UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JOSMAN ANDREY VELASCO MENDOZA

Expressão heteróloga, análise bioquímica e avaliação da produção fermentativa de uma enzima exo-arabinanase da família GH93

Lorena
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JOSMAN ANDREY VELASCO MENDOZA

Expressão heteróloga, análise bioquímica e avaliação da produção fermentativa de uma enzima exo-arabinanase da família GH93

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de microbiologia aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Corrigida

Lorena

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Velasco Mendoza, Josman Andrey
Expressão heteróloga, analise bioquímica e avaliação da produção fermentativa de uma enzima exo arabinanase da família GH93 / Josman Andrey Velasco Mendoza; orientador Fernando Segato - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
109 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Exo-alfa-1,5-arabinanase. 2. Expressão heteróloga. 3. Asperguillus nidulans. 4. Fermentação fúngica. I. Título. II. Segato, Fernando, orient.

Dedicado a minha família Benjamin Velasco, Helena Mendoza, Ferney, Jilmer, Johan.

A meus sogros Luís Emiro Quintero e Betsabe Mora e especialmente a.... "mi cielito lindo".

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o entendimento e a capacidade para desenvolver este trabalho e por me rodear de pessoas que enriquecem minha vida.

A minha esposa, amiga, colega e companheira pelo seu apoio nesta aventura fora do nosso país, e por ser o motor que me motiva cada dia a ser melhor.

Aos meus Pais e meus irmãos que renunciaram a muitas coisas para me dar a oportunidade de receber uma educação superior e sempre acreditaram em mim.

A meu orientador, Fernando Segato por me transmitir seus conhecimentos e contribuir a minha formação acadêmica, obrigado pela confiança e amizade.

A todo o grupo do laboratório de biologia sintética e molecular, pelo excelente clima de trabalho, pela parceria e por enriquecer meu conhecimento da língua portuguesa.

À EEL-USP e seus docentes que me brindaram as ferramentas necessárias para meu crescimento científico.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) de São Paulo e ao doutor Alfredo Maiorano, que permitiu participar como membro de sua equipe de trabalho e como parte dos novos talentos do IPT.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

VELASCO MENDOZA, J. A. **Expressão heteróloga, análise bioquímica e avaliação da produção fermentativa de uma enzima exo-arabinanase da família GH93.** 2018. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena - SP

Segundo a classificação CAZy (*Carbohydrate Active enZymes*), as glicosil hidrolases (GH) da família 93 são exo-α-1,5-arabinanases que atuam nas ligações α-1,5 que unem os resíduos de L-arabinofuranosideo que conformam a cadeia principal de arabinana desramificada, liberando arabinose ou arabinobiose. Esta recém descrita família de enzimas, além de ter o potencial de participar junto com outras proteínas na sacarificação de resíduos industriais como a polpa de beterraba, oferece a possibilidade de sintetizar novas moléculas, pois alguns membros desta família podem catalisar reações de transarabinosilação utilizando glicerol, xilitol e sorbitol como aceptores. Embora as GH93 apresentem caraterísticas atrativas para aplicações industriais, até o momento apenas cinco enzimas desta família foram caraterizadas bioquimicamente, sendo que a maioria delas apresentou maior atividade em pHs ácidos e nenhuma com caraterísticas termofílicas. Neste trabalho uma exo-α-1,5-arabinanase *abn*t do fungo termofílico *Thielavia terrestris* foi expressa heterólogamente pela primeira vez em fungo filamentoso, utilizando *Aspergillus nidulans* linhagem A773 transformado com o vetor pEXPYR como sistema de expressão. A enzima foi caraterizada bioquimicamente e sua produção fermentativa avaliada, utilizando dois tipos de indutores em diferentes concentrações e condições de cultivo, escolhendo a melhor condição para o escalonamento. A proteína recombinante de 39,8 KDa mostrou ser uma glicoproteína com uma atividade especifica de 248 $U.mg^{-1}$ em arabinana desramificada 0,28 mM, pH 5 e temperatura de 70 °C (valores ótimos para enzima), um K_m 0,29 mM, V_{max} 0,45 $\mu mol.min^{-1}$, K_{cat} 115,4 s^{-1}, e eficiência catalítica de 3,9 $*10^5$ s^{-1} M^{-1}, mostrando também um aumento de 34% na liberação de produto quando incubada na presença de $CoCl_2$ 1mM. Esta é a primeira exo-arabinanase reportada na literatura com comportamento termofílico e prolongada estabilidade em pHs ácidos. No processo fermentativo a melhor produção de *abn*t foi atingida usando 3% (m/v) do indutor em condições de cultivo submerso, o escalonamento do processo não afetou a produção enzimática. O sistema de expressão *A. nidulans*+pEXPYR foi capaz de produzir a mesma quantidade de proteína recombinante utilizando como indutor, um composto cinquenta vezes mais barato que o normalmente utilizado.

Palavras-chave: Exo-α-1,5-arabinanase. Expressão heteróloga. *Aspergillus nidulans*. Fermentação fúngica.

ABSTRACT

VELASCO MENDOZA, J. A. **Heterologous expression, biochemical analysis and evaluation of the fermentative production of an exo-arabinanase enzyme of the GH93 family.** 2018. 109 p. Dissertation (Master in Sciences) - Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP.

According to CAZy (Carbohydrate Active enZymes) classification, glycosyl hydrolases (GH) from family 93 are exo-α-1,5-arabinanases acting on α-1,5 bonds that bind L-arabinofuranose residues in the main chain of arabinan releasing arabinose or arabinobiose. This new family of enzymes was described recently and, besides having the potential to participate along with other proteins in the saccharification of agro industrial wastes such as sugar beet pulp, offers the possibility of synthesize new molecules, since some members of this family can catalyze reactions of transarabinosylation using glycerol, xylitol and sorbitol as acceptors. Although, GH93 presents attractive characteristics for industrial applications, only five enzymes have been characterized biochemically so far, most of them presenting higher activity in acidic pHs and none with thermophilic characteristics. In this work an exo-α-1,5-arabinanase *abn*t of the thermophilic fungus *Thielavia terrestris* was heterologously expressed for the first time in a filamentous fungus using *Aspergillus nidulans* strain A773 transformed with the pEXPYR vector as expression system. The enzyme was characterized biochemically and its fermentative production was evaluated using two types of inducers in different concentrations and conditions of cultivation, setting the best condition for scale up. The recombinant protein of 39.8 KDa showed be a glycoprotein with a specific activity of 248 U.mg-1 in 0.28 mM debranched arabinana at pH 5 and temperature of 70 °C (optimum values for enzyme), a K_m 0, 29 mM, V_{max} 0.45 µmol.min^{-1}, K_{cat} 115.4 s^{-1}, and catalytic efficiency of 3.9 * 105 s^{-1} M^{-1}, also showed an increase of 34% in product release when incubated in the presence of 1 mM $CoCl_2$. This, is the first exo-arabinanase reported in the literature with thermophilic behavior and prolonged stability at acidic pHs. In the fermentation process the best *abn*t production was achieved using 3% (m/v) of the inducer under submerged culture conditions, and the scaling process did not affect the enzymatic production. The *A. nidulans*+pEXPYR expression system was able to produce the same amount of recombinant protein using as an inducer, a compound fifty fold less expensive then the normally used.

Keywords: Exo-α-1,5-arabinanase. Heterologous expression. *Asperguillus nidulans.* Fungal fermentation.

LISTA DE ABREVIATURAS

*Abn*t	Exo-α-1,5-arabinanase de *Thielavia terrestris*
ABNt	Gene codificante da enzima GH93 do fungo *Thielavia terrestris*
ABNm	Gene codificante da enzima GH93 do fungo *Myceliophthora thermophila*
Abnx	Enzima GH93 de *Penicillium chrysogenum*
Abn2	Enzima GH93 de *Chrysosporium lucknowense*
Arap2	Enzima GH93 de *Penicillium purpurogenum*
Arb93A	Enzima GH93 de *Fusarium graminearum*
ARN3	Enzima GH93 produto de estudos metagenômicos
aw	Atividade de água
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BNR	*Bacterial Neuramidase Repeat*
CAZy	Carbohydrate Active enZymes
CBM	Módulo de ligação a carboidratos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalisilico
DP	Grau de polimerização
DSPS	*Double strength protoplasting solution*
GA	*Gibson Assembly*
GE	*General electric*
GH3	Glicosil hidrolases família 3
GH43	Glicosil hidrolases família 43
GH51	Glicosil hidrolases família 51
GH54	Glicosil hidrolases família 54
GH62	Glicosil hidrolases família 62
GH93	glicosil hidrolase família 93
Glu	Glutamina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IDT	*Integrated DNA Technologies*
Kcat	*Turn over number*
KDa	Kilo Dalton

Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	*National Center for Biotechnology information*
ng	Nanograma
PCR	*Polimerase Chain Reaction*
PEG	Polietilenoglicol
pyrG	Gene que codifica a orotidina-5´-monofosfato descarboxilase de *A. niger*
s	Segundo
SBP	*Sugar beet pulp*
SmF	*Submerged fermentation*
SSF	*Solid state fermentation*
STC	*Sorbitol Tris Calcium solution*
TBR	*Trickle bed reactor*
Tm	Temperatura de melting
tRNA	RNA de transferência
µg	Micrograma
µL	Microlitro
vvm	Volume de ar /volume de meio/minuto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da degradação enzimática de polímeros de L-arabinose 23

Figura 2 – Estrutura e mecanismo de ação da proteína Arb93A. 25

Figura 3 - Estrutura proposta por Sakamoto para o composto resultante da arabinobiosilação da molécula de glicerol. 27

Figura 4 - Comparação entre produção natural e heteróloga de biomoléculas. ...29

Figura 5 - Esquematização da metodologia de *Gibson Assembly* 47

Figura 6 - Árvore filogenética das sequências de proteínas exo-arabinanases. ..54

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o produto de PCR após a amplificação dos genes de interesse. 56

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação dos genes ABNm (A) e ABNt (B), após do PCR de colônia.....57

Figura 9 - SDS-PAGE mostrando o perfil proteico dos extratos obtidos a partir do cultivo de sete colônias de *A. nidulans* A773 transformado com o vetor contendo o gene ABNm após dois dias de cultivo. 58

Figura 10 – SDS-PAGE mostrando o perfil proteico dos extratos obtidos a partir do cultivo das 8 colônias transformantes de *A. nidulans* A773 com o gene ABNt após dois dias de cultivo. 59

Figura 11 – Resultados obtidos por espectrometria de massas das proteínas heterólogas produzidas pelos organismos recombinantes. 60

Figura 12 – Etapas utilizadas no processo de purificação enzimática. 69

Figura 13 - SDS-PAGE mostrando a comparação das proteínas *abn*t glicosilada e desglicosilada.....70

Figura 14 – Gráficos de pH (A) e temperatura (B) para enzima *abn*t. 72

Figura 15 – Estabilidade térmica e estabilidade a diferentes pHs da enzima *abn*t. 73

Figura 16 – Determinação dos parâmetros cinéticos para *abrn*t. 75

Figura 17 – Efeito exercido por tampões (A), íons (B), e diferentes concentrações de Ca^{2+} e Co^{2+} (C), sobre atividade hidrolítica de *abrn*t. 77

Figura 18 – Produção da proteína *abrn*t (A) e proteínas totais (B) nos diferentes tratamentos em estado estacionário. 87

Figura 19 – Comportamento da produção de melanina (A) e pH (B) para todos os tratamentos em estado estacionário e comparação dos melhores tratamentos para HIGH (C) e SIGMA (D) maltoses. 88

Figura 20 – Géis de SDS-PAGE para todos os tratamentos em estado estacionário para 48, 56 e 72 h, em 24 h a quantidade de proteína secretada não foi detectada pela técnica (dados não mostrados). 89

Figura 21 – Produção de proteínas totais (A) e *abrn*t (B) nos tratamentos com agitação. 90

Figura 22 – Comportamento da produção de melanina (A) e pH (B) para todos os tratamentos com agitação e comparação dos melhores tratamentos para HIGH (C) e SIGMA (D) maltoses. 92

Figura 23 – Géis de SDS-PAGE para todos os tratamentos com agitação para 24, 48, 56 e 72 h. 93

Figura 24 – Consumo de substrato, produção de proteína, melanina, proteases e comportamento do pH no biorreator. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições utilizadas para amplificação dos genes mediante a técnica de PCR. 44

Tabela 2 – Condições utilizadas para amplificação do vetor. 46

Tabela 3 – Condições utilizadas para PCR de colônia. 49

Tabela 4 – Quantidade de aminoácidos que compõem as estruturas *propeller* dentro da superfamília sialidase não viral. 53

Tabela 5 – Proteínas selecionadas para expressar heterólogamente em *A. nidulans* A773, a região sublinhada (apresentada nos primeiros 29 aminoácidos da sequência) corresponde ao peptídeo sinal. 55

Tabela 6 – Sequências dos *primers* utilizados na amplificação e clonagem dos genes de interesse, as regiões mostradas em negrito, correspondem as caudas acrescentadas para a inserção do gene ao vetor pEXPYR pela metodologia de *Gibson Assembly*. 56

Tabela 7 – Atividade enzimática sobre diferentes substratos. 70

Tabela 8 – Comparação da eficiência catalítica das enzimas: Abnx de *P. chrysogenum*, Arb93A do *F. graminearum* e *abn*t recombinante de *T. terrestris*..76

Tabela 9 – Comparação entre diferentes GH93 reportadas na literatura e *abn*t ..79

Tabela 10 – Nomenclatura utilizada para distinguir os diferentes tratamentos avaliados nas fermentações com e sem agitação.....83

Tabela 11 – Rendimentos, biomassa e atividade volumétrica final atingida para todos os tratamentos em estado estacionário.....89

Tabela 12 – Rendimentos, biomassa e atividade volumétrica final atingida para todos os tratamentos em agitação. 94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....22
2.1 Arabinanases.....22
2.2 Exo-α-L-1,5-arabinanases (GH 93).....24
2.2.1 Aplicações.....25
2.3 Fungos e enzimas termofílicas.....27
2.4 Expressão heteróloga.....28
2.4.1 Expressão heteróloga em fungo filamentoso.....30
2.5 Produção de enzimas por fermentação.....33
2.5.1 Fermentações em estado solido (SSF) e fermentações submersas (SmF).....34
2.5.2 Morfologia fúngica na fermentação.....35
2.5.3 Produção de proteases.....36
2.5.4 Produção de melanina.....38
3 OBJETIVO GERAL.....39
3.1 Objetivos específicos.....39
4 ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO.....40
5 PROSPECÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE DUAS ENZIMAS GH93 EM *Aspergillus nidulans*.....41
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....42
5.1.1 Análise filogenética e seleção das sequências proteicas.....42
5.1.2 Construção dos oligonucleotídeos (*primers*).....43
5.1.3 Clonagem dos genes.....43
5.1.4 Vetor de transformação e expressão.....45
5.1.5 Inserção do gene de interesse ao vetor.....46
5.1.6 Transformação bacteriana.....47
5.1.7 PCR de colônia.....48
5.1.8 Purificação dos plasmídeos.....49
5.1.9 Transformação fúngica.....49
5.1.10 *Screening* das colônias de *A. nidulans* recombinante.....51
5.2 RESULTADOS.....52
5.2.1 Análise filogenética e seleção das sequências proteicas.....52

5.2.2 Construção dos *primers* e clonagem dos genes 55
5.2.3 Transformação bacteriana e PCR de colônia 57
5.2.4 *Screening* dos transformantes de *A. nidulans* A773 58
5.2.5 Análises por espectrofotometria de massas 60
6 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUIMICA DA ENZIMA *abn*t 62
6.1 MATERIAL E MÉTODOS 63
6.1.1 Produção e purificação enzimática 63
6.1.2 Troca iônica e gel filtração 63
6.1.3 Desglicosilação 64
6.1.4 Painel de substratos 64
6.1.5 pH ótimo 65
6.1.6 Temperatura ótima 65
6.1.7 Termoestabilidade 65
6.1.8 Estabilidade enzimática em diferentes pHs 66
6.1.9 Liberação de produto em relação ao tempo 66
6.1.10 Parâmetros cinéticos 66
6.1.11 Efeito de tampões 67
6.1.12 Efeito de íons 67
6.2 RESULTADOS 67
6.2.1 Purificação enzimática 67
6.2.2 Desglicosilação 69
6.2.3 Painel de substratos 70
6.2.4 pH ótimo, temperatura ótima, termo estabilidade e estabilidade em diferentes pHs 71
6.2.5 Estudos cinéticos da enzima *abn*t 74
6.2.6 Efeito de tampões e íons 76
7 AVALIAÇÃO DE DOIS TIPOS DE MALTOSE A DIFERENTES CONCENTRAÇOES EM CULTIVOS COM E SEM AGITAÇÃO E SEU EFEITO NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DA ENZIMA *abn*t 80
7.1 MATERIAL E MÉTODOS 81
7.1.1 Tipos de indutor e meios de cultivo. 81
7.1.2 Fermentação em estado estacionário 82
7.1.3 Fermentação submersa 82

7.1.4 Parâmetros monitorados no bioprocesso 83
7.1.5 Fermentação em biorreator 84
7.2 RESULTADOS 86
7.2.1 Fermentação em estado estacionário. 86
7.2.2 Fermentação com agitação 90
7.2.3 Fermentação em biorreator 94
8 CONCLUSÕES 98
REFERÊNCIAS 100
APÊNDICE A 108
APÊNDICE B 109

1 INTRODUÇÃO

As arabinanases são consideradas enzimas acessórias que trabalham em conjunto com outras proteínas para uma completa degradação da hemicelulose. As enzimas pertencentes à família GH93 são exo-α-1,5- arabinanases que hidrolisam ligações α-1,5 em arabinana desramificada, sendo relevantes para uma eficiente degradação da arabinana em arabinobiose ou monômeros de L-arabinose, contribuindo ao mesmo tempo, para uma melhor extração da pectina, em resíduos lignocelulósicos de operações industriais como polpa de beterraba.

A polpa de beterraba ou SBP por sua sigla no inglês (*sugar beet pulp*) é um dos subprodutos de atividades agroindustriais gerada no processo de produção de açúcar em países como Chile, Argentina e da União Europeia, onde a indústria açucareira depende deste cultivo, e em países como Estados Unidos e Canadá, onde o tubérculo é uma alternativa de produção. Só na União Europeia, são produzidos cerca de 4 milhões de toneladas anuais de SBP, a qual é composta de aproximadamente 20 - 25% de arabinana. Sendo assim, iniciativas recentes têm utilizado os hidrolisados deste material para produção de bioenergia por vias fermentativas (BERŁOWSKA et al., 2016; KÜHNEL; SCHOLS; GRUPPEN, 2011; ZIEMIŃSKI; KOWALSKA-WENTEL, 2017).

O polímero de arabinana consiste em uma cadeia principal de α-1,5-L-arabinose a qual apresenta ramificações formadas por ligações α-1,3 e α-1,2 com outros monômeros de arabinose. Na natureza a arabinana, geralmente encontra-se unida covalentemente à pectina, outro biopolímero vegetal abundante e de grande interesse industrial (ADETUNJI et al., 2017; KÜHNEL; SCHOLS; GRUPPEN, 2011). A eficiente desconstrução da arabinana representa um desafio para as novas indústrias que usam SBP como matéria-prima para obtenção de L-arabinose (BERŁOWSKA et al., 2016; WONG; CHAN; BATT, 2008). Uma vez que a L-arabinose é extraída, esta pode ser utilzada para a produção de compostos de maior valor agregado, tais como blocos químicos, biocombustíveis e biopolímeros por via fermentativa ou pode ser comercializada diretamente como adoçante de alto valor econômico devido a seu baixo aporte calórico e seu potencial no tratamento de doenças relacionadas com a obesidade e a

hiperglicemia (BERŁOWSKA et al., 2016; KIM; LIM; OH, 2012; OSAKI et al., 2001).

O sucesso destas novas iniciativas para o aproveitamento da biomassa com alto conteúdo de arabinana depende, em grande parte, da correta degradação deste material onde as enzimas arabinanases são componentes fundamentais. Isto, tem impulsionado a prospecção e os estudos de novas arabinanases onde, os fungos filamentosos aparecem como organismos de maior interesse, pois são os principais degradadores de materiais lignocelulosicos na natureza, devido ao seu completo arsenal enzimático o qual tem assegurado seu eficiente desenvolvimento no planeta (SEGATO et al., 2012). Devido a este potencial, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas de modo a conhecer melhor os mecanismos de ação das diversas enzimas para sua aplicação em diversos processos industriais, uma vez que estes necessitam de organismos e enzimas robustas, que suportem condições adversas como altas temperaturas, pHs variados e presença de inibidores.

De encontro a esta necessidade, surge a produção heteróloga de enzimas como uma alternativa para aumentar a produtividade na elaboração destas biomoléculas, mediante o uso de organismos com requerimentos nutricionais simples, altos rendimentos e a possibilidade de gerar enzimas capazes de suportar as condições exigidas em um determinado processo (LUO et al., 2016; TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007). Quando se trata da produção heteróloga de enzimas, provenientes de fungos filamentosos, é conveniente a utilização de um sistema de expressão que apresente características semelhantes ao organismo de obtenção do gene tais como: uma maquinaria biomolecular similar, que permita uma eficiente integração do novo sistema, assim como a capacidade de realizar modificações pós-transcricionais e pós-traducionais (RIBEIRO et al., 2014).

Considerando que mais da metade das proteínas na natureza são glicosiladas e que os fungos são grandes produtores de glicoproteínas, é importante que, na maioria dos casos, as proteínas recombinantes tenham um padrão de glicosilação similar à proteína natural. O processo de glicosilação intervém em processos biológicos de transporte, interação intermolecular, estruturação, inibição de proteólise e secreção proteica, e por sua vez está relacionada com caraterísticas, termofílicas, eficiência hidrolítica e estabilidade

térmica da enzima (CORFIELD, 2017; RUBIO et al., 2016). A inibição de proteólise produto da glicosilação, é uma caraterística desejável das proteínas recombinantes, mais ainda quando produzidas por processos fermentativos usando organismos produtores de proteases nativas.

A produção de enzimas por processos fermentativos tem aumentado, conformando um mercado mundial de 4,9 bilhões de dólares em 2015 com expectativas de crescimento anual do 4,7% entre 2016 e 2021 (PARDO-PLANAS et al., 2017). Entre os fungos filamentosos mais usados para produção de proteínas se encontram várias espécies de *Aspergillus,* devido principalmente, as vantagens que estes organismos apresentam, como tolerância a diferentes condições industriais, altos níveis de produção e a facilidade de crescer sobre substratos de baixo custo (KIS-PAPO et al., 2003; LUBERTOZZI; KEASLING, 2009).

Os processos comumente utilizados para produção de proteínas são fermentações submersas (SmF) e fermentações em estado solido (SSF), sendo as SmFs as mais utilizadas, pois oferecem a possibilidade de maior controle do processo, maior homogeneidade do ambiente fermentativo e uma maior facilidade na recuperação do produto de interesse (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007; MÜLLER et al., 2015). Além disso, a forma de cultivo influencia a morfologia de crescimento do fungo, uma vez que em superfície o microrganismo forma uma camada densa de micélio sobre o meio. No entanto, dependendo da espécie do fungo, em condições submersas pode ocorrer a formação de pellets ou filamentos livres, sendo assim, a morfologia do fungo influencia a formação do produto (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; MÜLLER et al., 2002; TE BIESEBEKE et al., 2005; WANG et al., 2005a).

Embora, a utilização de fungos recombinantes para produção industrial de enzimas se apresente vantajoso, devido a sua maior estabilidade genética (uma caraterística essencial nos bioprocessos) e não ser susceptíveis a bacteriófagos quando comparados com outros organismos geneticamente modificados, como bactérias, a produção simultânea de pigmentos e proteases nativas, ainda é um desafio que deve ser superado para aumentar a sua produtividade (AHAMED; SINGH; WARD, 2005; PARDO-PLANAS et al., 2017; WANG et al., 2005a; WARD, 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

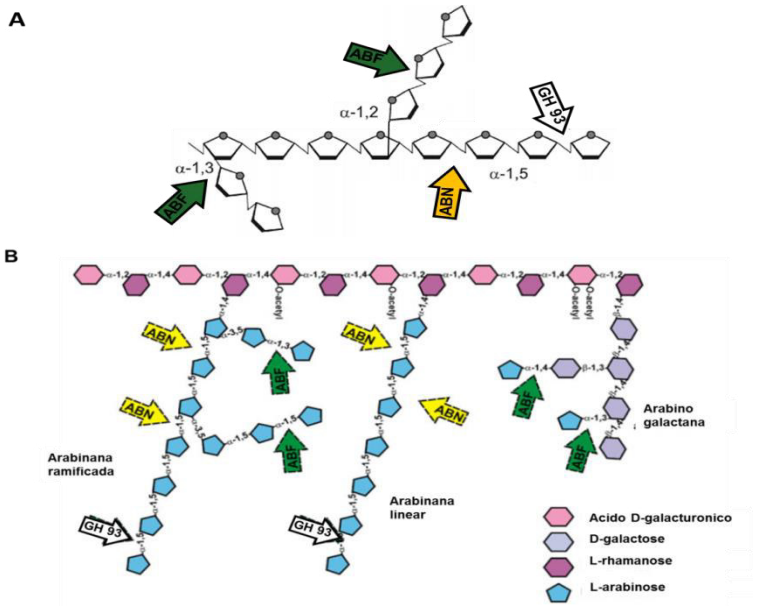
2.1 Arabinanases

São enzimas envolvidas na degradação de compostos que contém arabinose, podendo ser homopolímeros, como por exemplo, a arabinana conformada por uma cadeia principal de L-arabinofuranosideo unidos por ligações do tipo α-1,5, apresentando diferentes níveis de ramificação com ligações nos carbonos 2 e 3 da molécula (Figura 1A) (WONG; CHAN; BATT, 2008), ou heteropolímeros, como a arabinoxilana, presente em gramíneas como cana-de-açúcar e arabinogalactana associada à pectina (Figura 1B) (SEIBOTH; METZ, 2011; SQUINA et al., 2010). Em termos gerais, estas enzimas podem ser classificadas como endo- ou exo-arabinanases. As exo-arabinanases atuam removendo resíduos pendentes de arabinose unidos a uma cadeia principal de polissacarídeo, como algumas arabinofuranosidases, ou removendo arabinose ou oligômeros de arabinose ubicados na extremidade da cadeia principal de arabinana como as GH93. Endo arabinanases cortam a ligações α-1,5 que formam a cadeia principal de arabinana, hidrolisando a parte interna da cadeia. As arabinanases são agrupadas nas famílias das glicosil hidrolases GH3, GH43, GH51, GH54, GH62 e a mais recente GH93, segundo a classificação CAZy (***C****arbohydrate* ***A****ctive en****Zy****mes*), sendo então enzimas necessárias para a completa degradação da hemicelulose e da pectina (HENRISSAT; VEGETALES; GRENOBLE, 1991; SEIBOTH; METZ, 2011). Na família GH3 encontramos β-xilosidases que apresentam atividade de arabinofuranosidase. Foi demonstrado que estas enzimas apresentam atividade em *p*-nitrofenil-α-arabinofuranosideo porém não em arabinoxilana como substrato (HERRMANN et al., 1997; MARGOLLES-CLARK et al., 1996). A família GH43 contém endo α-1,5 arabinanases, enzimas que clivam ligações α-1,5 que formam a cadeia principal de arabinana usando o mecanismo de inversão, sendo que os membros desta família, apresentam três resíduos ácidos conservados (dois ácidos aspárticos e um acido glutâmico) no seu sitio catalítico (PONS et al., 2004).

Na GH51 estão contidas arabinanases que hidrolisam ligações α-1,2 e α-1,3 de resíduos de arabinofuranose em arabinana e xilana. Estão também,

algumas enzimas que podem apresentar características bifuncionais, apresentando atividade de endoxilanase como Ac-Abf51A de *Alicyclobacillus sp* que mostrou a capacidade de clivar as ligações α-1,2 e α-1,3 que unem resíduos de arabinofuranose à cadeia principal de xilana em arabinoxilana de trigo e por sua vez hidrolisar as ligações β-1,4 dos resíduos de xilose na cadeia principal porém com menor eficiência .(YANG et al., 2015). Arabinanases da família GH54 são enzimas com atividade arabinofuranosidase, as quais são úteis na remoção das ramificações presentes na arabinana. Estas enzimas podem conter dois domínios, sendo um catalítico e o outro de ligação ao substrato (CBM - *Carbohydrate Binding Module*). Estes CBMs podem ser específicos para polímeros contendo resíduos de L-arabinose como o caso do CBM42 ou específicos para celulose como os CBM1 (GUAIS et al., 2010; MIYANAGA et al., 2006). A família GH62 contém enzimas que apresentam atividade sobre arabinoxilana, arabinana e arabinogalactana, as mais conhecidas são aquelas especificas para arabinoxilana que hidrolisam ligações α-1,2 ou α-1,3 que unem arabinose à cadeia principal de xilana (KIMURA et al., 2000; SEIBOTH; METZ, 2011).

Figura 1 - Esquema da degradação enzimática de polímeros de L-arabinose



Fonte: adaptado de (INÁCIO; DE SÁ-NOGUEIRA, 2008; SEIBOTH; METZ, 2011).
Nota: A. Arabinana ramificada.
B. Polímeros de L-arabinose em pectina.
ABN. indica ação de endo-arabinanases.
ABF arabinofuranosidases.
GH93 exo-α-1,5-arabinanases.

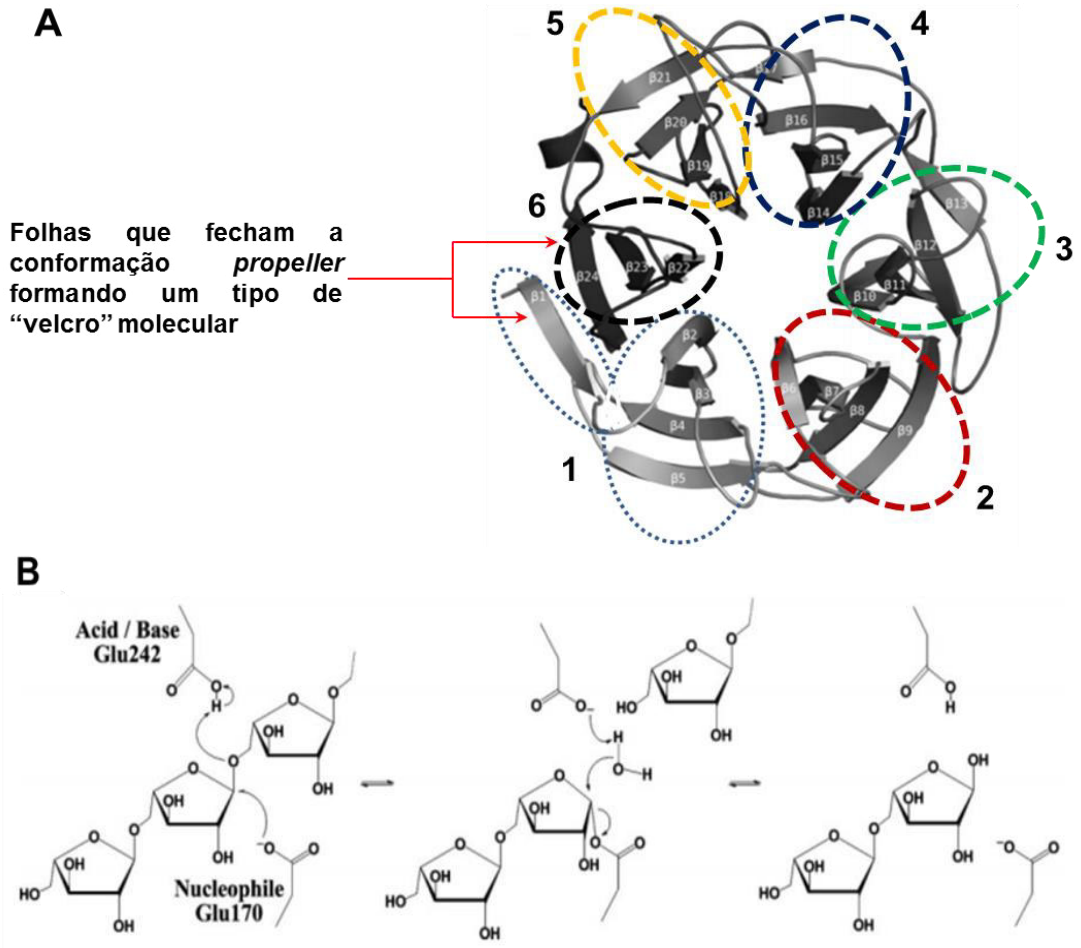
2.2 Exo-α-L-1,5-arabinanases (GH 93)

As enzimas da família GH93, são arabinanases com atividade exo-α-1,5, que atuam em arabinana linear liberando monômeros ou dímeros de L-arabinose. Tratam-se de enzimas relativamente novas e pouco descritas na literatura. Até o momento apenas cinco delas foram caracterizadas bioquimicamente e apenas duas apresentam suas estruturas tridimensionais descritas (CARAPITO et al., 2009; SOGABE et al., 2011; SAKAMOTO et al., 2004; KÜHNEL et al., 2010; MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015). Entre as enzimas GH93 reportadas, encontra-se a Arb93A de *Fusarium graminearum* (CARAPITO et al., 2009), a Abn2 de *Chrysosporium lucknowense* (KÜHNEL et al., 2010), Abnx de *Penicillium chrysogenum* (SAKAMOTO et al., 2004), *Arap2 de Penicillium purpurogenum* (MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015) e ARN3, uma enzima que foi expressa heterólogamente em *Escherichia coli* utilizando o gene arn3 isolado por estudos de metagenômica de rumem bovino (WONG; CHAN; BATT, 2008).

Segundo Carapito (2009), Arb93A é uma proteína monomérica que apresenta uma estrutura de seis lâminas do tipo *β-propeller,* onde cada lâmina está constituída por quatro folhas antiparalelas (Figura 2A). A primeira folha participa na formação da última lâmina e fecha a conformação *propeller* formando um tipo de velcro molecular, sendo que, estas mesmas caraterísticas estruturais foram apresentadas para Abnx (SOGABE et al., 2011). A enzima Arb93A possui um mecanismo catalítico de retenção onde os resíduos Glu170 e Glu242 funcionam como nucleófilo e ácido-base, respectivamente, os quais são necessários neste tipo de mecanismo (Figura 2B).

Todas as GH93 mencionadas anteriormente, geram arabinobiose como produto final, com exceção da enzima ARN3 a qual demonstrou a capacidade de liberar L-arabinose, além disso, os parâmetros cinéticos foram calculados apenas para Arb93A e Abnx. Alguns autores catalogaram enzimas GH93 como pectinases devido a sua participação na degradação de pectinas de beterraba açucareira e soja as quais apresentam alto conteúdo de arabinose (BENOIT et al., 2012)

Figura 2 – Estrutura e mecanismo de ação da proteína Arb93A.



Fonte:(CARAPITO et al., 2009).
Nota: A. Estrutura da proteína Arb93A descrita por Carapito, os círculos em cores indicam as seis lâminas que conformam o *propeller*.
B. Esquema representativo do mecanismo de retenção da enzima GH93

2.2.1 Aplicações

2.2.1.1 Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de bioenergia e building blocks

A importância das enzimas da família GH93 tem aumentado devido a seu importante papel na hidrólise de materiais de origem vegetal (hemicelulose e pectina) ricos em L-arabinose que fazem parte de cultivos de interesse industrial, como por exemplo, a beterraba açucareira. Este tubérculo é o cultivo base para produção de açúcar em países como Chile, Argentina e todos os países da União Europeia. Só na Europa, foram produzidos, aproximadamente 14 milhões de

toneladas de açúcar a partir de beterraba em 2014 gerando mais de 4 milhões de toneladas em peso seco de polpa de beterraba ou SBP por sua sigla no inglês (*sugar beet pulp*), principal subproduto desta indústria. A polpa de beterraba é composta por 22-30% de celulose, 22-30% de hemicelulose (arabinana principalmente), 24-32% de pectina (que também contém arabinana) e 1-3 % de lignina, em massa seca (BERŁOWSKA et al., 2016; KÜHNEL et al., 2010; ZIEMIŃSKI; KOWALSKA-WENTEL, 2017).

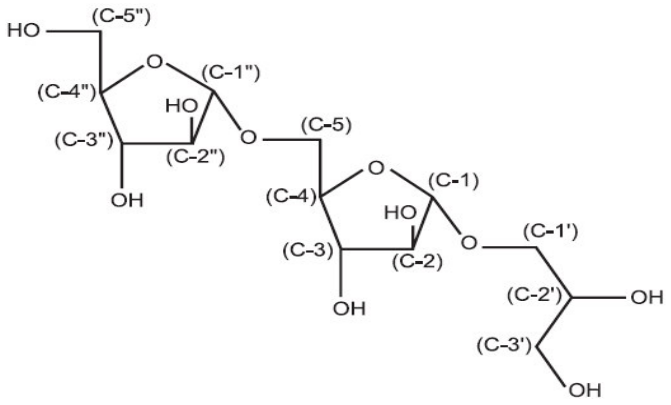
Este subproduto (utilizado como aditivo em ração animal), tem despertado muito interesse nos últimos anos para ser inserido como matéria prima para produção de bioetanol, biogás e biopolímeros, dentro do contexto de biorrefinarias (BERŁOWSKA et al., 2016; CHAKIATH et al., 2009; KÜHNEL; SCHOLS; GRUPPEN, 2011). Atualmente na Europa existem plantas de produção de energia elétrica a partir de biogás, o qual vem sendo produzido pela digestão anaeróbia do hidrolisado de SBP (ZIEMIŃSKI; KOWALSKA-WENTEL, 2017).

A sustentabilidade destas iniciativas mencionadas acima depende de processos hidrolíticos efetivos que permitam a decomposição do material vegetal nos seus açucares constitutivos, que são posteriormente fermentados para produção de bioenergia e/ou *building blocks* (BERŁOWSKA et al., 2016; KIM; LIM; OH, 2012).

2.2.1.2 Produção de novos compostos glicosilados

Entre enzimas pertencentes a família GH93 descritas até o momento, foi reportada a atividade de transglicosilação para Abnx. Nos experimentos realizados com Abnx foram utilizados como aceptores, 21 compostos diferentes, entre os quais se encontravam álcoois alifáticos, açúcares e álcoois de açúcar. A enzima apresentou capacidade de utilizar a arabinana linear como substrato, catalisando não apenas a reação de hidrólise, liberando arabinobiose, como também a transferência do dímero para os aceptores. A enzima mostrou preferência por glicerol, sorbitol e xilitol, entre eles a preferência foi maior por grupos hidroxila do glicerol, dando origem a novos compostos glicosilados de interesse no setor farmacêutico e para síntese de novos materiais (Figura 3) (SAKAMOTO; FUJITA; KAWASAKI, 2004).

Figura 3 - Estrutura proposta por Sakamoto para o composto resultante da arabinobiosilação da molécula de glicerol**.**



Fonte: (SAKAMOTO; FUJITA; KAWASAKI, 2004)

2.3 Fungos e enzimas termofílicas

A procura por enzimas ativas em carboidratos (*CAZymes*), tem sido de grande importância, devido à necessidade de se extrair desta matéria-prima os diferentes açúcares que a compõem para serem transformados em produtos de interesse, os quais podem ser direcionados para vários setores industriais (SEGATO et al., 2014). Naturalmente, os fungos filamentosos são os organismos com maior capacidade de secreção desta classe enzimática e, devido a isso, eles são capazes de converter, de maneira eficiente, os componentes da parede celular vegetal em moléculas de interesse energético como os açúcares. Esta caraterística tem levado a conversão de algumas espécies destes microrganismos em *cell factories,* utilizadas na produção de proteínas em grande escala, incentivando o uso de diferentes estratégias para aumentar seu rendimento, dentro das quais se encontra a produção heteróloga (SEGATO et al., 2012).

As celulases e hemicelulases amplamente estudadas e atualmente utilizadas em processos biotecnológicos, vêm sendo produzidas por um número relativamente restrito de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Estas enzimas, geralmente são estáveis em temperaturas que vão de 40 a 50 °C. Como não são muito elevadas, nestas temperaturas se requer um maior tempo de reação (várias horas e até dias) para que a hidrólise da biomassa atinja uma alta porcentagem de sacarificação. No entanto, longos períodos de reação diminuem a economicidade dos bioprocessos e faz com que os

biorreatores fiquem suscetíveis a contaminação microbiana. Uma alternativa para superar este obstáculo é aumentar a temperatura de reação e, deste modo, aumentar a eficiência da hidrólise, diminuindo a viscosidade do substrato pré-tratado, os riscos de contaminação e aumentando a acessibilidade das enzimas ao material a ser hidrolisado que tende a mudar sua conformação em altas temperaturas. Para isso, faz-se necessário o desenvolvimento de enzimas que apresentem maior estabilidade térmica quando comparadas com as preparações atualmente disponíveis (TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007). Fungos termofílicos e termotolerantes podem ser uma fonte potencial de enzimas com estas propriedades, devido a capacidade destes organismos de crescer em altas temperaturas, suas estruturas celulares como membranas, organelas, junto com suas proteínas funcionam normalmente a altas temperaturas (RIBEIRO et al., 2014).

Para que uma enzima possa ser considerada termofílica, deve manter a sua estrutura e consequentemente estar ativa, quando submetida a temperaturas superiores a 55 °C. No entanto, nem todas as enzimas termofílicas são termoestáveis por longos períodos de tempo (RIBEIRO et al., 2014; TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007).

2.4 Expressão heteróloga

Uma grande quantidade de biomoléculas utilizadas como antimicrobianos, anticâncer e como agentes ativos em diversas indústrias são produzidos ou derivados principalmente de microrganismos e plantas. Apesar disso, a produção em grande escala destas moléculas por organismos nativos é, muitas vezes inconveniente, devido principalmente a sua baixa produtividade e reduzida concentração (LUO et al., 2016). Em muitos casos, estes compostos bioativos são metabólitos secundários que se apresentam em menores concentrações, quando comparados com os metabolitos primários, fazendo com que os processos de extração e purificação sejam economicamente inviáveis (LUO et al., 2016).

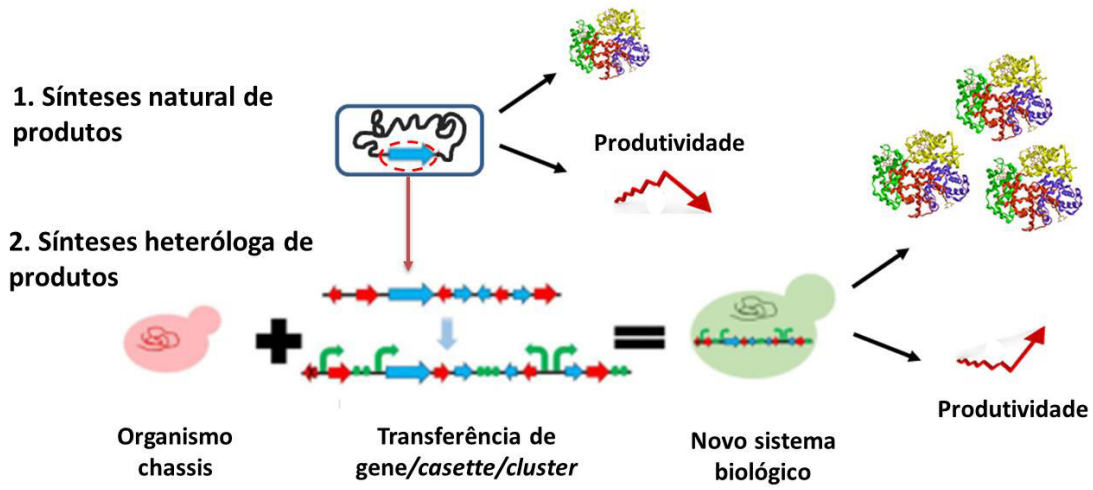
Novas alternativas têm sido propostas para suprir a crescente demanda nas áreas da saúde, de alimentos e energia, a partir do desenvolvimento conjunto de técnicas de biologia molecular que permitem a análise e transferência, de um simples gene, um conjunto de genes – *cassette* – ou um *cluster* deles para

modificar ou, dar origem a uma nova rota metabólica em um organismo hospedeiro. Estas técnicas tem revolucionado diversas áreas e vem sendo denominadas como terceira revolução da biotecnologia, pois integra as ciências físicas, biológicas e engenharia para o desenvolvimento de novos sistemas biológicos (LUO et al., 2016; TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007; WAY et al., 2014).

As técnicas de biologia molecular têm ajudado a superar os desafios e desvantagens da produção homóloga mencionados acima, favorecendo à produção heteróloga de diversas biomoléculas, dentre as quais se encontram diversas enzimas que vem sendo protagonistas em bioprocessos industriais (Figura 4).

Na produção heteróloga de proteínas, os sistemas de expressão comumente utilizados são a bactéria *E. coli,* algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris* e fungos filamentosos do gênero *Aspergillus.* Estes últimos se diferenciam dos outros organismos por apresentarem como principal vantagem a possibilidade de utilização de substratos de baixo valor econômico em seu cultivo, a fácil indução na produção de proteínas, não serem susceptíveis ao ataque de bacteriófagos como as bactérias, possuírem uma eficiente capacidade de secreção, e uma maquinaria de modificação pós-transcrição e -traducional muito próxima à de animais superiores (MADHAVAN; PANDEY; SUKUMARAN, 2017)

Figura 4 - Comparação entre produção natural e heteróloga de biomoléculas.



Fonte: adaptado (LUO et al., 2016)

Além da susceptibilidade a bacteriófagos (que representa um grande risco de contaminação em sistemas de produção como *E. coli*) o fato de não realizar modificações pós-traducionais, fazem desta bactéria um organismo pouco eficiente para a expressão de proteínas provenientes de eucariotos. No caso das leveduras, estas apresentam glicosilações excessivas das proteínas de interesse, o que torna a produção inconveniente, porém a glicosilação de proteínas é um processo que intervém na secreção, na estabilidade e pode aumentar ou diminuir a atividade da proteína madura. Por exemplo, a secreção de uma proteína nativa em *A. saitoi* foi bloqueada quando o processo de glicosilação da mesma foi inibido, no entanto, em *A. niger* a super produção de uma glucoamilase nativa foi acompanhada pelo incremento na glicosilação (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; MADHAVAN; PANDEY; SUKUMARAN, 2017; RIBEIRO et al., 2014; WALLIS et al., 1999).

2.4.1 Expressão heteróloga em fungo filamentoso

Com a finalidade de se explorar a extraordinária maquinaria de síntese e secreção de proteínas apresentada pelos fungos filamentosos, espécies dos gêneros que incluem *Aspergillus, Trichoderma, Penicillium* e *Rhizopus* tem sido utilizadas para produção de proteínas recombinantes uma vez que apresentam vantagens como: a produção da enzima de interesse em altas quantidades (o que facilita os processos de purificação e caracterização), a capacidade de reconhecer e processar corretamente regiões intrônicas que estão presentes na maioria dos genes de organismos eucariotos, e sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais como formas de enovelamento "*folding*" correto, pontes de sulfeto e glicosilações (RIBEIRO et al., 2014; WARD, 2012).

No entanto, estes organismos também apresentam algumas desvantagens, como a produção de proteases homólogas, que podem degradar a proteína de interesse, baixos níveis de expressão de proteínas não fúngicas e uma frequência de transformação relativamente baixa. Porém, a eficiência de transformação e dos níveis de expressão vem aumentando gradativamente com a utilização de novas metodologias e o aprimoramento das convencionais (KODA et al., 2005; LUBERTOZZI; KEASLING, 2009). Estudos demonstram que a expressão de

proteínas não fúngicas em fungo filamentoso, pode ser melhorada através de otimização de códons (KODA et al., 2005) e espécies de *Aspergillus,* em especial *A. niger, A. awamori*, *A. oryzae* e *A. nidulans* aparecem como os melhores sistemas de expressão fúngicas entre os fungos filamentosos (WARD, 2012)

2.4.1.1 Aspergillus como sistema de expressão

O gênero *Aspergillus* é composto por mais que 180 espécies reconhecidas. A maioria atua como degradadores dos polissacarídeos das plantas, alguns deles apresentam importância industrial para produção de diversos compostos, entre eles proteínas tanto homólogas, quanto heterólogas, sendo que, os estudos genéticos e moleculares mais relevantes realizados com *Aspergillus* para produção de proteína recombinantes contemplam as espécies de *A. nidulans* e *A. oryzae* (VRIES, 2003; FAWOLE; ODUNFA, 2003; WANG et al., 2003).

Uma compilação sobre as informações de proteínas fúngicas recombinantes mostra que pelo menos 80 proteínas foram expressas em 12 espécies de fungos filamentosos, destas 55 foram produzidas por quatro espécies de *Aspergillus: A. awamori, A. nidulans, A. niger* e *A. oryzae*. Outros trabalhos, citam 40 proteínas heterólogas, em sua maioria de origem animal e fúngicas, das quais 30 foram produzidas nas 4 espécies mencionadas anteriormente, entre as quais se encontra também a primeira proteína de planta expressada em *Aspergillus* (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; NAKAJIMA et al., 2006).

A. nidulans é a espécie melhor caraterizada geneticamente, sendo utilizado como organismo modelo para o estudo das funções de células eucarióticas, seu genoma total tem um tamanho de 30,1 megabases, com oito cromossomos bem definidos, contendo aproximadamente 10 mil genes (ARCHER; DYER, 2004; CLUTTERBUCK, 1997; GALAGAN et al., 2005; LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; WARD, 2012). Porém tem como fator indesejável a produção de *sterigmatocystina,* uma toxina com efeito comprovado em cobaias porém, sem efeito comprovado em humanos até o momento (WARD, 2012). Outros trabalhos de sequenciamento genômico foram descritos em *A. oryzae* (MACHIDA et al., 2005), *A. fumigatus* (NIERMAN et al., 2005), *A. clavatus, A. flavus, A. parasiticus* e *A. terreus* (JONES, 2007).

Embora muitos avanços tenham sido obtidos para a produção heteróloga nestes organismos, o processo de produção de proteínas recombinantes continua sendo objeto de estudos devido à complexidade de todos os processos biomoleculares interligados que acontecem no interior da célula do microrganismo. Por exemplo, um dos fatores desejáveis na produção de proteínas heterólogas é a super-expressão do gene de interesse, porém este efeito gera grandes quantidades de mRNA que deve ser devidamente traduzido em proteína, requerendo uma alta produção também de tRNA, acelerando o processo de transdução e aumentando o risco de erros na conformação da estrutura primária da proteína. Por sua vez, o aumento da quantidade de proteínas que chegam ao retículo endoplasmático e ao Golgi para serem devidamente enoveladas e processadas causa um efeito denominado de engarrafamento, que significa um aumento excessivo da atividade no retículo. Este efeito, aumenta também a probabilidade de ocorrência de proteínas desenoveladas ou com erros pós-traducionais, diminuindo o rendimento na produção da proteína recombinante. O engarrafamento tem sido objeto de estudo de várias pesquisas na tentativa de melhorar a produção de proteínas (BRANDHORST; KENEALY, 1995; GOUKA; PUNT; VAN DEN HONDEL, 1997; LUBERTOZZI; KEASLING, 2009).

2.4.1.2 Principais técnicas de transformação empregadas em fungo

Devido a sua morfologia multicelular, a presença de quitina na parede celular e ausência de plasmídeos, a transformação em fungos filamentosos é um processo mais complexo, quando comparado com a transformação de procariotos e leveduras, mesmo assim vários métodos tem sido desenvolvidos e aprimorados nos últimos anos. A técnica mais utilizada atualmente é uma adaptação do processo inicialmente utilizado na transformação de leveduras e consiste em um tratamento químico de protoplastos produzidos por digestão enzimática da parede celular do fungo. No tratamento, os protoplastos entram em contato com cloreto de cálcio para conferir carga positiva a membrana e devem permanecer numa solução isotônica junto com o DNA a ser inserido. Nesta técnica a transformação é mediada por polietilenoglicol (PEG) que estimula a fusão dos protoplastos (MEYER, 2008; WARD, 2012). Quando esta técnica começou a ser

implementada, apresentava uma baixa eficiência na transformação com apenas 10 transformantes por micrograma de DNA utilizado. Porém, tem sido aprimorada ao ponto de aumentar o número de obtenção de transformantes em várias centenas e até milhares (DAWE; WILLINS; MORRIS, 2000).

Outro método que requer a digestão da parede celular do fungo, a obtenção e preparação de protoplastos é a eletroporação, onde a membrana dos protoplastos que estão em contato com o DNA exógeno é permeabilizada por pulsos elétricos, promovendo o ingresso do material genético na célula e sua posterior integração ao genoma do fungo (MICHAEL WARD, KATHERINE H. KODAMA, 1989; SÁNCHEZ; AGUIRRE, 1996).

A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é também empregada, nesta técnica o microrganismo portador do vetor de transformação é cultivado junto com o fungo para que a transformação aconteça. O baixo número de cópias de DNA que são transferidas favorece uma integração mais específica (GOUKA et al., 1999; LUBERTOZZI; KEASLING, 2009). A biobalística é outro método utilizado, sendo o mais especializado quando comparado com os métodos mencionados anteriormente, esta técnica pode ser implementada sem remover a parede celular do microrganismo e consiste em disparar partículas de metal cobertas com o material genético de interesse dentro da célula, uma vez no interior o material se separa da partícula metálica para integrar-se ao DNA do fungo (HERZOG et al., 1996).

2.5 Produção de enzimas por fermentação

Os fungos filamentosos desenvolveram, durante a sua evolução, uma grande capacidade de secreção enzimática devido a seu habito de crescimento saprófito natural, que na maioria das vezes acontece sobre substratos sólidos com uma baixa atividade de água (aw=0,4), aproximadamente 50% menos do requerido pelas leveduras para seu adequado desenvolvimento (aw=0,85). Esta característica tem impulsionado seu uso em fermentações em estado solido para produção de alimentos, e diversos produtos de interesse industrial como as enzimas (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009).

Aspergillus é o gênero mais utilizado em processos industriais, podendo crescer em um intervalo amplo de temperaturas (10 até 50 °C), uma variedade de

faixas de pH (2 até 11) e níveis de osmolaridade que vão desde água quase pura até concentrações de 34% de sal. Além disso, apresentam a capacidade de secretar continuamente e em grandes quantidades diversos metabolitos, sua morfologia filamentosa facilita sua separação do meio de cultura e a purificação do produto de interesse (KIS-PAPO et al., 2003). Pode se dizer que, a biotecnologia moderna teve início a partir de 1894, quando foi patenteada a primeira preparação enzimática comercial por Jokichi Takamine, o produto continha uma amilase produzida a partir do cultivo do fungo *A. oryzae* (BENNETT, 1998). Após este período, a produção de enzimas derivadas de processos fermentativos vem crescendo constantemente, conformando um mercado mundial de 4,9 bilhões de dólares em 2015 com expectativas de crescimento anual do 4,7% entre 2016 e 2021 (PARDO-PLANAS et al., 2017)

2.5.1 Fermentações em estado solido (SSF) e fermentações submersas (SmF)

A produção extracelular de enzimas por fungos filamentosos foi baseada inicialmente, nos processos fermentativos utilizados na indústria de alimentos, onde o microrganismo crescia sobre substratos sólidos ou semissólidos que impediam a homogeneização e controle do processo. Com a finalidade de melhorar estas características, o processo sofreu uma transição da produção para condições submersas, onde faz-se uso de meios líquidos e reatores de tanque agitado. No entanto, a aplicação desta metodologia promoveu novos desafios envolvendo a alta viscosidade e produção excessiva de biomassa, as quais evitam a transferência adequada de oxigênio demandando uma maior agitação, fatores que influenciam o rendimento do processo (WARD, 2012).

Atualmente, processos tanto SSF, quanto SmF, são utilizados para produção de enzimas em escala industrial, sendo SmF o método mais explorado (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). Quando comparadas, as duas metodologias apresentam vantagens e desvantagens, como por exemplo: SSF permite realizar a produção com baixos níveis de aw, o que restringe o crescimento de outros microrganismos, o fato das proteínas não serem diluídas num meio liquido extracelular favorece altas produtividades volumétricas, a demanda de energia do processo é menor assim como o custo de produção, porém não permite a

realização de um processo produtivo e contínuo, a recuperação do produto é difícil e a heterogeneidade da fermentação faz deste, um processo pouco controlado. SmF permite uma maior automatização e controle do processo, permitindo uma produção continua e uma maior facilidade na recuperação do produto, porém o crescimento descontrolado do fungo frequentemente ocasiona entupimento do sistema (MÜLLER et al., 2015). Estes problemas podem ser superados pela aplicação de diferentes alternativas que vão desde a engenharia, até fatores fisiológicos e moleculares do organismo em questão, como por exemplo melhoramento no desenho de reatores que permitam uma maior aeração e que por sua vez controlam o efeito do cisalhamento ou a manipulação de genes envolvidos na morfologia do fungo, para estimular a formação de micélios mais ramificados com filamentos mais curtos (WARD, 2012).

Com o intuito de aproveitar as diferentes vantagens que oferecem as técnicas de SSF e SmF, novos sistemas tem sido propostos para aumentar a produtividade de proteínas recombinantes, produzidas a partir da utilização de *A. nidulans* como *cell factory*, como por exemplo o *Trickle bed reactor* (TBR). Este reator contém rocha vulcânica em seu interior, a qual é utilizada como suporte para o crescimento do microrganismo. O meio de cultivo entra através de gotejamento pela parte superior do reator, fazendo contato com o micélio do fungo durante o percurso até a parte inferior da dorna onde é liberado e logo em seguida reciclado, mantendo um fluxo constante de produção. Este tipo de reator facilita a transferência de massa do oxigênio, oferece a possibilidade de realizar um processo fermentativo continuo e devidamente controlado, porém o crescimento excessivo do micélio e os altos níveis de acúmulo de melanina são os principais desafios que devem ser superados (MÜLLER et al., 2015; PARDO-PLANAS et al., 2017).

2.5.2 Morfologia fúngica na fermentação

A forma de crescimento do fungo varia dependendo do tipo de fermentação, dos parâmetros do cultivo e da concentração do substrato. Em SSF, o fungo cresce na superfície do meio formando um micélio denso, no entanto, quando a fermentação é submersa o fungo forma pellets ou filamentos livres.

Quando o fungo cresce na superfície do meio a concentração do substrato influencia sua morfologia. Em altas concentrações do substrato, o organismo passa a emitir uma densa rede de hifas curtas, apresentando desta forma, um micélio altamente ramificado que permite um aproveitamento mais eficiente do substrato na área ocupada pelo fungo, no entanto, quando a concentração do substrato é baixa o fungo desenvolve hifas longas e pouco ramificadas, este mecanismo é utilizado pelo fungo para explorar áreas onde a concentração do substrato possa ser maior (MÜLLER et al., 2014; WANG et al., 2005a).

Em cultivos submersos quando o organismo forma pellet, o tamanho dele depende de vários fatores como: a quantidade de inóculo (quando um maior número de esporos entra no sistema o tamanho do pellet diminui), cisalhamento, pH e composição do meio de cultivo (ŽNIDARŠIČ; KOMEL; PAVKO, 2000). O tamanho e morfologia do pellet influenciam a formação do produto, por exemplo, em um trabalho realizado por El-Enshasy e colaboradores demonstraram que o decréscimo no tamanho do pellet incrementou a formação do produto (EL-ENSHASY; HELLMUTH; RINAS, 1999). Considerando que a secreção da proteína esta localizada na ponta da hifa do fungo, a formação de pellets altamente ramificados é considerada uma caraterística desejável. Alguns trabalhos mostram que a abundante ramificação resulta em pellets de menor tamanho, incrementando a secreção de proteínas, provavelmente devido a uma melhor transferência de oxigênio e de nutrientes para o interior do pellet (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009). No entanto, para avaliar a relação entre os níveis de ramificação e secreção, alguns trabalhos tem sido feitos com mutantes de *A. oryzae* hiper-ramificados, mostrando que em alguns casos ocorre um aumento nos níveis de secreção porém em outros o mesmo não ocorre (MÜLLER et al., 2002; TE BIESEBEKE et al., 2005).

2.5.3 Produção de proteases

Os microrganismos representam uma excelente fonte de produção de proteases. Estas enzimas catalisam a hidrólise das ligações peptídicas presentes em peptídeos e proteínas. Em um processo de produção de uma enzima recombinante específica, a produção homologa de proteases se torna indesejável

(BACH et al., 2012; SANTOS AGUILAR; SATO, 2018). As proteases podem ser classificadas de acordo com o intervalo de pH no qual elas atuam, podendo ser proteases ácidas, que são ativas em pH abaixo de 5, neutras com ação em pHs entre 5 e 8 e proteases alcalinas atuando em pHs 8-11. Alguns estudos reportaram a produção homóloga de proteases alcalinas em diversas espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus, A. niger e A. oryzae*) (SANTOS AGUILAR; SATO, 2018).

As condições de cultivo e a composição do meio de cultura, juntamente com o pH e a agitação, estão entre os fatores que influenciam a produção de proteases. Em um processo de produção heteróloga de proteínas onde há o conhecimento do tipo de proteases produzidas pelo fungo, manter o valor de pH em uma faixa que não seja adequada para atividade de proteases evita o efeito adverso destas sobre a proteína de interesse. Por outro lado, diminuir ao máximo o efeito do cisalhamento evitando a ruptura celular diminui a liberação de proteases intracelulares produzidas pelo organismo (AHAMED; SINGH; WARD, 2005; WANG et al., 2005b). Meios de cultura enriquecidos com peptídeos como fonte de nitrogênio também estimulam a produção de proteases, por outro lado, o esgotamento de nutrientes, como as fontes de carbono e de nitrogênio, podem induzir a superprodução de proteases para realizar a autólise dos micélios mais antigos para obtenção de energia. Em estudos de secretomica realizados com *A. niger* em condições de *starvation* foi encontrada a presença predominante de proteases, sendo assim, este tipo de condição deve ser evitada nos processos fermentativos (ADAV et al., 2010; BRAAKSMA et al., 2010).

Cepas modificadas para evitar a expressão de genes que codificam proteases tem sido outra estratégia que oferece bons resultados na produção de proteínas recombinantes. Estudos feitos com cepas de *A. nidulans* e *A. oryzae,* as quais tiveram alguns genes que codificam algumas proteases deletados mostraram um aumento consideravel na produção e na estabilidade das proteínas heterólogas presentes no meio (WARD, 2012).

2.5.4 Produção de melanina

Sendo um dos metabólitos secundários produzidos por diversos fungos, incluindo *A. nidulans* a melanina é um tipo de pigmento que oferece proteção para o microrganismo, uma vez que pode atuar como tampão redox extracelular, neutralizando agentes oxidantes como HOCl e H_2O_2 (GONCALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005). No caso de *A. nidulans,* a presença de melanina na parede celular do fungo aumenta a sua resistência a lise (KUO; ALEXANDER, 1967). Diferentes cepas de fungos produtores de melanina demonstraram capacidade de sobreviver em ambientes hostis como na antártica e dentro de reatores nucleares (EISENMAN; CASADEVALL, 2012). Porém, a produção do pigmento é um fator indesejável na produção de proteínas, considerando que o fungo direciona parte da fonte de carbono que poderia ser utilizada na formação do produto para a produção do pigmento, aliás o aumento na concentração do pigmento no meio extracelular incrementa também o acúmulo de material insolúvel, podendo gerar problemas de entupimento (JØRGENSEN et al., 2011).

Estudos envolvendo a produção heteróloga de proteínas em *A. nidulans* A773, utilizando o vetor de transformação pEXPYR, demonstraram que, em condições de estresse o fungo aumenta a produção de melanina, a qual é responsável pela coloração marrom apresentada pelo meio de cultura. O linhagem de *A. nidulans* A773 é incapaz de produzir piridoxina, uma vitamina necessária para seu crescimento, pois é precursor do piridoxal 5'-fosfato, um composto fundamental na via de metabolismo de aminoácidos (MÜLLER et al., 2014). Estudos realizados por Pardo-Planas e colaboradores (2017) mostraram que a limitação de piridoxina no meio incrementa também a produção de melanina, uma vez que a deficiência na síntese de aminoácidos é interpretada pelo fungo como um tipo de *starvation* (PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017)

3 OBJETIVO GERAL

A presente dissertação teve como objetivo geral, a prospecção, clonagem, produção heteróloga, análise bioquímica e avaliação da produção fermentativa de uma enzima exo-arabinanase da família GH93. Para se alcançar o objetivo proposto, o projeto foi dividido e executado em fases específicas.

3.1 Objetivos específicos

- Prospectar e analisar filogeneticamente diferentes enzimas da família GH93 produzidas por fungos filamentosos;
- Selecionar dois genes codificantes da proteína GH93 para transformação do fungo *Aspergillus nidulans* linhagem A773;
- Produzir de maneira heteróloga, uma exo-arabinanase e caracteriza-la bioquimicamente;
- Avaliar o efeito de dois tipos de indutores, em diferentes concentrações, sobre a produção da enzima recombinante em fermentação agitada e estacionária.

4 ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

Para uma melhor compressão do presente trabalho, o conteúdo foi distribuído em três seções principais que mostram as três etapas nas quais a pesquisa foi desenvolvida. Cada seção contém uma breve introdução, material e métodos, resultados e discussões. As conclusões são apresentadas na seção 8.

A seção 5 mostra o trabalho realizado para atingir os dois primeiros objetivos específicos da pesquisa, que compreendem as áreas de análise bioinformática e biologia molecular, iniciando com a prospecção de enzimas da família GH93, passando pela clonagem e expressão heteróloga de duas exo-arabinanases em *A.nidulans* com a posterior seleção de uma enzima para dar continuidade ao trabalho.

A seção 6 abrange toda a caraterização bioquímica da proteína escolhida, desde sua purificação, passando por estudos de cinética até a avaliação do efeito de diferentes íons sobre a atividade enzimática, atingindo assim o terceiro objetivo.

A seção 7 descreve a avaliação de dois tipos de maltose utilizadas como indutores na expressão do gene de interesse, assim como, o teste destes compostos em diferentes concentrações e seu efeito na produção da proteína recombinante em cultivos agitados e estacionários em pequena escala (50 mL), juntamente com escalamento do processo para um volume de 2 L, correspondente ao objetivo final proposto na pesquisa.

5 PROSPECÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE DUAS ENZIMAS GH93 EM *Aspergillus nidulans*

Devido ao crescente interesse na utilizção de enzimas em processos industriais, a procura por proteínas que apresentem caraterísticas específicas como termo estabilidade, termofilicidade, estabilidade em diferentes pHs, vem aumentando constantemente (RIBEIRO et al., 2014; TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007). Trabalhos anteriores, realizados no grupo de pesquisa, foram avaliados os secretomas dos fungos termofílicos *Myceliophthora thermophila* e *Thielavia terrestris* cultivados em bagaço de cana como única fonte de carbono. Os resultados obtidos apresentaram nestas condições um grande número de enzimas ativas em carboidratos, entre elas, enzimas da família GH93 (dados não publicados). O fato destes fungos apresentarem características termofílicas, aumenta a possibilidade das enzimas, produzidas por eles serem estáveis em temperaturas elevadas.

Pelo fato da família GH93 ser composta por exo-α-1,5-arabinanases, enzimas que hidrolisam as ligações α-1,5 da cadeia principal de arabinana (um composto abundante na biomassa vegetal associado a hemicelulose e pectina), o estudo desta classe tem chamado a atenção devido às aplicações que estas enzimas podem apresentar em contextos industriais como produção de bioenergia e *building blocks* obtidos a partir de resíduos agroindustriais, como a polpa de beterraba açucareira, assim como no aproveitamento do glicerol (uns dos principais subprodutos na produção de biodiesel) para sínteses de novas moléculas (BERŁOWSKA et al., 2016; SAKAMOTO; FUJITA; KAWASAKI, 2004; ZIEMIŃSKI; KOWALSKA-WENTEL, 2017).

O fungo *A. nidulans*, se apresenta como uma excelente alternativa para a produção heteróloga de enzimas que provém de fungos filamentosos devido as semelhanças que estes organismos apresentam em sua maquinaria celular, desde o processamento do material genético até a secreção da proteína madura. Além de ser um sistema de expressão propício, *A. nidulans,* quando transformado com vetor de expressão pEXPYR tem mostrado bons resultados na produção heteróloga de glicosil hidrolases. Após da sua publicação em 2012 este sistema de expressão tem sido utilizado na produção heteróloga sucedida de mais de uma dezena de *CAZymes* diferentes como arabinofuranosidases,

arabinanases, xilanases e oxidases, por diferentes grupos de pesquisa (CONTESINI et al., 2017; DAMÁSIO et al., 2012a, 2012b; GONÇALVES et al., 2012; PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017; RIBEIRO et al., 2014; SEGATO et al., 2012). Este capítulo descreve a análise filogenética de 30 sequências de proteínas da família GH93 produzidas por fungos, a clonagem dos genes ABNm de *M. thermophila* e ABNt de *T. terrestris* que codificam para enzimas GH93, assim como a expressão heteróloga destas enzimas em *A. nidulans* utilizando o vetor de expressão e secreção pEXPYR.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Análise filogenética e seleção das sequências proteicas

A prospecção de enzimas da família GH93 foi realizada utilizando a base de dados do *CAZy* (*Carbohydrate Active Enzymes*) e o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* do NCBI), considerando apenas sequências proteicas de enzimas que podem ser produzidas por fungos. Com o objetivo de se realizar uma análise filogenética que possibilitaria uma maior compreensão das características comuns e das diferenças apresentadas por estas proteínas, uma árvore filogenética foi construída utilizando-se o *software* MEGA7 como ferramenta (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis version* 7.0 *for* - NCBI) (ALTSCHUL et al., 1990; HENRISSAT; VEGETALES; GRENOBLE, 1991).

Como a expressão heteróloga de proteínas é um processo complexo onde intervêm muitas variáveis, para atingir o objetivo da produção de uma arabinanase, foram escolhidas proteínas de duas espécies de organismos para realizar a clonagem e a expressão, aumentando deste modo as possibilidades de sucesso. As sequências de aminoácidos das proteínas de interesse foram analisadas com a ferramenta *SignalP 4.1 Server* (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) para identificar a presença do peptídeo sinal e removê-lo da sequência de DNA que foi utilizada para o desenho dos oligonucleotideos (*primers*), utilizados na amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e na clonagem do gene (PETERSEN et al., 2011). Deste modo, o gene

clonado não apresentou a sequência que codifica para o peptídeo sinal nativo da proteína de interesse.

De modo a se obter maiores informações sobre as características das arabinanases selecionadas, a ferramenta de bioinformática *ProtParam* do servidor ExPASy (http://www.expasy.org/tools/protparam.html), foi utilizada para inferir o ponto isoelétrico, massa molar e coeficiente de extinção molar baseado na sequência de aminoácidos da proteína.

5.1.2 Construção dos oligonucleotídeos (*primers*)

As sequências dos dois genes de interesse, ausentes da região codificante para o peptídeo sinal, foram utilizadas como base para a construção dos *primers*. Para isso, foram considerados os trinta nucleotídeos iniciais, localizados nas regiões 5' e 3' do gene. Para a construção do *primer reverse*, a sequência da região 3' ao gene foi inserida no *software Reverse Complement*, da plataforma *Bioinformatics* (www.bioinformatics.org/sms/index.html). Após, as sequências dos *primers* foram analisadas para ajustar sua temperatura de *melting* (Tm) com a ferramenta *OligoAnalyzer* 3.1 do *Integrated DNA Technologies* (IDT) (https://www.idtdna.com/calc/analyzer), tendo como parâmetros que o comprimento dos *primers* apresentasse um número de bases acima de 20 e a sua Tm não apresentasse uma diferença maior que 3 °C entre os *primers forward* e *reverse* para o mesmo gene. Aos *primers* desenhados, foram adicionadas sequências específicas de ligação ao vetor de transformação denominadas caudas. Estas caudas permitiram a inserção do gene ao vetor de expressão por técnicas de recombinação *in vitro* (Gibson Assembly).

5.1.3 Clonagem dos genes

Tendo os *primers* para cada gene codificante das proteínas GH93 do fungo *M. thermophila* (ABNm, 11511450) e do fungo *T. terrestris* (ABNt, 11516004) realizou-se a extração do DNA genômico (DNAg) de cada fungo para a posterior amplificação por técnica de PCR e clonagem dos genes.

5.1.3.1 Extração de DNA

Esporos dos fungos *M. thermophila* e *T. terrestris* foram inoculados em 200 ml de meio de Mandels líquido (apêndice A), e foram mantidos a 45 ^{o}C sob agitação a 180 rpm durante 36 horas. Em seguida, os micélios foram separados por filtração e macerados em almofariz, adicionando nitrogênio líquido. Foram pesados 50 mg do macerado para serem utilizados no processo de extração do DNAg com o Kit de purificação de DNA genômico *Wizard* (Promega®) seguindo as especificações do fabricante.

5.1.3.2. Amplificação dos genes

A clonagem dos genes foi realizada através da amplificação dos mesmos pela técnica de PCR, utilizando a enzima DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion*™ (*New England BioLabs*®). As reações de PCR foram montadas, de acordo com os reagentes e os ciclos apresentados na tabela 1. O produto de PCR resultante, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), utilizando como padrão, o marcador *GeneRuler 1 Kb plus DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*).

Tabela 1 – Condições utilizadas para amplificação dos genes mediante a técnica de PCR.

REAÇÃO		PROGRAMAÇÃO DO TERMOCICLADOR		
Reagentes	**Quantidades µL**	**Temperatura**	**Tempo**	**Nº de ciclos**
DNAg	1			
Primer Forward	2	98ºC	30 s	1
Primer Reverse	2	98°C	10 s	25
dNTPs (2,5 M)	2	65°C	30 s	25
DMSO	2	72°C	1 min	25
$MgCl_2$	0,5	72°C	5 min	1
Polimerase	0,5	16°C	∞	
Tampão	10			
Água Milliq	30			
Volume total	50			

Fonte: autoria própria.

5.1.4 Vetor de transformação e expressão.

O vetor pEXPYR, foi utilizado para a super-expressão e secreção da proteína de interesse no fungo filamentoso *A. nidulans* linhagem *A773*. O vetor contém marcas de seleção que conferem resistência a ampicilina e zeocina, um promotor da glucoamilase de *A. niger* (*glaAP*) para indução da expressão gênica mediada por maltose, seguido por uma região *N*-terminal, que contém o peptídeo sinal e o terminador triptofano (*antrpCt*).

Na região de clonagem, existem sítios de restrição para as enzimas *NotI* e *XbaI*, (utilizados para inserir o gene de interesse quando se quer usar a sequência que codifica o peptídeo sinal da glucoamilase), e *BbvCI* e *XbaI* (para utilizar o peptídeo sinal nativo da proteína de interesse).

Possui também, uma marca de reversão de auxotrofia composta pelo gene que codifica a orotidina-5´-monofosfato descarboxilase de *A. niger* (*pyrG*). Esta enzima é fundamental para a biossíntese de pirimidinas, a presença deste gene no vetor é utilizada para complementar a linhagem auxotrófica de *A. nidulans* A773 (*pyrG*$^-$), a qual em condições naturais não consegue sintetizar uracila e uridina, sendo esta uma marca que permite verificar e selecionar as colônias transformantes positivas deste fungo, quando cultivadas em meio mínimo sem adição de uracila e uridina, uma vez que a inserção sucedida do vetor reconfere ao fungo a capacidade de sintetizar estes compostos.

O gene *pyrG* é flanqueado por repetições invertidas de 40 pb do *mate1* de *A. nidulans* que facilita a excisão do gene *pyrG*, restaurando o genótipo *pyrG*$^-$ dos transformantes, permitindo a realização de uma nova transformação ao mesmo organismo, sendo então este vetor reutilizável e muito apropriado para a criação de *cell factories* (SEGATO et al., 2012).

Para a inserção do gene pela metodologia de *Gibson*, foi necessário a linearização e o aumento do número de copias do vetor mediante PCR, segundo as condições apresentadas na tabela 2, utilizando o mesmo vetor como *template* e *primers* específicos para sua amplificação.

Tabela 2 – Condições utilizadas para amplificação do vetor.

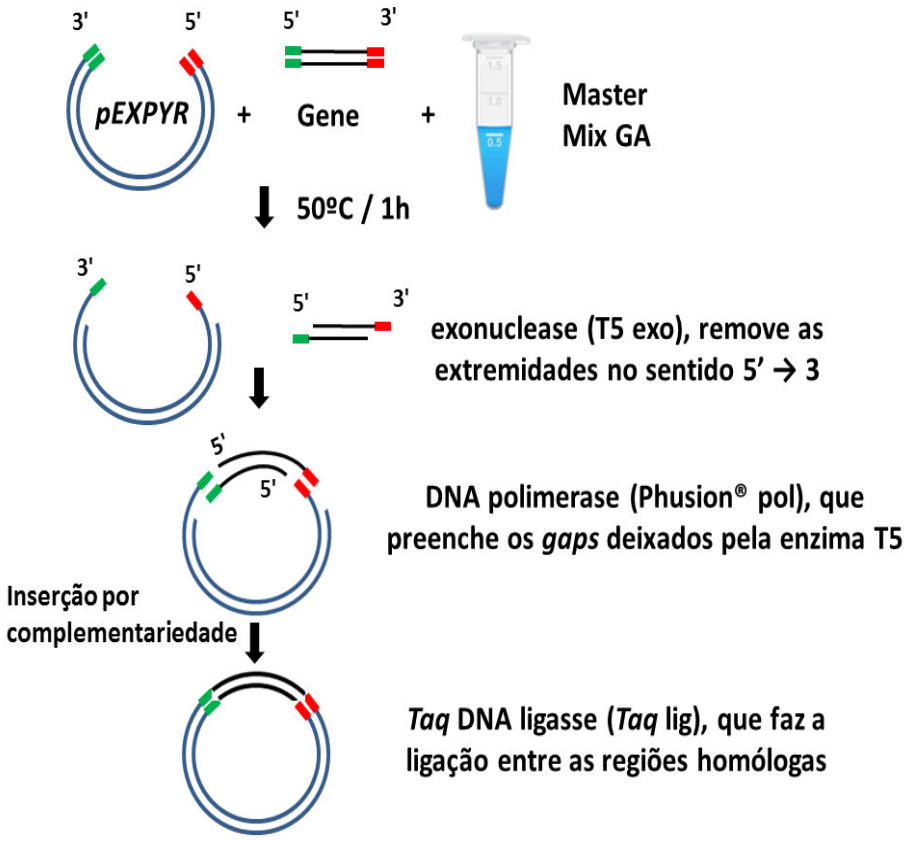
REAÇÃO		PROGRAMAÇÃO DO TERMOCICLADOR		
Reagentes	**Quantidades (µl)**	**Temperatura**	**Tempo**	**Nº de ciclos**
Template-vetor	1			
Primer pEXPYR Forward	2	98°C	30 s	1
Primer pEXPYR Reverse	2	98°C	10 s	24
dNTPs (2,5 mM)	2	72°C	30 s	24
DMSO	2	72°C	2 min	24
$MgCl_2$	0,5	72°C	5 min	1
Phusion polimerase	0,5	16°C	∞	
Tampão Phusion	10			
Água Milliq	30			
Volume total	50			

Fonte: autoria própria.

5.1.5 Inserção do gene de interesse ao vetor

Para a inserção dos genes que codificam as proteínas GH93 em *M. thermophila* (ABNm) e *T. terrestris* (ABNt) no vetor pEXPYR, foi utilizada a metodologia de *Gibson Assembly*, a qual não requer o uso de enzimas de restrição para tratar o vetor ou os fragmentos de DNA correspondentes aos genes. Para a reação de *Gibson*, foram preparadas misturas com 4µL tanto de ABNt, quanto de ABNm, com 2µL de vetor (25ng/µL) e 5 µL de *master mix Gibson Assembly* (GA). As amostras, foram então incubadas por uma hora a 50 ºC. O *master mix* GA contém uma 5'-T5 exonuclease (T5 exo), que remove as extremidades no sentido 5' → 3', uma *Phusion*® DNA polimerase (Phusion® pol), que preenche os *gaps* deixados pela enzima T5 e uma *Taq* DNA ligase (*Taq* lig), que faz a ligação entre as regiões homólogas, como pode ser visualizado na figura 5 (GIBSON, 2011).

Figura 5 - Esquematização da metodologia de *Gibson Assembly*



Fonte: adaptado (GIBSON, 2011).

5.1.6 Transformação bacteriana

Mesmo que o objetivo final do trabalho foi a transformação fúngica, foi preciso inserir o vetor contendo o gene de interesse em uma célula bacteriana, com a finalidade de utilizar o seu crescimento acelerado para obter um maior número de cópias da construção de interesse (vetor + gene), pois são necessários entre 5 e 10 µg de DNA plasmidial para a transformação do fungo *A. nidulans* A773.

A transformação bacteriana foi realizada utilizando a metodologia de *heat shock*, com células quimio-competentes de *E. coli* Turbo. Estas células, apresentam uma taxa de crescimento mais acelerado e tiveram a sua membrana celular carregada positivamente por tratamento químico ($CaCl_2$). Células contidas em 100 µL de meio SOC (apêndice A) foram descongeladas em banho de gelo, homogeneizadas e misturadas com o produto da reação do *Gibson Assembly* (aprox. 11 µL de vetor com gene), a reação foi mantida em banho de gelo por 30

minutos, durante este período, o DNA (vetor + gene) por apresentar carga negativa, fica aderido a membrana celular.

Em seguida a reação foi submetida ao choque térmico em banho-maria a 42°C por 45 segundos permitindo ao DNA ingressar ao citosol bacteriano. As células foram imediatamente transferidas para o banho de gelo, por mais 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de meio SOC e as mesmas foram incubadas a 37°C por 1 hora, sob agitação de 200 rpm. Após, o cultivo foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto, o excesso de sobrenadante foi descartado e a amostra remanescente de aproximadamente 100 µL foi utilizada para a resuspensão do pellet, que foi transferido para placas de Petri contendo meio LB sólido (apêndice A), acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram então incubadas por 18 horas a 37 °C, nestas condições apenas as células que continham o plasmídeo se desenvolveram e formaram colônias.

5.1.7 PCR de colônia

Para avaliar a inserção do vetor contendo o gene de interesse, as colônias resultantes da transformação foram submetidas ao PCR de colônia. Para isso, foram selecionadas e coletadas 10 colônias. Cada uma foi transferida para um tubo com 10 µL de água destilada estéril e, em seguida, 1 µL desta suspensão foi utilizada como *template* para reação de PCR de colônia realizada em termociclador *MyCycler* (Bio-Rad), usando as condições listadas na tabela 3. Para a reação, foram utilizados os *primers forward* e *reverse* correspondentes aos genes ABNm e ABNt, os procedimentos sempre foram feitos separadamente, mantendo a distinção entre os organismos portadores dos respectivos genes.

Nos primeiros cinco minutos do processo de PCR, as células são totalmente lisadas por efeito dos reagentes e da temperatura (98 °C), liberando os plasmídeos para dar continuidade ao processo. A presença dos genes de interesse no produto de PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), utilizando o marcador *GeneRuler 1 Kb plus DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*) para conferir o tamanho.

Tabela 3 – Condições utilizadas para PCR de colônia.

.

REAÇÃO		PROGRAMAÇÃO DO TERMOCICLADOR		
Reagentes	**Quantidades (µl)**	**Temperatura**	**Tempo**	**N° de ciclos**
Suspenção celular (template)	1			
Primer Forward	1	98ºC	5 min	1
Primer Reverse	1	98°C	10 s	30
dNTPs (2,5 mM)	1	68°C	30 s	30
DMSO	1	72°C	30 s	30
$MgCl_2$	0,25	72°C	5 min	1
Polimerase Phusion	0,25	16°C	∞	
Tampão Phusion	5			
Água Milliq	15			
Volume total	25,5			

Fonte: autoria própria.

5.1.8 Purificação dos plasmídeos

Após confirmação da presença dos genes clonados nas colônias bacterianas, os 9 µL da suspensão celular restante (usada como *template* no PCR de colônia) foram inoculados em 10 mL de meio LB líquido, acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e cultivados por 16 horas a 200 rpm e 37 °C, favorecendo a multiplicação dos plasmídeos que foram utilizados para posterior transformação fúngica. Para a extração dos plasmídeos das células bacterianas, os cultivos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. O *pellet* formado foi submetido a etapa de extração e purificação do DNA plasmidial, utilizando-se o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) seguindo as especificações do fabricante.

5.1.9 Transformação fúngica

5.1.9.1 Preparação de protoplastos

Vinte mililitros de uma suspensão de esporos do fungo *A. nidulans* A773, em uma concentração de 10^8 por mL foram inoculados em 250 mL de meio

mínimo pH 6,5 suplementado com uracila, uridina (2.5 mg/L de cada) e piridoxina (1 mg/L) (apêndice A). O cultivo foi mantido a 37 °C, sob agitação (180 rpm) por 18 horas. Os esporos e micélio produzidos foram recuperados por filtração em papel de filtro *Whatman* no. 1, foram lavados com solução de $MgSO_4$ 0,6 M e transferidos para um tubo cônico estéril de 50 mL contendo 10 mL de DSPS pH 5,8 (*Double Strength Protoplasting Solution:* KCl 1,1M, ácido cítrico 0,1M), acrescido das seguintes enzimas: 200 mg de *Lysing enzymes from Trichoderma harzianum* (Sigma L1412), 100 mg de *Lysozyme from Chicken Egg White* (Sigma L6876). Esta mistura pastosa foi incubada a 32 ºC, sob agitação a 180 rpm, por aproximadamente 3 horas até virar uma solução completamente líquida, produto da digestão enzimática da parede celular dos esporos e das células que formam as hifas.

Os protoplastos resultantes da digestão foram separados da solução por filtração em membrana *Miracloth* (Calbiochem) onde os resíduos fúngicos de maior tamanho são retidos e os protoplastos passam, sendo coletados em tubo de centrífuga de 50 mL estéril. Os protoplastos resultantes foram ressuspendidos e lavados 3 vezes com 50 mL de STC50 (Sorbitol 1,2 M, $CaCl_2$ 50 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, autoclavado e mantido a 4 °C), mediante centrifugação a 4500 rpm, a 4 ºC por 10 min para remoção das enzimas de protoplastização e carregar positivamente a membrana do protoplasto com $CaCl_2$. O sorbitol é um estabilizante osmótico que evita a ruptura dos protoplastos, que por falta de parede celular são muito susceptíveis a pressão osmótica. Por fim, o pellet resultante foi ressuspendido em 1 mL de STC 50 e os protoplastos obtidos foram utilizados na etapa de transformação.

5.1.9.2 Transformação dos protoplastos mediada por PEG

A transformação do fungo *A. nidulans* A773 com os vetores contendo os genes que codificam as proteínas da família GH93 obtidos dos fungos *M. thermophila* e *T. terrestris* foi feita separadamente, utilizando o método de transformação mediado por Polietilenoglicol. Para isso, adicionou-se aproximadamente 6 µg do DNA plasmidial a um tubo estéril contendo 250 µL da solução de protoplastos obtidos anteriormente. A mistura foi mantida à

temperatura ambiente por 15 min, nesta etapa, os plasmídeos com carga negativa irão se colocar ao redor dos protoplastos que tiveram sua membrana carregada positivamente. A homogeneização da mistura de uma maneira sutil é importante para evitar a ruptura dos protoplastos. Em seguida, foi adicionado 2 mL de solução PEG 60% (6 g de Polietilenoglicol 4000, dissolvidos em 10 ml de STC 50, em micro-ondas). Para garantir uma perfeita mistura dos protoplastos com a solução de PEG, a solução foi agitada cuidadosamente e extensivamente, foi incubada à temperatura ambiente por 20 min, durante este tempo o PEG induz a aglutinação e fusão dos protoplastos que ao se unirem, permitem a internalização dos plasmídeos circundantes ao citosol para a posterior recombinação com o genoma do fungo (KUWANO; SHIRATAKI; ITOH, 2008). Por fim, adicionou-se 10 mL de solução STC50, misturou-se bem e foram transferidos alíquotas de 2 ml para placas de Petri contendo meio de regeneração (meio mínimo adicionado de sorbitol 1,2 M e piridoxina 1mg/L), onde os transformantes foram selecionados pela reposição da marca auxotrófica *pyrG*. As placas foram incubadas a 37 ºC com as tampas voltadas para cima por 24h e então foram invertidas e incubadas por mais 48 horas, para o crescimento dos transformantes.

5.1.10 *Screening* das colônias de *A. nidulans* recombinante

Após a confirmação da integração dos plasmídeos ao genoma do fungo pela reversão auxotrófica evidenciada pelo crescimento das colônias de *A. nidulans* A773 em ausência de uracila e uridina, foi realizada uma triagem de vários transformantes, visando selecionar uma cepa que apresentasse melhores níveis de expressão e secreção da proteína de interesse. Nesta etapa foi usado como controle de expressão/secreção uma cepa de *A. nidulans* A773 (*pyrG*+) portadora do vetor pEXPYR sem o gene de interesse (vetor vazio). As colônias transformantes coletadas foram numeradas e juntamente com o controle, foram inoculadas em placas de Petri contendo 10mL de meio indutor (meio mínimo substituindo-se glicose por 5% de maltose, adicionado de piridoxina) e foram mantidos a 37 ºC por 48 horas em estado estacionário, tempo no qual as enzimas secretadas pelo fungo recombinante se acumulam no meio. Após este período de incubação, os extratos foram coletados e concentrados 20 vezes em dispositivos

de ultra filtração Vivaspin (GE *Healthcare*), com membrana de corte de 10 KDa, mediante centrifugação a 10000 rpm por 10 min. A expressão heteróloga da proteína de interesse foi analisada pela comparação do perfil proteico dos transformantes testados (tamanho/acumulação) com o controle, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, SDS-PAGE 12% (apêndice A), utilizando marcador de baixa massa molar (97, 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 KDa) e posteriormente corado com azul brilhante de Comassie (SHAPIRO; VIÑUELA; V. MAIZEL JR., 1967).As bandas da proteína heteróloga que coincidiram com o tamanho da arabinanase foram cortadas, purificadas, digeridas com tripsina e analisadas por espectrofotometria de massas (LC-MS/MS), para confirmar que as colônias recombinantes de *A. nidulans* estavam secretando as enzimas codificadas pelos genes de *M. thermophila* ou de *T. terrestris*.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Análise filogenética e seleção das sequências proteicas

Trinta sequências de exo-arabinanases fúngicas foram analisadas filogeneticamente pelo *software* MEGA7, a partir do alinhamento feito usando a ferramenta *MUSCLE* (*Multiple Sequence Alignment*) e da construção de uma árvore filogenética pela metodologia de *Neighbour Joining*. Para distinguir os diferentes domínios analisados e características dentro destes domínios, foram utilizadas figuras geométricas (▲, ●, ■) e cores, respectivamente (Figura 6). A análise das sequências apresentou a existência de três diferentes domínios conservados: sialidase não viral, BNR (*Bacterial Neuramidase Repeat*) e glicosil hidrolase para as famílias 32,43,62,68 e 45-65. O principal domínio apresentado, foi o sialidase não viral, que agrupou as sequências em uma superfamília representada pelo mesmo nome. As sialidases são enzimas que catalisam reações de quebra do ácido siálico em carboidratos complexos, glicoproteínas ou glicolipídeos, estando muitas vezes relacionadas com atividade patogênica de algumas bactérias que afetam principalmente as mucosas e pele de humanos (JUGE; TAILFORD; OWEN, 2016). Dentro desta superfamília podem estar contidas, algumas classificações relacionadas com regiões conservadas da

proteína, que dão origem a estruturas do tipo *propeller*. Na árvore filogenética gerada neste trabalho, foram agrupadas em clados as sequências pertencentes à superfamília sialidase não viral que possuem *propeller* 1,2,3,4,5,6. Esta numeração de *propeller* depende do tipo e do número de aminoácidos conservados que a compõem (Tabela 4). Na análise, as sequências com regiões *propeller* 4,5,6 foram representadas em apenas um clado, identificado pela cor azul, em cor preta o domínio *propeller* 1 e em vermelho sequências com *propeller* 4 e 5. As sequências que representavam os domínios BNR formaram clados muito próximos, fazendo distinção entre a subdivisão BNR1 representada pela cor amarela e BNR2 pela cor verde. O domínio BNR indica que as enzimas poderiam apresentar um comportamento sialidase (Figura 6). Os domínios glicosil hidrolase (GH) são os representados em menor número dentro das sequências estudadas, sendo que, apenas duas delas apresentaram este tipo de domínio conservado que é comum para as famílias GH 32,45,65,68 (círculo laranja) e 32,43,62,68 (círculo azul). O fato destas sequências conterem subdomínios compartilhados entre elas, como GH32 e GH68 faz com que fiquem em clados muito próximos (SANTOS et al., 2016).

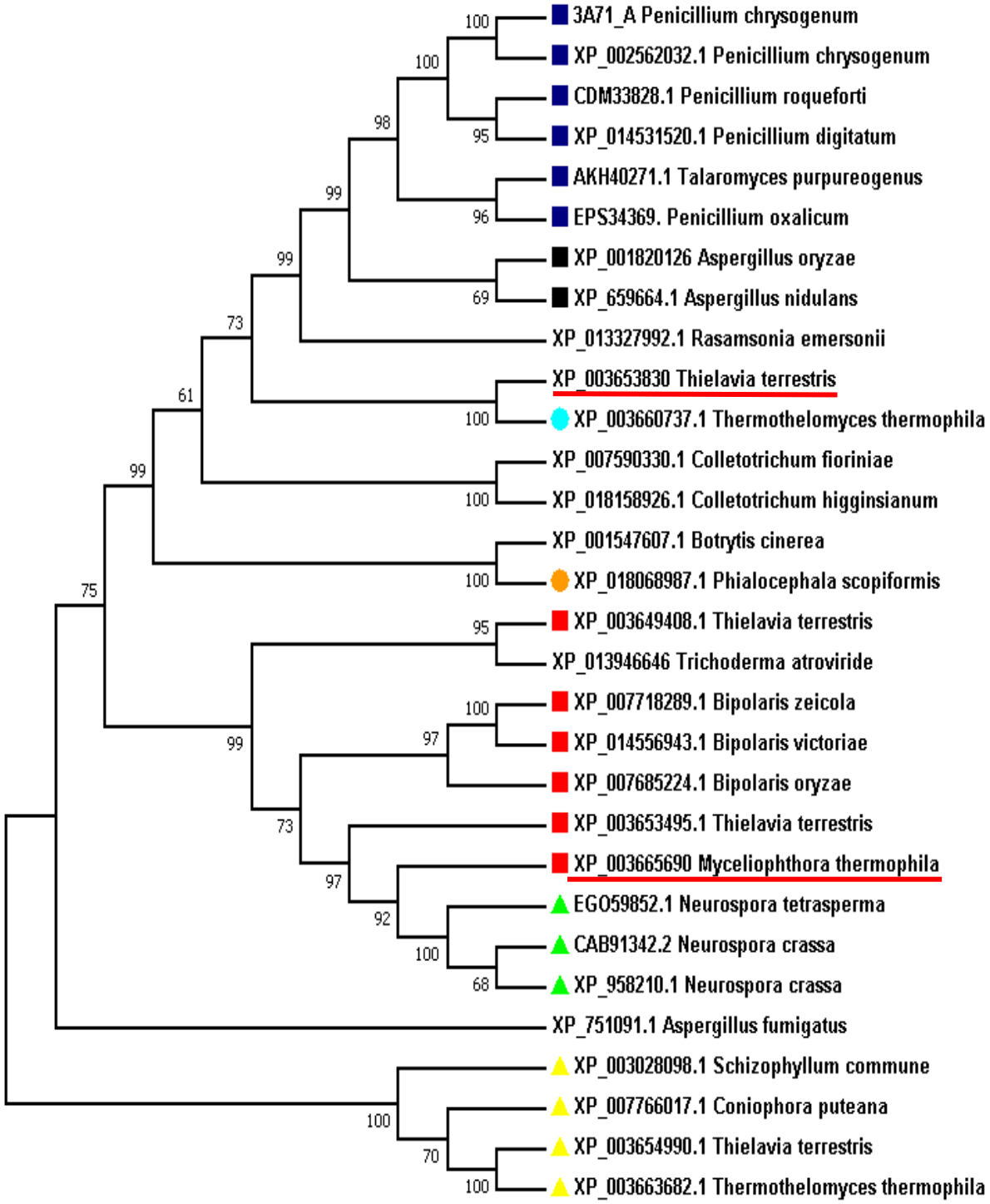
Estudos de bioinformática realizados por Pons e colaboradores, fazendo uso de múltiplos alinhamentos e mutações de aminoácidos em enzimas das famílias GH 32,43,62 e 68 mostraram que estas famílias apresentam domínios conservados comuns no seu sitio catalítico, com presença específica dos aminoácidos asparagina e glutamina. As estruturas preditas para estas proteínas foram do tipo *β-propeller* (PONS et al., 2004).

Tabela 4 – Quantidade de aminoácidos que compõem as estruturas *propeller* dentro da superfamília sialidase não viral.

Tipo de estrutura	Nº de aminoácidos constitutivos
Propeller 1	39
Propeller 2	35
Propeller 3	36
Propeller 4	32
Propeller 5	37
Propeller 6	24

Fonte: autoria própria

Figura 6 - Árvore filogenética das sequências de proteínas exo-arabinanases.



Fonte: autoria própria.

Nota: Os quadrados representam o domínio sialidase não viral (em preto *propeller* 1, azul *propeller* 4,5,6 e vermelho *propeller* 4 e 5).
Os triângulos representam o domínio BNR (amarelo BNR 1 e verde BNR 2).
O domínio GH esta representado pelos circulos (laranja: regiões comuns para GH 32,45,65,68; azul: para regiões comuns entre GH 32,43,62,68).
As sequências selecionadas para expressão heteróloga estão sublinhadas em vermelho.

Para a seleção das sequências utilizadas nas clonagens e expressão heteróloga, utilizou-se como modelo de busca, proteínas encontradas nos secretomas dos fungos termofílicos *M. thermophila* e *T. terrestris*, obtidos em resultados prévios de nosso grupo de pesquisa, onde, foram encontradas exo-arabinanases quando estes organismos foram cultivados em bagaço de cana como única fonte de carbono. Além disso, pelo fato destes organismos apresentarem características termofílicas, aumentam as possibilidades das enzimas codificadas por eles, apresentarem estabilidade em altas temperaturas, a qual, é adequada para utilização em alguns processos industriais, pois, permitem aumentar a eficiência dos processos hidrolíticos ao diminuir a viscosidade do substrato, os tempos de hidrólise e os riscos de contaminação (TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007). Assim, foram selecionadas as sequências XP003653830 de *T. terrestris* e XP003665690 de *M. thermophila*. A sequência de *T. terrestris* foi escolhida devido aos resultados obtidos nas análises filogenéticas sendo que esta proteína foi agrupada no clado das glicosil hidrolases. Ambas sequências apresentaram peptídeo sinal, o que demonstrou serem extracelulares, segundo o *software SignalP*. Os dados de ponto isoelétrico (pI), coeficiente de extinção molar e massa molar, foram inferidos pelo *software ProtParam* e são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Proteínas selecionadas para expressar heterólogamente em *A. nidulans* A773, a região sublinhada (apresentada nos primeiros 29 aminoácidos da sequência) corresponde ao peptídeo sinal.

Proteína	Peptídeo sinal	p.I	MW Da	ε
XP003653830 *T. terrestris*	**MRWSTLVLSLLPIVSA**APKEKTPKTFSQR	6,1	39886	72770
XP003665690 *M. thermophila*	**MRIHLRGFAILGLAVEAAIA**RPPGPPDTP	5,6	43779	80330

Fonte: arquivo próprio
Nota: MW: Massa molar em Daltons.
p.I: Ponto isoelétrico.
Ɛ: Coeficiente de extinção molar.

5.2.2 Construção dos *primers* e clonagem dos genes

As sequências dos genes que codificam as proteínas de interesse neste trabalho foram obtidas por ferramentas de bioinformática e apresentaram um

tamanho de 1275 e 1143 pb para *M. thermophila* (ABNm) e *T. terrestris* (ABNt) respectivamente. As sequências dos *primers* utilizados para a clonagem, com as caudas acrescentadas para inserção no vetor (região em negrito), são mostradas na tabela 6.

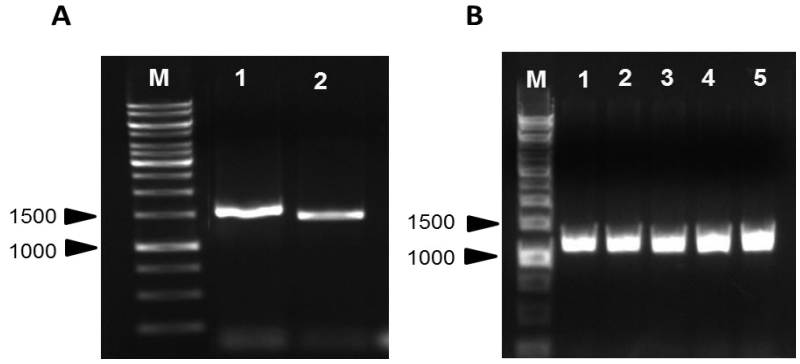
Tabela 6 – Sequências dos *primers* utilizados na amplificação e clonagem dos genes de interesse, as regiões mostradas em negrito, correspondem as caudas acrescentadas para a inserção do gene ao vetor pEXPYR pela metodologia de *Gibson Assembly*.

Organismo	Primer	Sequência
M. thermophila	Fwd	5'-**ATTACACCTCAGCAATGCG**TATTCACCTCCGTGGTTTTGCCATC-3'
	Rev	5'-**GTCCCGTGCCGGTTAT**TAGGGTGACTGGCCAGGTCAGAATA-3'
T. terrestris	Fwd	5'-**CATTACACCTCAGCAATGCG**GTGGTCAACGCTCGTCCTG-3'
	Rev	5'-**GTCCCGTGCCGGTTAT**CACAACGCCGCCTTCAGTTTGCTGATGTC-3'

Fonte: autoria própria.
Nota: Fwd: *Forward*.
Rev: Reverse.

Os genes foram amplificados e clonados de maneira satisfatória, apesar do gene ABNm ter apresentado tamanho um pouco maior que o esperado, como mostrado na figura 7A. Essa diferença no tamanho pode ser devido a uma possível degradação no marcador de peso molecular, uma vez que nos experimentos que foram realizados após os procedimentos de clonagem, o fragmento mostrou-se em seu tamanho correto (Figura 8A).

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o produto de PCR após a amplificação dos genes de interesse.

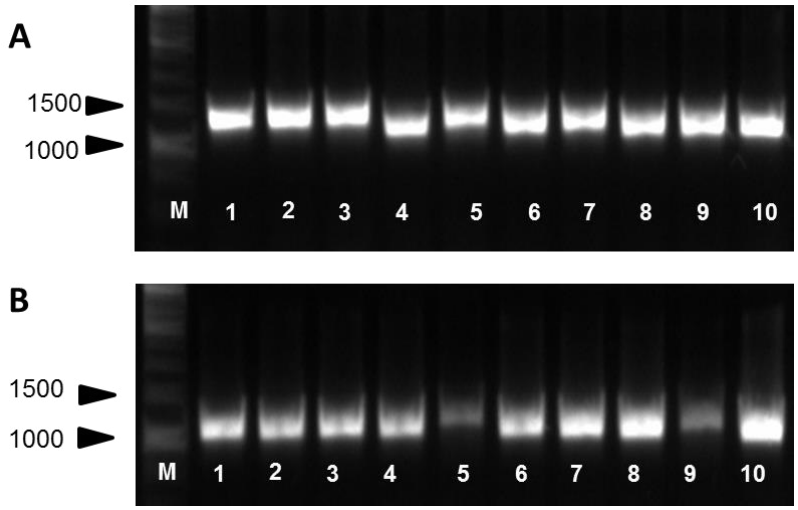


Fonte: autoria própria.
Nota: A: *M. thermophila* 1275 pb, 1, 2 cópias do gene.
B: *T. terrestris* 1143pb, 1-5 cópias do gene.
M: marcador de peso molecular.

5.2.3 Transformação bacteriana e PCR de colônia

Após a inserção dos genes de interesse no vetor pEXPYR por *Gibson Assembly,* foi realizada a transformação em *E. coli*. Das colônias obtidas, após seleção em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml), 10 foram selecionadas, tanto para o gene ABNt quanto para ABNm e submetidas a análise por PCR de colônia. Com esta técnica, foi possível confirmar a presença dos genes de interesse como mostrado na figura 8

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação dos genes ABNm (A) e ABNt (B), após do PCR de colônia



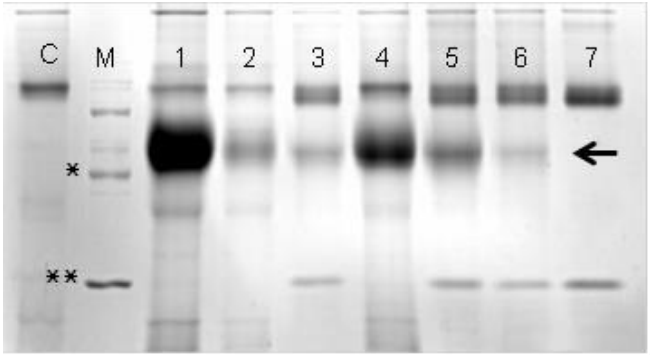
Fonte: autoria própria.
Nota: M: marcador de massa molar.
1-10: copias dos genes amplificadas a partir de cada colônia.

Na figura 8, observa-se que nas análises do gene ABNm, das 10 colônias selecionadas, foram obtidos dez clones positivos (um para cada colônia avaliada, totalizando 100% de eficiência na transformação), sendo que os fragmentos resultantes ficaram na faixa correspondente ao tamanho do gene de 1275 pb, com uma pequena diferença visualizada no clone 4, quando comparado aos demais. No caso do gene ABNt apenas os clones 5 e 9 presentaram uma pequena diferença no tamanho, quando comparados aos outros, porém apresentaram um tamanho aproximado de 1143 pb, o que corresponde ao tamanho esperado. Para os experimentos subsequentes, foi coletado um clone para cada gene e este foi cultivado para aumentar a quantidade de plasmídeos a serem utilizados na transformação do fungo *A. nidulans* A773.

5.2.4 *Screening* dos transformantes de *A. nidulans* A773

Após a transformação de *A. nidulans* A773 com os vetores contendo os genes ABNm e ABNt, foram obtidas várias colônias consideradas positivas, devido a sua capacidade de crescimento em meio mínimo ausente de uracila e uridina. Para confirmar se as colônias obtidas haviam incorporado, dentro do seu genoma, a construção de interesse e se as mesmas secretavam a proteína de interesse, as colônias foram cultivadas em meio de indução. Após 48 h de cultivo, o micélio foi removido, os extratos foram coletados, concentrados e avaliados quanto ao seu perfil proteico por SDS-PAGE, utilizando como controle uma colônia de *A. nidulans* A773 transformada com o vetor vazio (Figura 9).

Figura 9 - SDS-PAGE mostrando o perfil proteico dos extratos obtidos a partir do cultivo de sete colônias de *A. nidulans* A773 transformado com o vetor contendo o gene ABNm após dois dias de cultivo.

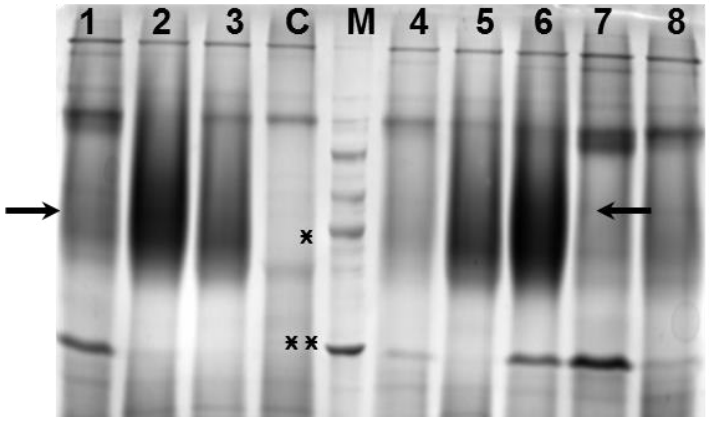


Fonte: autoria própria.
Nota: Seta indica a região onde se encontra a proteína heteróloga, produzida em maior quantidade.
C: controle.
M: marcador de massa molar.
*: 45KDa.
**: 30 KDa.
1-7: colônias do fungo.

A figura 9 confirma que as colônias transformantes analisadas para o gene de *M. thermophila* apresentaram altos níveis de produção da proteína heteróloga, pois, no controle (C), não se evidenciou a presença da banda na mesma posição. Dentre os transformantes selecionados, a colônia 1 apresentou uma alta concentração da proteína alvo em seu extrato. Devido a esta diferença, foi muito provável que esta proteína correspondesse à arabinanase de interesse, produto da expressão do gene ABNm, pois, a proteína (*abn*m) codificada por este gene apresenta um tamanho de 43,7 KDa. No entanto, as bandas mostradas no gel

mostraram-se um pouco acima de 45 KDa e esta diferença pode ser aferida a presença de glicosilações. Para as colônias obtidas após transformação de *A. nidulans* com o gene ABNt, também foi comprovada a presença de proteína heteróloga nos extratos testados, como mostrado na figura 10. Embora seja mais difícil estimar o tamanho das bandas mostradas, pois estas não estão bem definidas, devido ao padrão de migração no gel, ficou claro que a maior acumulação da proteína esteve na faixa de 45 KDa, o qual também mostrou-se um pouco maior que o esperado considerando-se o tamanho da arabinanase (*abn*t) de 39,8 KDa, codificada pelo gene ABNt.

Figura 10 – SDS-PAGE mostrando o perfil proteico dos extratos obtidos a partir do cultivo das 8 colônias transformantes de *A. nidulans* A773 com o gene ABNt após dois dias de cultivo.



Fonte: autoria própria.
Nota: A seta indica a região onde encontram-se as proteínas heterólogas produzidas em maior quantidade.
M: marcador.
C: controle.
⁎: 45 KDa.
⁎⁎: 30 KDa.
1-8: colônias do fungo.

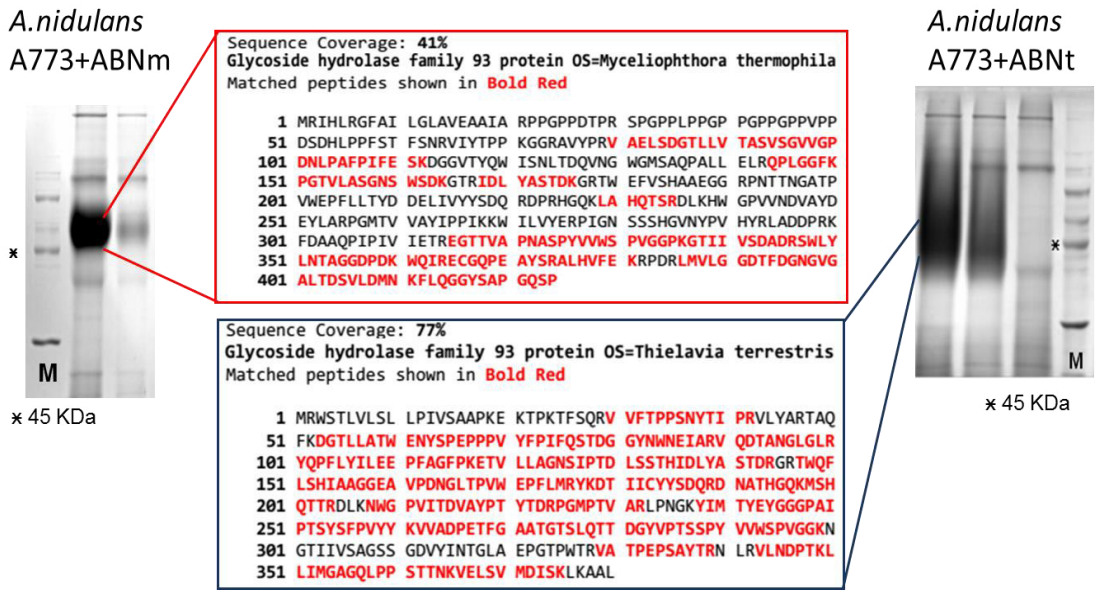
Para os perfis proteicos analisados, a presença de proteínas com maior tamanho, quando comparados ao que foi estimado pelo software *ProtParam*, pode ser aferido ao efeito de glicosilações, considerada uma das principais modificações pós-traducionais que é realizada por organismos eucariotos (CORFIELD, 2017). Levando-se em conta que mais da metade das proteínas presentes na natureza são glicosiladas (APWEILER; HERMJAKOB; SHARON, 1999; FONSECA-MALDONADO et al., 2013), pode-se considerar que a enzima expressa pode apresentar estas características, pois, as glicosilações não apenas

aumentam o tamanho da proteína alvo, como também influenciam no padrão de migração na eletroforese, como observado para as proteínas obtidas das colônias de *A. nidulans* ABNt+.

5.2.5 Análises por espectrofotometria de massas

Para confirmar se as bandas apresentadas na análise por SDS-PAGE correspondiam a arabinanases da família GH 93, as mesmas foram excisadas do gel e submetidas a análise em espectrômetro de massas (LC-MS/MS). Os resultados obtidos (Figura 11) confirmaram que o processo de transformação e a produção heteróloga foi realizado com sucesso, pois, a proteína secretada pelo transformante *A. nidulans* A773+ABNm foi identificada como uma glicosil hidrolase da família 93 (GH93) de *M. thermophila* com uma cobertura do 41% dos aminoácidos comparados, com 10 peptídeos identificados e a proteína do transformante *A. nidulans* A773+ABNt foi identificada como uma GH93 do fungo *T. terrestris* com uma cobertura do 77% e 16 peptídeos identificados (Figura 11).

Figura 11 – Resultados obtidos por espectrometria de massas das proteínas heterólogas produzidas pelos organismos recombinantes.



Fonte autoria própria.
Nota: As sequências em vermelho correspondem aos peptídeos identificados por LC-MS/MS na proteína de interesse.
M: marcador de massa molar.

O projeto, tinha como o objetivo inicial, a clonagem e produção de uma enzima GH93, então, foram selecionados genes para esta família em dois organismos, *M. thermophila* e *T. terrestris*. Como o processo de clonagem e expressão foi bem-sucedido, para as duas sequências selecionadas foi necessário escolher um dos alvos para dar continuidade aos processos de purificação e caracterização bioquímica.

Baseado nos resultados obtidos pelas análises filogenéticas e de espectrometria de massas, a proteína *abn*t codificada pelo gene ABNt foi selecionada, por ter sido confirmada como uma GH93 e segundo a filogenia por estar agrupada num clado junto com proteínas que apresentam domínios conservados de glicosil hidrolases diferente de *abn*m que foi agrupada no clado das proteínas como domínio conservado sialidase.

6 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUIMICA DA ENZIMA *abn*t

Até o momento, apenas cinco exo-α-1,5-arabinanases foram caraterizadas do ponto de vista bioquímico, sendo quatro delas pertencentes a fungos filamentosos e uma produto de estudos metagenômicos de rúmem bovino denominada ARN3 (WONG; CHAN; BATT, 2008).

Entre elas apenas uma (Abn2) de *Chrysosporium lucknowense* foi produzida de maneira homóloga (KÜHNEL et al., 2010), as demais foram expressas heterólogamente usando *E. coli* e Arap2 de *Penicillium purpurogenum* foi expressa em *Pichia pastoris* (MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015). Todas as enzimas reportadas apresentaram uma maior atividade em arabinana desramificada, afinidade por pHs ácidos e nenhuma delas com caraterísticas termofílicas.

Arap2 apresentou altos níveis de glicosilação (uma caraterística comum em proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris*) com uma atividade volumétrica de 0,86 U/mL após oito dias de cultivo para o melhor transformante e uma atividade especifica de 103,4 U/mg (MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015). Entre as GH93 reportadas, apenas duas apresentam estudos cinéticos completos onde os parâmetros K_m, K_{cat}, V_{max}, e eficiência de catálise K_{cat}/K_m foram calculados usando arabinohexaose como substrato em ambos os casos (CARAPITO et al., 2009; SAKAMOTO et al., 2004).

A enzima *abn*t estudada nesta pesquisa apresentou um tamanho maior que o estimado por ferramentas de bioinformática, provavelmente devido a presença glicosilações. É esperado que glicosil hidrolases produzidas em *A. nidulans* apresentem glicosilações considerando que em estudos recentes do secretoma deste fungo mostraram que 73% das proteínas glicosiladas produzidas por ele eram GHs (RUBIO et al., 2016). Neste capítulo, serão apresentadas as etapas de purificação, desglicosilação e caraterização bioquímica da enzima *abn*t, incluindo o cálculo do seus parâmetros cinéticos utilizando arabinana linear como substrato e o efeito de diferentes íons sobre sua atividade hidrolítica.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Produção e purificação enzimática

Dando continuidade ao processo, foi escolhida a proteína de *T. terrestris* (*abn*t) secretada por *A. nidulans* A773 para a produção em uma maior quantidade, e ser utilizada na caracterização bioquímica. A cepa transformada foi cultivada em 15 placas de Petri contendo 20 mL de meio de indução em estado estacionário por 48h a 37 °C. Ao término da incubação, o extrato bruto foi filtrado a vácuo em papel de filtro, e o volume total do extrato foi concentrado no aparato *Amicon-Stirred Cell* (Merck-Millipore) com membrana de corte de 10 KDa, até um volume final de 50 mL. A este volume, foram adicionados 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 para dialisar o extrato e continuar a concentração até um volume de 30 mL, garantindo que o pH da solução atingisse o valor de 7,5. Uma vez que, o pI da proteína *abn*t é 6,15, quando a mesma se encontrar em pH 7,5 estará carregada negativamente, podendo ser submetida a metodologia de purificação por troca iônica.

6.1.2 Troca iônica e gel filtração

O extrato concentrado foi aplicado em coluna de cromatografia de troca iônica DEAE-SEPHAROSE CL-6B (GE *Healthcare*) equilibrada previamente com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 recuperando o eluato. Em seguida, foi feita uma lavagem com 15 mL do mesmo tampão coletando também o material eluído da coluna durante o processo. Para eluição da proteína, foi utilizado um gradiente de NaCl (50, 100, 200, 300, 400 e 500 mM), coletando frações de 15 mL para cada concentração de sal. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 12% e aquelas que apresentaram a proteína de interesse foram reunidas e concentradas para um volume final de 6 mL, para posterior aplicação em sistema cromatográfico, com volume de injeção de 0,5 mL. O concentrado foi aplicado em coluna de gel filtração Superdex 200 10/300 GL (GE *Healthcare*) acoplada ao sistema ÄKTA™ *Pure* M25 (GE *Healthcare*) em volumes de 0,5 mL utilizando um fluxo de 0,5 mL/min, pressão máxima de 1,5 MPa com tampão

fosfato de sódio 50 mM pH 5 como fase móvel, com coleta de frações a cada 1 mL. As frações que apresentaram a proteína segundo os picos cromatográficos obtidos, foram analisadas em SDS-PAGE 12% para conferir o tamanho e a presença da proteína de interesse. A quantificação da proteína purificada foi feita por leitura da absorbância a 280 nm no leitor de placas *Infinite* 200 Pro (TECAN), usando o coeficiente de extinção molar e a massa molar da proteína (apêndice B).

6.1.3 Desglicosilação

Para conferir se a diferença do tamanho da proteína obtida quando comparado ao tamanho predito pelo *Software ProtParam* envolvia a presença de glicosilações, uma amostra da proteína foi submetida a tratamento com a enzima Endo H P0702S (*New England Biolabs*). Cerca de 25 µg de proteína foi misturado com 1 µL de *Glycoprotein denaturing Buffer* 10X e aquecida por 10 min a 100 ^{o}C. Após, foram adicionados 2 µL de *Glycobuffer* 3, 10X e 2 µL de Endo H, sendo que o volume final de 20 µL foi ajustado com água estéril e a reação foi incubada a 37 ^{o}C por 1 hora. A proteína desglicosilada foi analisada por SDS-PAGE 12% utilizando como controle a mesma proteína sem nenhum tratamento.

6.1.4 Painel de substratos

Foram realizadas reações da enzima de interesse na presença de diferentes substratos comerciais para comprovar sua atividade de arabinanase. Inicialmente foi avaliada a atividade sobre 2 mM de *p*NP-A (4-nitrofenol arabinofuranosideo), utilizando 2,6 µg da enzima a 37 ^{o}C, em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 por 1 hora. Após, a reação foi neutralizada com adição de 100 µL de bicarbonato de sódio 2 M e analisada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm.

Para os substratos comerciais obtidos da Megazyme: arabinana desramificada, arabinana de beterraba, arabinoxilana de trigo, arabinoxilana de centeio e arabinogalactana, as condições de reação foram as seguintes: 50 µL de substrato 1% em água destilada estéril, 7µL (2,6 µg) da enzima e 43 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 , incubada a 40 ^{o}C durante 1h. A atividade da enzima foi verificada por liberação de açúcares redutores totais quantificados

pela técnica de DNS (MILLER, 1959), adicionando 100 µL do reagente em volume final de 200 µL, o qual foi lido com uma a 545 nm usando uma curva padrão elaborada previamente (apêndice B).

6.1.5 pH ótimo

Foi preparado um tampão de fosfato + citrato + glicina a 100 mM de cada reagente em água destilada, a diferentes valores de pH desde 2 até 10 e com intervalos de 0,5. Para verificar o valor de pH mais adequado para a atividade enzimática foi utilizado 50 µL de arabinana desramificada como substrato a 1% com 7 µL da enzima, 43 µL de tampão e incubada a 40 ^{o}C durante 1h. As reações foram feitas em triplicata para cada valor de pH avaliando a liberação de açúcar redutor por DNS.

6.1.6 Temperatura ótima

Para esta determinação foram avaliadas temperaturas de reação entre 30 e 85 °C durante 1h, com intervalos de 5 graus, utilizando 43 µL de tampão citrato-fosfato-glicina 100 mM pH 5, 50 µL de arabinana desramificada 1%, 7 µL da enzima para um volume final de 100 µL. Todas as reações foram feitas por triplicata avaliando o conteúdo de açúcar final por DNS.

6.1.7 Termoestabilidade

Visando conferir sua estabilidade térmica, a enzima arabinanase foi submetida a diferentes períodos de incubação (15, 30, 45, 60, 90 e 180 min) em diferentes temperaturas. Foram selecionados valores de temperatura acima e abaixo da ótima para um total de quatro: 60, 65, 70 e 75 °C. Para a reação, 7 µL da enzima foram incubados com 43 µL do tampão citrato-fosfato-glicina 100 mM pH 5, para cada temperatura nos tempos definidos acima, após cada período de incubação, foram adicionados 50 µL do substrato (arabinana desramificada 1 %) para avaliar a atividade enzimática residual a 70 °C durante 1 h conferindo a liberação de açúcar por DNS.

6.1.8 Estabilidade enzimática em diferentes pHs

Para avaliação da estabilidade hidrolítica da enzima em diferentes pHs através do tempo, foram escolhidos pHs próximos ao ótimo da enzima (4; 4,5; 5; 5,5; 6,0; 6,5). Para isto 7 µL da enzima foram incubados com 43µL do tampão citrato-fosfato-glicina nos diferentes pHs durante 3, 6, 24, e 48 horas a temperatura ambiente, após o período de incubação foram adicionados 50 µL do substrato 1% e feita a reação durante 60 min a 70°C, usando como controle as mesmas condições de reação para cada tratamento com a enzima porém sem o período prévio de incubação

6.1.9 Liberação de produto em relação ao tempo

Com o intuito de observar a geração de produto em diferentes tempos de reação foram realizados testes a 70 °C, pH 5, usando 7 µL da enzima com substrato 1% e volume final de reação de 100 µL, avaliando a liberação de açúcar por DNS por 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min.

6.1.10 Parâmetros cinéticos

Para a determinação dos parâmetros cinéticos a enzima foi incubada com diferentes concentrações de arabinana linear 0,027, 0,055, 0,083, 0,139, 0,555, 0,833, 1,389 mM, em um volume final de reação de 100 µL a pH e temperatura ótimos em tampão citrato-fosfato-glicina usando 7µL da enzima. O tempo de reação para as menores concentrações de substrato (0,027-0,139 mM) foi de 2,5 min e 5 min para as concentrações maiores, tendo em conta que a determinação dos parâmetros cinéticos deve ser realizada no momento em que a velocidade de reação mantém um comportamento linear. Os valores de K_m , V_{max}, K_{cat} e K_{cat}/K_m foram calculados usando o *software GraphPad Prism* (*GraphPad*), por regressão não linear.

6.1.11 Efeito de tampões

De maneira a avaliar o efeito que alguns íons poderiam exercer sobre a atividade enzimática, avaliou-se primeiro o efeito de diferentes tampões, visando uma alternativa para o tampão citrato-fosfato-glicina, pois o citrato tem propriedades quelantes que podem atrapalhar o efeito dos íons sobre a enzima.

Deste modo, foram testados dois tampões: acetato de sódio e acetato de amônio 50 mM, utilizando o tampão citrato-fosfato-glicina como controle. A reação foi realizada a pH 5, 70 °C durante 30 min, usando 7 µL da enzima, 43 µL do tampão e 50 µL do substrato a 1%, o açúcar liberado foi quantificado pelo método de DNS. Os tampões acetato foram selecionado por serem eles os mais comumente usados nos estudos das exo-arabinanases reportados na literatura (CARAPITO et al., 2009; SAKAMOTO; FUJITA; KAWASAKI, 2004; SOGABE et al., 2011).

6.1.12 Efeito de íons

Foram preparadas seis diferentes soluções de sais: $MgCl_2$, $ZnSO_4$, $CoCl_2$, $FeCl_3$, $NaMoO_4$ e $CaCl_2$ a 200 mM em água destilada. Para avaliar o efeito destes íons na reação, foram misturados 7 µL da enzima, 38 µL do tampão acetato de sódio, 5 µL da solução do respectivo íon e 50 µL do substrato a 1% para um volume final de 100 µL e a concentração de íon a 10 mM na reação, a qual foi incubada a 70°C por 30 min. Como controle, foram usadas as mesmas condições de reação sem adição de íons. Os íons Cálcio e Cobalto foram testados posteriormente a diferentes concentrações (1 até 10 mM) para avaliar seu efeito na atividade da enzima por comparação dos açúcares redutores liberados nas diferentes reações.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.2.1 Purificação enzimática

Cerca de 300 mL do extrato contendo *abn*t foram produzidos para o processo de purificação e caracterização. Para o processo de purificação o

extrato inicial foi concentrado e dialisado com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 para que a enzima de interesse fosse carregada negativamente e fosse submetida a purificação por cromatografia de troca aniônica.

Como pode ser observado na figura 12, a eluição da proteína ligada à resina foi realizada através de lavagem com soluções a diferentes concentrações de NaCl (50, 100, 200, 300, 400 e 500 mM) e as frações obtidas, foram analisadas em SDS-PAGE.

Como se mostra na figura 12A, a proteína de interesse foi eluída em todas as concentrações de NaCl utilizadas, inclusive uma pequena quantidade pode ser notada no *flowthrought* (injeção), mostrando pequenas diferenças em seu tamanho e na quantidade.

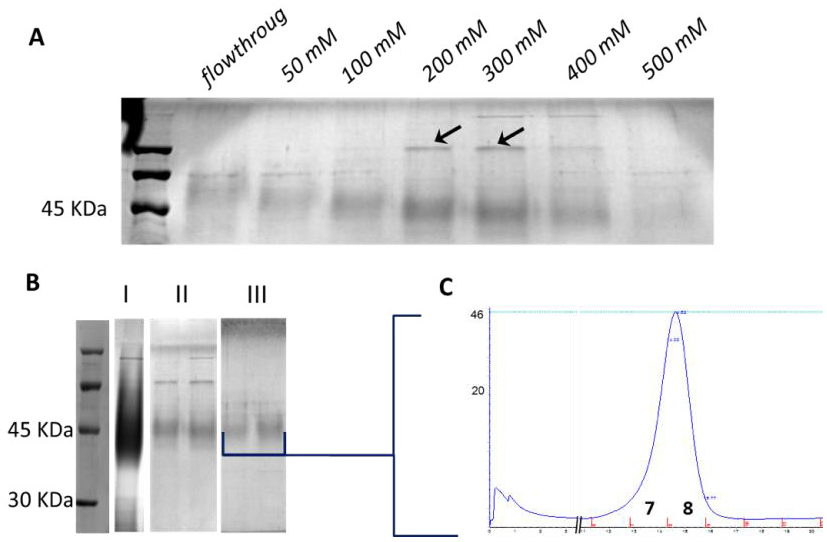
Segundo o perfil obtido no gel, foram escolhidas e unidas as frações eluídas em 200 e 300 mM de NaCl para dar seguimento ao processo de purificação por exclusão de tamanho, uma vez que as proteínas obtidas nestas frações apresentavam um tamanho aproximado ao estimado pelo *Protparam* e se mostraram em maior quantidade.

Para a etapa de cromatografia de exclusão por tamanho, as frações proteicas foram previamente concentradas de 30 para 6 mL e esta fração foi então injetada no sistema ÄKTA *Pure* M25.

Nesta etapa do processo, foi utilizada a coluna Superdex 200 10/300 GL e foi obtido um cromatograma mostrando a presença de um pico que correspondeu a proteína de interesse nas frações 7 e 8 (Figura 12C). Estas frações foram analisadas por SDS-PAGE mostrando também que a proteína tinha um maior nível de purificação devido à ausência daquela banda de maior tamanho que estava presente nas eluições da troca iônica (Figura 12B).

Após a purificação, as frações foram unidas e a concentração da enzima foi quantificada pela medida de sua absorbância a 280 nm e calculando sua concentração segundo a lei de Beer-Lambert, obtendo ao final do processo 0,37 mg/mL de *abn*t.

Figura 12 – Etapas utilizadas no processo de purificação enzimática.



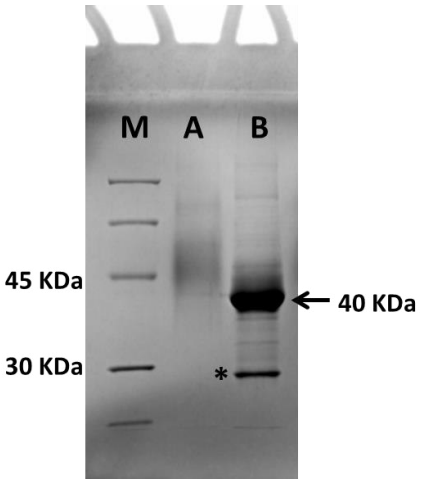
Fonte: autoria própria.
Nota: A: Eletroforese SDS-PAGE das eluições obtidas no processo de troca iônica, as setas indicam bandas proteicas de maior tamanho.
B: Comparação dos processos de purificação onde I refere-se ao extrato bruto inicial, II frações obtidas na troca ionica e III frações 7 e 8 coletadas na exclusão por tamanho, nota-se neste gel a ausência das bandas de maior tamanho que estiveram presentes no gel de troca iônica.
C: Cromatrograma obtido pelo processo de gel filtração resaltando as fracções 7 e 8

6.2.2 Desglicosilação

Após do processo de purificação a proteína manteve um tamanho maior que o esperado, o que nos levou a considerar que a mesma poderia apresentar níveis de glicosilação que estariam modificando sua massa molecular. Em estudos recentes envolvendo análises do secretoma do fungo *A. nidulans,* foi realizado um mapeamento das *N*-glicosilações presentes nas enzimas ativas em carboidratos. Foi demonstrado que 73% das proteínas *N*-glicosiladas produzidas pelo fungo pertenciam à família das glicosil hidrolases, tal resultado favoreceu nossa hipótese (RUBIO et al., 2016).

A hipótese levantada, foi comprovada depois de realizar o teste de desglicosilação da enzima GH93, como mostrado na figura 13, onde, pode-se notar que, após o tratamento da proteína GH93 com a enzima Endo H, ocorreu uma migração de uma maior população da proteína para o tamanho correto o que levou a uma melhor resolução da banda correspondente (Figura 13 coluna B). Para fins comparativos, foram aplicados no SDS-PAGE a mesma concentração da enzima *abn*t (25 µg) (Figura 13 coluna A e coluna B).

Figura 13 - SDS-PAGE mostrando a comparação das proteínas *abn*t glicosilada e desglicosilada.



Fonte: autoria própria.
Nota: A: Proteína sem tratamento de desglicosilação.
B: Proteína tratada com endo H, *: endo H 29 KDa.
M: marcador de massa molar.

6.2.3 Painel de substratos

Foi avaliada a atividade da enzima GH93 sobre diferentes substratos, como mostrado na tabela 7. A enzima apresentou uma maior atividade relativa (100%), sobre arabinana desramificada, quando comparada a outros substratos testados. Em arabinana de beterraba e arabinoxilana de centeio a enzima apresentou uma atividade relativa de cerca de 7%.

Tabela 7 – Atividade enzimática sobre diferentes substratos.

Substrato	Atividade relativa (%)
arabinana desramificada	100
arabinoxilana de trigo	0
arabinoxilana de centeio	6,9
arabinana de beterraba açucareira	6,6
arabinogalactana	0
*p*NP-A	0

Fonte: autoria própria.

Os resultados obtidos demostram que a enzima é uma arabinanase com uma afinidade por substrato semelhante às exo-arabinanases reportadas na

literatura, como as enzimas de *C. lucknowense* (KÜHNEL et al., 2010), de *P. chrysogenum* (SOGABE et al., 2011), de *F. Graminearum* (CARAPITO et al., 2009) e *P. purpurogenum* (MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015), que foram expressas de maneira heteróloga apresentando uma maior atividade sobre arabinana desramificada.

No caso da arabinoxilana de centeio e arabinana de beterraba a enzima também apresentou atividade, porém muito baixa sendo a metade do reportado por Mardones onde a enzima Arp2 mostrou cerca de 15% da atividade para ambos os substratos. A baixa atividade sobre estes substratos é devida a estrutura apresentada por eles. Por exemplo, arabinoxilana possui resíduos de arabinose ligados a cadeia principal de xilana por ligações α-1,2 e no caso da arabinana de beterraba embora esta seja um polímero de arabinose contém ramificações α-1,2 e α-1,3 (ver figura 1A) que não são hidrolisados por GH93 uma vez que estas enzimas são especificas para ligações α-1,5 (MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015). A proteína GH93 também não apresentou atividade sobre *p*-nitrofenil-arabinofuranosideo, semelhante aos resultados apresentados na literatura (CARAPITO et al., 2009; MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015; WONG; CHAN; BATT, 2008). Este resultado já era esperado, considerando que o *p*NP-A apresenta uma ligação α-1,2 que une o açúcar à molécula de nitrofenil. A afinidade pela arabinana desramificada poderia ser explicada por uma atividade de tipo exo-específica para a enzima, fazendo quebra nas ligações do tipo α-1,5 sendo que este tipo de substrato não apresenta ligações α-1,2 e α-1,3.

O desempenho das GH93 na hidrólise completa da arabinana presente em resíduos como SBP depende do trabalho conjunto com outras enzimas, como arabinofuranosidases, que removem as ramificações da cadeia principal fornecendo arabinana linear para ser hidrolisada pela GH93 para produzir arabinose ou arabinobiose.

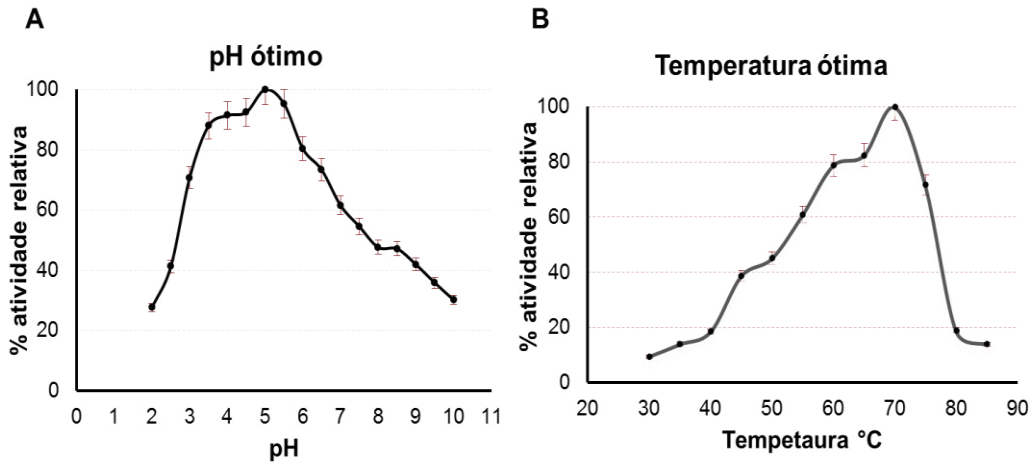
6.2.4 pH ótimo, temperatura ótima, termo estabilidade e estabilidade em diferentes pHs

Conhecendo o substrato no qual a enzima apresentou maior capacidade hidrolítica, deu-se continuidade a determinação das condições de pH e

temperatura mais apropriadas para a atividade da enzima. A figura 14A mostra que a proteína apresentou atividade acima dos 80%, numa faixa de pH de 3 a 6 sendo 5 o pH ótimo. Do mesmo modo, o seu comportamento mostrou-se termofílico, apresentado uma atividade superior a 80% entre 60 e 70 ^{o}C, atingindo a maior geração de produto a 70 ^{o}C (Figura 14B).

A afinidade por pH ácido tem sido um fator comum descrito na literatura para as exo-arabinanases fúngicas. No entanto, as arabinanases de origem bacteriana tem exibido uma melhor atividade em pH neutro ou alcalino (WONG; CHAN; BATT, 2008). O pH ótimo para *abn*t coincidiu com o ótimo apresentado para a exo-arabinanase de *P. purpurogenum* (MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015), sendo também, muito similar ao descrito por Sakamoto (SAKAMOTO et al., 2004) para exo-arabinanase de *P. chrysogenum* e por Kühnel para exo-arabinanase de *C. lucknowense* (KÜHNEL et al., 2010).

Figura 14 – Gráficos de pH (A) e temperatura (B) para enzima *abn*t.

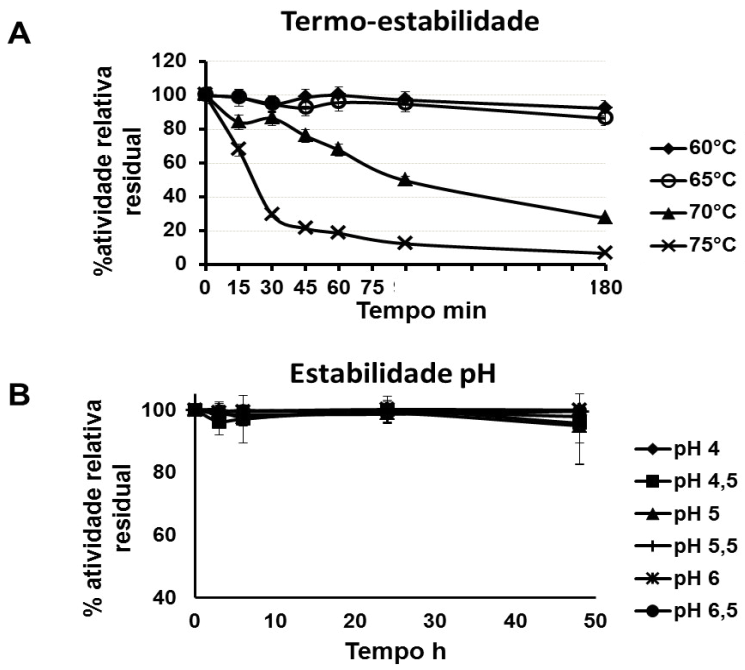


Fonte: autoria própria.

A caraterística termofílica da *abn*t é interessante devido a aplicações industriais que esta enzima pode ter, além de apresentar uma temperatura ótima entre 20 e 30 graus acima às reportadas na literatura para outras arabinanases, que no melhor dos resultados obtidos foi de 50 ^{o}C (KÜHNEL et al., 2010; WONG; CHAN; BATT, 2008). *Abn*t mostrou-se termoestável a 60 e 65 ^{o}C por 3h, como mostrado na figura 15A, conservando uma atividade residual superior ao 80%. Em sua temperatura ótima, a enzima conservou este mesmo nível de atividade por cerca de 45 minutos. A figura 15B mostra que a enzima mantêm sua atividade

residual acima de 90% após de ser incubada durante 48h em intervalos de pH de 4-6,5; uma estabilidade superior às reportadas para Abn2 onde sua atividade caiu para 50% após uma hora de incubação no seu pH ótimo (4) e para Arap2 onde sua atividade se reduz em 20% após de 5 h de incubação em pHs 4-5 (KÜHNEL et al., 2010; MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015). A estabilidade desta enzima em seu pH ótimo é uma caraterística interessante para ser utilizada em sinergismo com outras enzimas em processos de conversão de biomassa realizados em condições ácidas durante longos períodos de tempo (KIM; LIM; OH, 2012; LIM et al., 2011). O fato da proteína de interesse ser originalmente produzida por um fungo termofílico poderia explicar a termofilicidade da *abn*t, pois, estes organismos tem as suas estruturas e enzimas adaptadas para temperaturas mais elevadas (RIBEIRO et al., 2014). Embora também exista a possibilidade de organismos termofílicos não produzirem enzimas com características termofílicas. No entanto, estudos demostram que alguns organismos que crescem a baixas temperaturas também produzem enzimas com estas características (TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007).

Figura 15 – Estabilidade térmica e estabilidade a diferentes pHs da enzima *abn*t.



Fonte: autoria própria.

É importante mencionar que a termo estabilidade da enzima pode estar relacionado com as glicosilações, uma vez que foi comprovado que *abn*t é uma glicoproteína e toda a caracterização bioquímica foi feita com a proteína glicosilada.

Um estudo realizado com xilanases da família GH11 por Fonseca (2013), demostrou que não apenas o número, como também o local da glicosilação na sequência da proteína influencia a sua estabilidade térmica (FONSECA-MALDONADO et al., 2013), ainda que estas características não dependam apenas das glicosilações, como também de outras modificações pós-traducionais como pontes de sulfeto e a própria estrutura proteica, como demostrado em outros casos (RIBEIRO et al., 2014).

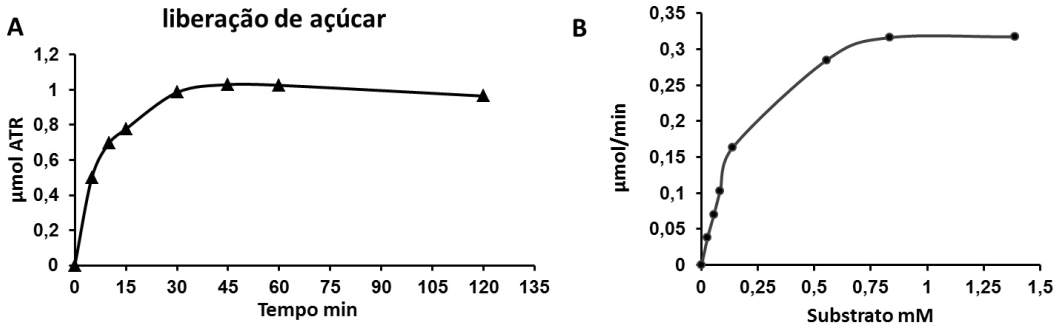
6.2.5 Estudos cinéticos da enzima *abn*t

Para uma correta determinação da atividades especifica da enzima e visando estabelecer as condições ótimas da reação hidrolítica de modo a realizar a caraterização cinética da enzima, tendo os valores de pH e temperatura mais adequados, analisou-se a liberação de açúcar com relação ao tempo, uma vez que até momento todas as reações foram realizadas por períodos de 1h, visou-se avaliar se o tempo de reação era suficiente ou excessivo para a conversão do substrato.

A figura 16A mostra a liberação de açúcar com relação ao tempo de incubação. Nos primeiros 5 minutos, a liberação de produto demonstrou um comportamento linear, com uma mudança na velocidade até 30 minutos de incubação, onde o aumento na liberação de açúcar cessou. Isto indica que 30 min foi um tempo suficiente para a conversão do substrato nestas condições. A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um µmol de açúcar por minuto. Utilizou-se um tempo de incubação de 5 minutos a 70 ^{o}C, pH 5 a partir de arabinana desramificada a 0,28 mmolar, para o cálculo da atividade específica que foi de 248 U/mg a segunda maior atividade registrada para uma GH93 após a reportada pela Arb93A (CARAPITO et al., 2009). A enzima mostrou um comportamento cinético que se ajusta ao modelo proposto por Michaelis-Menten, onde a velocidade de reação é afetada pelo

aumento na concentração do substrato (Figura 16B), onde manteve-se constante quando a concentração de substrato foi maior a 0,5 mM.

Figura 16 – Determinação dos parâmetros cinéticos para *abn*t.



C

Parâmetros cinéticos para exo-arabinanase GH93 *abn*t	
Atividade especifica	248 U/mg
*K*m	0,29 mM
Vmax	0,45 µmol/min
*K*cat	115,4 s^{-1}
*K*cat/*K*m	3,9 *10^5 s^{-1} M^{-1}

Fonte: autoria própria.
Nota: A: Liberação de açúcar com relação ao tempo.
B: Gráfico de velocidade enzimática em relação à concentração de substrato (Michaelis-Menten).
C: Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos para a enzima.

Os parâmetros cinéticos calculados se resumem na seção (C) da figura 16, onde o valor de K_m obtido, 0,29 *10^{-3} M ou 5 mg/mL demonstra uma alta afinidade da enzima pelo substrato, sendo este, superior ao da enzima ARN3 que apresentou um K_m de 6,2 mg/mL em carboximetil arabinana (WONG; CHAN; BATT, 2008) .

O valor de K_m também foi calculado para outras exo-arabinanases como Arb93A reportada por Carapito (CARAPITO et al., 2009) que foi de 0,75 *10^{-3} M usando arabinohexaose como substrato. Para Abnx (SAKAMOTO; FUJITA; KAWASAKI, 2004) reportaram afinidades muito menores para arabinooligossacarídeos, com diferentes níveis de polimerização, mostrando que a afinidade aumenta conforme o grau de polimerização do substrato aumenta, como por exemplo para um DP=3 o K_m foi de 1 mM e para DP=7 o K_m=0,36 mM sendo este último o melhor valor de K_m por eles obtido.

Embora o valor de K_{cat} tenha sido maior para algumas das enzimas mencionadas acima, quando comparadas com *abn*t, a eficiência catalítica K_{cat}/K_m é considerado o melhor parâmetro cinético para a comparação de enzimas quanto o seu comportamento hidrolítico (MILLER; WOLFENDEN, 2002). Para exo-arabinanases da família GH93 não se tem muitos dados publicados a respeito deste parâmetro, apenas Sakamoto (2004) e Carapito (2009) apresentaram para suas enzimas Abnx e Arb93A, respectivamente, usando arabinooligossacarídeos com diferente níveis de polimerização (DP3 - DP7) como substrato.

Nos resultados obtidos por eles, não foi possível determinar um comportamento do aumento da eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) com o aumento do DP, sendo que para Abnx tanto K_{cat}/K_m quanto DP aumentam até chegar a DP6, depois com DP7, o valor K_{cat}/K_m diminui (SAKAMOTO et al., 2004) e para Arb93A entre DP3 – DP4 o valor K_{cat}/K_m apresentou uma forte queda e após, um aumento continuo até DP6 (CARAPITO et al., 2009), em nenhum dos casos foi possível determinar a eficiência de catálise para arabinana desramificada. A tabela 8 mostra uma comparação da eficiência catalítica entre diferentes GH93 e *abn*t, .

Este é o primeiro estudo cinético completo feito para uma GH93 onde a eficiência de catálise foi calculada usando um substrato com alto grau de polimerização como arabinana linear.

Tabela 8 – Comparação da eficiência catalítica das enzimas: Abnx de *P. chrysogenum*, Arb93A do *F. graminearum* e *abn*t recombinante de *T. terrestris*

Enzima	Kcat/Km	Substrato	Referência
Arb93A	$4,66*10^{7}$ $s^{-1}M^{-1}$	DP6	(CARAPITO et al., 2009)
***abn*t**	$3,9*10^{5}$ $s^{-1}M^{-1}$	arabinana desramificada	Autoria própria
Abnx	39,2 s^{-1} mM^{-1}	DP6	(SAKAMOTO et al., 2004)
***abn*t**	397 s^{-1} mM^{-1}	arabinana desramificada	Autoria própria

Fonte: autoria própria.

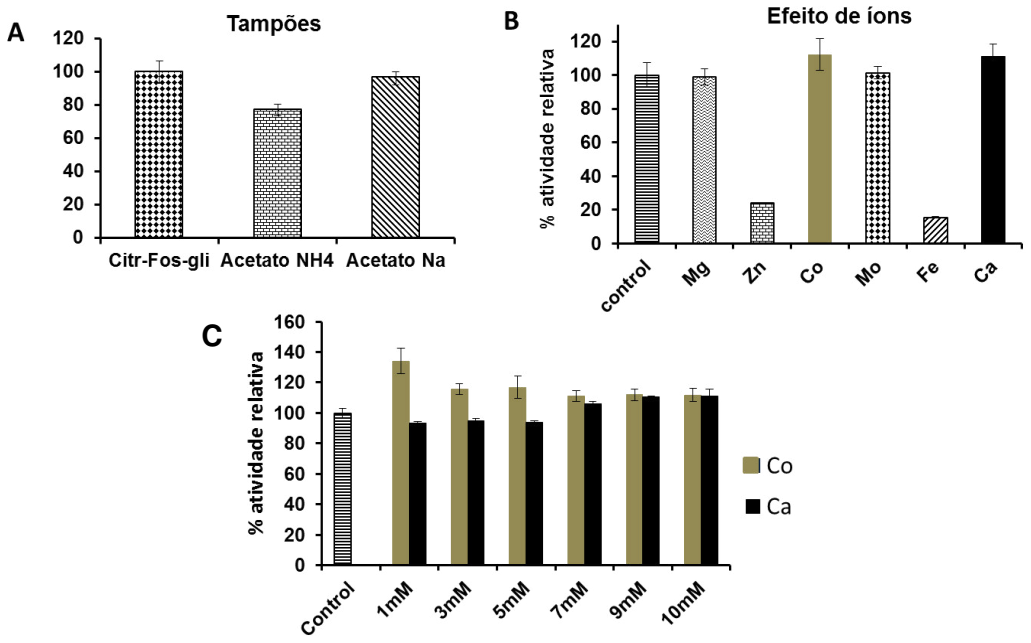
6.2.6 Efeito de tampões e íons

Após a determinação das caraterísticas cinéticas da enzima e o ajuste do tempo de reação a trinta minutos, avaliou-se o efeito produzido por outros dois tampões diferentes, além do tampão citrato-fosfato-glicina (utilizado em todas as

reações até o momento) e de seis íons diferentes. A avaliação de tampões foi em parte motivada pelo fato de ser utilizado um tampão que contém citrato, o qual apresenta uma atividade quelante sobre alguns íons e com maior força sobre o ferro. Este comportamento do tampão poderia estar atrapalhando o efeito dos íons sobre a atividade enzimática quando estes fossem adicionados ao experimento.

Em um primeiro momento, foram avaliados os tampões, demonstrando que o tampão acetato de amônio diminuiu em 23% a atividade enzimática (Figura 17A). No entanto, em tampão acetato de sódio, a enzima manteve a atividade quase sem alteração, quando comparado ao tampão citrato-fosfato-glicina, que para este caso foi utilizado como controle, demostrando que diferentes tampões exercem uma importante influência sobre a atividade enzimática. O fato do tampão acetato de sódio apresentar uma diferença de apenas 4% com o controle e ser o tampão comumente utilizado nos estudos para exo-arabinanases já reportadas (CARAPITO et al., 2009; KÜHNEL et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2004; SOGABE et al., 2011), motivou sua eleição para a avaliação do efeito de íons.

Figura 17 – Efeito exercido por tampões (A), íons (B), e diferentes concentrações de Ca^{2+} e Co^{2+} (C), sobre atividade hidrolítica de *abn*t.



Fonte: autoria própria.

O efeito que determinados íons podem exercer sobre as enzimas é bastante conhecido, pois estes interagem quimicamente com as proteínas afetando sua solubilidade, estabilidade, atuando muitas vezes como cofatores que aumentam significativamente sua atividade ou mesmo como inibidores (ZHAO, 2005).

A figura 17B mostra o nível de influência exercida pelos seis íons diferentes sobre a atividade enzimática de *abn*t, quando utilizados a uma concentração de 10 mM. Em termos gerais, ocorreu uma maior inibição da enzima quando a mesma foi suplementada com os íons Zn^{2+} e Fe^{2+}, os quais causaram uma diminuição de 76 e 85% da atividade, para os íons Mg^{2+} e Mo^{2+} o efeito não foi significativo e para os íons Co^{2+} e Ca^{2+} ocorreu um aumento na atividade de 12 e 11%, respectivamente.

Apesar de ter sido demostrado que os íons afetam de diferentes modos a ação da enzima, o melhor resultado obtido nestas concentrações, foi um aumento na eficiência de apenas 12% que se mostrou muito baixo, quando comparado com trabalhos reportados na literatura. Borges (2014), demonstrou um aumento na atividade de uma endoxilanase de 100, 200 e 300% utilizando Zn^{2+}, Mg^{2+} e Ca^{2+} respectivamente, em uma concentração de 10 mM (BORGES et al., 2014). Para o caso de exo-arabinanase, Mardones (2015) demonstrou um aumento na atividade da enzima Arap2 de 100 e 169% utilizando $MnCl_2$ e $CoCl_2$ respectivamente, em uma concentração de 1 mM (MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015).

Sendo que para a enzima reportada por Mardones Co^{2+} também foi uns dos íons que obteve um maior aumento na atividade embora testado em uma menor concentração, os íons Co^{2+} e Ca^{2+} foram avaliados quanto ao seu efeito sobre a enzima, quando utilizados em concentrações menores (Figura 17C). Cobalto a 1mM apresentou um aumento do 34% na atividade hidrolítica da *abn*t a medida que a concentração do Co^{2+} testada aumentou seu efeito positivo sobre a enzima decresceu, um comportamento oposto ao presentado pelo Cálcio, sendo que ao diminuir sua concentração seu efeito positivo sobre a enzima decresce também, ao ponto que em concentrações menores a 5 mM a atividade enzimática diminui 5% aproximadamente quando comparada com o controle.

A tabela 9, mostra uma comparação de características bioquímicas para exo-arabinanases da família GH93 reportadas na literatura com relação a *abn*t. Os dados compilados mostram que *abn*t é a primeira enzima expressada de maneira heteróloga em fungo filamentoso e com caraterísticas termofílicas.

Tabela 9 – Comparação entre diferentes GH93 reportadas na literatura e *abn*t

Enzima/ organismo	pH ótimo	Temperatura ótima °C	Massa KDa	Homologa/ heteróloga	Eficiência catalítica	Substrato de preferencia	Referência
Arb93A/ *Fusarium graminearum*	5	40	41	Heteróloga/ *E.coli*	*	Arabinana desramificada	(CARAPITO et al., 2009)
Abn2/ *Chrysosporium lucknowense*	4	50	41,8	Homologa	ND	Arabinana desramificada	(KÜHNEL et al., 2010)
Abnx/ *Penicillium chrysogenum*	4 e 5	40	41,7	Heteróloga/ *E.coli*	*	Arabinana desramificada	(SAKAMOTO et al., 2004; SOGABE et al., 2011)
ARN3/ microflora de rumem bovino	7	50	37,3	Heteróloga/ *E.coli*	ND	CM-arabinana linear	(WONG; CHAN; BATT, 2008)
Arap2/ *Penicillium purpurogenum*	4 e 5	40	39,8	Heteróloga/ *Pichia pastoris*	ND	Arabinana desramificada	(MARDONES; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2015)
*abn*t/ Thielavia terrestris	5	70	39,8	Heteróloga/ A. nidulans A773	*	Arabinana desramificada	Arquivo próprio

Fonte: autoria própria.
Nota: ND. Não determinado.
(*). Ver tabela 8

7 AVALIAÇÃO DE DOIS TIPOS DE MALTOSE A DIFERENTES CONCENTRAÇOES EM CULTIVOS COM E SEM AGITAÇÃO E SEU EFEITO NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DA ENZIMA *abn*t

Embora o interesse pela utilização de enzimas em processos industriais venha aumentando cada vez mais, um dos principais desafios que devem ser atendidos para incrementar a aplicação destes catalizadores é seu elevado custo, influenciado pelos processos de produção e purificação. Sendo assim, diversos esforços têm sido realizados para tornar estes catalizadores biológicos economicamente mais atrativos para seu uso industrial. Tais esforços incluem, melhoramento genético de organismos produtores, otimização dos bioprocessos, engenharia de proteínas que atribua à enzima maior poder hidrolítico e estabilidade em condições de operação específicas, oportunidades de reutilização, dentre outros (DAMÁSIO et al., 2012b; WANG et al., 2016, 2017; WARD, 2012).

A. nidulans A773 é um organismo com caraterísticas favoráveis para produção industrial de enzimas, considerando que pode ser facilmente separado do meio de fermentação (quando este é liquido), sua capacidade de crescer em um meio simples sem adição de aminoácidos ou peptídeos (que podem incrementar a produção de proteases além de interferir na quantificação de proteínas totais produzidas) e uma maior estabilidade genética dos seus transformantes quando comparados com transformantes bacterianos (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; WANG et al., 2003, 2005a; WARD, 2012).

Além disto, estudos recentes demonstram que seu crescimento pode ser controlado para evitar problemas de entupimento nos reatores, sem alterar sua produtividade e oferecendo a possibilidade de ser utilizado em processos contínuos, porém a produção de melanina e proteases nativas é um inconveniente que deve ser superado (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017). Apesar destas vantagens, poucos trabalhos tem sido realizados, de modo a observar o comportamento fermentativo de cepas transformantes de *A. nidulans*+pEXPYR na produção de enzimas ativas em carboidratos, principalmente, por ser um sistema relativamente novo de expressão e secreção de proteínas heterologas (SEGATO et al., 2012).

Nos trabalhos realizados por Müller para a produção de uma xilanase XynB, foram avaliadas diferentes formas de cultivo (estacionário e agitado) assim

como a implementação de um novo desenho de reator denominado TBR (*Trickle Bed Reactor).* Utilizando um transformante de *A. nidulans*+pEXPYR, neste estudo a melhor produção de XynB foi atingida em cultivos agitados e não foi encontrada nenhuma diferença entre a produção em *Erlenmeyers* agitados e o sistema TBR, porém o reator presentou problemas de entupimento (MÜLLER et al., 2014, 2015). No entanto, no estudo realizado por Pardo-Planas et al., 2017, a produção de MtGloA uma aril álcool oxidase usando *A. nidulans*+pEXPYR como sistema de expressão, foi possível controlar o crescimento do fungo, mantendo-se os níveis de piridoxina em 9 μg/L sem afetar a produção de proteína e evitando problemas de entupimento no reator. Os baixos níveis de piridoxina estimulam uma excessiva produção de melanina que pode ser controlada com a remoção do cobre e do zinco no meio de cultivo e/ou adição de ácido ascórbico (PARDO-PLANAS et al., 2017; PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017). Apesar de não haver nenhum estudo avaliando a pureza do indutor (maltose) utilizado na expressão heteróloga de proteínas a partir de transformantes de *A. nidulans*+pEXPYR, todos os trabalhos realizados até o momento fazem uso de maltose grau analítico para avaliar a produção de proteínas. No entanto, a procura de uma maltose, com menor grau de pureza que seja muito mais econômica e apresente um nível de produção de proteínas recombinantes similar, quando comparado com a maltose grau analítico oferece a oportunidade de tornar a produção enzimática mais econômica atribuindo mais uma caraterística desejável a este sistema de expressão para seu uso industrial. Neste capítulo será apresentada a avaliação de Maltose da SIGMA (alto grau de pureza) e de HIGH maltose (utilizada na produção de cerveja), em diferentes concentrações e condições de cultivo sobre a produção de *abn*t, assim como, o escalonamento do processo em biorreator a partir da melhor condição atingida nas etapas prévias

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1 Tipos de indutor e meios de cultivo.

Foram avaliados dois tipos de maltose como indutores para a produção enzimática, maltose de alto grau de pureza (Sigma-Aldrich) e HIGH maltose (WE

Consultoria), utilizada na fabricação de cerveja. Os indutores foram testados em diferentes concentrações no meio de cultivo 2, 3 e 5 % (m/v), estas concentrações foram escolhidas baseados nos estudos realizados anteriormente na literatura (SEGATO et al., 2012). Para as fermentações foi utilizado meio mínimo sem glicose, contendo 1mg/L de piridoxina suplementado com o indutor que por sua vez atuou também como fonte de carbono para o fungo. O meio não foi tamponado com o intuito de observar o comportamento do pH durante a fermentação.

7.1.2 Fermentação sem agitação

Foram preparados meios com três diferentes concentrações de HIGH maltose e maltose SIGMA (2, 3 e 5%). Cinquenta mililitros de meio foram dispostos em Erlenmeyers de 125 mL e esterilizados (121 °C, 15 psi, 15 min), uma amostra do meio sem maltose foi tomada para ser utilizada como branco do substrato, após a esterilização, foram tomadas amostras do meio para serem usadas como branco na quantificação de melanina e proteínas totais. Os 50 mL de meio foram inoculados com 500 µL de uma suspensão de 10^8 esporos/mL, o meio inoculado foi misturado vigorosamente para tomar amostra do tempo zero, a fermentação foi realizada sem agitação a 37 °C durante 72 h tomando amostras em diferentes tempos (0, 24, 48, 56 e 72 h), as amostras foram centrifugadas 5000 rpm, 5 min para precipitar os fragmentos celulares e o sobrenadante foi utilizado para análises dos parâmetros do processo.

7.1.3 Fermentação submersa

Para a fermentação submersa foram avaliadas também três concentrações diferentes tanto da maltose SIGMA quanto da HIGH maltose (2, 3 e 5%) mantendo as mesmas condições de inóculo, volume, temperatura, amostragem e tempo de cultivo usadas na etapa anterior porém, com agitação em *shaker* a 200 rpm. A nomenclatura utilizada para distinguir os diferentes tratamentos tanto nas fermentações em estado estacionário quanto no agitado aparecem na tabela 10.

Tabela 10 – Nomenclatura utilizada para distinguir os diferentes tratamentos avaliados nas fermentações com e sem agitação

HIGH maltose 2%	2% H
HIGH maltose 3%	3% H
HIGH maltose 5%	5% H
SIGMA maltose 2%	2% S
SIGMA maltose 3%	3% S
SIGMA maltose 5%	5% S

Fonte: autoria própria.

7.1.4 Parâmetros monitorados no bioprocesso

7.1.4.1 Consumo de substrato, produção de melanina e pH

O consumo de açúcar foi monitorado por DNS em micro ensaio usando 100 μL do meio diluído e adicionando 100 μL do reagente. A produção de melanina foi medida com base em estudos anteriormente reportados (PARDO-PLANAS et al., 2017; PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017; ROWLEY; PIRT, 1972), por leituras de absorbância a 425 nm de 200μL de meio em microplaca usando leitor de placas *Infinite* 200 Pro (TECAN), utilizando como branco uma amostra do mesmo meio de cultivo usado na fermentação, estéril e conservado a 8 °C, o comportamento do pH foi monitorado usando pHmetro HANNA *instruments.*

7.1.4.2 Proteínas totais, proteína recombinante e biomassa fúngica

As proteínas totais secretadas pelo fungo foram quantificadas pela metodologia de *Bradford,* a biomassa fúngica foi quantificada por massa seca apenas no final de cada processo tomando todo o meio de cultivo e recuperando a massa do fungo por filtração, após os micélios foram lavados com 40 mL de água destilada e secos a 60 °C durante 24 h. A produção da proteína recombinante foi monitorada pela atividade volumétrica (U/mL) do extrato (meio fermentado), para isto foram tomadas amostras de 100 μL do meio e colocadas em dispositivos de ultra filtração Vivaspin (GE *Healthcare*), com membrana de corte de 10 KDa, para retirar maltose do meio mediante lavagens sucessivas com água destilada centrifugando a 10000 rpm por 5 min. Após a lavagem com 2mL

de água, a proteína recombinante retida no dispositivo foi avolumada para 100 μL com água destilada para não alterar o volume inicial, este extrato enzimático sem açúcar foi utilizado para testar sua atividade. O teste de atividade foi feito usando 5 μL do extrato lavado, 45 μL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 e 50 μL de arabinana desramificada 1%, a reação foi realizada durante 5 min a 70 °C, a reação foi interrompida por adição de 100 μL de DNS para quantificação dos açucares redutores liberados.

7.1.4.3 Efeito de proteases sobre a produção de abnt

A observação do efeito de proteases nativas sobre *abn*t nas fermentações foi feita por eletroforese em géis SDS-PAGE 15%, para isso, foram coletadas amostras por períodos de 24, 48, 56 e 72 h que posteriormente foram concentradas dez vezes usando tubos concentradores Vivaspin com membranas de corte de 10 KDa, todas as amostras receberam o mesmo tratamento de concentração e a quantidade de proteína não foi ajustada antes de ser aplicada no gel para avaliar além da integridade da proteína as diferenças na quantidade secretada.

7.1.5 Fermentação em biorreator

Esta fermentação foi feita em batelada usando um reator de tanque agitado SARTORIUS com dorna de 5 L usando 2 L de meio de cultivo com 3% de HIGH maltose. Esporos do fungo *A. nidulans* A773 ABNt+ foram cultivados em placa de Petri e posteriormente suspendidos numa solução de NaCl 0,9% estéril para ser usada como inóculo na fermentação. Dois litros do meio de indução foram inoculados com 20 mL da solução contendo 10^8 esporos/mL.

A fermentação foi desenvolvida a 37 °C, 0,75 vvm de areação e 300 rpm de agitação durante 72 horas, tomando amostras em diferentes tempos (0, 24, 36, 48, 56 e 72 h). A produção de proteínas totais, proteína recombinante e melanina foi avaliada com a mesma metodologia descrita nas etapas anteriores. A biomassa fúngica total produzida não foi quantificada devido a dificuldades apresentadas para a recuperação total do micélio, o consumo de substrato foi

quantificado por DNS para açúcares redutores e HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) para observar o consumo específico de maltose, uma vez que HIGH maltose é um substrato que contêm outros sacarídeos além de maltose. Além destes parâmetros foi avaliada a produção de proteases dentro do processo através da medição da atividade proteolítica do meio.

7.1.5.1 Produção de proteases.

A metodologia para medir a atividade proteolítica do meio foi adaptada de estudos prévios feitos por Charney e Tomarelli (CHARNEY; TOMARELLI, 1947), onde, azocaseína (Sigma-Aldrich) foi usada como substrato para calcular a atividade proteolítica do extrato.

A reação consistiu em 125 µL de solução de azocaseína (10 mg/mL) em NaOH 0,1 M e 125 µL do extrato incubado por 45 min à 45 ºC. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% e a reação foi mantida em gelo por 10 minutos. Após, centrifugou-se a 4000 rpm, 5 min e 350 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 350 µL de NaOH 0,1 M, a reação foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e a absorbância lida a 440 nm. A atividade proteolítica foi calculada em microgramas de azocaseína degradada usando 35 L/cm.g como coeficiente de extinção, segundo as recomendações do fabricante.

7.1.5.2 Quantificação do consumo de maltose por HPLC

Além do DNS, para o consumo de substrato, foi utilizada a metodologia de HPLC para avaliar o consumo de maltose durante o processo, para isto foi utilizada uma coluna HPX-87P acoplada em cromatógrafo *Chromeleon-Dionex* mantida a 80°C, usando água como solvente a 0,8 mL/min. A quantidade de maltose foi calculada usando uma curva padrão construída com maltose grau analítico.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

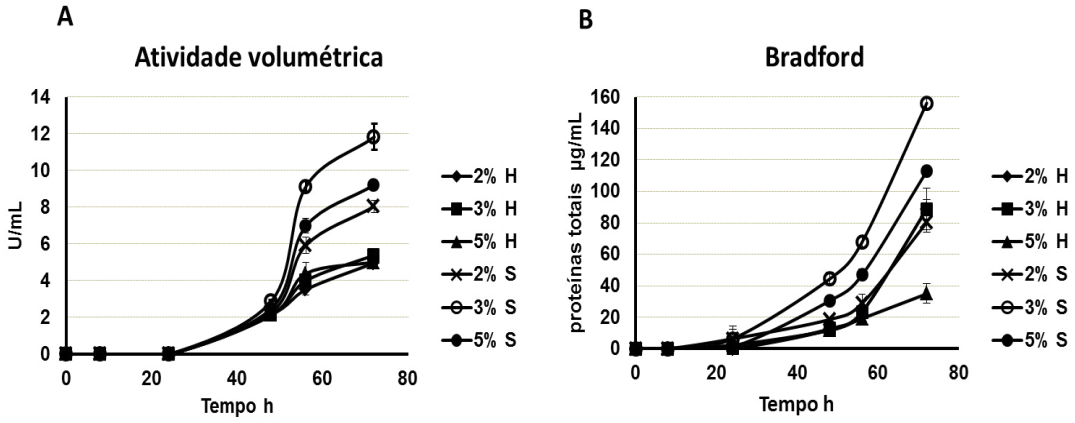
7.2.1 Fermentação sem agitação.

As fermentações foram realizadas para avaliar a produção da proteína recombinante *abn*t na presença de dois tipos de indutores (maltose) com diferentes graus de pureza em três concentrações diferentes. A forma de cultivo empregada neste caso estimulou condições de produção com crescimento em superfície (MÜLLER et al., 2015) onde o fungo cresce formando uma camada sobre o substrato. O parâmetro chave na avaliação do processo foi a atividade volumétrica (U/mL) da enzima atingida no final de cada fermentação. A figura 18 mostra a produção de proteínas totais e da *abn*t para todos os tratamentos, os gráficos mostram que a partir de 56 h, o comportamento na produção proteica muda, sendo que as proteínas totais apresentam um aumento significativo porém, a proteína de interesse após este período demonstrou um aumento pequeno que no melhor dos casos foi 2U/mL. Além da diferença no comportamento da produção proteica neste período, o fungo demonstrou também, um aumento na produção de melanina, com aumento pronunciado no pH (Figuras 19A e 19B). Como o método de *Bradford* para quantificar proteínas totais pode apresentar interferência por melanina (PARDO-PLANAS et al., 2017; ROWLEY; PIRT, 1972), há a possibilidade que o aumento na produção do pigmento tenha superestimado a quantificação de proteínas totais após as 56 h de cultivo, embora as condições que apresentaram a maior quantidade de proteínas totais (3%S e 5%S) não foram os mesmos que mostraram a maior produção de melanina (2%H e 3%H), todos os tratamentos com maltose SIGMA (S) demostraram ser melhores na produção da proteína recombinante quando comparados com tratamentos que continham HIGH (H) maltose como indutor. O aumento na produção do pigmento pode ser devido a algum tipo de estresse experimentado pelo fungo (MÜLLER et al., 2014; PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017; ROWLEY; PIRT, 1972), o qual não poderia ser atribuído ao esgotamento da piridoxina sendo que o pH aumentou através do tempo (ver figura 19B) e a diminuição na piridoxina estimula a produção de ácidos orgânicos como o ácido succínico, cítrico e lático por parte do

A. nidulans (MÜLLER et al., 2014; PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017), que acidificariam o meio.

Também não pode ser atribuído ao esgotamento do substrato, pois a condição com maior consumo ainda apresentou 33% de substrato residual após 72 h de cultivo. Sendo provável que o estresse tenha sido causado pelo tipo de cultivo uma vez que: a falta de agitação pode ter prejudicado a homogeneização do meio, pois o fungo cresce na superfície e não gera estruturas que cheguem ao fundo do frasco, fazendo com que o aproveitamento do substrato seja insuficiente em todos os pontos do recipiente, isto explicaria também os altos níveis de substrato residual no meio após a fermentação que foram de 52% na maioria dos casos.

Figura 18 – Produção da proteína *abn*t (A) e proteínas totais (B) nos diferentes tratamentos em estado estacionário.



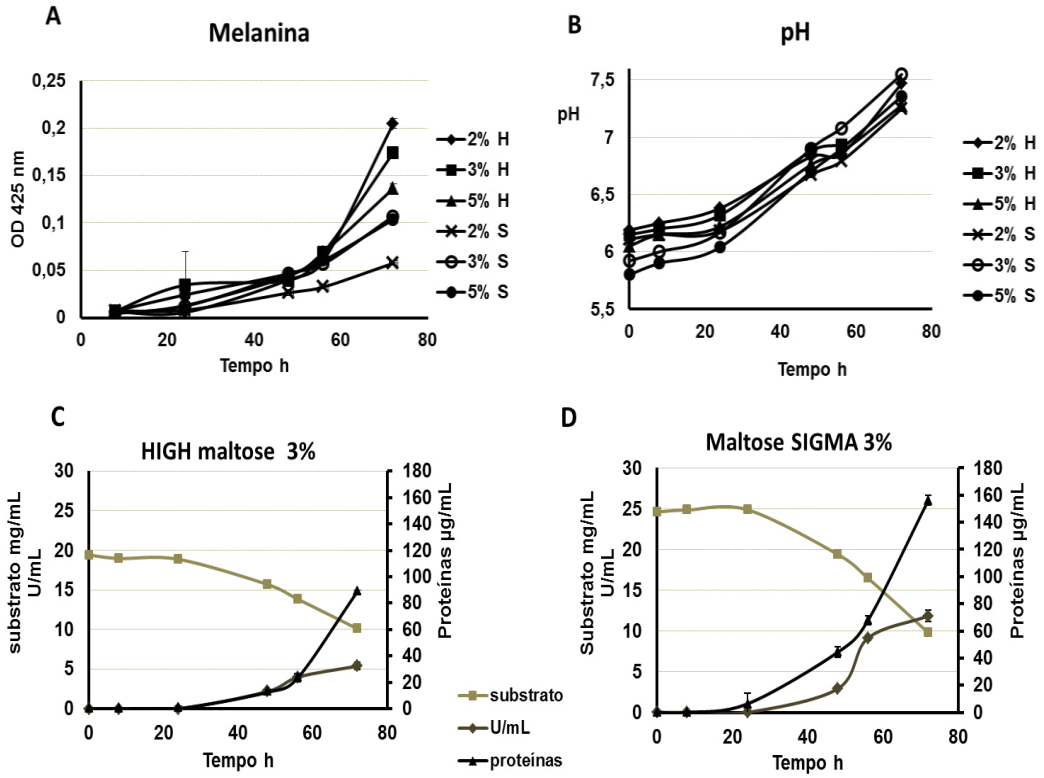
Fonte: autoria própria.

Os resultados mostraram que o tipo de maltose utilizada também poderia estar influenciando a produção do pigmento, uma vez que todas as condições avaliadas com HIGH maltose apresentaram maior produção de melanina quando comparados com tratamentos usando maltose SIGMA. Isto pode ter acontecido por ser HIGH maltose um substrato com menor grau de pureza (Figura 19A).

Embora maltose SIGMA tenha sido o melhor indutor, foi a concentração de 3% que apresentou a maior quantidade de proteína recombinante com 11,8 U/mL duas vezes a mais que o melhor tratamento com HIGH maltose (3%H). A figura 19C e 19D mostram um comparativo entre as melhores condições para cada tipo de indutor, além da diferença na produção de *abn*t, a quantidade de proteínas totais produzidas no tratamento com maltose SIGMA foi também o dobro

mostrando também um maior consumo do substrato. O fato do fungo apresentar um maior consumo do substrato no tratamento 3%S poderia explicar a maior produção da proteína de interesse, juntamente com o fato de apresentar menores níveis de melanina poderia indicar que a maior parte do substrato foi dirigida para geração do produto, quando comparado com o tratamento 3%H, onde o consumo de substrato foi menor e a produção de melanina maior, uma vez que a produção do pigmento concorre com a produção da enzima (PARDO-PLANAS et al., 2017).

Figura 19 – Comportamento da produção de melanina (A) e pH (B) para todos os tratamentos em estado estacionário e comparação dos melhores tratamentos para HIGH (C) e SIGMA (D) maltoses.

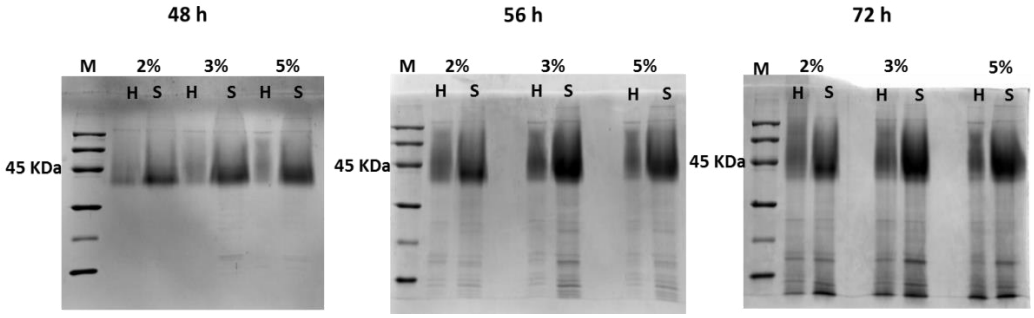


Fonte: autoria própria.

A enzima *abn*t não apresentou degradação durante as 72 h utilizadas no processo, como o evidenciam os géis de SDS-PAGE (Figura 20). Este dado pode indicar que o fungo não esteve secretando proteases para meio ou que a enzima não é vulnerável a atividade de proteases nativas. Além de mostrar a integridade da proteína os géis de SDS mostraram que a enzima apresentou uma migração diferente nos tratamentos com as maltoses HIGH e SIGMA. Com HIGH maltose a proteína apresenta um arrastre maior que pode ser o produto de diferentes níveis de glicosilação, além disto, os géis confirmaram mais uma vez que nos

tratamentos com maltose SIGMA ocorreu uma maior secreção de *abn*t e que com o passar do tempo aumenta a produção de outras proteínas.

Figura 20 – Géis de SDS-PAGE para todos os tratamentos em estado estacionário para 48, 56 e 72 h, em 24 h a quantidade de proteína secretada não foi detectada pela técnica (dados não mostrados).



Fonte: autoria própria.
Nota: M: marcador de massa molar.
H: HIGH maltose.
S: maltose SIGMA.

A tabela 11 mostra os valores de biomassa atingida em todos os tratamentos e um resumo dos rendimentos obtidos, embora o tratamento 3%S tenha atingido a maior quantidade da enzima recombinante o tratamento 2%S mostrou ser mais eficiente na conversão do substrato no produto de interesse com um rendimento $Y_{U/S}$ de 1085 U/g, mostrando também que o substrato foi utilizado preferencialmente para produção da proteína sendo que o fator da conversão do substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) foi um dos mais baixos 0,43 com a menor concentração final de biomassa 130,4 mg e melanina (Figura 19A), no geral os rendimento obtidos com maltose SIGMA foram os melhores.

Tabela 11 – Rendimentos, biomassa e atividade volumétrica final atingida para todos os tratamentos em estado estacionário

Tratamento	Rendimentos $Y_{U/S}$ U/g	$Y_{U/X}$ U/g	$Y_{X/S}$ g/g	U/mL final	Biomassa final mg
2% H	562,6	1248,9	0,45	4,97	159,3
3% H	579,8	1283,8	0,45	5,39	168,2
5% H	580,5	1201,8	0,45	5,0	167,1
2% S	1085,0	2468,1	0,43	8,0	130,4
3% S	797,5	1901,6	0,42	11,8	248,9
5% S	736,8	1496,6	0,49	9,2	246,5

Fonte: autoria própria.

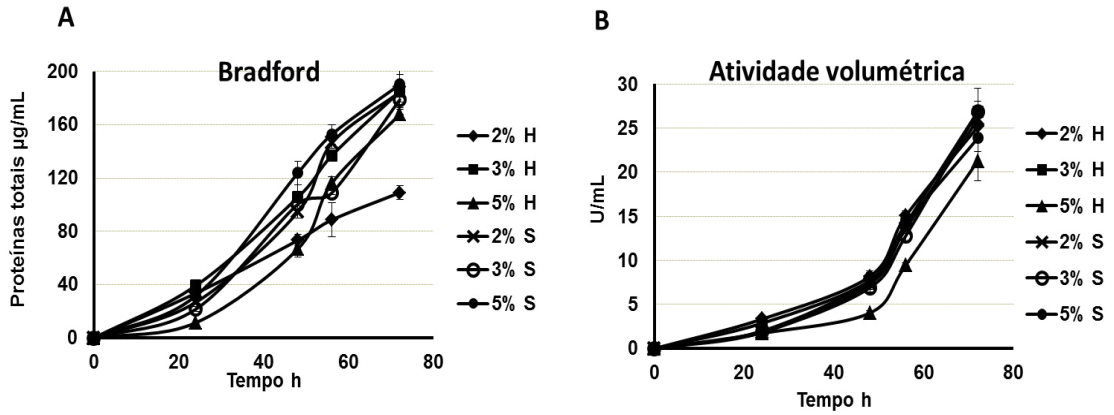
A quantidade de enzima *abn*t produzida (11,8 U/mL) no melhor tratamento estacionário resultou num valor próximo ao reportado por Müller para xilanase (XynB) após 72 h de fermentação no estado estacionário usando um meio de cultura com 4,7% de maltose como indutor e 1% de glicose, onde atingiu 15 U/mL embora com um rendimento de conversão de substrato em produto ($Y_{U/S}$) mais baixo, 543 U por grama de substrato (MÜLLER et al., 2015).

7.2.2 Fermentação com agitação

O processo fermentativo agitado mostrou ser mais efetivo para produção de proteínas totais e *abn*t, quando comparado com o estacionário. Para todos os tratamentos com agitação a quantidade de proteínas produzidas, assim como a atividade volumétrica se apresentaram com o dobro ou mais, quando comparados aos valores obtidos nos experimentos anteriores.

A figura 21 mostra a comparação entre as proteínas totais produzidas e *abn*t com agitação, neste caso o comportamento da produção proteica foi sempre ascendente após 56 h e a produção da proteína recombinante foi mais acentuada a partir de 48 h, sendo 3% a melhor concentração para os dois tipos de maltose, neste caso a quantidade de proteína recombinante produzida foi a mesma tanto para HIGH quanto para SIGMA maltoses com 26,8 U/mL.

Figura 21 – Produção de proteínas totais (A) e *abn*t (B) nos tratamentos com agitação.



Fonte: autoria própria.

O pH apresentou um comportamento ascendente como esperado, chegando a um valor máximo próximo a 7,5 para todos os tratamentos (Figura 22B). Embora estes valores sejam muitos parecidos com os valores apresentados nos tratamentos estacionários, a produção de melanina apresentada no estacionário foi o dobro quando comparados com os tratamentos agitados (Figura 22A).

A diferença nos níveis do pigmento pode ser devido a que o fungo nestas condições de cultivo não experimentou o mesmo nível de estresse que em cultivos sem agitação, devido ao tipo de cultivo, e à transferência de oxigênio uma vez que a transferência de massa do oxigênio afeta a produção de melanina (PARDO-PLANAS et al., 2017; ROWLEY; PIRT, 1972), assim quanto maior a transferência do oxigênio maior a quantidade do pigmento produzido, sendo que nos tratamentos agitados a transferência do oxigênio é menor (em comparação com os tratamentos estacionários onde o fungo cresce na superfície do meio em contato direto com O_2), menor será também a produção da melanina.

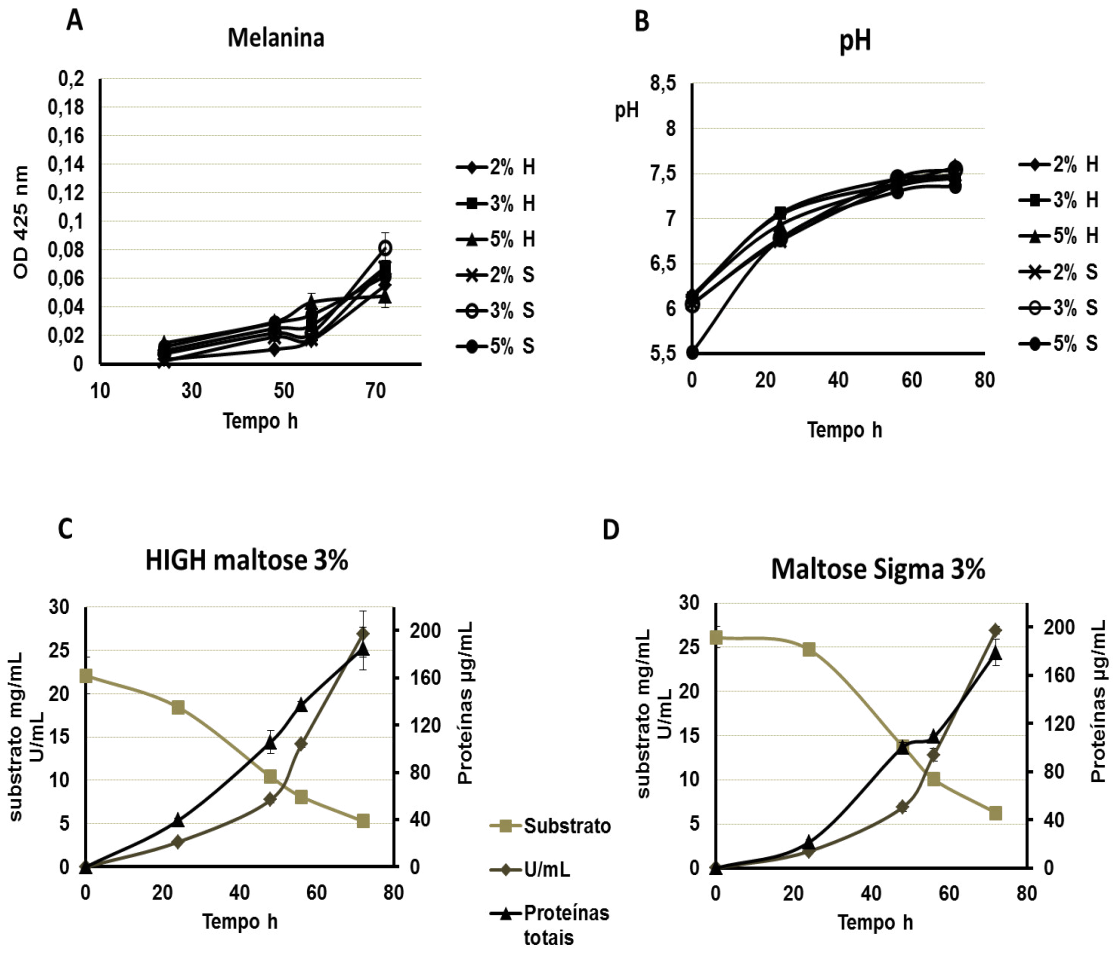
Entre os tratamentos com agitação a produção de melanina apresentou valores muito parecidos, sem ser influenciada pelo tipo de maltose com um valor máximo de 0,08 para 3%S e mínimo de 0,05 para 5%H. Além disso, o consumo de substrato foi maior quando comparado com o cultivo estacionário, uma vez que na maioria dos tratamentos apresentou um consumo de mais de 70% do substrato, como exceção dos tratamentos 5%H e 5%S onde o substrato consumido foi apenas 55% e 62,5%, respectivamente, o escasso consumo do substrato no tratamento 5%H explica o fato de ser o tratamento com menor produção de pigmento, proteína recombinante e biomassa (ver tabela 12).

A figura 22C e D mostra uma comparação dos melhores tratamentos agitados para produção da enzima, ambos casos foram muitos similares na maioria dos parâmetros com 185 e 179 μg/mL de proteínas totais para 3%H e 3%S, e 26,8 U/mL de *abn*t, com a diferença que o tratamento com HIGH maltose apresentou uma maior quantidade de biomassa final 434,7 mg comparados com os 402 mg atingidos com maltose SIGMA (ver tabela 12).

Os valores de enzima obtidos foram próximos aos reportados na literatura para XynB 33,5U/mL (MÜLLER et al., 2015), porém menores quando comparados com MtGloA uma aril álcool oxidase que apresentou valores próximos de 40 U/mL após 72h de cultivo usando *A.* nidulans+pEXPYR com 5% de maltose e 1% de

glicose como substrato (PARDO-PLANAS; PRADE; WILKINS, 2017). O maior consumo de substrato nos tratamentos agitados quando comparados com os estacionários pode ser devido a uma maior homogeneização do meio, favorecida pela agitação, fazendo com que o fungo tivesse um maior aceso aos nutrientes. Este aproveitamento se reflete nos rendimentos mostrados na tabela 12 que para o caso do produto e da biomassa gerados a partir do substrato se atingiram valores duas vezes maiores quando comparados com os tratamentos estacionários (Tabelas 11 e 12).

Figura 22 – Comportamento da produção de melanina (A) e pH (B) para todos os tratamentos com agitação e comparação dos melhores tratamentos para HIGH (C) e SIGMA (D) maltoses.

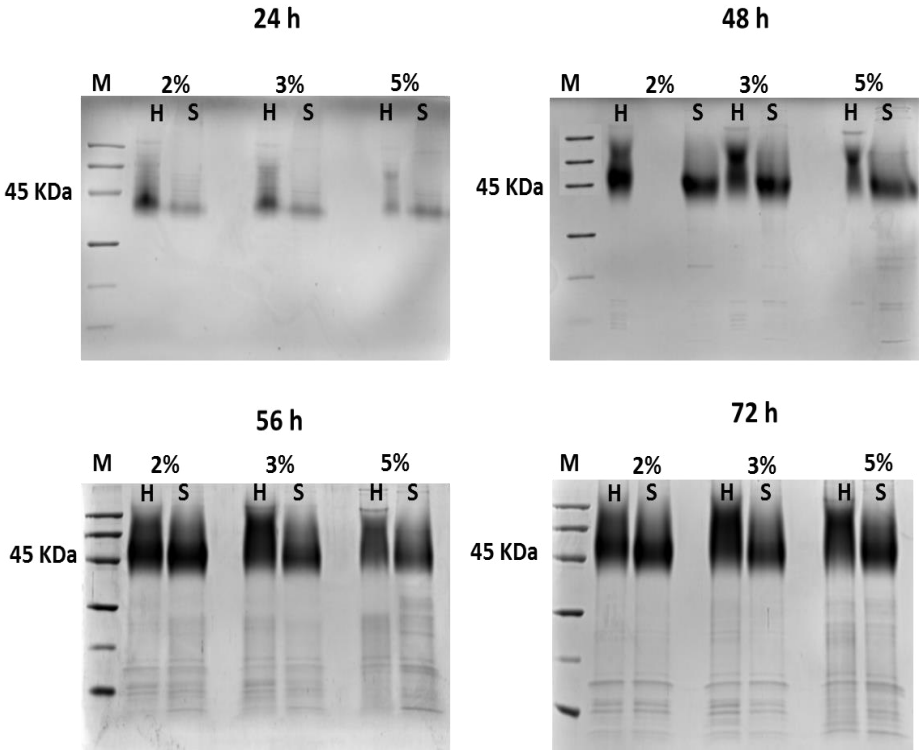


Fonte: autoria própria.

Assim como mostrado nos ensaios estacionários, nos tratamentos com agitação a enzima não foi degradada por proteases nativas do fungo (Figura 23). A enzima produzida com HIGH maltose apresentou o mesmo padrão de

migração, com um maior arrastre das bandas quando comparadas com as da proteína produzida com maltose SIGMA, porém, ao contrário das condições estacionárias, os géis mostraram que a quantidade de *abn*t secretada foi muito similar para os dois tipos de maltose avaliadas, sendo detectável a partir de 24 h de cultivo

Figura 23 – Géis de SDS-PAGE para todos os tratamentos com agitação para 24, 48, 56 e 72 h.



Fonte: autoria própria.
Nota: M: Marcador de massa molar.
H: HIGH maltose.
S: Maltose SIGMA

O arrastre apresentado pelas bandas tem sido uma caraterística comum de *abn*t desde o início do trabalho onde se comprovou que esta enzima é uma glicoproteína, havendo a possibilidade de estar sendo glicosilada em níveis diferentes, gerando a mesma proteína com diferentes tamanhos dependendo da quantidade de glicosídeos inseridos na sua cadeia de aminoácidos e talvez HIGH maltose esteja de alguma forma estimulando este processo de uma maneira diferenciada.

Embora os tratamentos com 3% do indutor tenham sido os melhores para a produção de *abn*t, os tratamentos com 2% mostraram uma melhor conversão do substrato em produto, os rendimentos mais baixos foram obtidos com concentrações de 5% de maltose com a menor produção de enzima também. No trabalho realizado por Müller os rendimentos obtidos para XynB com agitação após 96h de cultivo foram sempre menores com $Y_{U/S}$ de 781U/g e $Y_{U/X}$ de1850 U/g comparados com *abn*t (MÜLLER et al., 2015).

Tabela 12 – Rendimentos, biomassa e atividade volumétrica final atingida para todos os tratamentos em agitação.

Tratamentos	Rendimentos			U/mL final	Biomassa final mg
	$Y_{U/S}$ U/g	$Y_{U/X}$ U/g	$Y_{X/S}$ g/g		
2% H	1698,4	3075,1	0,55	25,1	409
3% H	1599,6	3090,9	0,52	26,8	434,7
5% H	1014	2776,5	0,36	21,2	382,8
2% S	1613,8	3329,6	0,48	25,9	390,3
3% S	1352,4	3344,1	0,40	26,8	402
5% S	866,4	2670	0,32	23,8	446,8

Fonte: autoria própria.

Uma vez que o tipo de maltose não mostrou diferença na quantidade de proteína obtida, o qual representa um excelente resultado, HIGH maltose foi escolhida como substrato/indutor numa concentração de 3% para escalamento a 2 L em biorreator, uma vez que este substrato é mais econômico e portanto confere uma caraterística favorável que permite avançar mais um passo na possibilidade de *A. nidulans*+pEXPYR ser usado como sistema de expressão de proteínas recombinantes em escala industrial.

7.2.3 Fermentação em biorreator

No escalonamento do processo para 2 L em biorreator usando HIGH maltose 3% foram encontrados resultados interessantes com valores de proteínas totais (192,2 μg/mL) e enzima recombinante (23,2 U/mL) próximos aos mostrados no mesmo tratamento com agitação a escala menor. A figura 24B mostra que a

produção das proteínas foi sempre ascendente, com um crescimento na produção após 48 h de cultivo. Esta caraterística na produção chama a atenção quando se observa o consumo de maltose, lembrando que neste caso o substrato foi quantificado como açúcar redutor usando DNS e também foi quantificado o consumo especifico de maltose por HPLC.

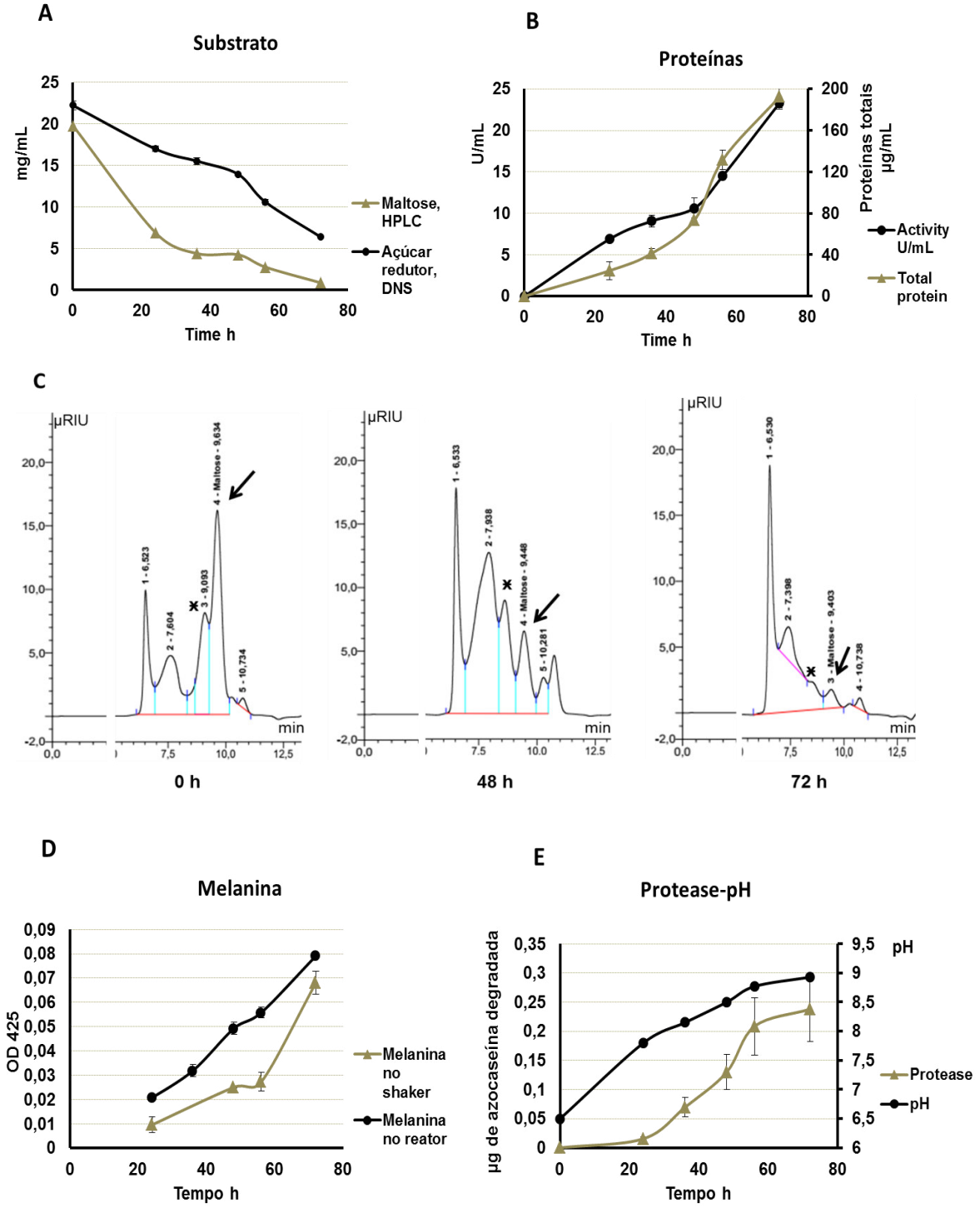
HIGH maltose é um substrato que pode conter maltotriose, glicose e outros açucares (informação fornecida pelo fabricante). Este dado foi confirmado pelo perfil mostrado pela análise por HPLC do consumo de maltose durante o processo de fermentação (Figura 24C).

A figura 24 A mostra que nas 48 h a maltose foi consumida em 80% e foi a partir desse momento que a velocidade de produção de *abn*t apresentou um maior aumento. Por outro lado, o consumo de outros açúcares presentes no meio, determinados por DNS, usados também pelo fungo para síntese da proteína recombinante mostrou que 62% de açúcares residuais estavam presentes até 48 h e seu consumo aumentou a partir deste momento até 72 h onde o açúcar residual foi de 28%.

A produção de melanina neste caso foi um pouco maior (0,079 unidades) quando comparado com o mesmo tratamento no *shaker* (0,069), esta diferença pode ser devido a uma maior na transferência do oxigênio no reator que é facilitada pela aeração e agitação mecânica. Como esperado, o pH foi ascendente durante o processo fermentativo, atingindo um valor maior (8,93) quando comparado com o mesmo tratamento no *shaker* (7,96), sendo que, esse aumento poderia gerar um ambiente favorável para ação de proteases alcalinas (Figuras 24 D e E).

Sabe-se que alguns fungos filamentosos são fonte de proteases, as quais, são indesejáveis na produção de *abn*t. Alguns trabalhos mostram que os gêneros *Aspergillus* podem produzir proteases alcalinas (SANTOS AGUILAR; SATO, 2018; WANG et al., 2005b), e trabalhos previamente realizados para produzir heterólogamente uma arabinofuranosidase (AbfB) usando *A. nidulans* mostraram que após o terceiro dia de cultivo o pH do meio tornava-se mais alcalino com valores próximos de 9, ao mesmo tempo a proteína de interesse era degradada (SEGATO et al., 2012).

Figura 24 – Consumo de substrato, produção de proteína, melanina, proteases e comportamento do pH no biorreator.



Fonte: autoria própria.

Nota: A: Consumo de maltose e outros açucares redutores totais.

B: Produção de proteínas totais e *abnt* no reator.

C: Perfil cromatográfico do consumo de substrato no tempo, setas indicam maltose e o asterisco outros açucares consumidos.

D:. Comparação da produção de melanina no reator e no mesmo tratamento realizado no *shaker*.

E: pH e produção de proteases no bioprocesso.

Nas etapas anteriores os géis de SDS mostraram que a proteína de interesse não foi degrada através do tempo, isto apesar de ser um comportamento favorável não permitiu confirmar se o fungo não estava produzindo proteases ou se pelo contrário, estava produzindo, mas no entanto, estas não estavam afetando a enzima *abn*t. Para observar a produção de protease por parte do fungo nesta etapa, foi monitorada e quantificada a atividade de proteases no meio de cultivo usando azocaseína e não por SDS-PAGE como foi feito nas etapas anteriores.

A figura 24E confirma a produção de proteases, mostrando que atividade de proteases no reator aumentou a partir de 24h de cultivo, esse aumento foi acompanhado também pelo aumento no pH, embora as proteases tenham aumentado no processo, a produção de *abn*t não apresentou inibição e nem decréscimo na atividade, o que permite aferir que, nesta etapa a enzima também não apresentou degradação por parte das proteases durante a fermentação e se o mesmo ocorreu, a degradação foi tão pequena (comparada com a velocidade de produção de proteína recombinante) que seu efeito não foi perceptível na atividade (U/mL) da *abn*t ao longo do processo.

Após o escalonamento do processo a quantidade de proteína de interesse produzida e a conversão do substrato em produto ($Y_{U/S}$=1468,5 U/g) apresentaram resultados muito parecidos com os atingidos pela fermentação em *shaker*. Um comportamento similar foi descrito por Müller onde a quantidade de XynB obtida e o rendimento ($Y_{U/S}$) após o escalamento do processo no reator TBR (*Trickle Bed Reactor)* foram também muito similares aos resultados obtidos em frascos agitados no *shaker* para XynB.

Os resultados apresentados aqui são promissórios uma vez que, em alguns casos o escalonamento do processo pode resultar em menores rendimentos do produto e no presente trabalho, ressalta-se que os valores de enzima obtidos no reator foram atingidos sem nenhum tipo de optimização dos parâmetros fermentativos. Além disso, *abn*t se mostrou resistente a proteases nativas do fungo durante as 72 horas de fermentação

8 CONCLUSÕES

O processo de clonagem dos genes, a transformação bacteriana e a fúngica foram bem-sucedidos do ponto de vista de se conseguir altos níveis de expressão para as enzimas da família GH93 pertencentes aos fungos *M. thermophila* e *T. terrestris* de maneira heteróloga no fungo *A. nidulans* A773 usando o vetor de transformação pEXPYR. As proteínas *abn*t e *abnm* são as primeiras exo-α-1,5-arabinanases produzidas de maneira heteróloga em fungo filamentoso.

A enzima *abn*t é até agora a única exo-α-1,5-arabinanase descrita, com caraterísticas termofílicas, apresentando uma temperatura ótima de 70 ^{o}C e prolongada estabilidade em pHs ácidos. Um pH ótimo de 5, com atividade específica e eficiência catalítica elevadas utilizando arabinana linear como substrato.

O fato de que, as características hidrolíticas da *abn*t podem ser melhoradas em até um 34% com a adição de Co^{2+}, junto com a sua termo estabilidade e a capacidade de manter seu poder hidrolítico por 48 h numa ampla faixa de pHs (4-6,5) fazem desta, uma proteína atraente para ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas com pHs ácidos.

A presente caraterização bioquímica de *abn*t permitirá enriquecer as bases de dados de enzimas ativas em carboidratos, que até o momento contam com apenas cinco proteínas GH93 descritas.

Independente do tipo de indutor utilizado a concentração de 3% sempre demonstrou um melhor efeito na produção da proteína recombinante. As condições de cultivo apresentaram grandes diferenças na produtividade de *abn*t mostrando que o cultivo submerso do fungo permitiu o dobro da produção enzimática, com um melhor aproveitamento do substrato e menor produção de melanina.

Os níveis de enzima recombinante produzidos por *A. nidulans*+pEXPYR usando HIGH maltose como indutor foram muito similares aos atingidos com maltose grau analítico, isto torna a produção enzimática mais econômica atribuindo mais uma caraterística desejável a este sistema de expressão para aplicações industriais uma vez que HIGH maltose é um substrato cinquenta vezes mais barato.

A produção da proteína recombinante no biorreator não se viu afetada pelas mudanças no volumem e na condução do bioprocesso quando comparada com a produção no *shaker* mostrando potencialidade para ampliação de escala.

REFERÊNCIAS

ADAV, S. S. et al. Quantitative iTRAQ Secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 8, p. 3932–3940, 2010.

ADETUNJI, L. R. et al. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 239–250, 2017.

AHAMED, A.; SINGH, A.; WARD, O. P. Culture-based strategies for reduction of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger* NRRL-3. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 1577–1583, 2005.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 1990.

APWEILER, R.; HERMJAKOB, H.; SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1473, n. 1, p. 4–8, 1999.

ARCHER, D. B.; DYER, P. S. From genomics to post-genomics in *Aspergillus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 499–504, 2004.

BACH, E. et al. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2455–2462, 2012.

BENNETT, J. . Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2–3, p. 101–107, 1998.

BENOIT, I. et al. Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012.

BERŁOWSKA, J. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of sugar beet pulp for efficient bioethanol production. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

BORGES, T. A. et al. Biochemical characterization of an endoxylanase from Pseudozyma brasiliensis sp. nov. strain GHG001 isolated from the intestinal tract of Chrysomelidae larvae associated to sugarcane roots. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 77–83, 2014.

BRAAKSMA, M. et al. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 584, 2010.

BRANDHORST, T.; KENEALY, W. R. Effects of leader sequences upon the heterologous expression of restrictocin in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 601–611, 1995.

CARAPITO, R. et al. Molecular basis of arabinobio-hydrolase activity in phytopathogenic fungi. Crystal structure and catalytic mechanism of Fusarium graminearum GH93 EXO-α-L-arabinanase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12285–12296, 2009.

CHAKIATH, C. et al. Thermal stabilization of erwinia chrysanthemi pectin methylesterase a for application in a sugar beet pulp biorefinery . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7343–7349, 2009.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–505, 1947.

CLUTTERBUCK, A. J. The validity of the *Aspergillus nidulans* linkage map. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, n. 3, p. 267–277, 1997.

CONTESINI, F. J. et al. Structural and functional characterization of a highly secreted α-L-arabinofuranosidase (GH62) from *Aspergillus nidulans* grown on sugarcane bagasse. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 12, p. 1758–1769, 2017.

CORFIELD, A. Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 147, n. 2, p. 119–147, 2017.

COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 558–569, 2007.

DAMÁSIO, A. et al. Improvement of fungal arabinofuranosidase thermal stability by reversible immobilization. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2411–2417, 2012a.

DAMÁSIO, A. et al. Immobilization of a recombinant endo-1,5-arabinanase secreted by *Aspergillus nidulans* strain A773. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 39–45, 2012b.

DAWE, A. L.; WILLINS, D. A.; MORRIS, N. R. Increased transformation efficiency of *Aspergillus nidulans* protoplasts in the presence of dithiothreitol. **Analytical Biochemistry**, v. 283, n. 1, p. 111–112, 2000.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 931–940, 2012.

EL-ENSHASY, H.; HELLMUTH, K.; RINAS, U. Fungal morphology in submerged cultures and its relation to glucose oxidase excretion by recombinant Aspergillus niger. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 1–11, 1999.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by Aspergillus niger. **International Biodeterioration and iodegradation**, v. 52, n. 4, p. 223–227, 2003.

FONSECA-MALDONADO, R. et al. Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. **Journal of iological Chemistry**, v. 288, n. 35, p. 25522–25534, 2013.

GALAGAN, J. E. et al. Sequencing of Aspergillus nidulans and comparative analysis with A. fumigatus and A. oryzae. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1105–1115, 2005.

GIBSON, D. G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. **Methods in Enzymology**, v. 498, p. 349–361, 2011.

GONCALVES, R.G.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from aspergillus nidulans. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. June, p. 1129–1131, 2005.

GONÇALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293–299, 2012.

GOUKA, R. J. et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens* – mediated homologous recombination. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 598–601, 1999.

GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 1–11, 1997.

GUAIS, O. et al. Characterization of the family GH54 α-L-arabinofuranosidases in *Penicillium funiculosum*, including a novel protein bearing a cellulose-binding domain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1007–1021, 2010.

HENRISSAT, B.; VEGETALES, M.; GRENOBLE, F. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. **Biochemical Journal**, v. 280, n. (Pt 2), p. 309–316, 1991.

HERRMANN, M. C. et al. The beta-D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase. **The Biochemical Journal**, v. 321, p. 375–81, 1997.

HERZOG, R. W. et al. A comparative study on the transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment of conidia and a more conventional procedure using protoplasts treated with polyethyleneglycol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 333–337, 1996.

INÁCIO, J. M.; SÁ-NOGUEIRA, I. Characterization of abn2 (yxiA), encoding a *Bacillus subtilis* GH43 arabinanase, Abn2, and its role in arabino-polysaccharide degradation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 12, p. 4272–4280, 2008.

JONES, M. G. The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential everyday resources or dusty museum specimens? **Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 1–6, 2007.

JØRGENSEN, T. R. et al. Submerged conidiation and product formation by *aspergillus niger* at low specific growth rates are affected in aerial developmental mutants . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5270–5277, 2011.

JUGE, N.; TAILFORD, L.; OWEN, C. D. Sialidases from gut bacteria: a mini-review. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 1, p. 166–175, 2016.

KIM, Y. S.; LIM, Y. R.; OH, D. K. L-Arabinose production from sugar beet arabinan by immobilized endo- and exo-arabinanases from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in a packed-bed reactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 239–241, 2012.

KIMURA, I. et al. Cloning, sequencing and expression of an alpha-L-arabinofuranosidase from Aspergillus sojae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 3, p. 262–266, 2000.

KIS-PAPO, T. et al. Survival of filamentous fungi in hypersaline dead sea water. **Microbial Ecology**, v. 45, n. 2, p. 183–190, 2003.

KODA, A. et al. High expression of a synthetic gene encoding potato α-glucan phosphorylase in *Aspergillus niger*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 5, p. 531–537, 2005.

KÜHNEL, S. et al. *Chrysosporium lucknowense* arabinohydrolases effectively degrade sugar beet arabinan. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8300–8307, 2010.

KÜHNEL, S.; SCHOLS, H. A.; GRUPPEN, H. Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 14, p. 1–14, 2011.

KUO, M.; ALEXANDER, M. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 3, p. 624–629, 1967.

KUWANO, T.; SHIRATAKI, C.; ITOH, Y. Comparison between polyethylene glycol- and polyethylenimine-mediated transformation of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v. 54, n. 2, p. 95–103, 2008.

LIM, Y. R. et al. Synergistic production of l-arabinose from arabinan by the combined use of thermostable endo- and exo-arabinanases from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4277–4280, 2011.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53–75, 2009.

LUO, Y. et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. **Chemichal Society Reviews**, v. 44, n. 17, p. 1922–2013, 2016.

MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157–1161, 2005.

MADHAVAN, A.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Expression system for heterologous protein expression in the filamentous fungus *Aspergillus unguis*. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1334–1342, 2017.

MARDONES, W.; CALLEGARI, E.; EYZAGUIRRE, J. Heterologous expression of a *Penicillium purpurogenum* exo-arabinanase in *Pichia pastoris* and its biochemical characterization. **Fungal Biology**, v. 119, n. 12, p. 1267–1278, 2015.

MARGOLLES-CLARK, E. et al. Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3840–6, 1996.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi - progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p. 177–185, 2008.

MICHAEL WARD, KATHERINE H. KODAMA, AND L. J. W. Transformation of *Aspergillus awamori* by Electroporation and *A . niger*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 289–293, 1989.

MILLER, B.; WOLFENDEN, R. CATALYTIC PROFICIENCY: The unusual case of omp decarboxylase. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 783–815, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIYANAGA, A. et al. The family 42 carbohydrate-binding module of family 54 α-L-arabinofuranosidase specifically binds the arabinofuranose side chain of hemicellulose. **Biochemical Journal**, v. 399, n. 3, p. 503–511, 2006.

MÜLLER, C. et al. Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1827–1836, 2002.

MÜLLER, M. et al. High-yield recombinant xylanase production by *Aspergillus nidulans* under pyridoxine limitation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1563–1570, 2014.

MÜLLER, M. et al. Continuous xylanase production with *Aspergillus nidulans* under pyridoxine limitation using a trickle bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 219–225, 2015.

NAKAJIMA, K. I. et al. Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3716–3723, 2006.

NIERMAN, W. C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1151–1156, 2005.

OSAKI, S. et al. Nutrient Metabolism — Research communication l -arabinose increases due to dietary sucrose in lipogenic enzymes and triacylglycerol levels in rats 1. **The journal of nutrition**, v. 131, n. 3, p. 796–799, 2001.

PARDO-PLANAS, O. et al. Prevention of melanin formation during aryl alcohol oxidase production under growth-limited conditions using an *Aspergillus nidulans* cell factory. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 874–882, 2017.

PARDO-PLANAS, O.; PRADE, R. A.; WILKINS, M. R. High-yield production of aryl alcohol oxidase under limited growth conditions in small-scale systems using a mutant *Aspergillus nidulans* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 247–257, 2017.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PONS, T. et al. Three acidic residues are at the active site of a β-propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 54, n. 3, p. 424–432, 2004.

RIBEIRO, L. F. C. et al. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

ROWLEY, B. I.; PIRT, S. J. Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat cultures. **Journal of general microbiology**, v. 72, n. 3, p. 553–563, 1972.

RUBIO, M. V. et al. Mapping N-linked glycosylation of carbohydrate-active enzymes in the secretome of *Aspergillus nidulans* grown on lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2016.

SAKAMOTO, T. et al. Molecular characterization of a *Penicillium chrysogenum* exo-1,5-α-L-arabinanase that is structurally distinct from other arabinan-degrading enzymes. **FEBS Letters**, v. 560, n. 1–3, p. 199–204, 2004.

SAKAMOTO, T.; FUJITA, T.; KAWASAKI, H. Transglycosylation catalyzed by a *Penicillium chrysogenum* exo-1,5-α-L-arabinanase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1674, n. 1, p. 85–90, 2004.

SÁNCHEZ, O.; AGUIRRE, J. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia efficient transformation of aspergillus nidulans by electroporation . **Fungal Genetics Newsletter**, v. 43, p. 48–51, 1996.

SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. September 2017, p. 253–262, 2018.

SANTOS, H. B. et al. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in Aspergillus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 100–106, 2012.

SEGATO, F. et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by Aspergilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588–613, 2014.

SEIBOTH, B.; METZ, B. Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1665–1673, 2011.

SHAPIRO, A. L.; VIÑUELA, E.; V. MAIZEL JR., J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 815–820, 1967.

SOGABE, Y. et al. High-resolution structure of exo-arabinanase from *Penicillium chrysogenum*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 5, p. 415–422, 2011.

SQUINA, F. M. et al. Substrate cleavage pattern, biophysical characterization and low-resolution structure of a novel hyperthermostable arabinanase from *Thermotoga petrophila*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 4, p. 505–511, 2010.

TE BIESEBEKE, R. et al. Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 44–50, 2005.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 1–23, 2007.

VRIES, R. P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 10–20, 2003.

WALLIS, G. L. F. et al. Glucoamylase overexpression and secretion in *Aspergillus niger*: Analysis of glycosylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, n. 3, p. 576–586, 1999.

WANG, G. et al. The disruption of two salt bridges of the cold-active xylanase XynGR40 results in an increase in activity, but a decrease in thermostability. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 481, n. 1–2, p. 139–145, 2016.

WANG, L. et al. Effects of process parameters on heterologous protein production in Aspergilus niger fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 12, p. 1259–1266, 2003.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 115–129, 2005a.

WANG, S. L. et al. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1–2, p. 660–665, 2005b.

WANG, X. et al. Improvement of the catalytic efficiency of a hyperthermophilic xylanase from Bispora sp. MEY-1. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–13, 2017.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by fi lamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1119–1139, 2012.

WAY, J. C. et al. Review integrating biological redesign : where synthetic biology came from and where it needs to go. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 151–161, 2014.

WONG, D. W. S.; CHAN, V. J.; BATT, S. B. Cloning and characterization of a novel exo-α-1,5-L-arabinanase gene and the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 941–949, 2008.

YANG, W. et al. A novel bifunctional GH51 exo-α-l-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus sp*. A4 with significant biomass-degrading capacity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 16–25, 2005.

ZIEMIŃSKI, K.; KOWALSKA-WENTEL, M. Effect of different sugar beet pulp pretreatments on biogas production efficiency. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 3, p. 1211–1227, 2017.

ŽNIDARŠIČ, P.; KOMEL, R.; PAVKO, A. Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 589–593, 2000.

APÊNDICE A – Soluções e meios de cultivo

Meio SOC

Triptona	20 g/L,
extrato de levedura	5 g/L,
NaCl	10 mM,
KCl	2,5mM,
MgCl2	20 mM
glicose	20 mM

Meio LB

Triptona	1%
extrato de levedura	0,5% ,
NaCl	1%
ágar	2%
pH 7,0	

SDS-PAGE 12%

Água	3,3 mL
Acrilamida 30%	4,0 mL
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5mL
SDS10%	0,1 mL
persulfato de amônia 10%	0,1mL
TEMED	0,004mL

Meio MINIMO/100mL

Solução de sais 20X	5mL
Elementos trace 1000X	0,1mL
Glicose	1 gr
Agar	1,9 gr
pH 6,5	

Meio MANDELS/200mL

Urea	0,06 gr
Peptona	0,15 gr
Extrato de levedura	0,05 gr
$(NH_4)_2SO_4$	0,28 gr
KH_2PO_4	0,4 gr
$CaCl_2$	0,06 gr

Elementos trace/100mL

$ZnSO_4$	2,2 gr
H_3BO_3	1,1 gr
$MnCl_2$	0,5 gr
$FeSO_4$ $7H_2O$	0,5 gr
$CoCl_2$ $5H_2O$	0,16 gr
$CuSO_4$ $5H_2O$	0,16gr
Na_2MoO_4 $4H_2O$	0,11gr
EDTA-Na	5

Solução de sais 20X, g/L

$NaNO_3$	120 gr
KCl	10,4 gr
$MgSO_4$	10,4 gr
KH_2PO_4	30,4 gr

APÊNDICE B – Quantificação de proteína pura e curva padrão de DNS

Quantificação da proteína purificada segundo a lei de Beer-Lambert

$$Abs = \varepsilon * L * C$$

Onde:**Abs**= absorbância.

ε= coeficiente de extinção molar.

L= caminho ótico em cm.

C= concentração Molar

Assim para calcular a concentração da proteínas temos:

O valor da abs medido a 280nm**, L que para esta placa com 200 µl corresponde a 0,5cm** e o ε inferido por protparam, então pode se achar C

$$C = Abs / \varepsilon * L$$

para a proteína *abn*t com ε= 72770 $M^{-1}cm^{-1}$, massa= 39,800 Da e abs_{280}=0,340

$$C = 0{,}340 / 72770 * 0{,}5 = 9{,}35*10^{-6}\ M$$

Assim $9{,}35*10^{-6}$ M* 39800 g/mol = 0,372 g/L ou 0,372 mg/mL

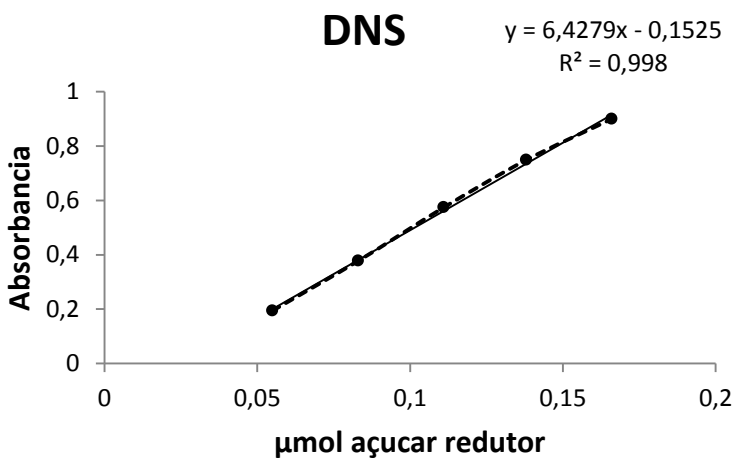



Figura B1 – Curva padrão DNS