DANIELE HEIRAS PIVETTA

"Clonagem e expressão do gene *engXCA* de *Xanthomonas campestris* pv. campestris em S*accharomyces cerevisiae* e estudo das endoglucanases nativa e recombinante"

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins
Co-orientador: Prof.Dr. Henrique Ferreira

ARARAQUARA, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Pivetta, Daniele Heiras
P693c Clonagem e expressão do gene *engXCA* de *Xanthomonas campestris* pv. campestris em *Saccharomyces cerevisiae* e estudos das endoglucanases nativa e recombinante / Daniele Heiras Pivetta. – Araraquara : [s.n], 2014
76 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Daniela Alonso Bocchini Martins
Coorientador: Henrique Ferreira

1. Biotecnologia. 2. Endoglucanase. 3. Expressão heteróloga. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DANIELE HEIRAS PIVETTA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 07 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. DANIELA ALONSO BOCCHINI MARTINS (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara / UNESP / Araraquara

Drª. CRISTIANE SANCHEZ FARINAS
Embrapa Instrumentação Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos

DADOS CURRICULARES

DANIELE HEIRAS PIVETTA

Formação acadêmica (2007-2011)

Bacharelado em Física Biológica

Universidade Estadual paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. **Trabalhos publicados a periódicos indexados:**

FERRAREZI, A. L.; PIVETTA, D. H.; GUISAN, J. M.; GOMES, E.; SILVA, R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; PESSELA, B. Partial purification, immobilization and preliminary biochemical characterization of lipases from *Rhizomucor pusillus*. **Advances in Enzyme Research**, v. 01, p. 79-90, 2013.

2. **Participação em eventos científicos:**

- **XXVII Congresso Brasileiro de Microbiologia.**

29 de setembro a 03 de outubro de 2013. Natal, RN. (Congresso).

"Clonagem e expressão da endoglucanase majoritária de *Xanthomonas campestris* pv. campestris em *Saccharomyces cerevisiae*."

-**XXVI Congresso Brasileiro de Microbiologia.**

02 a 06 de outubro de 2011. Foz do Iguaçú, PR. (Congresso).

"Produção e caracterização das lipases produzidas pelo fungo termofílico *Rhizomucor pusillus*"

E-mail: daniele_pivetta@hotmail.com

Dedico este trabalho aos meus pais Odenir e Marlene e minha irmã Fernanda.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amparar, me dar forças e me guiar nos momentos mais difíceis desta caminhada.

À minha família, pelo apoio, amor e força. Vocês são minha fortaleza, minha base. Muito obrigada pela confiança, carinho e paciência.

À Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins, pela oportunidade, apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira, pelos ensinamentos e suporte.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, pela colaboração.

À Me. Amanda Piovesan, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Às amigas e companheiras de laboratório Natália Marques, Maira Prearo e Marina Marques, por estarem sempre dispostas a ajudar e que tornaram esta caminhada mais agradável.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, Ana Carolina Boni, Stella Virgilio, Rodrigo Duarte, Fernanda Cupertino e Fernanda Zanolli, pelo grande suporte e amizade.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, por me proporcionar a estrutura e as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro durante o período de realização deste mestrado.

À todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

"Crê em ti mesmo, age e verá os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar."

Chico Xavier

RESUMO

A grande dependência de fontes fósseis de energia altamente poluentes, como o petróleo e seus derivados, tem levado a sociedade a buscar alternativas renováveis para a utilização de combustíveis. As pesquisas atuais sinalizam como tecnologia emergente a produção de etanol combustível a partir de biomassas residuais de composição lignocelulósica. Com o desenvolvimento e o estabelecimento de novas tecnologias para a obtenção de etanol de segunda geração, as celulases podem tornar-se a primeira classe de enzimas comercializadas e industrialmente utilizadas no mundo todo. Mesmo sendo produzidas por uma gama de micro-organismos, ainda há restrições que dificultam o processo de obtenção destas enzimas. Para superar algumas destas dificuldades, a Biologia Molecular surge como uma ferramenta favorável na produção enzimática, pois a clonagem e expressão de genes de celulases em leveduras representa uma estratégia interessante para a utilização das mesmas em processos de sacarificação e fermentação simultâneos (SFS). Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo a construção de uma linhagem de levedura capaz de expressar uma celulase bacteriana para testes futuros de SFS. Para tal, foi isolado o gene *engXCA* de *Xanthomonas campestris* pv. campestres (Xcc) e um fragmento do gene codificando para o peptídeo sinal do fator alpha de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (*MFalpha*). Este foi ligado upstream ao gene *engXCA*, resultando na fusão *MFalpha-engXCA*. Tal quimera foi ligada ao vetor de expressão pYES2 de Sc e a endoglucanase recombinante foi secretada para o meio de cultivo. A linhagem que apresentou melhor produção da enzima recombinante foi Sc BJ3501 quando cultivada por 36h a 30°C, em meio rico YPGal+CMC (carboximetilcelulose) 1,0%. As condições reacionais foram avaliadas tanto para a endoglucanase recombinante quanto para a selvagem de Xcc e, as melhores condições para as atividades enzimáticas foram em pH 5,5 e 65°C. Já em relação è estabilidade, as enzimas se apresentaram mais estáveis em pH 5,0 e mantiveram termoestabilidade até 55°C, quando incubadas por 1 hora.

Palavras-chave: Endoglucanase. Expressão heteróloga. *Saccharomyces cerevisiae. Xanthomonas campestris* pv. campestris.

ABSTRACT

The dependence on highly polluting fossil sources of energy, such as oil and oil products, has led the society to look for alternatives for renewable fuel use. Current researches indicate as emerging technology the production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass waste. With the development and the establishment of new technologies for obtaining second-generation ethanol, cellulases may become the first class of enzymes marketed and industrially used worldwide. Despite being produced by a range of microorganisms, there are still limitations that hinder the process to obtain these enzymes. In order to overcome some of these difficulties, molecular biology appears as a favorable enzyme production tool. Since cloning and expression of cellulase genes in yeasts represents a interesting strategy for using these enzymes in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. Within this context, this study aimed the construction of a yeast strain capable of expressing a bacterial cellulase for future testing of SFS. To this end, *engXCA* gene was isolated from *Xanthomonas campestris* pv. campestris (Xcc), and a gene fragment coding for the signal peptide of the alpha factor Sc (*MFalpha*). The latter was connected upstream to *engXCA* gene, resulting in *MFalpha-engXCA* merger. This chimera was linked to vector pYES2 *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and the recombinant expression endoglucanase was secreted into the culture medium. The strain that showed the best production of the recombinant enzyme was Sc BJ3501. When growing for 36 h at 30°C, in rich medium YPGal + CMC (carboxymethyl cellulose) 1.0%. The reaction conditions were evaluated for both native and Xcc recombinant endoglucanases and the best conditions for enzymatic activities were pH 5.5 and 65°C. Regarding stability, recombinant and native endoglucanases were more stable at pH 5.0 and maintained a high thermostability up to 55 °C when incubated for 1 hour.

Keywords: Endoglucanase. Heterologous expression. *Saccharomyces cerevisiae.* *Xanthomonas campestris* pv. campestris.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação de preço do ATR (Açúcares Totais Recuperáveis) para etanol anidro, hidratado e açúcar. **.....18**

Figura 2 - Produção de bioetanol no Brasil. **.....19**

Figura 3 - Esquema da parede celular vegetal. **.....22**

Figura 4 - Estrutura representativa das cadeias de celulose. **.....23**

Figura 5 - Degradação enzimática completa da celulose. **.....25**

Figura 6 - Perspectivas para a produção de biocombustíveis. **.....27**

Figura 7 - Vetores utilizados para clonagem e expressão. (A) pJET1.2/blunt, para clonagem e manipulação dos genes de interesse em *E.Coli*. (B) Vetor de expressão de *S. cerevisiae*. **.....36**

Figura 8 - Construção plasmidial pretendida. **.....38**

Figura 9 - Ensaio de atividade CMCase em placa a partir de Xcc. (A) Colônias de Xcc crescidas por 48h a 30°C em meio N acrescido de CMC 1%, contendo (g/L): glicerol (20,0), peptona (5,0), extrato de levedura (3,0) e Agar (15,0). (B) Atividade CMCase revelada com solução 0,1% de vermelho congo. **.....48**

Figura 10 - PCR para isolamento e amplificação do gene *mfα*. No poço 1 encontra-se o marcador de peso molecular (NewEnglandBioLabs - 500µg/mL) em kilobases (Kb) e no poço 2, o produto da reação PCR do gene *mfα*, com aproximadamente 300 pares de base (pb). **.....49**

Figura 11 - PCR para isolamento do gene *engXCA*. Na parte (A) tem-se no poço 1 a PCR do DNA de Xcc, na qual a banda cortada equivale ao gene *engXCA* e, no poço 2, se encontra o marcador de peso molecular (BioLabs - 500µg/mL). Já na parte (B) mostra-se em 1 o referido marcador de peso molecular e em 2, a banda equivalente ao gene de aproximadamente 1500 pb, purificada com GeneJET™ Gel Extraction Kit – Fermentas Life Science. **.....50**

Figura 12- Análise de restrição para a clonagem do gene *engXCA*, mostrando no poço 1 a digestão com as enzimas *BamH*I e *Xho*I, no 2 a digestão com a enzima *EcoR*I e em 3, o marcador de peso molecular (NewEnglandBioLabs - 500µg/mL). **.....51**

Figura 13 - Análise de restrição da subclonagem do gene *engXCA* em vetor de expressão pYES2 (clone 3). No poço 1 tem-se a construção plasmidial intacta pYES2-eng no poço 2, a digestão com a enzima *BamH*I, no poço 3 as digestões

com *Kpn*I e *Xho*I e em 4, o marcador de peso molecular (NewEnglandBioLabs - 500µg/mL)**.....52**

Figura 14 - Avaliação da produção de endoglucanase pela linhagem CBO012 através de fermentação submersa. Fermentação submersa seguindo o protocolo 1 dos transformantes CBO012 com o controle negativo (vetor vazio) pYES2 e as construções plasmidiais pYES2-eng e pYE pYES2-nc. A linha preta mostra o crescimento celular de cada cultura, enquanto a azul evidencia a inexistência de atividade CMCase nos 2 casos. **.....53**

Figura 15 - Teste de atividade CMCase em placa a partir da linhagem CBO012. Alíquotas retiradas no tempo 48h, na qual (A) mostra as colônias transformantes contendo a construção plasmidial pYES2-eng, crescidas em meio SC+U +2% Galactose + 1% CMC como substrato sintético, sendo C a linhagem controle. Já em (B) tem-se a revelação da atividade negativa de CMCase com solução 0,1% de vermelho congo. Nota-se que não há a formação de halo ao redor da colônia em (B), indicando a inexistência de enduglucanases no meio. **.....53**

Figura 16 - Atividade CMCase revelada com solução 0,1% de vermelho congo. Transformantes da linhagem BJ3501 apresentaram atividade enzimática qualitativa em placa. **.....55**

Figura 17 - Atividade CMCase revelada com solução 0,1% de vermelho congo. Transformantes da linhagem INVSc-1 apresentaram atividade enzimática qualitativa em placa. **.....55**

Figura 18 - Time-course: atividade enzimática qualitativa em placa. Foram depositados sobre a placa, 5,0 µL das alíquotas obtidas em cada tempo, em horas: 12, 24, 36, 48, 60 e 72, além do controle C, nos tempos 36 e 72 horas. **57**

Figura 20 - Influência do pH sobre a atividade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc**.....**Erro! Indicador não definido.

Figura 21 - Influência da temperatura sobre a atividade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc. **.....61**

Figura 22 - Efeito do pH sobre a estabilidade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc**.....63**

Figura 23 - Efeito da temperatura sobre a estabilidade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc. **.....64**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos inicializadores utilizados nas reações de PCR.....**36**

Tabela 2 - Composição dos meios nutrientes testados para a produção da endoglucanase recombinante em *S. cerevisiae*.....**43**

Tabela 3 - Produção de endoglucanase pela linhagem *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xac) durante fermentação submersa em diferentes meios nutrientes.....**46**

Tabela 4 - Produção de endoglucanase pela linhagem *Xanthomonas campestris* pv. campestris (Xcc) durante fermentação submersa em diferentes meios nutrientes **47**

Tabela 5 - Produção de endoglucanase pela linhagem *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (Xav) durante fermentação submersa em diferentes meios nutrientes **47**

Tabela 6 - Expressão de endoglucanases de diferentes organismos em *S. cerevisiae* **66**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS 15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Etanol no Brasil: breve visão e perspectivas 17
2.2 Biomassa como fonte de Bioenergia 21
2.3 Celulases 24
2.4 Micro-organismos produtores e expressão heteróloga de celulases 27
3. OBJETIVOS 31
3.1 Geral 31
3.2 Específicos 31
4. MATERIAL E MÉTODOS 32
4.1 Produção de endoglucanase por fermentação submersa 32
4.2 Análise quantitativa de atividade enzimática 33
4.3 Extração de DNA cromossômico bacteriano 33
4.4 Micro-organismos utilizados para clonagem e expressão e condições de cultura 34
4.5 Plasmídeos e vetores utilizados 35
4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 36
4.6.I) Amplificação do gene *mfα* 36
4.6.II) Amplificação do gene *engXCA* 37
4.7 Clonagem do gene engXCA em vetor de clonagem 37
4.8 Construção plasmidial pYES2-eng 38
4.9 Procedimentos básicos em Biologia Molecular 39
4.9.I) Indução de competência em *E.coli* 39
4.9.II) Transformação em *E. coli* competente DH10B 39
4.9.III) Extração de DNA plasmidial 39
4.9.IV) Sequenciamento 39
4.9.V) Transformação em levedura CBO012, INVSc-1 e BJ3501 39
4.10 Fermentações submersas para testes de expressão em CBO012 40
4.10.I) Protocolo 1: 40
4.10.II) Protocolo 2: 41
4.11 Expressão nas linhagens de levedura INVSc-1 e BJ3501 42
4.12 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes tempos de fermentação (Time course) 42

4.13 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes meios de cultivo....43
4.14 Quantificação de proteínas totais 44
4.15 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e Zimograma....44
4.16 Caracterização físico-química das endoglucanases nativa e recombinante 45
4.16.I) Determinação do pH ótimo de atividade 45
4.16.II) Determinação da temperatura ótima de atividade....45
4.16.III) Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante 45
4.16.IV) Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante 45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO....46
5.1 Produção de endoglucanase por fermentação submersa....46
5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)....48
5.3 Verificação da clonagem do gene *engXCA* em pJET por análise de restrição 50
5.4 Subclonagem dos genes *mfα* e *engXCA* no vetor de expressão pYES2 (Invitrogen)....51
5.5 Verificação da construção plasmidial pYES2-eng por análise de restrição ...51
5.6 Fermentações submersas para testes de expressão em CBO012....52
5.7 Expressão nas linhagens de leveduras INVSc-1 e BJ3501 54
5.8 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes tempos de fermentação (Time course)....56
5.9 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes meios de cultivo....57
5.10 Caracterização físico-química das endoglucanases nativa e recombinante.59
5.10.I) Determinação do pH ótimo de atividade 59
5.10.II) Determinação da temperatura ótima de atividade....61
5.10.III) Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante 62
5.10.IV) Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante 64
6. CONCLUSÕES....68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....70

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

Com a intensa demanda mundial por energia e a possível limitação dos recursos petrolíferos, é crescente o interesse por fontes alternativas aos combustíveis fósseis. Neste sentido, a busca por fontes de energia alternativas e renováveis está mobilizando internacionalmente e de forma ímpar setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais, com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental.

A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil apresenta uma série de vantagens econômicas e ambientas, pois as emissões de gases e a toxicidade do etanol são mais baixas quando comparadas àquelas dos combustíveis obtidos a partir do petróleo. Porém, com a crescente produção deste bioetanol de primeira geração no Brasil, a área de cultivo de cana-de-açúcar deverá ser expandida para atender à demanda nacional e internacional. Para evitar a expansão desmedida destas áreas, têm-se desenvolvido processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósicas, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração (SILVA, 2010).

Anualmente, as plantas produzem aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose, fazendo deste polissacarídeo o maior reservatório de carbono orgânico no planeta (GLAZER; NIKAIDO, 2007). Desta forma, grande atenção tem sido dispensada ao potencial biotecnológico da celulose presente nestes resíduos lignocelulósicos agroindustriais, florestais e urbanos, especialmente no que se refere à sua conversão em glicose e posterior fermentação deste açúcar em etanol. O reaproveitamento de resíduos também pode minimizar os problemas ambientais relacionados ao seu acúmulo, diminuir o uso de combustíveis fósseis e, consequentemente, a emissão de gases de efeito estufa e ainda, reduzir o conflito entre o uso da terra para a produção de alimentos e de fontes de energia.

A conversão enzimática da celulose de resíduos lignocelulósicos traz benefícios interessantes no ponto de vista ambiental, sendo realizada pela ação combinada de pelo menos três grupos de enzimas que atuam em sinergia: as endoglucanases, as exoglucanases ou celobiohidrolases e as β-glicosidases (BUABAN *et al*., 2010).

No que se refere à obtenção destas enzimas para utilização na produção de bioetanol de segunda geração, seu custo ainda é muito elevado, fazendo deste um dos maiores entraves para o desenvolvimento do processo. Mesmo sendo produzidas por uma gama de micro-organismos, ainda há restrições que dificultam o processo de obtenção destas enzimas.

Para minimizar tais dificuldades, a utilização de ferramentas de Biologia Molecular representa uma eficiente estratégia para melhorar a produção enzimática. A clonagem e expressão de genes de celulases em leveduras representa uma alternativa interessante para a utilização das enzimas em bioprocessos consolidados para a obtenção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. Desta forma, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) configura-se como o mais adequado sistema de expressão heterólogo, pois além de expressar as enzimas de interesse, é capaz de fermentar os produtos de hidrólise simultaneamente (LIMA e RODRIGUES, 2007).

Dentro deste contexto, este trabalho objetivou iniciar a construção de uma linhagem de Sc útil para futuros testes de Sacarificação e Fermentação Simultâneos (SFS), a partir do isolamento, clonagem e expressão da endoglucanase majoritária de *Xanthomonas campestris* pv. campestris (Xcc) em plataforma bem sucedida para expressão em levedura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol no Brasil: breve visão e perspectivas

Com a possível escassez e a crescente elevação no preço dos combustíveis fósseis, têm-se dado grande importância aos investimentos na produção de combustíveis renováveis, com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental.

Cada vez mais, o etanol ganha importância frente a este cenário como principal opção de fonte de energia, pois é um combustível barato, menos poluente e renovável. O etanol produzido atualmente pela fermentação da sacarose contida no caldo da cana-de-açúcar é chamado de etanol de primeira geração, ou simplesmente bioetanol. O bioetanol é um combustível, ou seja, libera significativas quantidades de calor ao se queimar. Contudo, apresenta algumas diferenças importantes em relação aos combustíveis convencionais derivados de petróleo. A principal delas é o elevado teor de oxigênio, que constitui em massa 35% do etanol. Suas características possibilitam a combustão mais limpa e o melhor desempenho dos motores, contribuindo para a diminuição da emissão de gases poluentes, o que torna o bioetanol brasileiro um combustível avançado (GOLDEMBERG *et al.*, 2008).

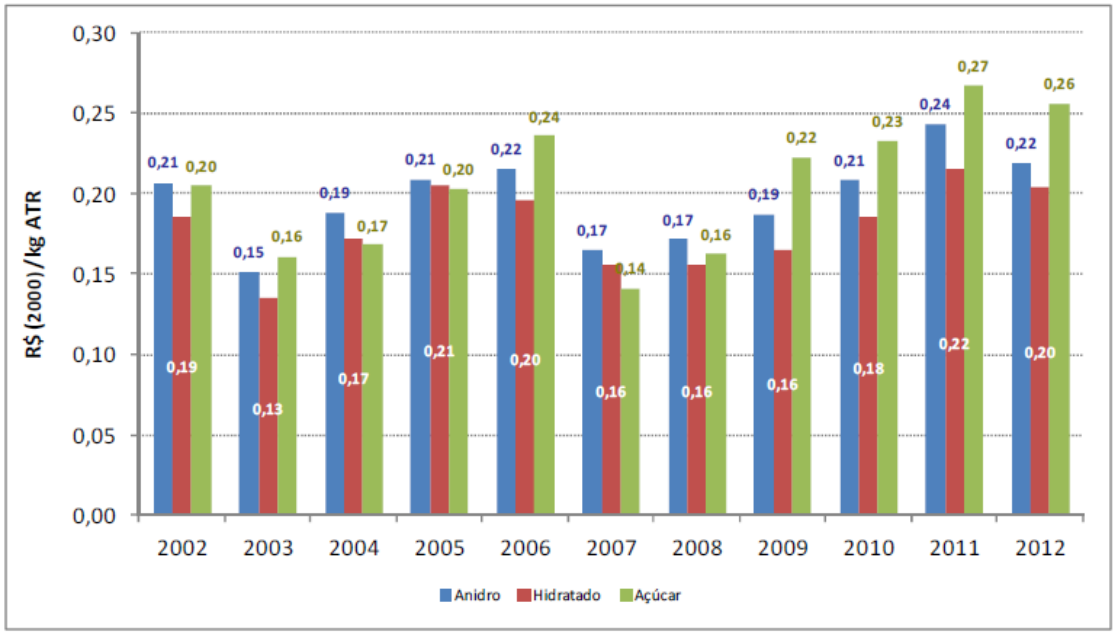
O desenvolvimento histórico do uso do bioetanol como combustível veicular permitiu que este se tornasse um componente regular da matriz energética brasileira. O Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol do mundo, o maior exportador mundial e líder internacional da tecnologia de produção a partir de cana-de-açúcar (SILVA, 2010). O Brasil já vem, por muitas décadas, utilizando apenas álcool como combustível ou sob a forma de uma mistura contendo de 20% a 25% de álcool na gasolina, colocando o país em uma posição extremamente favorável internacionalmente, em termos de emissão de CO_2.

Entretanto, a quantidade de bioetanol produzida atualmente não é suficiente para atender a demanda mundial. Isto ocorre pelo fato das usinas sucroalcooleiras direcionarem sua produção para a demanda do mercado. As capacidades nominais de produção de açúcar, etanol anidro e hidratado são inter-relacionadas, ou seja, caso se queira produzir uma quantidade maior de um determinado produto, é

necessário reduzir a produção do outro. Estima-se que esta flexibilidade seja em torno de 15% entre etanol e açúcar (BRASIL, 2011).

O forte crescimento da frota nacional de veículos "*flex fuel*" e da demanda internacional de açúcar tem intensificado a competição pelo ATR (Açúcares Totais Recuperáveis) nos últimos anos, com o açúcar apresentando maior rentabilidade que o etanol desde 2009, como pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Comparação de preço do ATR (Açúcares Totais Recuperáveis) para etanol anidro, hidratado e açúcar.

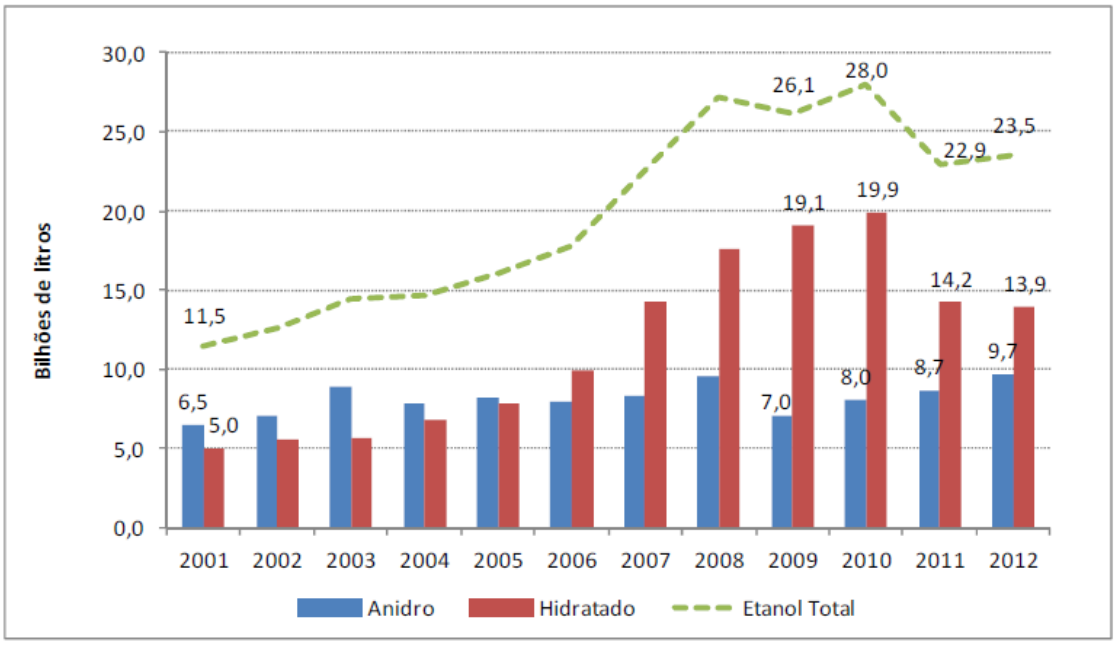


FONTE: (BRASIL,2013).

Historicamente, o Brasil vem aumentando sua participação no comércio mundial de açúcar. Em 2001, o país foi responsável por 27% deste mercado e em 2011 chegou a ter representatividade de mais de 50% (BRASIL, 2013a). Como consequência, nota-se um aumento da destinação da cana para a produção de açúcar desde 2009, interferindo diretamente na produção, na oferta e no preço do bioetanol. Juntamente a isto, existem outros fatores que têm prejudicado a produtividade deste biocombustível nos últimos anos. Como exemplo, pode-se citar o atraso do início da safra 2012/13, que ocorreu pelos seguintes principais fatores: problemas climáticos que prejudicaram a qualidade da matéria-prima (seca em fevereiro e março, e chuvas intensas de abril a junho); e expectativa de sobreoferta de açúcar no mercado mundial (BRASIL, 2012).

A Figura 2 mostra o reflexo destes problemas: a partir de 2010, a produção e as exportações brasileiras de etanol caíram significantemente. Em 2012, as importações alcançaram 0,6 bilhão de litros, resultando em volumes líquidos exportados de apenas 2,5 bilhões, o que equivale a quase metade das exportações de 2008, que alcançaram 5,1 bilhões de litros (BRASIL, 2013c).

Figura 2 - Produção de bioetanol no Brasil.



FONTE: (BRASIL,2013a).

Os dados acima mostram que o uso da cana-de-açúcar para a produção de etanol está desfavorecido, pois esta tem sido utilizada majoritariamente para a produção de açúcar, ou até mesmo pelas condições climáticas desfavoráveis. Desta forma, diferentes resíduos têm sido estudados para serem usados como fonte de glicose a ser convertida em etanol.

Embora os últimos anos tenham apresentado um prognóstico desfavorável à implementação em larga escala de biocombustíveis obtidos por processos tecnológicos com matérias-primas de usos menos nobres, este tipo de combustível tem chamado cada vez mais a atenção por apresentar-se como uma alternativa para se aumentar a produção de bioetanol. Para isto, têm-se desenvolvido processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósicas para a produção de bioetanol de segunda geração (SILVA, 2010).

Dentro deste contexto, grande atenção tem sido dispensada ao potencial biotecnológico da celulose presente nos resíduos lignocelulósicos agroindustriais, especialmente no que se refere à sua conversão em glicose e posterior fermentação deste açúcar em etanol.

Atualmente, a biomassa residual gerada pelas usinas é subutilizada em relação ao seu verdadeiro potencial energético, pois ela é queimada para manter caldeiras e gerar eletricidade, enquanto poderia ser utilizada na produção de etanol de segunda geração (visto que existem outras formas, também renováveis, de se gerar eletricidade, como usinas hidrelétricas e parques eólicos).

Neste amplo contexto da bioenergia, a produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa tem sido considerada a opção mais promissora para atender particularmente às necessidades de transporte veicular, já que para estes fins, ainda não existem outras alternativas renováveis com maturidade tecnológica e viabilidade econômica suficientes (ZHANG & SMITH, 2007).

Muito recentemente, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP - concedeu a primeira autorização para construção de uma unidade produtora de etanol de segunda geração no Brasil (Autorização ANP nº 758, de 7 de outubro de 2013). A Bioflex Agroindustrial terá capacidade de produção de 250 m³ de etanol anidro por dia, utilizando a palha e o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima e a tecnologia de conversão de biomassa em etanol. A unidade produtora estará localizada na cidade de São Miguel dos Campos - Alagoas (BRASIL, 2013c).

Este fato consolida a perspectiva de sucesso na produção de bioetanol de segunda geração, deixando o Brasil ainda mais competitivo mundialmente no mercado de biocombustíveis renováveis, pois a utilização da palha e do bagaço permitirá que a produtividade industrial do etanol chegue à cerca de 10 mil litros por hectare, sob condições otimizadas, o que significa um aumento de até 45% em relação aos níveis atuais (BRASIL, 2013b).

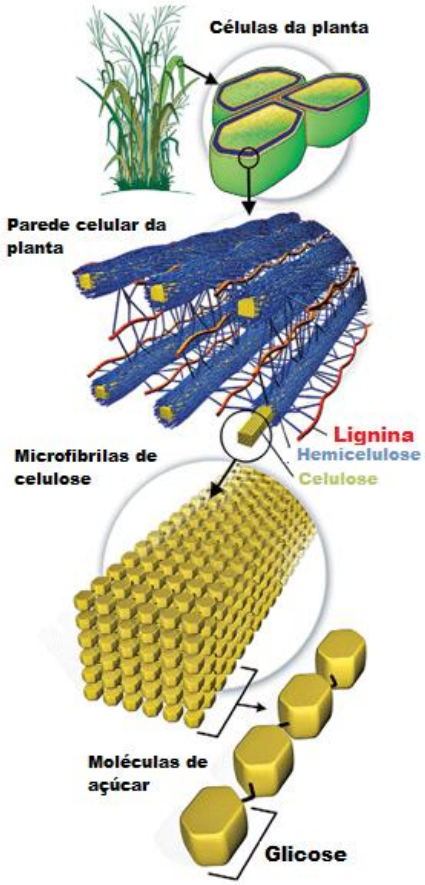
2.2 Biomassa como fonte de Bioenergia

Com exceção da cana-de-açúcar, as tecnologias comercialmente disponíveis na atualidade para a produção de bioetanol de primeira geração a partir de biomassas sacaríneas e amiláceas envolvem ganhos energéticos e ambientais bastante estreitos. Além disso, essas matérias-primas apresentam uma limitada vantagem econômica e encontram, em geral, mercados alternativos mais remuneradores, como alimentos ou insumos para outros fins (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2008).

A biomassa gerada pela indústria sucroalcooleira e a matéria orgânica que é descartada no campo podem ser utilizadas na produção de etanol de segunda geração, que é produzido a partir dos polissacarídeos da parede celular vegetal. No processo de obtenção do etanol celulósico, o objetivo é desestruturar a parede celular para utilizar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis, especialmente no que se refere à glicose proveniente da celulose. No entanto, a complexidade da estrutura da parede celular e a delicadeza do processo para preservar intactos os monossacarídeos que serão usados para a fermentação, dificultam sua realização.

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas resistentes e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (Figura 3) (LEE, 1997).

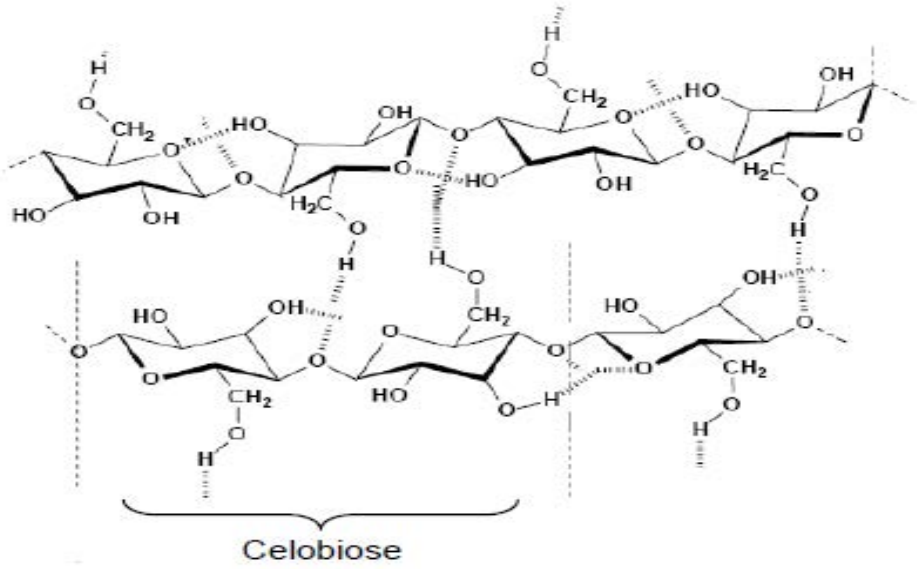
Figura 3 - Esquema da parede celular vegetal.



FONTE: SANNIGRAHI; PU; RAGAUSKAS, 2010. (Modificado)

A celulose (23% - 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica) é um polímero linear que contém até 15.000 unidades de β-D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β-1,4 e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) (Figura 4) (ARANTES & SADDLER, 2010). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ *et al*., 2007).

Figura 4 - Estrutura representativa das cadeias de celulose.



FONTE: MORAIS, 2005 (Modificado).

Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula de celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010). Desta forma, tem sido empregados processos de pré-tratamento da biomassa, visando a remoção ou desestruturação da lignina, com consequente aumento da acessibilidade das celulases ao seu substrato (ZHANG; SMITH, 2009).

Por sua vez, a fração hemicelulósica (15% - 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos β-D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β-D-galacturânico, e deoxiexoses. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA *et al*., 2009). Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Porém, poucos micro-

organismos são capazes de fermentar açúcares de cinco carbonos (pentoses) (SUN; CHENG, 2005).

Já a estrutura bioquímica da fração lignina (10% - 30%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida por isso, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose.

Como citado anteriormente, a conversão da maioria dos materiais lignocelulósicos a álcool, a partir da glicose proveniente da celulose, requer um pré-tratamento. O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais; além disso, deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir a ação dos micro-organismos fermentadores. Para a realização desta separação, foram descritos diferentes tipos de processos, dentre os quais podem ser destacados o uso de ácidos (FOGEL *et al*., 2005) ou o emprego de vapor (MONIRUZZAMAN, 1996). Em seguida, deve ocorrer a despolimerização da celulose e da hemicelulose (através de hidrólise) para liberação de açúcares, os quais serão utilizados pelo micro-organismo para a síntese do produto de interesse.

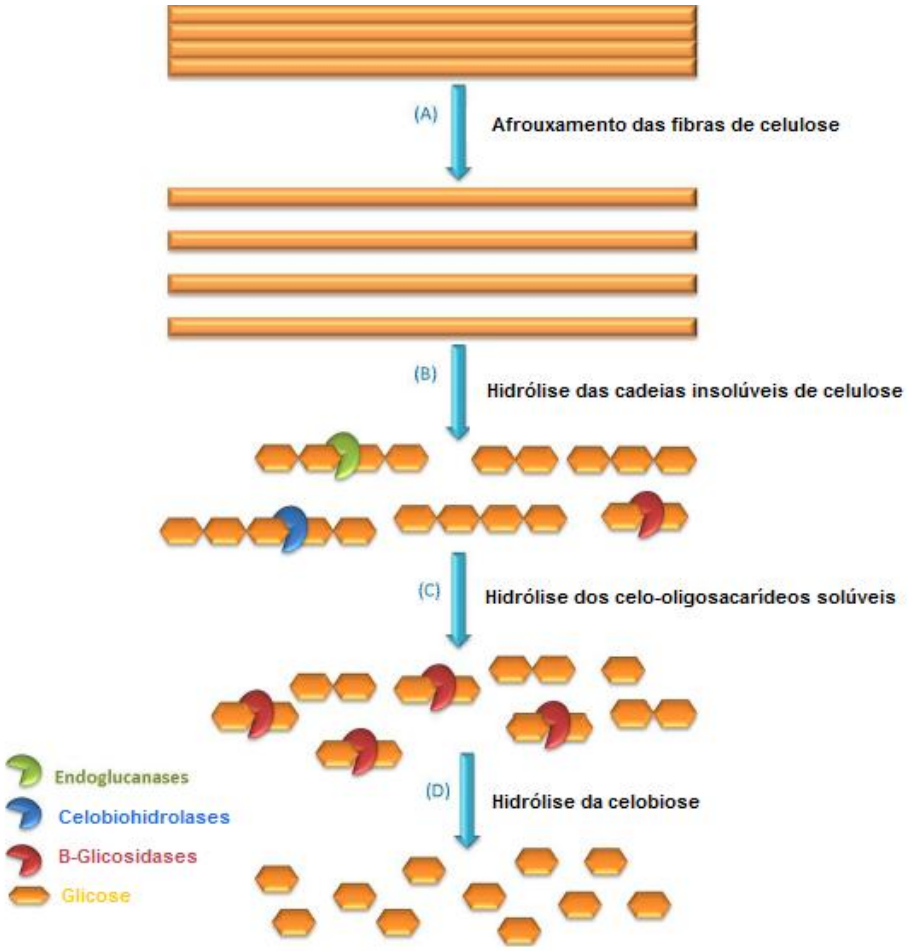
Embora o processo envolvendo a utilização de ácidos seja funcional, ainda não é eficiente para permitir a produção comercial de bioetanol de segunda geração. Desta forma, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos em bioprocessos, sendo que a hidrólise enzimática da celulose destaca-se quando comparada com a conversão química, pois não leva a perda de substrato por modificações químicas ou à formação de produtos colaterais. Além disso, o emprego de enzimas pode ser feito sob condições operacionais moderadas e não corrosivas. A conversão enzimática da celulose de resíduos lignocelulósicos traz, portanto, benefícios interessantes (BUABAN *et al*., 2010).

2.3 Celulases

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que são chamadas de celulases. Conforme ilustrado na Figura 5, a degradação enzimática completa da celulose requer a ação combinada de pelo

menos três grupos de enzimas que atuam em sinergia: as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), as exoglucanases ou celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91) (I e II, respectivamente) e as β-glicosidases (E.C. 3.2.1.21) (TAHERZADEH, KARIMI, 2007).

Figura 5 - Degradação enzimática completa da celulose.



FONTE: ARANTES; SADDLER, 2010. (Modificado).

A endoglucanase é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, consequentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. A endoglucanase é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos menores. Estas clivam o polímero internamente, mais

facilmente nas regiões amorfas das fibras de celulose, diminuindo o grau de polimerização e expondo extremidades redutoras e não redutoras (LEE, 1997).

As exoglucanases atuam nas extremidades citadas, liberando celobiose e celooligossacarídeos por hidrólise. As celobiohidrolasess participam da hidrólise primária da fibra de celulose e são responsáveis pela amorfogênese, fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulases (LYND et al., 2002).

A degradação da celulose é finalizada pela ação das β-glicosidases, que apresentam a propriedade de hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Além destas, outras proteínas como as expansinas e as soleninas têm sido reportadas como capazes de afrouxar a estrutura da celulose cristalina, o que favorece a sua sacarificação (MCQUEEN-MASON; COSGROVE, 1995).

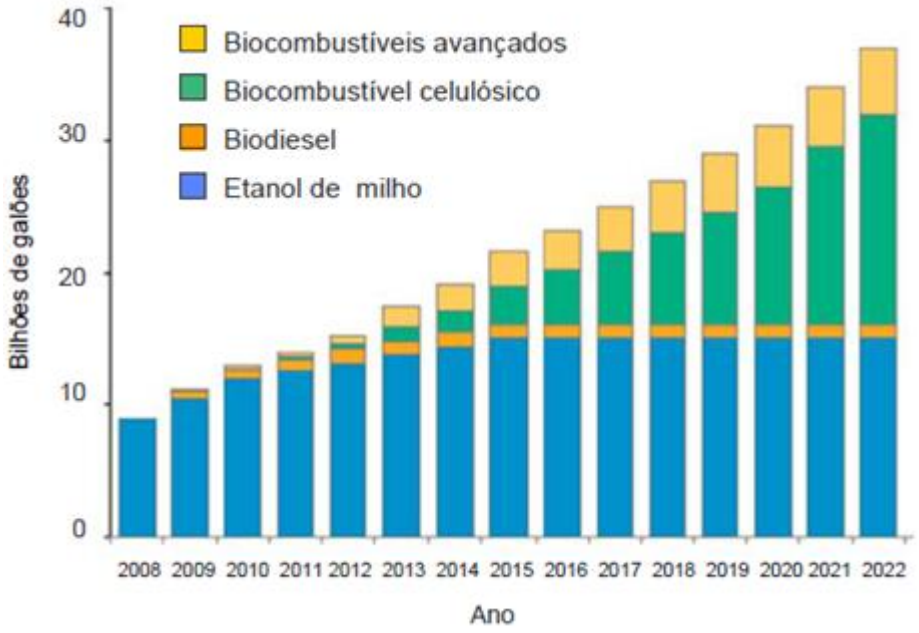
Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulases (SUN & CHENG, 2002).

Apesar das reconhecidas vantagens apresentadas pelo etanol celulósico obtido através da rota enzimática, seu custo de produção ainda não atingiu níveis competitivos de mercado comparados ao etanol sacarídeo e a gasolina, devido às dificuldades em seu processo de produção. No entanto, diferentes frentes de pesquisas nacionais e internacionais e empresas Norte-americanas, como a Novozymes, Genencor Danisco e Verenium, indústrias consagradas na produção comercial de celulases, têm adotado novas tecnologias para reduzir o custo de produção dos preparados celulásicos, e vêm trabalhando exaustivamente para a viabilidade da produção comercial do etanol celulósico (SINGHANIA *et al*., 2010).

Mesmo com tais restrições, perspectivas norte-americanas mais otimistas afirmam que em 2022 poderão ser produzidos aproximadamente 60 bilhões de litros de biocombustíveis celulósicos, como pode ser visualizado na Figura 6. De acordo com esta estimativa, a produção de biocombustíveis de segunda geração

apresentará crescimento maior do que o bioetanol de milho (de primeira geração) e de biocombustíveis avançados.

Figura 6 - Perspectivas para a produção de biocombustíveis.



Fonte: SILVA, 2010

2.4 Micro-organismos produtores e expressão heteróloga de celulases

A produção de celulases por micro-organismos ocorre, principalmente, por bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos de produção por leveduras (SINGHANIA *et al.,* 2010). Os fungos filamentosos são os mais utilizados industrialmente na produção de celulases, principalmente os gêneros *Aspergillus, Trichoderma, Humicola, Penicilliu* e *Fusarium* (SINGHANIA *et al*., 2010). Estes produzem o complexo celulásico com as três classes de enzimas necessárias para a completa hidrólise de celulose, em diferentes proporções.

Embora a maioria das celulases industriais seja de origem fúngica, o interesse científico em celulases produzidas por bactérias celulolíticas como *Cellulomonas* e *Clostridium* tem aumentado nos últimos anos. Ainda entre as bactérias, várias fitopatogênicas (capazes de acometer os mais variados tipos de plantas) secretam enzimas extracelulares despolimerizantes, inclusive celulases. Podem ser citados

representantes dos gêneros *Dickeya, Pectobacterium, Ralstonia, Pseudomonas, Clavibacter, Xylella, Xantomonas*, entre outros (CANDIDO *et al*., 2008).

Estudos demonstraram que, em muitas bactérias fitopatogênicas, a secreção de celulases (incluindo também as β-glicosidases) está relacionada com a patogênese e virulência, promovendo eficiente maceração do tecido vegetal e, consequentemente, desempenhando um importante papel na infecção (JAHR *et al.,* 2000).

Laine e colaboradores (2000) relataram que as endoglucanases são responsáveis pela degradação da parede dos vasos do xilema, interferindo no transporte de seiva e permitindo a colonização do hospedeiro. Assim, pode-se inferir que as celulases de bactérias fitopatogênicas apresentam características interessantes do ponto de vista do ataque às fibras de celulose, incluindo acessibilidade às fibras, adsorção específica ao substrato e reciclagem das moléculas de enzima ("*turnover*"). Outra característica atrativa apresentada pelas enzimas bacterianas está relacionada ao seu tamanho, pois as endoglucanases bacterianas são menores do que aquelas produzidas por fungos filamentosos. Estes fatores estão diretamente relacionados com a eficácia da hidrólise da celulose, elevando ainda mais seu potencial.

Uma espécie em particular, *Xanthomonas campestris* pv. campestris (Xcc), que é responsável pela podridão negra em crucíferas (WILLIAMS, 1980), há muito vem sendo caracterizada como produtora de fatores de virulência como EPS (goma xantana) de grande interesse industrial, e de diversas enzimas extracelulares, dentre estas, celulases (revisto por (GIBSON *et al*., 2011)). De fato, a análise do genoma desta bactéria mostrou grande riqueza em genes/ORFs codificando para enzimas envolvidas no processo de degradação da parede celular, incluindo as pectinases, liases, xilanases e nove celulases (VAN SLUYS *et al*., 2002). A maioria destas enzimas secretadas são endoglucanases, na qual uma delas é a endoglucanase majoritária desta bactéria, codificada pelo gene *engXCA* (GOUGH *et al*., 1990).

Mesmo as celulases sendo produzidas por uma gama de micro-organismos, ainda há restrições que dificultam ou que oneram o processo de produção destas enzimas. Uma das principais restrições encontradas é seu baixo nível de produção e o elevado tempo requerido para obtê-las, pois normalmente, as celulases são

produzidas por fermentações em estado sólido ou semi-sólido e em cultivo submerso.

Para superar algumas destas dificuldades, a Biologia Molecular surge como uma ferramenta favorável na produção enzimática, viabilizando a expressão das enzimas de interesse em sistemas heterólogos ou ainda aumentando a produção no organismo que a codifica. Além disso, pode ocorrer a minimização da produção de proteínas interferentes e a redução do tempo de produção, melhorando a produtividade e as propriedades cinéticas e físico-químicas da proteína. Outra vantagem apresentada está na obtenção e purificação da enzima, facilitando o processo, principalmente, quando há secreção para o meio de cultivo (FERREIRA, 2010).

No que tange à expressão gênica, as formas mais conhecidas de manipulação genética são a expressão homóloga e a expressão heteróloga, que se distinguem conforme a procedência do material genético inserido na célula hospedeira. Dentre os organismos hospedeiros mais comumente utilizados para a expressão heteróloga de proteínas, estão a bactéria *Escherichia coli* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris.* O sistema de *S. cerevisiae*, embora tenha se mostrado eficiente em alguns casos, apresenta forte tendência a hiperglicosilar as proteínas produzidas. Em relação ao sistema de expressão de *E. coli*, uma das principais desvantagens é a deficiência de etapas pós-traducionais, que decorre em errônea organização estrutural da cadeia polipeptídica, além do fato de esta ficar localizada em corpos de inclusão, os quais dificultam a extração do produto. Por fim, o sistema de expressão de *P. pastoris*, embora tenha apresentado hiperglicosilação em alguns casos, mostra-se como um dos mais adequados dentre os conhecidos atualmente, por proporcionar elevada produção da proteína de interesse (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1995). Entretanto, se o objetivo for a produção das enzimas celulolíticas para a conversão de biomassa lignocelulósica a etanol, *S. cerevisiae* configura-se como o mais adequado sistema de expressão heteróloga, pois além de expressar as enzimas de interesse, é capaz de fermentar os produtos de hidrólise simultaneamente.

Desta forma, a clonagem e expressão de genes de endoglucanases em Sc representa uma ferramenta importante para a utilização das mesmas em bioprocessos consolidados para a obtenção de etanol a partir de biomassa

lignocelulósica. Nestes processos, a sacarificação dos carboidratos presentes na lignocelulose e a fermentação dos açúcares em etanol são realizadas simultaneamente pela levedura, geneticamente modificada para expressar celulases (XU; SINGH; HIMMEL, 2009). No processo de sacarificação simultânea à fermentação, as celulases são menos passíveis de inibição pelos produtos de hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada. As linhagens podem ainda ser adaptadas para a fermentação de pentoses a etanol, clonando e expressando genes codificando para xilanases simultaneamente aos que codificam para celulases, aumentando a eficácia da produção de etanol a partir da biomassa (JEFFRIES; JIN, 2004).

Vários trabalhos reportam a utilização de ferramentas de Biologia Molecular na produção de celulases, exibindo uma melhora significativa na qualidade e eficiência das enzimas secretadas, tornando estes estudos tão atrativos e que representam uma eficiente estratégia para a questão de bioconversão de resíduos celulósicos (LIMA e RODRIGUES, 2007).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como finalidade o isolamento, clonagem e testes de expressão do gene *engXCA* que codifica para a endoglucanase majoritária de *Xanthomonas campestris* pv. campestris em plataforma bem sucedida de expressão em leveduras, visando expressar a enzima em sistema de expressão proteica de levedura, na perspectiva da construção de uma linhagem útil para futuros testes de SFS. Foram avaliadas também, as características físico-químicas e bioquímicas das enzimas selvagem e recombinante de Xcc.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente trabalho tem por objetivo principal a clonagem e expressão do gene *engXCA,* codificando para a endoglucanase majoritária de *X. campestris* pv. campestris, em *S. cerevisiae* e a caracterização físico-química das enzimas nativa e recombinante, como um primeiro passo na busca de uma levedura modificada que apresente características desejáveis para uso em processos de sacarificação e fermentação simultâneas de materiais lignocelulósicos.

3.2 Específicos

Como objetivos específicos foram definidos:

1. selecionar o gene de endoglucanase a ser clonado;

2. isolar os fragmentos *engXCA* e *mfα* (este codifica para o peptídeo sinal de Sc, com a finalidade de secretar a enzima para o meio de cultivo)*;*

3. clonar e expressar a endoglucanase bacteriana em Sc;

4. selecionar a melhor linhagem transformante de Sc produtora da endoglucanase bacteriana e analisar a expressão e secreção da enzima recombinante pela levedura;

5. avaliar a produção da enzima recombinante em diferentes tempos de fermentação e meios de cultivo;

6. comparar as características físico-quimicas da endoglucanase recombinante com as da enzima selvagem de Xcc.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de endoglucanase por fermentação submersa

Com a intenção de selecionar um gene codificando para uma endoglucanase eficiente através de organismos do gênero *Xanthomonas*, foi realizado um experimento preliminar a fim de selecionar a melhor linhagem produtora de endoglucanase extracelular. Para isto, foram utilizadas as linhagens de bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas citri* subs*. citri* (neste caso, será utilizada a abreviação antiga, Xac, para não causar confusão com a próxima linhagem), *Xanthomonas campestris pv.* campestris (Xcc) e *Xanthomonas campestris pv.* vesicatoria (Xav)*,* pertencentes a coleção de culturas da Fundecitrus de Araraquara - SP.

As linhagens, estocadas em ultrafreezer (-80), foram inicialmente reativadas em meio de cultura LB, composto por (g/L): extrato de levedura (5,0), triptona (10,0), cloreto de sódio (10,0) e agar (15,0) por até 72 horas a 30ºC.

Para a comparação da produção da enzima por fermentação submersa em diferentes meios, foram testados os seguintes meios nutrientes:

- Meio 2XTY, composto por (g/L): extrato de levedura (10,0), triptona (16,0) e cloreto de sódio (10,0);

- Meio 2XTY acrescido de CMC, composto por (g/L): extrato de levedura (10,0), triptona (16,0), cloreto de sódio (10,0) e carboximetilcelulose (CMC – Sigma) (10,0 g/L);

- Meio MME acrescido de CMC, composto por (g/L): $MgSO_4.7H_2O$ (0,25), KH_2PO_4 (4,5), K_2HPO_4 (10,5), $(NH_4)_2SO_4$ (1,0) e carboximetilcelulose (CMC – Sigma) (10,0 g/L).

Inicialmente, colônias provenientes das três culturas reativadas das espécies citadas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125,0 mL contendo 20,0 mL de cada um dos meios nutrientes descritos acima. Os cultivos foram mantidos a 30ºC, sob agitação de 200 rpm. Alíquotas de 2,0 mL foram retiradas de cada frasco em períodos de 24, 48 e 72 horas, a fim de conhecer a cinética de produção desta enzima. As alíquotas foram centrifugadas a 11.000 *xg* por 1 minuto e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

Para o ensaio de atividade enzimática de CMCase, foi seguido o procedimento descrito no item seguinte.

4.2 Análise quantitativa de atividade enzimática

A metodologia utilizada para se verificar quantitativamente a atividade CMCase presente nos sobrenadantes dos cultivos foi a seguinte:

- *Reação*: em tubos de ensaio foram adicionados 0,225 mL de tampão acetato 0,1M pH 5,0 acrescido de CMC (20,0 g/L) como substrato e 0,025mL de extrato enzimático.
- *Controle:* foram adicionados 0,225 mL de tampão acetato 0,1M pH 5,0 acrescido de CMC (20,0 g/L), 0,250 mL do reagente DNS (ácido1-3-dinitrosalicílico) e 0,025mL de extrato enzimático aos tubos de ensaio, nesta ordem.
- *Branco:* ao tubo de ensaio, foram adicionados 0,250 mL de água destilada e 0,250 mL do reagente DNS (ácido1-3-dinitrosalicílico).

Os tubos de reação foram incubados em banho a 45ºC por 10 minutos e então a reação foi interrompida pela adição de 0,250 mL do reagente DNS (ácido1-3-dinitrosalicílico). Em seguida, os tubos de reação e controle foram inseridos em banho de fervura por 5 minutos e logo após, foram resfriados em gelo. Finalmente, foram adicionados 2,5 mL de água destilada em cada tubo para que pudesse ser realizada a leitura ótica em espectofotômetro a 540 nm, para a quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da curva padrão de glicose, como proposto por Miller (1959). Segundo o autor, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.3 Extração de DNA cromossômico bacteriano

Para a extração do DNA cromossômico bacteriano, foi realizado um cultivo de Xcc por aproximadamente 16 horas em 3,0 mL de meio LB em tubo de ensaio. Uma massa celular correspondente a 2,0 ml de cultura foi obtida por centrifugação do inóculo, que posteriormente foi dissolvido em 400,0 μL de tampão TAS (50,0mM

Tris-HCl pH 8, 50,0 mM EDTA, 150,0 mM NaCl). Após nova centrifugação, as células foram ressuspendidas em 446,0 µL do mesmo tampão. Adicionou-se então 4,0 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 50,0 µL de SDS 10%. Em seguida, misturou-se por inversão e o tubo foi incubado por 1h a 50°C para a atividade de proteinase.

Para a limpeza e retirada de proteínas por fenol/clorofórmio, foi realizado um procedimento na seguinte ordem: adicionou-se ao tubo 500,0 µL de fenol, que foi centrifugado por 3 minutos a 11.000 *xg*. A fração superior foi recuperada e o procedimento foi repetido utilizando clorofórmio. O material foi submetido à diálise por aproximadamente 16 horas em tampão TE (10,0 mM TRIS, 1,0 mM EDTA) com agitação e, após recuperação, foi conferida a presença e concentração de DNA em gel de Agarose 0,7%.

4.4 Micro-organismos utilizados para clonagem e expressão e condições de cultura

- Linhagem de *E. coli*

A linhagem de *E. coli* utilizada para transformações e manutenção dos plasmídeos foi a DH10B [F–mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ–].

- Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras utilizadas neste trabalho foram*:*

- **CBO012**, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Clesley Fernando Zanelli do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. Esta linhagem requer para crescimento os suplementos Adenina, Histidina, Leucina e Uracila, pois carrega alterações genéticas em *ade2*, *his3,* l*eu2 e ura3,* respectivamente.

- **INVSc-1,** gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Celia Bertolini – Instituto de Química, UNESP. Esta linhagem requer para crescimento os suplementos Histidina, Leucina, Uracila e Triptofano, pois carrega alterações genéticas em *his3,* l*eu2, ura3* e *Trp*, respectivamente.

- **BJ3501,** gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Celia Bertolini – Instituto de Química, UNESP. Esta linhagem requer para crescimento os suplementos Histidina e Uracila, pois carrega alterações genéticas em *his3 e ura3* respectivamente.

As linhagens foram cultivadas em meio YPD (g/L: extrato de levedura (10,0), peptona (20,0), glicose (20,0) e Agar (15,0)) e selecionadas em meio SC-U (g/L): YNB - Extrato de levedura sem aminoácidos - (6,7), suplementado com requerimentos específicos de acordo com a necessidade (drop out) (2,0), Agar (20,0) e neste caso, glicose (20,0) como fonte de carbono) foram estocadas a -80°C em glicerol 40% e utilizadas para expressão das enzimas recombinantes.

- Linhagem de *Xanthomonas campestris* pv. campestris

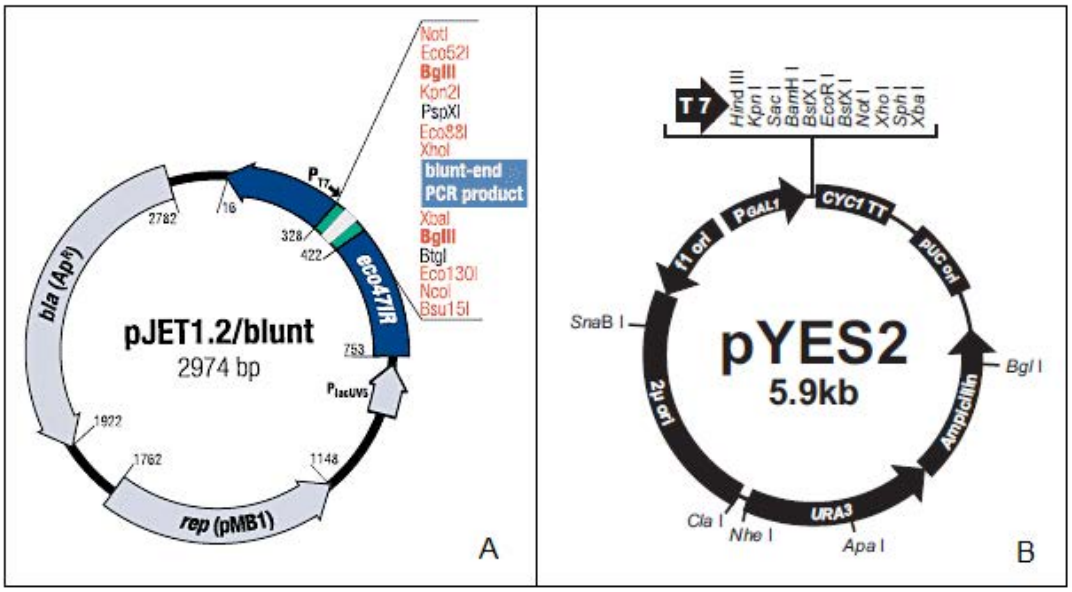
A linhagem de bactéria fitopatogênica escolhida para este trabalho foi a Xcc (ATCC 33913).

4.5 Plasmídeos e vetores utilizados

Para a clonagem dos produtos de PCR e manipulação dos genes de interesse, foi utilizado o plasmídeo pJET1.2/blunt (Fermentas), figura 7(A). Os procedimentos foram executados de acordo com o fabricante.

Para expressão do gene de interesse em *S. cerevisiae*, foi utilizado o vetor pYES2 (Invitrogen), mostrado na figura 7(B), como base para a construção plasmidial pretendida.

Figura 7 - Vetores utilizados para clonagem e expressão. (A) pJET1.2/blunt, para clonagem e manipulação dos genes de interesse em *E.Coli*. (B) Vetor de expressão de *S. cerevisiae*.



FONTE: Modificado de FERMENTAS e INVITROGEN

4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificar os genes de interesse, foram utilizados os oligonucleotídeos inicializadores mostrados na tabela 1, onde as bases sombreadas se referem a sítios específicos para enzimas de restrição apropriadas para cada construção pretendida.

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos inicializadores utilizados nas reações de PCR

Nome do Primer	Sequência nucleotídica (5' - 3')
mfaF (5´-*Kpn*I)	ATCGGTACCAAAAGAATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTG
mfaR(5´-*BamH*I)	ATCGGATCCCCAAGCTTCAGCCTCTCTTTTATC
engXCAF (5´-*BamH*I)	ATCGGATCCATGTCCATATTCAGGACCGCAAG
engXCAR (5´-*Xho*I)	ATCTCGAGTCAGCTCGCGGCGCAGAAGC

4.6.I) Amplificação do gene *mfα*

A amplificação do DNA de interesse foi realizada pela técnica de polimerização em cadeia, utilizando-se como molde 10,0 ng de DNA de Sc fator de

acasalamento α, 1,0 µM de cada primer (mfaR e mfaF), Pfu Buffer (Fermentas) 1x concentrado, 0,1 mM de cada dNTP, 1,0 U de Pfu® DNA Polymerase (Fermentas) e água estéril quanto baste para um volume final de 20,0 µL.

A reação para a amplificação deste fragmento de 294 pares de base (pb) foi realizada em termociclador durante 30 ciclos sob as seguintes condições:

- Desnaturação inicial (94°C – 1')
- Touch down: 5 ciclos - 68°C, 66ºC, 64°C, 62°C e 60°C.
- Ciclo: desnaturação (94°C - 30''), anelamento (55°C - 1') e extensão (70°C – 30'').

4.6.II) Amplificação do gene *engXCA*

Para este caso, a reação de PCR foi realizada utilizando-se como molde 10,0 ng de DNA de Xcc, 1,0 µM de cada primer (engXCAR e engXCAF), Pfu Buffer (Fermentas) 1x concentrado, 0,1 mM de cada dNTP , 1,0U de Pfu® DNA Polymerase (Fermentas), 1% de formamida e água estéril quanto baste para um volume final de 20,0 µL.

Neste caso, utilizou-se 30 ciclos nas seguintes condições para a amplificação do gene *engXCA*, que possui 1472 pb:

- Desnaturação inicial (94°C – 1')
- Touch down: 5 ciclos - 68°C, 66ºC, 64°C, 62°C e 60°C.
- Ciclo: desnaturação (94°C - 30''), anelamento (55°C - 1') e extensão (70°C - 2').

4.7 Clonagem do gene engXCA em vetor de clonagem

Para se obter quantidades suficientes de DNA e facilitar a manipulação dos genes, os fragmentos de DNA foram ligados em vetores de clonagem pJET1.2/blunt (Fermentas), gerando construções denominadas pJET-eng. As clonagens foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante.

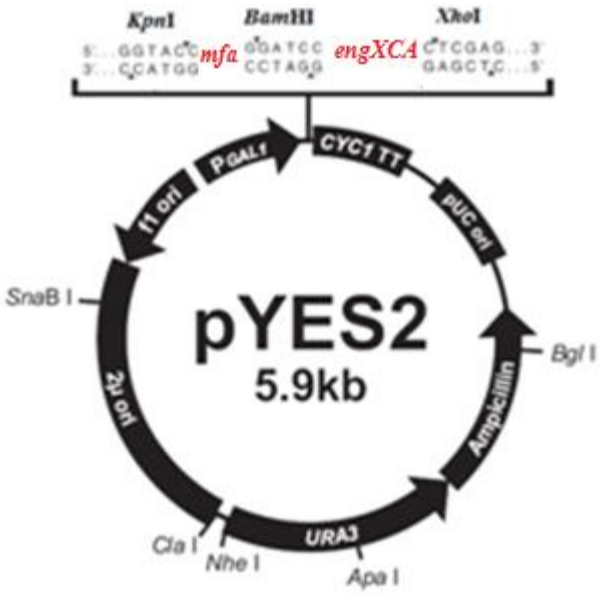
4.8 Construção plasmidial pYES2-eng

O gene *engXCA* foi amplificado por PCR e ligado no vetor pJET por 16 horas a 16°C. Em seguida, foi transformado em células de *E. coli* DH10B competentes e a construção gerada (pJET-eng) foi verificada através de digestão enzimática utilizando as enzimas *BamH*I e *Xho*I. Já o gene *mfα foi* isolado através de PCR e purificado com GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit – Fermentas Life Science. Em seguida, o DNA foi digerido com as enzimas *Kpn*I e *BamH*I.

Os fragmentos de interesse foram transferidos para o vetor de expressão de leveduras pYES2 com a seguinte estratégia: o gene *engXCA* foi isolado do vetor de clonagem utilizando as enzimas *BamH*I e *Xho*I, enquanto o vetor de expressão pYES2 foi digerido com as enzimas *Kpn*I e *Xho*I.

Em uma reação de ligação, foram ligados os genes *mfα* à esquerda do gene *engXCA* (figura 8), de forma a compor uma construção quimérica que codifica para Mfa-EngXCA, dando origem à construção denominada "pYES2-eng".

Figura 8 - Construção plasmidial pretendida.



FONTE: Modificado de INVITROGEN

4.9 Procedimentos básicos em Biologia Molecular

4.9.I) Indução de competência em *E.coli*

A indução de competência em células bacterianas foi realizada pelo método de cloreto de cálcio (SAMBROOK *et al*.,1989).

4.9.II) Transformação em *E. coli* competente DH10B

As construções plasmidiais foram inseridas nas células bacterianas competentes, sendo adicionados 10,0 µL do produto da ligação do gene no vetor de clonagem em 100,0 µL de células de *E. coli* DH10B competentes. A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos e em seguida, a 42°C por 1 minuto. Logo após, foi inserida em banho de gelo por mais 2 minutos e então adicionado meio LB para 1,0 mL final. As células foram plaqueadas em meios sólidos contendo antibiótico (Ampicilina 20,0 mg/mL) por aproximadamente 16 horas a 37°C.

4.9.III) Extração de DNA plasmidial

Em todos os procedimentos que necessitava-se extrair DNA plasmidial bacteriano, foi utilizado GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit - Fermentas Life Science.

4.9.IV) Sequenciamento

Após checar as clonagens por análise enzimática, as construções foram analisadas por sequenciamento através da empresa Macrogen (Korea). A partir de então, puderam ser inseridas em leveduras para se dar início aos testes de expressão das enzimas recombinantes.

4.9.V) Transformação em levedura CBO012, INVSc-1 e BJ3501

Para inserir as construções plasmidiais pYES2-eng em Sc, uma alíquota de 25,0 µL de cultura de aproximadamente 16 horas de crescimento foi centrifugada a

3.000 *xg* por 1 minuto e em seguida, dissolvidas em 1,0 mL de água Milli-Q estéril. As células foram centrifugadas a 12.000 *xg* por 5 segundos, resuspensas em 1,0 mL de acetato de lítio (LiAc) 100,0 mM e incubadas por 5 minutos a 30°C. A seguir, as células foram centrifugadas a 12.000 *xg* por 5 minutos e o sobrenadante removido com a micropipeta. Foram adicionados os seguintes componentes no tubo, em cima da massa de células, nesta ordem:

240,0 µL de PEG (50% w/v)

36,0 µL de LiAc 1,0 M.

50,0 µL de SS-DNA (2.0mg/mL)

5,0 µL de DNA plasmidial (100,0 ng até 5,0 µg)

45,0 µL de água Milli-Q estéril.

O tubo foi agitado em vortex por pelo menos por 1 minuto para resuspender as células no mix de transformação e incubado a 42°C por 20 minutos. A seguir, foi submetido à centrifugação a 12.000 *xg* por 10 segundos e o sobrenadante removido usando uma micropipeta. A massa de células foi gentilmente dissolvida em 200,0 a 400,0 µL de água Milli-Q estéril, pipetando devagar. A suspensão de células foi então plaqueada em meio seletivo SC-U. Colônias apareceram entre 2 a 4 dias a 30°C.

4.10 Fermentações submersas para testes de expressão em CBO012

4.10.I) Protocolo 1:

Primeiramente foi testado o seguinte protocolo para expressão de proteínas para esta linhagem:

- Foram preparados pré-inóculos (P.I.) de 5,0 mL com diferentes transformantes em meio YPD, mantidos por 24h a 30°C sob agitação de 200rpm.
- As culturas foram centrifugadas a 1.500 *xg* por 3 minutos e então lavou-se as células com PBS 1x concentrado para a remoção da glicose e, em seguida, com água estéril.
- Cada massa de células foi dissolvida em 1-2,0 mL de meio SC-U com Raffinose 2% e a seguir, inoculados em 50,0 mL do mesmo meio por mais 24 horas, mantidos nas mesmas condições de temperatura e agitação.

- Após atingir a densidade óptica (D.O.) 2,5, foi feita a indução da expressão, adicionando às culturas 5,0 mL de meio YPGal 10x concentrado.
- O time course foi realizado nos tempos 4, 6, 8, 24, 48, 72 e 96h após indução, retirando-se alíquotas de 2,0 mL de cultura, que foram centrifugadas a 10.000 *xg* por 1 minuto. Foi verificada também a D.O. em cada tempo de cultura, para acompanhar o crescimento das células.
- Os sobrenadantes das culturas foram precipitados com Sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) 60% e ressuspendidos com tampão acetado de sódio 0,1M pH 5,0. As atividades enzimáticas das porções ressuspendidas foram analisadas quantitativamente através do método do DNS, como citado no item 4.2 e, posteriormente, plotadas em gráfico.

4.10.II) Protocolo 2:

Com este protocolo, objetivou-se expressar as enzimas e visualizar sua atividade CMCase qualitativamente em placa. Para isto, a fermentação foi realizada da seguinte maneira:

- Foram preparados pré-inóculos de 15,0 mL com diferentes transformantes, incluindo a linhagem controle, em meio SC-U+Raffinose 2% e com a linhagem não transformada em meio SC+U+Raffinose 2%, mantidos por 24 horas a 30°C sob agitação de 200rpm.
- Foi medida a densidade ótica do P.I. e verificado o volume necessário de cultura para se atingir uma D.O 0,4 em 50,0 mL de meio contendo 2% de galactose para indução.
- Os volumes foram centrifugados a 1.500 *xg* por 3 minutos e dissolvidos em 1-2,0 mL de meio de indução e a seguir, inoculados em 50,0 mL do mesmo meio.
- O time course foi realizado nos tempos 12, 24, 36 e 48h após a indução, retirando-se alíquotas de 2,0 mL de cultura.
- Cada alíquota foi centrifugada a 1.500 *xg* por 3 minutos e então foram plaqueados 5,0 µL da massa de células formada ao descartar o sobrenadante.

- Cada placa foi mantida por 12 horas em estufa a 30°C e a atividade CMCase foi revelada com solução 0,1% de vermelho congo.

4.11 Expressão nas linhagens de levedura INVSc-1 e BJ3501

Como teste inicial, objetivou-se verificar se as linhagens estão produzindo e secretando celulases apenas através da presença de atividade CMCase em placa apropriada para atividade.

Desta forma, massas de células provenientes de colônias isoladas (obtidas a partir das linhagens de Sc transformadas com as construções pYES2-eng) foram coletadas e dissolvidas em 20,0 µL de água estéril, para que fosse medida sua D.O. Volumes específicos das massas de células dissolvidas foram depositados em placa contendo meio SC-U+1%CMC+2% galactose (açúcar indutor), a fim de se obter a mesma concentração de células para cada transformante testado.

Após 48h de incubação a 30°C, a placa foi corada com uma solução 0,1% de vermelho congo e a presença de atividade CMCase no meio foi revelada descorando-se a mesma com NaCl 1,0 M.

4.12 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes tempos de fermentação (Time course)

Escolhida a linhagem transformante contendo a construção plasmidial pYES2-eng, foram realizados experimentos para se verificar o melhor tempo de indução para a produção da enzima recombinante em levedura.

Inicialmente, foram preparados pré-inóculos com massas de células obtidas a partir de colônias isoladas do transformante selecionado e do controle (linhagem contendo o vetor vazio) em 10,0 mL de meio seletivo SC-U+ Rafinose 2%, mantidos por 24h a 30°C em 200rpm.

Após a verificação das concentrações de células nos P.I., volumes de cultura equivalentes a D.O 3,5 foram transferidos para 50,0 mL de meio de indução (SC-U+Galactose 2%).

A partir de então, amostras de 1,0 mL foram coletadas de cada frasco equivalente aos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de cultivo, para verificação

da atividade enzimática qualitativa do sobrenadante em placa contendo o substrato sintético CMC.

A seguir, alíquotas de 5,0 µL do sobrenadante de cada frasco coletado foram depositadas sobre placa apropriada para visualização de atividade. Incubou-se a placa por 3 horas a 45°C e, a seguir, a mesma foi corada com uma solução 0,1% de vermelho congo. A presença de atividade CMCase no sobrenadante foi revelada na placa descorando-a com NaCl 1,0 M.

4.13 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes meios de cultivo

Ao melhor tempo de fermentação para a produção de endoglucanase pela levedura, foram testados 7 diferentes meios de cultivo para analisar diferenças quantitativas na produção da enzima recombinante, seguindo os passos descritos no item 4.12 para o cultivo das células. A composição dos meios está detalhada na tabela 2:

Tabela 2 - Composição dos meios nutrientes testados para a produção da endoglucanase recombinante em *S. cerevisiae*:

Meio	YNB (%)	A.A. (%)	$(NH_4)_2SO_4$ (%)	Peptona (%)	Extrato de levedura (%)	CMC (%)	Galactose (%)
1	0,67	0,2	-	-	-	-	2,0
2	0,67	0,2	-	0,45	-	-	2,0
3	0,34	0,2	1,0	-	-	-	2,0
4	0,34	0,2	1,0	0,45	-	-	2,0
5	0,34	0,2	0,25	-	0,45	-	2,0
6	-	-	-	2,0	1,0	-	2,0
7	-	-	-	2,0	1,0	1,0	2,0

A.A: Aminoácidos; YNB: Extrato de levedura sem aminoácidos; CMC: Carboximetilcelulose

Para que se possa verificar quantitativamente a atividade enzimática do sobrenadante a partir do método do DNS (item 4.2), é necessário retirar o açúcar redutor presente no meio de indução, a galactose. Para isto, os sobrenadantes das

culturas foram concentrados e lavados com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 em concentradores Vivaspin-20 (GE Healthcare Life Sciences).

4.14 Quantificação de proteínas totais

A determinação das proteínas totais presentes nos sobrenadante das culturas foi realizada de acordo com o método de Hartree modificado, utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (HARTREE, 1972).

4.15 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e Zimograma

As amostras de interesse foram desnaturadas pela ação da temperatura e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS (SDS-PAGE) por aproximadamente 2 horas a 150 V (LAEMMLI, 1970). Para estimar o peso molecular das proteínas, suas bandas foram comparadas àquelas dos padrões de peso molecular (MW calibration Kit,GE Healthcare) e sua coloração foi realizada com nitrato de prata, de acordo com protocolos descritos na literatura (OAKLEY *et al*, 1980).

Para a realização do zimograma, foram feitos géis SDS-PAGE convencionais, acrescido de CMC 0,1% como substrato (porém, as amostras não foram desnaturadas pela ação da temperatura). Após a corrida, o gel foi submetido a um tratamento com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 contendo 2,5% de Triton X-100 por 30 minutos para a retirada do SDS. Finalizada a remoção do SDS, o gel foi lavado com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 em duas etapas de 30 minutos cada. Em seguida, com o tampão incorporado ao gel, este foi mantido em banho por 30 minutos a 45°C para se iniciar a ação das enzimas sobre o substrato (CMC) contido no mesmo. Finalmente, o gel foi corado com uma solução 0,1% de vermelho congo por 15 minutos e descorado com NaCl 1,0 M até que as bandas pudessem ser visualizadas. Um tratamento com ácido acético 10% foi realizado para maior nitidez das bandas claras (presença de atividade CMCase).

4.16 Caracterização físico-química das endoglucanases nativa e recombinante

4.16.I) Determinação do pH ótimo de atividade

Para a determinação do pH ótimo, as atividades enzimáticas foram avaliadas de acordo com o item 4.2, porém, utilizando-se soluções de substrato em uma ampla faixa de pH (3,5 – 10,5). Os tampões utilizados foram (VILLELA; BACILA; TASTALDI, 1973): tampão McIlvaine (fosfato de sódio 0,2 mol/L; ácido cítrico 0,1 mol/L) para faixa de pH 3,5 – 8,0 e tampão glicina-hidróxido de sódio (glicina 0,2 mol/L; NaOH 0,2 mol/L) para faixa de pH 8,5 – 10,5.

4.16.II) Determinação da temperatura ótima de atividade

A temperatura ótima de atividade foi avaliada mantendo-se a mistura de reação sob diferentes temperaturas (25 – 80°C), no pH ótimo de atividade, seguindo os procedimentos descritos no item 4.2.

4.16.III) Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante

A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, as mesmas foram incubadas por 24 h, a 23°C em soluções tampão (0,05 mol/L) de diferentes valores de pH (3,5 – 10,5) e, em seguida, foi determinada a atividade residual, sob as condições ótimas de reação.

4.16.IV) Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante

A termoestabilidade foi avaliada incubando-se as enzimas por 1 h a temperaturas de 30°C a 70°C no tampão em que mais se mantiveram estáveis, seguida da determinação da atividade residual, sob as condições ótimas de reação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de endoglucanase por fermentação submersa

Com a intenção de selecionar um gene codificando para uma endoglucanase eficiente através de organismos do gênero *Xanthomonas*, foi realizado um experimento preliminar a fim de selecionar a melhor linhagem produtora de endoglucanase extracelular.

Como posteriormente o sobrenadante da cultura bacteriana será utilizado como extrato bruto enzimático, objetiva-se escolher aquela linhagem que melhor produz e secreta endoglucanase para o meio de cultivo.

Para isto, três linhagens diferentes *Xanthomonas* foram testadas e, neste experimento, foi verificado o possível melhor tempo e composição do meio de cultivo para a produção enzimática nestes organismos. Pode-se observar, através das tabelas mostradas abaixo (Tabelas 3 a 5), que a bactéria Xcc apresentou uma produção significantemente maior de endoglucanases quando utilizado o meio 2XTY acrescido de CMC a 1,0% (tabela 4), em comparação às outras espécies e meios nutrientes avaliados.

Tabela 3 - Produção de endoglucanase pela linhagem *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xac) durante fermentação submersa em diferentes meios nutrientes.

Xac - *Atividade CMCase (U/mL)*			
Tempo (h)	2XTY	2XTY+CMC	MME+CMC
24	0,12	0,22	0,16
48	0,15	0,14	0,1
72	0,12	0,11	0,1

Tabela 4 - Produção de endoglucanase pela linhagem *Xanthomonas campestris pv.* campestris (Xcc) durante fermentação submersa em diferentes meios nutrientes.

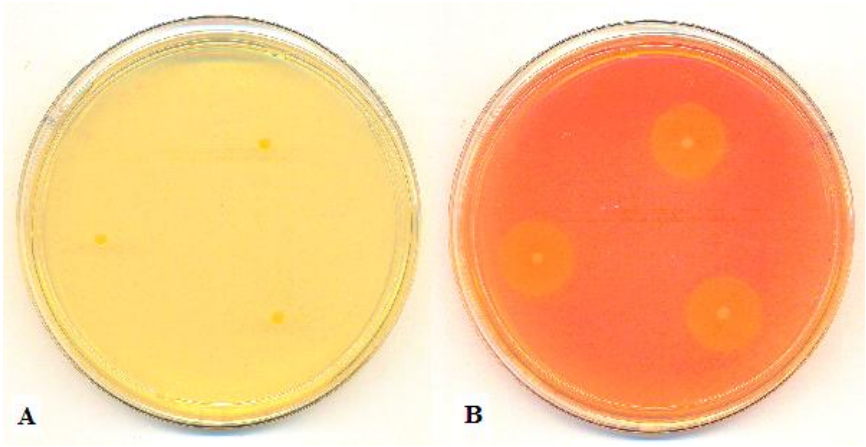
Xcc - *Atividade CMCase (U/mL)*			
Tempo (h)	2XTY	2XTY+CMC	MME+CMC
24	0,54	0,34	0,17
48	0,72	0,97	0,1
72	1,0	**1,45**	0,1

Tabela 5 - Produção de endoglucanase pela linhagem *Xanthomonas campestris pv.* vesicatoria (Xav) durante fermentação submersa em diferentes meios nutrientes.

Xav - *Atividade CMCase (U/mL)*			
Tempo (h)	2XTY	2XTY+CMC	MME+CMC
24	0,1	0,1	0,12
48	0,12	0,11	0,1
72	0,1	0,1	0,1

Desta forma, Xcc foi selecionada para dar continuidade ao trabalho e, para ilustrar a secreção da enzima de interesse, foi feito um ensaio de atividade enzimática em placa (figura 9), na qual o halo formado indica a atividade de endoglucanase sobre o substrato sintético utilizado (CMC).

Figura 9 - Ensaio de atividade CMCase em placa a partir de Xcc. (A) Colônias de Xcc crescidas por 48h a 30°C em meio N acrescido de CMC 1%, contendo (g/L): glicerol (20,0), peptona (5,0), extrato de levedura (3,0) e Agar (15,0). (B) Atividade CMCase revelada com solução 0,1% de vermelho congo.



FONTE: Elaborado pelo autor.

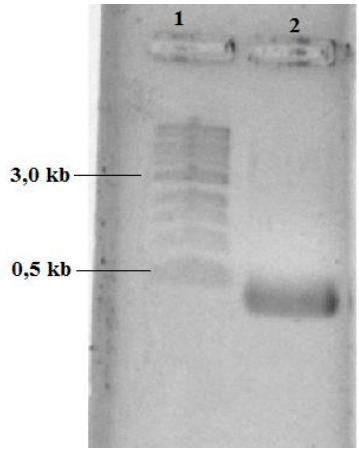
Com base em dados de literatura, o gene *engXCA* é apontado como o principal responsável pela atividade de endoglucanase extracelular desta bactéria (GOUGH *et al*., 1990) Iniciou-se assim, o processo de desenho do gene quimérico que foi utilizado em expressão controlada a partir de levedura.

5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com o objetivo de clonar, expressar e secretar a endoglucanase majoritária de Xcc em Sc, foi realizado o isolamento do gene que codifica para a enzima, *engXCA*, e também do gene que codifica para o peptídeo sinal de levedura *mfα* (fator alpha de Sc). Para isto, foram utilizados primers específicos para amplificar tais genes para posterior ligação em vetor de expressão de levedura pYES2.

Considerando que o gene *mfα* possui aproximadamente 300 pb, observou-se que a banda gerada correspondeu ao tamanho de fragmento esperado após eletroforese em gel de agarose 0,7% (figura 10). O DNA foi amplificado por PCR e posteriormente purificado com kit (GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit – Fermentas Life Science).

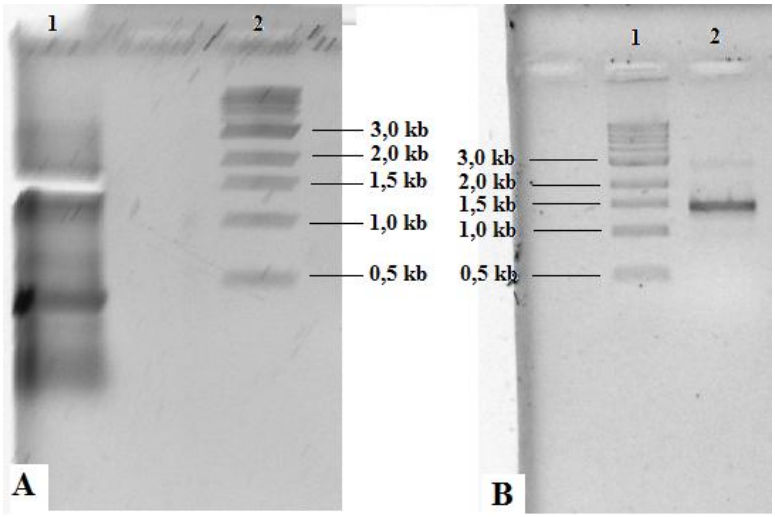
Figura 10 - PCR para isolamento e amplificação do gene *mfα*. No poço 1 encontra-se o marcador de peso molecular (NewEnglandBioLabs - 500µg/mL) em kilobases (Kb) e no poço 2, o produto da reação PCR do gene *mfα*, com aproximadamente 300 pares de base (pb).



FONTE: Elaborado pelo autor.

Já a reação de PCR para o isolamento do gene codificando para endoglucanase de Xcc gerou uma grande quantidade de DNA amplificado com diversos tamanhos, dificultando o isolamento do fragmento de interesse (*engXCA)* de 1492 pb. Porém, a banda a ser isolada contendo o material desejado deveria se apresentar próxima aos 1500 pb após eletroforese em gel de agarose e, desta forma, o gene *engXCA* foi isolado com sucesso. A figura 11 mostra o resultado esperado para o produto desta amplificação. Posteriormente, a banda cortada do gel foi submetida a purificação com GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit – Fermentas Life Science, e o DNA quantificado para ligação.

Figura 11 - PCR para isolamento do gene *engXCA*. Na parte (A) tem-se no poço 1 a PCR do DNA de Xcc, na qual a banda cortada equivale ao gene *engXCA* e, no poço 2, se encontra o marcador de peso molecular (BioLabs - 500µg/mL). Já na parte (B) mostra-se em 1 o referido marcador de peso molecular e em 2, a banda equivalente ao gene de aproximadamente 1500 pb, purificada com GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit – Fermentas Life Science.



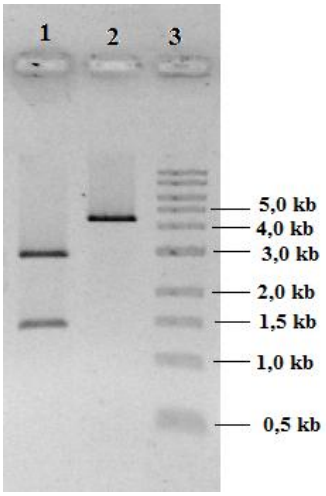
FONTE: Elaborado pelo autor.

5.3 Verificação da clonagem do gene *engXCA* em pJET por análise de restrição

Após a transformação das células competentes de *E. coli* com as construção plasmidial pJET-eng, colônias recombinantes foram obtidas em meio LB contendo ampicilina e o DNA plasmidial foi extraído. Amostras de DNA plasmidial foram submetidas a análises de restrição e a identidade das construções plasmidiais pôde ser checada. Para isto, vetores candidatos foram digeridos com as enzimas *BamH*I, *Xho*I e *EcoR*I, as quais deveriam gerar fragmentos de 1461, 2962 e 4446 pb, respectivamente.

A figura 12 mostra o perfil de migração dos produtos destas digestões após eletroforese, onde foram observados fragmentos de tamanhos 1461, 2962 e 4446 pb, confirmando a construção pretendida.

Figura 12- Análise de restrição para a clonagem do gene *engXCA*, mostrando no poço 1 a digestão com as enzimas *BamH*I e *Xho*I, no 2 a digestão com a enzima *EcoR*I e em 3, o marcador de peso molecular (NewEnglandBioLabs - 500µg/mL).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Subclonagem dos genes *mfα* e *engXCA* no vetor de expressão pYES2 (Invitrogen)

Nesta etapa do trabalho transferiram-se os fragmentos dos genes ligados em vetor de clonagem para o vetor de expressão pYES2, ligando o gene que codifica para endoglucanase em frame com o fragmento codificando para o peptideo sinal do fator alpha de Sc, para que a enzima produzida contenha o peptídeo sinal e seja secretada para o meio de cultivo.

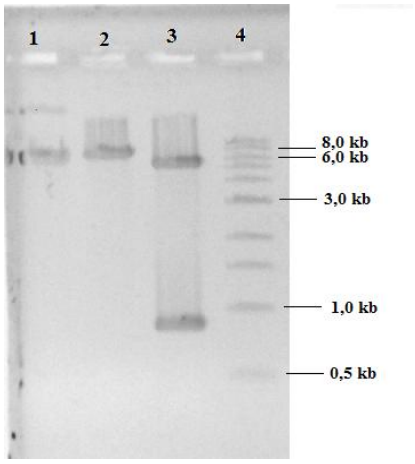
5.5 Verificação da construção plasmidial pYES2-eng por análise de restrição

Ao transformar células competentes de *E. coli* com as construções plasmidiais pYES-eng, foram obtidas colônias recombinantes e o DNA plasmidial foi extraído. Vetores candidatos foram submetidos a análises de restrição e assim foi possível checar a identidade das construções plasmidiais.

Para isto, construções candidatas foram digeridas com as enzimas *BamH*I, *Kpn*I e *Xho*I e, nestas digestões, construções corretas deveriam gerar fragmentos de DNA de tamanhos 7667, 891, 875 e 5900 pb.

A figura 13 mostra que o vetor candidato 3 apresentou os fragmentos esperados após as reações de digestão. Desta forma, este foi considerado um possível clone positivo e foi o escolhido para ser enviado para análise por sequenciamento, que confirmou sua identidade.

Figura 13 - Análise de restrição da subclonagem do gene *engXCA* em vetor de expressão pYES2 (clone 3). No poço 1 tem-se a construção plasmidial intacta pYES2-eng no poço 2, a digestão com a enzima *BamH*I, no poço 3 as digestões com *Kpn*I e *Xho*I e em 4, o marcador de peso molecular (NewEnglandBioLabs - 500µg/mL)



FONTE: Elaborado pelo autor.

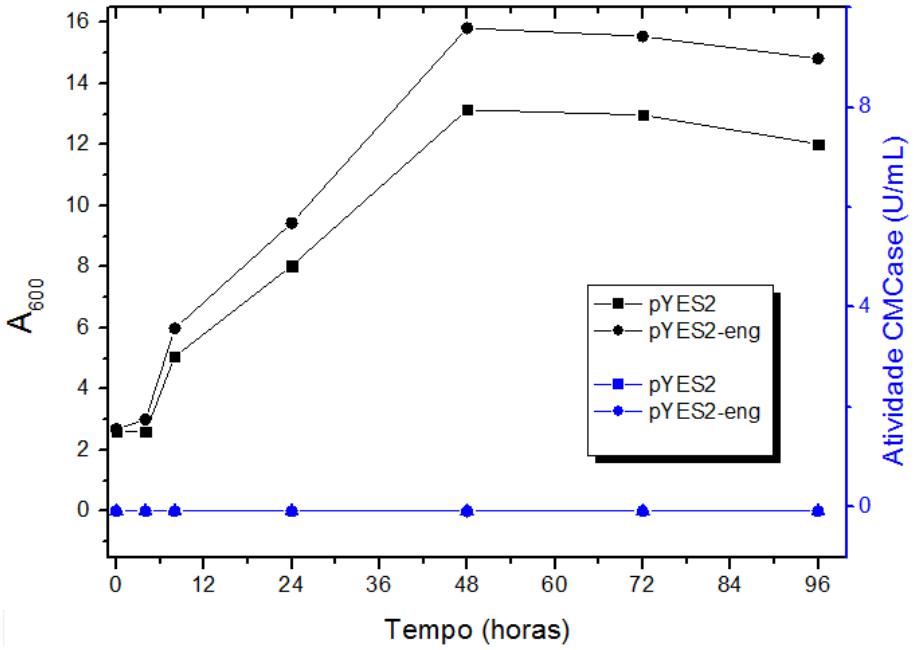
5.6 Fermentações submersas para testes de expressão em CBO012

Após inserir as construções plasmidiais na linhagem de Sc CBO012, foram selecionadas várias colônias transformantes para se dar inicio aos testes de diferentes protocolos para a expressão de proteínas em Sc.

Ao realizar o protocolo 1, foram testados vários transformantes e, apesar da elevada densidade celular apresentada, não foi notada nenhuma atividade CMCase no sobrenadante, tão pouco no interior das células. Com esta metodologia, foi possível plotar o seguinte gráfico (figura 14), no qual foi demonstrado apenas dois transformantes, relacionando o crescimento celular de Sc com a produção da enzima recombinante.

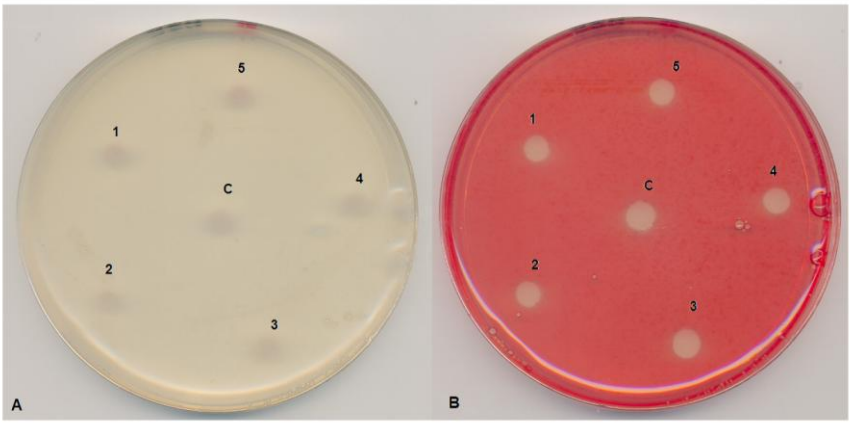
Já com o protocolo 2, foi possível analisar qualitativamente a presença ou não de atividade enzimática em placa. A figura 15 mostra que não houve secreção da enzima para o meio de cultivo.

Figura 14 - Avaliação da produção de endoglucanase pela linhagem CBO012 através de fermentação submersa. Fermentação submersa seguindo o protocolo 1 dos transformantes CBO012 com o controle negativo (vetor vazio) pYES2 e as construções plasmidiais pYES2-eng. A linha preta mostra o crescimento celular de cada cultura, enquanto a azul evidencia a inexistência de atividade CMCase nos 2 casos.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Teste de atividade CMCase em placa a partir da linhagem CBO012. Alíquotas retiradas no tempo 48h, na qual (A) mostra as colônias transformantes contendo a construção plasmidial pYES2-eng, crescidas em meio SC+U +2% Galactose + 1% CMC como substrato sintético, sendo C a linhagem controle. Já em (B) tem-se a revelação da atividade negativa de CMCase com solução 0,1% de vermelho congo. Nota-se que não há a formação de halo ao redor da colônia em (B), indicando a inexistência de enduglucanases no meio.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Pode ser visto neste teste que os halos apresentados encontram-se restritos ao local ocupado pelas colônias. Halos pronunciados semelhantes aos observados para a linhagem de Xcc, não foram detectados.

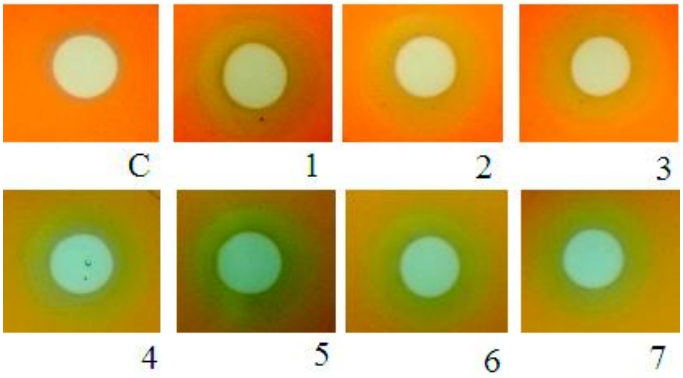
Estes resultados mostram que esta linhagem de Sc não parece ser apropriada para o sistema de expressão construído. Para verificar se a enzima está sendo produzida, mas contida no interior da célula, foi realizada a lise das células através de choque mecânico com pérolas de vidro. Entretanto, ao verificar quantitativamente a atividade enzimática intracelular, o resultado também foi negativo.

5.7 Expressão nas linhagens de leveduras INVSc-1 e BJ3501

Nesta etapa, as construções plasmidiais pYES2-eng foram inseridas nas linhagens de Sc INVSc-01 e BJ3501, e algumas colônias transformantes contendo a construção citada foram selecionadas para a realização de testes de atividade CMCase em placa. Para ilustrar produção e a secreção das enzimas de interesse, foram feitos ensaios de atividade enzimática em placa, nas quais o halo formado ao redor das colônias indica a atividade de endoglucanase sobre o substrato sintético utilizado (CMC).

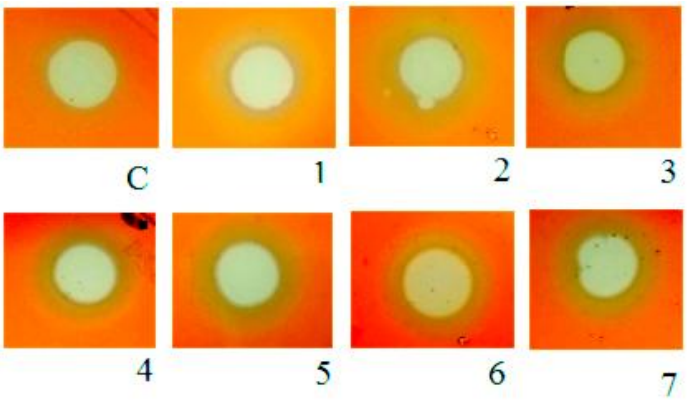
A expressão e secreção da endoglucanase codificada pelo gene *engXCA* nas linhagens INVSc-01 e BJ3501 ocorreu de forma satisfatória. Nas Figuras 16 e 17 pode-se observar que em ambas as linhagens de levedura houve expressão da endoglucanase de Xcc, mediante produção de halo de degradação do substrato contido no meio de cultivo ao redor das colônias (os círculos internos delimitam os espaços ocupados pelas colônias de leveduras e que foram removidas com o tratamento com o revelador). Nota-se que a linhagem controle (C) portando o vetor vazio (pYES2) não apresenta produção de halos. Estes resultados demonstram a produção da endoglucanase bacteriana em Sc com sucesso.

Figura 16 - Atividade CMCase revelada com solução 0,1% de vermelho congo. Transformantes da linhagem BJ3501 apresentaram atividade enzimática qualitativa em placa.



FONTE: Elaborado pelo autor

Figura 17 - Atividade CMCase revelada com solução 0,1% de vermelho congo. Transformantes da linhagem INVSc-1 apresentaram atividade enzimática qualitativa em placa.



FONTE: Elaborado pelo autor

Comparando as figuras 16 e 17, observa-se que a linhagem BJ3501 apresentou uma produção ligeiramente melhor da enzima em relação à linhagem INVSc-1, levando-se em consideração o diâmetro do halo de hidrólise formado. Desta forma, foi escolhido o transformante 4 da linhagem BJ3501 contendo a construção pYES2-eng para continuar os experimentos.

Adicionalmente, a atividade pôde ser detectada no sobrenadante das culturas de levedura (Figura 18), corroborando a secreção do produto do gene *engXCA* devido à inserção da região pré-pró do fator alpha de acasalamento de *S. cerevisiae* (MFα) *upstream* ao gene codificando para celulase. Esta região é a sequência sinal mais utilizada para secreção de proteínas heterólogas a partir de Sc. Muitas proteínas já foram secretadas a partir de levedura utilizando o peptídeo sinal do fator

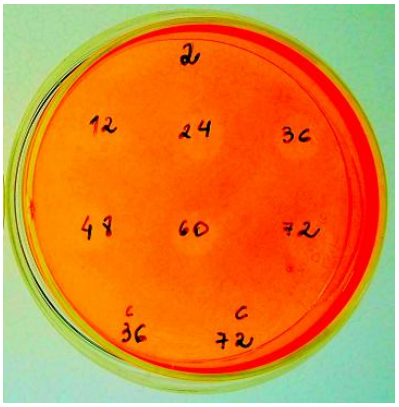
alpha e, este sistema tem sido demonstrado ser de aplicação geral (ROMANOS et al., 1992).

Segundo Bitter e colaboradores (1984), o fator de acasalamento de leveduras é um peptídeo (fator alpha) que é secretado para o meio de cultura por células MAT**α**. O fator alpha aprisiona células MAT**a** em fase G1 e induz alterações bioquímicas e morfológicas específicas como um pré-requisito para o acasalamento de uma célula **a** com uma célula **α** haplóide. A produção do peptídeo sinal é tão eficiente quanto a alta expressão de enzimas glicolíticas de levedura. Mostra-se verídico, portanto, que os componentes responsáveis pela eficiente secreção do fator alpha podem ser utilizados para dirigir a secreção de proteínas heterólogas no meio de cultura (THORNER, 1981).

5.8 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes tempos de fermentação (Time course)

Após selecionar um transformante da linhagem BJ3501 produtor da endoglucanase de Xcc, foram realizados experimentos para se verificar o melhor tempo de indução para a produção da enzima recombinante. Foi realizada a fermentação submersa de uma colônia isolada da linhagem selecionada e alíquotas do sobrenadante da cultura foram depositadas em placas apropriadas para verificação de atividade CMCase. Desta forma, pôde-se observar através da Figura 18 que, qualitativamente, houve um aumento leve e gradativo da hidrólise do substrato contido na placa quando analisados os sobrenadantes de 36 até 60 horas de fermentação. No local onde foi depositado o sobrenadante do tempo 72h, observa-se que houve diminuição da hidrólise, indicando menor quantidade de enzima funcional.

Figura 18 - Time-course: atividade enzimática qualitativa em placa. Foram depositados sobre a placa, 5,0 µL das alíquotas obtidas em cada tempo, em horas: 12, 24, 36, 48, 60 e 72, além do controle C, nos tempos 36 e 72 horas.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, é notado um tempo maior de fermentação para a melhor produção de enzimas em leveduras. Haan *et al*. (2007) reportou um tempo de 96 horas de fermentação ao expressar uma endoglucanase de *Trichoderma reesei* e uma β-glicosidase de *Saccharomycopsis fibuligera* em *S. cerevisiae.* Já Plessis (2008) obteve maior produção em 120 horas de cultivo, quando expressou combinadamente uma endoglucanase, uma celobiohidrolase e uma β-glicosidase de *T. reesei* também e Sc. Siqueira (2006) expressou uma endoglucanase de *Humicola grisea* em Sc e produziu a enzima intracelularmente após 96 horas de fermentação e sua porção extracelular em 72 horas.

Nota-se, portanto, que a produção da endoglucanase recombinante neste trabalho foi mais rápida (36 horas) comparado à maioria dos estudos, sendo esta uma característica interessante do ponto de vista industrial e biotecnológico.

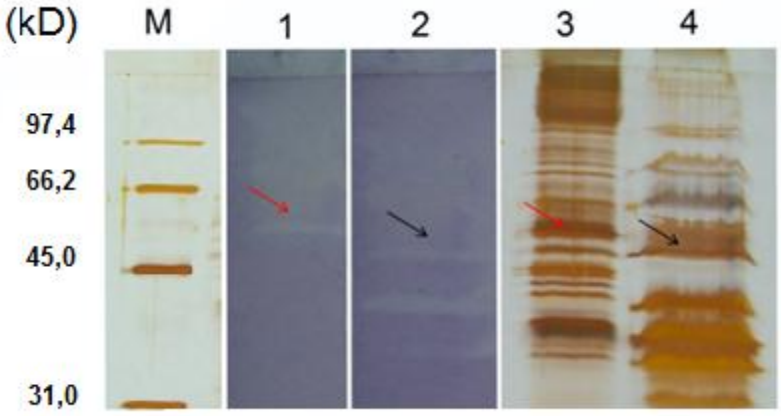
5.9 Análise da produção da endoglucanase recombinante em diferentes meios de cultivo

A linhagem selecionada foi submetida à fermentação e observou-se que, nos meios intitulados 1, 2 e 3, a quantidade de enzima presente no sobrenadante concentrado não foi suficiente para a sua quantificação. Em contrapartida, foi notada a presença de atividade enzimática com um aumento gradativo a partir do meio 4, sendo o meio 7 aquele que proporcionou maior quantidade de endoglucanase

recombinante no sobrenadante, alcançando a produção de 0,11 U/mL, ou 12,0 unidades por grama de peso seco de células (U/g DWC), nas condições descritas no item 4.2.

Para melhor identificar a endoglucanase recombinante, foi realizado um zimograma (Figura 19) com a amostra do sobrenadante da cultura da linhagem BJ3501 em meio denominado 6, após 48 horas de indução. Para fins de comparação, foi analisada também, a amostra do sobrenadante da cultura de Xcc em meio LB, após 48 horas de cultivo.

Figura 19 - SDS-PAGE e zimograma das endoglucanases nativa e recombinante de Xcc. No poço M, encontra-se o marcador de peso molecular (MW calibration Kit,GE Healthcare). Em 1, o zimograma da enzima recombinante e em 2, pode-se observar através de zimograma, as endoglucanases secretadas pela bactéria fitopatogênica. No poço 3 encontra-se o sobrenadante da cultura da linhagem de Sc transformada com a construção plasmidial pYES2-eng e em 4, o sobrenadante da cultura de Xcc. As setas vermelhas indicam as bandas referentes à enzima recombinante e as setas pretas, à enzima nativa de Xcc.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através das bandas visualizadas nos zimogramas, pode-se notar um aumento na massa molecular da endoglucanase recombinante (aparentemente entre 55,0 e 65,0 kD) em relação à selvagem (que apresenta 49,5 kD (ROSSETO, 2011)). Este fato provavelmente deve-se à ligação do peptídeo sinal de Sc à proteína, e também à glicosilação formada durante as modificações pós traducionais ocorridas na produção heteróloga da enzima bacteriana pela levedura.

Algumas proteínas heterólogas são hiperglicosiladas quando secretadas por leveduras. Este problema é mais provável de ocorrer com as proteínas originais de

bactérias, em que não há glicosilação, ou com proteínas que não sejam normalmente secretadas pelo organismo (ROMANOS *et al.*, 1992).

A glicosilação é uma modificação pós-traducional onipresente, servindo em muitas funções biológicas, tanto no reconhecimento quanto sinalização (JEOH *et al*., 2008). Em celulases, este processo varia de acordo com o organismo em que se irá realizar a expressão heteróloga e as condições ambientais que se encontra, com modificações que podem interferir na afinidade de ligação ao substrato e atividade (BECKHAM *et al*., 2012).

Vários estudos examinaram os efeitos de glicanos em atividade enzimática. Além de interferir na secreção, a glicosilação pode apresentar funções adicionais, como inibição de proteólise. Foi demonstrado para as enzimas, que a glicosilação também pode conferir estabilidade contra agregação de proteínas bem como o reforço da estabilidade térmica (HOIBERG-NIELSEN *et al*., 2006).

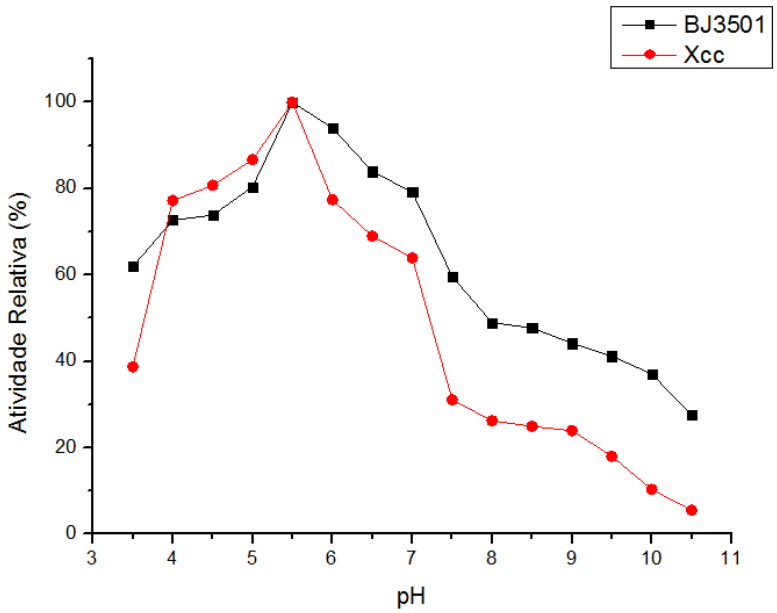
5.10 Caracterização físico-química das endoglucanases nativa e recombinante

Conhecidas as melhores condições para a produção da endoglucanase bacteriana por Sc, deu-se inicio à caracterização das enzimas nativa e recombinante de Xcc. Foram observadas, diferenças nas características apresentadas pela enzima recombinante em relação à endoglucanase selvagem de Xcc. Os ensaios foram realizados em duplicata e o desvio padrão foi menor que 5% em todos os casos.

5.10.I) Determinação do pH ótimo de atividade

Nesta etapa, foi avaliado o efeito do pH sobre a atividade das endoglucanases nativa e recombinante, sendo considerado como 100% a maior atividade encontrada para cada enzima. Ambas as enzimas são maia ativas em 5,5 (Figura 20).

Figura 19 - Influência do pH sobre a atividade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Observando a figura acima, pode-se verificar que, enquanto a enzima selvagem apresenta atividade acima de 75 % para valores de pH entre 4,0 e 5,5, a endoglucanase recombinante atua melhor na faixa de pH entre 5,0 e 7,0, apresentando mais de 80% de atividade nestes casos. Além disso, a enzima recombinante apresenta maiores rendimentos do que a endoglucanase selvagem em valores de pH acima de 5,5. Enquanto a enzima recombinante apresenta cerca de 60% de atividade em pH 7,5, a enzima nativa já perdeu mais de 70% de atividade nesta faixa de pH.

Estes resultados mostram que a endoglucanase recombinante obtida neste trabalho apresenta características próximas àquelas produzidas por fungos filamentosos, visto que a maioria das celulases empregadas em processos de sacarificação tem origem fúngica. Endoglucanases produzidas por *Aspergillus niger* isolado de sabugo de milho apresentaram pH ótimo 5,0 (OYELEKE *et al.,* 2012), assim como as endoglucanases produzidas por *Chaetomium sp*., em estudo realizado por Ravindran e colaboradores (2010), as quais apresentaram pH ótimo 5,0. Por outro lado, Chellapandi e Himanshu (2008) obtiveram valores de pH ótimo de atividade entre 6,5 e 7,5 para endoglucanases produzidas por *Streptomyces sp*.

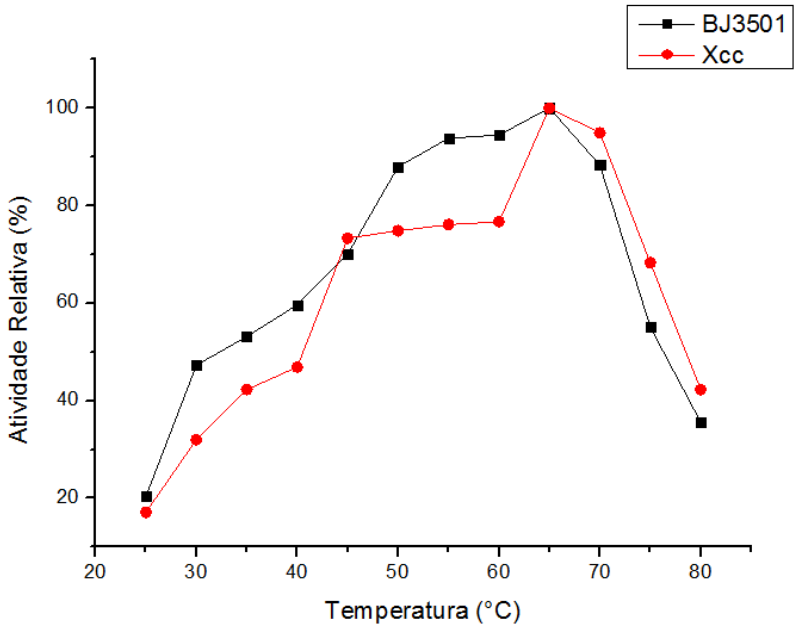
Ao expressar uma endoglucanase de *Trichoderma viride* em Sc, Huang e colaboradores (2012) verificaram que a enzima recombinante (codificada pelo gene

egIV) atua melhor em pH 5,0. Entretanto, duas endoglucanases de *Penicillium decumbens* (codificadas pelos genes *cel7B* e *cel5A)* expressas em Sc, apresentaram pH ótimo de atividade 4,0, como reportou Wei e colaboradores (2009). Zhang *et al* (2012) também clonaram e expressaram endoglucanases de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus aculeatus* em Sc e obtiveram como pH ótimo 5,0 em ambos os casos.

5.10.II) Determinação da temperatura ótima de atividade

O efeito da temperatura sobre a atividade das endoglucanases nativa e recombinante foi avaliado em meio reacional mantido no pH ótimo de atividade encontrado para as enzimas. Neste caso também foi considerado como 100% a maior atividade encontrada para cada enzima. A temperatura ótima de atividade obtida para ambas as endoglucanases foi 65,0°C, como pode ser visualizado na Figura 21.

Figura 20 - Influência da temperatura sobre a atividade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Estes resultados demonstram que a endoglucanase recombinante apresenta uma maior faixa de atuação em relação à enzima nativa, quando submetida a

diferentes temperaturas. Pode-se observar que a enzima produzida pela levedura apresenta atividades acima de 85% entre valores de 50°C até 70°C, enquanto a endoglucanase selvagem apresenta esta porcentagem de atividade apenas para temperaturas elevadas, como 65°C e 70°C.

Os dados obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados para temperatura ótima da endoglucanase recombinante de *Trichoderma viride* (HUANG *et al.*, 2012). Neste caso, a faixa de atuação da enzima recombinante foi a mesma que a obtida no presente estudo.

Wei e colaboradores (2009) relataram que obtiveram 60°C como temperatura ótima de atividade para a endoglucanase produzida em Sc. Semelhantemente, Siqueira (2006) obteve valores máximos de atividade na faixa de temperatura entre 50°C e 60°C, ao expressar uma endoglucanase de *Humicola grisea* também em Sc.

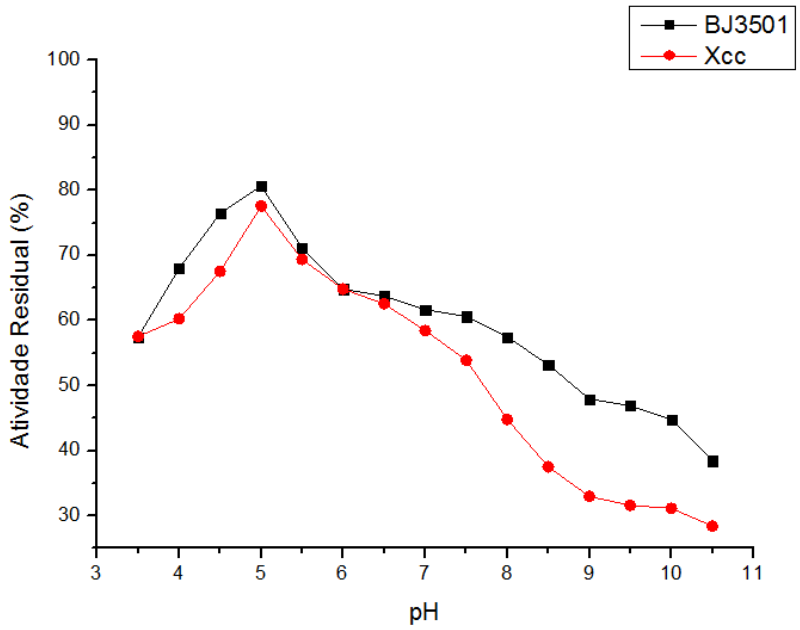
Por outro lado, uma endoglucanase produzida por *Halomonas sp.* apresentou temperatura ótima de atividade em 45°C (HUANG et al., 2010). A mesma temperatura foi reportada por Nirmala e Shindu (2011), ao caracterizar uma endoglucanase de *Bacillus circulans*.

Com a caracterização da endoglucanase recombinante de Xcc em relação ao pH e temperatura, o valor de atividade CMCase encontrado neste trabalho passou a ser 0,5 U/mL, um aumento de aproximadamente 5 vezes em relação aos ensaios preliminares. A atividade específica, entretanto, foi avaliada em 0,17 U/mg.

5.10.III) Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante

Ao avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade, das enzimas foi considerado como 100% a atividade das enzimas quantificadas no seu pH e temperatura ótimos de atividade antes do período de incubação. Como pode ser verificado na Figura 22, ambas as endoglucanases apresentaram maior estabilidade quando incubadas em pH 5,0.

Figura 21 - Efeito do pH sobre a estabilidade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Mais uma vez, podem ser notadas diferenças no comportamento da enzima recombinante em relação à nativa de Xcc. No que se refere à estabilidade em relação ao pH, a endoglucanase produzida pela levedura também se destaca por apresentar mais resistência a valores de pH diferenciados. Em praticamente todos os valores de pH analisados, a endoglucanase recombinante apresenta maior porcentagem de atividade residual quando comparada à selvagem.

A faixa de valores de pH em que ambas as enzimas se mostraram mais estáveis foi de 4,0 a 6,0, onde apresentaram mais de 75% de atividade após incubação.

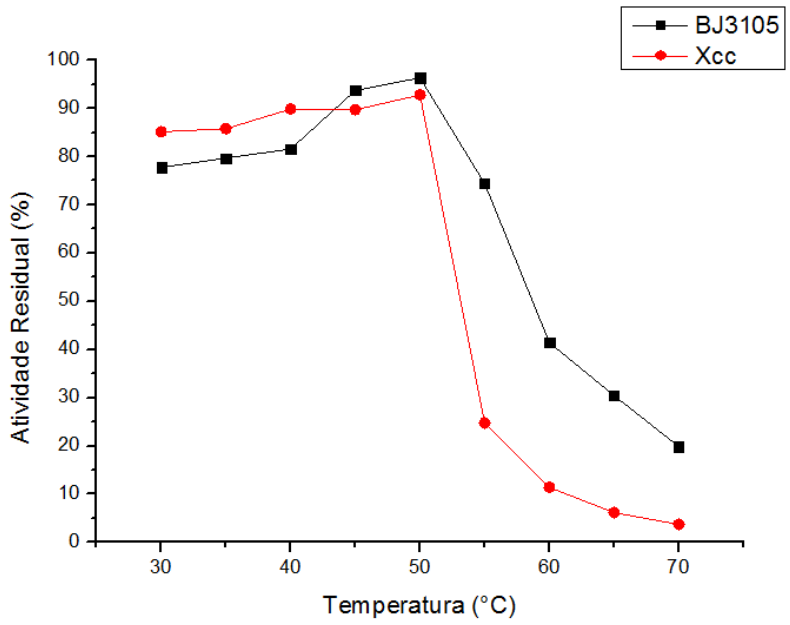
Song e Wei (2010) caracterizaram as endoglucanases produzidas por *Cellulosimicrobium cellulans* em relação à estabilidade ao pH, as quais tiveram uma perda de 50% da sua atividade máxima em pH 5,0 sendo incubadas por uma hora no tampão correspondente. Outra celulase bacteriana foi estudada por Bajaj e colaboradores (2009), que caracterizou uma endoglucanase produzida por um isolado de *Bacillus sp*. a partir de farelo de arroz. Esta enzima apresentou características muito semelhantes à endoglucanase recombinante obtida no presente trabalho em relação ao pH de estabilidade, apresentando estabilidade máxima em pH 5,0 e mantendo-se estável (70 a 83%) na faixa de pH de 4,0 a 6,0.

Já Huang e colaboradores (2012) produziram uma endoglucanase recombinante em Sc mais estável em relação ao pH, mantendo atividade residual acima de 85% para valores de pH entre 4,0 e 7,0, sendo o pH 5,0, aquele que proporcionou maior estabilidade. Entretanto, esta enzima foi incubada por apenas 30 minutos em tampão adequado.

5.10.IV) Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas nativa e recombinante

Para finalizar, foi avaliado o efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas, sendo considerado como 100%, a atividade das enzimas quantificadas no seu pH e temperatura ótimos de atividade antes do período de incubação. A partir da Figura 23, pode-se observar que ambas as enzimas apresentaram elevada termoestabilidade quando incubadas a até 50°C por 1 hora.

Figura 23 - Efeito da temperatura sobre a estabilidade das endoglucanases selvagem e recombinante de Xcc.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Através destes resultados, verifica-se que a endoglucanase recombinante apresenta uma termoestabilidade maior comparada à enzima selvagem de Xcc. Nota-se que, para a endoglucanase nativa, há uma drástica queda na atividade residual após 50°C, enquanto a enzima produzida pela levedura mantém-se

altamente estável (75%) em até 55°C, apresentando valores consideráveis de atividade residual. Este efeito deve-se, principalmente, ao fato de a enzima recombinante ter sofrido modificações pós traducionais durante seu processamento em Sc, corroborando o reforço da estabilidade térmica proporcionada pelas glicosilações.

Endoglucanases produzidas por *Aspergillus fumigatus* Z5 em estudo realizado por Liu e colaboradores (2011) apresentaram estabilidade térmica em uma faixa temperaturas de 40 – 60 °C, mantendo mais de 80% de sua atividade máxima. Já Bajaj e colaboradores (2009) obtiveram para a endoglucanase avaliada, a faixa de termoestabilidade entre 50 e 60°C.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com estudos realizados com endoglucanases produzidas por de diversas espécies fúngicas e bacterianas, nota-se que endoglucanase recombinante de Xcc apresentada características interessantes no ponto de vista de aplicação biotecnológica, pois esta também pode ser utilizada em diversas situações além da aplicação em processos para a produção de biocombustíveis, devido à sua ampla faixa de atuação em relação ao pH e à temperatura.

Adicionalmente, ao observar estudos publicados na literatura, pode-se inferir que a produção enzimática obtida neste trabalho (0,5 U/mL) está acima da faixa de valores encontrados para a expressão de endoglucanases em *S. cerevisiae.* A Tabela 6 mostra o resultado de alguns trabalhos envolvendo a produção de endoglucanases de diversos organismos em levedura.

Tabela 6 - Expressão de endoglucanases de diferentes organismos em *S. cerevisiae*.

Enzima	*Organismo de origem*	*Promotor*	*Meio de cultura*	*Produção (U/mL)*	*Secretada*	*Purificada*	*Referência*
EGL2	*H. grisea*	ADH1	Glicose + YNB	0,0007	Não	Não	Siqueira, 2006
EGIII	*T. reesei*	ADH1	YPD + extrato de malte	0,017	Sim	Sim	Okada *et al*., 1998
CMCase	*A. aculeatus*	GAP	Glicose + YNB	0,1	Sim	Sim	Minamiguchi *et al*., 1995
EG I	*Scopulariopsis brevicaulis*	PGK	YPD	0,109	Sim	Não	Nakatani *et al*., 2000
EGL6	*Trichoderma spp.*	ADHI	YPD	0,45	Sim	Não	Lee *et al*., 2007
EngI	*A. niger*	GAPDH	Glicose + YNB + CMC + suplemento*	0,529	Sim	Sim	Hong *et al*., 2001
EgIV	*Trichoderma viride AS 3.3711*	GAL1	YPD	0,15	Sim	Não	Huang *et al*., 2012

* - aminoácidos e fatores de crescimento necessários conforme a linhagem utilizada

Como pode ser visualizado na tabela acima, Huang e colaboradores (2012) obtiveram um valor bastante inferior de atividade CMCase ao expressar a endoglucanase *de Trichoderma viride AS 3.3711* em Sc. Neste caso, a plataforma utilizada para expressão em leveduras foi a mesma utilizada no presente estudo, o vetor pYES2.

Por outro lado, também foram encontrados níveis elevados de expressão de endoglucanases em Sc, como reportado no trabalho de Zhang *et al*. (2012), no qual foram descritos valores de atividade de endoglucanase variando de 347,7 U/g DWC a 30,8 U/g DWC dependendo da linhagem de levedura utilizada. Haan *et al*. (2007) também obteve alta eficiência ao produzir uma endoglucanase de *T. reesei* em Sc, obtendo 470 U/g DWC.

Entretanto, existem poucos relatos sobre a expressão de celulases bacterianas em leveduras. Na grande maioria dos estudos, são expressos genes codificando para celulases de fungos filamentosos que já possuem suas características bem conhecidas. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho são bastante promissores, tendo em vista que o principal objetivo foi alcançado com sucesso, sendo este, a expressão e secreção de uma endoglucanase de Xcc em Sc, como um primeiro passo para a construção de uma linhagem de levedura capaz de expressar uma celulase bacteriana para testes futuros de SSF.

Nesta primeira etapa, a expressão da celulase a partir de levedura esteve sob controle do promotor GAL1 presente no vetor de pYES2. Porém, sabe-se que para que seja obtida uma linhagem de Sc adequada para testes de SFS, o promotor da construção plasmidial deverá ser adaptado, trocando o atual por um promotor constitutivo. Trabalhos futuros poderão testar também outros vetores e linhagens de levedura apropriadas para expressão. Futuramente, objetiva-se ainda clonar genes codificando para β-glicosidases e celobiohidrolases e expressá-los simultaneamente ao gene *engXCA* de Xcc em Sc, com a finalidade de se concretizar a degradação enzimática da celulose e liberar de fato a glicose para a fermentação deste açúcar a etanol pela levedura.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, todos os objetivos traçados foram realizados com sucesso:

- O gene *engXCA* foi isolado de Xcc e utilizado na montagem de um sistema de expressão para leveduras.

- A clonagem, expressão e secreção da endoglucanase bacteriana em levedura ocorreram de forma satisfatória.

- As melhores condições para a produção da endoglucanase recombinante foram em meio YPGal acrescido de CMC 1% quando cultivada por 36h de fermentação a 30°C.

- As condições reacionais em que as enzimas nativa e recombinante apresentaram maior atividade CMCase foram em pH 5,5 e temperatura 65°C.

- Em relação è estabilidade, as endoglucanases se apresentaram mais estáveis em pH 5,0 e a enzima recombinante manteve elevada termoestabilidade em até 55°C.

Estes estudos mostram que, ao se explorar e conhecer as condições ótimas de produção e atividade destas enzimas, sua produtividade é aumentada consideravelmente.

Observando os dados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que estes resultados são bastante promissores, tendo em vista o baixo número de estudos envolvendo expressão heteróloga de celulases bacterianas em Sc, assim como o valor satisfatório de atividade CMCase encontrado para a enzima recombinante de Xcc, 0,5 U/mL.

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi dado o primeiro passo para o início da construção de uma linhagem de levedura útil em processos SFS. Foi notado que a endoglucanase recombinante de Xcc apresenta algumas características interessantes para sua utilização nestes processos, como a elevada estabilidade em relação ao pH e temperatura.

Finalmente, os conhecimentos adquiridos ao decorrer dos experimentos serão de grande valia para o desenvolvimento de trabalhos e projetos futuros, envolvendo a clonagem e expressão de genes de celulases em Sc.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAJAJ, B. K.; PANGOTRA, H.; WANI, M. A.; SHARMA, P.; SHARMA, A. Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus strain* M-9. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 16, p. 382-387, 2009.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. 2008. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org/pt/download/bioetanol.pdf> Acesso em: 03 nov. 2013.

BECKHAM, G. T.; DAI, Z.; MATTHEWS, J. F.; MOMANY, M.; PAYNE, C. M.; ADNEY, W. S.; BAKER, S. E.; HIMMEL, M. E. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 338-345, 2012.

BITTER, G. A.; CHEN, K. K.; BANKS, A. R; LAI, P. Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by a-factor gene fusions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 5330-5334, 1984.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de conjuntura dos biocombustíveis**. 2011. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20-%20boletins%20peri%C3%B3dicos/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20%E2%80%93%20Ano%202010.pdf>. Acesso em: 29 out. 2013.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de conjuntura dos biocombustíveis**. 2012. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20-%20boletins%20peri%C3%B3dicos/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20%E2%80%93%20Ano%202011.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2013.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de conjuntura dos biocombustíveis**. 2013a. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20-%20boletins%20peri%C3%B3dicos/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20%E2%80%93%20Ano%202012.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2013.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, n. 60, 2013b. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_060_-_janeiro_de_2013.pdf>. Acesso em: 15 out. 2013.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, n. 69, 2013c. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_069_-_outubro_de_2013.pdf >. Acesso em: 15 out. 2013.

BUABAN, B.; INOUE, H.; YANO, S.; TANAPONGPIPAT, S.; RUANGLEK, V.; CHAMPREDA, V.; PICHYANGKURA, R; RENGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis.* **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 18-25, 2010.

CHELLAPANDI, P.; HIMANSHU, M. J. Production of endoglucanase by the native strains of *streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 122-127, 2008.

FERREIRA, V. **Produção de β-glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FOGEL, R.; GARCIA, R. R.; OLIVEIRA, R. da S.; PALACIO, D. N.; MADEIRA, L. da S.; PEREIRA, N. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 122, n. 1/3, p. 741-752, 2005.

GIBSON, D. M.; KING, B. C.; HAYES, M. L.; BERGSTROM, G. C. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 264-270, 2011.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology**: fundamentals of applied microbiology. New York: W.H. Freeman, 1995. p. 325-339.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086-2097, 2008.

GOUGH, C. L.; DOW, J. M.; KEEN, J.; HENRISSAT, B.; DANIELS, M. J. Nucleotide sequence of the *engXCA* gene encoding the major endoglucanase of *Xanthomonas campestris* pv. campestris. **Gene**, v. 89, p. 53-59. 1990.

HAAN, H. D.; ROSE, S. H.; LYND, R. L.; ZYL, W. H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae.* **Metabolic Engineering**, v. 9, p. 87-94, 2007.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HOIBERG-NIELSEN, R.; FUGLSANG, C. C.; ARLETH, L.; WESTH, P. Interrelation ships of glycosylation and aggregation kinetics for *Peniophora lycii* phytase. **Biochemistry**, v. 45, p. 5057-5066, 2006.

HONG, J.; HISANORI, T.; SHUNICHI, A.; KUMAGAI, H. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-β-1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 32, n. 5, p. 434-441, 2001.

HUANG, X.; FAN J.; YANG, Q.; CHEN, X.; LIU, Z.; WANG, Y.; WANG, D. Cloning, expression, and characterization of endoglucanase gene *egIV* from *Trichoderma viride AS 3.3711*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 390-399, 2012.

JAHR, H.; DREIER, J.; MELETZUS, D.; BAHRO, R.; EICHENLAUB, R. The endo-β-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 703-714, 2000.

JEFFRIES T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 495-509, 2004.

JEOH, T.; MICHENER, W.; HIMMEL, M. E.; DECKER, S. R.; ADNEY, W. S. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion**.** **Biotechnololy for Biofuels**, v. 1, p. 10, 2008. Disponível em: < http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/pdf/1754-6834-1-10.pdf>. Acesso em: 20 set. 2013.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT. E. L.; SANDERS, J. P. M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 31, 2009. Disponível em: < http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/pdf/1754-6834-2-31.pdf>. Acesso em: 22 set. 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAINE, M. J.; HAAPALAINEN, M.; WAHLROOS, T.; KANKARE, K.; NISSINEN, R.; KASSUWI, S.; METZLER, M. C. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 221-233, 2000.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEE, J. H.; MYUNG-YE, L.; KIM, M.; SUN-YEON, H.; JIN-HO S.; YEON-HEE, K.; NAM, S. Constitutive coexpression of *bacillus* endoxylanase and *Trichoderma* endoglucanase genes in *Saccharomyces cerevisiae.* **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 2076-2080, 2007.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus Z5* under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 717-725, 2011.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

McQUEEN-MASON, S. J.; COSGROVE, D. J. Expansin mode of action on cell walls. **Plant Physiology**, v. 107, p. 87-100, 1995.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reduction sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MINAMIGUCHI, K.; OOI, T.; KAWAGUCHI, T.; OKADA, H.; MURAO, S., ARAI, M. Secrevite expression of the *Aspergillus aculeatus* cellulase (FI-CMCase) by *Saccharomyces cerevisiae.* **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 363-366, 1995.

MONIRUZZAMAN, M. Saccharification and alcohol fermentation of steamexploded rice straw. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 2, p. 111-117, 1996.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I - estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

NAKATANI, F.; KAWAGUCHI, T.; TAKADA, G.; SUMITAMI, J.; MORIKAWA, Y.; ARAI, M. Cloning and sequencing of a endoglucanase gene from *Scopulariopsis*

brevicaulis TOF-1212, and Its expression in *Saccharomyces cerevisiae.* **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 6, p.1238-1246, 2000.

NIRMALA. P.; SINDHU, A. Production of endoglucanase by optimizing the environmental conditions of *Bacillus circulans* on submerged fermentation. **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 2, n. 2, p. 472-481, 2011.

OAKLEY, B. R.; KIRSCH, D. R.; MORRIS, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 361-363, 1980.

OKADA, H.; TADA, K.; SEKIYA, T.; YOKOYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; TOHDA, H.; KUMAGAI, H.; MORIKAWA, Y. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass from *Trichoderma reesei* QM9414. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 555-563, 1998.

OYELEKE, S. B.; OYEWOLE, O. A.; EGWIM, E. C.; DAUDA, B. E. N.; IBEH, E. N. Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 5, p. 78-83, n. 1, 2012.

PLESSIS, L. **Co-expression of cellulase genes in *Saccharomyces cerevisiae* for cellulose degradation**. 2008. 77 f. Thesis (Masters of Science) - Stellenbosch University, Stellenbosch, 2008. Disponível em: <scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/1577/duplessis_coexpression_2008.pdf ?sequence=1>. Acesso em: 15 jan. 2013.

RAVINDRAN, C.; NAVEENAN, T.; VARATHARAJAN, G. R. Optimization of alkaline cellulase production by the marine-derived fungus *Chaetomium* sp. using agricultural and industrial wastes as substrates. **Botanica Marina**, v. 53, n. 3, p. 275-282, 2010.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v. 8, p. 423-488, 1992.

ROSSETO, F. R. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por *Xanthomonas campestris* pv. campestris ATCC33913**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANNIGRAHI, P.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. Cellulosic biorefineries-unleashing lignin opportunities. **Opinion in Environmental Sustainability**, v. 2 p. 383-393, 2010.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SIQUEIRA, S. J. L. **Clonagem do c-DNA da endoglicanase 2 *Humicolagrisea* var. *thermoidea* e sua expressão em *Saccharomyces cerevisiae*** . 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF, 2006.

SONG, J. M.; WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1930-1934, 2010.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

THORNER, J. Pheromonal regulation of development *in Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***: life cycle and inheritance. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. Cap. 6, p. 143-180.

VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; MENCK, C. F.; SILVA, A. C. da; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P.; SIMPSON, A. J. Comparative genomic analysis
of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 169-189, 2002.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C. da; SOUZA JUNIOR, M. B. de; PEREIRA JUNIOR, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 12, p. 137-140, 2007.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973.

WEI, X.; YU-QI, Q.; YIN-BO, Q. Molecular cloning and characterization of two major endoglucanases from *Penicillium decumbens*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 265-270, 2010.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, v. 64, p. 736-742, 1980.

XU, Q.; SINGH, A.; HIMMEL, M. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 364-371, 2009.

ZHANG, J.; SMITH, K. R. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: measurements, health impacts, and interventions. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 6, p. 848-855, 2007.

ZHANG, W.; LIU, C.; WANG, G.; MA, Y.; ZHANG, K.; ZOU, S.; ZHANG, M. Comparison of the esxpression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase IIfrom *Tricoderma reesei* and endoglucanase I from *Aspergillus aculeatus.* **BioResouses**, v. 7, n. 3, p. 4031-4045, 2012.