UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

MARIANA BROLEZZI GOMES LATARULLO

Caracterização de uma endopoligalacturonase (scEPG1) de cana-de-açúcar e suas implicações para a produção de etanol

São Paulo
2018

MARIANA BROLEZZI GOMES LATARULLO

Caracterização de uma endopoligalacturonase (scEPG1) de cana-de-açúcar e suas implicações para a produção de etanol

Tese apresentada ao programa
de Pós-Graduação de Interunidades
em Biotecnologia, para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Gabriel Padilla Maldonado
Co-orientador: Prof. Marcos Silveira Buckeridge

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Latarullo, Mariana Brolezzi Gomes
Caracterização de uma endopoligalacturonase (scEPG1) de cana-de-açúcar e suas implicações para a produção de etanol / Mariana Brolezzi Gomes Latarullo; orientador Gabriel Padilla; coorientador Marcos Buckeridge. -- São Paulo, 2018.
126 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Endopoligalacturonase. 2. Cana-de-açúcar. 3. Pectina. 4. Pichia pastoris. 5. Etanol. I. Padilla, Gabriel, orientador. II. Buckeridge, Marcos, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Candidato(a): Mariana Brolezzi Gomes Latarullo
Título da Tese: Caracterização de uma endopoligalacturonase (scEPG1) de cana-de-açúcar e suas implicações para a produção de etanol
Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em ____/_____ /_____ , considerou:

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **688/14** referente ao projeto intitulado: *"Caracterização bioquímica e estrutural de enzimas lignocelulósicas produzidas por fungos e actinomicetos endofíticos"* sob a responsabilidade de **Mariana Brolezzi Gomes Latarullo,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

p/

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

A todos aqueles que de alguma forma
estiveram e estão próximos de mim,
fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Gabriel Padilla, pela orientação, pelos ensinamentos, por confiar no meu trabalho e pela amizade durante todos estes anos. Suas palavras sempre me motivaram e acalmaram esse meu coraçãozinho nem sempre tão otimista.

Ao professor Marcos Buckeridge, que aceitou me co-orientar mesmo com um ano já corrido e me acolheu no seu grupo de pesquisa. Me ensinou muito, principalemente como explorar o meu melhor.

À minha mentora, Eveline Tavares (Eveeeeeee) que me acompanhou desde o início, teve muita paciência comigo e não desistiu de mim. Me ensinou muito (e ainda ensina) além de ser uma ótima pessoa, uma verdadeira inspiração.

Aos meus pais, Silvio e Telma, que sempre me apoiaram em todas as fases da minha vida e me acompanham nessas aventuras que eu me meto.. hehehe.. Amo demais vocês!!
À minha irmã, Fabiana, que mesmo me jogando do braço sofá porque ela queria ficar deitada sozinha, eu amo muito. E claro, ao cunhado Thiago e afilhado mais lindo da dinda, Gustavo!

Ao meu marido e companheiro de aventuras Cello, por ser essa pessoa que eu admiro muito, é muito dedicado e mesmo com dificuldades, continua sempre focado nos seus objetivos. É uma pessoa incrível, além de lindo e com um ótimo gosto para escolher a esposa =P.

Aos meus avós, Vó Leonor e Vô José (*in memorian*), pela ajuda na minha criação e por estar sempre presente, e Vó urubu e Vô Pedro pelo carinho.

Aos meus padrinhos Tia Léa e Tio Valdir, por estarem sempre presentes e me incentivarem a ser tudo que eu quiser.

Aos meus sogrinhos, Máaaaaa e Carlão, que sempre me incentivam a melhorar e me ajudam a passar pelas dificuldades da vida. Além de serem ótimas companhias =*

Aos meus cunhados, Jana, Toninho Newbaweebaaaa e sobrinho Felipe, por estarem sempre perto em todas as situações.

Aos meus familiares e amigos, eu não seria nada sem vocês. ^^

Ao professor Welington pela parceria de laboratório e por dividir nosso técnico Leandro Garrido. Importante lembar que ambos compartilham comigo a preferência pela cor magenta.

Pelos colegas do Lafieco e Bioprodutos pela ajuda, companhia e amizade: Luana, Ruth, Vinicius, Lucas, Débora, Bruno Navarro, Bruno Flausino, Carmen, Adriana, Marina, Janaína, Arthur, Giuliano e todos outros que passaram pelos laboratórios.

Às azuletes, Greucilene (Grayce =P), Lauana e Igou (Eglee), vocês fazem os dias muito mais divertidos!, muito bom saber que posso contar sempre com vocês e vocês comigo =*

Aos meus amigos, que sempre me apoiam, especialmente a Eulalia (zamora), que me acompanha desde a graduação. São 14 anos de companheirismo e amizade.

Aos coleguinhas da FMU, Dani, Bárbara, Karlinha e Silvio, pela amizade, por guardarem lugar pra mim.. kkkkkk, pelas gordices na sala e por sempre me ajudarem <3

Ao Prof. Richard Ward, pela ajuda no trabalho, pelo material utilizadas aqui e por me receber no seu laboratório com todo carinho.

À professora, Marie Anne e sua técnica de laboratório, Tati, por disponibilizar o laboratório dela, para a realização de alguns experimentos, me ensinarem as técnicas e por toda a ajuda.

Aos professores do ICBII, Marcio Dias, Kelly Ishida, José Gregório e Luiziana por autorizarem a utilização dos seus equipamentos.

Às funcionárias da secretaria: Fábia e Eliane, por sempre me ajudarem a resolver as questões burocráticas.

À CAPES, pelo apoio financeiro de 2014 a 2018.

À todos os professores e alunos do departamento, foram muitos anos se encontrando nos corredores.

Muito Obrigada!!

"Je remue le ciel, le jour, la nuit
Je danse avec le vent, la pluie
Un peu d'amour, un brin de miel
Et je danse, danse, danse, danse, danse, danse"

Indila

RESUMO

Latarullo M. Caracterização de uma endopoligalacturonase (scEPG1) de cana-de-açúcar e suas implicações para a produção de etanol. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

O maior desafio para a produção de bioenergia continua sendo a precisa desconstrução da parede celular de vegetal. Tendo em vista viabilizar a produção de etanol de segunda geração (2G) em larga escala, bem como otimizar o procedimento de produção do etanol de primeira geração (1G), estudos vêm sendo desenvolvidos com foco na produção de enzimas lignocelulósicas, principalmente as de origem fúngica. Esses estudos visam o aperfeiçoamento de coquetéis enzimáticos, compostos principalmente por enzimas que atacam celulose e hemiceluloses. No entanto, sabemos que as paredes celulares vegetais possuem também pectinas e recentemente foi demonstrado que pectinases podem melhorar sensivelmente o processo de hidrólise (até 30%). Após o levantamento de dados referentes a diferentes enzimas pectinolíticas denominadas endopoligalacturonases (EPGs) já caracterizadas e catalogadas no banco de dados CAZy, foi possível verificar que aquelas produzidas por fungos filamentosos contabilizam mais de 65%. A partir disso foi realizada uma análise filogenética de todas as EPGs caracterizadas produzidas por diferentes organismos. O resultado demonstrou que enzimas dessa família produzidas por bactérias – também com interesse biotecnológico – são mais próximas de plantas do que dos próprios fungos. Além disso, a proporção de enzimas caracterizadas de bactérias e plantas era significativamente menor que o observado para EPGs de fungos. Isso evidenciou uma lacuna no conhecimento sobre enzimas de plantas, ainda pouco exploradas no contexto de biotecnologia e bioenergia. Este trabalho apresenta a clonagem, expressão heteróloga e caracterização da EPG de cana-de-açúcar recombinante. O principal objetivo é obter informações a respeito de uma enzima com atividade chave na degradação de parede celular, haja vista ter sido ela isolada de um processo de ataque endógeno à pectina da própria cana-de-açúcar. Como resultado, a endopoligalacturonase de *Saccharum* sp. foi eficientemente expressa em sistema de expressão heterólogo com *Pichia pastoris* X33. O clone produtor selecionado gerou os maiores valores de proteínas totais no sobrenadante de cultivo com 96 horas de indução com metanol. A partir do extrato bruto do sobrenadante coleta, os melhores valores de atividade enzimática foram obtidos quando da incubação por 22 horas a 45 ˚C em tampão acetato de sódio pH 5,0. Sais, detergentes e quelantes atuaram como inibidores da atividade enzimática e, por outro lado, o agente redutor ditiotreitol (DTT) foi responsável pelo incremento de atividade enzimática. Por fim, os parâmetros cinéticos obtidos para a enzima caracterizada indicam a possibilidade de utilizá-la como complemento de coquetéis enzimáticos, conhecidamente pobres em pectinases.

Palavras-chave: Endopoligalacturonase. Cana-de-açúcar. Pectina. *Pichia pastoris*. Etanol.

ABSTRACT

Latarullo M. Characterization of an endopolygalacturonase (scEPG1) of sugarcane and its implications for the ethanol production. [Ph.D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

The biggest challenge for bioenergy production remains the disassembly of the extracellular matrix of some plant species. For the large-scale production of second generation ethanol (2G), and optimizing the first generation ethanol (1G) production process, studies have been developed focusing on the production of lignocellulosic enzymes, especially those of produced by fungi. These studies aim at the improvement of enzymatic cocktails, composed mainly of enzymes that are capable of attacking cellulose and hemicelluloses. However, it is a known fact that the plant cell walls also contain pectins and it has been recently demonstrated that pectinases could significantly improve the hydrolysis process (up to 30%). After an analysis of different pectinolytic enzymes known as endopoligalacturonases (EPGs), already characterized and cataloged under the CAZy database, it was possible to verify that fungi enzymes account for more than 65% of all of the characterized EPGs. The result has shown that enzymes from this family produced by bacteria - also with biotechnological interest - are closer to plants than fungi. Besides, the proportion of characterized enzymes from bacteria and plants was significantly lower than that observed for fungal EPGs. This evidenced a gap in knowledge about plant enzymes, still little explored in the context of biotechnology and bioenergy. This work presents the cloning, heterologous expression, and characterization of recombinant sugarcane EPG. The primary objective is to obtain information about an enzyme with key activity in cell wall degradation since it has been isolated from a process of an endogenous attack on sugarcane pectin itself. As a result, the endopoligalacturonase of Saccharum sp. was efficiently expressed through the heterologous expression system with Pichia pastoris X33. The selected clone generated the highest total protein values in the culture supernatant at 96 hours of methanol induction. From the crude extract of the supernatant collected, the best enzyme activity values were obtained upon incubation for 22 hours at 45 °C in pH 5.0 sodium acetate buffer. Salts, detergents, and chelators acted as inhibitors of the enzymatic activity and, on the other hand, the reducing agent dithiothreitol (DTT) was responsible for the increase of enzymatic activity. Finally, the kinetic parameters obtained for the enzyme characterized indicate that it can be used as a complement to enzymatic cocktails, which are known to be poor in pectinases.

Keywords: Endopolygalacturonase. Sugarcane. Pectin. *Pichia pastoris*. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Uso de extratos fúngicos com diferentes atividades de pectinases na extração de sucos de (A) laranja e (B) maçã 30

Figura 2 - Mapa do vetor pPICZαA..... 41

Figura 3 - Homologia das sequências de aminoácidos de enzimas de plantas e microrganismos mais representados da família CAZy GH28 54

Figura 4 - Alinhamento da sequência da endopoligalacturonase de cana com outras endopoligalacturonases de microrganismos (*A. niger* e *P. carotovorum*) 57

Figura 5 - Sequência de aminoácidos da endopoligalacturonase de cana-de-açúcar nativa..... 58

Figura 6 - Sequência de aminoácidos da endopoligalacturonase de cana-de-açúcar heteróloga 58

Figura 7 - Modelo teórico scEPG1 nativa (Homo-tetrâmero)..... 62

Figura 8 - Alinhamento múltiplo da sequência da EPG nativa com a sequência mais similar do banco de dados (Exopoligalacturonase de *Thermotoga maritima*) 62

Figura 9 - Modelo teórico EPG heteróloga (Monômero)..... 63

Figura 10 - Alinhamento múltiplo da sequência da EPG heteróloga com a sequência mais similar do banco de dados (Exopoligalacturonase de *Thermotoga maritima*)... 63

Figura 11 - Mapa do plasmídeo pUC57 + inserto EPG cana digerido com EcoRI 65

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose da extração e digestão do DNA plasmidial de pUC57 + scEPG1. 65

Figura 13 - Sequência do sítio múltiplo de clonagem do vetor pPICzαA após a inserção da sequência da scEPG1. 67

Figura 14 - Sequência de aminoácidos e nucleotídeos da enzima recombinante..... 68

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação do gene sintético da endopoligalacturonase contido no plasmídeo pUC57 69

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da contrução pPICzαA_scEPG1 obtidos de cinco diferentes clones de *E. coli* DH10B 70

Figura 17 - Alinhamento múltiplo dos 5 clones selecionados de *E. coli* com o a sequência padrão da construção vetor+inserto como molde 71

Figura 18 - Alinhamento múltiplo dos 5 clones selecionados de *E. coli* com o a sequência padrão da construção vetor+inserto como molde 72

Figura 19 - Cultivo de *Pichia pastoris* em meios BMMG e BMMY..... 73

Figura 20 - Atividade enzimática em placa dos extratos intra e extracelular dos 4 clones de *Pichia pastoris* obtidos após a clonagem 75

Figura 21 - Esquema de anelamento dos primers específicos para scEPG1 77

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação do *locus* AOX do material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio 78

Figura 23 – Esquema didático dos possíveis resultados da reação de PCR utilizando os primers A1-AOX-F / A7-AOX-R 79

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da região interna parcial da scEPG1 com material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio 80

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da região completa da scEPG1 com material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio 81

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da região parcial do vetor pPICzαA e região parcial da scEPG1 com material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio 82

Figura 27 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com extratos brutos obtidos da linhagem mutante *P. pastoris* X33_scEPG1 em diferentes tempos de indução.....83

Figura 28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com extratos brutos obtidos da linhagem mutante P. pastoris X33 + Vetor vazio em diferentes tempos de indução. 84

Figura 29 - Otimização da expressão de proteínas totais do clone *P. pastoris* C21 .86

Figura 30 - Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática 90

Figura 31 - Efeito do pH sobre a atividade enzimática 90

Figura 32 - Efeito de interferentes sobre a atividade enzimática.....92

Figura 33 - Variação na concentração de DTT sobre a atividade enzimática 94

Figura 34 - Ensaio em placa de atividade pectinolítica com o extrato bruto da scEPG1 e vetor vazio com e sem a adição de DTT. 95

Figura 35 - Sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar com coquetel enzimático + scEPG1 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores e enzimas de restrição utilizados para amplificação dos genes codificadores da scEPG1 de cana-de-açúcar para clonagem e sequenciamento 43

Tabela 2 - Composição dos meios BMGY / BMMY 47

Tabela 3 - Comparações entre EPGs de Fungo (*Aspergillus niger*), Bactéria (*Pectobacterium carotovorum*) e Planta (*Saccharum* sp.) quanto ao modo de nutrição, dados na literatura, ação da enzima no metabolismo e especificidade do substrato 56

Tabela 4 - Análise in silico da sequência da scEPG1 nativa da cana-de-açúcar e heteróloga produzida por *Pichia pastoris* 58

Tabela 5 - Primers utilizados para detectar a presença do inserto no clone *Pichia pastoris* C21 76

Tabela 6 - Otimização da expressão de proteínas totais pelo clone C21 (*Pichia pastoris* X33_pPICZαA_scEPG1) 85

Tabela 7 - Dados brutos de sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL – Agência nacional de energia elétrica

BLAST – ferramenta de alinhamento local e busca

BMMG – meio completo tamponado com glicerol

BMMY – meio completo tamponado com metanol

BSA – soro albumina bovina

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleotídeo

DTT – ditiotreitol

EPG - endopoligalacturonase

MM – Meio mínimo com metanol

OD – densidade óptica

PCR – reação de polimerização em cadeia

pH – potencial hidrogeniônico

RPM – rotações por minuto

RT-PCR – transcrição reversa - reação de polimeração em cadeia

scEPG1 – endopoligalacturonase de cana-de-açúcar (*sugarcane* EPG)

SDS – sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE – gel eletroforético desnaturante de poliacrilamida

TE – tampão Tris-EDTA

YNB – base nitrogenada de levedura

YPD - meio de cultura contendo dextrose, peptona e extrato de levedura

YPDS – meio de cultura contendo dextrose, peptona, extrato de levedura e sorbitol

αMF – α *mating factor* - fator de acoplamento alfa de *Saccharomyces cerevisiae*

SUMÁRIO

1. ***Introdução*** *18*
2. ***Revisão da literatura*** *20*
2.1 *Bioenergia e a cana-de-açúcar* 20
2.2 *Etanol 1G e 2G* 21
2.3 *Produção de Etanol 2G* 21
2.4 *Parede celular da cana-de-açúcar* 22
2.5 *Substâncias pécticas* 23
2.6 *Pectinases* 24
2.7 *Emprego industrial de pectinases* 28
2.7.1 Indústria têxtil 29
2.7.2 Pectinases na extração de suco de frutas 29
2.7.3 Extração de óleos essenciais e vegetais 30
2.7.4 Processamento de bebidas alcoólicas 31
2.7.5 Processamento de chá e café 31
2.7.6 Alimentação animal 32
2.7.7 Sacarificação de produtos agrícolas 32
2.8 *Produção de pectinases heterólogas* 32
2.9 *Sistema de expressão heteróloga* 33
2.10 *Modificações endógenas nas paredes celulares pelas plantas: o exemplo do aerênquima* 35
3. ***Justificativa*** *38*
4. ***Objetivos*** *39*
5. ***Material e Métodos*** *40*
5.1 *Material Biológico* 40
5.1.1 Linhagens utilizadas para clonagem 40
5.1.2 Sistema de clonagem e linhagem hospedeira 40
5.1.3 Vetor de expressão 40
5.2 *Amplificação da região codificante (CDS) da scEPG1 de Saccharum sp. para clonagem* 41
5.2.1 Obtenção do DNA sintético 41
5.2.2 Preparação de bactérias *E. coli* DH10B eletrocompetentes 42
5.2.3 Transformação em *E. coli* DH10B eletrocompetente 42
5.2.4 Digestão da construção pUC57 + inserto da scEPG1 43
5.2.5 Amplificação dos genes da ScEPG1 43

5.2.6 Purificação dos produtos de PCR 44
5.3 *Análise in silico das sequências da scEPG1 nativa e heteróloga*.....44
5.4 *Clonagem em E. coli DH10B*.....45
5.4.1 Construção vetor pPICZαA + amplicon ScEPG1 45
5.4.2 Transformação de E. coli DH10B por eletroporação 45
5.5 *Clonagem em Pichia pastoris X33* 46
5.5.1 Transformação de *Pichia pastoris* X33.....46
5.5.2 Análise da expressão de proteína em *Pichia pastoris*.....47
5.5.3 Quantificação de proteínas totais 47
5.6 *Extração de DNA genômico e cDNA de Pichia pastoris X33_scEPG1* 48
5.7 *Identificação da proteína* 48
5.7.1 Precipitação da proteína.....48
5.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 48
5.7.3 Coloração com azul de comassie.....49
5.8 *Ensaios enzimáticos*.....49
5.8.1 Medição da atividade enzimática 49
5.8.2 Efeito de íons metálicos, agentes redutores, detergentes e quelantes sobre a atividade pectinolítica da scEPG1. 50
5.8.3 Extração do conteúdo intracelular dos clones X33_scEPG1 e X33_vetor vazio 50
5.8.4 Influência do pH e temperatura sobre as atividades da scEPG1 50
5.9 *Sacarificação*.....51
6. ***Plano de trabalho***.....*52*
7. ***Resultados e Discussão***.....*53*
7.1 *Análises in silico da sequência da EPG de cana-de-açúcar*.....57
7.1.1 Peso molecular das enzimas nativa e heteróloga e glicosilações 59
7.1.2 Ponto isoelétrico.....60
7.1.3 Modelo tridimensional teórico da EPG nativa e heteróloga 61
7.2 *Construção do vetor pPICZαA + inserto da EPG de cana-de-açúcar*.....64
7.2.1 Obtenção do material genômico de Saccharum sp. 64
7.2.2 Desenho dos primers para a contrução do vetor pPICZαA + scEPG1 65
7.2.3 Amplificação do Fragmento da EPG de cana-de-açúcar em plasmídeo pUC57 69
7.2.4 Contrução do vetor pPICzαA_scEPG1 em E. coli DH10B 69
7.3 *Análise dos clones de E. coli DH10B + pPICzαA_scEPG1* 70
7.3.1 Análise das sequências dos clones de E. coli DH10B + pPICzαA_scEPG1 70

7.4 *Transformação de Pichia pastoris X33*.....72
7.4.1 Produção da proteína recombinante em Pichia pastoris X33.....72
7.4.2 Teste de atividade enzimática com extratos intra e extracelulares dos 4 clones obtidos.....74
7.4.3 Análise por PCR do DNA e cDNA do clone selecionado.....76
7.5 *Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.* 82
7.6 *Otimização da expressão da enzima recombinante*.....84
7.7 *Detecção da atividade enzimática*.....87
7.7.1 Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade enzimática 88
7.7.2 Efeito de íons metálicos, agentes redutores, detergentes e quelantes sobre a atividade pectinolítica da scEPG1 91
7.8 *Sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar*.....95
8. ***Resumo dos principais resultados obtidos*** *97*
9. ***Conclusão e perspectivas***.....*98*
10. ***Referências Bibliográficas*** *99*
11. ***Apêndices*** *115*
Apêndice A – Artigo publicado em 2016 115
Apêndice B – Sequências obtidas do DNA genômico e transcrito do clone *P. pastoris* scEPG1 122
Apêndice C – Sequências obtidas do DNA genômico e transcrito do clone *P. pastoris* + Vetor vazio 126
Apêndice D – Curvas padrão e equações.....127
Apêndice E – Otimização da indução.....128
Apêndice F – Valores brutos de variação de temperatura e pH.....128

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país agrícola, e diante do atual cenário econômico e suas perspectivas, a utilização consciente das matérias-primas disponíveis é uma das melhores formas de potencializar a economia. Dentre as plantas de interesse agronômico produzidas no Brasil, a cana-de-açúcar é um dos cultivos de maior importância econômica.

Com as alterações climáticas, os biocombustíveis têm recebido bastante atenção como alternativa aos combustíveis fósseis. O etanol é um dos mais promissores pelas suas características, tais como: baixa emissão de CO_2, sustentabilidade e produção de bioeletricidade (que sustenta a usina em termos energéticos com parte do resíduo). O Brasil possui larga experiência na produção desse combustível (cerca de 50 anos desde o programa Próalcool em 1970), tendo conseguido avanços tecnológicos importantes. Graças a um sistema de produção de etanol com alta eficiência, tornamo-nos um polo mundial na ciência, tecnologia e produção maciça de automóveis *flexfuel* e distribuição por todo o país (De Souza et al. 2013a).

A safra 2017/2018 de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 641 milhões de toneladas e produziu 38 milhões de toneladas de açúcar e 27 milhões de m^3 de etanol (UNICA 2018). Estes produtos são derivados do caldo da cana-de-açúcar e como resíduo foram gerados aproximadamente 300 milhões de toneladas de palha e bagaço.

O potencial de expansão da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil é enorme. Utilizando terra agricultável sem avanço sobre biomas preservados e sem avançar nas áreas de produção de alimentos até 2045, a produção de etanol por cana-de-açúcar tem potencial para substituir até 6% da gasolina mundial e mitigar em até 14% das emissões de CO_2 em relação à 2014 (Jaiswal et al. 2017).

Tal capacidade de produção e seu potencial futuro têm norteado estudos focados na produção de etanol 2G utilizando estes resíduos, sendo o principal entrave o pré-tratamento e hidrólise enzimática por serem as etapas mais custosas. Para aumentar a eficiência no processo global de produção de etanol é necessário reduzir o custo relacionado à fabricação deste produto.

As paredes celulares de plantas, inclusive as de cana-de-açúcar, possuem uma resistência natural à hidrólise enzimática denominada “recalcitrância”. Ela ocorre devido à alta complexidade gerada pelas interações entre os polímeros da parede celular, classificados em três domínios principais: celulose-hemicelulose, pectinas e lignina. Em conjunto, estes domínios formam um arranjo arquitetônico que é denominado Código Glicômico (Buckeridge and De Souza 2014).

A recalcitrância do Código Glicômico se deve, em parte, à interação entre componentes das pectinas com a lignina (De Souza et al. 2015).

As pectinas são formadas principalmente por um polímero composto por unidades de ácido galacturônico. Estão presentes na lamela média e preenchem os espaços intercelulares em toda a planta. Este grupo de polissacarídeos está presente em baixas proporções na parede celular de gramíneas (2-10%) e por isso, nos coquetéis enzimáticos comerciais, as enzimas que hidrolisam pectinas ou estão ausentes ou em baixas concentrações.

Com os avanços observados na área de biotecnologia atrelada ao conhecimento da arquitetura da parede celular (Buckeridge et al. 2019), os custos tendem a reduzir graças à produção de enzimas mais eficientes. De Souza et al. (2013b) e De Souza et al. (2015) discutem sobre a estrutura dos polímeros presentes nas paredes de cana-de-açúcar e *miscanthus* respectivamente e sugerem que a degradação da parede celular requer pelo menos 18 tipos diferentes de enzimas, sendo muitas destas relacionadas ao ataque de pectinas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioenergia e a cana-de-açúcar

O conceito de bioenergia se refere à utilização de recursos biológicos renováveis para a geração de energia. Pode ser produzida tanto em pequenas como em grandes unidades de produção e pode ser gerada em praticamente todo lugar onde os processos fotossintéticos garantam um mínimo de condições para a realização da síntese da vida vegetal (Rathore et al. 2015).

A ideia básica é transformar hidrocarbonetos produzidos por plantas ou algas (a maioria na forma de açúcar e lipídios) em compostos como diesel e etanol. No último caso, existem somente algumas espécies de plantas que são consideradas ou efetivamente utilizadas para produção em larga escala. Entre elas, há as que armazenam altas concentrações de sacarose (p. ex. cana de açúcar e beterraba), amido (p. ex. milho), lignocelulose a partir de materiais lenhosos (p. ex. salgueiro) ou gramíneas (p. ex. palha de milho, *switchgrass*, *miscanthus* e bagaço cana de açúcar) (De Souza et al. 2013a). Outros resíduos, tais como polpa de maçã, citrinos e beterraba, que são ricos em pectinas, também têm sido sugeridos como possíveis fontes de carbono para a produção de bioetanol (Edwards and Doran-Peterson 2012).

A cana-de-açúcar é composta basicamente de três porções: o caldo, o bagaço (umidade aprox. de 50%) e a palha (umidade aprox. de 15%). Cada parte representa aproximadamente 1/3 da capacidade energética deste material. O etanol de primeira geração é produzido somente a partir do caldo da cana-de-açúcar, e atualmente, somente uma parte do bagaço é destinada para obtenção de energia para a própria usina através da queima, enquanto a palha não é aproveitada, sendo queimada ou abandonada no próprio campo (Alonso Pippo et al. 2011a; Alonso Pippo et al. 2011b).

De acordo com a UNICA, a indústria brasileira de cana-de-açúcar contribui com 7,5% de toda energia fornecida pela Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), sendo assim a terceira mais importante fonte de energia do país, ficando atrás apenas da energia hidrelétrica e combustíveis fósseis. Com a introdução de veículos *flex* em 2003, que podem utilizar etanol ou gasolina como combustível, houve um aumento do consumo de etanol e consumo de gasolina caiu mais da metade. Outra razão para o aumento da demanda por álcool anidro foi a política adotada pelo Brasil e outros

países de aumentar o percentual de álcool na gasolina. Atualmente no Brasil é obrigatório haver uma mistura de 27% de etanol anidro na gasolina (Carpio and Simone de Souza 2017).

2.2 Etanol 1G e 2G

O Brasil e os EUA são os maiores produtores de etanol do mundo, utilizando como principais matérias-primas para a produção em grande escala a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e o milho (*Zea mays*) respectivamente (RFA 2015).

O rendimento da produção de etanol depende da variedade da cana-de-açúcar, estimada principalmente pela quantidade de sacarose obtida após a moagem, e da eficiência de utilização desse material. A eficiência industrial (utilização da sacarose) do Etanol 1G é de mais de 90% (Macedo et al. 2008). Por isso, diante do crescente aumento na demanda, será necessário aumentar a área plantada, utilizar fontes alternativas ou otimizar o processo de extração da sacarose.

O etanol de segunda geração (2G) é produzido a partir da biomassa do colmo e palha, ou seja, os resíduos gerados a partir da extração de sacarose para o etanol 1G. Este material rico em celulose e hemiceluloses passa por etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação de hexoses e pentoses (Ojeda and Kafarov 2009). A partir desta etapa, o processo de produção e o produto final é idêntico ao etanol 1G (Abramson et al. 2010).

Estudos focados no desenvolvimento de tecnologias eficientes para o pré-tratamento do bagaço, o melhoramento do coquetel enzimático e leveduras adequadas para a fermentação das pentoses e hexoses mostram que, além da pesquisa básica necessária para apoiar novos desenvolvimentos nesses campos, a solução para esses desafios parece depender de uma abordagem integrada e altamente multidisciplinar, pois essas linhas de pesquisa estão, de fato, muito fortemente relacionadas (Soccol et al. 2010).

2.3 Produção de Etanol 2G

A produção do etanol 2G acontece por etapas, sendo a primeira o pré-tratamento da biomassa da cana (bagaço ou palha). Este tratamento pode ocorrer por hidrólise alcalina, hidrólise ácida, explosão a vapor, sendo a última a mais utilizada.

Após o pré-tratamento, o material é submetido à hidrólise enzimática. Esta etapa é considerada o “gargalo” da produção do etanol 2G devido ao seu alto custo (Soccol et al. 2010; Buckeridge et al. 2019). As principais limitações são: a recalcitrância da biomassa à degradação por enzimas, ou seja, a resistência intrínseca da parede celular à hidrólise devido ao seu Código Glicômico, e a grande diversidade de ligações e ramificações que unem uma ampla gama de hexoses e pentoses na estrutura de polissacarídeos complexos (Somerville et al. 2010; Buckeridge and De Souza 2014). Entender a síntese e a desmontagem da parede celular da cana-de-açúcar e, sobretudo, sua estrutura, também pode ajudar a manipular e efetivamente degradar esses polímeros até açúcares fermentáveis e obter todo potencial energético, minimizando os custos de produção e/ou ampliando a gama de matérias-primas possíveis desse combustível (Vogel 2008; Leite et al. 2017).

2.4 Parede celular da cana-de-açúcar

Os carboidratos possuem diversas funções fisiológicas nas plantas, dentre elas, o controle do crescimento através dos balanços das fontes de carbono e energia, defesa contra o ataque de patógenos, sinalização, resistência mecânica e interações com o ambiente (Zagrobelny et al. 2004; Parre and Geitmann 2005; Wingler et al. 2006). Estas funções envolvem uma grande diversidade de enzimas que estão responsáveis pela síntese (glicosiltransferases), modificação (carboidrato esterases) e degradação (glicosil hidrolases e polissacarídeo liases) (Minic 2008).

O primeiro genoma completo de planta descrito foi o de *Arabidopsis thaliana* e a análise das sequências sugerem que as enzimas que agem em carboidratos podem ser muito mais abundantes do que nas espécies não-vegetais (Henrissat et al. 2001). E atualmente, com estudos mais recentes e específicos, ainda é possível afirmar que as plantas têm consideravelmente mais genes codificando enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos do que outros grupos taxonômicos (Davies et al. 2005; Geisler-Lee et al. 2006). Mesmo com este reservatório de glicosil hidrolases excepcionalmente grande e estruturalmente diverso, sabe-se relativamente pouco sobre sua enzimologia e muito menos sobre suas estruturas (Lopez-Casado et al. 2008).

As propriedades de cada polissacarídeo, suas proporções relativas e as inter-relações entre eles são aspectos relevantes a compor a complexidade da parede

celular, o que resulta em um agregado de moléculas bastante resistente à desmontagem. A parede celular da cana-de-açúcar é um composto de microfibrilas de celulose que interagem entre si formando macrofibrilas, que ficam embebidas em uma matriz de pectinas e β-glucano (Buckeridge et al. 2015). Proporcionalmente, os valores aproximados de carboidratos estruturais em colmos e folhas da cana-de-açúcar são: 30% de celulose, 50% de hemicelulose e 2-10% de pectinas (De Souza et al. 2013b). A arquitetura e as proporções de carboidratos caracterizam a parede celular da cana-de-açúcar como do tipo II, que contém arabinoxilano como a principal hemicelulose e possui valores relativamente baixos de pectina (Vogel 2008; Mohnen 2008; De Souza et al. 2013b). Apesar da baixa proporção, as pectinas estão possivelmente ligadas à lignina em cana-de-açúcar e *Miscanthus sinensis*, tendo grande interferência na recalcitrância e dificultando o processo de hidrólise (De Souza et al. 2013b; De Souza et al. 2015).

2.5 Substâncias pécticas

As pectinas são macromoléculas glicosídicas encontradas principalmente na lamela média e junções celulares das plantas. A Sociedade Americana de Química (*American Chemical Society*) classificou as substâncias pécticas em: (a) Ácido péctico: que são substâncias pécticas compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxila estão essencialmente livres de grupos metil éster e seus sais são pectatos neutros ou ácidos; (b) Ácido pectínico: formado por um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico coloidal com poucos grupos metil éster e (c) Protopectina: é a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais (por exemplo o cálcio) e, em condições de hidrólise restrita, produzem ácidos pectínicos ou pectina. Possui a maior parte dos seus grupos carboxílicos esterificados sendo a única substância péctica insolúvel em água (Sakai et al. 1993; Kashyap et al. 2001).

Um dos principais compostos da classe das pectinas é um polissacarídeo de alto peso molecular formado por ácido galacturônico unidos por ligações α-1,4 e pode ser classificado em diferentes domínios de acordo com a estrutura e grau de ramificação com outras moléculas. O homogalacturonano (HG) é a pectina mais abundante, consistindo em um polímero linear atingindo até 100 resíduos de comprimento. O HG, que pode ser metilado e/ou acetilado, contabiliza cerca de 65%

da pectina em alguns sistemas (Mohnen 2008; Babu and Bayer 2014). As demais pectinas são estruturalmente mais complexas e incluem os ramnogalacturonanos I e II (RG-I e II), produto da alternância de resíduos de ácido galacturônico e ramnose na cadeia principal, com ramificações por polímeros de cadeia relativamente curta que podem ser principalmente arabinanos e galactanos ou em ocorrências específicas, podem conter xilogalacturonanos (XGA) e apiogalacturonanos (AP).

Pectinas com alto grau de metilação são chamadas pectinas HM (High-methoxyl) e têm poder de geleificação na presença de açúcares e ácidos, enquanto que pectinas com baixo grau de metilação são chamadas LM (Low-methoxyl) e podem apresentar geleificação na ausência de açúcares e na presença de alguns íons metálicos, principalmente o cálcio. Esta geleificação ocorre pela formação de zonas de junção entre o homogalacturonano de diferentes cadeias, formando uma estrutura denominada “egg box” (caixas de ovos) (Sakai et al. 1993; Fernández-González et al. 2004; Sharma et al. 2006).

As enzimas com atividade de poligalacturonase hidrolisam as ligações glicosídicas de pectinas com baixo grau de metilação (LM). As enzimas pectina e pectatoliases rompem as ligações glicosídicas das pectinas HM e LM, respectivamente, por um mecanismo de β-eliminação (Kravtchenko et al. 1993).

O grau de esterificação ou acetilação também varia de acordo com a origem da substância péctica, podendo influenciar diretamente na eficiência da hidrólise. Por exemplo, em maçãs encontram-se 71% de esterificação e 4% de acetilação, em beterraba a pectina pode estar até 55% esterificada e 20% acetilada, em batata o grau de esterificação chega a 31% e de acetilação até 14% (Voragen et al. 1986).

2.6 Pectinases

As pectinas compreendem uma classe de polímeros cuja síntese e degradação requer um complexo arranjo de enzimas. A síntese desse polissacarídeo pode envolver 67 enzimas diferentes, incluindo várias glicosil transferases, metiltransferases e acetiltransferases. O alto nível de complexidade estrutural implica a necessidade de diferentes enzimas para degradar estes polissacarídeos (Jayani et al. 2005; Mohnen 2008). A hidrólise desse carboidrato é muito importante no processo de desmontagem da parede celular porque pode influenciar diretamente na

acessibilidade das enzimas durante o processo de hidrólise enzimática. Isso é verdade na medida que sua presença pode impedir o acesso à celulose e/ou hemicelulose, bloqueando o acesso das enzimas responsáveis pela degradação dos outros componentes da parede celular (Marcus et al. 2008). Isto porque as pectinas são os principais compostos determinantes da porosidade da parede celular (Buckeridge et al., 2015).

De forma geral, as pectinases podem ser classificadas como ácidas ou alcalinas (Kashyap et al. 2001). As pectinases ácidas geralmente são produzidas por fungos, especificamente pela espécie *Aspergillus niger*, enquanto as alcalinas geralmente são produzidas por bactérias, geralmente do gênero *Bacillus* sp. Esta diferença resulta nas condições utilizadas nos processos industriais (Alimardani-Theuil et al. 2011). Pectinases também podem ser classificadas pelo modo de ação, preferência pelo substrato e produto gerado após a reação enzimática. Dentre as principais, estão:

- Pectina metil esterase (PE/PME) (EC 3.1.1.11) – Promovem a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, produzindo metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado).

- Pectina acetil esterase (PAE) (EC 3.1.1.6) – Promovem a desesterificação dos grupos acetil da pectina, produzindo acetato e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado).

- Endopoligalacturonase (EndoPG) (EC 3.2.1.15) – Catalisa a hidrólise do poligalacturonano desramificado, nas regiões internas, produzindo oligogalacturonanos.

- Exopoligalacturonase (ExoPG) (EC 3.2.1.67) – Catalisa a hidrólise do poligalacturonano desramificado, a partir da extremidade não redutora, produzindo monogalacturonanos.

- Exo-poli-α-galacturonosidase (EC 3.2.1.82) – Catalisa a hidrólise do poligalacturonano desramificado, a partir da extremidade não redutora, produzindo digalacturonanos.

- Endopectatoliase (EndoPaL) (EC 4.2.2.2) – Atua no poligalacturonano desramificado por transeliminação nas regiões internas, produzindo oligogalacturonatos insaturados. Requer Ca^{2+}.

- Exopectatoliase (ExoPaL) (EC 4.2.2.9) – Atua no poligalacturonano desramificado por transeliminação nas regiões terminais a partir da extremidade não redutora, produzindo digalacturonanos insaturados. Requer Ca^{2+}.

- Endopectinaliases (EndoPL) ou Pectinaliase (PL) (EC 4.2.2.10) – Atua na pectina por β-eliminação, entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados, sem absorção de água, produzindo oligogalacturonanos metilados insaturados.

- Protopectinases (PPase) – Estas enzimas solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada. Com base nas suas aplicações, são principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina e, protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares. Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina.

De modo geral, as hidrolases incorporam a molécula de água através de catálise ácida durante a quebra da ligação glicosídica entre duas unidades de sacarídeos. Por outro lado, as liases quebram a ligação glicosídica através de uma reação de β-eliminação que remove um próton, resultando em uma ligação insaturada entre o C4 e C5 da unidade sacarídica no final não-redutor.

Existem atualmente 112 famílias de glicosil hidrolases descritas em um banco de dados chamado CAZypedia (http://www.cazypedia.org). Nesse banco, a classificação das enzimas é baseada nas semelhanças na sequência de aminoácidos fundamentada pela relação direta entre a sequência e o dobramento.

A família GH28 é composta de enzimas com atividade de poligalacturonase e estão amplamente distribuídas na natureza (Hadfield and Bennett 1998). São produzidas por diferentes organismos como bactérias, fungos filamentosos, plantas, leveduras, insetos, nematoides entre outros. Entretanto, apesar desta grande diversidade, a maioria dos trabalhos com estas enzimas representa enzimas produzidas por fungos e bactérias (Sticklen 2008). Em palha de milho, foi observado o sinergismo entre enzimas de plantas e fungos. Han & Chen (2011) verificaram que houve incremento no acúmulo de glicose (60%) e na produção de etanol (63%)

quando foram adicionadas GHs de plantas a uma mistura que só continha celulases produzidas *Trichoderma reesei*.

Poligalacturonases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α-(1,4) entre duas unidades de ácido galacturônico não esterificadas. Considerando a atividade de hidrólise destas enzimas, estas podem ser classificadas como endo-poligalacturonases (endoPG; EC 3.2.1.15) ou exo-poligalacturonases (exoPG; EC 3.2.1.67). Os prefixos Endo e Exo denominam se a clivagem se dá em ligações internas ou terminais, respectivamente, podendo ser encontradas no ambiente extracelular e no periplasma. Enzimas com atividade de endopoligalacturonases podem degradar formas altamente polimerizadas presentes na parede celular vegetal, enquanto as enzimas com atividade exopoligalacturonase podem ser mais eficientes na produção de pequenos oligogalacturonídeos que se acumulam no periplasma (Abbott and Boraston 2008). Além disso, devido às suas importantes características associadas à hidrólise da pectina, diminuindo a adesão celular e aumentando a porosidade da parede celular vegetal, podem ser aplicadas junto ao coquetel enzimático comercial para aumentar o rendimento da produção de etanol, representando um importante papel para bioenergia (Latarullo et al. 2016).

O fungo *Aspergillus niger* é o mais explorado para produção de enzimas pectinolíticas. Esta espécie é capaz de produzir diversos tipos de pectinases (Pectinametilesterase, Poligalacturonase e Pectina Liase) (Jia and Wheals 2000). Foram descritos sete tipos de endopoligalacturonases produzidas por este fungo (Tipo I, II, A, B, C, D e E). Uma característica enzimática que pode diferenciá-las é o comportamento processivo nos tipos I, A, C e D. Enzimas processivas não liberam o substrato após a reação de hidrólise, continuando a atividade no próximo sítio (Pouderoyen et al. 2003).

Portanto, a presença de pectinases em tecidos vegetais parece ser relevante para os primeiros passos da degradação da parede celular. O uso destas enzimas para bioenergia poderia favorecer não apenas os processos de etanol 2G, mas também os de 1G. Ao reduzir a rigidez da parede celular com estas enzimas, as células se tornariam mais susceptíveis ao rompimento, reduzindo significativamente a energia necessária para extrair a sacarose (Tavares 2015).

Considerando que as funções biológicas das endopoligalacturonases das plantas são razoavelmente bem descritas, caracterizações similares sobre as EPGs

de fungos não envolvem os mesmos aspectos funcionais abordados nas plantas. No caso dos fungos, o papel biológico destas enzimas parecem ser ou de obtenção de substrato para o crescimento ou de ganho de acesso ao citoplasma das células vegetais. Assim como as EPGs de plantas, as de fungos não são bem caracterizadas em relação à suas atividades bioquímicas sobre uma grande variedade de substratos (Lopez-Casado et al. 2008).

Desta forma, todos os esforços para a prospecção de enzimas têm um alto valor para a bioenergia, oferecendo novas alternativas para criar coquetéis enzimáticos e complementar os já existentes. As pesquisas em EPGs de plantas desempenham um papel importante sobre os seus papeis em diferentes processos fisiológicos, nos quais a parede celular é modificada e/ou hidrolisada. Ainda assim, os dados disponíveis na literatura ainda não permitem preencher as lacunas sobre como as EPGs vegetais atuam sobre os carboidratos da matéria-prima de bioenergia (Latarullo et al. 2016).

2.7 Emprego industrial de pectinases

Graças ao aumento da demanda pela substituição dos processos químicos tradicionais e com o avanço da biotecnologia, enzimas começaram a ser amplamente utilizadas em indústrias. Enzimas com ação de pectinases, xilanases e celulases possuem grande valor econômico e ambiental (Pakarinen et al. 2012). Em 2010, o comércio e a aplicação de enzimas movimentaram cerca de US$ 3,6 bilhões no mundo todo (Dewan 2014). Somente para o mercado de alimentos e bebidas houve movimentação de US$ 1,2 bilhão em 2010 na produção de enzimas, sendo que as pectinases equivaliam a aproximadamente 10% da produção total (Mukesh Kumar et al. 2012).

Pectinases foram as primeiras enzimas a serem utilizadas na indústria para a preparação de vinhos e sucos em meados de 1930, mas só a partir de 1960 iniciou-se a utilização destas enzimas para outras aplicações industriais (Meneses 2007). Uma forma de reduzir os custos de produção de enzimas seria através da utilização das enzimas presentes nos resíduos agroindustriais gerados na produção de sucos, vinhos e alguns alimentos à base de vegetais como substratos indutores para a produção de pectinases. Dessa maneira, os custos de produção dessas enzimas

diminuem e, de certa forma, o processo pode se retroalimentar, aumentando a sustentabilidade econômica (Kaur et al. 2004).

Atualmente, na indústria, melhorias no processo e redução de custos são extremamente importantes, e a pesquisa é dirigida para a descoberta de enzimas que sejam mais robustas com respeito aos parâmetros de funcionamento enzimático, como pH, temperatura e termoestabilidade (Ahlawat et al. 2008). Os principais organismos produtores de pectinases utilizadas industrialmente são bactérias, fungos e leveduras. Entre eles, os principais gêneros envolvidos são: *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Aspergillus*, *Alkaliflexus*, *Natronoflexus* e *Natranaerovirga* (Mei et al. 2013). Dentre esses grupos, a pectinase de *Bacillus halodurans* expressa em *E. coli* apresentou características importantes como termoestabilidade em altas temperaturas, conferindo uma longa meia-vida e tornando-a potencialmente viável em processos industriais.

2.7.1 Indústria têxtil

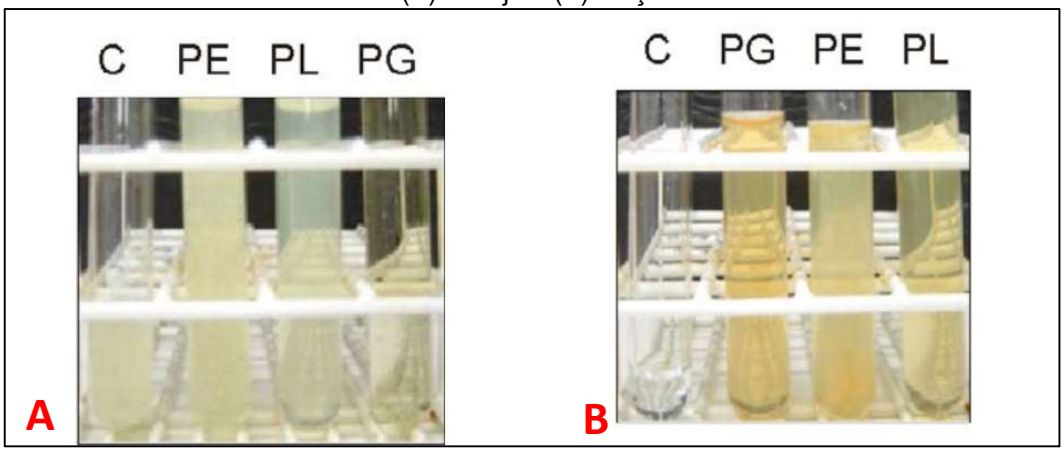
Fibras de plantas como algodão, juta, fibra de coco, linho, cânhamo, rami e banana, são usadas como matéria-prima para a indústria têxtil. As enzimas pectinolíticas podem ser usadas na indústrias têxtil para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, para a etapa de processamento (Esfandiari et al. 2007; Kalantzi et al. 2010; Garg et al. 2016). Estas pectinases, em conjunto com outras enzimas, removem os resíduos de pectina e cera do produto de forma mais segura, evitando o alto consumo de energia e os graves problemas de poluição associados à limpeza alcalina convencional com soda cáustica. Este bio-processamento ocorre sem promover efeitos negativos na celulose, mantendo a qualidade do material para o posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia (Hoondal et al. 2002; Agrawal et al. 2007).

2.7.2 Pectinases na extração de suco de frutas

A principal aplicação de pectinases na indústria é na extração e clarificação de sucos de frutas. O uso de enzimas de maceração aumenta o rendimento da extração e melhora o processamento dos sucos. Essas enzimas são utilizadas após o corte da matéria-prima, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes da fruta (Bhat 2000). Como exemplo, extratos fúngicos com diferentes tipos de

pectinases (PG - poligalacturonase, PL - pectinaliase e PE - pectinaesterase) foram empregados no processo de extração de suco de laranja (Figura 1-A) e maçã (Figura 1-B). Pode-se observar um aumento do rendimento de extração de sucos em relação ao controle (tubos C) e clarificação deles, principalmente quando PG é utilizada. Observa-se também que no tubo controle (C) de maçã, visualiza-se somente uma pequena quantidade de tampão, o que comprova a eficiência do uso de pectinases no processo de extração de sucos de frutas.

Figura 1 - Uso de extratos fúngicos com diferentes atividades de pectinases na extração de sucos de (A) laranja e (B) maçã



Legenda: C = Controle; PE = Extrato contendo maior atividade de pectinesterase; PL = Extrato contendo maior atividade de pectinaliase e PG = extrato contendo maior atividade de poligalacturonase. Fonte: (Santi et al. 1999).

2.7.3 Extração de óleos essenciais e vegetais

Óleos vegetais como o de oliva, girassol, coco, palma ou canola e óleos cítricos como o de limão são geralmente obtidos pela extração com solventes orgânicos como hexano, que é um potencial carcinogênico. Atualmente, o uso de coquetéis enzimáticos contendo celulases, hemicelulases e pectinases resulta em uma máxima extração do óleo pois atuam nas propriedades emulsificantes da pectina que interferem na coleta do óleo da casca aumentando não só o rendimento como o a qualidade do produto pelo aumento do conteúdo polifenólico e vitamina E (Kashyap et al. 2001; Hoondal et al. 2002; Iconomou et al. 2010).

Desta forma, a aplicação de pectinases no processo de extração de óleos, hidrolisa os complexos de pectina-proteína, liberando mais óleo, aumentando o rendimento final, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a qualidade do produto final (Kashyap et al. 2001; Jayani et al. 2005).

2.7.4 Processamento de bebidas alcoólicas

Na indústria de vinhos, as pectinases estão relacionadas com a elaboração e obtenção de vinhos finos e de maior qualidade. Essas enzimas são adicionadas durante o processo de esmagamento das uvas ou no mosto de vinho, maximizando o rendimento do processo de extração, além de ser um facilitador no processo de filtração, contribuindo para a redução do tempo de clarificação e intensificando o sabor e a cor (Chaudhri and Suneetha 2012). Quando essas enzimas são adicionadas durante a maceração das uvas tintas, o procedimento resulta no melhoramento de características visuais, como cor e turbidez, melhor estabilidade e redução do tempo de filtração quando comparadas com vinhos não tratados enzimaticamente (Revilla and Gonzalez-San Jose 2003; Jayani et al. 2005).

2.7.5 Processamento de chá e café

Na indústria do café, a fermentação está relacionada à reação microbiana de leveduras e bactérias que destroem os açúcares da mucilagem, a camada externa. Enzimas pectinolíticas podem ser utilizadas na fermentação do café para remover o revestimento mucilaginoso. Este é principalmente constituído de três quartos de substâncias pécticas, que a ele conferem uma textura gelatinosa e viscosa. A degradação dessas substâncias por pectinases contribui para a qualidade do grão de café (Murthy and Naidu 2011).

A levedura *Pichia kluyveri* produz uma poligalacturonase que apresenta uma melhor atividade nas mesmas condições de fermentação do café e pode ser utilizada nas etapas iniciais do processo, promovendo a degradação da mucilagem. Além disso, esta levedura possui a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Aspergillus ochraceus* e consequentemente a produção da micotoxina Ocratoxina A (OTA) (Masoud and Jespersen 2006).

A aplicação de enzimas que atuam na hidrólise das paredes celulares das folhas de chá resulta na completa maceração das células e, consequentemente, um aumento nos compostos fenólicos do chá que pode melhorar sua qualidade e valor terapêutico (Thakur and Gupta 2012). No processamento, o tratamento com pectinases acelera a oxidação e destrói a espuma formada nos pós de chás instantâneos. A mudança na cor do chá durante a oxidação também resulta no desenvolvimento do aroma (Carr 1985; Barage et al. 2013).

2.7.6 Alimentação animal

A alimentação de ruminantes pode ser suplementada por coquetéis enzimáticos que contém xilanases, pectinases e celulases. O papel das pectinases em um coquetel enzimático é reduzir a viscosidade do alimento e aumentar a absorção dos nutrientes pela hidrólise de fibras não biodegradáveis ou por liberar nutrientes presos nestas fibras (Hoondal et al. 2002; Barage et al. 2013).

2.7.7 Sacarificação de produtos agrícolas

Diferentes enzimas como pectinases, hemicelulases e celulases são usualmente utilizadas para converter os polissacarídeos presentes na parede celular da planta em monossacarídeos. Atualmente, pectinases são utilizadas em biorefinarias por hidrolisar a pectina presente em resíduos agroindustriais ricos em nesse carboidrato, como os resíduos cítricos, aumentando a extração de açúcares e consequentemente aumentando o rendimento da produção (Biz et al. 2014). Além disso, a partir da hidrólise da pectina são recuperados diferentes monossacarídeos, dentre eles a galactose e a xilose. Por meio da utilização de microrganismos capazes de fermentá-los, esses açúcares podem ser empregados na produção de etanol, ácido acético e ácido láctico (Mohnen 2008; Zanella 2013; Seyfried et al. 2016).

Devido ao papel das pectinas na porosidade da parede celular e na adesão celular, a utilização de pectinases pode promover uma maior liberação de açúcares fermentáveis, por meio da redução da recalcitrância, com consequente aumento na produção de etanol de primeira e segunda geração (Latarullo et al. 2016). Estudos envolvendo o uso de pectinases na planta lentilha d'água (*Landoltia punctata*) demonstrou a eficiência da extração de açúcares após o tratamento enzimático com pectinases, apresentando um aumento de 142% de glicose quando comparado com o não tratado (Chen et al. 2012).

2.8 Produção de pectinases heterólogas

Conforme mencionado, preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngica, geralmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, mas também podem ser dos gêneros *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Monilia*, *Coniothyrium* e *Rhizopus* (Geocze 1994; Castilho et al. 2000). Apesar das propriedades destes fungos como bons produtores de pectinases, nem todos podem ser amplamente empregados

no contexto da biotecnologia, pois alguns deles são produtores de diferentes micotoxinas (Dalbøge 1997).

Xiao et al. (2008) caracterizaram cinco pectatoliases (PL) e duas poligalacturonases (PG) de *Xanthomonas campestris* e *Streptomyces coelicolor*, expressas em *E. coli*. Das sete sequências selecionadas, somente uma não apresentou atividade enzimática. Entretanto, uma das poligalacturonases heterólogas apresentou uma eficiência catalítica 40-140 vezes menor do que outras poligalacturonases caracterizadas, sugerindo que a expressão heteróloga pode não refletir o mesmo comportamento da enzima nativa.

2.9 Sistema de expressão heteróloga

A produção de proteínas recombinantes purificadas e caracterizadas tornou-se uma tarefa fundamental para a indústria (Schmidt 2004). Em termos de eficiência, os sistemas de expressão oferecem diferentes características para a produção de proteínas recombinantes. Sistemas bacterianos ainda são os mais atrativos graças ao baixo custo, alta produtividade, rápida produção e extensa informação na literatura. Dentre os organismos mais estudados, *Escherichia coli* é de longe o mais explorado para expressão de proteínas heterólogas seguido de Bacilos gram-positivos (Terpe 2006).

Além de bactérias, leveduras também são amplamente utilizadas pois oferecem as mesmas vantagens dos sistemas procariotos (a velocidade de crescimento, fácil manipulação genética, baixo custo, alta produtividade) e também oferece algumas vantagens dos sistemas eucarióticos. Dentre as vantagens está o potencial de realizar muitas modificações pós-transcricionais tipicamente associadas com eucariotos superiores, como o processamento de sequências sinal, dobramentos, formação de pontes dissulfeto, adição de certos tipos de lipídios e sistemas de secreção. Os gêneros mais utilizados são: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* e *Yarrowia*. As principais desvantagens deste sistema são as hiper-glicosilações que podem ocorrer e o modo de respiração fermentativa, que resulta em um crescimento mais lento e, consequentemente, menor rendimento (Juturu and Wu 2018).

A levedura *Pichia pastoris* é metilotrófica (pode usar metanol como fonte de carbono) e passou a ser muito utilizada em biotecnologia especialmente para

produção de proteínas recombinantes na produção de biofármacos e enzimas industriais. Esta levedura foi introduzida há mais de 40 anos pela empresa “Phillips Petroleum” para produção comercial de proteínas para alimentação industrial baseado no processo de fermentação utilizando metanol como fonte de carbono. Entretanto, a crise do petróleo em 1973 resultou no aumento drástico do preço do metanol e tornou esta produção inviável (Ahmad et al. 2014).

A principal vantagem de utilizar a levedura *P. pastoris* se deve ao fato de que esta levedura secreta baixos níveis de proteínas endógenas. Logo, as proteínas recombinantes secretadas constituem a vasta maioria do total de proteína no meio. Sendo assim, o direcionamento da proteína recombinante para o meio extracelular pode servir como uma vantagem para o processo de purificação. Para que o direcionamento das proteínas recombinantes ocorra, a sequência codificadora das proteínas é geralmente fundida com o peptídeo-sinal do fator de secreção alfa (α-MF) de *S. cerevisiae* (Lin-Cereghino et al. 2013).

Além disso, esta levedura é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura (15 a 30˚C) e possui relativa tolerância a variação de pH (3.0 a 7.0) (Macauley-Patrick et al. 2005). As condições de crescimento de *P. pastoris* são ideais para produção em larga escala porque os componentes do meio são baratos e definidos, consistindo de fontes puras de carbono, biotina, sais e água. O baixo pH do meio e a presença do metanol dificultam a contaminação por outros microrganismos (Cereghino and Cregg 2000).

Outro aspecto positivo é que o nível de transcrição, que responde ao promotor do gene AOX1, pode ser 3-5 vezes maior em células crescendo em metanol. Este promotor fortemente induzido é comumente utilizado para expressão de proteínas recombinantes. As principais vantagens de utilizá-lo são: 1) A expressão de proteínas heterólogas reguladas por este promotor sofre forte influência de mecanismos de repressão e desrepressão; 2) É possível alcançar altos níveis de produção da proteína heteróloga; 3) repressão do gene AOX1 pela maioria das fontes de carbono, exceto o metanol, garantindo um alto crescimento celular antes da indução; e 4) a indução ocorre facilmente pela simples adição de metanol. Por outro lado, as principais desvantagens são: 1) a dificuldade em monitorar a concentração de metanol durante a fermentação; 2) metanol é altamente inflamável e tóxico, o que dificultaria a produção em grande escala; e 3) o uso de duas fontes de carbono gera a dificuldade

de mudar a cultura da fase de crescimento (com glicerol) para o outro meio de cultura de indução (com metanol) (Juturu and Wu 2018).

A enzima álcool oxidase (AOX), codificada pelos genes AOX1 e 2, é responsável pela metabolização do metanol, sendo maior a contribuição de AOX1 nessa atividade (Ellis et al. 1985). As primeiras reações do metabolismo de metanol para obtenção de energia ocorrem no peroxissomo e depois continuam no citoplasma. Esta enzima oxida o metanol a formaldeído, e posteriormente a peróxido de hidrogênio, que então é degradado a oxigênio e água. Uma parte do formaldeído deixa o peroxissomo e vai para o citoplasma, onde é oxidado a formato e carbono (Cereghino and Cregg 2000).

A levedura *Pichia pastoris* pode apresentar diferentes fenótipos associados ao metabolismo de metanol. Linhagens que apresentam o gene AOX1 intacto (responsável por até 85% da utilização do metanol) tem fenótipo Mut^{+} (*methanol utilization plus*) e apresentam taxa de crescimento no metanol igual à linhagem selvagem. A linhagem com o gene AOX1 interrompido ou deletado utiliza somente o gene AOX2 (que possui menor contribuição sobre a metabolização do metanol) apresenta o fenótipo Mut^{S} (*methanol utilization slow*) e tem o crescimento mais lento com metanol como fonte de carbono. A linhagem com os genes AOX1 e AOX2 interrompidos ou deletados apresenta o fenótipo Mut^{-} sendo incapaz de crescer em meio com metanol como fonte única de carbono (Cereghino and Cregg 2000; Inan and Meagher 2001).

Com base nas informações descritas acima, é plausível pensar que a levedura *Pichia pastoris* pode representar um meio otimizado de produção de enzimas de interesse biotecnológico, haja vista a capacidade de produzir e secretar grandes quantidades de proteína heteróloga, dispensando, a princípio, a necessidade de purificação.

2.10 Modificações endógenas nas paredes celulares pelas plantas: o exemplo do aerênquima

A busca de enzimas para aplicações industriais tem sido feita em sua maioria em microrganismos. Fungos e bactérias, por exemplo, produzem um grande número de hidrolases que utilizam para decompor a biomassa vegetal. Para dar conta da

degradação da biomassa existente naturalmente, há grande variedade de microrganismos, cada um com sua especificidade. Há também um grande número de espécies que atacam células vegetais como patógenos e nestes casos, para ter acesso aos tecidos vegetais, têm que produzir hidrolases. Além da relativa simplicidade dos microrganismos, o que permite dominar seu crescimento e cultura, recentemente tem sido e mais rápido e eficiente o sequenciamento de seus genomas e obter sequencias completas de genes de hidrolases que podem ser expressas heterólogamente.

Nas plantas, há uma série de mecanismos endógenos em que paredes celulares são completamente degradadas (Buckeridge 2010) ou modificadas (Leite et al. 2017). Grandis et al. (2014) e posteriormente Tavares et al. (2015) revisaram a literatura para fenômenos em que paredes celulares vegetais são degradadas/modificadas. Tais fenômenos ocorrem durante a mobilização de reservas, amadurecimento de frutos, abscisão foliar, entre outros.

No caso da cana de açúcar, uma investigação do processo de senescência foliar demonstrou que as paredes celulares das folhas não sofrem alterações significativas (Martins et al. 2016).

Por outro lado, havia anteriormente a menção, por Grandis (2014) de que a formação do aerênquima nas raízes de cana-de-açúcar se mostrava como um mecanismo promissor para a busca de um processo na própria planta que fosse capaz de modificar a parede celular usando enzimas.

De fato, uma das situações em que a planta pode produzir pectinases é durante a formação do aerênquima. O aerênquima ocorre em várias espécies de plantas e é um tecido que possui grandes espaços de ar, utilizado principalmente para o transporte de gases (Evans 2004). O aerênquima pode ser formado de dois diferentes modos, um deles é o processo esquizógeno onde ocorre pela separação celular, e o outro é o lisígeno, que evolve o processo de morte celular programada. A cana-de-açúcar apresenta a formação de aerênquima lisígeno de forma constitutiva, ou seja, forma o aerênquima nas raízes independente de fatores externos. Entretanto a formação do aerênquima também pode ser influenciada por estresses ambientais como alagamento e estresse nutricional (Tavares et al. submetido).

Estudos realizados por Leite et al. (2017) em cana-de-açúcar mostraram a formação do aerênquima constitutivo em 40% do córtex radicular mesmo sem nenhum fator ambiental associado. Durante a formação do aerênquima foi observado decréscimo nos níveis de homogalacturonano, concomitante com o aumento dos níveis de transcrito que codifica para uma EPG. Um gene denominado scEPG1 teve seus alelos completamente sequenciados, sugerindo um potencial para aplicações relacionadas à bioenergia na cana-de-açúcar (Tavares et al., submetido).

A prevalência do poligalacturonano na lamela média (verificada em cana-de-açúcar por Leite et al., 2017) na região da lamela média (região onde duas células adjacentes estão em contato) sugere que este constitua um ponto chave para a adesão celular, podendo seu decréscimo levar à redução da adesão, expondo mais as células para que outras enzimas atuem na degradação dos diferentes carboidratos de parede (Atkinson et al. 2002).

De fato, a superexpressão de uma poligalacturonase em maçãs transgênicas resultou em fenótipo de folhas acinzentadas e queda prematura das folhas causadas pela redução da adesão celular nas zonas de abscisão (Atkinson et al. 2002). Nesse sentido, a caracterização da enzima codificada por scEPG1 de cana-de-açúcar, possível responsável pelo efeito de redução de adesão celular e afrouxamento do tecido quando produzida em sistema nativo (Leite et al., 2017), poderia ter um bom potencial para aplicações em bioenergia e também para outras aplicações industriais.

3. JUSTIFICATIVA

A produção comercial de etanol requer uma solução integrada que combine cultivos apropriados, técnicas de modificação de biomassa e engenharia de processos. A aplicação de avanços recentes na engenharia genética de plantas, química de carboidratos e melhor conhecimento da estrutura da parede celular da planta focado na reengenharia das paredes celulares pode ajudar na redução dos custos de sacarificação e conversão da biomassa, aumentando significativamente o rendimento da produção de biocombustível. Considerando a relevância de pectinases para a bioenergia juntamente com o efeito sobre o afrouxamento do tecido operado pela endopoligalacturonase 1 de cana-de-açúcar, o gene scEPG1 desta planta foi clonado e expresso em *Pichia pastoris*, com posterior caracterização do produto heterólogo.

4. OBJETIVOS

- Obter o plasmídeo contendo o vetor pPICZαA + gene scEPG1
- Integrar a construção do plasmídeo no genoma de *Pichia pastoris* X33
- Produzir a scEPG1 extracelular ativa.
- Otimizar o protocolo de expressão da enzima alterando fatores como temperatura, rotação e concentração final de metanol
- Determinar os parâmetros enzimáticos da scEPG1 sobre temperatura, termoestabilidade, pH e efeito de interferentes.
- Adicionar a scEPG1 ao coquetel enzimático comercial e avaliar se há aumento na sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material Biológico

5.1.1 Linhagens utilizadas para clonagem

A partir da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 (*Saccharum* spp), foi obtida a sequência da EPG (ScEPG1-SHCRBa_028_C15) presente no BAC SHCRBa_028_C15 e descrita na tese de doutorado da Dra. Eveline Tavares (Tavares 2015). Esta sequência foi utilizada como molde para o desenho do gene sintético da scEPG1 que foi recebido como inserto no vetor pUC57.

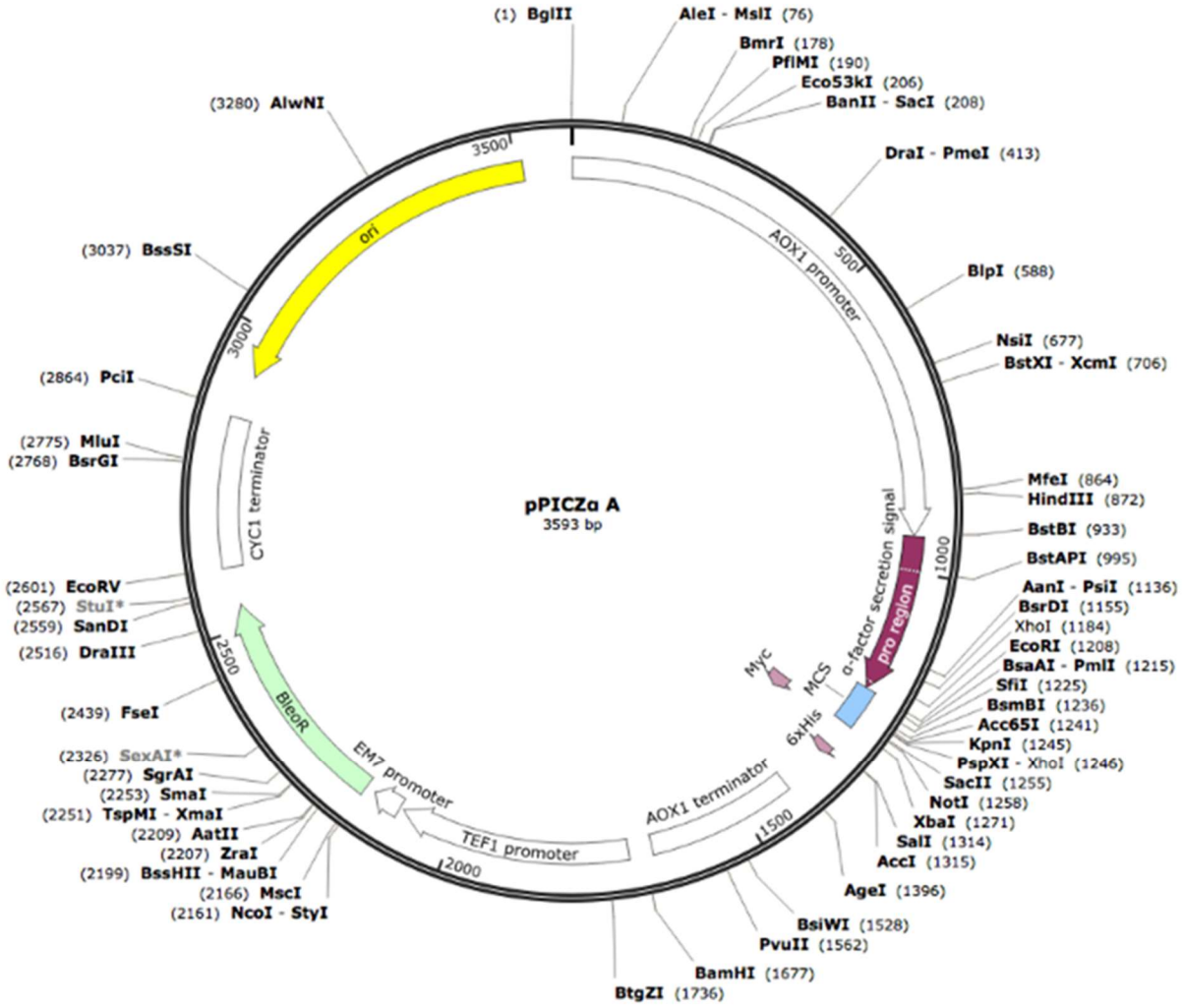
5.1.2 Sistema de clonagem e linhagem hospedeira

As linhagens escolhidas para a expressão da enzima heteróloga foram a levedura *Pichia pastoris* X33 (*Wild-Type*) para produção da enzima e a bactéria *Escherichia coli* DH10B foi utilizada como célula hospedeira da construção vetor + inserto. Estas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Richard Ward do IQ/USP Ribeirão Preto.

5.1.3 Vetor de expressão

O vetor escolhido para a clonagem em ambos hospedeiros é o plasmídeo pPICZαA (Invitrogen). Esse plasmídeo de 3,6 kb possui como marcador de seleção o gene “Sh ble” que confere resistência ao antibiótico Zeocina™ (Invitrogen) em *E. coli* e *Pichia pastoris*. O promotor do gene AOX1 (álcool oxidase 1) é fortemente induzido durante o crescimento das células em metanol. Além disso, o vetor possui a sequência do fator-α de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica para o peptídeo sinal para direcionamento da proteína recombinante para o meio extracelular. Por fim no vetor também está presente uma cauda de histidina na região C-terminal para purificação da proteína recombinante. O mapa do vetor com as indicações das regiões principais pode ser encontrado na Figura 2.

Figura 2 - Mapa do vetor pPICZαA



Legenda: Este vetor possui a origem de replicação em *E. coli* (ori), o fragmento contendo o promotor AOX1, o fator de término de transcrição AOX1, sinal de secreção do fator alfa de acasalamento de S. cerevisiae, marca de resistência ao antibiótico zeocina (BleoR) com o comando dos promotores TEF1 (para a expressão em levedura) e EM7 (para a expressão em bactéria), região de sítios múltiplos de clonagem (MCS), o fator de término de transcrição de S. cerevisiae (CYC1), a cauda de epítopo myc e a cauda com resíduos de histidina para purificação (6xHis). Fonte: Invitrogen.

5.2 Amplificação da região codificante (CDS) da scEPG1 de *Saccharum* sp. para clonagem

5.2.1 Obtenção do DNA sintético

O gene da scEPG1 de cana-de-açúcar foi sintetizado comercialmente pela empresa “FastBio” clonados no vetor pUC57. Esse material foi ressuspendido em água MilliQ estéril, sua concentração foi avaliada por espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific) e seu tamanho confirmado por eletroforese em gel de agarose e armazenado a -20ºC.

5.2.2 Preparação de bactérias E. coli DH10B eletrocompetentes

Uma colônia isolada da bactéria E. coli DH10B foi inoculada por 16 h, a 37°C sob agitação de 200 rpm, em meio LB líquido. Posteriormente, o pré-inóculo foi diluído 1:100 em meio SOB (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 250 mM, MgCl2 1M) e mantido a 200 rpm e a 37°C até atingir a densidade óptica (OD_{600}) de aproximadamente 0,5-0,6. A cultura foi centrifugada a 5000 x g, por 10 min a 4°C e as células foram lavadas duas vezes com igual volume de Glicerol 10% gelado. A cultura foi centrifugada novamente e o precipitado ressuspendido em glicerol 10% gelado. Alíquotas de 50 µL foram separadas e imediatamente armazenadas a -80 °C para serem usadas nas transformações por eletroporação.

5.2.3 Transformação em E. coli DH10B eletrocompetente

A fim de armazenar e obter o DNA plasmidial, a construção vetor pUC57 + inserto da scEPG1 de cana foi inserida na bactéria *E. coli* DH10B através de transformação por eletroporação. Para tal, foi utilizado o aparelho “Gene Pulser” (Biorad). Foram preparados 50µL de *E. coli* DH10B eletrocompetente e 1µL de DNA (sistema de ligação), que foram transferidos para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente resfriada em gelo. As configurações utilizadas foram: 2,5 KV, 25 µF e 200 Ω. Imediatamente após o pulso elétrico foi adicionado às células adicionado 1 mL de meio SOC contendo: 20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de cloreto de sódio, 2,5 mM de cloreto de potássio, 10mM de cloreto de magnésio e 20mM de glicose (pH 7,0) . Esta suspensão foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL estéril, sendo repetido três vezes até completar 3 mL de meio de cultura. O material foi incubado a 37 ˚C, sob agitação de 200 rpm por 1 hora. Em seguida, 100 µL foram transferidos para uma placa contendo meio LB ágar acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e X-gal (200 µg/mL) e incubadas a 37 ˚C de 14 a 16 horas. No dia seguinte, colônias brancas foram selecionadas para cultivo em meio LB líquido com Ampicilina, e posteriormente foram submetidas à extração plasmidial com o kit Plasmid Miniprep (Qiagen) enquanto algumas alíquotas foram estocadas em Glicerol 20% a -80 ˚C.

5.2.4 Digestão da construção pUC57 + inserto da scEPG1

A fim de confirmar o tamanho e a qualidade do material recebido, após a extração de DNA plasmidial, este material foi submetido à digestão pela enzima de restrição *EcoRI* (NEB). Esta digestão deve gerar dois fragmentos de aproximadamente 400 e 1100 pares de bases.

5.2.5 Amplificação dos genes da ScEPG1

A partir do molde da scEPG1, foram desenhados pares de oligonucleotídeos com sítios de restrição flanqueando o gene alvo para a clonagem e primers específicos para sequenciamento dos fragmentos (Tabela 1). O conjunto de *primers* Cana-F_KpnI_C1 e Cana-R_XbaI_C2 foi desenhado para este trabalho e utilizado para amplificação do inserto para utilização nas etapas de clonagem, enquanto os primers A1-AOX-F, A2-alpha-F e A7-AOX-R que flanqueiam a região AOX e fator alfa do vetor foram desenhados pela empresa "Invitrogen", além destes, foram desenhados os primers A3-cana_inicio-R, A4-cana_interno-F, A5-cana_interno-R e A6-cana_final-F para amplificação e sequenciamento das regiões internas do inserto da scEPG1. Os primers utilizados para a clonagem foram desenhados a partir da sequência da região do sítio múltiplo de clonagem da construção: vetor pPICzαA + scEPG1.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores e enzimas de restrição utilizados para amplificação dos genes codificadores da scEPG1 de cana-de-açúcar para clonagem e sequenciamento

Primer	*Sequência 5' → 3'*	*pb*	*Tm*	*T°C do Hairpin*
Cana-F_KpnI_C1 (clonagem)	ATTAATGGTACCGGCGCGTCGTCCGGG	27pb	69,5°C	46,9°C (ΔG = -3,91)
Cana-R_XbaI_C2 (clonagem)	ACGGCTTCTAGACCGTAGCTACACTTTGGCAG	32pb	65,1°C	40,0°C (ΔG = -2,3)
A1-AOX-F (sequenciamento)*	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21pb		
A2-alpha-F (sequenciamento)*	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	21pb		
A3-cana_inicio-R (sequenciamento)	GATCTTGACATGCGAGGAAGA	21pb	54,5°C	23,7°C (ΔG = -0,11)
A4-cana_interno-F (sequenciamento)	AAGCACGTGGCGAAGGTCAGG	21pb	62,5°C	34,8°C (ΔG = -0,61)
A5-cana_interno-R (sequenciamento)	CTCCATCCTGCCGGCCATGGT	21pb	64,6°C	33,6°C (ΔG = -0,91)
A6-cana_final-F (sequenciamento)	TGGGTGTTCTGGATGACCGGCAAC	24pb	65,2°C	31,8°C (ΔG = -0,56)
A7-AOX-R (sequenciamento)*	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21pb		

Legenda: em vermelho: adaptadores; em verde: região do sítio para enzima de restrição; em roxo: bases extras adicionadas para manter a fase de leitura. *Primers comerciais – Invitrogen.

Para a amplificação da scEPG1, o material genético foi submetido a uma reação de PCR. As reações foram preparadas com a utilização da enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher) nas seguintes concentrações finais: 1X Phusion High Fidelity Buffer, 200 µM dNTP`s, 0,5 µM Primers F e R, 3% DMSO e 1U Phusion Taq Polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98 °C por 30 segundos, seguido de 25 ciclos repetidos com temperaturas de 98 °C por 10 segundos (desnaturação), 72 ˚C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos (extensão), finalizando a reação com uma etapa de extensão adicional a 72 °C por dez minutos. Nestas condições espera-se observar em gel de agarose fragmentos de 1311 pb.

5.2.6 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com “PureLink™ Genomic DNA Mini Kit” (ThermoFisher), seguindo instruções do fabricante e armazenados a -20 ˚C.

5.3 Análise *in silico* das sequências da scEPG1 nativa e heteróloga

As análises teóricas realizadas neste trabalho utilizaram diferentes softwares. Para comparação do número de aminoácidos, peso molecular teórico e ponto isoelétrico, foi utilizada a ferramenta “ProtParam” (https://web.expasy.org/protparam).

Para análises de similaridade com proteínas homólogas depositadas em bancos de dados, foi utilizada a ferramenta “BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*” (NCBI).

A identificação de regiões de domínios conservados foi realizada utilizando a base de dados de domínios conservados “CDD” (*Conserved Domain Database*) (Marchler-Bauer et al. 2017).

Para predição de possíveis glicosilações, foram utilizados os servidores “NetOGlyc 4.0” (Steentoft et al. 2013) que indica as regiões de possíveis glicosilações O-*linked*; e o servidor “NetNGlyc 1.0” (Gupta and Brunak 2001) que indica as regiões de possíveis glicosilações N-*linked*.

Para a construção dos modelos teóricos por homologia, foi utilizado o servidor SWISS-MODEL (Benkert et al. 2011; Waterhouse et al. 2018). A sequência de

aminoácidos é inserida na página do servidor que retorna o resultado final da análise que consiste no alinhamento múltiplo de sequências proteicas comparando com o banco de dados "*Protein Data Bank*" (PDB). Com base nas informações obtidas é predita a estrutura tridimensional da proteína de interesse, de forma comparativa e virtual.

5.4 Clonagem em *E. coli* DH10B

5.4.1 Construção vetor pPICZαA + amplicon ScEPG1

O vetor pPICZαA (ThermoFisher) foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *KpnI* deixando-o na sua forma linear com as extremidades compatíveis com o produto de PCR gerado nas etapas anteriores, que também foram submetidos à digestão com as mesmas enzimas nas seguintes condições em 50 µL de volume total de reação: Para enzima *XbaI*, DNA (Vetor ou Inserto): 4 µg, Buffer CutSmart (5 µL), Enzima *XbaI* (2 µL); Para enzima *KpnI*, DNA (Vetor ou Inserto): 4 µg, Buffer NEB 1.1 (5 µL), Enzima *KpnI* (2 µL). Ambos foram incubados a 37 ˚C por 3 horas.

Após a clivagem, tanto o vetor, quanto o produto de PCR foram purificados com "PureLink™ Genomic DNA Mini Kit" (ThermoFisher), seguindo instruções do fabricante e armazenados a -20 ˚C.

Para reação de ligação na proporção 3:1 (Vetor:Inserto), realizou-se a reação nas seguintes condições: Vetor (100 ng/µL), Inserto (100 ng/µL), Tampão T4 10X, Enzima T4 ligase (1µL) incubado a 16 ˚C por 16 horas. A enzima foi inativada após incubação a 65 ˚C por 10 minutos.

5.4.2 Transformação de E. coli DH10B por eletroporação

O sistema de ligação contendo o vetor pPICZαA e o produto de PCR obtido anteriormente foi usado para transformação de *E. coli* DH10B eletrocompetente. Para tal, foi utilizado o aparelho "Gene Pulser" (Biorad). Foram preparados 50µL de *E. coli* DH10B eletrocompetente e 3µL de DNA do sistema de ligação (Item 5.4.1), que foram transferidos para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada. As configurações utilizadas foram: 2,5 KV, 25 µF e 200 Ω. As células foram submetidas a um pulso elétrico e imediatamente após foi adicionado 1 mL de meio SOC no interior da cubeta e homogeneizado com as células. Esta suspensão foi transferida para um

tubo Falcon de 15 mL estéril, sendo repetido três vezes até completar 3 mL de meio de cultura. O material foi incubado a 37 ˚C, sob agitação de 200 rpm por 1 hora. Em seguida, 100 µL foram transferidos para uma placa contendo meio LB ágar Low Salt pH 7,5 acrescido de Zeocina (Triptona 10%; NaCl 5%; Extrato de levedura 5%; Zeocina 25mg/ml) e incubadas a 37 ˚C por 24 horas. Dez colônias foram selecionadas e posteriormente estocadas em Glicerol 20% a -80 ˚C.

5.5 Clonagem em *Pichia pastoris* X33

Foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o kit MaxiPrep (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Dez microgramas do material genético foram linearizados com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs) por incubação a 37 ˚C por 2 horas e interrompida por aquecimento a 65 ˚C por 20 minutos e posteriormente purificado com o kit "PureLink™ Genomic DNA Mini Kit" (ThermoFisher) e estocado em freezer -20 ˚C.

5.5.1 Transformação de Pichia pastoris X33

Inicialmente as células de *P. pastoris* X33 foram preparadas para a transformação química. Para isso, as células foram crescidas em 5 mL de meio YPD líquido a 30 ˚C e agitação de 200 rpm por 16 horas para a obtenção do pré-inóculo. Este pré-inóculo foi diluído até a OD_{600} na faixa de 0,1 - 0,2, seguidas de incubação a 30 ˚C sob agitação de 250 rpm até a OD_{600} atingir a faixa de 0,6 - 1,0. A partir desta cultura, as células foram submetidas à competência utilizando o kit "Pichia EasyComp™ Transformation Kit" (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As células competentes foram armazenadas em freezer -80 ˚C.

O procedimento de transformação foi realizado utilizando-se 50 µL das células previamente tornadas competentes e adicionado 3,5 µg de DNA linearizado previamente purificado. A transformação foi realizada utilizando as soluções do kit "Pichia EasyComp™ Transformation Kit" (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Foram plaqueados 150 µL de cultura em meio YPDS (YPD+Sorbitol) sólido com 100 µg/ml de Zeocina. A inclusão de sorbitol nas placas de YPD estabiliza as células recém transformadas pois são sensíveis a alterações osmóticas. As placas foram mantidas em estufa a 30 ºC por 2-3 dias. Após o crescimento das colônias, foram armazenadas em glicerol 20% a -80 ºC.

5.5.2 Análise da expressão de proteína em Pichia pastoris

Tendo confirmado, por PCR, que as colônias recombinantes contêm o inserto, é necessário determinar as condições e métodos ótimos para a expressão do gene clonado. Seguindo o protocolo "*Expression of recombinant Pichia strains"* (Invitrogen), os estoques obtidos na etapa anterior foram cultivados em meio BMGY (Meio Tamponado Complexo com Glicerol) (Tabela 2) até atingir a OD_{600} de 2,0 a 6,0. Em seguida a cultura foi diluída em meio BMMY (Meio Tamponado Complexo com Metanol) (Tabela 2), no qual as células cresceram por sete dias. A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 1,0 mL, deste volume, foi retirado 20 µL para medição através de espectrofotometria da OD_{600} para monitorar o crescimento celular. Após a centrifugação da alíquota da cultura, 10µL foram utilizados para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) e 100µL para medição de atividade enzimática pelo método de DNS. A cada 24 horas a quantidade de metanol no meio foi reposta de modo manter ativa a indução da expressão da proteína recombinante, sendo sua concentração final de 1,5%.

Tabela 2 - Composição dos meios BMGY / BMMY

Componentes	**Concentração**
Extrato de levedura (p/v)	1%
Peptona de caseína (p/v)	2%
Tampão fosfato pH 6,0 1M (v/v)	10%
10X YNB (Meio Nitrogênio levedura Base 13.4%) (v/v)	10%
500X B (Biotina 0,02%) (v/v)	0,2%
10X M (Metanol 5%) (v/v) Para BMMY	10%
10X GY (Glicerol 10%) (v/v) Para BGMY	10%

Fonte: Invitrogen

5.5.3 Quantificação de proteínas totais

Para determinação da concentração de proteínas totais da amostra, foi utilizado o método de Bradford. Para isso, foi construída uma curva padrão para calibração do equipamento utilizando diferentes concentrações de albumina bovina sérica (BSA). Foram utilizadas cinco diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL) e os valores de absorbância foram lidos a 595nm. Após a construção do gráfico, foi obtida a equação da reta, com valor de R2 > 0,99 e que foi utilizada posteriormente para determinação da concentração de proteínas totais nas amostras.

5.6 Extração de DNA genômico e cDNA de Pichia pastoris X33_scEPG1

O DNA genômico dos clones de *Pichia pastoris* foi extraído segundo o protocolo descrito por Lõoke et al. (2011), utilizando acetato de lítio 0,2M e solução SDS 1%.

O RNA total das linhagens submetidas à indução por 144 horas foi extraído pela utilização do "*Plant/Fungi Total RNA Purification Kit*" (Norgen Biotek). Este RNA foi submetido à reação da trasncriptase reversa "*SuperScript™ III Reverse Transcriptase*" (ThermoFisher) seguindo as instruções do fabricante. Este material genético foi utilizado como molde nas reações de PCR com primers específicos para análise dos transcritos produzidos pela levedura.

5.7 Identificação da proteína

5.7.1 Precipitação da proteína

As amostras foram previamente submetidas à precipitação por solução de ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 10% e incubado a -20 ˚C por uma hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 30 minutos a 4 ˚C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a três ciclos de lavagem por acetona gelada (100%) seguidas de centrifugação nas mesmas condições e posteriormente em temperatura ambiente para secagem.

As amostras foram ressuspendidas em 4 µL de água milli-Q, e, a este volume, foram adicionados 5 µL de tampão de amostra (Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X) – Thermofisher n˚ LC2676) e 1 µL de agente redutor (NuPAGE® Reducing Agent (10X) – Thermofisher n˚ NP0004). Em seguida, as amostras foram incubadas a 85 ˚C por 2 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida 10% com 1 mm de espessura.

5.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS

Para análise da presença da proteína recombinante no extrato bruto de *P. pastoris*, foi empregada a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

A eletroforese foi realizada em sistema fechado contendo tampão de corrida diluído (100 mL de "10X Novex™ Tris-Glycine SDS Running Buffer" e 900 mL de água

destilada). Para cada corrida, foram utilizados 5 µL do marcador “Precision Plus Protein™ Dual Color Standards” (Bio-Rad) contendo 10 proteínas recombinantes com tamanhos de 10 a 250 kD, sendo duas marcadas em rosa (25 e 75 kD) e oito marcadas em azul. A corrida foi realizada à temperatura ambiente, submetida a 125 V constante por 90 minutos.

5.7.3 Coloração com azul de comassie

As bandas protéicas presentes no SDS-PAGE foram visualizadas após a sua incubação, seguida de três ciclos de lavagem com água destilada por 5 minutos sob agitação para remoção do tampão SDS, e posteriormente foi adicionado 20 mL de corante “SimplyBlue™ SafeStain” (Invitrogen) e incubado por 3 horas à temperatura ambiente sob agitação. Após o tempo de incubação na solução corante, o gel foi descorado duas vezes utilizando água destilada por 1 hora sob agitação.

5.8 Ensaios enzimáticos

5.8.1 Medição da atividade enzimática

A atividade enzimática foi avaliada primeiramente utilizando o extrato bruto enzimático obtido nas etapas anteriores. O substrato utilizado foi ácido poligalacturônico (PGA, 95% pureza, Sigma Aldrich). Tendo como controle positivo uma pectinase de *Aspergillus niger* comercial (Sigma Aldrich), com atividade enzimática de 1,32 UI por mg de enzima. O substrato foi dissolvido em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5 na concentração de 0,5%. Esta atividade foi determinada através do aumento da concentração de açúcar redutor após incubação da amostra enzimática com a solução de substrato.

Para o ensaio enzimático foram utilizados 100 µL de extrato enzimático e 100 µL solução de substrato. O controle negativo é composto de 100 µL solução de substrato acrescida de 100 µL de extrato obtido da linhagem transformada apenas com o vetor pPICzαA vazio, enquanto o branco possui 100 µL de solução substrato e 100 µL de meio BMMY. A mistura foi incubada a 40 ˚C em 22 horas de reação. A reação foi interrompida pela adição de 300 µL de DNS modificado (10 g/L ácido-3,5-dinitrosalicílico, 3,2 g/L hidróxido de sódio e 300 g/L tartarato de sódio e potássio), seguido de incubação a 100˚C por 10 minutos e diluído para um volume total de 2 mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

5.8.2 Efeito de íons metálicos, agentes redutores, detergentes e quelantes sobre a atividade pectinolítica da scEPG1.

Para determinar se há influência de diferentes compostos na atividade enzimática, foram adicionados sais de íons metálicos ($FeCl_3.6H_2O$; $CaCl_2$; $ZnSO_4$; NaCl; $CoCl_2.7H_2O$; KCl; $CuCl_2$); agentes redutores (β-Mercaptoetanol; ditiotreitol [DTT]); detergentes (Dodecil sulfato de sódio [SDS]) e quelantes (Etilenodiamino tetracético [EDTA]).

Neste ensaio foram empregados 100 µL do extrato bruto contendo a enzima, 50 µL do substrato ácido poligalacturônico 1% em tampão acetato de sódio 100mM pH 5, 38 µL de tampão acetato de sódio 100mM pH 5 e 12 µL de solução de sais, detergentes, agentes redutores ou quelantes a 300 mM, ficando na concentração final de 18 mM.

5.8.3 Extração do conteúdo intracelular dos clones X33_scEPG1 e X33_vetor vazio

Para análise da atividade intracelular, as células foram submetidas a extração do conteúdo intracelular pela utilização do tampão de rompimento (*Breaking buffer*) sugerido pelo protocolo “Pichia expression Kit” (Invitrogen).

As células foram previamentes lavadas e centrifugadas a 3000 xg por 10 minutos com *Breaking Buffer* (BB) (50 mM Fosfato de sódio pH 7,4; PMSF 1 mM (fluoreto de fenilmetilsulfonil), EDTA 1 mM e 5% glycerol), em seguida as células foram ressuspendidas com *Breaking Buffer* até atingirem a OD_{600}: 50-100. Foi adicionado igual volume de pérolas de vidro de 0,5mm (previamente lavadas com ácido e autoclavadas). Após rigorosa agitação em vórtex por 30 segundos, as células foram incubadas em gelo por 30 segundos. Esse processo de agitação e resfriamento foi repetido 7 vezes. Este procedimento reduz a chance de desnaturação da proteína. Após esse processo, as células foram centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e armazenado para posterior utilização no ensaio de atividade enzimática.

5.8.4 Influência do pH e temperatura sobre as atividades da scEPG1

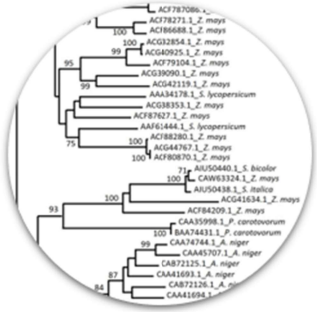
Para se determinar o pH ótimo da atividade da scEPG1, as amostras foram incubadas com o substrato, em tampões de diferentes valores de pH, sendo citrato-

fosfato 0,1 M (pH 4.0), acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0 – 7,0) e Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0 - 9,0). Dentre as temperaturas, foi testada a faixa de 10 a 70 ˚C.

5.9 Sacarificação

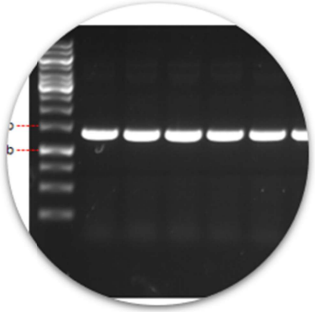
10 mg de cana-de-açúcar SP80-3280 foram incubadas com 0,5 mL de hidróxido de sódio por 30 minutos a 90 °C sob agitação constante. O resíduo obtido desse pré-tratamento foi lavado três vezes com 1 mL de tampão acetato de sódio (pH 5.0). A este material foram adicionados 1,6 mL do coquetel enzimático Celluclast 1.5L (Novozymes®) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) e incubados a 50 °C por 16 horas sob leve agitação. Para avaliação do processo de sacarificação, os açúcares redutores obtidos da digestão enzimática foram mensurados pelo método MBTH empregando glicose 10 mM como padrão. A 300 µL do sobrenadante da hidrólise foram adicionados 100 µL de hidróxido de sódio 1N e 200 µL do reagente MBTH (3mg.mL-1 MBTH e 1 mg.mL-1 DTT) em um novo microtubo. Essa solução foi levada a aquecimento á 70 °C por 20 minutos. Logo, foi adicionado 400 µL de agente oxidante (0,5% sulfato ferroso de amônio, 0,5% ácido sulfâmico e 0,25 N ácido clorídrico) onde permaneceu em repouso por 1 h. O ensaio colorimétrico foi avaliado na absorbância de 620 nm.

6. PLANO DE TRABALHO



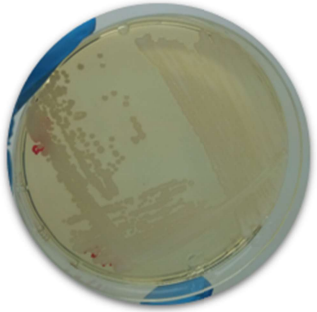
Enzima e organismo alvo

- Estudos da parede celular da cana-de-açúcar
- Levantamento e análise das EPGs caracterizadas no cAZY
- Análise da árvore filogenética



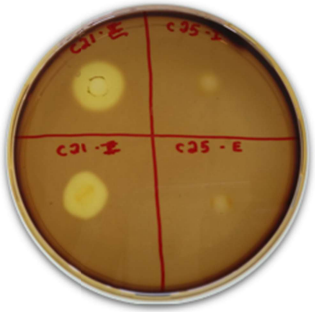
Sequência da scEPG1 e clonagem em *E. coli*

- Obtenção do DNA sintético
- Amplificação
- Ligação no vetor pPICZαA
- Clonagem em *E. coli*
- Extração do DNA plasmidial
- Sequenciamento para escolha do clone
- Extração de DNA plasmidial



Clonagem em *Pichia pastoris* X33

- Preparação das células quimiocompetentes
- Transformação química
- Seleção de clones por resistência ao ATB Zeocina
- Extração de DNA genômico e obtenção de cDNA para amplificação da região da clonagem



Análise da expressão da enzima recombinante

- Ensaio em placa do conteúdo intra e extracelular
- Eletroforese em gel de poliacrilamida
- Otimização do protocolo de expressão
- Efeito de temperatura, pH e interferentes na atividade enzimática.
- Adição da scEPG1 + coquetel enzimático na biomassa de cana-de-açúcar.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

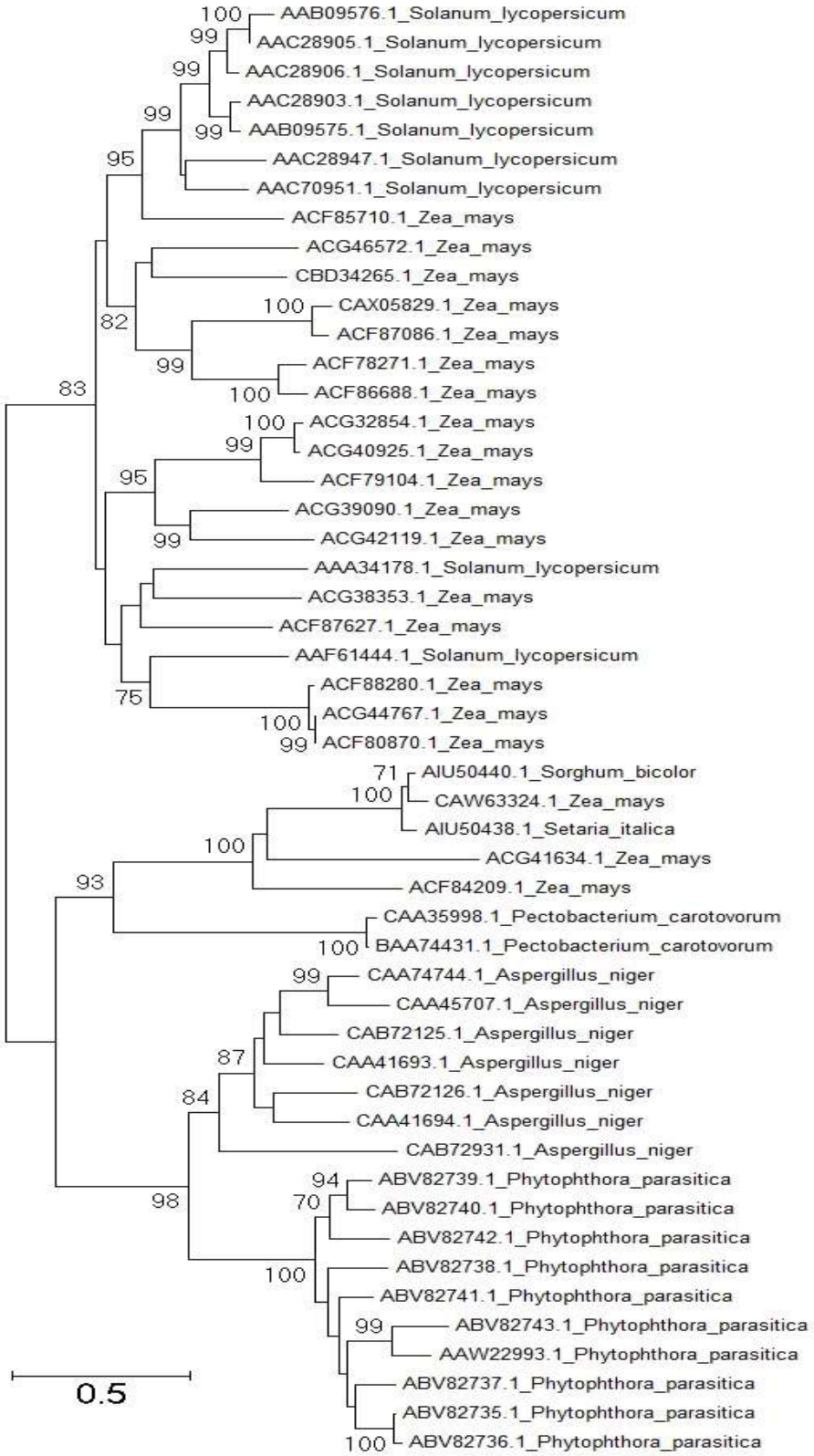
Este trabalho faz parte de um grande projeto em andamento que une 30 laboratórios em 5 estados brasileiros com o objetivo de desenvolver as bases tecnológicas necessárias para viabilizar a produção de etanol celulósico a partir de cana-de-açúcar no Brasil (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – INCT n° 14/50884-5). O foco deste trabalho é expressar, de forma heteróloga, uma pectinase com atividade de endopoligalacturonase produzida pela cana-de-açúcar, até o momento não estão disponíveis na literatura.

Os três principais desafios enfrentados neste trabalho foram (a) a produção da enzima funcional, chamada aqui de scEPG1 (*sugarcane* EPG-1) de forma heteróloga, (b) a determinação dos melhores parâmetros cinéticos e (c) a evidência que a adição desta enzima ao coquetel comercial pode promover um melhor rendimento de açúcares a partir da biomassa da cana-de-açúcar.

Mesmo em pequenas proporções, a pectina é um importante polissacarídeo envolvido na recalcitrância da biomassa, prejudicando o rendimento na produção de etanol de segunda geração (De Souza et al. 2015). Quando o coquetel enzimático comercial foi suplementado com um extrato fúngico rico em pectinase e α-L-arabinofuranosidade, observou-se um aumento de 116% na eficiência de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (Delabona et al. 2013).

Além disso, trabalhos anteriores já demonstraram que a adição de enzimas acessórias como hemicelulases e pectinases à biomassa vegetal promoveu melhor rendimento e velocidade de conversão (Gusakov et al. 2007; Berlin et al. 2007). Por exemplo, a adição de uma pectinase comercial em extratos ricos em enzimas celulolíticas aumentou o rendimento na hidrólise da palha de milho (Berlin et al. 2007) e bagaço de cana (Delabona et al. 2013). Porém, todos esses dados se referem a enzimas de origem microbiana. A endopoligalacturonase (EC 3.2.1.15), família GH28, catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α-(1,4) entre duas unidades de ácido galacturônico não esterificadas do homogalacturonano. Com o intuito de realizar uma análise comparativa entre as sequências de endopoligalacturonases provenientes de organismos produtores de EPGs, foi feito um levantamento das enzimas caracterizadas presentes em bancos de dados (Figura 3).

Figura 3 - Homologia das sequências de aminoácidos de enzimas de plantas e microrganismos mais representados da família CAZy GH28



Legenda: EPGs preditas de gramíneas (*Setaria itálica*, *Sorghum Bicolor* e *Zea mays* - ainda não caracterizadas) foram adicionadas ao alinhamento. Os números indicam os valores de bootstrap. O método de máxima verossimilhança foi escolhido de acordo com o modelo de substituição mais bem classificado (Tajima-Nei) com 1000 réplicas de bootstrap. Os números do NCBI GenBank são indicados em cada sequência. Fonte: (Latarullo et al. 2016)

A atuação das EPGs em cana organismo deve refletir a fisiologia, metabolismo e modo de vista dos organismos que as produzem. Das 210 enzimas caracterizadas no banco de dados CAZy, 68% são de fungos filamentosos que têm como organismo mais prevalente, o fungo *Aspergillus niger*. Bussink *et al*. (1992) descreve sete diferentes tipos de endopoligalacturonases produzidas pela linhagem *A. niger* N400. Este fungo é saprófito, ou seja, obtém seus nutrientes de biomassa em decomposição. Esta característica pode estar relacionada com a grande variedade de EPGs produzidas, pois é um ataque inespecífico.

Por outro lado, outro modelo presente na literatura é o bacteriano. Dentre as EPGs caracterizadas de bactérias, a mais amplamente estudada é a produzida por *Pectobacterium carotovorum*. Esta bactéria é um fitopatógeno causador da doença "podridão mole" e "canela preta" através da produção de substâncias pécticas que causam a maceração do tecido, sendo uma doença comum em plantações de batata, cenoura, tomate, abóbora, cebola, pimentão verde entre outros (Hayward and Mariano 1997). Por ser um fitopatógeno, este microrganismo produz enzimas específicas e de forma controlada para que ocorra a penetração no tecido vegetal.

Por fim, em plantas o ataque às pectinas da parede celular e da lamela média tem sido amplamente descrito para a formação da zona de abscisão (González-Carranza et al. 2002), o amadurecimento precoce em frutos (Prasanna et al. 2007) e a formação de aerênquima (Gunawardena et al. 2001). Entretanto, sabe-se relativamente pouco sobre a diversidade estrutural e funcional das pectinases de origem vegetal.

Esta enzima é produzida por diversos organismos como: Fungos filamentosos, bactérias, Archaea, plantas, insetos e nematóides. Pela revisão da literatura concluiu-se que fungos filamentosos são os organismos mais amplamente estudados para prospecção de enzimas de degradação de biomassa vegetal.

A Tabela 3 mostra as principais características dos três principais sistemas biológicos naturais produtores de endopoligalacturonases, os fungos, as bactérias e as plantas. O fungo é saprófito, se alimenta principalmente de matéria orgânica em decomposição, logo se espera que seu arsenal enzimático seja mais amplo e mais inespecífico. A bactéria é um fitopatógeno, se alimenta de matéria orgânica viva de uma gama restrita de plantas e produz enzimas para auxiliar na invasão ao vegetal. A cana-de-açúcar produz esta enzima de forma mais controlada para realizar

modificações no córtex da raiz para a formação do aerênquima nas raízes através da degradação da lamela média.

Entretanto, pode-se observar que as sequências de EPGs da bactéria *Pectobacterium carotovorum* são mais similares às EPG de gramíneas quando comparada com a sequência da EPG de fungo (Figuras 3 e 4). A maior proximidade filogenética entre EPGs bacterianas e de plantas pode ser analisado juntamente com o fato de serem ambos grupos pouco explorados quanto à caracterização de enzimas dessa família (quando comparadas às EPGs de fungos). Nesse sentido, conclui-se que a maioria do que se conhece sobre EPGs de fungos pode não se aplicar às pouco conhecidas endopoligalacturonases de plantas, o que mais uma vez reforça a tese que há um potencial relevante ainda não explorado em pectinases de origem vegetal.

Tabela 3 - - Comparações entre EPGs de Fungo (Aspergillus niger), Bactéria (Pectobacterium carotovorum) e Planta (Saccharum sp.) quanto ao modo de nutrição, dados na literatura, ação da enzima no metabolismo e especificidade do substrato

	Fungo filamentoso	**Bactéria (*P. carotovorum*)**	**Planta (*Saccharum* sp.)**
Modo de nutrição	Saprófito	Fitopatógeno	Fotossíntese
EPGs caracterizadas (Dados na literatura)	68% fungo filamentoso	8% bactérias	22% outras plantas (0% cana-de-açúcar)
Ação da EPG no metabolismo	Para obtenção do alimento em decomposição	Para auxiliar a entrada no vegetal no momento da infecção	Para modificações no próprio córtex (aerênquima), amadurecimento de frutos e formação da zona de abscisão
Especificidade do substrato	Inespecífico (atua em diferentes plantas em decomposição)	Mais específico e controlado (produzido no momento da infecção de planta específica)	Altamente específico e controlado (atua na própria parede celular de forma controlada)

Fonte: Elaborado pelo autor

Utilizando as sequências de aminoácidos da EPG de cana-de-açúcar e comparando com a sequência modelo de um microrganismo fúngico (*A. niger*) e outra de um microrganismo bacteriano (*Pectobacterium carotovorum*) (Figura 4), é possível verificar pelo alinhamento das sequências as regiões mais conservadas da EPG (em cinza) e os aminoácidos similares (em vermelho).

Figura 4 - Alinhamento da sequência da endopoligalacturonase de cana com outras endopoligalacturonases de microrganismos (*A. niger* e *P. carotovorum*)

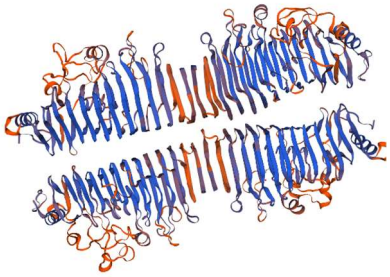
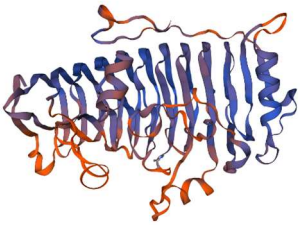
```
                                        10         20         30         40         50         60
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
Pectobacterium carotovorum      MEYQSGKRVL SLSLGLIGLF SASAFASDSR TVSEPKVPSS CTVLKADSST ATS-TIQKAL NNCGQGKA
Aspergillus niger               -------MHS FASLLAYGLV AGATFASASP IEARDSCTFT TAAAAKAGKA KCS-TITLNN IEVPAG--
Saccharum sp. hybrid            MAPGRSLRPV AVALWAASLL LAASCARAGA SSGGPGCRKH VAKVREYGAV GDGRTLNTAA FARAVADL

                                        110        120        130        140        150        160
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
Pectobacterium carotovorum      IDKGVTLRAV NNAKSF---E NAPSSCGVVD KNGKGCDAFI TATSTTNSGI YG-PGTIDGQ GGVKLQDK
Aspergillus niger               FEG------- ---------- --TTTFQYEE WAGP--LISM SGEHITVTGA SG--HLINCD G------
Saccharum sp. hybrid            LDEGAEILAS QDMNHWPLIA PLPSYGRGRD EPGPRYINFI GGSNLTDVII TGKNGTINGQ G------

                                        210        220        230        240        250        260
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
Pectobacterium carotovorum      TLYNVSLINS PNFHVVFSDG DGFTAWKTTI KTPSTARNTD GIDPMSSKNI TIAHSSISTG DDNVAIKA
Aspergillus niger               NIKNTPLMAF S-VQANDITF TDVTINNADG DTQG-GHNTD AFDVGNSVGV NIIKPWVHNQ DDCLAVNS
Saccharum sp. hybrid            IISNVTFINA PYWNLHPTYC TNVTISGVTI LAPLNSPNTD GIDPDSSSHV KIEDCYIVSG DDCVAVKS

                                        310        320        330        340        350        360
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
Pectobacterium carotovorum      -IGSETMG-V YNVTVDDLNM NGTTNGLRIK SDKSAAGVVN GVRYSNVVMK NVAKP-IVID TVYEKKEG
Aspergillus niger               SVGDRSNNVV KNVTIEHSTV SNSENAVRIK TISGATGSVS EITYSNIVMS GISDYGVVIQ QDYEDGKP
Saccharum sp. hybrid            -LGSEMSGGI RDVRAEDNVA INTESAVRVK SGAGRGGFVR DIFVRGLSLH TMKWV-FWMT GNYGQHPD

                                        410        420        430        440        450        460
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
Pectobacterium carotovorum      NAKKP----- -IEVTMKNVK LTSDSTWQIK NVTVKK---- ---------- ---------- --------
Aspergillus niger               T--------- -EIYLLCGSG SCSDWTWDDV KVTGGKKSTA CKNFPSVASC ---------- --------
Saccharum sp. hybrid            IPNDPYTGIC ISNVTARLAP NAQELQWNCT NVKGVTSDVS PKPCPELGAE GKPCAFPVEE LVIGPPEL
```

Legenda: em vermelho: aminoácidos similares; em cinza: região conservada
(Fonte: elaborado pelo autor).

7.1 Análises *in silico* da sequência da EPG de cana-de-açúcar

Informações teóricas sobre as possíveis glicosilações, ponto isoelétrico, peso molecular, estabilidade e possível estrutura tridimensional, utilizando a sequência de EPG de cana-de-açúcar (versão nativa e heteróloga) foram obtidas com o fim de avaliar a semelhança de ambas proteínas. Desta forma, foi possível predizer algumas diferenças que poderiam ocorrer substituindo o peptídeo sinal nativo pelo peptídeo sinal do vetor além da adição do epítopo c-myc e cauda de histidina. O resultado obtido pode ser observado de forma resumida na Tabela 4 e a sequência completa de aminoácidos da EPG de cana-de-açúcar nativa (Figura 5) e heteróloga produzida por *Pichia pastoris* (Figura 6).

Tabela 4 - Análise in silico da sequência da scEPG1 nativa da cana-de-açúcar e heteróloga produzida por *Pichia pastoris*

Informação	scEPG1 nativa	scEPG1 heteróloga
Número de aminoácidos	460 aa	557 aa (sendo 74 aa do peptídeo sinal + 23 aa do epítopo c-myc e cauda de histidina)
Peso molecular	49.4 kDa	60.1 kDa
Ponto isoelétrico (PI) teórico	6.32	5.30
Similaridade com outras EPGs	93,7% similar à EPG de sorgo (*Sorghum bicolor* C5X022)	95,2% similar à EPG de sorgo (*Sorghum bicolor* C5X022)
Domínios conservados	EPG: entre os aa 41-344 (COG5434 – Família GH 28)	Fator alfa: entre os aa 1-85 (pfam05436 - Mating factor alpha) EPG: entre os aa 115-418 (COG5434 – Família GH 28)
Glicosilações teóricas	3 potenciais regiões (O-*linked*) 4 potenciais regiões (N-*linked*)	6 potenciais regiões (O-*linked*) 6 potenciais regiões (N-*linked*)
Modelagem comparativa da estrutura terciária	 Homo-tetrâmero	 Monômero

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 5 - Sequência de aminoácidos da endopoligalacturonase de cana-de-açúcar nativa

MAPGRSLRPVAVALWAASLLLAASCARAGASSGGPGCRKHVAKVREYGAVGDGRTLNTAAFARAVADLSRRARDG
GAALVVPPGKWLTGPFNLTSCFTLYLDEGAEILASQDMNHWPLIAPLPSYGRGRDEPGPRYINFIGGSNLTDVIITGK
NGTINGQGQVWWDKFHAKELKSTRGHLLELLYSDNIIISNVTFINAPYWNLHPTYCTNVTISGVTILAPLNSPNTDGI
DPDSSSHVKIEDCYIVSGDDCVAVKSGWDEYGIRFNMPSQHIVIRRLTCISPTSAMIALGSEMSGGIRDVRAEDNVAI
NTESAVRVKSGAGRGGFVRDIFVRGLSLHTMKWVFWMTGNYGQHPDNTSNPNALPEVTGINYSDVFAENVTMA
GRMEGIPNDPYTGICISNVTARLAPNAQELQWNCTNVKGVTSDVSPKPCPELGAEGKPCAFPVEELVIGPPELPKCSY

Legenda: Em verde: Região removida após a clivagem do peptídeo sinal nativo; Em cinza: região do domínio da família GH28; caixas vermelhas: região de possível glicosilação *N-linked*; setas vermelhas: região de possível glicosilação *O-linked*.

Figura 6 - Sequência de aminoácidos da endopoligalacturonase de cana-de-açúcar heteróloga

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNITTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGV
SLEKREAEAEFTWPSRPSRIGTGASSGGPGCRKHVAKVREYGAVGDGRTLNTAAFARAVADLSRRARDGGAALVV
PPGKWLTGPFNLTSCFTLYLDEGAEILASQDMNHWPLIAPLPSYGRGRDEPGPRYINFIGGSNLTDVIITGKNGTING
QGQVWWDKFHAKELKSTRGHLLELLYSDNIIISNVTFINAPYWNLHPTYCTNVTISGVTILAPLNSPNTDGIDPDSSS
HVKIEDCYIVSGDDCVAVKSGWDEYGIRFNMPSQHIVIRRLTCISPTSAMIALGSEMSGGIRDVRAEDNVAINTESA
VRVKSGAGRGGFVRDIFVRGLSLHTMKWVFWMTGNYGQHPDNTSNPNALPEVTGINYSDVFAENVTMAGRM
EGIPNDPYTGICISNVTARLAPNAQELQWNCTNVKGVTSDVSPKPCPELGAEGKPCAFPVEELVIGPPELPKCSYGLE
QKLISEEDLNSAVDHHHHHH

Legenda: Em azul: Região do peptídeo sinal do vetor pPICzαA (fator alfa de *Saccharomyces* cerevisiae); Em cinza: região do domínio da família GH28; Em amarelo: epítopo c-myc; Em roxo: cauda de histidina; caixas vermelhas: região de possível glicosilação *N-linked*; setas vermelhas: região de possível glicosilação *O-linked*.

A scEPG1 nativa possui 460 aminoácidos enquanto a scEPG1 heteróloga possui 557 aminoácidos (Tabela 4). Essa diferença decorre da adição da sequência do peptídeo sinal da enzima heteróloga (fator alfa de *Saccharomyces cerevisae*), que possui 74 aminoácidos. A sequência da enzima heteróloga possui também, adicionados ao final do gene de interesse, o epítopo c-myc e cauda de histidina, que somam mais 23 aminoácidos.

O peptídeo sinal é necessário para o direcionamento e translocação de membrana pelas respectivas proteínas de translocação, porém pode influenciar também na biossíntese, na cinética de enrolamento e na estabilidade das respectivas proteínas (Freudl 2018). A utilização do peptídeo sinal do vetor é recomendada pelo fabricante (Invitrogen) pois permite a eficiente secreção da maioria das proteínas clonadas em *Pichia pastoris*.

A adição do epítopo c-myc é um sistema de detecção que tem sido amplamente utilizado para *Western blotting*, imunoprecipitação e citometria de fluxo, mas raramente é aplicado para purificações (Kipriyanov et al. 1996). Seu tamanho pequeno (sequência EQKLISEEDL) sugere a baixa possibilidade de perturbar (ou melhorar) o dobramento de proteínas (Li 2010).

Os marcadores His-Tag facilitam a purificação da proteína heteróloga pela ligação seletiva da proteína expressa a uma coluna de afinidade de níquel (Chant et al. 2005). Carson et al. (2007) demonstraram que estas marcas de purificação geralmente não têm efeito significativo na estrutura da proteína nativa.

7.1.1 Peso molecular das enzimas nativa e heteróloga e glicosilações

A análise de peso molecular da enzima nativa com dados do “Uniprot” de EPGs já caracterizadas demonstrou que o tamanho esperado da EPG nativa (49.4 KDa – Tabela 4) está em uma faixa similar ao peso das enzimas de outras plantas, como *Arabidopsis thaliana* (Uniprot: Q949Z1) que possui 51,3 kDa, de soja *Glycine max* (Uniprot: Q9SWS3) que possui 47.33 kDa e do tomate *Solanum lycopersicum* (Uniprot: Q96488) possui 41.85 kDa. As EPGs de plantas apresentam de modo geral maior peso molecular quando comparadas com EPGs de fungos como *Aspergillus niger* (Uniprot: P26213) que possui 38.1 kDa, *Geotrichum candidum* (Q96WQ1) que possui 38.13 kDa e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Uniprot: P47180) que possui 37.28 kDa.

A diferença observada nos pesos moleculares entre a enzima nativa e a heteróloga (10,7 kDa) pode ser explicada pela(s) glicosilação(ões), que podem ser efetuadas pela levedura durante o processamento pós-traducional. Esta diferença pode ocorrer pela presença da sequência do peptídeo-sinal, caso a enzima não seja processada, o que aumentaria 9,3 kDa. O mesmo também pode ser decorrente dos aminoácidos adicionados ao final como o epítopo c-myc e a cauda de histidina, que adicionam 2,5 kDa. Além disso, é possível que as três glicosilações preditas na enzima heteróloga possam aumentar o peso molecular.

A glicosilação é uma modificação pós-traducional que precede a secreção de proteínas e ocorre no retículo endoplasmático. A levedura *P. pastoris* é capaz de realizar ambos os tipos de glicosilação (O- e N-ligadas) (Daly and Hearn 2005; Roohvand et al. 2017). Poligalacturonases de diferentes espécies de *Aspergillus* sp. apresentam pelo menos um sítio de N-glicosilação, e a deglicosilação causa a total perda de atividade desta enzima (Stratilová et al. 1998). A poligalacturonase de *Aspergillus acureatus* é altamente glicosilada, apresentando um sítio de N-glicosilação e dez sítios de O-glicosilações (Cho et al. 2001). Por outro lado, o estudo da EPG de *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou claramente que a glicosilação não é necessária para manter os parâmetros obtidos da EPG selvagem (glicosilada) (Houle et al. 2008).

O resultado obtido da predição de glicosilações para a scEPG1 nativa é de 3 possíveis glicosilações O-*linked* e 4 possíveis glicosilações N-*linked*. Enquanto para a EPG heteróloga há 6 regiões de possíveis glicosilações O-*linked* e 6 regiões N-*linked*, esta diferença ocorre, pois, as regiões do vetor que incluem o peptídeo sinal, c-myc e cauda de histidina apresentou regiões de possíveis glicosilações. A presença de sítios de glicosilação indica que, uma vez glicosilada, a proteína pode apresentar um peso molecular maior do que a prevista utilizando a partir de somente a sequência primária.

7.1.2 Ponto isoelétrico

A carga total da proteína varia de acordo com o pH. Define-se o ponto isoelétrico (PI) como o valor de pH no qual a carga total da proteína é nula. Quando o pH está abaixo do PI, a proteína tem carga positiva e quando está acima do PI a carga da proteína é negativa. Em relação ao ponto isoelétrico da enzima utilizada neste

trabalho, a scEPG1 nativa possui o PI teórico de 6,32 enquanto a enzima heteróloga possui o PI teórico de 5,30.

Outras poligalacturonases encontradas em plantas possuíam valores mais altos de PI quando comparados com os resultados obtidos para este trabalho. Por exemplo, a poligalacturonase de *Arabdopsis* apresentou o PI teórico de 8,39 (González-Carranza et al. 2002) e a EPG de tomate possui o PI de 9,4 (Ali and Brady 1982). As EPGs de fungos geralmente apresentam valores mais baixos de PI, a EPG de *A. niger* possui o PI: 4,1 (Pařenicová et al. 2000), de *Mucor rouxii* NRRL 1894 é: 6,0 (Saad et al. 2007), de *Cryptococcus albidus var.albidus* é: 8,10 (Federici 1985) enquanto a EPG de *Pectobacterium carotovorum* apresentou o ponto isoelétrico mais alto, sendo 10,19 (Saarilahti et al. 1990).

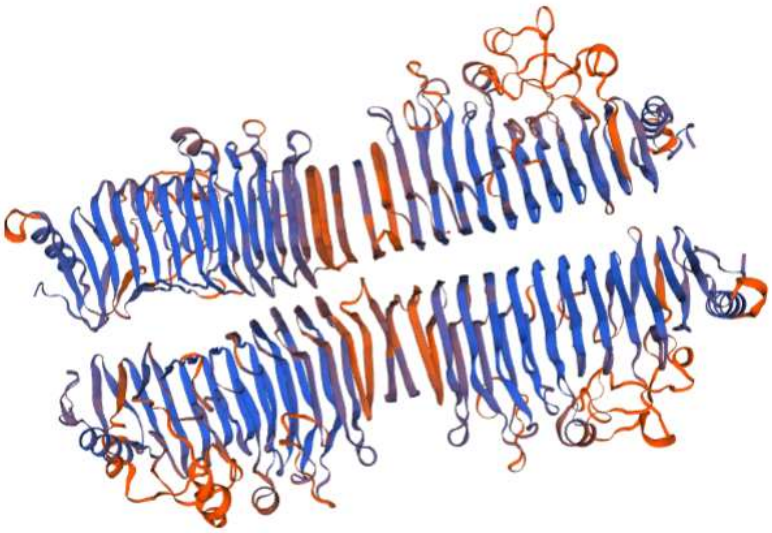
7.1.3 Modelo tridimensional teórico da EPG nativa e heteróloga

O programa SWISS-MODEL utiliza o cálculo matemático chamado "*Global Model Quality Estimation* (GMQE)", este valor é uma estimativa de qualidade que combina propriedades do alinhamento do modelo de destino e do método de pesquisa do modelo. A pontuação resultante do GMQE é expressa como um número entre zeros (0) e uns (1), refletindo a precisão esperada de um modelo construído com esse alinhamento e modelo e a cobertura do alvo. Números mais altos indicam maior confiabilidade (Waterhouse et al. 2018).

Além deste, outro importante índice é o QMEAN, que, baseado em diferentes propriedades geométricas, fornece estimativas de qualidade absoluta globais (para toda a estrutura) e locais (por resíduo) com base em um único modelo. O valor do QMEAN em torno de zero indica boa concordância entre a estrutura do modelo e as estruturas experimentais. Valores de -4.0 ou abaixo são uma indicação de modelos com baixa qualidade (Benkert et al. 2011).

O modelo teórico da estrutura tridimensional scEPG1 nativa apresentou a isoforma de homo-tetrâmero (Figura 7) com 37% de similaridade, 82% de cobertura e 34,40% de identidade com uma hipertermoativa exopoligalacturonase da bactéria *Thermotoga maritima* (Pijning et al. 2009). O valor de GMQE de 0,60 sugere a correta topologia do modelo gerado e o QMEAN de -2,35 indica a boa qualidade da predição (Figura 8).

Figura 7 - Modelo teórico scEPG1 nativa (Homo-tetrâmero)



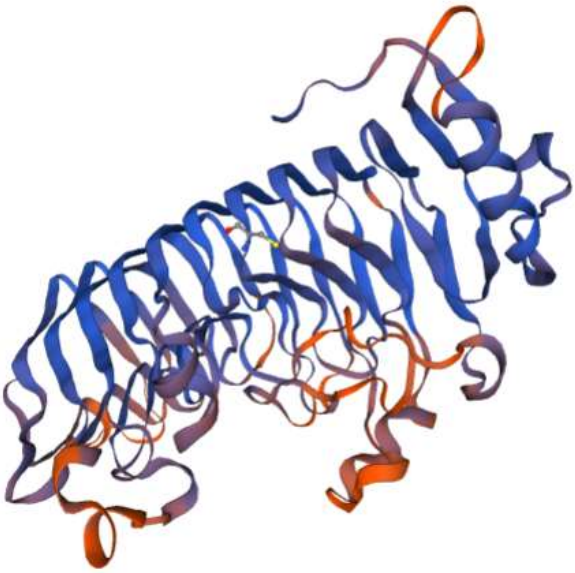
Fonte: SWISS-MODEL

Figura 8 - Alinhamento múltiplo da sequência da EPG nativa com a sequência mais similar do banco de dados (Exopoligalacturonase de *Thermotoga maritima*)

Fonte: SWISS-MODEL

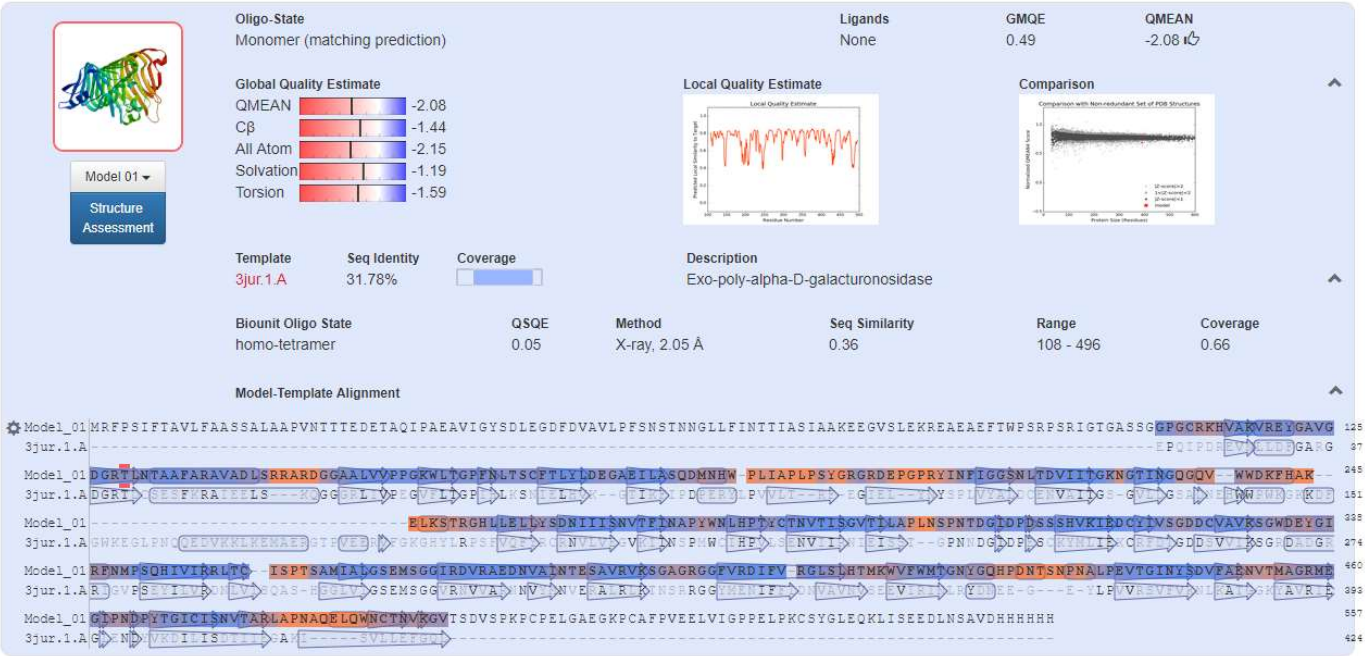
O modelo teórico da estrutura tridimensional da EPG heteróloga apresentou a isoforma de monômero (Figura 9) com 36% de similaridade, 66% de cobertura e 31,78% de identidade com uma hipertermoativa exopoligalacturonase da bactéria *Thermotoga maritima* (Pijning et al. 2009). O valor de GMQE de 0,49 sugere a correta topologia do modelo gerado e o QMEAN de -2,08 indica a boa qualidade da predição (Figura 10).

Figura 9 - Modelo teórico EPG heteróloga (Monômero)



Fonte: SWISS-MODEL

Figura 10 - Alinhamento múltiplo da sequência da EPG heteróloga com a sequência mais similar do banco de dados (Exopoligalacturonase de *Thermotoga maritima*)



Fonte: SWISS-MODEL

Guillén et al. (2011) analisaram as diferenças na enzima lipase do fungo *Rhizopus oryzae* produzida por *P. pastoris* comparando com a enzima comercial produzida pelo próprio fungo e observaram que a atividade específica da enzima heteróloga é 40 vezes maior do que a nativa, e também o peso molecular da lipase heteróloga é ligeiramente menor do que a nativa. Os autores sugerem que as modificações na sequência da enzima (pré e pós) além das modificações pós-traducionais da *Pichia pastoris* podem influenciar na atividade biológica da enzima.

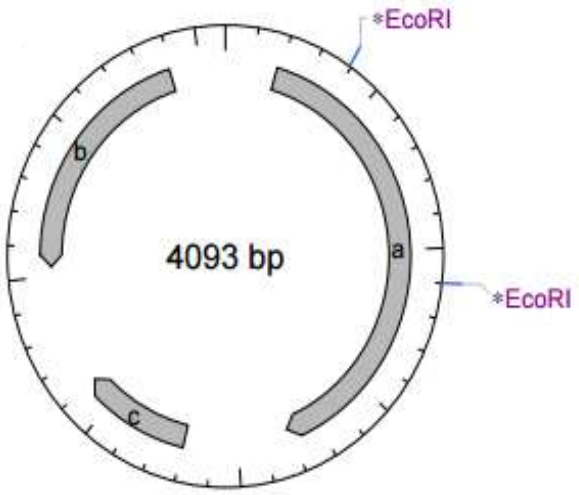
7.2 Construção do vetor pPICZαA + inserto da EPG de cana-de-açúcar

7.2.1 Obtenção do material genômico de Saccharum sp.

A síntese do fragmento de DNA correspondente à sequência codificante da scEPG1 foi necessária por diversos fatores. O principal é que a cana-de-açúcar é uma planta poliplóide e o sequenciamento de regiões da cana-de-açúcar que codificam a EPG evidenciaram oito versões hom(e)ólogas muito similares entre si (97-99% de similaridade) (Tavares 2015). Por esse motivo, não seria possível amplificar o gene diretamente do DNA complementar, haja vista que inclusive as regiões UTR são bastante similares entre os hom(e)ólogos.

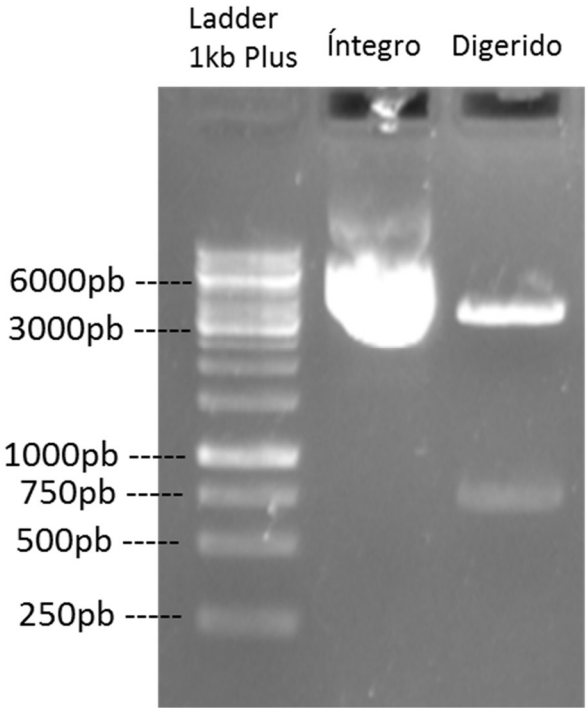
O gene sintetizado pela empresa “FastBio” foi recebido no vetor pUC57. Para replicação e armazenamento do plasmídeo, este foi inserido por transformação na bactéria *E. coli* DH10B. Assim, colônias brancas, que possuem a construção pUC57 + inserto, foram selecionadas para extração de DNA plasmidial e sequenciamento para confirmação da sequência solicitada. Para a confirmação do tamanho esperado da construção vetorial, foi realizada a digestão do DNA plasmidial com a enzima EcoRI, e como resultado, foram obtidos dois fragmentos. Os tamanhos observados de cerca de 3,3 kb e 700 pb coincidem com o perfil de digestão obtido *in silico* (NEBCutter) (Figura 11 e Figura 12). Após análise do sequenciamento deste plasmídeo, conclui-se que a sequência é idêntica à molde solicitada, tornando este material viável para as próximas etapas do trabalho.

Figura 11 - Mapa do plasmídeo pUC57 + inserto EPG cana digerido com EcoRI



Fonte: NEBCutter

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose da extração e digestão do DNA plasmidial de pUC57 + scEPG1.



Legenda: Na primeira canaleta contém o marcador de peso molecular ladder 1kb plus (ThermoFisher), no segundo poço a construção íntegra e no terceiro poço após a digestão com *EcoRI* (Fonte: Elaborado pelo autor).

7.2.2 Desenho dos primers para a construção do vetor pPICZαA + scEPG1

Os primers utilizados para realizar a construção do inserto da scEPG1 com o vetor pPICZαA foram desenhados utilizando a região de Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC) para utilização das enzimas de restrição *Kpn*I e *Xba*I, após a confirmação que

estas enzimas não cortariam nenhuma região do inserto, utilizando a ferramenta (NEBCutter). Além disso, foi retirado o peptídeo sinal nativo da EPG para utilização do peptídeo sinal do vetor (fator-α de *Saccharomyces cerevisiae*) que exporta a proteína para o meio extracelular. Também foi removido o “Stop-códon” nativo, para utilização do “Stop-códon” do vetor que é precedido pelo epítopo c-myc que pode ser utilizado para detecção da proteína e cauda de histidina “His-tag” utilizada para purificação da enzima.

Na Figura 13, é possível verificar cada região, sendo as bases em cinza referentes à região do gene AOX1 do vetor pPICZαA, em laranja o fator- α do vetor pPICZαA, em azul claro a região do sítio múltiplo de clonagem, em vermelho a região das enzimas de restrição utilizadas neste trabalho, em preto a sequência da EPG de cana-de-açúcar sem o peptídeo sinal e o “Stop-códon”, em roxo as bases extras adicionadas no primer para manter a fase de leitura e em azul escuro o “Stop-códon” do vetor pPICZαA.

Figura 13 - Sequência do sítio múltiplo de clonagem do vetor pPICzαA após a inserção da sequência da scEPG1.

CTG GTT CCA ATT GAC AAG CTT TTG ATT TTA ACG ACT TTT AAC GAC AAC TTG AGA AGA
TCA AAA AAC AAC TAA TTA TTC GAA ACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA
TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG
GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT
GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT
ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT
GAA GCT GAA TTC ACG TGG CCC AGC CGG CCG TCT CGG ATC GGT ACC GGC GCG TCG
TCC GGG GGG CCT GGA TGC CGG AAG CAC GTG GCG AAG GTC AGG GAG TAC GGC GCG
GTG GGG GAC GGG AGG ACG CTC AAC ACG GCG GCG TTC GCC AGG GCG GTG GCG GAC
CTG TCG CGG CGC GCG CGC GAC GGC GGC GCG GCG CTG GTG GTG CCG CCG GGG AAG
TGG CTC ACG GGG CCC TTC AAC CTC ACA AGC TGC TTC ACG CTC TAC CTC GAC GAG GGC
GCC GAG ATC CTC GCG TCC CAG GAC ATG AAC CAT TGG CCC CTC ATA GCT CCC CTG CCG
TCT TAC GGG AGA GGA AGG GAC GAG CCT GGC CCA AGG TAC ATC AAT TTC ATT GGA GGA
TCC AAT CTC ACT GAC GTC ATC ATC ACA GGT AAA AAT GGA ACA ATC AAC GGG CAG GGG
CAA GTC TGG TGG GAC AAG TTC CAT GCC AAG GAG CTC AAG TCC ACC CGC GGC CAC CTC
CTG GAG CTC CTC TAC TCT GAT AAC ATC ATC ATC TCC AAT GTC ACC TTC ATC AAC GCG
CCA TAC TGG AAC CTC CAC CCT ACC TAT TGC ACC AAT GTG ACC ATC AGT GGC GTC ACC
ATT CTC GCG CCG CTG AAT TCG CCT AAC ACC GAT GGA ATT GAC CCA GAT TCT TCC TCG
CAT GTC AAG ATC GAG GAC TGC TAC ATC GTC TCC GGC GAC GAC TGC GTC GCC GTG AAG
AGC GGG TGG GAC GAG TAC GGC ATC AGG TTC AAC ATG CCG AGC CAG CAC ATC GTC ATC
AGG AGG CTG ACC TGC ATC TCC CCC ACG AGC GCC ATG ATC GCG CTG GGC AGC GAG
ATG TCC GGC GGC ATC CGC GAC GTG CGC GCC GAG GAC AAC GTC GCC ATC AAC ACG
GAG TCG GCC GTC AGG GTC AAG TCC GGC GCG GGG AGG GGC GGC TTT GTC AGG GAC
ATT TTC GTG CGC GGC CTC AGC CTC CAC ACC ATG AAG TGG GTG TTC TGG ATG ACC GGC
AAC TAC GGG CAG CAC CCC GAC AAC ACG TCC AAC CCC AAC GCC TTG CCC GAG GTC ACC
GGC ATC AAC TAC AGC GAC GTG TTC GCT GAG AAC GTG ACC ATG GCC GGC AGG ATG
GAG GGC ATC CCC AAC GAC CCC TAC ACC GGG ATC TGC ATA TCC AAC GTC ACT GCC CGC
CTC GCG CCG AAC GCC CAG GAG CTG CAG TGG AAC TGC ACC AAC GTC AAG GGG GTC
ACC TCC GAC GTC TCG CCC AAG CCG TGC CCA GAG CTC GGC GCG GAG GGC AAG CCG
TGC GCC TTC CCG GTG GAA GAG CTC GTC ATT GGC CCA CCG GAG CTG CCA AAG TGT AGC
TAC GGT CTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT
CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTT TGT AGC CTT AGA CAT GAC TGT TCC TCA

Legenda: Em cinza: parte do vetor pPICzαA; em laranja: região do fator-α do vetor pPICzαA; em azul claro: região do sítio múltiplo de clonagem; em vermelho: sítio das enzimas de restrição utilizadas; em preto: sequência da scEPG1 sem o peptídeo sinal e 'STOP códon' nativo; em roxo: adição das bases extras para manter a fase de leitura e em azul escuro: 'STOP códon' do vetor

Para confirmar que a fase de leitura da construção plasmidial está correta, a sequência de aminoácidos foi utilizada como *input* em um tradutor de proteínas (ExPASy) e o resultado obtido confirmou a sequência traduzida na fase correta, começando na metionina do fator α do vetor e terminando logo após os seis resíduos de histidina (Figura 14).

Figura 14 - Sequência de aminoácidos e nucleotídeos da enzima recombinante

5'3' Frame 1

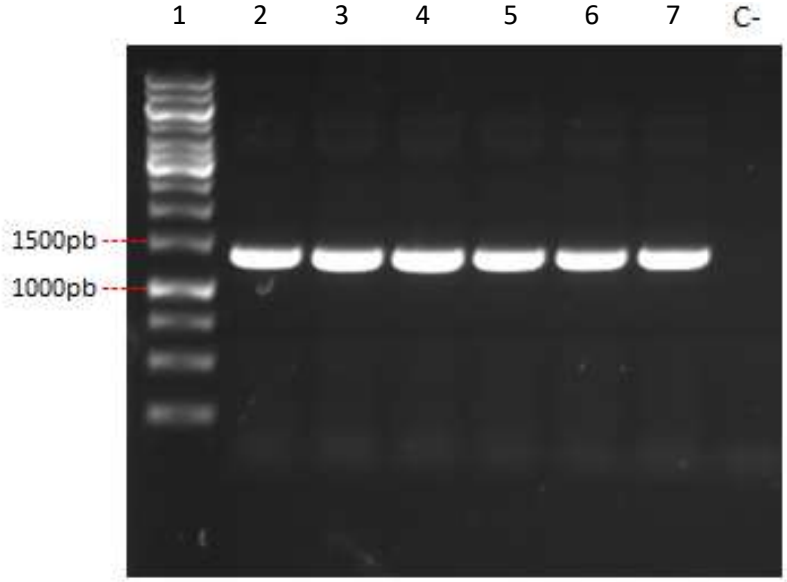
```
atg aga ttt cct tca att ttt act gct gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca tta gct gct
 M   R   F   P   S   I   F   T   A   V   L   F   A   A   S   S   A   L   A   A

cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att ccg gct gaa gct gtc atc ggt
 P   V   N   T   T   T   E   D   E   T   A   Q   I   P   A   E   A   V   I   G

tac tca gat tta gaa ggg gat ttc gat gtt gct gtt ttg cca ttt tcc aac agc aca aat
 Y   S   D   L   E   G   D   F   D   V   A   V   L   P   F   S   N   S   T   N

aac ggg tta ttg ttt ata aat act act att gcc agc att gct gct aaa gaa gaa ggg gta
 N   G   L   L   F   I   N   T   T   I   A   S   I   A   A   K   E   E   G   V

tct ctc gag aaa aga gag gct gaa gct gaa ttc acg tgg ccc agc cgg ccg tct cgg atc
 S   L   E   K   R   E   A   E   A   E   F   T   W   P   S   R   P   S   R   I

ggt acc ggc gcg tcg tcc ggg ggg cct gga tgc cgg aag cac gtg gcg aag gtc agg gag
 G   T   G   A   S   S   G   G   P   G   C   R   K   H   V   A   K   V   R   E

tac ggc gcg gtg ggg gac ggg agg acg ctc aac acg gcg gcg ttc gcc agg gcg gtg gcg
 Y   G   A   V   G   D   G   R   T   L   N   T   A   A   F   A   R   A   V   A

gac ctg tcg cgg cgc gcg cgc gac ggc ggc gcg gcg ctg gtg gtg ccg ccg ggg aag tgg
 D   L   S   R   R   A   R   D   G   G   A   A   L   V   V   P   P   G   K   W

ctc acg ggg ccc ttc aac ctc aca agc tgc ttc acg ctc tac ctc gac gag ggc gcc gag
 L   T   G   P   F   N   L   T   S   C   F   T   L   Y   L   D   E   G   A   E

atc ctc gcg tcc cag gac atg aac cat tgg ccc ctc ata gct ccc ctg ccg tct tac ggg
 I   L   A   S   Q   D   M   N   H   W   P   L   I   A   P   L   P   S   Y   G

aga gga agg gac gag cct ggc cca agg tac atc aat ttc att gga gga tcc aat ctc act
 R   G   R   D   E   P   G   P   R   Y   I   N   F   I   G   G   S   N   L   T

gac gtc atc atc aca ggt aaa aat gga aca atc aac ggg cag ggg caa gtc tgg tgg gac
 D   V   I   I   T   G   K   N   G   T   I   N   G   Q   G   Q   V   W   W   D

aag ttc cat gcc aag gag ctc aag tcc acc cgc ggc cac ctc ctg gag ctc ctc tac tct
 K   F   H   A   K   E   L   K   S   T   R   G   H   L   L   E   L   L   Y   S

gat aac atc atc atc tcc aat gtc acc ttc atc aac gcg cca tac tgg aac ctc cac cct
 D   N   I   I   I   S   N   V   T   F   I   N   A   P   Y   W   N   L   H   P

acc tat tgc acc aat gtg acc atc agt ggc gtc acc att ctc gcg ccg ctg aat tcg cct
 T   Y   C   T   N   V   T   I   S   G   V   T   I   L   A   P   L   N   S   P

aac acc gat gga att gac cca gat tct tcc tcg cat gtc aag atc gag gac tgc tac atc
 N   T   D   G   I   D   P   D   S   S   S   H   V   K   I   E   D   C   Y   I

gtc tcc ggc gac gac tgc gtc gcc gtg aag agc ggg tgg gac gag tac ggc atc agg ttc
 V   S   G   D   D   C   V   A   V   K   S   G   W   D   E   Y   G   I   R   F

aac atg ccg agc cag cac atc gtc atc agg agg ctg acc tgc atc tcc ccc acg agc gcc
 N   M   P   S   Q   H   I   V   I   R   R   L   T   C   I   S   P   T   S   A

atg atc gcg ctg ggc agc gag atg tcc ggc ggc atc cgc gac gtg cgc gcc gag gac aac
 M   I   A   L   G   S   E   M   S   G   G   I   R   D   V   R   A   E   D   N

gtc gcc atc aac acg gag tcg gcc gtc agg gtc aag tcc ggc gcg ggg agg ggc ggc ttt
 V   A   I   N   T   E   S   A   V   R   V   K   S   G   A   G   R   G   G   F

gtc agg gac att ttc gtg cgc ggc ctc agc ctc cac acc atg aag tgg gtg ttc tgg atg
 V   R   D   I   F   V   R   G   L   S   L   H   T   M   K   W   V   F   W   M

acc ggc aac tac ggg cag cac ccc gac aac acg tcc aac ccc aac gcc ttg ccc gag gtc
 T   G   N   Y   G   Q   H   P   D   N   T   S   N   P   N   A   L   P   E   V

acc ggc atc aac tac agc gac gtg ttc gct gag aac gtg acc atg gcc ggc agg atg gag
 T   G   I   N   Y   S   D   V   F   A   E   N   V   T   M   A   G   R   M   E

ggc atc ccc aac gac ccc tac acc ggg atc tgc ata tcc aac gtc act gcc cgc ctc gcg
 G   I   P   N   D   P   Y   T   G   I   C   I   S   N   V   T   A   R   L   A

ccg aac gcc cag gag ctg cag tgg aac tgc acc aac gtc aag ggg gtc acc tcc gac gtc
 P   N   A   Q   E   L   Q   W   N   C   T   N   V   K   G   V   T   S   D   V

tcg ccc aag ccg tgc cca gag ctc ggc gcg gag ggc aag ccg tgc gcc ttc ccg gtg gaa
 S   P   K   P   C   P   E   L   G   A   E   G   K   P   C   A   F   P   V   E

gag ctc gtc att ggc cca ccg gag ctg cca aag tgt agc tac ggt cta gaa caa aaa ctc
 E   L   V   I   G   P   P   E   L   P   K   C   S   Y   G   L   E   Q   K   L

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat tga
 I   S   E   E   D   L   N   S   A   V   D   H   H   H   H   H   H   -
```

Fonte: ExPASy

7.2.3 Amplificação do Fragmento da EPG de cana-de-açúcar em plasmídeo pUC57

Após a extração do DNA plasmidial, os primers desenhados para a clonagem foram utilizados para amplificação do fragmento correspondente à sequência codificante da scEPG1. Após a reação de PCR, foi observado em gel de agarose 1% fragmentos com tamanho entre 1000 e 1500pb, sendo o tamanho esperado 1311pb (Figura 15).

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação do gene sintético da endopoligalacturonase contido no plasmídeo pUC57



Legenda: Gel de agarose contendo na canaleta 1 o marcador de peso molecular 1kb plus (Thermo Fisher), nas canaletas 2 a 7 a amplificação da ScEPG1 (replicatas) e na canaleta 8 o controle negativo da reação de PCR. (Fonte: elaborado pelo autor).

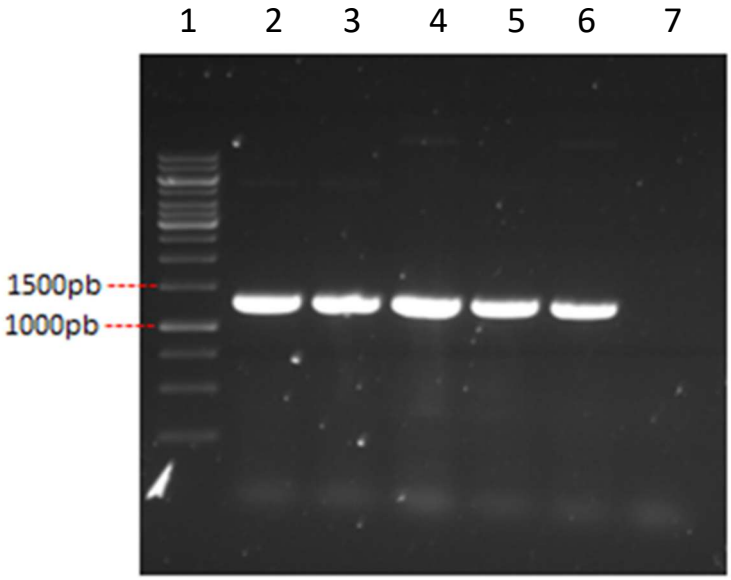
7.2.4 Construção do vetor pPICzαA_scEPG1 em E. coli DH10B

O vetor pPICZαA (ThermoFisher) foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Kpn*I deixando-o na sua forma linear com as extremidades compatíveis com o produto de PCR gerado nas etapas anteriores (Item 6.2.3), que também foram submetidos à digestão com as mesmas enzimas. Após a clivagem, foram purificados e submetidos à reação de ligação que foram posteriormente inseridos em *E. coli* DH10B eletrocompetentes por eletroporação. Estas células foram conservadas para manutenção e armazenamento do material genético plasmídeo + inserto.

7.3 Análise dos clones de E. coli DH10B + pPICzαA_scEPG1

Após a extração do DNA plasmidial, cinco diferentes clones foram analisados por eletroforese em gel de agarose pelo tamanho dos fragmentos gerados (Figura 16), onde os 5 clones possuíam o fragmento do tamanho esperado (1.3kb). Estes cinco clones foram sequenciados utilizando os sete diferentes primers (Tabela 1).

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da construção pPICzαA_scEPG1 obtidos de cinco diferentes clones de *E. coli* DH10B



Legenda: Na primeira canaleta o marcador de peso molecular 1kb plus (Thermo Fisher), nas canaletas 2 a 6 amplificação dos 5 diferentes clones de *E. coli* transformadas com o gene da ScEPG1 no vetor pPICzαA, na canaleta 7 o controle negativo da reação de PCR (Fonte: elaborado pelo autor).

7.3.1 Análise das sequências dos clones de E. coli DH10B + pPICzαA_scEPG1

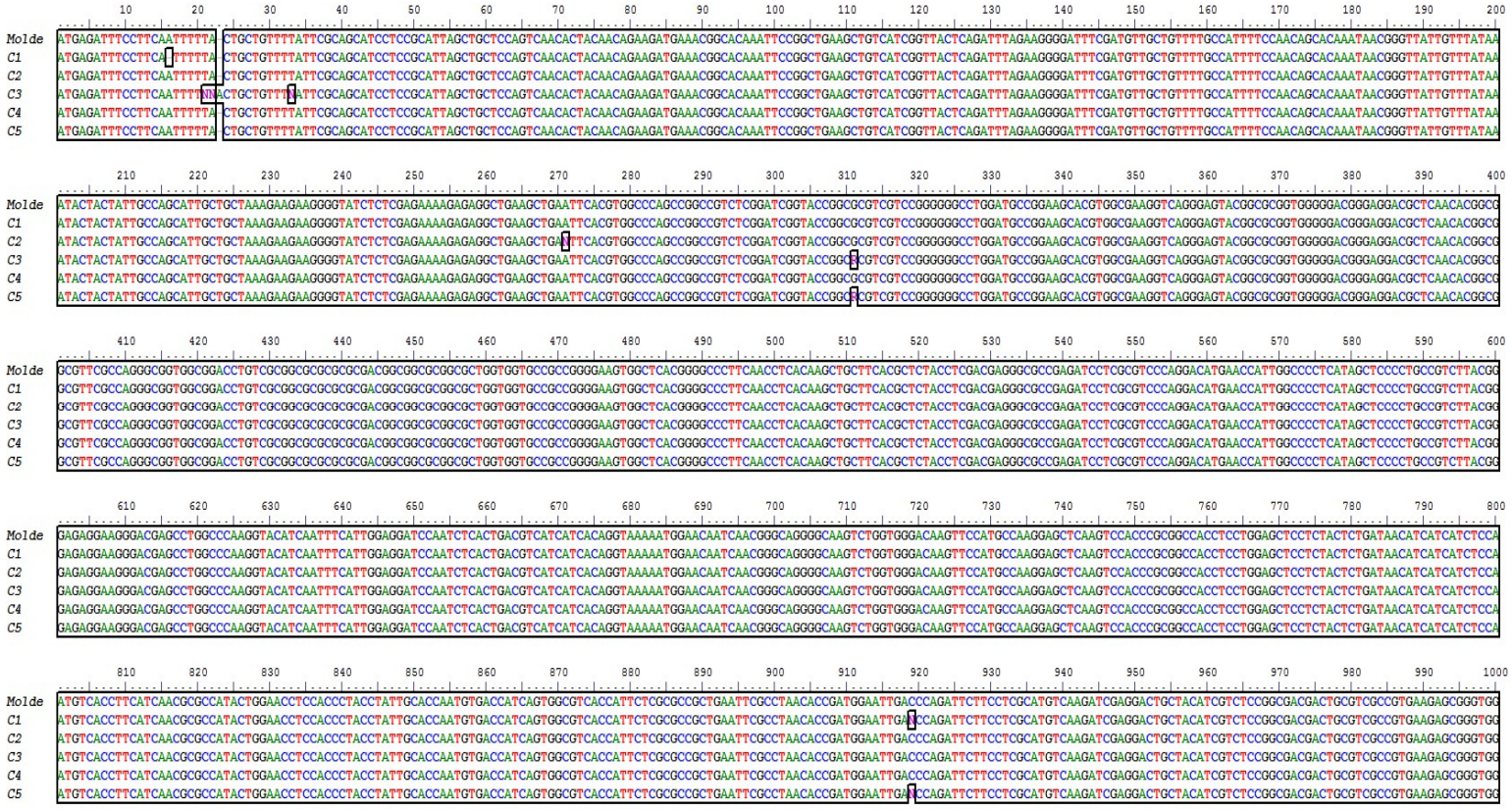
Após a reação de sequenciamento, foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências dos cinco clones que foram comparadas com a sequência molde. O “clone 1” apresentou bases *mismatches* e *gaps* entre as posições 15 – 20 (1), 915 – 920 (1), 1065 – 1070 (1), 1200 – 1205 (1) e 1280 – 1300 (6), totalizando 10 mudanças em relação à sequência esperada. Logo, este clone foi excluído. O “clone 2” apresentou somente uma alteração entre as regiões 270 – 275 (1). O “clone 3” apresentou alterações nas regiões 20 – 25 (2), 30 – 35 (1), 310 – 315 (1) e 1190 – 1195 (1), totalizando 5 bases diferentes do molde. O “clone 4” é 100% idêntico ao molde e o “clone 5” apresentou duas alterações entre as posições 310 – 315 (1) e 915 – 920 (1). A partir destes dados, o clone escolhido para as próximas etapas de clonagem foi o

“clone 4” que apresentou 100% de similaridade com a sequência molde (Figura 17 e Figura 18)

Este resultado não era esperado, pois os métodos utilizados para a amplificação das sequências para a clonagem foram voltados para minimizar o risco de erros, utilizando apenas 25 ciclos de PCR e uma enzima de alta fidelidade (*Phusion Taq* Polimerase - Thermofisher). Estudos comparativos com esta enzima frente à Taq polimerase comum, mostrou que a *Phusion Taq* pode ser até 52x mais precisa (McInerney et al. 2014).

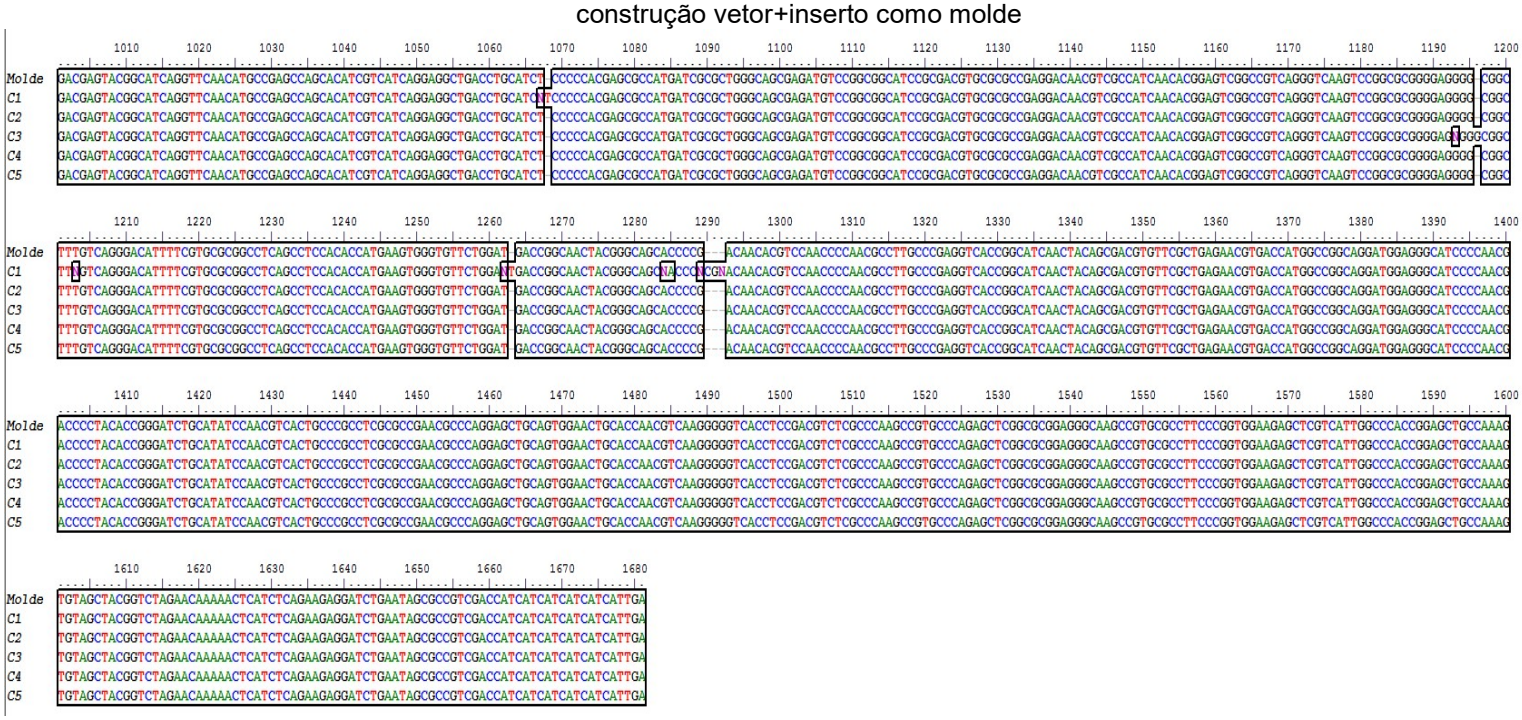
O “clone 4” foi cultivado em grande escala e submetido à extração de DNA plasmidial por Maxi-prep, apresentando um rendimento de 103,1 ng/µL. Este material foi armazenado em freezer -20 ˚C para posterior transformação em *Pichia pastoris* X33.

Figura 17 - Alinhamento múltiplo dos 5 clones selecionados de *E. coli* com o a sequência padrão da construção vetor+inserto como molde



Legenda: Bases diferentes do molde marcadas em preto (BioEdit)

Figura 18 - Alinhamento múltiplo dos 5 clones selecionados de *E. coli* com o a sequência padrão da construção vetor+inserto como molde



Legenda: Bases diferentes do molde marcadas em preto (BioEdit)

7.4 Transformação de *Pichia pastoris* X33

Cinco microgramas de DNA plasmidial do “clone 4” foram linearizados com a enzima *PmeI* para a integração do plasmídeo no genoma de *P. pastoris* X33. A transformação resultou em 4 clones de X33_scEPG1 e 20 clones do vetor pPICzαA vazio, selecionados pela resistência ao antibiótico Zeocina.

7.4.1 Produção da proteína recombinante em Pichia pastoris X33

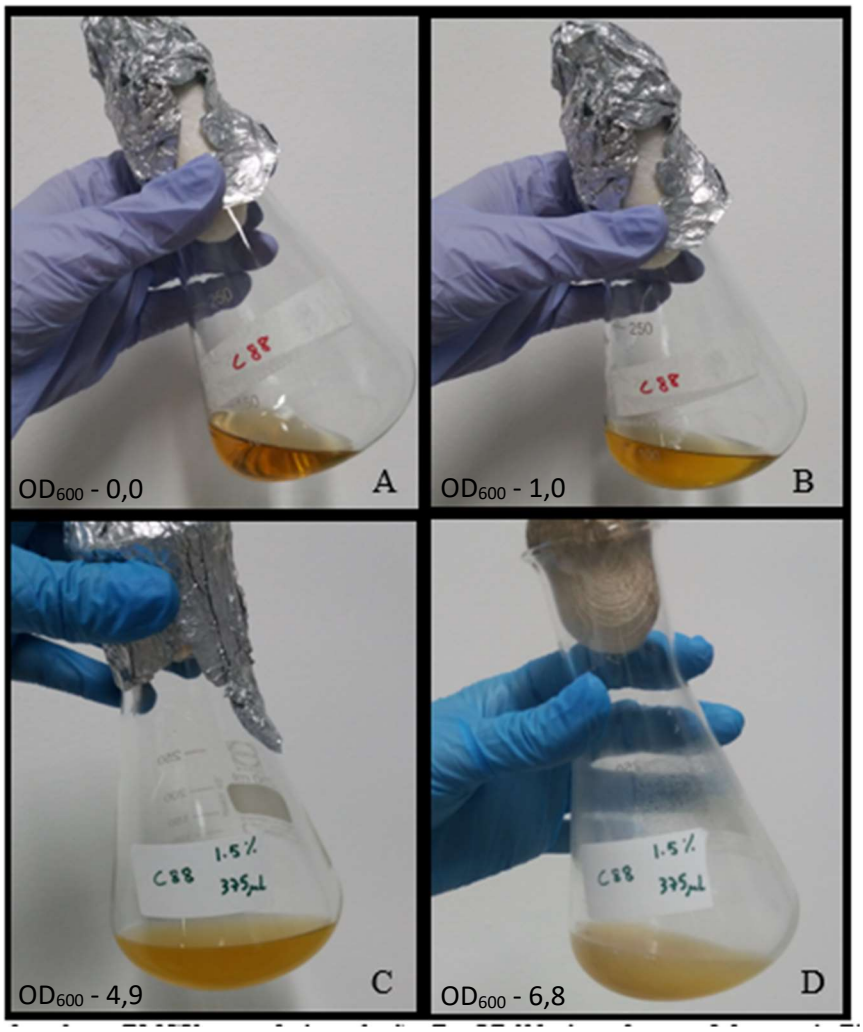
Tendo confirmado por PCR que as colônias recombinantes continham o inserto, foi necessário determinar as condições e métodos ótimos para a expressão do gene clonado.

A curva de crescimento obtida neste cultivo, onde a levedura apresentou boa taxa de crescimento em meio BMGY com o crescimento exponencial em até 24 horas de cultivo, demonstrou a fase ótima para indução e expressão da proteína de interesse. Estas células foram coletadas, lavadas e inoculadas em meio BMMY.

A Figura 19-A mostra o meio BMMY antes da inoculação, a Figura 19-B mostra a turbidez após o ajuste de OD_{600}:1,0, a Figura 19-C mostra a turbidez após 24 horas de cultivo e a Figura 19-D mostra a alta densidade celular após 48 horas. Ferrara et

al. (2006) sugerem que cultivos em alta densidade são mais recomendados para expressão de proteínas heterólogas. Os clones selecionados para expressão foram cultivados por até 144 horas, com OD_{600} inicial de 1,0 e terminando com OD_{600}: ~ 10,0.

Figura 19 - Cultivo de *Pichia pastoris* em meios BMMG e BMMY



Legenda: A - Meio de cultura BMGY antes da inoculação; B - OD_{600} ajustada para 1,0 no meio BMMY para iniciar a indução; C - Meio BMMY com 24h de indução e D - Meio BMMY com 48h de indução (Fonte: elaborado pelo autor).

A otimização das condições de indução é uma etapa crítica na produção de enzimas heterólogas em *P. pastoris,* haja vista a toxicidade que níveis elevados de metanol podem produzir e a dependência que a metabolização dessa molécula tem em relação à aeração da cultura. O cultivo de *Pichia pastoris* pode produzir uma grande quantidade de proteínas heterólogas mesmo em alta densidade celular sob indução de metanol (Wang et al. 2017).

Leveduras metilotróficas parecem possuir um sistema similar de assimilação do metanol envolvendo um mesmo conjunto de enzimas para a via metabólica. A

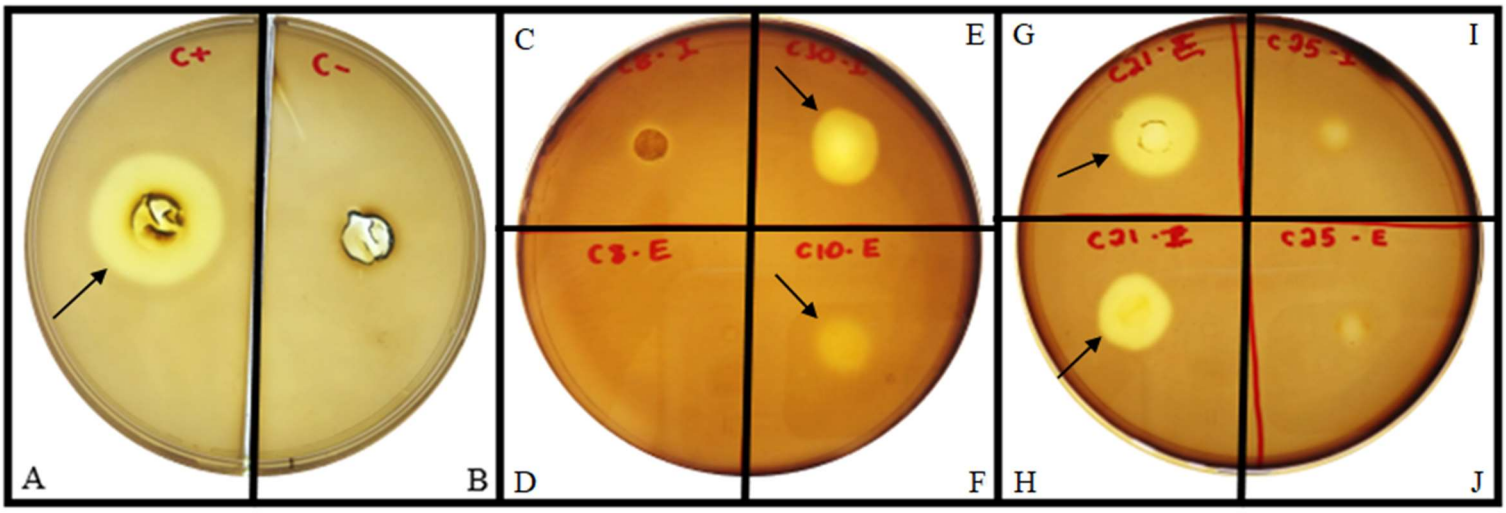
primeira etapa da via é a oxidação do metanol a formaldeído pela enzima álcool oxidase (AOX). Para evitar a toxicidade do peróxido de hidrogênio no processo, esta etapa ocorre no interior de uma organela especializada chamada peroxissomo. Esta enzima possui fraca afinidade pelo O_2, e para compensar esta deficiência, a levedura pode sintetizá-la em grandes quantidades (Cregg et al. 2000).

Muitos dos protocolos de cultivos disponíveis na literatura baseiam-se nos procedimentos descritos no "*Pichia expression Kit*" (Invitrogen). Entretanto, o ideal é a utilização de protocolos mais específicos que permitam o desenvolvimento de uma estratégia específica para cada proteína (Zhang et al. 2007). Tendo em vista a necessidade da otimização, o primeiro protocolo utilizado para expressão da proteína nos quatro clones obtidos foi a utilização de frascos de 200 mL agitados a 250 RPM com a temperatura de 30 ˚C. Este cultivo, apresentou baixos valores de proteína total no meio extracelular (resultados não mostrados). Para confirmar a atividade e a correta secreção destas enzimas para o meio extracelular, os extratos intra e extracelulares foram utilizados.

7.4.2 Teste de atividade enzimática com extratos intra e extracelulares dos 4 clones obtidos

A fim de verificar a atividade e secreção para o meio extracelular da proteína heteróloga, os 4 clones foram cultivados nas condições descritas na metodologia e o sobrenadante foi coletado. Além disso, as células foram centrifugadas, lavadas e rompidas e o material obtido foi utilizado como extrato intracelular. Como controle positivo foi utilizada pectinase de *Aspergillus niger* e como controle negativo, o sobrenadante da linhagem transformada com o vetor pPICZαA vazio. Estes extratos foram utilizados em um ensaio em placa contendo pectina e a formação de um halo incolor no centro do poço indicou atividade enzimática (Figura 20).

Figura 20 - Atividade enzimática em placa dos extratos intra e extracelular dos 4 clones de *Pichia pastoris* obtidos após a clonagem



Legenda: as setas indicam o halo de degradação da pectina formado após a atividade enzimática.
A = controle positivo; B = controle negativo; C = extrato intracelular do clone C8; D = extrato extracelular do clone C8; E = extrato intracelular do clone C10; F = extrato extracelular do clone C10; G = extrato extracelular do clone C21; H = extrato intracelular do clone C21; I = extrato intracelular do clone C25 e J = extrato extracelular do clone C25 (Fonte: elaborado pelo autor).

O resultado obtido para os clones C8 e C25 mostraram uma baixa eficiência para degradação da pectina tanto quando do emprego do extrato intra quanto extracelular. Já quanto aos clones C10 e C21, houve a formação de halos tanto em decorrência do ensaio com extratos intra e extracelulares. A atividade intracelular detectada pode estar relacionada ao não reconhecimento do peptídeo sinal (fator alfa de *Saccharomyces cerevisiae*) ou à formação de corpos de inclusão nestas condições de cultivo. Muitas vezes se observa a secreção ineficiente da proteína para o meio extracelular, comprometendo a estabilidade das enzimas. Divino (2016) utilizou o sistema de expressão em *Pichia pastoris* com vetor pPIC9 para produção da L-Asparaginase de *S. cerevisiae* e detectou atividade enzimática somente no conteúdo intracelular, e sugere a incapacidade do peptídeo sinal (fator alfa) de promover a secreção desta enzima para o meio extracelular.

Um dos fatores que podem influenciar o correto dobramento e secreção da proteína, é a resposta celular adaptativa, que ocorre na maioria dos eucariotos chamada “estresse secretório”. Esta resposta ocorre na tentativa de restaurar o equilíbrio entre a proteína e a capacidade do retículo endoplasmático (Hetz 2012). Este fenômeno pode ocorrer quando as células são expostas a várias condições ambientais ou fisiológicas, incluindo falta de nutrientes, depleção de cálcio do retículo

endoplasmático, infecção viral, hipóxia e até mesmo no desenvolvimento e diferenciação normais (Kohno 2010).

Dada a natureza qualitativa do ensaio enzimático em placa, não é possível afirmar em qual situação a atividade foi mais intensa. Dentre os dois clones C10 e C21 foi feita uma escolha arbitrária pelo segundo. Posteriormente, esse clone foi empregado na checagem da transformação e na otimização da produção da enzima recombinante.

7.4.3 Análise por PCR do DNA e cDNA do clone selecionado

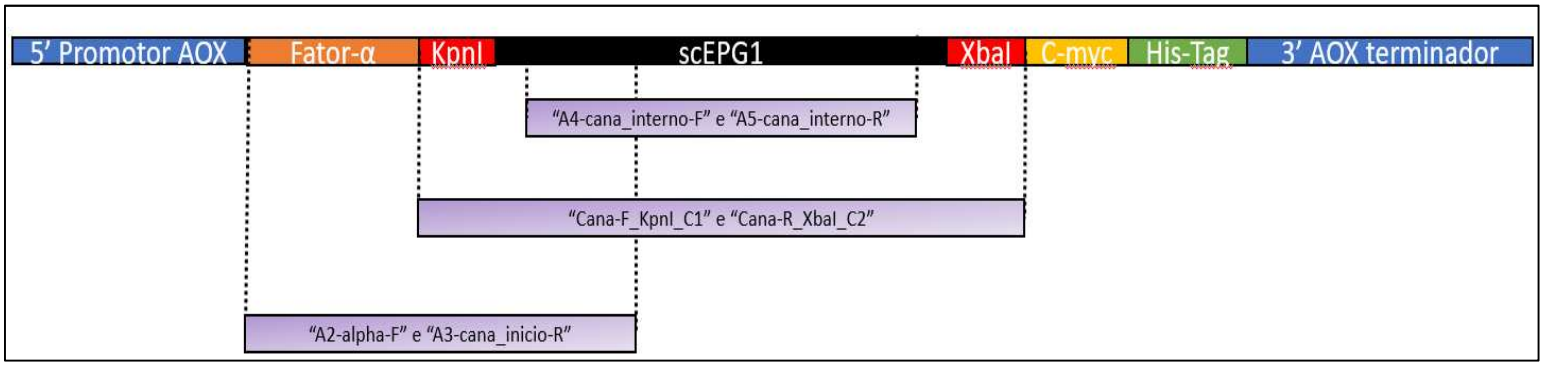
A fim de confirmar a presença do inserto após a transformação, o DNA genômico do clone selecionado e da linhagem transformada com o vetor vazio foram extraídos e submetidos à reação de PCR com 4 diferentes combinações de primers (descritos na Tabela 5 e Figura 21). Além disso, para confirmar que o gene estava sendo expresso durante a indução, foi extraído o RNA total das células que ficaram 144 horas em indução. Após a reação de transcrição reversa, o cDNA foi utilizado como molde com os mesmos conjuntos de primers utilizados anteriormente. A análise destes fragmentos confirmou que o inserto scEPG1 está presente no genoma da *P. pastoris* C21 e que está sendo expresso quando induzido em metanol. As análises individuais de cada fragmento podem ser observadas nos itens 6.4.3.1, 6.4.3.2, 6.4.3.3 e 6.4.3.4. E a sequência obtida do DNA e cDNA estão no apêndice B e C.

Tabela 5 - Primers utilizados para detectar a presença do inserto no clone *Pichia pastoris* C21

Primers	**Região amplificada**	**Tamanho esperado no clone *P. pastoris* C21 (pPICzαA_scEPG1)**	**Tamanho esperado no clone *P. pastoris* Vetor vazio (pPICzαA)**
“A1-AOX-F” e “A7-AOX-R”	Região completa do *locus* AOX	Mut^+ = 1 banda 2,2kb + 1 banda 1,899 pb Mut^S = 1 banda 1,899 pb	1 banda 2,2 kb + 1 banda 588 pb.
“A4-cana_interno-F” e “A5-cana_interno-R”	Região interna específica do gene da scEPG1	1044 pb	Não amplifica
“Cana-F_KpnI_C1” e “Cana-R_XbaI_C2”	Região completa da scEPG1 desde os sítios de clonagem	1311 pb	Não amplifica
“A2-alpha-F” e “A3-cana_inicio-R”	Região do fator alfa do vetor pPICzαA e início do gene da scEPG1	742 pb	Não amplifica

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21 - Esquema de anelamento dos primers específicos para scEPG1



Fonte: elaborado pelo autor.

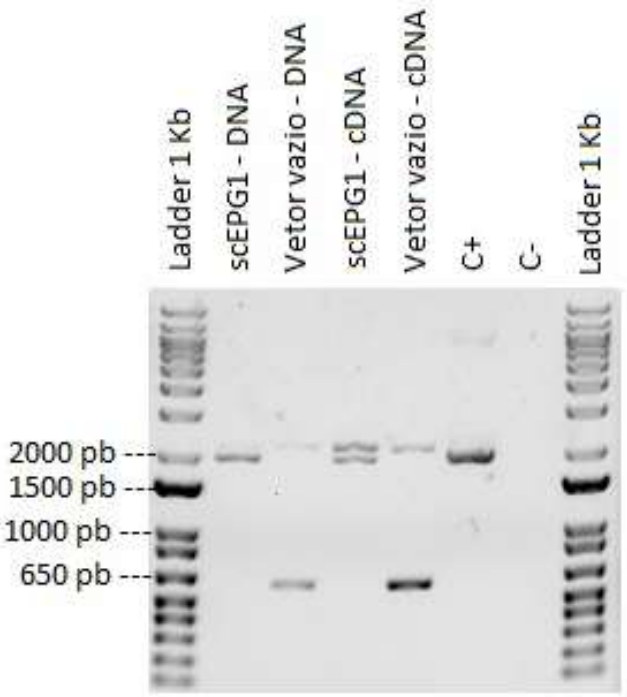
7.4.3.1 Amplificação da região completa do locus AOX para definição do fenótipo Mut^+ ou Mut^S do clone selecionado

Foram utilizados os primers "A1-AOX-F" e "A7-AOX-R" para confirmação do fenótipo do clone C21. Estes primers amplificaram a região completa do *locus* AOX, onde o DNA correspondente à sequência codificante da scEPG1 foi inserido. A levedura *P. pastoris* possui dois genes AOX, sendo AOX1 e AOX 2. O sistema de clonagem com o vetor pPICzαA insere o gene na região do AOX1. O gene AOX1 nativo possui 2.2 Kb e o inserto 1311 pb.

O gene AOX2 é cerca de 97% homólogo ao AOX1, porém a metabolização do metanol pelo AOX2 é muito mais lenta do que pelo AOX1. A perda do gene AOX1 implica na perda de maior parte da atividade da álcool oxidase, resultando em linhagens com fenótipo Mut^S (*methanol utilization slow*). Os outros possíveis fenótipos seriam Mut^+ (methanol utilization plus) que se refere a linhagem com o gene AOX1 funcional, mas também é possível encontrar linhagens com a deleção dos genes AOX1 e AOX2, apresentando o fenótipo Mut^- sendo incapaz de metabolizar metanol como fonte única de carbono (Wang et al. 2017).

Foi realizado previamente um teste bioquímico para detectar se a linhagem escolhida era Mut^+ ou Mut^S (dados não mostrados) verificando a capacidade e o tempo de crescimento em meio mínimo com metanol (MMH). O clone C21 apresentou o fenótipo Mut^+. Sendo assim, espera-se na reação de PCR com os primers AOX, a presença de duas bandas no gel de agarose (Figura 22).

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação do *locus* AOX do material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio



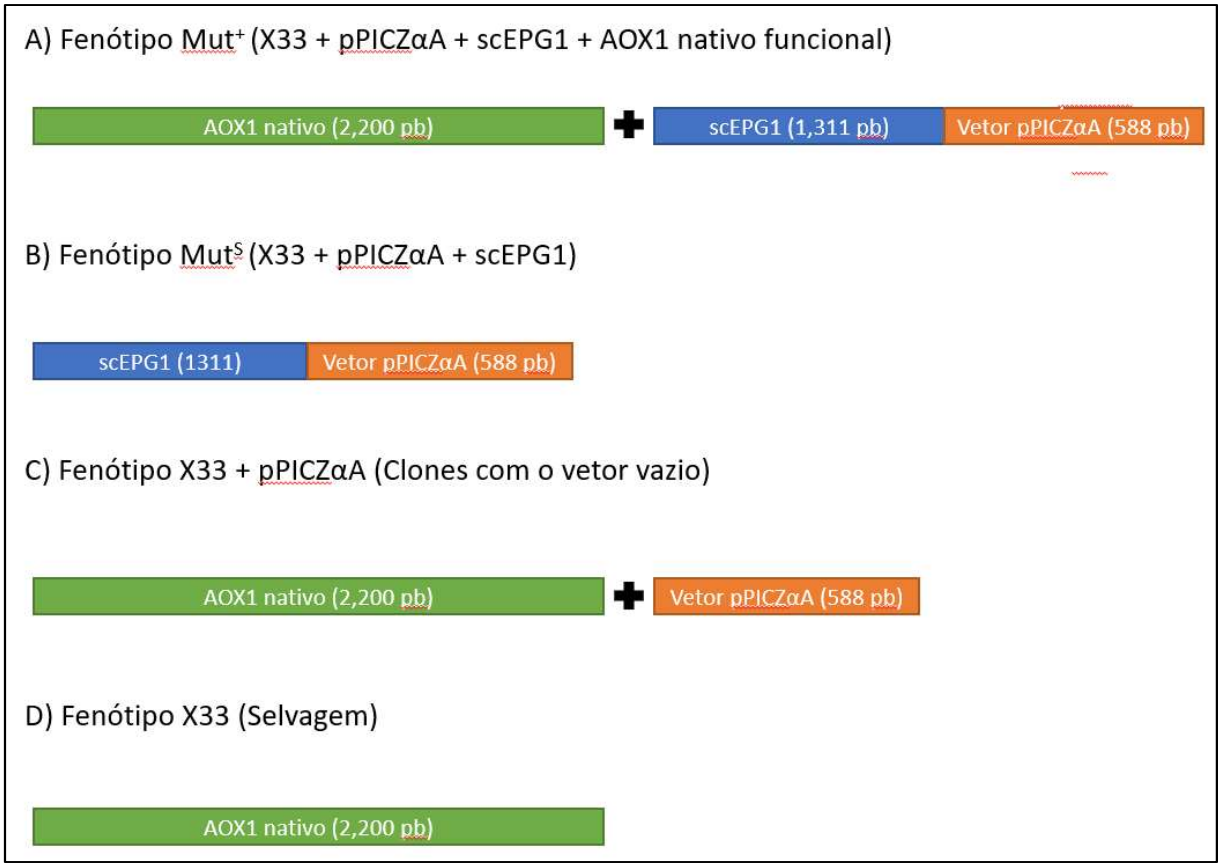
Legenda: Na canaleta 1: Ladder 1kb Plus (Invitrogen), canaleta 2: PCR utilizando DNA genômico do clone C21, canaleta 3: PCR utilizando o DNA genômico de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 4: PCR utilizando cDNA do clone produtor do clone C21, canaleta 5: PCR utilizando cDNA de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 6: controle positivo utilizando o plasmídeo contendo a sequencia codificante da EPG como molde, canaleta 7: controle negativo da reação (H_2O) e canaleta 8: Ladder 1kb Plus (Invitrogen) (Fonte: elaborado pelo autor).

No clone C21, é possível verificar tanto na amplificação com DNA genômico como na amplificação com o transcrito a presença das duas bandas nos tamanhos esperados (2.2 kb AOX nativo e 1.899 pb do inserto) (Figura 22). Além disso, observa-se que a PCR utilizando o DNA extraído da levedura com o vetor vazio a presença de apenas uma banda referente ao AOX1 nativo (2.2 kb) e o gene AOX do vetor pPICzαA de 588 pares de bases, confirmando o fenótipo Mut^+ do clone selecionado, ou seja, apresentará as mesmas taxas de crescimento das linhagens selvagens quando cultivadas em meio contendo somente metanol como fonte de carbono.

Estes resultados podem ser melhor interpretados observando a Figura 23, que apresenta os possíveis perfis fenotípicos. A amplificação por PCR empregando primers AOX a partir de DNA extraído de linhagens Mut^+ gera duas bandas, uma delas correspondente ao gene AOX1 nativo (2.2 kb) e outra de 1,899 pb referente à construção do gene de interesse (1.311 kb) com o vetor (588 pb) (Figura 23-A). Se o clone escolhido fosse Mut^S isso indicaria a perda do *locus* AOX1, ficando apenas com

o *locus* AOX2 selvagem, que resultaria no crescimento lento em metanol, sendo representado por apenas uma banda de 1,899pb referente ao gene da scEPG1 + vetor (Figura 23-B). Quando a levedura é transformada apenas com o vetor vazio pPICzαA, é visível então a banda referente ao AOX1 nativo e o gene do vetor com 588 pares de bases (Figura 23-C) e caso a transformação não tivesse ocorrido, apresentaria o fenótipo de *Pichia pastoris* X33 selvagem, com a amplificação de apenas uma banda de 2.200 pb referente ao AOX1 nativo (Figura 23-D).

Figura 23 – Esquema didático dos possíveis resultados da reação de PCR utilizando os primers A1-AOX-F / A7-AOX-R



Fonte: elaborado pelo autor

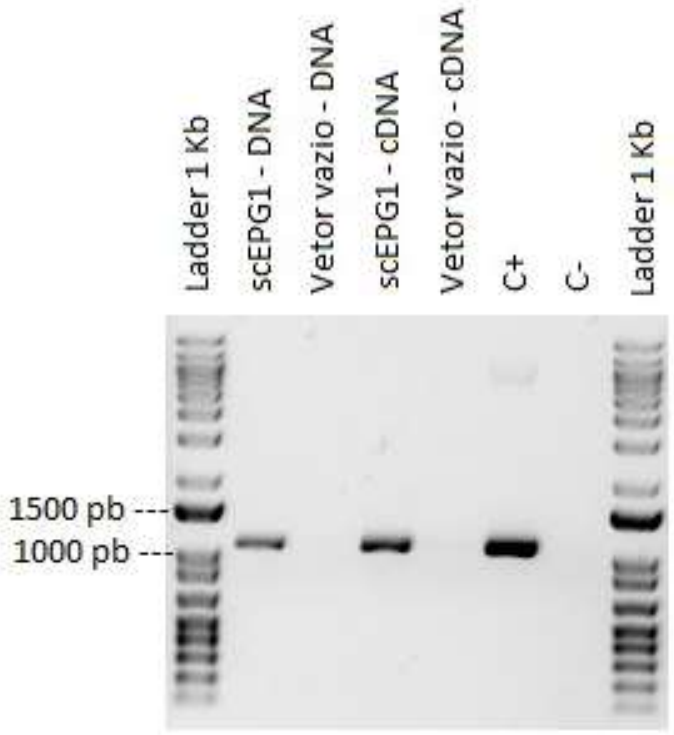
7.4.3.2 Amplificação de regiões específicas da scEPG1 – Região parcial interna.

Para a confirmação da clonagem, foram utilizadas três diferentes combinações de *primers*, garantindo uma melhor cobertura e qualidade do resultado de sequenciamento.

O par de primers utilizado para amplificação da região interna parcial da scEPG1 foi o “A4-cana_interno-F” e “A5-cana_interno-R”. O primer “A4-cana_interno-F” anela no início do gene da scEPG1 e o “A5-cana_interno-R” anela no final do gene

da scEPG1, que produzem um fragmento de 1044 pb. Como resultado, pode-se observar a presença da sequência alvo tanto quando se utiliza o DNA genômico extraído da linhagem transformada como molde, quanto no transcrito após a indução (Figura 24).

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da região interna parcial da scEPG1 com material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio

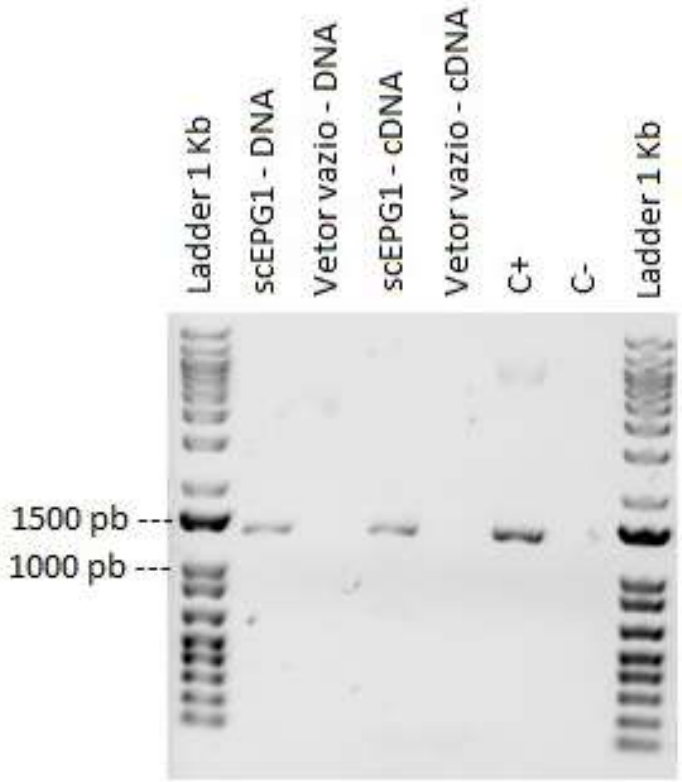


Legenda: Na canaleta 1: Ladder 1kb Plus (Invitrogen), canaleta 2: PCR utilizando DNA genômico do clone C21, canaleta 3: PCR utilizando o DNA genômico de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 4: PCR utilizando cDNA do clone produtor do clone C21, canaleta 5: PCR utilizando cDNA de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 6: controle positivo utilizando o plasmídeo contendo a sequencia codificante da EPG como molde, canaleta 7: controle negativo da reação (H_2O) e canaleta 8: Ladder 1kb Plus (Invitrogen) (Fonte: elaborado pelo autor).

7.4.3.3 Amplificação de regiões específicas da scEPG1 – Região completa.

Outro par de *primers* utilizado foi o “Cana-F_KpnI_C1” e “Cana-R_XbaI_C2”, cujo emprego resulta na amplificação da sequência completa da scEPG1 começando no sítio da enzima de restrição utilizada da região 5’ (*KpnI*) e terminando na região do segundo sítio da enzima de restrição *XbaI,* tendo esse fragmento 1311 pares de bases (Figura 25). O resultado obtido confirma a correta clonagem do inserto na região do sítio múltiplo de clonagem do vetor pPICzαA.

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da região completa da scEPG1 com material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio

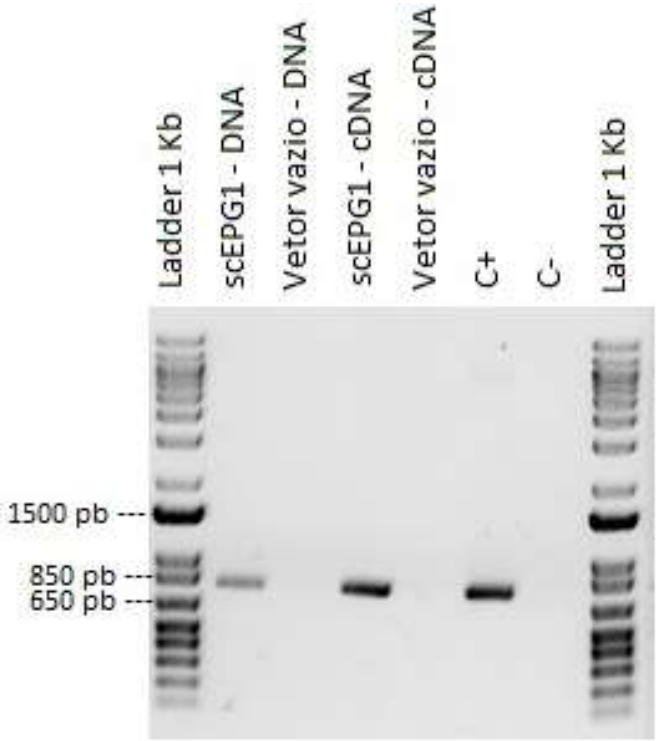


Legenda: Na canaleta 1: Ladder 1kb Plus (Invitrogen), canaleta 2: PCR utilizando DNA genômico do clone C21, canaleta 3: PCR utilizando o DNA genômico de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 4: PCR utilizando cDNA do clone produtor do clone C21, canaleta 5: PCR utilizando cDNA de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 6: controle positivo utilizando o plasmídeo contendo a sequencia codificante da EPG como molde, canaleta 7: controle negativo da reação (H_2O) e canaleta 8: Ladder 1kb Plus (Invitrogen) (Fonte: elaborado pelo autor).

7.4.3.4 Amplificação de regiões específicas da scEPG1 – Região entre o início do vetor pPICzαA e início da scEPG1

E finalmente, o último par de *primers* utilizado foi o “A2-alpha-F” e “A3-cana_inicio-R”. O primer “A2-alpha-F” anela na região do vetor que codifica o fator alfa, responsável pela exportação da proteína recombinante para o meio extracelular, enquanto o primer “A3-cana-inicio-R” amplifica a região interna do início do gene da EPG. Espera-se desta amplificação um fragmento de 742 pb. Os fragmentos obtidos a partir da amplificação usando como molde DNA genômico e cDNA confirmam a presença do gene de interesse no clone selecionado (Figura 26). A confirmação da presença do fator alfa de *Saccharomyces cerevisiae* ligado corretamente ao inserto da scEPG1 sugere que ocorrerá a correta exportação da proteína recombinante ao meio extracelular.

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por PCR da amplificação da região parcial do vetor pPICzαA e região parcial da scEPG1 com material genômico e transcrito do clone *P. pastoris* C21 e *P. pastoris* + vetor vazio



Legenda: Na canaleta 1: Ladder 1kb Plus (Invitrogen), canaleta 2: PCR utilizando DNA genômico do clone C21, canaleta 3: PCR utilizando o DNA genômico de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 4: PCR utilizando cDNA do clone produtor do clone C21, canaleta 5: PCR utilizando cDNA de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, canaleta 6: controle positivo utilizando o plasmídeo contendo a sequencia codificante da EPG como molde, canaleta 7: controle negativo da reação (H_2O) e canaleta 8: Ladder 1kb Plus (Invitrogen) (Fonte: elaborado pelo autor).

O sequenciamento e alinhamento de todos os fragmentos obtidos aqui, tanto com DNA genômico como molde quanto com cDNA, apresentaram 100% de identidade com a sequência de nucleotídeos desenhada para a expressão da proteína (Apêndice B e C) confirmando a correta inserção e fase de leitura do gene da scEPG1.

7.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

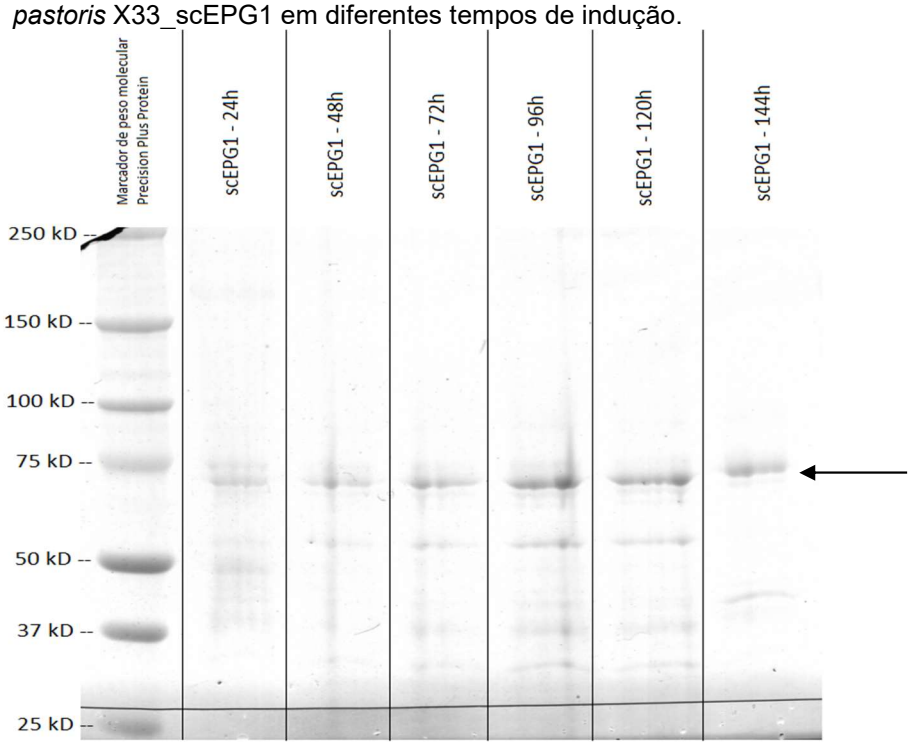
Os extratos brutos das culturas com o mutante *P. pastoris* X33_scEPG1 e a linhagem X33 transformada somente com o vetor vazio foram precipitados e este material foi amplificado em gel de poliacrilamida para análise das diferentes proteínas separadas por peso molecular. Estima-se que a enzima recombinante possua 60,1 kDa. Entretanto, pode haver até seis glicosilações, que afetariam diretamente o tamanho da enzima. Heimo et al. (1997) observaram uma diferença de aproximadamente 10 kDa na expressão em *Pichia pastoris* do domínio catalítico da glicoamilase de *Aspergillus awamori* que foi atribuída a três possíveis glicosilações.

Na Figura 27, é possível verificar a presença de bandas de proteínas de diferentes tamanhos, sendo a mais intensa uma próxima à banda do marcador de 75 kDa. Este aumento de pode ser atribuído ao padrão de glicosilação. É possível verificar também que a intensidade desta banda aumenta gradativamente em relação ao tempo de indução.

Lang and Looman (1995) expressaram uma poligalacturonase de *Aspergillus niger* em *Saccharomyces cerevisiae*. O tamanho aparente da enzima recombinante era levemente maior do que a enzima nativa (38,4 kDa e 37,3 kDa respectivamente). Esta variação de massa molecular pode ser pela diferença no padrão de glicosilação entre as duas proteínas. Segundo o preditor "NetOGlyc 4.0", esta enzima pode ter até seis glicosilações, e este fator também influenciaria no tamanho esperado da proteína.

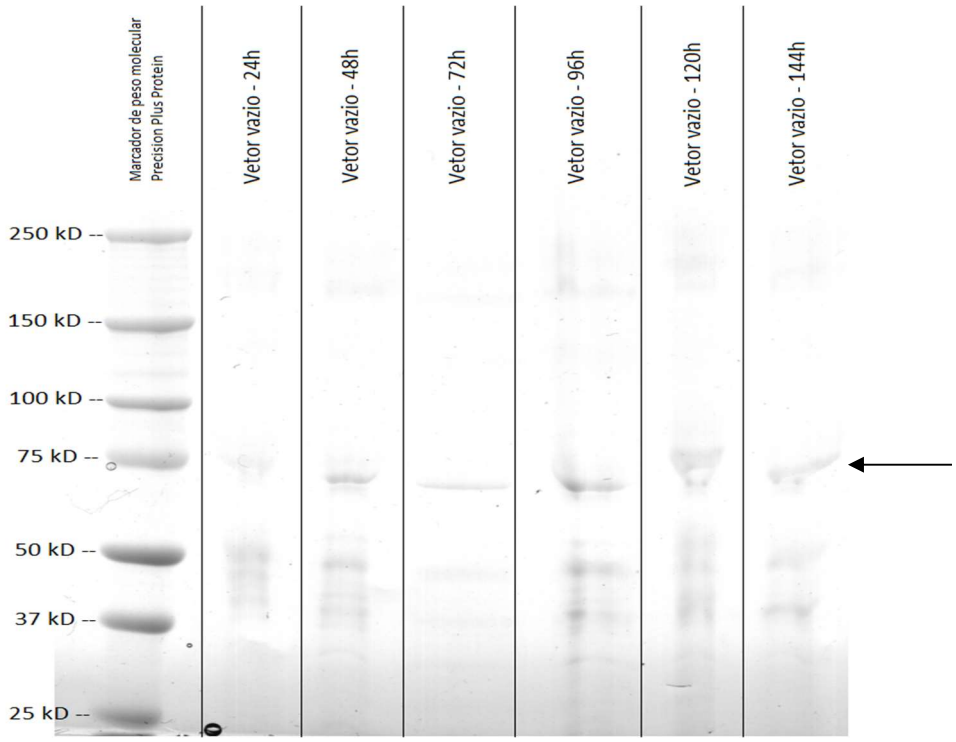
Além disso, a enzima álcool oxidase codificada pelos genes AOX1 e AOX2 possui o peso molecular de 72 kDa (Ellis et al. 1985). Esta enzima, por ter o peso molecular aproximado da enzima heteróloga, dificulta a visualização no gel, e explica a presença de bandas do mesmo tamanho nos extratos produzidos pela linhagem transformada apenas com o vetor vazio (Figura 28).

Figura 27 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com extratos brutos obtidos da linhagem mutante *P. pastoris* X33_scEPG1 em diferentes tempos de indução.



Legenda: Na primeira canaleta: marcador de peso molecular "Precision Plus Protein", na canaleta 2: extrato bruto com 24h de indução, canaleta 3: extrato bruto com 48h de indução, canaleta 4: extrato bruto com 72h de indução, canaleta 5: extrato bruto com 120h de indução, canaleta 6: extrato bruto com 144h de indução (Fonte: elaborado pelo autor).

Figura 28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com extratos brutos obtidos da linhagem mutante P. pastoris X33 + Vetor vazio em diferentes tempos de indução.



Legenda: Na primeira canaleta: marcador de peso molecular "Precision Plus Protein", na canaleta 2: extrato bruto com 24h de indução, canaleta 3: extrato bruto com 48h de indução, canaleta 4: extrato bruto com 72h de indução, canaleta 5: extrato bruto com 120h de indução, canaleta 6: extrato bruto com 144h de indução (Fonte: elaborado pelo autor).

7.6 Otimização da expressão da enzima recombinante

Para a obtenção de uma maior concentração de scEPG1 recombinante no conteúdo extracelular, foram realizadas variações na densidade celular no início da indução, concentração final de metanol, temperatura de cultivo e velocidade rotacional.

Diferentes testes foram realizados sem sucesso, envolvendo: (a) variação da concentração final de metanol. Esta modificação mostrou um aumento de proteínas totais na concentração final de 1,5%, sendo esta mantida nos experimentos posteriores; (b) aumento da densidade celular (OD_{600}) no começo da indução, variando de OD 1,0, OD 3,0 e OD 6,0. Esta otimização mostrou maiores valores de proteínas totais quando utilizada a OD 1,0; (c) variação na temperatura de cultivo. Foram testadas culturas crescidas a 22˚C, 25˚C, 28˚C e 30˚C, sendo a cultura crescida a 28˚C a melhor produtora de proteínas totais e (d) variação na rotação no cultivo.

Foram também testadas culturas crescidas a 180 RPM e 250 RPM. As culturas crescidas a 180 RPM apresentaram maiores valores de proteínas totais (Tabela 6).

Tabela 6 - Otimização da expressão de proteínas totais pelo clone C21 (*Pichia pastoris* X33_pPICZαA_scEPG1)

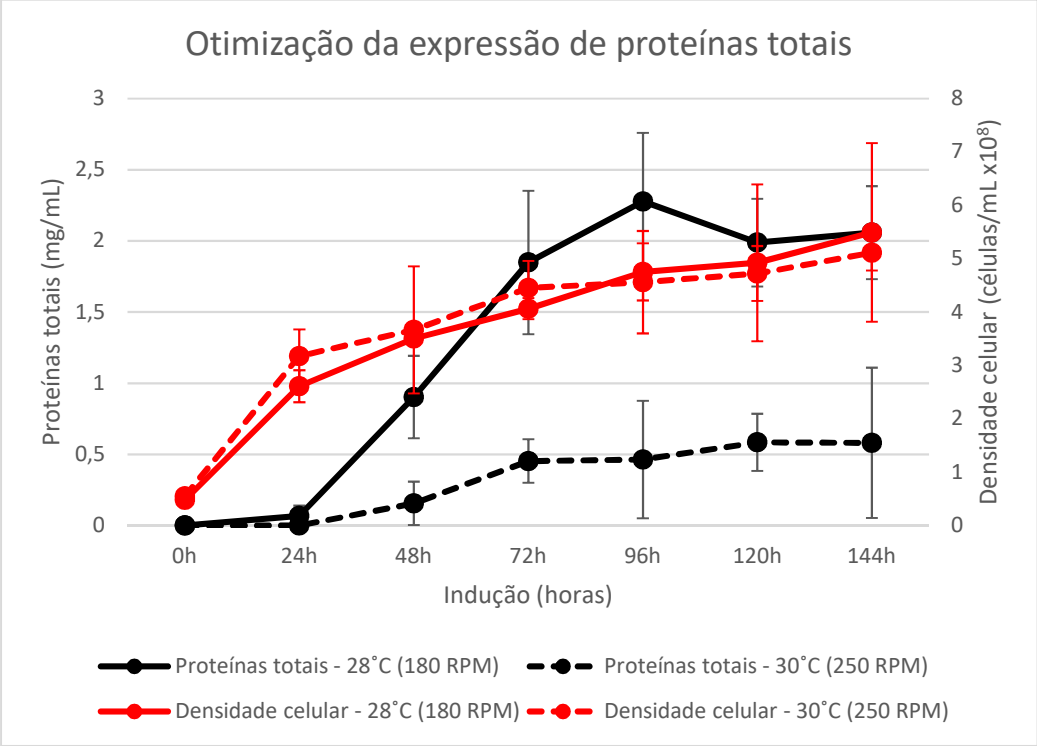
Volume da cultura	OD_{600} inicial na fase de indução	Concentração final de Metanol	Temperatura	Agitação
800 µL (Placas deep weel 2 mL)	OD_{600}: 1.0	0.5 %	30 ˚C	250 RPM
25 mL (Frascos de 250 mL)	OD_{600}: 1.0	0.5 % 1.0 % 1.5 %	30 ˚C	250 RPM
25 mL (Frascos de 250 mL)	OD_{600}: 1.0 OD_{600}: 3.0 OD_{600}: 6.0	1.5 %	30 ˚C	250 RPM
25 mL (Frascos de 250 mL)	OD_{600}: 1.0	1.5 %	22 ˚C 25 ˚C 28 ˚C 30 ˚C	250 RPM
200 mL (Frascos de 2 L)	OD_{600}: 1.0	1.5 %	28 ˚C	180 RPM 250 RPM
200 mL (Frascos de 2 L) - Otimizado	OD_{600}: 1.0	1.5 %	28 ˚C	180 RPM

Legenda: em vermelho, os maiores valores de proteínas totais obtidos. Fonte: elaborado pelo autor

O tempo de indução pode variar na expressão de algumas proteínas. Luiz (2011), expressando o peptídeo antimicrobiano abaecina do himenóptero *Apis mellifera* em *Pichia pastoris*, observou que a proteína heteróloga só foi detectada a partir de 72 horas. Araújo (2008) também apresentou dados em que a proteína quimosina apresenta maior concentração entre os tempos de indução 72 e 96 horas. O resultado obtido no trabalho reflete a quantidade de proteínas totais, com pico em 96 horas, apresentando 2,27 mg/ml. Faber et al., (1995) discutem que *Pichia pastoris* secreta níveis relativamente baixos de proteínas endógenas, e que cerca de 80-90% das proteínas totais do sobrenadante correspondem à proteína heteróloga.

A comparação da curva de crescimento e conteúdo de proteínas totais do protocolo otimizado com o protocolo padrão sugerido pelo "*Pichia expression Kit* (Invitrogen)" - que indica a indução com 0,5% de metanol, 30˚C e 250-300 RPM - demonstra que a otimização da indução elaborada no presente trabalho (1,5% de metanol, 28˚C e 180 RPM) foi mais eficiente para a produção de proteínas (Figura 29).

Figura 29 - Otimização da expressão de proteínas totais do clone *P. pastoris* C21



Legenda: Linhas pretas indicam a quantidade de proteínas totais pelo método de Bradford em mg/mL e linhas vermelhas a densidade celular da cultura em células/mL. Linhas contínuas indicam a otimização do protocolo utilizada neste trabalho e linhas tracejadas o protocolo padrão de expressão recomendado pelo fabricante (Fonte: elaborado pelo autor).

Os valores utilizados neste gráfico (Figura 29) são referentes à média obtida nas linhagens mutantes X33_C21 subtraída dos valores obtidos para as culturas com o vetor vazio. Todos os valores obtidos para ambas as culturas podem ser encontrados no Apêndice E.

Santoso et al. (2012) testaram diferentes concentrações de metanol e tempos de indução para o hormônio glicoproteico eritropoetina humana. Para tal, testaram uma variação de metanol de 0 a 20% na concentração final e tempos de indução de 24 a 144 horas. Os autores concluíram que para esta proteína a melhor condição seria 2,5% de metanol em 48 horas de indução.

A temperatura ótima para *Pichia pastoris* é 30°C. Entretanto, neste trabalho, a temperatura de 28°C teve melhores resultados. Foi descrito previamente que menores temperaturas durante a fase indução são benéficas para expressão extracelular, pois podem prevenir o “estresse secretório” e a formação de corpos de inclusão, sendo vantajoso para o processamento correto de proteínas (Sato et al. 2009; Jin et al. 2010).

Estes resultados mostram que as condições ótimas de expressão de uma proteína heteróloga em *Pichia pastoris* podem variar e confirmam a necessidade da otimização da indução para cada proteína.

7.7 Detecção da atividade enzimática

A fim de confirmar se as proteínas expressas possuíam atividade enzimática, diversos ensaios foram empregados. A atividade de pectinase pode ser detectada em placas de ágar com poligalacturonatos. Esta atividade é visualizada por vermelho de rutênio, iodo ou pela incubação das placas com soluções sais de amônio quaternário (McKay 1988). Esta atividade também é comumente quantificada pela liberação de açúcares redutores através de métodos colorimétricos por DNS (Mopper and Melvin Gindler 1973; McFeeters 1980; Fox and Robyt 1991) e Somogyi-Nelson (Nelson 1944; Somogyi 1952) ou pela variação na viscosidade na reação. Entretanto, as medidas de viscosidade possuem uma limitação por não possuírem uma correlação linear entre a redução da viscosidade e o número de hidrólises ocorridas no substrato (Jayani et al. 2005).

Os ensaios realizados em placa apresentaram halos de degradação da pectina quando utilizados os extratos brutos obtidos da indução após 144 horas da X33_pPICZαA_scEPG1, enquanto o extrato bruto produzido pelo controle negativo da levedura com o vetor vazio X33_pPICzαA não apresentou halos de degradação da pectina. Sendo assim, este método foi utilizado para confirmação de forma qualitativa da atividade enzimática (Figura 20).

Os métodos quantitativos utilizados neste trabalho se baseiam na medida de açúcar redutor liberado após a hidrólise enzimática. A diferença dessa metodologia em relação a outros métodos de determinação de açúcares redutores é a sensibilidade do método, cuja faixa de determinação situa-se entre 25 e 500 mg/L, entretanto esta reação não é específica, podendo sofrer interferência de outros componentes redutores (Maldonade et al. 2013).

O ensaio enzimático com a scEPG1 pelo método de Somogyi-Nelson não apresentou resultados diferenciais entre o clone produtor da scEPG1 e o controle vetor vazio (dados não mostrados) e por isso não foi utilizado nos ensaios posteriores. Já o método por DNS apresentou resultados diferenciais e a partir disso, foi realizada

a otimização do ensaio. Breuil and Saddler (1985) observaram as principais diferenças entre métodos de DNS e Somogyi-Nelson. Utilizaram a enzima endo-1,4-β-d-glicanase de *T. harzianum* e verificaram que os valores obtidos com o ensaio de DNS foram sempre consideravelmente superiores aos obtidos com o ensaio de Somogyi-Nelson.

O pico de atividade da scEPG1 usando o ensaio de DNS foi observado correspondente após 22 horas de incubação, quando foi atingida a concentração de 0,136 U/mL. A partir deste ensaio, este o tempo foi definido para os ensaios de variação de temperatura e pH.

7.7.1 Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

Os ensaios conduzidos neste trabalho levaram à observação que a endopoligalacturonase recombinante apresentou maiores níveis de atividade sobre ácido poligalacturônico na temperatura de 45 ˚C por 22 horas (Figura 30). Em relação ao pH, dentro da faixa testada o valor máximo de atividade foi obtido quando da incubação com substrato dissolvido no tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 (Figura 31). O valor de pH ótimo obtido na enzima recombinante scEPG1 se encontra muito próxima ao seu ponto isoelétrico (pI teórico de 5,30). Este valor ótimo de pH pode denominar a enzima scEPG1 como uma pectinase ácida.

Dentre os parâmetros cinéticos testados, a temperatura e o pH têm fundamental relevância, principalmente em aplicações biotecnológicas. O coquetel enzimático Celluclast® é um produto derivado do fungo *Trichoderma reesei* sendo rico em celulases. A aplicação de enzimas acessórias neste coquetel pode ser realizada, entretanto é importante que possuam atividade em pH e temperatura próximos. O manual deste produto indica que estas enzimas possuem atividade ótima entre 50 e 60 °C e a faixa de pH entre 4,5 e 6.0 (Sørensen et al. 2007).

Pectinases ácidas são amplamente utilizadas na indústria de sucos e vinhos e são comumente produzidas por fungos, principalmente *Aspergillus niger* (Pedrolli et al. 2009). Isso demonstra que a endopoligalacturonase recombinante pode apresentar aplicabilidade industrial não somente contexto de bioenergia, mas também em outros setores.

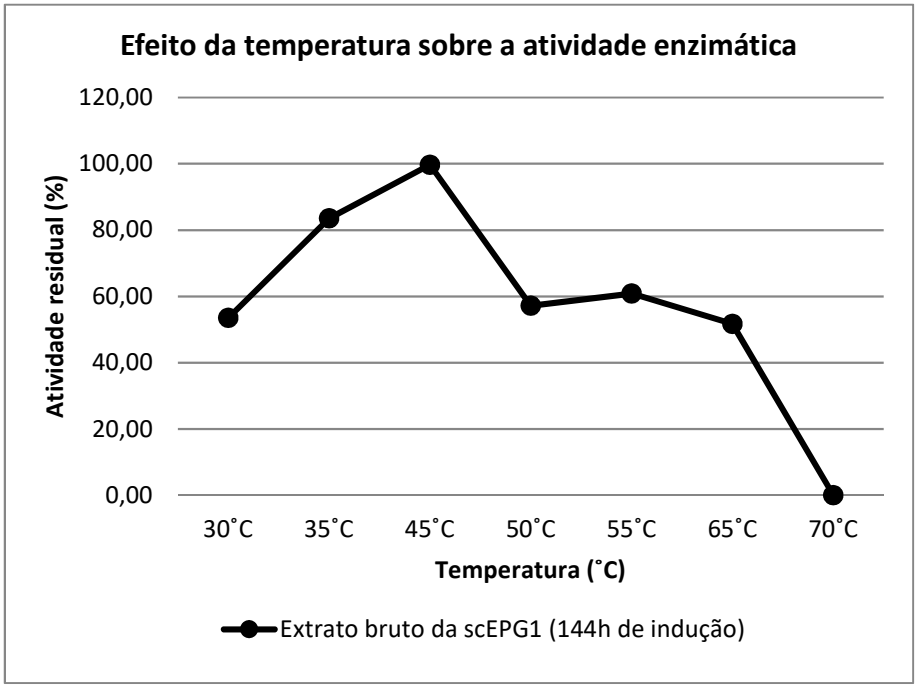
Pectinases de fungos filamentosos como *Cryphonectria parasitica*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans*, *Sclerotium rolfsii*, *Mucor*

flavus e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* apresentam valores similares de temperatura ótima (entre 30 – 55 ˚C) e pH (entre 3.5 – 5.5) (Gao and Shain 1994; Blanco et al. 1994; Channe and Shewale 1995; Serrat et al. 2002; Gadre et al. 2003; Thakur et al. 2010; Borin et al. 2015; Abdulrachman et al. 2017). Em plantas, a pectinase produzida pela planta *Muntingia calabura* possui a temperatura ótima de 40˚C e pH 4,0 (Gayathri et al. 2007). Por outro lado, pectinases de bactérias como *Bacillus* sp. possuem a temperatura ótima um pouco acima da encontrada neste trabalho, variando de 60 a 75 ˚C e o pH entre 5 e 10,5 (Javaid Asad M et al. 2015).

Os resultados dos ensaios de efeito de temperatura e pH foram expressos em atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade obtida nas seguintes condições: Temperatura 45 ˚C e pH 5,0 por 22 horas, apresentando o valor de 0,136 U/mL. Os valores brutos obtidos nestas reações podem ser encontrados no Apêndice F.

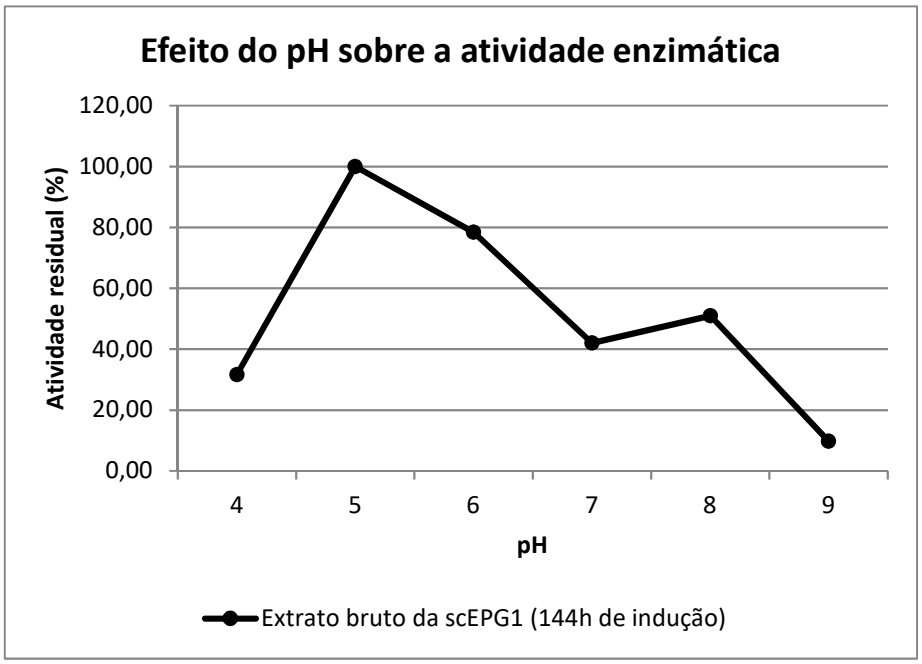
O baixo valor de atividade em ácido poligalacturônico já foi observado em trabalhos anteriores de caracterização de uma poligalacturonase D, produzida por *A. niger.* Tais trabalhos demonstraram que o substrato pode influenciar diretamente na atividade da enzima, e devido à grande variedade de tipos de pectina existentes é importante realizar diferentes ensaios enzimáticos com uma maior variedade de substratos e diferentes graus de polimerização (Pařenicová et al. 2000).

Figura 30 - Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 31 - Efeito do pH sobre a atividade enzimática



Fonte: elaborado pelo autor.

7.7.2 Efeito de íons metálicos, agentes redutores, detergentes e quelantes sobre a atividade pectinolítica da scEPG1

Alguns componentes orgânicos ou inorgânicos podem modificar a atividade das enzimas, atuando como inibidores ou ativadores. Quando atuam como ativadores, estes aceleram a reação enzimática por promoverem o estado ativo da enzima ou do substrato, estabilizando a conformação do seu sítio ativo. Dados da literatura sugerem que muitas enzimas pectinolíticas podem ser dependentes de alguns íons metálicos, os quais facilitam a interação entre o sítio catalítico e o substrato, promovendo a formação do produto (Kobayashi and Palumbo 2000; Kaur et al. 2004).

As proteínas podem ser desnaturadas pela presença de agentes redutores como β-mercaptoetanol, Ditiotreitol (DTT) ou pelo detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Estes interferentes reduzem as ligações dissulfeto tornando regiões das proteínas mais acessíveis (Alfenas and Brune 1998). Íons de sais e metais como sódio, ferro, potássio e cálcio costumar estar associados a enzimas, enquanto metais pesados como cobalto, cobre e zinco geralmente possuem efeitos inibidores. O quelante etilenodiaminotetraacetato (EDTA) remove os íons cálcio que interagem com a pectina, tornando-a mais acessível. Entretanto, algumas enzimas possuem átomos de metais associados às suas estruturas ou na função de cofatores, podendo estes serem afetados pelo EDTA, que tende a remover estes metais e consequentemente prejudicar o funcionamento normal destas enzimas (Niaz et al. 2011).

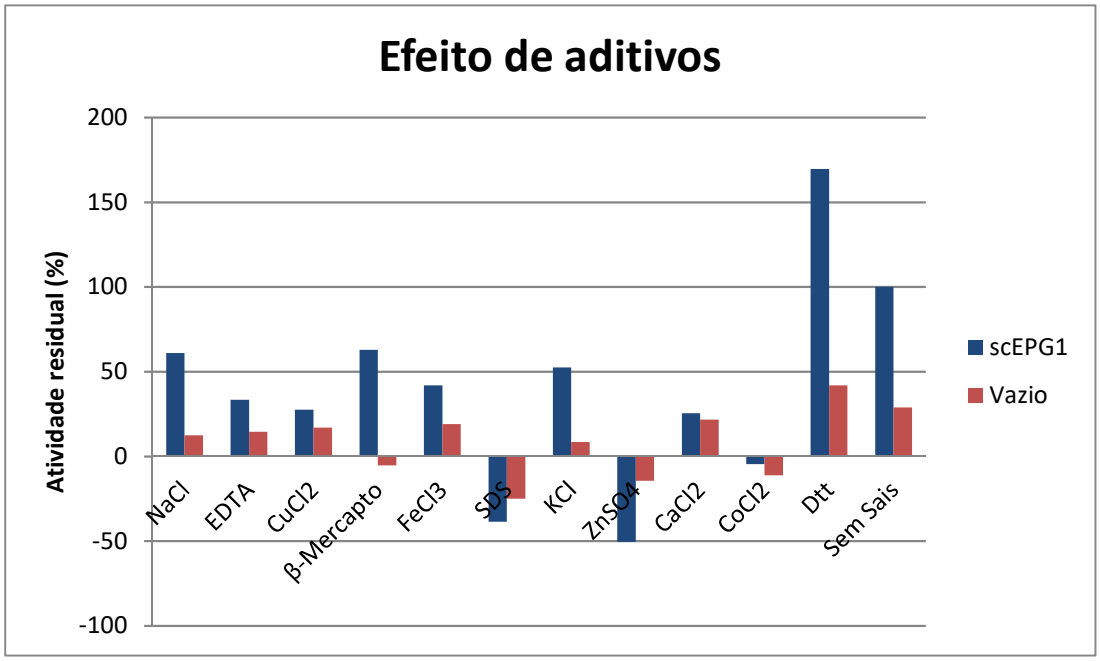
Com o objetivo de melhorar a atividade enzimática obtida até o momento, alguns reagentes foram adicionados à reação com scEPG1. Como resultado, pode-se observar que a adição de sais, detergentes e quelantes atuaram como inibidores da atividade enzimática. Por outro lado, a adição do agente redutor (Ditiotreitol – DTT) apresentou valores superiores de atividade quando comparados com o controle sem adição de sais (Figura 32)

Celestino et al. (2006) observaram na pectinase produzida por *Acrophialophora nainiana* que a adição de íons como Cu^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Al^{3+} Mn^{2+} e Zn^{2} apresentou resultados similares de inibição em uma faixa de 40 – 70% e a adição de DTT aumentou a atividade enzimática em até 140%. Por outro lado, o agente redutor β-mercaptoetanol apresentou resultados diferentes dos daqui obtidos, onde foi observado o efeito estimulatório de atividade em 80%. Já no presente trabalho, houve

efeito inibitório de cerca de 45% quando do emprego desse reagente, assim como para a endopoligalacturonase de *Sporotrichum thermophile* (Kaur et al. 2004). Resultados similares com uma pectinase de *Bacillus subtilis* foram encontrados quando frente ao SDS e β-mercaptoetanol houve redução da atividade (Oumer and Abate 2017). Outros estudos com poligalacturonases de *Bacillus* sp. e *S. thermophile* mostraram que esta enzima foi estimulada pela adição de Mn^{2+} e Fe^{2+}, mas inibida por Cu^{2+} e Zn^{2+} (Kobayashi and Palumbo 2000; Kaur et al. 2004).

Estes agentes podem apresentar resultados distintos entre diferentes enzimas pois grupos essenciais podem estar inacessíveis e consequentemente não serem modificados pelo agente utilizado. Além disso, a modificação de grupos distantes do sítio ativo pode promover mudanças conformacionais e consequente perda de atividade enzimática (Kashyap et al. 2001; Malheiros Ferreira et al. 2004).

Figura 32 - Efeito de interferentes sobre a atividade enzimática



Fonte: elaborado pelo autor.

7.7.2.1 Concentração de DTT sobre a atividade pectinolítica da ScEPG1

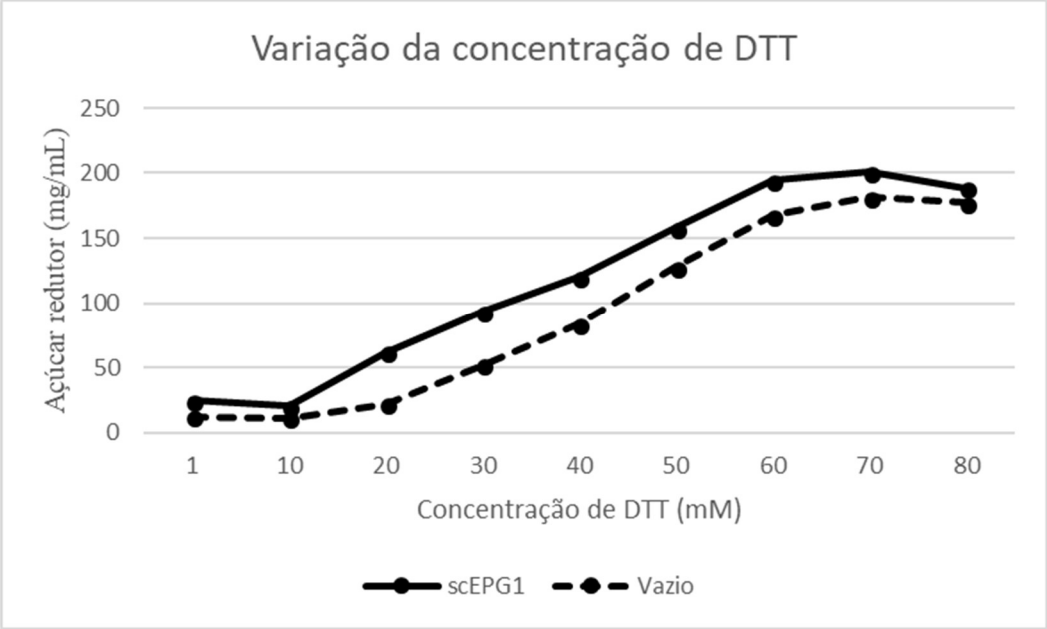
O estímulo da atividade enzimática da scEPG1 pelo agente redutor Ditiotreitol (DTT) já foi reportado anteriormente em outras enzimas com atividade de pectinase. Celestino et al. (2006) caracterizaram uma enzima com atividade de exopolimetilgalacturonato liase (EC. 4.2.2.9) do fungo *Acrophialophora nainiana* e observaram que, frente ao DTT a 50mM, observou-se um aumento da atividade

relativa em 140%. Amid et al. (2014) obteve resultados similares, onde a adição de 5mM de DTT causou um aumento de 10% na atividade enzimática de uma pectinase termoalcalina de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*).

A adição do agente redutor DTT a 18mM causou um estímulo de 70% na atividade da scEPG1 pelo método DNS. Este resultado poderia indicar que os resíduos de L-cisteína estariam envolvidos na ligação de hidrogênio com o substrato e no dobramento enzimático (Malheiros Ferreira et al. 2004). Além disso, essa ativação pode ser atribuída à redução no tamanho do agregado pela destruição das ligações dissulfeto intermoleculares e proteção dos grupos tiol que estabilizam a estrutura tridimensional da enzima (Khedher et al. 2008).

Para determinar a melhor concentração de DTT na reação enzimática, foram adicionadas diferentes concentrações deste agente redutor (de 1 a 80 mM), onde a melhor concentração de DTT foi de 60mM (Figura 33). Entretanto, é possível verificar que o extrato do vetor vazio utilizado como controle também apresentou um aumento de atividade em relação ao aumento da concentração de DTT. Considerando que para estes ensaios enzimáticos foi utilizado o extrato bruto da levedura transformada e que o extrato utilizado como controle do vetor vazio também apresentou valores de atividade enzimática, é possível que haja alguma proteína no sobrenadante que possa ter influenciado este resultado. Isto significa que apenas parte do resultado observado com a adição de DTT pode ser de fato atribuída a um efeito sobre a enzima scEPG1. Não se pode descartar a possibilidade de que grande parte deste aumento se deva a alguma interferência no método do DNS.

Figura 33 - Variação na concentração de DTT sobre a atividade enzimática

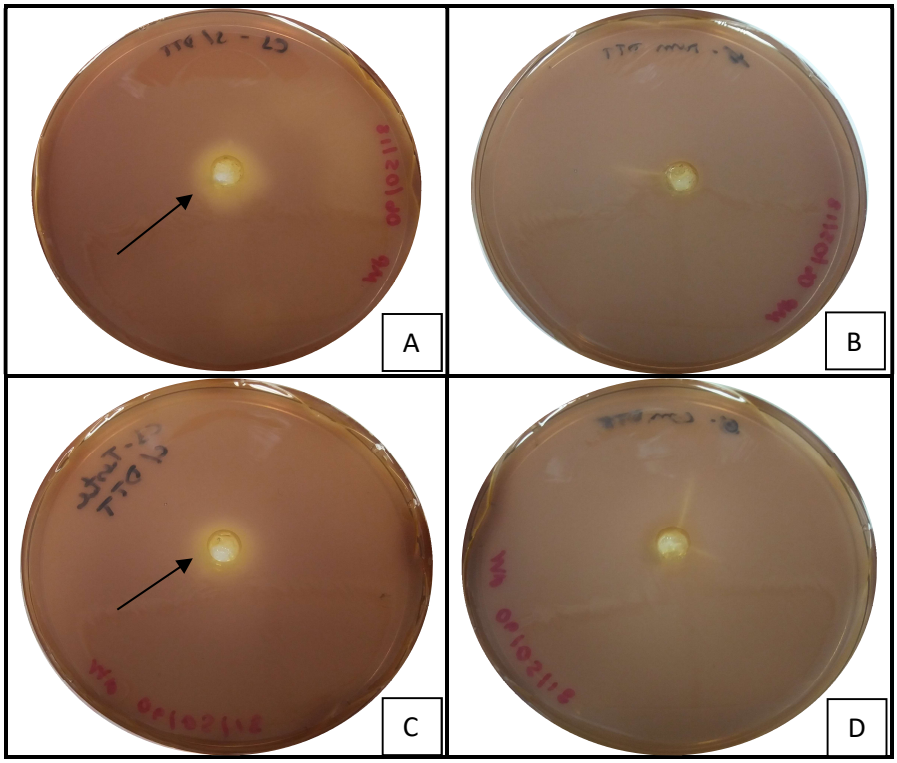


Fonte: elaborado pelo autor

Diversos estudos mostraram que é possível identificar *in vitro*, pelo método DNS, uma interferência pela atividade de outra enzima chamada desulfurase quando há a presença desta enzima, de L-cisteína e de Ditiotreitol (DTT) (Zheng et al. 1993; Frazzon et al. 2007). A enzima desulfurase de cisteína, envolvida na biogênese do cluster de ferro-enxofre (Fe/S) é necessária para a tio-modificação pós-transcricional de RNAt mitocondrial e citoplasmático. É descrito na literatura a presença do gene responsável pela expressão da enzima desulfurase (Nfs1) no genoma de *Pichia pastoris* (Love et al. 2016), o que pode explicar essa resultado obtido no ensaio com o sobrenadante da *P. pastoris* com o vetor vazio.

Desta forma, para verificar se realmente não havia atividade enzimática no extrato do controle vazio com ou sem a adição de DTT, foi realizado um ensaio em placa, onde foi observado que no extrato da scEPG1 sem DTT (Figura 34-A) e com DTT (Figura 34-C) havia atividade pectinolítica, enquanto nas placas com o extrato do vetor vazio sem DTT (Figura 34-B) e com DTT (Figura 34-D) não havia atividade enzimática.

Figura 34 - Ensaio em placa de atividade pectinolítica com o extrato bruto da scEPG1 e vetor vazio com e sem a adição de DTT.

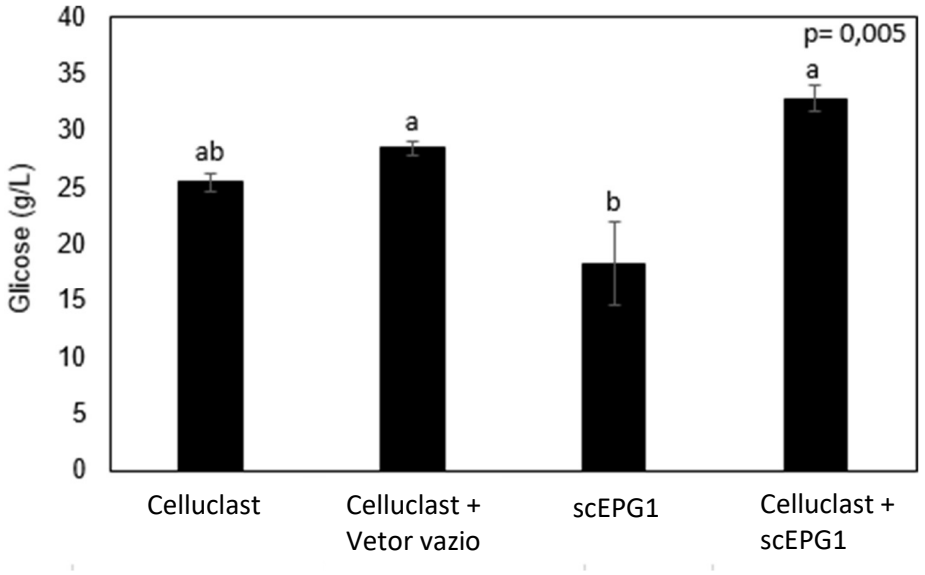


Legenda: (A) scEPG1 sem DTT, (B) vetor vazio sem DTT, (C) scEPG1 com DTT e (D) vetor vazio sem DTT – setas indicam o halo de atividade enzimática (Fonte: elaborado pelo autor).

7.8 Sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar

Após a adição da scEPG1 ao coquetel enzimático Celluclast 1.5L (Novozymes®) foi possível observar que não houve diferença estatística entre os extratos enzimáticos brutos da scEPG1 e o vetor vazio (Figura 35). Entretanto é necessário salientar que este é um ensaio preliminar realizado com o extrato bruto do sobrenadante. É possível que haja interferentes no meio de cultura que possam influenciar no resultado obtido. Ensaios futuros com diferentes concentrações da enzima e a utilização da enzima purificada podem fornecer resultados mais específicos sobre a atividade da enzima frente à biomassa de cana-de-açúcar.

Figura 35 - Sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar com coquetel enzimático + scEPG1



Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados brutos utilizados para a construção do gráfico acima podem ser encontrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados brutos de sacarificação da biomassa de cana-de-açúcar

Amostra	Glicose (g/L)
Celluclast (1)	24,54
Celluclast (2)	27,10
Celluclast (3)	24,95
Celluclast + Vetor vazio (1)	28,34
Celluclast + Vetor vazio (2)	29,66
Celluclast + Vetor vazio (3)	27,52
scEPG1 (1)	10,90
scEPG1 (2)	22,47
scEPG1 (3)	21,65
Celluclast + scEPG1 (1)	30,99
Celluclast + scEPG1 (2)	34,87
Celluclast + scEPG1 (3)	32,64

8. RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

- Construção plasmidial do vetor pPICZαA contendo o gene scEPG1
- Obtenção do clone de *Pichia pastoris* X33 produtor da scEPG1 extracelular ativa.
- Otimização do protocolo de expressão da enzima alterando fatores como temperatura, rotação e concentração final de metanol
- Determinação dos parâmetros enzimáticos da scEPG1 sobre temperatura, termoestabilidade, pH e efeito de interferentes.
- A adição da scEPG1 ao coquetel enzimático comercial não apresentou diferenças estatísticas em relação ao rendimento de açúcares solúveis da biomassa de cana-de-açúcar nos ensaios preliminares.

9. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A endopoligalacturonase de *Saccharum* sp. foi eficientemente expressa em sistema de expressão heterólogo com *Pichia pastoris* X33. O mutante produtor desta enzima produziu os maiores valores de proteínas totais com 96 horas de indução com metanol. O extrato bruto obtido apresentou melhores valores de atividade enzimática quando incubada por 22 horas a 45 ˚C em tampão acetato de sódio pH 5,0, sofrendo interação positiva do agente redutor DTT a 60 mM.

Ensaios futuros de purificação desta enzima e obtenção dos parâmetros cinéticos poderão auxiliar na compreensão do modo de ação e especificidade pelo substrato.

A scEPG1 parece ter bom potencial para uso em biotecnologia, seja em aplicações como as de produção de sucos processados ou produção de vinho, seja para aplicação em bioenergia.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott DW, Boraston AB. Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72(2):301–16.

Abdulrachman D, Thongkred P, Kocharin K, Nakpathom M, Somboon B, Narumol N, et al. Heterologous expression of *Aspergillus aculeatus* endo-polygalacturonase in *Pichia pastoris* by high cell density fermentation and its application in textile scouring. BMC Biotechnol. BioMed Central; 17(1):15.

Abramson M, Shoseyov O, Shani Z. Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. Plant Sci. Elsevier; 178(2):61–72.

Agrawal PB, Nierstrasz VA, Klug-Santner BG, Gübitz GM, Lenting HBM, Warmoeskerken MMCG. Wax removal for accelerated cotton scouring with alkaline pectinase. Biotechnol. J. 2(3):306–15.

Ahlawat S, Mandhan RP, Dhiman SS, Kumar R, Sharma J. Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. Appl. Biochem. Biotechnol. 149(3):287–93.

Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer; 98(12):5301–17.

Alfenas AC, Brune W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Eletroforese isoenzimas e proteínas afins. Viçosa; 1998. p. 151–82.

Ali Z, Brady C. Purification and Characterization of the Polygalacturonases of Tomato Fruits. Aust. J. Plant Physiol. 9(2):155.

Alimardani-Theuil P, Gainvors-Claisse A, Duchiron F. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. Process Biochem. Elsevier; 46(8):1525–37.

Alonso Pippo W, Luengo CA, Alonsoamador Morales Alberteris L, Garzone P, Cornacchia G. Energy Recovery from Sugarcane-Trash in the Light of 2nd Generation Biofuel. Part 2: Socio-Economic Aspects and Techno-Economic Analysis. Waste and Biomass Valorization. Springer Netherlands; 2(3):257–66.

Alonso Pippo W, Luengo CA, Alonsoamador Morales Alberteris L, Garzone P, Cornacchia G. Energy Recovery from Sugarcane-Trash in the Light of 2nd Generation Biofuels. Part 1: Current Situation and Environmental Aspects. Waste and Biomass Valorization. Springer Netherlands; 2(1):1–16.

Amid M, Manap Y, Zohdi K. Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. Eur. Food Res. Technol. Springer Berlin Heidelberg; 239(1):21–9.

Atkinson RG, Schröder R, Hallett IC, Cohen D, MacRae E a. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. Plant Physiol. 129(1):122–33.

Babu Y, Bayer M. Plant Polygalacturonases Involved in Cell Elongation and Separation—The Same but Different? Plants. 3(4):613–23.

Barage SH, Jalkute CB, Dhanavade MJ, Sonawane KD. Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences. Virtual Screen. Mol. Dyn. Simul. study hECE-1 protease Inhib. 4(1):1279–91.

Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. Bioinformatics. Oxford University Press; 27(3):343–50.

Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Wiley-Blackwell; 97(2):287–96.

Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18(5):355–83.

Biz A, Farias FC, Motter FA, De Paula DH, Richard P, Krieger N, et al. Pectinase activity determination: An early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works! Uversky VN, editor. PLoS One. Public Library of Science; 9(10).

Blanco P, Sieiro C, Diaz a, Villa TG. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from Saccharomyces cerevisiae. Can. J. Microbiol. 40(11):974–7.

Borin GP, Sanchez CC, De Souza AP, De Santana ES, De Souza AT, Leme AFP, et al. Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. PLoS One. 10(6).

Breuil C, Saddler JN. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. Enzyme Microb. Technol. Elsevier; 7(7):327–32.

Buckeridge M, Santos W dos, Tiné MAS, Souza AP. The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance. Compend. Bioenergy Plants. CRC Press; 2015. p. 31–50.

Buckeridge MS. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. Plant Physiol. 154(3):1017–23.

Buckeridge MS, Grandis A, Tavares EQP. Disassembling the Glycomic Code of Sugarcane Cell Walls to Improve Second-Generation Bioethanol Production. Bioethanol Prod. from Food Crop. Academic Press; :31–43.

Buckeridge MS, De Souza AP. Breaking the “Glycomic Code” of Cell Wall Polysaccharides May Improve Second-Generation Bioenergy Production from Biomass. Bioenergy Res. 7(4):1065–73.

Bussink HJD, Buxton FP, Fraaye BA, Graaff LH De, Visser J. The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. 90:83–90.

Carpio LGT, Simone de Souza F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. Renew. Energy. Pergamon; 111:771–80.

Carr JG. Tea, coffee and cocoa. In: B.J.B, editor. Microbiol. Fermented Foods. II. London: Elsevier Applied Science; 1985. p. 133–54.

Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, DeLucas LJ. His-tag impact on structure. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography (IUCr); 63(3):295–301.

Castilho LR, Medronho RA, Alves TL. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. 71(1):45–50.

Celestino SMC, Maria de Freitas S, Javier Medrano F, Valle de Sousa M, Filho EXF. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. J. Biotechnol. 123(1):33–42.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24(1):45–66.

Channe PS, Shewale JG. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: Effect of culture conditions. Folia Microbiol. (Praha). Springer Netherlands; 40(1):111–7.

Chant A, Kraemer-Pecore CM, Watkin R, Kneale GG. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the Aspergillus nidulans gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. Protein Expr. Purif. 39(2):152–9.

Chaudhri A, Suneetha V. Microbially Derived Pectinases: A Review. IOSR J. Pharm. Biol. 2(2):1–5.

Chen Q, Jin Y, Zhang G, Fang Y, Xiao Y, Zhao H. Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. Energies. Molecular Diversity Preservation International; 5(8):3019–32.

Cho SW, Lee S, Shin W. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. J. Mol. Biol. 311(4):863–78.

Correia R. Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP3) de Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2015.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant Protein Expression in Pichia pastoris. Mol. Biotechnol. 16(1):23–52.

Dalbøge H. Expression cloning of fungal enzyme genes; a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. FEMS Microbiol. Rev. 21(1):29–42.

Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineenring and production. J. Mol. Recognit. 2005. p. 119–38.

Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol. 15(6):637–45.

Delabona P da S, Cota J, Hoffmam ZB, Paixão DAA, Farinas CS, Cairo JPLF, et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α-l-arabinofuranosidase. Bioresour. Technol. Elsevier; 131:500–7.

Dewan SS. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - BIO030H. BCC Res. 2014. p. 1–157.

Edwards MC, Doran-Peterson J. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 95(3):565–75.

Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cell. Biol. 5(5):1111–21.

Esfandiari E, Shekari F, Shekari F, Esfandiari M. The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. 35(1):48–56.

Evans DE. Aerenchyma formation. New Phytol. Blackwell Publishing Ltd; 2004. p. 35–49.

Federici F. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus var. albidus*. Antonie Van Leeuwenhoek. 51(2):139–50.

Fernández-González M, ÚBeda JF, Vasudevan TG, Otero RRC, Briones AI. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. FEMS Microbiol. Lett. Oxford University Press; 237(2):261–6.

Ferrara MA, Severino NMB, Mansure JJ, Martins AS, Oliveira EMM, Siani AC, et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. Enzyme Microb. Technol. Elsevier; 39(7):1457–63.

Fox JD, Robyt JF. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. Anal. Biochem. 195(1):93–6.

Frazzon APG, Ramirez M V., Warek U, Balk J, Frazzon J, Dean DR, et al. Functional analysis of *Arabidopsis* genes involved in mitochondrial iron–sulfur cluster assembly. Plant Mol. Biol. 64(3):225–40.

Freudl R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. Microb. Cell Fact. BioMed Central; 17(1):52.

Gadre R V., Van Driessche G, Van Beeumen J, Bhat MK. Purification, characterisation and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. Enzyme Microb. Technol. Elsevier; 32(2):321–30.

Gao S, Shain L. Characterization of an endopolygalacturonase produced by the chestnut blight fungus. Physiol. Mol. Plant Pathol. Academic Press; 45(3):169–79.

Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. 3 Biotech. Springer; 6(1):47.

Gayathri T, Kishor Mohan TC, Murugan K. Purification and Characterization of Polygalacturonase-3 from Jamaica cherry (*Muntingia calabura Linn*). J. Plant Biochem. Biotechnol. Springer India; 16(2):127–30.

Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, et al. Poplar Carbohydrate-Active Enzymes. Gene Identification and Expression Analyses. PLANT Physiol. 140(3):946–62.

Geocze MLA. Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *Penicillium expansum*. UFV; 1994.

González-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA, Haydé González-Carranza Z, Whitelaw CA, et al. Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. Plant Physiol. 128(2):534–43.

Grandis A, de Souza AP, Tavares EQP, Buckeridge MS. Using natural plant cell wall degradation mechanisms to improve second generation bioethanol. Plants and BioEnergy. New York, NY: Springer New York; 2014.

Guillén M, Benaiges MD, Valero F. Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from Rhizopus oryzae expressed in *Pichia pastoris* with a native extract. Biochem. Eng. J. 54(2):117–23.

Gunawardena A, Pearce D, Jackson M, Hawes C, Evans D. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localised form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L) promoted by ethylene. Plant, Cell Environ. 24.

Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. Biocomput. 2001. p. 310–22.

Gusakov A V., Salanovich TN, Antonov AI, Ustinov BB, Okunev ON, Burlingame R, et al. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. Bioeng. 97(5):1028–38.

Hadfield KA, Bennett AB. Update on Cell Walls Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function 1 PG and pectin disassembly in ripening fruit. :337–43.

Han Y, Chen H. Improvement of corn stover bioconversion efficiency by using plant glycoside hydrolase. Bioresour. Technol. Elsevier Ltd; 102(7):4787–92.

Hayward AC, Mariano RLR. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. Revisão Anu. Patol. Plantas. 5:199–234.

Heimo H, Palmu K, Suominen I. Expression in *Pichia pastoris* and Purification of *Aspergillus awamori* Glucoamylase Catalytic Domain. Protein Expr. Purif. Academic Press; 10(1):70–9.

Henrissat B, Coutinho PM, Davies GJ. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. Kluwer Academic Publishers; 47(1/2):55–72.

Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13(2):89–102.

Hoondal G, Tiwari R, Tewari R, Dahiya N, Beg Q. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002 [cited 2018 Jul 29]. p. 409–18.

Houle V, Gagnon MC, Dubé E, Hurtubise Y, Beauregard M. Impact of Glycosylation on *Saccharomyces cerevisiae* Endopolygalacturonase PGU1 Activity and Stability. Open Biotechnol. J. 2008.

Iconomou D, Arapoglou D, Israilides C. Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. Grasas y Aceites. 61(3):303–11.

Inan M, Meagher MM. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. J. Biosci. Bioeng. 92(6):585–9.

Jaiswal D, De Souza AP, Larsen S, Lebauer DS, Miguez FE, Sparovek G, et al. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. Nat. Clim. Chang. Nature Publishing Group; 7(11):788–92.

Javaid Asad et al. Production, Purification and Characterization of Endopolygalacturonase by *Bacillus subtillus*. Biochem. Anal. Biochem. OMICS International; 04(03):1–12.

Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochem. Elsevier; 40(9):2931–44.

Jia J, Wheals a. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. Curr. Genet. 38(5):264–70.

Jin H, Liu G, Ye X, Duan Z, Li Z, Shi Z. Enhanced porcine interferon-α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. Biochem. Eng. J. Elsevier; 52(1):91–8.

Juturu V, Wu JC. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. ChemBioChem. 19(1):7–21.

Kalantzi S, Mamma D, Kalogeris E, Kekos D. Improved properties of cotton fabrics treated with lipase and its combination with pectinase. Fibres Text. East. Eur. 82(5):86–92.

Kashyap D. R, Vohra P. K, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresour. Technol. Elsevier; 77(3):215–27.

Kaur G, Kumar S, Satyanarayana T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile Apinis*. Bioresour. Technol. 94(3):239–43.

Khedher IBA, Bressollier P, Urdaci MC, Limam F, Marzouki MN. Production and biochemical characterization of S*clerotinia sclerotiorum* α-amylase ScAmy1: Assay in starch liquefaction treatments. J. Food Biochem. 32(5):597–614.

Kipriyanov SM, Kupriyanova OA, Little M, Moldenhauer G. Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry. J. Immunol. Methods. 196(1):51–62.

Kobayashi DY, Palumbo JD. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. Microb. endophytes. 2000. p. 199–236.

Kohno K. Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. J. Biochem. 147(1):27–33.

Kravtchenko TP, Penci M, Voragen AGJ, Pilnik W. Enzymic and chemical degradation of some industrial pectins. Carbohydr. Polym. Elsevier; 20(3):195–205.

Lang C, Looman AC. Efficient expression and secretion of Aspergillus niger RH5344 polygalacturonase in Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer-Verlag; 44(1–2):147–56.

Latarullo MBG, Tavares EQP, Padilla G, Leite DCC, Buckeridge MS. Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy. Front. Plant Sci. Frontiers Media SA; 7:1401.

Leite DCC, Grandis A, Tavares EQP, Piovezani AR, Pattathil S, Avci U, et al. Cell wall changes during the formation of aerenchyma in sugarcane roots. Ann. Bot. 120(5):693–708.

Li Y. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. Biotechnol. Appl. Biochem. 55(2):73–83.

Lin-Cereghino GP, Stark CM, Kim D, Chang JJW, Shaheen N, Poerwanto H, et al. The effect of α-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Gene. NIH Public Access; 519(2):311–7.

Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. Biotechniques. 50(5):325–8.

Lopez-Casado G, Urbanowicz BR, Damasceno CM, Rose JK. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. Curr. Opin. Plant Biol. 11(3):329–37.

Love KR, Shah KA, Whittaker CA, Wu J, Bartlett MC, Ma D, et al. Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*. BMC Genomics. BioMed Central; 17(1):550.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast. 22(4):249–70.

Macedo IC, Seabra JEA, Silva JEAR. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. Biomass and Bioenergy. 32(7):582–95.

Maldonade IR, Carvalho PGB, Ferreira NA, Moulin BSF. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico.:1–4.

Malheiros Ferreira H, Ximenes Ferreira Filho E, Ferreira HM, Filho EXF. Purification and characterization of a β-mannanase from Trichoderma harzianum strain T4. Carbohydr. Polym. Elsevier; 57(1):23–9.

Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. Nucleic Acids Res. 45(D1):D200–3.

Marcus SE, Verhertbruggen Y, Hervé C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, et al. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. BMC Plant Biol. 8(60):1–12.

Martins MTB, De Souza WR, Da Cunha BADB, Basso MF, De Oliveira NG, Vinecky F, et al. Characterization of sugarcane (Saccharum spp.) leaf senescence: Implications for biofuel production. Biotechnol. Biofuels. BioMed Central; 9(1):153.

Masoud W, Jespersen L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa. Int. J. Food Microbiol. 110(3):291–6.

McFeeters RF. A manual method for reducing sugar determinations with 2,2′-bicinchoninate reagent. Anal. Biochem. Academic Press; 103(2):302–6.

McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. Mol. Biol. Int. Hindawi; 2014:287430.

McKay AM. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. FEMS Microbiol. Lett. Oxford University Press; 56(3):355–8.

Mei Y, Chen Y, Zhai R, Liu Y. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from Bacillus halodurans M29. J. Mol. Catal. B Enzym. 94:77–81.

Meneses A. Produção de enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico G088. :112.

Minic Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. Planta. 227(4):723–40.

Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. Curr. Opin. Plant Biol. 11(3):266–77.

Mopper K, Melvin Gindler E. A new noncorrosive dye reagent for automatic sugar chromatography. Anal. Biochem. Academic Press; 56(2):440–2.

Mukesh Kumar DJ, Saranya GM, Suresh K, Andal Priyadharshini D, Rajakumar R. Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp . MFW7 using Cassava Waste. Asian J. Plant Sci. Res. 2(3):369–75.

Murthy PS, Naidu MM. Improvement of Robusta Coffee Fermentation with Microbial Enzymes. Eur. J. Appl. Sci. 3(4):130–9.

Nelson N. A photometric adaptation of Somogyi Method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 03(2):375–80.

Niaz A, Malik QJ, Muhammad S, Shamim T, Asghar S. Bioscouring of cellulosic textiles. Color. Technol. Wiley/Blackwell (10.1111); 127(4):211–6.

Ojeda K, Kafarov V. Exergy analysis of enzymatic hydrolysis reactors for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. Chem. Eng. J. Elsevier; 154(1–3):390–5.

Oumer OJ, Abate D. Characterization of Pectinase from Bacillus subtilis Strain Btk 27 and Its Potential Application in Removal of Mucilage from Coffee Beans. Enzyme Res. 2017.

Pakarinen A, Zhang J, Brock T, Maijala P, Viikari L. Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin. Bioresour. Technol. Elsevier Ltd; 107:275–81.

Pařenicová L, Benen JA, Kester HC, Visser J. pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. Biochem. J. 345 Pt 3:637–44.

Parre E, Geitmann A. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. Planta. 220(4):582–92.

Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Cano Carmona E. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes [Internet]. Open Biotechnol. J. 2009.

Pijning T, van Pouderoyen G, Kluskens L, van der Oost J, Dijkstra BW. The crystal structure of a hyperthermoactive exopolygalacturonase from *Thermotoga maritima* reveals a unique tetramer. FEBS Lett. Wiley-Blackwell; 583(22):3665–70.

Pouderoyen G Van, Snijder HJ, Benen JAE, Dijkstra BW. Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. 554:462–6.

Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN. Fruit ripening phenomena--an overview. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47(1):1–19.

Rathore D, Nigam PS, Singh A. Biorefinery concept for a microalgal bioenergy production system. Mar. bioenergy trends Dev. Boca Raton: CRC Press; 2015. p. 179–94.

Revilla I, Gonzalez-San Jose ML. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. Int. J. Food Sci. Technol. Wiley/Blackwell (10.1111); 38(1):29–36.

RFA. Renewable Fuels Association [Internet]. Statistics (Ber). 2015.

Roohvand F, Shokri M, Abdollahpour-Alitappeh M, Ehsani P. Biomedical applications of yeast- a patent view, part one: yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. Expert Opin. Ther. Pat. 2017. p. 929–51.

Saad N, Briand M, Gardarin C, Briand Y, Michaud P. Production, purification and characterization of an endopolygalacturonase from Mucor rouxii NRRL 1894. Enzyme Microb. Technol. Elsevier; 41(6–7):800–5.

Saarilahti HT, Heino P, Pakkanen R, Kalkkinen N, Palva I, Palva ET. Structural Analysis of the Peh-a Gene and Characterization of Its Protein Product Endopolygalacturonase of Erwinia-Carotovora-Ssp-Carotovora. Mol. Microbiol. 4(6):1037–44.

Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production,[Properties, and Applications. Adv. Appl. Microbiol. 39(C):213–94.

Santi L, Berger M, Silva W. Pectinases e Pectina: Aplicação comercial e potencial biotecnológico. Rev. Cad. Pedagógico. Editora Univates; 1999.

Santoso A, Herawati N, Rubiana Y. Effect of Methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. 2012.

Sato R, Matsumoto T, Hidaka N, Imai Y, Abe K, Takahashi S, et al. Cloning and expression of carp acetylcholinesterase gene in Pichia pastoris and characterization of the recombinant enzyme. Protein Expr. Purif. 64(2):205–12.

Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65(4):363–72.

Serrat M, Bermúdez RC, Villa TG. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol. 97(3):193–208.

Seyfried M, Soldera-Silva A, Bovo F, Stevan-Hancke FR, Maurer JBB, Zawadzki-Baggio SF. Pectinas de plantas medicinais: Características estruturais e atividades imunomoduladoras. Rev. Bras. Plantas Med. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais; 2016. p. 201–14.

Sharma BR, Naresh L, Dhuldhoya NC, Merchant SU, Merchant UC. An Overview on Pectins. Times food Process. J. 51(June-July):44–51.

Soccol CR, Vandenberghe LP de S, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. Bioresour. Technol. 101(13):4820–5.

Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC, Long SP. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. Science. American Association for the Advancement of Science; 329(5993):790–2.

Somogyi M. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195(1):19–23.

Sørensen HR, Pedersen S, Meyer AS. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. Enzyme Microb. Technol. Elsevier; 40(4):908–18.

De Souza AP, Grandis A, Leite DCC, Buckeridge MS. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. BioEnergy Res. 7(1):24–35.

De Souza AP, Kamei CLA, Torres AF, Pattathil S, Hahn MG, Trindade LM, et al. How cell wall complexity influences saccharification efficiency in Miscanthus sinensis. J. Exp. Bot. 66(14):4351–65.

De Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. Bioenergy Res. 6(2):564–79.

Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KTBG, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J. 32(10):1478–88.

Sticklen MB. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. Nat. Rev. Genet. Nature Publishing Group; 9(6):433–43.

Stratilová E, Mislovicová D, Kacuráková M, Machová E, Kolarová N, Markovic O, et al. The glycoprotein character of multiple forms of Aspergillus polygalacturonase. J. Protein Chem. 17(2):173–9.

Tavares EQDP. Regulação da degradação da parede celular durante a formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar. 2015. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo

Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer-Verlag; 72(2):211–22.

Thakur A, Pahwa R, Singh S, Gupta R. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from Mucor circinelloides ITCC 6025. Enzyme Res. Hindawi Limited; 2010:170549.

Thakur J, Gupta R. Improvement of tea leaves fermentation through pectinases. Acta Microbiol. Immunol. Hung. Akadémiai Kiadó ; 59(3):321–34.

UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar. Unicadata. 2018.

Vogel J. Unique aspects of the grass cell wall. Curr. Opin. Plant Biol. 11(3):301–7.

Voragen AGJ, Schols HA, Pilnik W. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. Top. Catal. Elsevier; 1(1):65–70.

Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y, et al. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in Pichia pastoris. Sci. Rep. Nature Publishing Group; 7:41850.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. 46(W1):W296–303.

Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. J. Exp. Bot. 2006 [cited 2018 Aug 26]. p. 391–9.

Xiao Z, Boyd J, Grosse S, Beauchemin M, Coupe E, Lau PCK. Mining Xanthomonas and Streptomyces genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer-Verlag; 78(6):973–81.

Zagrobelny M, Bak S, Rasmussen AV, Jørgensen B, Naumann CM, Møller BL. Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. Phytochemistry. 2004. p. 293–306.

Zanella K. Extração da Pectina da Casca da Laranja-Pera (*Citrus sinensis L. Osbeck*) com Solução Diluída de Ácido Cítrico. ; :23–33.

Zhang AL, Zhang TY, Luo JX, Chen SC, Guan WJ, Fu CY, et al. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Springer-Verlag; 34(2):117–22.

Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(7):2754–8.

1. APÊNDICES

Apêndice A – Artigo publicado em 2016

frontiers in Plant Science

MINI REVIEW
published: 20 September 2016
doi: 10.3389/fpls.2016.01401

Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy

*Mariana B. G. Latarullo[1,2†], Eveline Q. P. Tavares[1†], Gabriel Padilla[2], Débora C. C. Leite[1] andMarcos S. Buckeridge [1]**

[1] Laboratory of Plant Physiological Ecology, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, [2] Bioproducts Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

The precise disassembly of the extracellular matrix of some plant species used as feedstocks for bioenergy production continues to be a major barrier to reach reasonable cost effective bioethanol production. One solution has been the use of pretreatments, which can be effective, but increase even more the cost of processing and also lead to loss of cell wall materials that could otherwise be used in industry. Although pectins are known to account for a relatively low proportion of walls of grasses, their role in recalcitrance to hydrolysis has been shown to be important. In this mini-review, we examine the importance of pectins for cell wall hydrolysis highlighting the work associated with bioenergy. Here we focus on the importance of endopolygalacturonases (EPGs) discovered to date. The EPGs cataloged by CAZy were screened, revealing that most sequences, as well as the scarce structural work performed with EPGs, are from fungi (mostly *Aspergillus niger*). The comparisons among the EPG from different microorganisms, suggests that EPGs from bacteria and grasses display higher similarity than each of them with fungi. This compilation strongly suggests that structural and functional studies of EPGs, mainly from plants and bacteria, should be a priority of research regarding the use of pectinases for bioenergy production purposes.

Keywords: bioethanol, pectinase, endopolygalacturonase, grasses, cell wall, bioenergy, ethanol

OPEN ACCESS

Edited by:
Rashid Ali,
University of Connecticut, USA

Reviewed by:
Taras P. Pasternak,
Institute of Biology II, Germany
Holger Klose,
RWTH Aachen University, Germany

**Correspondence:*
Marcos S. Buckeridge
msbuck@usp.br

†These authors have contributed equally to this work.

Specialty section:
This article was submitted to Plant Biotechnology, a section of the journal Frontiers in Plant Science

Received: 09 April 2016
Accepted: 02 September 2016
Published: 20 September 2016

Citation:
Latarullo MBG, Tavares EQP, Padilla G, Leite DCC and Buckeridge MS (2016) Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy. Front. Plant Sci. 7:1401. doi:10.3389/fpls.2016.01401

INTRODUCTION

Bioenergy can be produced from several species and in different ways. The basic idea is to transform hydrocarbons produced by plants and algae –mostly in the form of sugars and lipids– into compounds similar to gasoline, diesel, and ethanol. In the latter case, there are only a handful of plant species that have been considered or effectively used for bioenergy production in large scale. Among these there are the ones that produce high concentrations of sucrose (e.g., sugarcane and sugar beet), starch (e.g., maize), lignocellulose from woody materials (e.g., poplar and willow) or grasses (e.g., corn stove, switchgrass, miscanthus, and sugarcane) (De Souza et al.,2013a). Other residues, such as apple pomace, citrus, and sugar beet, which are rich in pectins have been suggested as possible sources of carbon for bioethanol production (Edwards and Doran-Peterson,2012).

Maize (*Zea mays*) and sugarcane (*Saccharum* sp.) are the main feedstocks used in large scale for bioethanol generation, with the USA and Brazil being the world's largest producers (RFA,2015). The bioethanol from sugarcane can be produced at lower costs in comparison to maize (Méjean and Hope,2010) probably due to the energy balance in the production process which has been optimized since the early 20th century (De Souza et al.,2013a;Loqué et al.,2015).

The first generation bioethanol (1G) consists in fermenting sucrose from the juice. Sucrose is extracted from large vacuoles present in cells of the stem (**Figures 1A,C**). Sucrose is then used in fermentation tanks to produce ethanol using *Saccharomyces cerevisiae* (Amorim et al., 2011). Although this process became extremely efficient along decades of engineering development, some of the sucrose is still lost during the process due to difficulty to open all sucrose-storage cells of the culm. These cells cannot all be broken probably due to the strength of the cell walls as well as their junctions (the middle lamellae), so that groups of cells can resist to the mechanical forces involved in the milling and hot water extraction during the 1G industrial process (**Figures 1B,D**).

Second Generation (2G) bioethanol production consists in using different strategies to extract the sugars present in the cell walls. For this purpose, some suggested feedstocks are woody materials (e.g., poplar, willow, eucalyptus), grass stems, that contain proportionally more cell walls than sucrose (e.g., miscanthus and switchgrass) and also from plant residues, such as corn stover, wheat straw, sugarcane bagasse, sugar beet, citrus, and apple residues.

The 2G processes have been designed to include biomass pretreatment (Soccol et al., 2010; Pu et al., 2013; Martins et al., 2015; Pereira et al., 2015) aimed at granting access to cellulose. Pretreatments are known to cause losses of hemicelluloses and pectins (DeMartini et al., 2013; Pu et al., 2013), decreasing yield.

The raw material employed in 2G technologies is the plant cell wall, a complex conglomerate of three polysaccharide domains (pectins, hemicelluloses, and cellulose) which are cross-linked with lignin (Buckeridge et al., 2015). This Mini-review aims to look on the role of pectins on cell wall recalcitrance to hydrolysis and the potential of pectinases for bioenergy purposes. We revised the literature about the use of pectinases to understand cell wall hydrolysis and show that research made on these enzymes is quite limited since only a few have been purified and characterized. Here we focus on endopolygalacturonases, which are the most well known among the pectinases. Increasing knowledge about the structural and functional aspects of these enzymes might bring new possibilities for their use in biomass hydrolysis and bioethanol production.

CELL WALLS, PECTINS, AND BIOENERGY

Cell walls are composites made of polymers with diverse structures that are attached by covalent and non-covalent linkages, forming an extremely complex network that constitutes the Glycomic Code (Buckeridge and de Souza, 2014; Buckeridge et al., 2015; Tavares and Buckeridge, 2015)

Among the grasses used for bioenergy purposes, maize (Carpita, 1984), sugarcane (De Souza et al., 2013b), and miscanthus (De Souza et al., 2015) are among the most profoundly studied species. The architecture of the walls of grasses is named Type II, which has arabinoxylans as the main hemicellulose and relatively low proportions of pectins (ca. 2–10% of the wall in sugarcane and miscanthus) (Mohnen, 2008; Vogel, 2008; De Souza et al., 2013b, 2015). Maize and sugarcane are known to form "packages" of cellulose *micro*fibrils (*macro*fibrils) bound to xyloglucan and xylans, whereas pectins seem to form a separate domain with more soluble polysaccharides into which the other cell wall domains are embedded (Ding et al., 2012; Buckeridge et al., 2015). Despite its low content in grasses, pectins are possibly involved in bindings with lignin in sugarcane and miscanthus, conferring recalcitrance to hydrolysis (De Souza et al., 2013b, 2015).

It is also widely known that pectins are the main components of the middle lamella. Thus, besides hampering wall hydrolysis and thus preventing efficient release of sugars for 2G bioethanol, the presence of pectins in the middle lamella can also be a barrier to the release of cells from tissues in 1G processes, interfering in sucrose extraction (De Souza et al., 2013b, 2015).

The hydrolysis step required for disassembly of cell walls and their polymers is regarded as one of the major bottlenecks for 2G ethanol production. Thus, understanding the mechanisms of breakdown of the cell walls will help to determine the most efficient strategies to reduce costs of production (Turumtay, 2015). Considering what is known about the structure and fine structure of the pectic and hemicellulosic polymers in the walls of sugarcane and miscanthus, the degradation of the cell walls of sugarcane, for instance, is thought to require at least 18 different types of enzymes, several of them related to pectin attack (De Souza et al., 2013b).

Pectins are composed mainly of three polysaccharides, including homogalacturonan present within the middle lamella, which can be acetylated and/or methylated. Rhamnogalacturonans I and II present a more complex structure, composed of a main chain of galacturonic acid interspaced with residues of rhamnose which are branched with chains of arabinans, galactans, and arabinogalactans.

Usually referred to as accessory enzymes, the main required enzymes to hydrolyze pectins are endopolygalacturonases (EPGs), acetyl and methylesterases, α-arabinofuranosidases and β-galactosidases. The fact that some linkages between carbohydrates and phenylpropanoids would have to be broken in order to allow attack to pectin, possibly more enzymes than what is currently known might be involved in the complete hydrolysis of this polysaccharide (Rytioja et al., 2014).

Experiments have been performed with pectin-rich materials such as citrus waste (Edwards and Doran-Peterson, 2012; Awan et al., 2013). Employing this biomass, a mixture of *S. cerevisiae* and *Candida parapsilosis* have been successfully fermented. Also, the use of enzymes from *Xanthomonas axonopodis* (a Gram negative pathogen that confers canker to citrus) led to high efficiency in ethanol production.

The effort on prospecting pectinases has been mostly on fungal enzymes whereas some plant enzymes have also been studied in systems of agronomic importance. Conversely, in plants, the attack upon the pectins of cell wall and middle lamella have been largely described for abscission zone formation (González-Carranza et al., 2002), fruit ripening (Prasanna et al., 2007) and aerenchyma formation (Gunawardena et al., 2001). As a result, relatively little is known about the structural and functional diversity of pectinases in plant and microbe metabolisms.

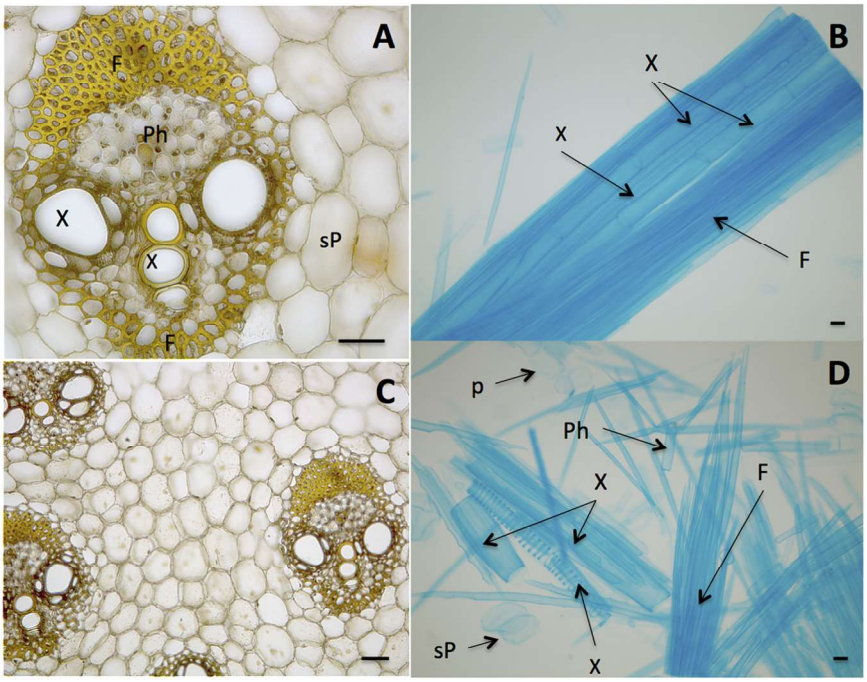


FIGURE 1 | Biomass units of sugarcane stem (culm) with cells bound by middle lamellae. (A,C) Stele, the vascular bundle showing Fibers (F), Phloem (Ph), Xylem (X), sucrose-storage parenchyma (sP). **(B)** Macerated tissue showing a detail of an isolated stele that still maintains adhesion among cells. **(D)** Cells of sugarcane stem without the binding of middle lamellae. Cells are named as in **(A)**. The cell separation was prepared according to Franklin (1945) and cells were stained with toluidine blue **(B,D)** and iodine-potassium iodide **(A,C)**. Bars represent 100 μm.

The roles of pectin in biomass yield and processing for bioenergy have been recently reviewed (Xiao and Anderson, 2013). Since pectins represent the class of polysaccharides responsible for adhesion to neighbor cells, it could be decreased due to pectinase activity. Another important role is the control of penetration of other enzymes into the biomass network, since pectins are thought to be responsible for determination of cell wall porosity (Baron-Epel et al., 1988), limiting the size and dimensions of enzymes allowed to penetrate the wall (Buckeridge et al., 2015). A search in the CAZy databank gave 210 sequences of EPGs (GH28 family, EPG 3.2.1.15), 46 pectin acetyl esterases (CE12 and CE13 families, PAE 3.1.1.) and 44 pectin methyl esterases (CE8 family, PME 3.1.1.11) (Lombard et al., 2014). Thus, EPGs are by far the best-known enzyme family associated to the homogalacturonan hydrolysis.

POTENCIAL USE OF PECTIN AND PECTINASES FOR BIOENERGY

Depolymerases such as polygalacturonases are classified as endo- or exopolygalacturonases according to their mode of action. Exopolygalacturonases attack the non-reducing end of the polymer, generating the monosaccharide galacturonic acid. EPGs hydrolyze inner linkages within homogalacturonan molecules, originating oligogalacturonides of different sizes.

Endopolygalacturonases play important roles in fruit ripening. Smith et al. (1990) found that down-regulation of EPG expression led to a reduction in enzyme activity between 5 and 50%, increasing ripe fruit shelf life. Similar results were observed for apple and strawberry fruits. Moreover, microscopic analysis of transgenic fruits revealed smaller inter-cellular spaces and higher cellular adhesion (Atkinson et al., 2012; Posé et al., 2013).

Because the proportion of pectins in grasses is rather low, studies are scarce about their effect on saccharification. Some evidence from experiments with dicot plants produced promising results. The addition of pectinases to enzyme cocktails can increase biomass hydrolysis in *Arabidopsis* (Lionetti et al., 2010). Supplementing the commercial enzyme cocktail Celluclast 1.5 L (which is mainly composed of cellulases) with fungal EPG or overexpression of endogenous pectin methyl esterases, increased the efficiency of enzymatic hydrolysis of cell walls. It is not yet known by which mechanisms this process takes place, but it is probable that these are related to the attack performed by pectinases in general, which results in the removal of pectins that prevent other enzymes to act. Thus, pectin connections in the cell wall matrix can affect saccharification and pretreatment, so that EPGs could eliminate the need for acid pretreatment, reducing costs and environmental impacts.

Concerning microbe EPGs, *Aspergillus niger* is by far the most studied fungi species and at least seven different types of the enzyme have been described and classified as EPG I, II, A, B, C, D, and E (Bussink et al., 1992), producing substrates with different degrees of polymerization (DP). EPGI produces large amounts of oligogalacturonides with DP 5, whereas EPG II products range from DP 6 to 15 (Cook et al., 1999). Moreover, they

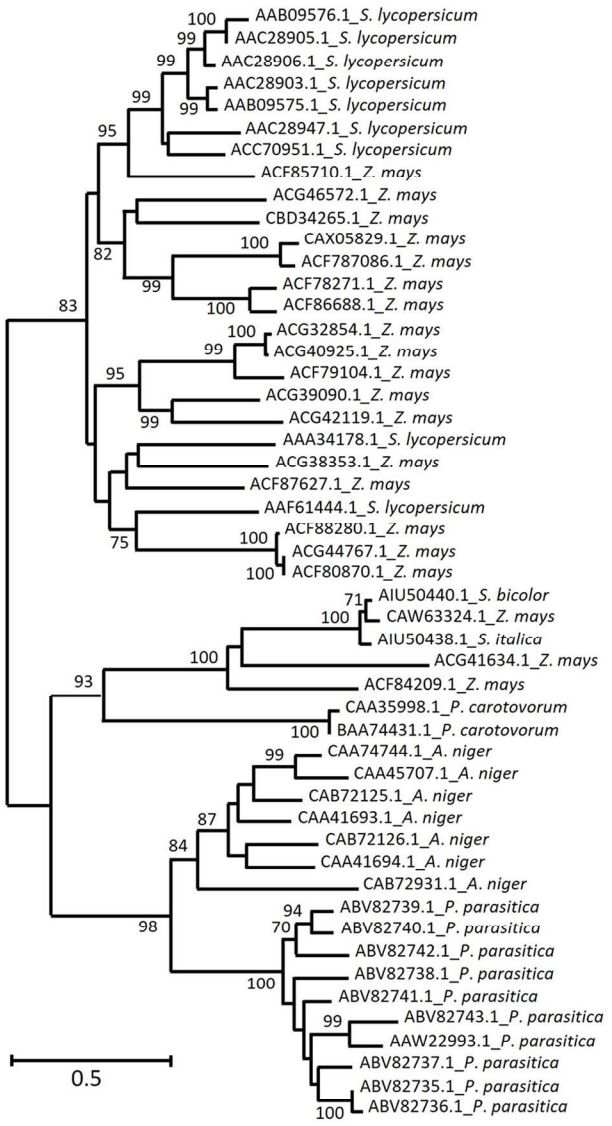


FIGURE 2 | Homology of deduced amino acid sequences from the most represented plant and microbe EPG among the characterized enzymes from CAZy GH28. Predicted EPGs from grasses (*Setaria italica*, *Sorghum Bicolor*, and *Zea mays* – not yet characterized) were added to the alignment. The arabic numbers indicate bootstrap values and phylogenetic groups identified, respectively. The maximum likelihood tree was chosen accordingly to the highest ranked substitution model (Tajima-Nei) and 1000 bootstrap replications. NCBI GenBank numbers are indicated in each sequence.

have distinct properties regarding optimal pH and temperature, substrate specificity and molecular weight. This wide variety of pectinases found in *A. niger* reflects the high complexity of cell wall architecture (i.e., the Glycomic Code) within and among cell walls of different plant species.

Currently, it is possible to find in the literature the characterization of different EPGs produced by fungi, bacteria, archaea, plants, insects, and nematodes. The most studied organisms are fungi and plants and only fungi EPGs had their 3D structure characterized (van Santen et al., 1999; Pouderoyen et al., 2003).

THE DIVERSITY OF EPGs IN MICROORGANISMS AND PLANTS

In order to evaluate the diversity of characterized EPGs, all 210 sequences classified as such (3.2.1.15) were selected from the GH28 family (Lombard et al., 2014). From those, 177 protein sequences harboring predicted GH28 and pectin lyase domains were identified according to InterPro database (Marchler-Bauer et al., 2014). As a result, a total of 122 (68%), 39 (22%), 12 (0,8%), and 4 (0,2%) represented fungi, plant, bacteria, and other eukaryotes EPGs, respectively.

The most represented phylum among fungi was Ascomycota (70 sequences), mainly composed of *Aspergillus* species (21 sequences). Among the *Aspergilli*, those from *A. niger* were the most abundant (five sequences). Following Ascomycota, Oomycota was the second most represented fungi phylum, presenting nine sequences, all from *Phytophthora parasitica*. Concerning bacteria, the most common sub-order was Enterobacteriaceae, with two sequences from *Pectobacterium carotovorum*.

Plant sequences were from Solanaceae (10 sequences): nine from *Solanum lycopersicum* and one from *Nicotiana tabacum*. Among plant species, the families better represented within GH28 (Solanaceae, Rosaceae, Leguminosae) do not have large application in the biofuel industry. Although the grasses are more established as promising feedstocks for biofuel production (Somerville et al., 2010), according to CAZy, no grass endopolygalacturonase figure among the characterized GH28.

In order to compare similarities among plants, bacteria and fungi, the sequences from the above mentioned species (only the most represented from each mentioned fungi phylum, bacteria sub-order or plant family) were aligned using MUSCLE available from MEGA v. 7 (Kumar et al., 2016). Due to the role played by grasses as feedstocks for bioenergy, all GH28 grass EPGs were added to the alignment (20 sequences from *Z. mays*, one sequence from *Sorghum bicolor* and one from *Setaria italica*). Next, a phylogenetic tree derived from the alignment was constructed using Maximum Likelihood as a model and Tamura-Nei method (Tamura and Nei, 1993) with 1000 bootstrap replications.

The phylogenetic tree in **Figure 2** shows that plant EPG diversity appears to be higher than the one observed for fungi. Whereas microbes and grasses (including three out of 20 *Z. mays* sequences) EPG are clustered separately, the majority of *Z. mays* sequences are allocated in two major clades, one among the grass sequences and another among *S. lycopersicum* EPG sequences. *S. lycopersicum* EPGs play important roles during fruit ripening, germination and leaf and flower abscission. Although *S. lycopersicum* sequences divergence is not well supported by bootstrap (<70), they are described below as two different clusters in order to better organize the presentation of functional and transcriptional information.

Increased galacturonic acid levels along with increased accumulation of LeXPG1 mRNA, suggests that this enzyme

(AAF61444.1) is required for radicle protrusion (Sitrit et al., 1999), whereas another tomato enzyme (AAA34178.1) has a fruit ripening-specific pattern (Bird et al., 1988). The majority of the remaining *S. lycopersicum* sequences (AAC28905.1, AAC28906.1, AAC28903.1, AAC28947.1, AAB09575.1, AAB09576.1) is related to abscission zone formation within leaves and flowers (Kalaitzis et al., 1997; Hong and Tucker, 1998). The specificity of these enzymes seems to be a relevant issue since divergent sequences are thought to play different biological roles (Bird et al., 1988), besides displaying different temporal expression patterns (Kalaitzis et al., 1997). It is hard to speculate which roles might be played by *Z. mays* sequences that were clustered together with *S. lycopersicum* ones. However, it is important to note that protein sequence identity between *Z. mays* (ACF85710.1) and *S. lycopersicum* range from 47 to 50%. This level of similarity is higher than the one observed among different *S. lycopersicum* EPG expressed on abscission zones compared to the ones expressed in fruit tissue (38–41%) (Kalaitzis et al., 1997). On the other hand, the identity between those related to leaf and flower abscission was much higher, 76–93%.

Fungi EPG characterization does not cover the same aspects addressed in plant EPG. Reports on functional characterization are available, concerning optimum pH, temperature and mode of action upon homogalacturonans with different degrees of polymerization. Although sugar beet pectins have been used to induce enzyme production, the activity of purified/heterologous EPG upon substrates derived from plants used as bioenergy feedstocks have not been reported. The change of substrates for yeast fermentation from monosaccharides (e.g., galacturonic acid or rhamnose) to polysaccharides (polygalacturonic acid) did not result in increased expression of *A. niger* EPG *pga*A and *pga*B and authors suggested that fungi metabolism was not promptly adapted to the new carbon source (Pařenicová et al., 2000a). The processivity of *A. niger pga*D was precisely and elegantly described upon lemon pectins (Pařenicová et al., 2000b) and polygalacturonan (Pařenicova et al., 1998). However, studies like these have not yet been performed using structurally well characterized polysaccharides from *Z. mays*, sugarcane or miscanthus (Carpita et al., 2001; De Souza et al., 2013b, 2015).

Interestingly, one clade exclusively composed of grass EPG is located separately from *S. lycopersicum* and from other *Z. mays* sequences, which might represent an interesting target for biotechnology research. These predicted proteins seem to be more closely related to microbial ones than to other proteins of plant species, although this divergence is not well supported by bootstrap values and might require further research in order to be confirmed.

Whereas the physiological roles of plant EPGs are reasonably well described, fungi EPG characterization does not cover the same functional aspects addressed in plants. Conversely, reports on plant EPG do not characterize target enzymes in respect of their activity upon a large range of substrates.

Evidently, all efforts toward enzyme prospection have a high value for bioenergy, providing new alternatives to create enzyme cocktails and complement the existing ones. Research on plant EPGs plays an important role in deciphering how they act during physiological processes in which the cell wall is modified and/or hydrolyzed. However, very few of these approaches fill the gap concerning how plant and microbe EPG act upon carbohydrates from bioenergy feedstocks.

CONCLUDING REMARKS

Although in small proportion in walls of grasses and wood biomass feedstocks, pectins can play an important role to circumvent cell wall recalcitrance to hydrolysis.

The literature on EPG focusing on mechanisms of hydrolysis as well as the catalogs of related genes are quite limited, being restricted mainly to fungi (overall, *A. niger*) and a few species of bacteria and plants. The focus on comparisons among pectinases from different microorganisms, suggests that EPGs from bacteria and grasses display higher similarity than each of them with fungi. The fact that the structural and functional properties of EPGs are scarce suggests that such studies should be regarded as a priority in bioenergy research.

Due to the role of pectins on cell wall porosity and cell adhesion, hydrolysis of bioenergy feedstocks with EPG might aid significantly to decrease recalcitrance to hydrolysis, helping both 1G and 2G bioethanol production processes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML composed the first draft of the manuscript and worked with ET on the phylogeny. ET performed the study of the sequences and produced the phylogeny, with the help of ML under supervision of MB. DL produced **Figure 1**. GP and MB supervised the study. All authors worked on writing. MB and ET composed the final version and the main argument of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

MB acknowledges the support of FAPESP-RCUK-CONFAP grant number 2014/50953 and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – INCT do Bioetanol (FAPESP 2008/57908-6 and CNPq 574002/2008-1) and ET acknowledges FAPESP grant number 2015/13479-8.

REFERENCES

Amorim, H. V., Lopes, M. L., de Castro Oliveira, J. V., Buckeridge, M. S., and Goldman, G. H. (2011). Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1267–1275. doi: 10.1007/s00253-011-3437-6

Atkinson, R. G., Sutherland, P. W., Johnston, S. L., Gunaseelan, K., Hallett, I. C., Mitra, D., et al. (2012). Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. *BMC Plant Biol.* 12:129. doi: 10.1186/1471-2229-12-129

Awan, A. T., Tsukamoto, J., and Tasic, L. (2013). Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation. *RSC Adv.* 3, 25071–25078. doi: 10.1039/c3ra43722a

Baron-Epel, O., Hernandez, D., Jiang, L. W., Meiners, S., and Schindler, M. (1988). Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plant cells. *J. Cell Biol.* 106, 715–721. doi: 10.1083/jcb.106.3.715

Bird, C. R., Smith, C. J., Ray, J. A., Moureau, P., Bevan, M. W., Bird, A. S., et al. (1988). The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 11, 651–662. doi: 10.1007/BF00017465

Buckeridge, M., Santos, W., Tiné, M., and De Souza, A. P., (2015). "The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance," in *Compendium of Bioenergy Plants: Compendium of Bioenergy Plants*, eds E. Lam, H. Carrer, J. A. da Silva, and C. Kole (Boca Raton, FL: CRC Press), 31–50. doi: 10.1201/b19601-4

Buckeridge, M. S., and de Souza, A. P. (2014). Breaking the "Glycomic Code" of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. *Bioenergy Res.* 7, 1065–1073. doi: 10.1007/s12155-014-9460-6

Bussink, H. J. D., Buxton, F. P., Fraaye, B. A., De Graaff, L. H., and Visser, J. (1992). The polygalacturonases of *Aspergilks niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur. J. Biochem.* 208, 83–90. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17161.x

Carpita, N. C. (1984). Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. *Phytochemistry* 23, 1089–1093. doi: 10.1016/S0031-9422(00)82615-1

Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., et al. (2001). Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol.* 127, 551–565. doi: 10.1104/pp.010146

Cook, B. J., Clay, R. P., Bergmann, C. W., Albersheim, P., and Darvill, A. G. (1999). Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 703–711. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.8.703

De Souza, A. P., Grandis, A., Leite, D. C. C., and Buckeridge, M. S. (2013a). Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. *BioEnergy Res.* 7, 24–35. doi: 10.1007/s12155-013-9366-8

De Souza, A. P., Kamei, C. L. A., Torres, A. F., Pattathil, S., Hahn, M. G., Trindade, L. M., et al. (2015). How cell wall complexity influences saccharification efficiency in *Miscanthus sinensis*. *J. Exp. Bot.* 66, 4351–4365. doi: 10.1093/jxb/erv183

De Souza, A. P., Leite, D. C. C., Pattathil, S., Hahn, M. G., and Buckeridge, M. S. (2013b). Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenergy Res.* 6, 564–579. doi: 10.1007/s12155-012-9268-1

DeMartini, J. D., Pattathil, S., Miller, J. S., Li, H., Hahn, M. G., and Wyman, C. E. (2013). Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. *Energy Environ. Sci.* 6, 898–909. doi: 10.1039/c3ee23801f

Ding, S.-Y., Liu, Y.-S., Zeng, Y., Himmel, M. E., Baker, J. O., and Bayer, E. A. (2012). How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? *Science* 338, 1055–1060. doi: 10.1126/science.1227491

Edwards, M. C., and Doran-Peterson, J. (2012). Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 565–575. doi: 10.1007/s00253-012-4173-2

Franklin, G. L. (1945). Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature* 155, 51. doi: 10.1038/155051a0

González-Carranza, Z. H., Whitelaw, C. A., Swarup, R., and Roberts, J. A. (2002). Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 534–543. doi: 10.1104/pp.010610

Gunawardena, A., Pearce, D., Jackson, M., Hawes, C., and Evans, D. (2001). Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localised form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L) promoted by ethylene. *Plant Cell Environ.* 24, 1369–1375. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00774.x

Hong, S. B., and Tucker, M. L. (1998). Genomic organization of six tomato polygalacturonases and 5' upstream sequence identity with tap1 and win2 genes. *Mol. Gen. Genet.* 258, 479–487. doi: 10.1007/s0043800 50758

Kalaitzis, P., Solomos, T., and Tucker, M. L. (1997). Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. *Plant Physiol.* 113, 1303–1308. doi: 10.1104/pp.113.4.1303

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054

Lionetti, V., Francocci, F., Ferrari, S., Volpi, C., Bellincampi, D., Galletti, R., et al. (2010). Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *PNAS* 107, 616–621. doi: 10.1073/pnas.0907549107

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, D490–D495. doi: 10.1093/nar/gkt1178

Loqué, D., Scheller, H. V., and Pauly, M. (2015). Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 151–161. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.018

Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., et al. (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* 43, D222–D226. doi: 10.1093/nar/gku1221

Martins, L. H., Rabelo, S. C., and da Costa, A. C. (2015). Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 191, 312–321. doi: 10.1016/j.biortech.2015.05.024

Méjean, A., and Hope, C. (2010). Modelling the costs of energy crops: a case study of US corn and Brazilian sugar cane. *Energy Policy* 38, 547–561. doi: 10.1016/j.enpol.2009.10.006

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266–277. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006

Pařenicová, L., Benen, J. A., Kester, H. C., and Visser, J. (2000a). pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 345(Pt 3), 637–644. doi: 10.1042/bj3450637

Pařenicova, L., Benen, J. A. E., Kester, H. C. M., and Visser, J. (1998). pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* 251, 72–80. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510072.x

Pařenicová, L., Kester, H. C. M., Benen, J. A. E., and Visser, J. (2000b). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS Lett.* 467, 333–336. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01173-X

Pereira, S. C., Maehara, L., Machado, C. M. M., and Farinas, C. S. (2015). 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* 8, 44. doi: 10.1186/s13068-015-0224-0

Posé, S., Paniagua, C., Cifuentes, M., Blanco-Portales, R., Quesada, M. A., and Mercado, J. A. (2013). Insights into the effects of polygalacturonase FaPG1 gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 64, 3803–3815. doi: 10.1093/jxb/ert210

Pouderoyen, G., Snijder, H. J., Benen, J. A. E., and Dijkstra, B. W. (2003). Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.* 554, 462–466. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01221-3

Prasanna, V., Prabha, T. N., and Tharanathan, R. N. (2007). Fruit ripening phenomena–an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 1–19. doi: 10.1080/10408390600976841

Pu, Y., Hu, F., Huang, F., Davison, B. H., and Ragauskas, A. J. (2013). Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. *Biotechnol. Biofuels* 6:15. doi: 10.1186/1754-6834-6-15

RFA (2015). *Renewable Fuels Association. Statistics (Ber)*. Available at: http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics [accessed April 4, 2016]

Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., and Mäkelä, M. R. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 614–649. doi: 10.1128/MMBR.00035-14

Sitrit, Y., Hadfield, K. A., Bennett, A. B., Bradford, K. J., and Downie, A. B. (1999). Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol.* 121, 419–428. doi: 10.1104/pp.121.2.419

Smith, C. J., Watson, C. F., Morris, P. C., Bird, C. R., Seymour, G. B., Gray, J. E., et al. (1990). Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.* 14, 369–379. doi: 10.1007/BF00028773

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., et al. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.* 101, 4820–4825. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.067

Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S. C., and Long, S. P. (2010). Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science* 329, 790–792. doi: 10.1126/science.1189268

Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.

Tavares, E. Q. P., and Buckeridge, M. S. (2015). Do plant cell walls have a code? *Plant Sci.* 241, 286–294. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.10.016

Turumtay, H. (2015). Cell wall engineering by heterologous expression of cell wall-degrading enzymes for better conversion of lignocellulosic biomass into biofuels. *BioEnergy Res.* 8, 1574–1588. doi: 10.1007/s12155-015-9624-z

van Santen, Y., Benen, J. A. E., Schroter, K. H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser, J., et al. (1999). 1.68-angstrom crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 30474–30480. doi: 10.1074/jbc.274.43.30474

Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 301–307. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.002

Xiao, C., and Anderson, C. T. (2013). Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels. *Front. Plant Sci.* 4:67. doi: 10.3389/fpls.2013.00067

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Latarullo, Tavares, Padilla, Leite and Buckeridge. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Apêndice B - Sequências obtidas do DNA genômico e transcrito do clone P. pastoris scEPG1

Sequenciamento - X33_scEPG1

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                            10         20         30         40         50         60
Molde - Construção  AAACGCTGTC TTGGAACCTA ATATGACAAA AGCGTGATCT CATCCAAGAT GAACTAAGTT
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       AAACGCTGTC TTGGAACCTA ATATGACAAA AGCGTGATCT CATCCAAGAT GAACTAAGTT

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                            70         80         90        100        110        120
Molde - Construção  TGGTTCGTTG AAATGCTAAC GGCCAGTTGG TCAAAAAGAA ACTTCCAAAA GTCGGCATAC
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       TGGTTCGTTG AAATGCTAAC GGCCAGTTGG TCAAAAAGAA ACTTCCAAAA GTCGGCATAC

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           130        140        150        160        170        180
Molde - Construção  CGTTTGTCTT GTTTGGTATT GATTGACGAA TGCTCAAAAA TAATCTCATT AATGCTTAGC
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       CGTTTGTCTT GTTTGGTATT GATTGACGAA TGCTCAAAAA TAATCTCATT AATGCTTAGC

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           190        200        210        220        230        240
Molde - Construção  GCAGTCTCTC TATCGCTTCT GAACCCCGGT GCACCTGTGC CGAAACGCAA ATGGGGAAAC
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       GCAGTCTCTC TATCGCTTCT GAACCCCGGT GCACCTGTGC CGAAACGCAA ATGGGGAAAC

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           250        260        270        280        290        300
Molde - Construção  ACCCGCTTTT TGGATGATTA TGCATTGTCT CCACATTGTA TGCTTCCAAG ATTCTGGTGG
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       ACCCGCTTTT TGGATGATTA TGCATTGTCT CCACATTGTA TGCTTCCAAG ATTCTGGTGG

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           310        320        330        340        350        360
Molde - Construção  GAATACTGCT GATAGCCTAA CGTTCATGAT CAAAATTTAA CTGTTCTAAC CCCTACTTGA
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       GAATACTGCT GATAGCCTAA CGTTCATGAT CAAAATTTAA CTGTTCTAAC CCCTACTTGA

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           370        380        390        400        410        420
Molde - Construção  CAGCAATATA TAAACAGAAG GAAGCTGCCC TGTCTTAAAC CTTTTTTTTT ATCATCATTA
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       CAGCAATATA TAAACAGAAG GAAGCTGCCC TGTCTTAAAC CTTTTTTTTT ATCATCATTA

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           430        440        450        460        470        480
Molde - Construção  TTAGCTTACT TTCATAATTG CGACTGGTTC CAATTGACAA GCTTTTGATT TTAACGACTT
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       TTAGCTTACT TTCATAATTG CGACTGGTTC CAATTGACAA GCTTTTGATT TTAACGACTT

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           490        500        510        520        530        540
Molde - Construção  TTAACGACAA CTTGAGAAGA TCAAAAAACA ACTAATTATT CGAAACGATG AGATTTCCTT
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       TTAACGACAA CTTGAGAAGA TCAAAAAACA ACTAATTATT CGAAACGATG AGATTTCCTT

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           550        560        570        580        590        600
Molde - Construção  CAATTTTTAC TGCTGTTTTA TTCGCAGCAT CCTCCGCATT AGCTGCTCCA GTCAACACTA
scEPG1 - DNA        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA       CAATTTTTAC TGCTGTTTTA TTCGCAGCAT CCTCCGCATT AGCTGCTC-- ----------
```

```
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 610        620        630        640        650        660
Molde - Construção       CAACAGAAGA TGAAACGGCA CAAATTCCGG CTGAAGCTGT CATCGGTTAC TCAGATTTAG
scEPG1 - DNA             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 670        680        690        700        710        720
Molde - Construção       AAGGGGATTT CGATGTTGCT GTTTTGCCAT TTTCCAACAG CACAAATAAC GGGTTATTGT
scEPG1 - DNA             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 730        740        750        760        770        780
Molde - Construção       TTATAAATAC TACTATTGCC AGCATTGCTG CTAAAGAAGA AGGGGTATCT CTCGAGAAAA
scEPG1 - DNA             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 790        800        810        820        830        840
Molde - Construção       GAGAGGCTGA AGCTGAATTC ACGTGGCCCA GCCGGCCGTC TCGGATCGGT ACCGGCGCGT
scEPG1 - DNA             -------TGA AGCTGAATTC ACGTCGCCCA GCCGGCCGTC TCGGATCGGT ACCGGCGCGT
scEPG1 - cDNA            ---------- ---------- ---------A GCCGGCCGTC TCGGATCGGT ACCGGCGCGT

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 850        860        870        880        890        900
Molde - Construção       CGTCCGGGGG GCCTGGATGC CGGAAGCACG TGGCGAAGGT CAGGGAGTAC GGCGCGGTGG
scEPG1 - DNA             CGTCCGGGGG GCCTGGATGC CGGAAGCACG TGGCGAAGGT CAGGGAGTAC GGCGCGGTGG
scEPG1 - cDNA            CGTCCGGGGG GCCTGGATGC CGGAAGCACG TGGCGAAGGT CAGGGAGTAC GGCGCGGTGG

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 910        920        930        940        950        960
Molde - Construção       GGGACGGGAG GACGCTCAAC ACGGCGGCGT TCGCCAGGGC GGTGGCGGAC CTGTCGCGGC
scEPG1 - DNA             GGGACGGGAG GACGCTCAAC ACGGCGGCGT TCGCCAGGGC GGTGGCGGAC CTGTCGCGGC
scEPG1 - cDNA            GGGACGGGAG GACGCTCAAC ACGGCGGCGT TCGCCAGGGC GGTGGCGGAC CTGTCGCGGC

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 970        980        990       1000       1010       1020
Molde - Construção       GCGCGCGCGA CGGCGGCGCG GCGCTGGTGG TGCCGCCGGG GAAGTGGCTC ACGGGGCCCT
scEPG1 - DNA             GCGCGCGCGA CGGCGGCGCG GCGCTGGTGG TGCCGCCGGG GAAGTGGCTC ACGGGGCCCT
scEPG1 - cDNA            GCGCGCGCGA CGGCGGCGCG GCGCTGGTGG TGCCGCCGGG GAAGTGGCTC ACGGGGCCCT

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                1030       1040       1050       1060       1070       1080
Molde - Construção       TCAACCTCAC AAGCTGCTTC ACGCTCTACC TCGACGAGGG CGCCGAGATC CTCGCGTCCC
scEPG1 - DNA             TCAACCTCAC AAGCTGCTTC ACGCTCTACC TCGACGAGGG CGCCGAGATC CTCGCGTCCC
scEPG1 - cDNA            TCAACCTCAC AAGCTGCTTC ACGCTCTACC TCGACGAGGG CGCCGAGATC CTCGCGTCCC

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                1090       1100       1110       1120       1130       1140
Molde - Construção       AGGACATGAA CCATTGGCCC CTCATAGCTC CCCTGCCGTC TTACGGGAGA GGAAGGGACG
scEPG1 - DNA             AGGACATGAA CCATTGGCCC CTCATAGCTC CCCTGCCGTC TTACGGGAGA GGAAGGGACG
scEPG1 - cDNA            AGGACATGAA CCATTGGCCC CTCATAGCTC CCCTGCCGTC TTACGGGAGA GGAAGGGACG

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                1150       1160       1170       1180       1190       1200
Molde - Construção       AGCCTGGCCC AAGGTACATC AATTTCATTG GAGGATCCAA TCTCACTGAC GTCATCATCA
scEPG1 - DNA             AGCCTGGCCC AAGGTACATC AATTTCATTG GAGGATCCAA TCTCACTGAC GTCATCATCA
scEPG1 - cDNA            AGCCTGGCCC AAGGTACATC AATTTCATTG GAGGATCCAA TCTCACTGAC GTCATCATCA

                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                1210       1220       1230       1240       1250       1260
Molde - Construção       CAGGTAAAAA TGGAACAATC AACGGGCAGG GGCAAGTCTG GTGGGACAAG TTCCATGCCA
```

```
scEPG1 - DNA          CAGGTAAAAA TGGAACAATC AACGGGCAGG GGCAAGTCTG GTGGGACAAG TTCCATGCCA
scEPG1 - cDNA         CAGGTAAAAA TGGAACAATC AACGGGCAGG GGCAAGTCTG GTGGGACAAG TTCCATGCCA

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1270       1280       1290       1300       1310       1320
Molde - Construção    AGGAGCTCAA GTCCACCCGC GGCCACCTCC TGGAGCTCCT CTACTCTGAT AACATCATCA
scEPG1 - DNA          AGGAGCTCAA GTCCACCCGC GGCCACCTCC TGGAGCTCCT CTACTCTGAT AACATCATCA
scEPG1 - cDNA         AGGAGCTCAA GTCCACCCGC GGCCACCTCC TGGAGCTCCT CTACTCTGAT AACATCATCA

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1330       1340       1350       1360       1370       1380
Molde - Construção    TCTCCAATGT CACCTTCATC AACGCGCCAT ACTGGAACCT CCACCCTACC TATTGCACCA
scEPG1 - DNA          TCTCCAATGT CACCTTCATC AACGCGCCAT ACTGGAACCT CCACCCTACC TATTGCACCA
scEPG1 - cDNA         TCTCCAATGT CACCTTCATC AACGCGCCAT ACTGGAACCT CCACCCTACC TATTGCACCA

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1390       1400       1410       1420       1430       1440
Molde - Construção    ATGTGACCAT CAGTGGCGTC ACCATTCTCG CGCCGCTGAA TTCGCCTAAC ACCGATGGAA
scEPG1 - DNA          ATGTGACCAT CAGTGGCGTC ACCATTCTCG CGCCGCTGAA TTCGCCTAAC ACCGATGGAA
scEPG1 - cDNA         ATGTGACCAT CAGTGGCGTC ACCATTCTCG CGCCGCTGAA TTCGCCTAAC ACCGATGGAA

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1450       1460       1470       1480       1490       1500
Molde - Construção    TTGACCCAGA TTCTTCCTCG CATGTCAAGA TCGAGGACTG CTACATCGTC TCCGGCGACG
scEPG1 - DNA          TTGACCCAGA TTCTTCCTCG CATGTCAAGA TCGAGGACTG CTACATCGTC TCCGGCGACG
scEPG1 - cDNA         TTGACCCAGA TTCTTCCTCG CATGTCAAGA TCGAGGACTG CTACATCGTC TCCGGCGACG

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1510       1520       1530       1540       1550       1560
Molde - Construção    ACTGCGTCGC CGTGAAGAGC GGGTGGGACG AGTACGGCAT CAGGTTCAAC ATGCCGAGCC
scEPG1 - DNA          ACTGCGTCGC CGTGAAGAGC GGGTGGGACG AGTACGGCAT CAGGTTCAAC ATGCCGAGCC
scEPG1 - cDNA         ACTGCGTCGC CGTGAAGAGC GGGTGGGACG AGTACGGCAT CAGGTTCAAC ATGCCGAGCC

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1570       1580       1590       1600       1610       1620
Molde - Construção    AGCACATCGT CATCAGGAGG CTGACCTGCA TCTCCCCCAC GAGCGCCATG ATCGCGCTGG
scEPG1 - DNA          AGCACATCGT CATCAGGAGG CTGACCTGCA TCTCCCCCAC GAGCGCCATG ATCGCGCTGG
scEPG1 - cDNA         AGCACATCGT CATCAGGAGG CTGACCTGCA TCTCCCCCAC GAGCGCCATG ATCGCGCTGG

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1630       1640       1650       1660       1670       1680
Molde - Construção    GCAGCGAGAT GTCCGGCGGC ATCCGCGACG TGCGCGCCGA GGACAACGTC GCCATCAACA
scEPG1 - DNA          GCAGCGAGAT GTCCGGCGGC ATCCGCGACG TGCGCGCCGA GGACAACGTC GCCATCAACA
scEPG1 - cDNA         GCAGCGAGAT GTCCGGCGGC ATCCGCGACG TGCGCGCCGA GGACAACGTC GCCATCAACA

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1690       1700       1710       1720       1730       1740
Molde - Construção    CGGAGTCGGC CGTCAGGGTC AAGTCCGGCG CGGGGAGGGG CGGCTTTGTC AGGGACATTT
scEPG1 - DNA          CGGAGTCGGC CGTCAGGGTC AAGTCCGGCG CGGGGAGGGG CGGCTTTGTC AGGGACATTT
scEPG1 - cDNA         CGGAGTCGGC CGTCAGGGTC AAGTCCGGCG CGGGGAGGGG CGGCTTTGTC AGGGACATTT

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1750       1760       1770       1780       1790       1800
Molde - Construção    TCGTGCGCGG CCTCAGCCTC CACACCATGA AGTGGGTGTT CTGGATGACC GGCAACTACG
scEPG1 - DNA          TCGTGCGCGG CCTCAGCCTC CACACCATGA AGTGGGTGTT CTGGATGACC GGCAACTACG
scEPG1 - cDNA         TCGTGCGCGG CCTCAGCCTC CACACCATGA AGTGGGTGTT CTGGATGACC GGCAACTACG

                      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              1810       1820       1830       1840       1850       1860
Molde - Construção    GGCAGCACCC CGACAACACG TCCAACCCCA ACGCCTTGCC CGAGGTCACC GGCATCAACT
scEPG1 - DNA          GGCAGCACCC CGACAACACG TCCAACCCCA ACGCCTTGCC CGAGGTCACC GGCATCAACT
scEPG1 - cDNA         GGCAGCACCC CGACAACACG TCCAACCCCA ACGCCTTGCC CGAGGTCACC GGCATCAACT
```

```
                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                1870       1880       1890       1900       1910       1920
Molde - Construção      ACAGCGACGT GTTCGCTGAG AACGTGACCA TGGCCGGCAG GATGGAGGGC ATCCCCAACG
scEPG1 - DNA            ACAGCGACGT GTTCGCTGAG AACGTGACCA TGGCCGGCAG GATGGAGGGC ATCCCCAACG
scEPG1 - cDNA           ACAGCGACGT GTTCGCTGAG AACGTGACCA TGGCCGGCAG GATGGAGGGC ATCCCCAACG

                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                1930       1940       1950       1960       1970       1980
Molde - Construção      ACCCCTACAC CGGGATCTGC ATATCCAACG TCACTGCCCG CCTCGCGCCG AACGCCCAGG
scEPG1 - DNA            ACCCCTACAC CGGGATCTGC ATATCCAACG TCACTGCCCG CCTCGCGCCG AACGCCCAGG
scEPG1 - cDNA           ACCCCTACAC CGGGATCTGC ATATCCAACG TCACTGCCCG CCTCGCGCCG AACGCCCAGG

                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                1990       2000       2010       2020       2030       2040
Molde - Construção      AGCTGCAGTG GAACTGCACC AACGTCAAGG GGGTCACCTC CGACGTCTCG CCCAAGCCGT
scEPG1 - DNA            AGCTGCAGTG GAACTGCACC AACGTCAAGG GGGTCACCTC CGACGTCTCG CCCAAGCCGT
scEPG1 - cDNA           AGCTGCAGTG GAACTGCACC AACGTCAAGG GGGTCACCTC CGACGTCTCG CCCAAGCCGT

                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                2050       2060       2070       2080       2090       2100
Molde - Construção      GCCCAGAGCT CGGCGCGGAG GGCAAGCCGT GCGCCTTCCC GGTGGAAGAG CTCGTCATTG
scEPG1 - DNA            GCCCAGAGCT CGGCGCGGAG GGCAAGCCGT GCGCCTTCCC GGTGGAAGAG CTCGTCATTG
scEPG1 - cDNA           GCCCAGAGCT CGGCGCGGAG GGCAAGCCGT GCGCCTTCCC GGTGGAAGAG CTCGTCATTG

                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                2110       2120       2130       2140       2150       2160
Molde - Construção      GCCCACCGGA GCTGCCAAAG TGTAGCTACG GTCTAGAACA AAAACTCATC TCAGAAGAGG
scEPG1 - DNA            GCCCACCGGA GCTGCCAAAG TGTAGCTACG GTCTAGAACA AAAACTCATC TCAGAAGAGG
scEPG1 - cDNA           GCCCACCGGA GCTGCCAAAG TGTAGCTACG GTCTAGAACA AAAACTCATC TCAGAAGAGG

                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                2170       2180       2190       2200       2210       2220
Molde - Construção      ATCTGAATAG CGCCGTCGAC CATCATCATC ATCATCATTG AGTTTGTAGC CTTAGACATG
scEPG1 - DNA            ATCTGAATAG CGCCGTCGAC CATCATCATC ATCATCATTG AGTTTGTAGC CTTAGACATG
scEPG1 - cDNA           ATCTGAATAG CGCCGTCGAC CATCATCATC ATCATCATTG AGTTTGTAGC CTTAGACATG

                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                2230       2240       2250       2260       2270       2280
Molde - Construção      ACTGTTCCTC AGTTCAAGTT GGGCACTTAC GAGAAGACCG GTCTTGCTAG ATTCTAATCA
scEPG1 - DNA            ACTGTTCCTC AGTTCAAGTT GGGCACTTAC GAGAAGACCG GTCTTGCTAG ----------
scEPG1 - cDNA           ACTGTTCCTC AGTTCAAGTT GGGCACTTAC GAGAAGACCG GTCTTGCTAG ATTCTAATCA

                        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                2290       2300       2310       2320       2330       2340
Molde - Construção      AGAGGATGTC AGAATGCCAT TTGCCTGAGA GATGCAGGCT TCATTTTTGA TACTTTTTTA
scEPG1 - DNA            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
scEPG1 - cDNA           AGAGGATGTC AGAATGCCAT TTGC------ ---------- ---------- ----------
```

Apêndice C – Sequências obtidas do DNA genômico e transcrito do clone P. pastoris + Vetor vazio

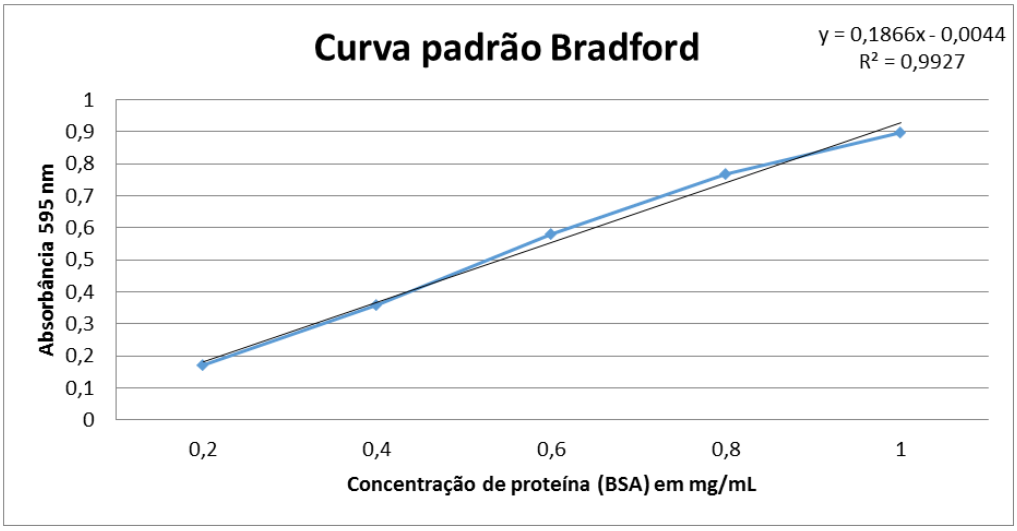
Sequenciamento - Vetor vazio

```
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                        790        800        810        820        830        840
pPICzaA - Mapa completo         ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT
Vetor Vazio - DNA               ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Vetor Vazio - cDNA              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                        850        860        870        880        890        900
pPICzaA - Mapa completo         ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA
Vetor Vazio - DNA               ---------- ----GACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA
Vetor Vazio - cDNA              ---------- ----GACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                        910        920        930        940        950        960
pPICzaA - Mapa completo         CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTCGAAACG ATGAGATTTC CTTCAATTTT
Vetor Vazio - DNA               CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTCGAAACG ATGAGATTTC CTTCAATTTT
Vetor Vazio - cDNA              CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTCGAAACG ATGAGATTTC CTTCAATTTT

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                        970        980        990       1000       1010       1020
pPICzaA - Mapa completo         TACTGCTGTT TTATTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT CCAGTCAACA CTACAACAGA
Vetor Vazio - DNA               TACTGCTGTT TTATTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT CCAGTCAACA CTACAACAGA
Vetor Vazio - cDNA              TACTGCTGTT TTATTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT CCAGTCAACA CTACAACAGA

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                       1030       1040       1050       1060       1070       1080
pPICzaA - Mapa completo         AGATGAAACG GCACAAATTC CGGCTGAAGC TGTCATCGGT TACTCAGATT TAGAAGGGGA
Vetor Vazio - DNA               AGATGAAACG GCACAAATTC CGGCTGAAGC TGTCATCGGT TACTCAGATT TAGAAGGGGA
Vetor Vazio - cDNA              AGATGAAACG GCACAAATTC CGGCTGAAGC TGTCATCGGT TACTCAGATT TAGAAGGGGA

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                       1090       1100       1110       1120       1130       1140
pPICzaA - Mapa completo         TTTCGATGTT GCTGTTTTGC CATTTTCCAA CAGCACAAAT AACGGGTTAT TGTTTATAAA
Vetor Vazio - DNA               TTTCGATGTT GCTGTTTTGC CATTTTCCAA CAGCACAAAT AACGGGTTAT TGTTTATAAA
Vetor Vazio - cDNA              TTTCGATGTT GCTGTTTTGC CATTTTCCAA CAGCACAAAT AACGGGTTAT TGTTTATAAA

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                       1150       1160       1170       1180       1190       1200
pPICzaA - Mapa completo         TACTACTATT GCCAGCATTG CTGCTAAAGA AGAAGGGGTA TCTCTCGAGA AAAGAGAGGC
Vetor Vazio - DNA               TACTACTATT GCCAGCATTG CTGCTAAAGA AGAAGGGGTA TCTCTCGAGA AAAGAGAGGC
Vetor Vazio - cDNA              TACTACTATT GCCAGCATTG CTGCTAAAGA AGAAGGGGTA TCTCTCGAGA AAAGAGAGGC

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                       1210       1220       1230       1240       1250       1260
pPICzaA - Mapa completo         TGAAGCTGAA TTCACGTGGC CCAGCCGGCC GTCTCGGATC GGTACCTCGA GCCGCGGCGG
Vetor Vazio - DNA               TGAAGCTGAA TTCACGTGGC CCAGCCGGCC GTCTCGGATC GGTACCTCGA GCCGCGGCGG
Vetor Vazio - cDNA              TGAAGCTGAA TTCACGTGGC CCAGCCGGCC GTCTCGGATC GGTACCTCGA GCCGCGGCGG

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                       1270       1280       1290       1300       1310       1320
pPICzaA - Mapa completo         CCGCCAGCTT TCTAGAACAA AAACTCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATAGC GCCGTCGACC
Vetor Vazio - DNA               CCGCCAGCTT TCTAGAACAA AAACTCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATAGC GCCGTCGACC
Vetor Vazio - cDNA              CCGCCAGCTT TCTAGAACAA AAACTCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATAGC GCCGTCGACC

                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                       1330       1340       1350       1360       1370       1380
pPICzaA - Mapa completo         ATCATCATCA TCATCATTGA GTTTGTAGCC TTAGACATGA CTGTTCCTCA GTTCAAGTTG
Vetor Vazio - DNA               ATCATCATCA TCATCATTGA GTTTGTAGCC TTAGACATGA CTGTTCCTCA GTTCAAGTTG
Vetor Vazio - cDNA              ATCATCATCA TCATCATTGA GTTTGTAGCC TTAGACATGA CTGTTCCTCA GTTCAAGTTG
```

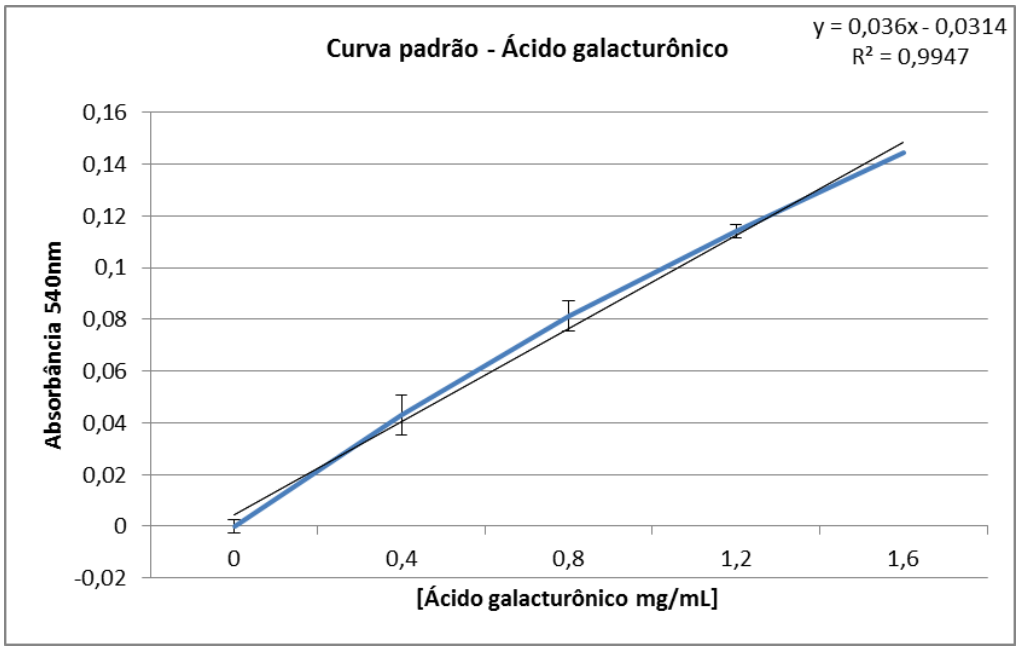
```
                                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                         1390       1400       1410       1420       1430       1440
pPICzaA - Mapa completo          GGCACTTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT
Vetor Vazio - DNA                GGCACTTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT
Vetor Vazio - cDNA               GGCACTTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT

                                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                         1450       1460       1470       1480       1490       1500
pPICzaA - Mapa completo          TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG
Vetor Vazio - DNA                TGCC------ ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Vetor Vazio - cDNA               TGCC------ ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                         1510       1520       1530       1540       1550       1560
```

Apêndice D – Curvas padrão e equações

Curva padrão – Proteínas (Bradford)



Curva padrão – Ácido galacturônico (DNS)



Apêndice E – Otimização da indução

	scEPG1 - 28˚C (180 RPM)				Vetor vazio - 28˚C (180 RPM)			
Indução (h)	**Amostra 1**	**Amostra 2**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Amostra 1**	**Amostra 2**	**Média**	**Desvio Padrão**
24h	0,237942122	0,093247588	0,165594855	0,072347267	0,120042872	0,077170418	0,098606645	0,021436227
48h	1,272240086	0,693461951	0,982851018	0,289389068	0,130760986	0,028938907	0,079849946	0,05091104
72h	1,459807074	2,467309753	1,963558414	0,50375134	0,136120043	0,093247588	0,114683816	0,021436227
96h	1,958199357	2,922829582	2,440514469	0,482315113	0,200428725	0,125401929	0,162915327	0,037513398
120h	2,279742765	2,896034298	2,587888532	0,308145766	0,54340836	0,655948553	0,599678457	0,056270096
144h	2,038585209	2,692390139	2,365487674	0,326902465	0,538049303	0,077170418	0,307609861	0,230439443

	scEPG1 - 30˚C (250 RPM)				Vetor vazio - 30˚C (250 RPM)			
Indução (h)	**Amostra 1**	**Amostra 2**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Amostra 1**	**Amostra 2**	**Média**	**Desvio Padrão**
24h	0,168274384	0,248660236	0,20846731	0,040192926	0,146838156	0,345123258	0,245980707	0,099142551
48h	0,538049303	0,232583065	0,385316184	0,152733119	0,420150054	0,03965702	0,229903537	0,190246517
72h	0,8113612	0,505894962	0,658628081	0,152733119	0,109324759	0,302250804	0,205787781	0,096463023
96h	1,309753483	0,484458735	0,897106109	0,412647374	0,52733119	0,339764202	0,433547696	0,093783494
120h	1,148981779	0,747052519	0,948017149	0,20096463	0,54340836	0,184351554	0,363879957	0,179528403
144h	1,41693462	0,361200429	0,889067524	0,527867095	0,40943194	0,205787781	0,307609861	0,101822079

Apêndice F – Valores brutos de variação de temperatura e pH

Variação de pH

	scEPG1							Vetor vazio						
Tampão	**Abs 1**	**Abs 2**	**Abs3**	**Média**	**Desvio Padrão**	**U/mL**	**% residual**	**Abs 1**	**Abs 2**	**Abs3**	**Média**	**Desvio Padrão**	**U/mL**	**% residual**
4,0	0,149	0,145	0,136	0,143	0,007	0,037	31,617	0,122	0,060	0,027	0,070	0,048	0,021	11,278
5,0	0,677	0,566	0,610	0,618	0,056	0,137	100,000	0,465	0,312	0,350	0,376	0,080	0,086	60,817
6,0	0,199	0,206	0,185	0,197	0,011	0,048	78,398	0,020	0,010	0,012	0,014	0,005	0,010	2,266
7,0	0,099	0,100	0,095	0,098	0,003	0,027	42,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
8,0	0,122	0,124	0,110	0,119	0,008	0,032	50,930	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
9,0	0,064	0,004	0,000	0,023	0,036	0,011	9,728	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000

Variação de temperatura

	scEPG1							Vetor vazio						
Temperatura	**Abs 1**	**Abs 2**	**Abs3**	**Média**	**Desvio Padrão**	**U/mL**	**% residual**	**Abs 1**	**Abs 2**	**Abs3**	**Média**	**Desvio Padrão**	**U/mL**	**% residual**
30˚C	0,066	0,065	0,044	0,058	0,012	0,019	38,126	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
35˚C	0,126	0,140	0,110	0,125	0,015	0,033	81,917	0,028	0,029	0,046	0,034	0,010	0,014	22,484
45˚C	0,158	0,098	0,202	0,153	0,052	0,039	99,978	0,022	0,045	0,065	0,044	0,022	0,016	28,815
50˚C	0,133	0,066	0,109	0,103	0,034	0,028	67,102	0,059	0,010	0,052	0,040	0,027	0,015	26,413
55˚C	0,116	0,081	0,102	0,100	0,018	0,028	65,142	0,013	0,039	0,048	0,033	0,018	0,014	21,829
60˚C	0,099	0,099	0,098	0,099	0,001	0,027	64,488	0,017	0,001	0,000	0,006	0,010	0,008	3,929
65˚C	0,099	0,045	0,078	0,074	0,027	0,022	48,366	0,043	0,003	0,007	0,018	0,022	0,010	11,570
70˚C	0,011	0,035	0,014	0,020	0,013	0,011	13,072	0,029	0,043	0,000	0,024	0,022	0,012	15,717