas do *Saccharum complex*, apresentaram expressão satisfatória das proteínas-alvo, todas essas transformadas com o vetor pPICZB. Os géis revelaram bandas bem definidas nas amostras concentradas, confirmando a expressão das proteínas recombinantes. Outras quatro linhagens produtoras de LPMOs transformadas com genes de *Thermobifida fusca*, *Agarivorans albus* e *Hahella ganghwensis*, também cultivadas em meio indutivo e transformadas com o vetor pPICZ α A, não apresentaram produção

satisfatória, possivelmente devido ao baixo número de células no inóculo. No entanto, uma das linhagens transformadas com gene de LPMO de *T. fusca*, exibiu produção discreta, aquém do esperado. Esses resultados indicam a necessidade de ajustes nas condições de cultivo e indução para otimização da expressão. De modo geral, os dados obtidos até o momento comprovam a viabilidade e a integridade genética das linhagens após longo período de conservação e demonstram o potencial do sistema de expressão em *K. phaffii* X-33 para a produção estável de expansinas e LPMOs recombinantes. Para as próximas etapas, espera-se analisar a produção das dez linhagens restantes e verificar se o sítio ativo das enzimas está funcional.

Palavras-chave: Enzimas; Preservação microbiana; Expressão; Estabilidade genética.

Referências:

INVITROGEN. EasySelect™ Pichia Expression Kit: user manual. Carlsbad: Invitrogen Corporation, 2010. 124 p.