



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0902757-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0902757-2

(22) Data do Depósito: 04/08/2009

(43) Data da Publicação do Pedido: 12/04/2011

(51) Classificação Internacional: C12N 15/81; C12N 15/80; C12N 9/42; C12N 1/19; C12N 1/15

(54) Título: VETORES BIOLÓGICOS HETERÓLOGOS, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES, COMPOSIÇÃO ENZIMATICAMENTE ATIVA, USO DE COMPOSIÇÃO E MÉTODO DE MODIFICAÇÃO DE TECIDOS

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Cidade Universitária, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR); FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FUB/UNB. CGC/CPF: 00038174000143. Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte, Brasília, DF, BRASIL(BR)

(72) Inventor: ALDO JOSÉ PINHEIRO DILLON; MARCIO JOSÉ POÇAS FONSECA; ILDINETE SILVA PEREIRA; MARCIANO RÉGIS RUBINI

Código de Controle: C14B3CA46A3AD51A 7C04A63FE60DDCD4

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 04/08/2009, observadas as condições legais

Expedida em: 14/08/2018

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

VETORES BIOLÓGICOS HETERÓLOGOS, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES, COMPOSIÇÃO ENZIMATICAMENTE ATIVA, USO DE COMPOSIÇÃO E MÉTODO DE MODIFICAÇÃO DE TECIDOS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve vetores, células, processo de produção, método de expressão, composição e uso de composição compreendendo celulases e método de modificação de tecidos utilizando celulases obtidas a partir de *P. echinulatum*, especialmente a cepa 9A02S1 (DSM18942). A presente invenção se situa no campo da biologia e química

Antecedentes da Invenção

Celulases

[0002] As celulases correspondem a um complexo de enzimas naturalmente secretadas por microrganismos como fungos e bactérias. Este complexo também está presente no sistema digestivo de algumas espécies de insetos e de gastrópodes que apresentam a capacidade de hidrolisar celulose a pequenos oligossacarídeos e a moléculas de glicose (Kubicek *et al.*, 1993).

[0003] As celulases correspondem a um complexo de enzimas naturalmente secretadas por microrganismos como fungos e bactérias. Este complexo também está presente no sistema digestivo de algumas espécies de insetos e de gastrópodes que apresentam a capacidade de hidrolisar celulose a pequenos oligossacarídeos e a moléculas de glicose (Kubicek *et al.*, 1993).

[0004] Dentre estes produtores naturais de celulases, os fungos filamentosos apresentam grande habilidade e versatilidade na degradação de fontes de carbono complexas como celulose, xilana, lignina e pectina. Tais substratos são utilizados na ausência de fontes de carbono prontamente utilizáveis, visando a garantir o seu crescimento trófico (Strauss *et al.*, 1999).

[0005] Estudos genéticos realizados inicialmente com os fungos *Trichoderma*

reesei, *Trichoderma koningii* e *Phanerochaete chrysosporium* revelaram a existência de um sistema especializado para a biodegradação da celulose. Dentre estes, o microrganismo mais estudado, *Trichoderma reesei*, apresenta um sistema celulolítico composto por distintas hidrolases: endo- β -1,4-glicanases (EG I, EG II, EG III, EG IV, EG V, EC 3.2.1.4) e exo- β -1,4-glicanases (CBH I, CBH II, EC 3.2.1.91) que hidrolisam as ligações β -1,4, degradando os polímeros de celulose a celobiose. Uma terceira classe de hidrolases, a β -1,4-glicosidase (BG I, BG II, EC 3.2.1.21) degrada a celobiose em duas moléculas de D-glicose (Bisaria & Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000). Acredita-se que as endoglicanases (endo-1,4-glicanases) atuem nas regiões amorfas fosfatadas das fibras de celulose, liberando extremidades reductoras e não-reductoras que serão atacadas pelas celobiohidrolases (exo- β -1,4-glicanases). Verificou-se que as três enzimas atuam em sinergismo (Messner & Kubicek, 1988).

[0006] As enzimas celulolíticas são reguladas por repressão catabólica, ou seja, o produto final da via enzimática, a glicose, inibe a expressão dos genes. Entretanto, esse fenômeno não é universal, sendo outros sacarídeos capazes de atuar na repressão tais como frutose, galactose e sacarose (Kubicek *et al.*, 1993; Ilmén *et al.*, 1997; Poças-Fonseca *et al.*, 2000; Suto & Tonita, 2001). Existem evidências que sugerem que a repressão pode ser minimizada pela suplementação do meio com metilxantinas, aumentando o produto de secreção (Camassola & Dillon, 2006).

Emprego Industrial das Celulases

[0007] O mercado mundial apresenta uma crescente demanda por celulases nos mais diferentes setores industriais, sendo essas enzimas utilizadas em associação com detergentes para a limpeza de roupas, na formulação de detergentes domésticos, bioestonagem e biopolimento de tecidos, produção de sucos, produtos dermatológicos, pigmentos, extração de óleo vegetal, produção de álcool, como adjuvante para malte na fabricação de cerveja,

sendo também utilizadas como constituintes de rações animais e em indutores de silagem (Dillon, 2004). Graça ao seu grande emprego, as celulases são consideradas essenciais na catálise de alguns processos e na elaboração de novos produtos (Haakana *et al.*, 2003).

[0008] A hidrólise enzimática de celulose de algodão tem sido estudada em pormenor desde a década de 1980, quando as enzimas foram introduzidas para substituir pedras pomes em processos de finalização de tecidos (efeito *stonewashing*). Atualmente cerca de 26% de todas as empresas têxteis utilizam enzimas em seus processos, sendo o mercado de enzimas para este setor estimado em US\$ 200 milhões de dólares. (Heikinheimo *et al.*, 2003) O tratamento com celulases tem-se afirmado nos últimos anos como uma forma ecológica de processar o algodão. As duas aplicações mais freqüentes são a obtenção do aspecto usado do jeans (bioestonagem) e a remoção de borbotos e fibras soltas em tecidos de algodão (biopolimento), estes efeitos de acabamento são geralmente obtidos com misturas celulotíticas brutas e em processos com forte agitação (Cavaco-Paulo, 1995). Sua aplicação na indústria têxtil tornou os processos de bioestonagem e biopolimento de tecidos, que anteriormente se apresentavam como muito abrasivos, desgastando excessivamente os tecidos (jeans), em processos mais amenos, possibilitando aumentar o brilho dos tecidos pela retirada de microfibrilas desorganizadas. Este fato tem estimulado estas empresas a inovar, empregando processos que utilizem celulases especialmente produzidas para esta finalidade (Dillon, 2004). Com este intuito, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de aprimorar estes processos, obtendo-se celulases em alto grau de pureza, associado à otimização mecânica dos processos de bioestonagem e biopolimento. Desta forma, Boisset *et al.* (1997), trabalhando com uma endoglicanase V recombinante produzida pelo fungo *Humicola insolens*, demonstraram que o processo de biopolimento pode ser realizado utilizando celulases em pequenas quantidades juntamente com a lavagem dos tecidos, resultando na remoção das fibras superficiais dos tecidos, devolvendo o

aspecto de novo, não sendo evidenciada a sua atuação no interior das fibras.

[0009] Neste mesmo sentido, diferentes autores avaliaram o biopolimento do algodão utilizando celulasas e xilanases comerciais em dois sistemas distintos, um sistema com agitação e o outro sem agitação, sendo variada a concentração da enzima e o tempo de tratamento dos tecidos. Os resultados obtidos sugerem que estas enzimas podem ser utilizadas em processos de biopolimento, sendo os principais parâmetros que afetam o tratamento, a concentração da enzima, mecanismo de agitação e tempo de tratamento (Cavaco-Paulo *et al.*, 1996; Kundu *et al.*, 1996; Gulrajani *et al.*, 1998; Csizár *et al.*, 2001; Verenich *et al.*, 2008).

[0010] Outro fator que deve ser considerado com relação às técnicas de lavagem e biopolimento do jeans está relacionado ao pH ótimo das celulasas utilizadas. Celulasas ácidas ou neutras podem ocasionar a re-deposição do corante utilizado para colorir o algodão. Quando utilizadas celulasas alcalinas esta re-deposição não é observada. Utilizando uma endoglicanase alcalina estável, conhecida como T-EG, obtida a partir de *Thermomonospora* sp., um microrganismo alcalófilo e termofílico, Anish *et al.* (2007) realizaram experimentos de biopolimento e re-deposição, constatando que esta enzima se apresenta efetiva para o tratamento dos jeans, não ocorrendo a re-deposição de corante, sendo a enzima ativa mesmo em condições não tamponadas.

[0011] A utilização de enzimas de fungos do gênero *Penicillium* para a bioestonagem e biopolimento de tecidos se apresenta como uma excelente alternativa às enzimas produzidas por fungos de outros gêneros como *Trichoderma* e *Humicola*, as quais são comercializadas em grande escala. Desta forma, um mutante de *P. occitanis* (Pol6), que secreta um conjunto de enzimas com alta atividade, foi avaliando quanto às atividades de biopolimento e bioestonagem de tecidos. Os resultados demonstraram que o conjunto de enzimas secretadas pela linhagem Pol6, apresenta alta atividade sobre os tecidos tratados, sendo seu efeito abrasivo muito uniforme e com eficiência comparável à obtida com enzimas comerciais.

[0012] Celulases de *Acrophialophora nainiana* e *Penicillium echinulatum* foram utilizadas no acabamento de tecidos de malha de algodão (*stonewashing*) e comparadas com os tratamentos enzimáticos utilizando celulases de *Trichoderma reesei*. Ambas as celulases testadas reduziram a tendência de remoção das fibras (*Pilling*) com uma menor perda de peso. Celulases produzidas por *P. echinulatum* apresentaram melhores resultados para a remoção da cor e uma menor redeposição dos corantes (*stonewashing*), quando comparado às outras enzimas testadas, sob as condições de ensaio. (Rau *et al.*, 2008).

[0013] Um outro emprego para as celulases na indústria têxtil está relacionado à remoção de parte da celulose que compõe os tecidos ditos mistos, onde as proporções de fibras naturais e artificiais são variáveis. A remoção de parte das fibras de celulose resulta em um tecido mais macio e de melhor aspecto. Vasconcelos & Cavaco-Paulo (2006) estudaram a combinação de diferentes ações para a remoção de parte da celulose que compõe estes tecidos. O resultado de seus estudos aponta para uma combinação de ações entre efeitos mecânicos e enzimáticos, sendo possível tornar os tecidos mais macios e resistentes, evitando o seu desgaste excessivo. Esta metodologia, comparada à tradicional, que utiliza ácido para remover estas fibras, se demonstra menos abrasiva.

[0014] Utilizando diferentes enzimas para realizar o biopolimento de tecidos de poliéster e mistos de algodão/poliéster, McCloskey & Jump (2005) relatam a utilização de duas cutinases distintas e a associação entre cutinases e celulases compatíveis na proporção de 50/50. Os resultados demonstraram que 100% dos tecidos de poliéster e poliéster/algodão podem ser tratados com estas enzimas isoladas, ou em conjunto, resultando em um excelente acabamento, sendo esta metodologia uma possível alternativa aos processos químicos e mecânicos utilizados atualmente nas indústrias.

[0015] Novas metodologias estão sendo testadas para o tratamento de tecido de algodão, utilizando o extrato total contendo as celulases de *Trichoderma*

reesei. Os tratamentos são realizados em duas etapas, variando-se a temperatura, quantidade de enzima, bem como agitação e tempo de tratamento. Com esta metodologia se observa uma diminuição no peso das amostras e um aumento na taxa de hidrólise, quando comparado a processos que não utilizam duas etapas de tratamento (Schimper *et al.*, 2008).

[0016] Com base nestes dados, podemos constatar que o mercado de celulases apresenta-se altamente promissor para a utilização dessas enzimas em processos têxteis. Desta forma, cria-se um ambiente favorável ao desenvolvimento de tecnologias que visem ao fornecimento dessas enzimas em larga escala e em elevado grau de pureza para as indústrias tais como a têxtil e a de papel, que têm seu processo produtivo encarecido pela importação desses insumos.

[0017] No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

[0018] O documento EP 1 700 524 descreve novas enzimas celulases e sistemas para sua expressão, especialmente a clonagem e expressão de proteínas celulases truncadas ou derivadas dos filamentos do fungo *Trichoderma longibrachiatum*, sendo que os transformantes desses fungos expressam novas celulases e seus derivados. Além disso, esse documento cita os vetores de expressão realizados para a formação das enzimas, assim como as células transformadas e o processo de transformação dessas células. A presente invenção difere desse documento por não compreender a modificação genética de *Trichoderma longibrachiatum* para a formação de celulases, mas, sim, o estudo e a utilização de *P. echinulatum* para a formação de celulases, além do uso das mesmas, especialmente para modificação de tecidos, fato não citado no referido documento.

[0019] O documento US 5,650,322 descreve métodos para bioestonagem de tecidos utilizando endoglicanases, especialmente para redução da deposição de corantes durante a bioestonagem de tecidos coloridos compreendendo o tratamento do tecido com uma quantidade efetiva de celulase e utilizando cerca

de 40% de endoglicanase III derivada de *Trichoderma sp.* A presente invenção difere desse documento por não compreender a modificação genética de *Trichoderma* para a formação de celulases, mas, sim, o estudo e a utilização de *P. echinulatum* para a formação das mesmas. A celulase de *P. echinulatum* apresentou desempenho surpreendente quando comparada ao estado da técnica.

[0020] O documento US 6,184,019 descreve celulases e seus genes codificadores, células transformadas, oligonucleotídeos e processo para a produção de celulases. Em especial, as celulases foram originadas em estudos utilizando *Myceliophthora*, *Myriococcum*, *Melanocarpus*, *Sporotrichum* e *Chaetomium*. A presente invenção difere desse documento por não compreender a modificação genética de nenhum dos organismos citados no referido documento para a formação de celulases, mas, sim, o estudo e a utilização de *P. echinulatum* para a formação das mesmas, que possuem seqüências diferentes daquelas citadas no referido documento.

[0021] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0022] Em um aspecto, a presente invenção descreve a clonagem de celulases de *P. echinulatum*, em especial a cepa 9A02S1 (DSM18942), incluindo a descrição de vetores, células, processo de produção, método de expressão, além de uma composição e uso de uma composição compreendendo celulases. Em especial, a presente invenção é nova e tem como principais vantagens a atividade enzimática das celulases obtidas a partir de *P. echinulatum* cepa 9A02S1 (DSM18942), cujo filtrado enzimático é um dos mais ativos comparativamente as celulases conhecidas do estado da técnica, especialmente quando os microrganismos são produzidos com 1% de celulose.

Além disso, a presente invenção descreve a modificação de tecidos utilizando celulases obtidas a partir de *P. echinulatum*, especialmente a cepa 9A02S1 (DSM18942).

[0023] É, portanto, um objeto da presente invenção vetores biológicos heterólogos compreendendo:

a) pelo menos um promotor;

b) pelo menos um material biológico de celulases de *P. echinulatum*, especialmente da cepa 9A02S1 (DSM18942).

[0024] Em especial, as celulases heterólogas de *P. echinulatum* cepa 9A02S1 (DSM18942) compreendem a endoglicanase EGL1, conforme a SEQ ID nº1.

[0025] É um objeto adicional da presente invenção células transformadas compreendendo o material biológico de celulases de *P. echinulatum* cepa 9A02S1 (DSM18942) inserido em pelo menos uma célula-alvo heteróloga.

[0026] É um objeto da presente invenção o método de expressão de celulases compreendendo as etapas de:

a) obter material biológico de celulases de *P. echinulatum*, especialmente da cepa 9A02S1 (DSM18942);

b) inserir o material de a) em pelo menos um vetor biológico heterólogo;

c) contactar o material de b) com meio que permita a modulação da atividade de celulases.

[0027] É um objeto da presente invenção uma composição enzimaticamente ativa compreendendo:

a) material biológico de celulases de *P. echinulatum*, especialmente da cepa 9A02S1 (DSM18942);

b) veículo aceitável.

[0028] Em especial, as celulases heterólogas de *P. echinulatum*, especialmente da cepa 9A02S1 (DSM18942) é a endoglicanase EGL1, conforme a SEQ ID nº1.

[0029] É um objeto adicional da presente invenção o uso da composição em processos industriais. Em especial, processos industriais como biopolimento,

detergentes, preparo de alimentos e quaisquer processos que envolvam celulases, especialmente aqueles relacionados à modificação de tecidos como, por exemplo, bioestonagem e descoloramento de tecidos.

[0030] É um objeto adicional da presente invenção o método de modificação de tecidos compreendendo pelo menos uma etapa de contactar, direta ou indiretamente, uma celulase de *P. echinulatum* com o tecido a ser modificado.

[0031] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0032] A figura 1 mostra a amplificação de fragmento de DNA relativo ao cDNA *egl1* de *P. echinulatum*, analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Linha 1: produto de amplificação obtido a partir do DNA plasmidial contendo o cDNA *egl1* de *P. echinulatum*; Linha 2: Marcador de massa molecular 1Kb *plus DNA ladder* (Invitrogen); Linha 3: Controle negativo da reação (reação sem DNA molde).

[0033] A figura 2 mostra a análise de restrição para confirmação da construção do vetor pPIC9-egl1/P.e em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Linha 1: Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); Linhas 2; 4; 6; 8 Plasmídeo pPIC9-egl1/P.e digerido com as endonucleases de restrição *Xho* I e *Eco* RI, clones 1; 2; 3; 4. Linhas 3; 5; 7; 9: Plasmídeo intacto clones 1; 2; 3; 4.

[0034] A figura 3 mostra a curva de crescimento (□) e atividade enzimática (■) da endoglicanase 1 de *P. echinulatum* produzida por *Pichia pastoris* em sistema heterólogo. Cultivo em frasco agitado a 220 rpm, 27°C, por 120 horas de indução.

[0035] A figura 4 mostra a comparação entre a seqüência EGL1 de *P. echinulatum* e diferentes seqüências de endoglicanases de distintos fungos depositadas em banco de dados do NCBI. Resíduos conservados estão em

box. Os sítios ativos de EGL1 são mostrados em vermelho (resíduos catalíticos, glutamato), azuis (resíduos aromáticos) e verdes (resíduos polares), como descritos para endoglicanases da família GH5. Os números de acesso das sequências são: *Penicillium echinulatum* (este trabalho, FJ998421), *Aspergillus clavatus* (XP_001268256), *Aspergillus fumigatus* (XP_751043), *Aspergillus niger* (XP_001397982), *Aspergillus terreus* (XP_001214181), *Neosartorya fischeri* (XP_001261834), *Penicillium brasilianum* (ACB06750), *Penicillium chrysogenum* (CAP85523), *Thermoascus aurantiacus* (AAL88714). (eg, Sakon *et al.*, 1996; Leggio and Larsen, 2002).

Descrição Detalhada da Invenção

[0036] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Material biológico

[0037] O material biológico útil na presente invenção inclui, mas não se limita a elementos biológicos como DNA, RNAs e/ou proteínas ou peptídeos, inteiros ou parciais, encontrados em células e/ou tecidos e/ou órgãos de um organismo eucarioto e/ou procaríoto.

Celulases de *P. echinulatum*, especialmente da cepa 9A02S1 (DSM18942)

[0038] As celulases de *P. echinulatum* da presente invenção compreendem todo e qualquer material biológico de *Penicillium echinulatum* relacionado a atividade celulolítica. Em especial, as celulases de *P. echinulatum* compreendem a endoglicanase EGL1. Em especial, a expressão *P. echinulatum* pode ser entendida pela espécie *P. echinulatum* cepa 9A02S1 (DSM18942).

Vetores Biológicos

[0039] Os vetores biológicos da presente invenção compreendem quaisquer organismos que possam ser geneticamente modificados a fim de inserir em sua seqüência e/ou em seu interior material biológico heterólogo. Em especial, os

vetores biológicos da presente invenção compreendem vetores de clonagem, expressão e/ou transporte. Os vetores biológicos heterólogos da presente invenção compreendem:

- a) pelo menos um promotor;
- b) pelo menos um material biológico de celulasas de *P. echinulatum*.

[0040] Os vetores biológicos da presente invenção compreendem quaisquer organismos cujo com material biológico de *P. echinulatum* foi contactado/inserido, excluindo ele próprio. Em especial, na presente invenção foi construído um vetor de expressão para o organismo *P. pastoris*.

[0041] O promotor da presente invenção é qualquer seqüência capaz de promover a expressão de celulasas de *P. echinulatum* e/ou seus fragmentos em uma célula.

Células transformadas

[0042] As células transformadas da presente invenção compreendem:

- a) obter material biológico de celulasas de *P. echinulatum*;
- b) inserir o material de a) em pelo menos uma célula-alvo heteróloga.

Processo de produção de celulasas

[0043] O processo de produção de celulasas da presente invenção compreende as etapas de:

- a) obter material biológico de celulasas de *P. echinulatum*;
- b) inserir o material de a) em pelo menos um vetor biológico heterólogo;
- c) contactar o material de b) com meio que permita a produção de celulasas.

[0044] Os meios da presente invenção compreendem meios de cultura e/ou dispositivos e/ou métodos que permitam a produção de material biológico de celulasas.

Composição enzimaticamente ativa

[0045] A composição enzimaticamente ativa da presente invenção compreende uma composição compreendendo:

- a) material biológico de celulasas de *P. echinulatum*;

b) veículo aceitável;

inserida em uma outra composição qualquer que necessite de atividade enzimática celulolítica como, por exemplo, mas não se limitando a, detergentes, composições cosméticas, entre outras.

Veículo aceitável

[0046] O veículo aceitável da presente invenção compreende qualquer formulação contendo excipientes e carreadores farmacologicamente aceitáveis bem conhecidos por técnicos no assunto, que permitam o desenvolvimento de composições convenientes para uso industrial.

Uso da composição

[0047] É um objeto adicional da presente invenção o uso da composição em processos industriais. Em especial, os processos industriais compreendem processos como biopolimento, detergentes, preparo de alimentos e quaisquer processos que envolvam celulasas, especialmente aqueles relacionados à modificação de tecidos como, por exemplo, bioestonagem e descoloramento de tecidos.

Método de modificação de tecidos

[0048] É um objeto adicional da presente invenção o método de modificação de tecidos compreendendo pelo menos uma etapa de contactar, direta ou indiretamente, uma celulase de *P. echinulatum* com o tecido a ser modificado.

[0049] A modificação de tecidos da presente invenção envolve quaisquer processamentos dos tecidos como, por exemplo, bioestonagem, bioacabamento (*biofinishing*), controle de deposição de tintas, entre outros, bem como a mistura dos mesmos.

[0050] A modificação de tecidos compreende o uso de enzimas, como celulasas, em processos de descoloramento de tecidos. Uma das enzimas compreendidas na presente invenção capaz de realizar a modificação de tecidos é a celulase endogliconase EGL1 que trabalha em pH alcalino, dispensando a necessidade do ajuste do pH das lavanderias e não causando a redeposição de corantes nos tecidos.

Exemplo 1 – Realização preferencial

1.1 Microrganismos utilizados

1.1.1 Linhagem de *Penicillium echinulatum*

[0051] A cepa 9A02S1 (DSM18942) de *P. echinulatum*, utilizada neste trabalho, foi obtida a partir de uma cultura da linhagem selvagem 2HH, tratada com peróxido de hidrogênio e 1,2,7,8-diepoxiocetane, utilizando como fator de seleção a resistência ao fungicida benomil.

1.1.2 Linhagens de Levedura *Pichia pastoris*

1.1.1.1 *Pichia pastoris* linhagem GS115 (Invitrogen) – *his4*.

[0052] As linhagens *his4* possuem uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) que permitir a seleção do vetor de expressão contendo o gene *HIS4* funcional após transformação.

1.1.1.2 *Pichia pastoris* linhagem SMD 1168 (Invitrogen) – *his4, pep4*

[0053] As linhagens *his4, pep4* possuem uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) e uma mutação no gene que codifica para proteinase A (*PEP4*), permitindo a seleção do vetor de expressão contendo o gene *HIS4* após transformação, sendo protease deficiente.

1.1.3 Linhagens de *Escherichia coli*

[0054] As linhagens bacterianas utilizadas para manipulação de DNA foram DH5- α e XL1Blue (Tabela 1). Tanto as células hospedeiras quanto as transformadas foram cultivadas em meio LB (Item: 4.2.3.1) e estocadas a -80 °C, em glicerol 35%.

Tabela 1. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

Linhagem	Genótipo	Fornecedor
DH5- α	<i>EndA1 recA1 hsdR17 supE44 gyrA96 thi-1 relA1 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15)</i> Tet ^r Δ <i>emcrA</i> 183	Stratagene
XL1 Blue	<i>Δ183 183 $\epsilon$$\delta$$\Sigma$MP-$\mu$rr)173 <i>recA1 envA1 γppA96 τηt-1 η σδρ17 συπE44 <i>relA1 lacZ</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔproAB lacZ</i> (Tet^r)]</i></i>	Stratagene

1.2 Meios de cultura e soluções

[0055] Todos os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo de microrganismos foram confeccionados com água destilada e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos a 1 ATM a menos que especificado outro método.

1.2.1 Soluções e meios para cultivo de fungos filamentosos

1.2.1.1 Meio para indução de celulasas de *P. echinulatum* (MPIC)

BCA ou BMS	0,1% (p/v)
Peptona	1,0 g
Tween 80	1,0 mL
Meio de sais (M9) A	q.s.p 1000 mL

Ajustar pH para 7,0

(BCA) Bagaço de cana explodido a vapor

(BMS) Bagaço de cereal moído

1.2.1.2 Meio para produção de micélio *P. echinulatum* (MPM)

Extrato de levedura	5,0 g
Peptona	2,0 g
Glicose	10,0 g
Meio de sais (M9) A	q.s.p 1000 mL

Ajustar pH para 7,0

1.2.1.3 Meio BDA para crescimento e produção de esporos de *P. echinulatum*

BDA	37 g
H ₂ O	q.s.p 1000 mL

1.2.1.4 Solução de Elementos Traço

KCl	26 mg
CuSO ₄ -5H ₂ O	400 mg
FeSO ₄ -7H ₂ O	714 mg
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	800 mg
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8 mg
H ₂ O	q.s.p 1000 mL

pH ajustado para 2,0

1.2.1.5 Solução de Sais

Na ₂ B ₄ O ₇ -10H ₂ O	40 mg
MgSO ₄ -7H ₂ O	10 g
KH ₂ PO ₄	76 g
Sol. Elementos Traço	50 mL
H ₂ O	q.s.p 1000 mL

1.2.2 Soluções e meios para cultivo de leveduras *P. pastoris*

1.2.2.1 Meio YPD (Meio extrato de levedura peptona glicose)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona de caseína	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

1.2.2.2 Meio YPD-Ágar

Meio YPD adicionado de ágar bacteriológico a 2 % (p/v).

1.2.2.3 Meio YPDS-Ágar (Meio extrato de levedura peptona glicose com

sorbitol)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Sorbitol	1 M
Ágar bacteriológico	2 % (p/v)

1.2.2.4 MD (Meio mínimo com glicose)

Biotina	4×10^{-5} %
YNB	1,34 %
Glicose	2 % (p/v)

1.2.2.5 MD-Ágar

Meio MD adicionado de ágar bacteriológico a 2 % (p/v).

1.2.2.6 MM (Meio mínimo metanol)

Biotina	4×10^{-5} %
YNB	1,34 %
Metanol	0,5 %

1.2.2.7 Meio BMGY (Meio complexo tamponado com glicerol)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Tampão fosfato pH 6.0	100 mM
Biotina	4×10^{-5} %
NB	1,34 %
Glicerol	1 %

1.2.2.8 Meio BMMY (Meio complexo tamponado com metanol)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
---------------------	-----------

Peptona de caseína	2 % (p/v)
Tampão fosfato pH 6.0	100 mM
Biotina	4×10^{-5} %
YNB	1,34 %
Metanol	0,5%

1.2.2.9 Meio BMGluY (Meio complexo tamponado com glicose)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Tampão fosfato pH 6.0	100 mM
YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} %
Glicose	2 %

1.2.2.10 Meio MGY (Meio mínimo com glicerol)

Tampão fosfato pH 6.0	100 mM
YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} %
Glicerol	1 %

1.2.2.11 Meio mínimo-Ágar CMC + Metanol (Detecção de atividade em placa, *P. pastoris*)

Biotina	4×10^{-5} %
YNB	1,34 %
Metanol 100%	0,5 %
CMC low viscosity (Sigma)	1% (p/v)

1.2.3 Meios e soluções para cultivo de *Escherichia coli*

1.2.3.1 Meio Luria-Bertani (LB)

Peptona de caseína	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	q.s.p 1000 mL
pH ajustado para 7,2	

1.2.3.2 Meio LB-Ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico 15 g/L

1.2.3.3 Meio SOB

Bacto-Triptona	20,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,5 g
H ₂ O	q.s.p 1000 mL
pH ajustado para 7,2	

1.2.3.4 Meio SOC

SOB	100 ml
Glicose	20,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
MgSO ₄	5,0 mM

As soluções de glicose, MgCl₂ e MgSO₄ foram esterilizadas por filtração em membrana millipore 0,22 µm.

1.2.3.5 Meio 2XYT ou 2YT para o "Screening" do banco cDNA

Peptona de caseína	16 g
Extrato de levedura	10 g
NaCl	5 g
Ágar	15 g

H₂O q.s.p 1000 mL

Ajustar pH 7,2

1.2.3.6 Meio mínimo para bactéria (M9)

Solução A

KH₂PO₄ 15 g

Na₂HPO₄ + 2H₂O 30 g

NaCl 2,5 g

NH₄Cl 5 g

H₂O q.s.p 500 mL

Solução B

Ágar 7,5 g

H₂O q.s.p 450 mL

Soluções suplementares

Glicose 20 % (v/v) (autoclavar)

Cloreto de Cálcio 1 M (esterilizar com filtro 0,22 µm)

Sulfato de Magnésio 1 M (esterilizar com filtro 0,22 µm)

Solução de Tiamina 1 % (v/v) (esterilizar com filtro 0,22 µm)

[0056] Após autoclavadas as soluções A e B, são misturadas na proporção de 50 mL da solução A para 450 mL da solução B. Quando a temperatura da mistura chegar a aproximadamente 60°C, adicionar as soluções suplementares (5 mL glicose; 50 µL cloreto de cálcio; 500 µL de sulfato de magnésio; 250 µL de tiamina).

1.2.3.7 Solução IPTG 1M (Estoque)

IPTG	1,226 g
H ₂ O	q.s.p 3 mL

1.2.3.8 Solução X-gal 2% (481 mM)

X-gal	0,2 g
Dimetilformamida	10 mL

Adicionar 500µL desta solução a 200 mL de meio de cultura resfriado (cerca de 45°C).

1.2.3.9 Solução de ampicilina 50 mg/mL (Estoque)

Ampicilina	0,5 g
H ₂ O	q.s.p 10 mL

[0057] Dissolver 0,5 g de ampicilina em 7 mL de H₂O, (poderá ser necessária a adição de algumas gotas de NaOH, para auxiliar a diluição) posteriormente, completar para 10 mL com H₂O destilada e homogeneizar, esterilizar por filtração em membrana milipore 0,22 µm. Estocar a -20°C.

1.2.3.10 Solução de Vermelho do Congo 1% “Congo Red” (Estoque)

Congo red	5 g
H ₂ O	q.s.p 500 mL

1.2.4 Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinante

1.2.4.1 Soluções para a extração de DNA plasmidial (mini-preparação)

1.2.4.2 Solução 1 (Tampão Tris - EDTA)

Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
EDTA	10 mM

1.2.4.3 Solução 2 (Solução de Lise alcalina)

NaOH	0,2 M
SDS	1,0 % (p/v)

Preparada no momento do uso.

1.2.4.4 Solução 3 (Solução de Neutralização)

Acetato de Potássio 5 M	60,0 mL
Ácido acético Glacial	11,5 mL
H ₂ O	28,5 mL

1.2.4.5 Solução de lise (Extração de DNA genômico)

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	250 mM
Proteinase K	200 µg/mL
Triton 100X	0,5% (v/v)

1.2.4.6 Tampão de corrida para gel de eletroforese

1.2.4.7 Tampão Tris-Borato EDTA (TEB) 20X

Tris base	1,78 M
Ácido Bórico	1,78 M
EDTA	0,16 M

pH ajustado para 8,4

1.2.4.8 Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 10X

Tris-Acetato	40 mM
EDTA	1 mM

pH ajustado para 8,5

1.2.4.9 Tampão de Amostra (10X) para análise de DNA por eletroforese

TEB 20X	50 % (v/v)
Glicerol	30% (v/v)

Azul de Bromofenol	0,25 % (p/v)
Xilenocianol	0,25 % (p/v)

1.2.4.10 Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante

1.2.4.10.1 Tampão de Amostra para proteína (2x)

Tris-HCl 1 M pH 6,8	200 mM
SDS	4,0% (p/v)
β -Mercaptoetanol	4,0% (v/v)
Glicerol	20,0% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Volume final de 10 mL	

1.2.4.10.2 Acrilamida:Bis-Acrilamida (39:1)

Acrilamida	39 g
Bis-acrilamida	1 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada em frasco escuro a 4°C.

1.2.4.10.3 Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris	18,2 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL
Ajustar o pH com HCl para 8,8	

1.2.4.10.4 Tris-HCl 1 M pH 6,8

Tris	12,1 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL
Ajustar o pH com HCl para 6,8	

1.2.4.10.5 Persulfato de Amônio (P.A.) 10% (P/V)

P.A.	1 g
------	-----

Água destilada q.s.p. 10 mL

1.2.4.10.6 Tampão de Corrida – Tris-Glicina 5x (Estoque)

Tris 16,7 g

Glicina 104,5 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

No momento do uso, foi adicionado SDS para a concentração final de 0,1%.

1.2.5 Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática (DNS)

1.2.5.1 Tampão Tris-HCl 1M pH 7,0 (1M estoque)

Tris 12,1 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

Ajustar o pH com HCl para 7,0

1.2.5.2 Reagente DNS

Ácido Dinitrosalicílico 10 g

NaOH 2M 200 mL

Tartarato de Sódio e Potássio 300 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

[0058] O tartarato de sódio e potássio foi dissolvido em 500 mL de água destilada aquecida e adicionado ao DNS previamente dissolvido em NaOH também aquecido. A solução foi agitada sob aquecimento até ser observada a completa dissolução dos reagentes. O volume foi então completado para 1000 mL com água destilada.

1.3 Marcadores de massa molecular para DNA

1 Kb Plus ladder (Gibco)

1 Kb Plus ladder (Invitrogen)

DNA do fago λ digerido com *Hind* III (Invitrogen)

1.4 Endonucleases de restrição e tampões e de reação

[0059] Foram empregadas diferentes enzimas de restrição fornecidas juntamente com seus tampões otimizados pelos fabricantes. O uso de cada enzima seguiu as instruções de cada fabricante.

1.5 Oligonucleotídios sintéticos

[0060] Os Oligonucleotídios sintéticos utilizados foram confeccionados pela *DNAgency (CA, USA)* e *IDT (Integrated DNA Technologies)*. (Tabela2)

Tabela 2: *Primers* utilizados para amplificação, seqüenciamento, técnica de RACE e clonagem do cDNA de endoglucanase de *P. echinulatum*.

Oligonucleotideo	Seqüência 5' → 3'
Xho1/KexII	CTCGAGAAAAGAGAGGCTCCGCCAGCCTCGCGCTCAATC
End/Eco RI	GAATTCTCACAGACACTGCGAGTAGTAGTC
H2M-F3	ATGCACCAACTACCTGACTC
H2M-R162	ATACCAGTGATGGCACTCTC
H2M-R154	GTAATGACTTTGCCATAGTAGCG
END-189 RACE	AGGCTGCATCCGGGCTAGCAGTC
END-440 RACE	GCGTTCGATGGCGGCCTGAT
M13 forward	GTAACGACGGCCAGT
M13 reverse	AACAGCTATGACCATG
SP6 universal	ATTTAGGTGACACTATAG
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.6. Condições de cultivo de fungos

1.6.1 Cultivo de *Penicillium echinulatum*

[0061] Esporos do fungo *P. echinulatum*, foram obtidos de placas Petri contendo meio BDA (Merck), incubadas por sete dias a 28 °C. Utilizando uma espátula, estes esporos foram raspados com o auxílio de solução salina (0,9%), formando uma suspensão na concentração de $2,2 \times 10^8$ conídios por

mL. Um volume de 300 μ L desta suspensão foi inoculado em 150 mL de meio para a produção de micélio (MPM), obtendo-se uma concentração final de 5×10^6 esporos por mL. Este meio foi incubado por 24 h, 28 °C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, o micélio foi coletado em papel de filtro esterilizado, lavado com água esterilizada e transferido para o meio de indução de celulasas (MPIC), contendo bagaço de cana explodido a vapor como única fonte de carbono, incubado por 19 h, 28 °C com agitação de 200 rpm, visando à indução de diferentes genes de complexo lignocelulolítico de *P. echinulatum*.

1.6.2 Cultivo de *Pichia pastoris*

1.6.2.1 Indução e expressão de recombinantes em frasco

[0062] Usando uma colônia isolada, fez-se um pré-pré-inóculo em 25 ml de meio MM em *Erlenmeyer* de 250 mL. Crescidas a 30 °C sob agitação até uma OD_{600} de 2-6 (aproximadamente 16-18 horas). Para o pré-inóculo uma alíquota destas células crescidas (0,5mL) foi inoculado em *Erlenmeyer* de 1L com 100 mL de meio BMGY e crescidos até uma OD_{600} 6 (aproximadamente 18 horas). Posteriormente as células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado. Para o inóculo o número de células foi ajustado para OD_{600} 1 em um volume final de 100 mL de meio de indução BMMY + casaminoácido 1% em *Erlenmeyer* de 1 L. Adicionou-se metanol (100 %) para uma concentração final no meio de cultura de 1 %, a cada 24 horas de crescimento mantendo a indução dos transformantes. A cada tempo de indução foram retirados 2 mL de cada cultura. Após a medição da OD_{600} as células foram centrifugadas e descartadas, sendo o sobrenadante utilizado para medição da atividade enzimática e análise do perfil protéico em gel SDS-PAGE.

1.6.2.2 Otimização das condições de cultivo de *P. pastoris* em frasco.

[0063] Primeiramente foram realizadas fermentações em frasco para se escolher a melhor fonte de nitrogênio entre YNB e uréia (na mesma

concentração), sendo utilizadas as mesmas condições de indução em frasco descritas anteriormente.

[0064] Para a otimização foi realizado um planejamento fatorial envolvendo três variáveis limitantes no crescimento e na produção da proteína heteróloga – densidade celular inicial (OD_{600}), concentração de fonte de nitrogênio e concentração do indutor metanol. Estes fatores limitantes foram variados em três distintas concentrações na formulação do meio BMMY. Como ponto central para validação estatística, foi formulado um meio onde os fatores limitantes são a média da soma das concentrações extremas das variáveis limitantes utilizadas. Duas repetições de cada tratamento foram realizadas e quatro repetições do ponto central. As condições foram variadas nas faixas especificadas na tabela 3. Foi escolhido para cada variável dois valores extremos (um máximo e um mínimo) e determinou-se o ponto central de cada fator. A variável escolhida como resposta da produção enzimática foi a atividade enzimática após 72 horas de indução. Os experimentos foram conduzidos em 25 mL de meio em *Erlenmeyers* de 250 mL. Após o crescimento do pré-inóculo em meio BMGY por 24 horas, as células foram medidas (OD_{600}), centrifugadas e resuspensas em meio BMMY com as devidas modificações propostas pela otimização. O cultivo foi realizado em agitador orbital a 220 rpm e temperatura de 30 °C.

Tabela 3. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2^3) para otimização da produção enzimática.

Fatores	Nível Inferior (-1)	Nível Intermediário (0)	Nível Superior (+1)
% Metanol	0,5	0,75	1
OD_{600} inicial	1	5,5	10
% Fonte de Nitrogênio	1,34	2,68	4,02

1.7. Obtenção dos RNAs Total e Mensageiro (*P. echinullatum*)

[0065] Decorrido o tempo necessário para a indução, o micélio foi coletado por filtração, sendo o RNA total extraído empregando-se o reagente TRIzol® (GibcoBRL) de acordo com as instruções do fabricante, posteriormente tratado com DNase I (Promega). A amostra obtida foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, para verificação de sua integridade e quantificada em espectrofotômetro *GeneQuant* (*Biochrom*). A fração Poli - A⁺ foi purificada utilizando-se o Kit *Micro-FastTrack™ 2.0 Kit* (Invitrogen), por cromatografia em coluna de oligo (dT) celulose, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, essa fração foi precipitada pela adição de acetato de sódio e etanol absoluto e coletada por centrifugação, sendo sua integridade verificada em gel de agarose 0,8%. Toda a manipulação foi realizada em condições livres de RNases.

1.8 Obtenção das moléculas de cDNA

[0066] Para a síntese das moléculas de DNA complementares a partir dos mRNAs obtidos foi utilizada a técnica de transcrição reversa. Brevemente, as amostras de mRNA foram misturadas a oligonucleotídeos poli-T (iniciadores de polimerização), 500 µM de cada dNTP (dATP; dCTP; dTTP; dGDP), tampão de reação específico para a enzima MML-V (*Gibco BRL*) e incubadas a 37 °C por uma hora. Em seguida o sistema foi tratado com duas unidades de RNase H a 37 °C por 20 min. Posteriormente, uma alíquota da reação foi submetida à reação de polimerização em cadeia (PCR) típica, empregando-se como iniciadores oligonucleotídeos poli-T e uma mistura de hexanucleotídeos.

1.9 Construção da Biblioteca de cDNA

[0067] Para a construção de uma biblioteca de expressão com as moléculas de cDNA obtidas no item anterior, foi utilizado o kit "*SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning*" (Invitrogen), segundo instruções do fabricante, utilizando o plasmídeo

pSPORT1, sendo o cDNA clonado nos sítios de *Sal* I/*Not* I. O sistema de ligação foi transformado por eletroporação utilizando células de *E. coli* XL1 Blue e DH5- α .

1.10 Plasmídeos utilizados

1.10.1 Plasmídeo pSPORT 1 (Invitrogen)

[0068] Para a clonagem dos cDNAs e manipulação dos genes de interesse foi utilizado o plasmídeo pSPORT1. Esse plasmídeo de 4,1 kb possui o gene de resistência à ampicilina como marca de seleção, promotor induzível do gene *lac* (*lacZ*), por 1mM de Isopropiltio- β -galactosídeo (IPTG), origem de replicação oriundo do plasmídeo pUC. Apresenta a seqüência do gene *lacOPZ*, que possibilita a seleção branco/azul e as seqüências M13 (para anelamento dos oligonucleotídeos universal e reverso) flanqueando o sitio de policlonagem. A primeira seleção dos clones recombinantes foi realizada pela detecção de atividade de β -galactosidase, na presença de X-gal e IPTG em placa de Petri.

1.10.2 Plasmídeo pPIC9 (Invitrogen)

[0069] Utilizado para construção do vetor de expressão e vetor controle negativo para integração e/ou recombinação em *P. pastoris*. Esse plasmídeo de 8 kb possui o gene de resistência à ampicilina como marca de seleção para bactérias e o gene *HIS4* como marca de seleção para levedura, promotor induzível do gene *AOX1*, ativado por metanol, origem de replicação para *E. coli* pBR322 e origem de replicação para Bacteriófago f1, terminador e sinal de poliadenilação do gene *AOX1*, sinal de secreção da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fator α), flanqueando o sitio de policlonagem. Possui as seqüências para anelamento de oligonucleotídeos 5'*AOX1* e 3'*AOX1*.

1.10.3. Plasmídeo pGEM-T (Promega).

[0070] Utilizado para clonar os produtos de PCR para análise, seqüenciamento e classificação do cDNA *egl1*. Esse plasmídeo de 3 kb possui o gene de

resistência à ampicilina como marca de seleção, origem de replicação do fago F1, parte do gene lacZ que codifica o fragmento amino terminal da enzima β -galactosidase, sítio múltiplo de clonagem e os promotores T7, SP6 e M13 Universal e M13 Reverso, flanqueando a região de clonagem.

1.11 Transformação de células bacterianas

1.11.1 Transformação de células de *E. coli* por Eletroporação

[0071] Para a eletroporação das células de *E. coli* foi utilizado o aparelho “GENE Pulser II” (Biorad[®]) de acordo com as instruções do fabricante. Os sistemas de transformação foram preparados contendo 100 μ L de células eletrocompetentes e 2 μ L de DNA. Após montado o sistema, este foi transferido para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm), já previamente resfriada. Ajustadas as condições de eletroporação (2,5 KV, 25 μ F, 200 Ω), o sistema foi submetido a um pulso elétrico. Imediatamente após a descarga elétrica foi adicionado 1mL de meio SOC no interior da cubeta e homogeneizado com as células eletroporadas. Esta suspensão foi retirada da cubeta e colocada em um tubo Falcon de 50 mL esterilizado, sendo o processo repetido mais duas vezes, totalizando 3 mL de meio de cultura. As células foram então incubadas por uma hora a 37°C, sob agitação 200 rpm. Decorrido este tempo, as células foram semeadas em placas contendo o meio LB ágar acrescido de ampicilina 200 μ g/mL e incubadas durante a noite a 37 °C. Após este período as células foram coletadas com o auxílio de uma espátula esterilizada e estocadas em glicerol 35 % a -80 °C e ou selecionados distintos clones e extraído seu DNA plasmidial para posterior avaliação.

1.11.2 Transformação de *E. coli* por choque térmico

[0072] Uma alíquota de célula termo competente previamente preparada foi utilizada para cada sistema de ligação. As células foram retiradas do freezer a -80 °C e deixadas no gelo até que descongelassem. Em seguida, foram adicionados 5 μ L do sistema de ligação às células, estas foram novamente

incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a 37 °C, por 5 minutos, novamente incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente foram adicionados 900 µL de meio LB ao sistema que foi incubado a 37 °C por 1 hora. Decorrido este tempo, estas células foram semeadas em 3 placas contendo meio LB-ágar e o antibiótico adequado e incubadas a 37 °C durante a noite.

1.11.3 Transformação de *P. pastoris* por Eletroporação

[0073] Uma colônia da levedura *P. pastoris* foi crescida em 5 mL de meio YPD em *Erlenmeyer* de 125 mL por 24 horas a 30 °C sob agitação (200 rpm). Deste pré-inoculo, cerca de 0,2 mL foram adicionados a 100 mL de meio YPD e crescidos durante a noite até atingirem uma OD₆₀₀ entre 1,3 e 1,5. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 x g por 5 min a 4 °C e ressuspensas em 100 mL de água estéril gelada (4 °C). Este procedimento foi novamente repetido sendo as células ressuspensas em 50 mL de água estéril gelada. Após esta última centrifugação, as células foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1M gelado. Novamente centrifugado (mesmas condições anteriores), as células foram ressuspensas em 0,8 mL de sorbitol 1M gelado, e mantidas no gelo até o momento do uso. Para a eletroporação, 80 µL das células foram misturadas com 5-10 µg do DNA plasmidial (previamente linearizado) e 320 µL de sorbitol 1M gelado. A suspensão é então transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada. As células foram eletroporadas nas seguintes condições para o eletroporador da BioRad “GENE Pulser II” (BioRad®): 7,5 KV/cm, 25 µF e 400 Ω. O tempo de eletroporação foi de aproximadamente 10 ms. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol (1M) gelado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo de *Eppendorff* de 1,5 mL estéril. As células foram espalhadas em placa de Petri previamente preparadas com meio de cultura MD sem histidina para seleção dos transformantes com o vetor contendo a marca auxotrófica *HIS4*. Finalmente, as placas foram incubadas a 30 °C até o aparecimento de colônias

recombinantes, em geral em torno de 48 horas.

1.12 Seleção de clones com atividade celulolítica (bactéria) (*Screening* primário)

[0074] Para uma varredura inicial, uma alíquota das células armazenadas a -80°C foi descongelada e semeada em placa para *Screening* de 22 x 22 cm, contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina 200 µg/mL, X-gal e IPTG 1mM/mL, sendo incubadas durante a noite. A seleção foi realizada pela distinção do fenótipo das células crescidas entre brancas e azuis.

1.13 Seleção de clones com atividade celulolítica em placas *deep well* (96 *Well*) (*Screening* de levedura) (Boettner *et al.*, 2002)

[0075] Em uma placa de *deep well* foram adicionados 800 µL de meio BMGY a cada poço, e em cada um deles foi inoculada uma colônia escolhida aleatoriamente das placas de transformação. A placa foi vedada com filme adesivo plástico e incubada em *shaker* a 30 °C e 200 rpm. Após três dias a placa foi centrifugada a 1280 x *g* por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Foram adicionados a cada poço 800 µL de meio BMMY + 0,5% (V/V) metanol 100%. A placa foi novamente fechada com o adesivo plástico e incubada em *shaker* nas mesmas condições descritas anteriormente por mais 72 horas. Foi adicionado metanol para uma concentração final de 0,5 %, a cada 24 horas as culturas. Decorrido este tempo estas foram centrifugadas a 1280 x *g* por 10 minutos, uma alíquota de 50µL do sobrenadante de cada transformante foi retirada para análise da atividade.

1.14 Extração de DNA plasmidial em pequena escala para seqüenciamento. (Bactéria)

[0076] Selecionados diferentes clones de interesse se procedeu a extração do seu DNA plasmidial para posterior seqüenciamento. Para tanto os clones foram incubados em 4 mL de meio LB, acrescido de ampicilina 200 µg/mL, por 16 h,

37°C a 200 rpm. Posteriormente o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit “*Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System*” (Promega™), conforme especificações do fabricante.

1.15 Seqüenciamento e análise das seqüências de DNA

[0077] As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático *MegaBACE 1000* (Molecular Dynamics). Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles dos *primers* apropriados e o kit “*DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing*”(MJ Research, INC). Os DNAs utilizados no seqüenciamento foram quantificados por espectrofotometria utilizando o *GeneQuant* (Biochrom) e analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etideo (EtBr) 0,3 µg. A qualidade das seqüências obtidas na reação de seqüenciamento automático foi analisada utilizando-se as ferramentas de bioinformática: PHRED; Cross-match e CAP3, disponíveis na página: www.unb.br/ib/cel/biomol. Após a análise de qualidade, as seqüências que apresentaram qualidade igual ou superior a PHRED ≥ 20 e tamanho ≥100 nucleotídeos, foram analisadas pelo programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), contra a base de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

1.16 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Método de lise alcalina; caseiro)

[0078] Foi inoculada uma colônia de bactéria em 4 mL de meio LB, contendo ampicilina 200 µg/mL e incubado por aproximadamente 16 a 18 horas a 200 rpm, 37 °C. Posteriormente foi centrifugado 3 mL da suspensão bacteriana (10.000 x g por 2 minutos), descartado o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspenso em 200 µL de solução Tris-EDTA, adicionou-se 360 µL de Solução 2 e homogeneizou-se por inversão, foi adicionado 300µL de Solução 3, misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min, posteriormente foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min, transferido o sobrenadante para outro tubo

contendo 750 µL de isopropanol, novamente homogeneizado por inversão, centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de solução TE. Foi adicionado 2 µL de RNase 4 mg/mL e incubado a 37 °C por 30 min, posteriormente foi adicionado 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e misturou-se por inversão. Após nova centrifugação a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 750 µL de etanol 100% gelado. Após inversão por várias vezes, o tubo foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min, descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado pela adição de 500 µL de etanol 70%, centrifugado novamente a 10.000 x g por 10 min, descartado o sobrenadante, sendo o *pellet* seco à temperatura ambiente, sendo em seguida ressuspenso em 50 µL de TE ou água ultra pura (Milli-Q).

1.17 Extração de DNA plasmidial em média escala (midi-prep) (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

[0079] Primeiramente um pré-inoculo em meio LB contendo ampicilina 200 µg/mL (5 mL) foi realizado partindo de uma colônia isolada e crescido por 16 horas a 200 rpm, 37 °C. Decorrido este tempo foi realizado o inoculo de 50µL do pré-inoculo em 50 mL meio LB contendo ampicilina 200 µg/mL, em erlenmeyer de 250mL (0,1% do volume final da midi-prep) e crescido entre 16 e 18 horas a 200 rpm, 37 °C. Decorrido este tempo o meio e centrifugado (10.000 x g por 2 minutos), descartado o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspenso em 2mL de solução Tris-EDTA, adicionou-se 3,6 mL de Solução 2 e homogeneizou-se por inversão, foi adicionado 3 mL de Solução 3, misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min, posteriormente foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min, transferido o sobrenadante para outro tubo contendo 7,5 mL de isopropanol, novamente homogeneizado por inversão, centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de solução TE. Foi adicionado 2 µL de RNase (4 mg/mL) e incubado a 37 °C por 30 min, posteriormente foi adicionado 110 µL

de acetato de amônio 7,5 M e misturou-se por inversão (Pode-se optar por utilizar 200 µL de clorofane por 2X + indicado). Após nova centrifugação a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 750 µL de etanol 100% gelado. Após inversão por várias vezes, o tubo foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min, descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado pela adição de 500 µL de etanol 70%, centrifugado novamente a 10.000 x g por 10 min, descartado o sobrenadante, sendo o *pellet* seco à temperatura ambiente, sendo em seguida ressuspenso em 50 µL de TE ou água ultra pura (Milli-Q).

1.18 Análise de Ácidos Nucléicos por eletroforese em Gel de Agarose (Sambrook *et al.*, 2001)

[0080] A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação da qualidade do DNA e ou RNA. A agarose foi preparada em concentrações adequada (por exemplo 0,8% (p/v)) em tampão de corrida TEB 1X ou TAE 1X. Como marcadores moleculares para DNA foram utilizados 1 kb ladder (INVITROGEN) e ou DNA de fago λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III (λ *Eco* / *Hind*) ou apenas *Hind* III (λ *Hind*).

1.19 Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

[0081] Após digestão dos plasmídios com as enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos de DNA e cDNA contendo as seqüências de interesse foram aplicados em gel de agarose 0,8% e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando-se o kit “*Wizard®SVGEL and PCR Clean-Up System*” (Promega), conforme as especificações do fabricante.

1.20 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

[0082] Para a amplificação de DNA por meio de PCR os sistemas foram montados com um volume final de 50µL, como descrito: cerca de 10 ng de

DNA genômico como molde (ou cerca de 0,1-1 ng de DNA plasmidial), 0,2 mM de cada um dos iniciadores, 0,2 mM de uma solução de dNTPs; tampão de *Taq* DNA polimerase para uma concentração final de 1X, cloreto de magnésio (na concentração ótima para cada par de oligos), 2 U de *Taq* DNA polimerase).

[0083] Os sistemas de amplificação foram homogeneizados e posteriormente recobertos com 20 µL de óleo mineral. Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador *Minicycler MJ Research*, modelo PTC-150. A amplificação foi executada por 35 ciclos onde o DNA foi desnaturado a 94 °C por 1 min, anelado a temperatura ideal para cada par de oligonucleotídeo por 1 min e alongado a 72 °C por 2 min. Após a amplificação, cerca de 1/5 do sistema de reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

1.21 Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)

[0084] Os sistemas de ligação foram montados de modo que a razão molar entre vetor e inserto ficasse entre 1:3 e 1:8. A enzima T4 DNA Ligase foi utilizada com os tampões de reação fornecidos pelos fabricantes. Os sistemas foram incubados a 4°C por pelo menos 14 h antes de serem utilizados para transformação de bactérias.

1.22 Preparo de células Bacterianas competentes

1.22.1 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico (CaCl₂)

[0085] O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por Cohen (1972) com algumas modificações. As células da linhagem de *E. coli* desejada foram crescidas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 10 mL de CaCl₂ 100 mM estéril e gelado. Em seguida as células foram

submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram aliquotadas em tubos *Eppendorff* (80 ou 100 µL/tubo) e estocadas a -80 °C.

1.22.2 Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação.

[0086] O preparo de células de *E. coli* competentes para eletroporação foi realizado inoculando-se uma colônia isolada da bactéria em 50mL de meio SOB e crescidas durante a noite a 37°C e 250 rpm. Em seguida 500 µL da cultura foram inoculados em 200 mL de meio SOB, seguindo-se de incubação nas mesmas condições descritas anteriormente até uma OD₆₀₀ de 0,8. Posteriormente as células foram centrifugadas a 3.000g durante 10 min a 4°C, o sedimento foi ressuscitado em 40 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ao final, as células foram ressuscitadas em 1 mL de glicerol 10% e alicotadas em volumes de 100 µL e estocadas a -80°C.

1.23. Caracterização bioquímica da enzima EGL1

1.23.1. Diálise e liofilização do sobrenadante

[0087] Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido a diálise, para a remoção de sais e açúcares presentes no meio de cultura, em sacos de celulose (Dialysis tubing – Sigma) que retém proteínas maiores que 12 KDa. A diálise foi feita contra água destilada a temperatura de 4 °C. Na primeira hora do processo a água foi trocada a cada 30 minutos e depois a cada hora durante 6 horas. Os sacos de diálise das amostras contendo a endoglicanase foram trocados a cada três horas para evitar a dissolução dos mesmos devido a atividade da endoglicanase. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante dialisado foi utilizada para determinação da atividade enzimática. O restante desse sobrenadante foi alicotado em volumes de 1 mL em eppendorf de 1,5 mL e concentrado por liofilização. O material liofilizado foi ressuscitado em água destilada em 1/100 do volume inicial e utilizado nos testes posteriores.

1.23.2. Ensaio enzimático

[0088] A atividade de endoglicanase 1 foi determinada por ensaio colorimétrico de detecção açúcares redutores geradas pela hidrólise do substrato carboximetilcelulose (CMC low viscosity – Sigma). Para a detecção de açúcares redutores em solução utilizado o reagente DNS - ácido dinitrosalicílico - (Miller, 1959), com modificações. Os ensaios de atividade de EGL1 foram realizados nas seguintes condições: 50 µL de CMC 2 % (p/v), em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7 e 50 µL de amostra contendo a enzima. A mistura foi incubada a 60 °C por 30 min e em seguida adicionou-se 300 µL de reagente DNS. As amostras foram fervidas por 10 minutos e após o resfriamento a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III. As leituras de absorbância foram convertidas em quantidade de equivalente de glicose, por meio da curva de calibração obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações de glicose (10 a 100 µg) com o reagente DNS. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco de leitura no aparelho a solução contendo o tampão de reação 50 µL e 50 µL substrato (CMC 2%); tratados como descrito anteriormente. Como controle da concentração inicial de açúcares redutores no meio de cultivo, o tampão da enzima foi aquecido por 30 min a 60°C e posteriormente adicionado de 50 µL da amostra contendo a enzima e 300 µL de DNS, seguido de 10 min de fervura. Uma unidade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 µmol de equivalente de glicose por minuto de reação.

1.23.3 Atividade enzimática em diferentes valores de pH

[0089] O efeito da variação do pH na atividade enzimática foi avaliado realizando-se os ensaios com 50 µL de tampão em diferentes valores de pH (100 mM concentração final) e 50 µL de sobrenadante de cultura contendo a enzima de interesse, na temperatura de 50 °C por 30 minutos (Tabela 4).

Tabela 4. Composição dos tampões utilizados no ensaio de atividade em

diferentes pH (Estoque)

Tampão	pH
Citrato de Sódio 0,5 M	2,0
Citrato de Sódio 0,5 M	3,0
Acetato de Sódio 0,5 M	4,0, 5,0 e 6,0
Tris-HCl 0,5 M	6,0 e 7,0
Tris-HCl 0,5 M	8,0
Tris-HCl 0,5 M	9,0

1.23.4 Atividade enzimática em diferentes temperaturas e estabilidade térmica

[0090] Os ensaios para verificação da influência da temperatura sobre a atividade enzimática foram realizados nas temperaturas de 10, 30, 40, 50, 60 e 70°C por 30 minutos em pH 7,0 (pH ideal da enzima). Para o ensaio de estabilidade térmica alíquotas da enzima foram pré-incubadas nas temperaturas de 50, 60 e 70°C, durante 0, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. A atividade remanescente da enzima foi detectada fazendo-se o ensaio na temperatura e pH ideal da enzima por 30 minutos. A reação era composta por 50 µL da enzima pré-incubada na respectiva temperatura e 50 µL de uma solução de CMC 2% (P/V) em tampão Tris-HCl pH 7,0.

1.23.5 Atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato

[0091] Foram realizados dois ensaios independentes. Em um deles, foram utilizadas as concentrações de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 e 15 mg/mL de CMC. No outro, as concentrações utilizadas foram de 0, 0,50, 0,62, 0,83, 1,25, 2,50 e 5,00 mg/mL de CMC. Os dados obtidos foram utilizados para fazer a curva de velocidade de reação (produto formado por unidade de tempo) por concentração de substrato.

1.23.6 Atividade enzimática sobre diferentes substratos

[0092] A atividade da endoglicanase 1 recombinante foi testada utilizando-se

os substratos celulose microcristalina (Sigmacell tipo 20 - Sigma), papel de filtro (Whatman N° 1), MUC (4-metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo) e pNPC (p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo). Os ensaios com sigmacell e papel de filtro foram feitos medindo-se a quantidade de açúcares redutores produzidos, nas mesmas condições de reação dos ensaios realizados com CMC, que foi substituído por 50 μ L de solução sigmacell 2% (p/v) e por uma tira de 6 cm X 0,5cm de papel de filtro, respectivamente. No ensaio com sigmacell, os tubos foram agitados a cada 15 minutos, para manter o substrato em suspensão.

[0093] O ensaio com pNPC foi realizado adicionando-se 50 μ L de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 5,0, 200 μ L de água e 125 μ L de amostra contendo atividade de endoglicanase a 125 μ L de pNPC 2 mM. O sistema foi incubado por 1 hora a 40 °C e em seguida foram adicionados 500 μ L de acetato de sódio 1 M pH 9,0, para parar a reação. O ensaio com MUC foi realizado utilizando 250 μ L de MUC 2 mM, 50 μ L de tampão acetato de sódio 0,5 M e 200 μ L de amostra contendo a enzima recombinante e incubados a 40 °C por uma hora. A atividade enzimática foi detectada pela emissão de fluorescência ao incidir luz ultravioleta sobre os tubos contendo a reação.

1.24 Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

1.24.1 Condições de eletroforese em gel de poliacrilamida.

[0094] A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo descrito por Silva-Pereira (2003). Amostras do sobrenadante contendo a enzima recombinante foram concentradas por liofilização e ou precipitação e ressuspenções em tampão de amostra de proteína para um volume final de 20 μ L. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel separador de 12% contendo 0,15% de CMC (p/v) e concentrador de 6%. A eletroforese foi realizada por 8 horas em voltagem de 80 a 250 V. Como marcador de massa molecular para proteínas foi utilizado o “BenchMark Protein Ladder” (Invitrogen).

1.24.2 Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma)

[0095] Após o processo de eletroforese o gel SDS-PAGE 12% contendo 0,15% de CMC (*Low viscosity sodium Salt SIGMA*), foi tratado para revelar a atividade enzimática conforme descrito por Sun *et al.* (2008) (com modificações). O gel foi retirado do sistema de eletroforese e lavado duas vezes em solução de isopropanol 25% em tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 durante 20 minutos, para a remoção do SDS. Para a renaturação da enzima o gel foi lavado com água destilada, e posteriormente incubado em tampão tris-HCL 100 mM pH 7,0 + 5 mM de β -mercaptoethanol (pequenas quantidades auxiliam no dobramento de proteínas complexas) a 4°C durante a noite. Decorrido este tempo é descartado a solução e o gel e lavado em água destilada por duas vezes durante 2 minutos cada. O gel e transferido para uma nova solução tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 e deixado a temperatura ambiente por 2 horas e incubado por mais 3 horas a 60°C em banho pré-aquecido. A atividade enzimática foi detectada corando-se o gel com solução de Congo Red 0,1% (p/v) durante 30 minutos, seguido de lavagem com cloreto de sódio 1 M. Após a detecção da região de degradação do substrato no gel foram adicionados 200 μ L de HCl 0,2 M à solução de NaCl para fixação da cor, permitindo um maior contraste para a visualização da atividade enzimática em gel.

1.24.3 Coloração de gel de poliacrilamida com prata

[0096] Um gel preparado nas mesmas condições descritas anteriormente juntamente com o zimograma foi utilizado para visualização do perfil protéico por coloração com prata. Para tal, foi utilizado o kit “Silver Staining Kit Protein Silver One™” (Amersham Biosciences) conforme especificações do fabricante.

1.24.4 Coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

[0097] Um gel preparado nas mesmas condições descritas anteriormente, foi utilizado para visualização do perfil protéico por coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Após corrida eletroforética o gel foi submerso em solução

corante por 4 hora, sob agitação. Decorrido este tempo o mesmo foi descorado utilizando a solução descorante pelo tempo necessário para a visualização das bandas de proteína.

1.25 Precipitação de proteínas com TCA e acetona

[0098] Um mililitro do sobrenadante das fermentações foi precipitado com 250 μ L de TCA 100 %. Após ser incubado no *freezer* por 3 horas, foi centrifugado a 8000 x *g* por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 1 mL de acetona gelada e novamente centrifugado a 8000 x *g* por 30 minutos. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e ressuspensão em 20 μ L de tampão de amostra 2X. No caso de amostras com o pH ácido (amostra com coloração amarela) acrescentou-se 2 μ L de tris-HCl pH 8,8. As amostras foram estocadas a -20 °C até a análise em gel SDS-PAGE.

Exemplo 2. Resultados

2.1 Obtenção do RNA total e RNA poli (A)⁺

[0099] O fungo *P. echinulatum* foi cultivado em meio para a produção de micélio, coletado em papel de filtro, lavado e inoculado em meio MPIC contendo fonte de carbono específica (BCA) para promover a indução do sistema celulolítico do fungo *P. echinulatum*.

[0100] Decorridas 19 horas de indução, conforme descrito na metodologia, procedeu-se à extração do RNA total. A qualidade e a quantificação do RNA total foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e espectrofotometria (GeneQuant), respectivamente.

[0101] As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando 1 μ L da preparação de RNA. Os dados de absorbância a 260/280nm, que refletem a qualidade da amostra, revelaram que os RNAs obtidos apresentam qualidade adequada para a realização das etapas posteriores. O fracionamento do mRNA foi realizado como descrito em material e métodos utilizando-se RNA total obtido a partir de micélio crescido em meio contendo BCA como fonte de

carbono. Após a extração, o mRNA foi quantificado por espectrofotometria, e apresentou qualidade adequada para a realização dos experimentos.

[0102] Estudos realizados por De-Paula *et al.* (1999, 2003) mostraram que substratos lignocelulósicos complexos, como BCA, são bons indutores de celulases em *Humicola grisea* var. *thermoidea*, sendo utilizado este protocolo para a obtenção do micélio para a extração do RNA total. Outro fato associado à escolha da fonte de carbono, esta relacionado a utilização de BCA para a indução do complexo celulolítico de *P. echinulatum* por outros autores (Camassola *et al.*, IN PRESS; Camassola *et al.*, 2007).

2.2 Construção de Biblioteca de cDNA de *Penicillium echinulatum* sob indução do sistema celulolítico usando BCA como fonte de carbono.

[0103] A biblioteca de cDNA foi construída empregando o Kit “SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (*Invitrogen*). Cerca de 3µg do mRNA obtido conforme descrito acima, foi empregado como molde na síntese da primeira fita de cDNA, sendo esta e as demais etapas realizadas exatamente de acordo com as recomendação do fabricante.

2.3 *Screening* da biblioteca de cDNA de *P. echinulatum*.

[0104] Primeiramente se optou por realizar a seleção de clones positivos pela atividade celulolítica de hidrólise em placa. Uma vez observado a formação de discretos halos de hidrólise em todos os clones inoculados, 48 destes clones foram selecionados ao acaso, para a extração de DNA plasmidial e seu posterior seqüenciamento. De todos os clones seqüenciados, foi possível obter somente quatro seqüências de qualidade (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100 nucleotídeos), sendo que nenhuma destas exibia similaridade com genes de celulases depositados no GeneBank. Duas das seqüências obtidas apresentavam similaridade com uma proteína de choque térmico; outra exibia similaridade com uma ATPase e a última não apresentou similaridade com

qualquer seqüência descrita no banco de dados. Devido ao insucesso da metodologia anterior, foi utilizando a metodologia de hibridação de clones em membrana de nylon para a seleção de clones positivos (*Southern Blot*). Utilizando esta metodologia também não obtivemos êxito na seleção de clones que aportassem genes de celulasas.

[0105] Em função dos resultados obtidos em placas de *screening* e à limitação da metodologia empregada na seleção dos clones, onde celulose microcristalina foi utilizada como substrato, sendo esta altamente insolúvel, somada ao insucesso na utilização das técnicas de *Southern blot*, decidimos optar por uma metodologia alternativa para a seleção dos clones de cDNAs de celulasas. Para tanto, realizamos um *screening* por meio de seqüenciamento aleatório de clones, objetivando além da seleção de clones contendo genes de celulase a construção do transcriptoma parcial do fungo *Penicillium echinulatum*.

2.4 Seqüenciamento automático de clones selecionados aleatoriamente da biblioteca de cDNA de *P. echinulatum*.

[0106] Tendo em vista o pouco conhecimento sobre a Biologia Molecular de *P. echinulatum* e o baixo número de seqüências nucleotídicas descritas para o gênero *Penicillium*, um fungo de grande interesse biotecnológico, iniciamos a caracterização parcial do transcriptoma deste fungo por meio do seqüenciamento automático de clones de uma biblioteca de cDNA, geradas sob condições de indução dos genes celulolíticos.

[0107] A metodologia básica para o plaqueamento da biblioteca, seleção, cultivo dos clones recombinantes (brancos), extração e análise do DNA plasmidial foram exatamente as mesmas previamente descritas em nosso laboratório (Felipe *et al.*, 2005, Procópio, 2006). Uma réplica dos clones a serem seqüenciados foi obtida e mantida como estoque de clones bacterianos em glicerol 35% e armazenada a -80°C.

2.4.1 Geração de *Expressed Sequence Tags* (ESTs).

[0108] A partir do DNA plasmidial extraído, foi utilizado cerca de 200 ng (correspondendo entre 3,5µL a 4µL de cada preparação de DNA plasmidial) para as reações de seqüenciamento, que se procederam conforme descrito anteriormente, utilizando o iniciador M13 reverso. As seqüências obtidas após análise pelo *pipeline* da página do Projeto Transcriptoma de *Paracoccidioides brasiliensis* (<http://adenina.biomol.unb.br>), constituído pelos programas (PHRED, Cross-match e CAP3), foram comparadas pelos programas BLASTN e BLASTX contra a base de dados do NCBI. Foram submetidos ao seqüenciamento automático 12 placas contendo 96 clones de cDNA cada (1152 clones ao todo). Destas apenas 285 seqüências de qualidade foram geradas (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100 nt), correspondendo a 54,67% do total de seqüências geradas. Essa baixa eficiência na geração de seqüências com essa biblioteca deveu-se tanto aos problemas da nossa estrutura de seqüenciamento, bem como a um grande número de DNAs plasmidiais constituídos apenas por vetor sem incerto de cDNA, apesar da seleção prévia de clones brancos.

[0109] Foram geradas 267 ESTs e agrupadas em 37 *contigs*, que apresentam a seguinte composição: *contigs* 23; 24; 30 e 36 constituídas por 2 seqüências; *contigs* 6; 7; 13; 15 e 26, por 3 seqüências; *contigs* 1 e 11 por 4 seqüências; *contigs* 3; 8; 9; 10; 14 e 34, por 5 seqüências; *contigs* 2; 4; 5; 33 e 35 constituídas por 6 seqüências; *contigs* 21 e 22 por 7 seqüências; *contig* 17 por 8 seqüências; *contigs* 16; 18; 27 e 32 por 9 seqüências. *contigs* 12; 20 e 25 constituídas por 10 seqüências; *contig* 31, por 14 seqüências, *contig* 28 por 23 seqüências, *contig* 21 por 19 seqüências, *contigs* 29 e 37 por 16 seqüências. Posteriormente procedeu-se à análise de similaridade destas seqüências em bancos de dados (NCBI) sendo os resultados principais mostrados na tabela 5. Relacionado aos *Singlets* que totalizaram 18, estas seqüências apresentam o seguinte perfil após análise de similaridade: Doze foram identificadas como proteínas hipotéticas; uma como Kinase sub-unidade reguladora (cAMP-

dependente), duas como proteína predita, uma como proteína de citoplasma, uma como proteína (Nop14) rRNA e uma sem similaridade no banco de dados no NCBI.

Tabela 5. Análise de similaridade das *contigs* obtidas após corrido *pipeline* de análise (PHRED; Cross-match e CAP3). As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa BLASTn e BLASTx, contra a base de dados do NCBI. (Seqüências de fungos).

Contigs formados	Blastn nr		Blastx nr	
	Anotação	e-value Porcentagem de cobertura	Anotação	e-value Porcentagem de cobertura
<i>Contig 1</i> (4 <i>ESTs</i>)	Aspergillus niger CBS 513.88 hypothetical protein (An09g00590) partial mRNA	4e-07 75%	hypothetical protein [Laccaria bicolor S238N-H82]	2e-14 52%
<i>Contig 2</i> (6 <i>ESTs</i>)	Aspergillus nidulans FGSC A4 hypothetical protein AN0358.2 partial mRNA	2e-04 72%	extracellular SCP domain protein Pry1 [Aspergillus fumigatus Af293]	3e-25 57%
<i>Contig 3</i> (5 <i>ESTs</i>)	Ustilago maydis 521 hypothetical protein (UM02458.1) partial mRNA	0.10 81%	conserved hypothetical protein [Talaromyces stipitatus ATCC 10500]	5e-04 25%
<i>Contig 4</i> (6 <i>ESTs</i>)	Chaetomium globosum CBS 148.51 hypothetical protein (CHGG_06573) partial mRNA	0,094 78%	hypothetical protein SNOG_07419 [Phaeosphaeria nodorum SN15]	0,16 27%

<i>Contig 5</i> (6 <i>ESTs</i>)	hypothetical protein [<i>Podospora anserina</i> DSM 980]	0,008 89%	hypothetical protein NCU04429 [<i>Neurospora</i> <i>crassa</i> OR74A]	0.30 24%
<i>Contig 6</i> (3 <i>ESTs</i>)	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15 predicted protein (MGG_04105) partial 3. mRNA	3e-45 83%	Stress response RCI peptide, putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	2e-25 94%
<i>Contig 7</i> (3 <i>ESTs</i>)	<i>Penicillium brasilianum</i> strain IBT 20888 endo- 1,4-beta-D-glucanase (cel5c) gene, complete cds	3e-52 67%	cellulase, putative [<i>Aspergillus</i> <i>clavatus</i> NRRL 1]	6e-38 63%
<i>Contig 8</i> (5 <i>ESTs</i>)	<i>Ajellomyces</i> <i>capsulatus</i> NAM1 predicted protein (HCAG_03354) partial mRNA	0,34 88%	histidine kinase [<i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i>]	0,61 25%
<i>Contig 9</i> (5 <i>ESTs</i>)	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 conserved hypothetical protein (AFUA_1G05370)	0,095 92%	SUN domain protein (Adg3), putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	0,61 25%
<i>Contig 10</i> (5 <i>ESTs</i>)	<i>Septobasidium burtii</i> translation elongation factor 1 alpha (TEF1) gene, partial cds	0,006 86%	hypothetical protein MGL_2613 [<i>Malassezia</i> <i>globosa</i> CBS 7966]	0,18 38%
<i>Contig 11</i> (4 <i>ESTs</i>)	<i>Aspergillus terreus</i>	1e-38	conserved	2e-46

<i>ESTs</i>)	NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_01942) partial mRNA	68%	hypothetical protein [Aspergillus terreus NIH2624]	55%
<i>Contig 12</i> (10 <i>ESTs</i>)	Penicillium decumbens strain 114-2 swollenin gene, complete cds	3e-76 81%	swollenin [Penicillium decumbens]	2e-41 91%
<i>Contig 13</i> (3 <i>ESTs</i>)	Coprinopsis cinerea okayama7#130 hypothetical protein (CC1G_09809) partial mRNA	0,74 86%	hypothetical protein SNOG_01444 [Phaeosphaeria nodorum SN15]	1.1 46%
<i>Contig 14</i> (5 <i>ESTs</i>)	potassium channel, putative [Penicillium marneffei ATCC 18224]	1e-37 71%	ion channel, putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]	1e-57 53%
<i>Contig 15</i> (3 <i>ESTs</i>)	Podospora anserina DSM 980 hypothetical protein (PODANSg6691) partial mRNA	0,19 87%	predicted protein [Aspergillus terreus NIH2624]	0,012 28%
<i>Contig 16</i> (9 <i>ESTs</i>)	hypothetical protein [Aspergillus niger CBS 513.88]	0,008 93%	predicted protein [Postia placenta Mad-698-R]	0,009 25%
<i>Contig 17</i> (8 <i>ESTs</i>)	Neurospora crassa OR74A hypothetical protein NCU01791 partial mRNA	0,36 90%	hypothetical protein CHGG_07610 [Chaetomium globosum CBS 148.51]	0,52 29%
<i>Contig18</i> (9	Neurospora crassa	8e-15	thioredoxin,	0,10

<i>ESTs</i>)	OR74A thioredoxin I partial mRNA	38%	putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]	81%
<i>Contig 19 (21 ESTs)</i>	18S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,81 92%	transcriptional regulator, LysR family [Enterocytozoon bieneusi H348]	0,002 30%
<i>Contig 20 (10 ESTs)</i>	Cytochrome b subunit of succinate dehydrogenase, putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]	2e-26 74%	Cytochrome b subunit of succinate dehydrogenase, putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]	9e-14 70%
<i>Contig 21 (7 ESTs)</i>	hypothetical protein [Aspergillus terreus NIH2624]	7e-73 74%	SUN domain protein (Uth1), putative [Aspergillus flavus NRRL3357]	6e-57 72%
<i>Contig 22 (7 ESTs)</i>	Aspergillus terreus NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_05538) partial mRNA	7e-45 45%	integral ER membrane protein Scs2, putative [Aspergillus flavus NRRL3357]	8e-43 51%
<i>Contig 23 (2 ESTs)</i>	Penicillium sp. CCF3812 18S ribosomal RNA gene	0,0 99%	hypothetical protein NCU04867 [Neurospora	0,17 73%

			crassa OR74A]	
<i>Contig 24</i> (2 <i>ESTs</i>)	Soil fungal sp. DM2-454 gene for 28S rRNA, partial sequence	1e-67 100%	unnamed protein product [Kluyveromyces lactis]	9e-11 81%
<i>Contig 25</i> (10 <i>ESTs</i>)	5.8S ribosomal RNA gene Penicillium sp	0,0 100%	Mitochondrial protein of unknown function Saccharomyces cerevisiae	6e-22 76%
<i>Contig 26</i> (3 <i>ESTs</i>)	RING finger protein [Neosartorya fischeri NRRL 181]	4e-12 83%	hypothetical protein AN6609.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]	3e-08 74%
<i>Contig 27</i> (9 <i>ESTs</i>)	Lophodermium indianum; 5.8S ribosomal RNA gene	1,2 100%	membrane transporter [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]	4.3 29%
<i>Contig 28</i> (23 <i>ESTs</i>)	hypothetical protein [Aspergillus niger CBS 513.88]	7e-10 97%	conserved hypothetical protein [Aspergillus flavus NRRL3357]	2e-15 40%
<i>Contig 29</i> (16 <i>ESTs</i>)	Chaetomium globosum CBS 148.51 hypothetical protein (CHGG_07385) partial mRNA	0,34 81%	hypothetical protein AN9135.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]	2e-15 40%
<i>Contig 30</i> (2 <i>ESTs</i>)	hypothetical protein [Chaetomium	0,002 84%	hypothetical protein	5,0 40%

	globosum CBS 148.51]		CHGG_06069 [Chaetomium globosum CBS 148.51]	
<i>Contig 31</i> (14 <i>ESTs</i>)	P.chrysogenum mitochondrion genes	0,0 84%	ATP synthase subunit A; ATPase subunit 6 [Penicillium chrysogenum]	1e-43 90%
<i>Contig 32</i> (9 <i>ESTs</i>)	Podospora anserina genomic DNA chromosome 4	6e-04 82%	hypothetical protein UM02137.1 [Ustilago maydis 521]	9,9 42%
<i>Contig 33</i> (6 <i>ESTs</i>)	hypothetical protein [Aspergillus terreus NIH2624]	7e-149 77%	MFS lactose permease, putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]	1e-98 77%
<i>Contig 34</i> (<i>ESTs</i>)	hypothetical protein [Gibberella zeae PH-1]	2e-61 71%	Formaldehyde dehydrogenase [Schizosaccharo myces pombe]	1e-74 62%
<i>Contig 35</i> (6 <i>ESTs</i>)	Aspergillus clavatus NRRL 1 mitochondrial metallochaperone Sco1 Putative (ACLA_035570), partial mRNA	2e-118 81%	mitochondrial metallochaperone Sco1, putative [Aspergillus clavatus NRRL 1]	2e-86 70%
<i>Contig 36</i> (2	cytochrome P450	3e-09	Aspergillus	4e-05

<i>ESTs</i>)	alkane hydroxylase, putative [Aspergillus clavatus NRRL 1]	81%	clavatus NRRL 1 cytochrome P450 alkane hydroxylase, putative (ACLA_082210), partial mRNA	77%
<i>Contig 37 (16 ESTs)</i>	Aspergillus fumigatus Af293 MFS quinate transporter (AFUA_4G00990), partial mRNA	3e-123 78%	MFS quinate transporter, putative [Aspergillus clavatus NRRL 1]	2e-92 89%

2.5 Obtenção e caracterização do cDNA *egl1* de *Penicillium echinulatum*

2.5.1 Obtenção do cDNA.

[0110] O cDNA *egl1* que codifica a endoglicanase 1 (EGL1) de *Penicillium echinulatum*, foi identificado em uma coleção de ESTs geradas pelo seqüenciamento aleatório de clones de uma biblioteca de cDNA, a qual foi construída a partir de mRNA de *P. echinulatum*, cultivado sob condição de indução do sistema celulolítico.

[0111] Após isolamento do clone de cDNA e da obtenção do respectivo DNA plasmidial, este foi seqüenciado confirmando tratar-se do cDNA de uma endoglicanase de *P. echinulatum*.

[0112] A análise da seqüência obtida revelou que o cDNA *egl1* não se encontrava completo, faltando parte da região relativa ao peptídeo sinal da enzima. O cDNA obtido consiste em 1185pb e codifica uma proteína de 387 resíduos de aminoácidos. Com o intuito de esclarecer este fato, foram realizados alinhamentos múltiplos utilizando a seqüência protéica predita para EGL1 e os melhores *hits* de endoglicanases encontrados no banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Após o alinhamento destas seqüências, foi utilizando o programa *SignalP* (*ExpASy Proteomics tools*

<http://expasy.org/tools>) para a predição da região correspondente ao peptídeo sinal de cada seqüência e sua posterior comparação com a seqüência EGL1 de *P. echinulatum*.

[0113] A análise do alinhamento múltiplo sugere que o peptídeo sinal da seqüência EGL1 não está de fato completo e que a proteína madura provavelmente inicia em dois resíduos de prolina. Os resíduos anteriores às prolinas (QSIRRVLT), são possivelmente parte do peptídeo sinal nativo da endoglicanase de *P. echinulatum*.

[0114] Visando a posterior clonagem do cDNA *egl1* (região correspondente à proteína madura, sem peptídeo sinal) em fase com a seqüência do peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* presente no vetor de expressão para *P. pastoris* pPIC9, iniciadores específicos foram desenhados contendo em suas extremidades sítios para enzimas de restrição apropriadas, além da seqüência de reconhecimento para a clivagem do produto de expressão pela protease KexII de *P. pastoris*. As características destes iniciadores estão descritas na tabela 2. O DNA plasmidial contendo o cDNA *egl1* clonado, foi usado como molde em uma PCR contendo os iniciadores descritos na tabela 2, utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (*Platinum Taq High Fidelity* - Invitrogen) para obtenção de um amplicon compatível para a clonagem no vetor pPIC9. Conforme esperado, o fragmento de DNA amplificado apresentou o tamanho de aproximadamente 1,2 Kb.

[0115] Uma vez que a Taq DNA Polimerase de alta fidelidade gera produtos de amplificação com extremidades abruptas, adicionalmente foi feito o A-tailing no produto de amplificação do cDNA *egl1*. Esse procedimento visa à adição das extremidades de uma adenina necessárias para a clonagem no vetor pGEM-T (Promega). Esta clonagem consiste de uma etapa intermediária que antecede a construção do vetor de expressão para *P. pastoris*. Após a ligação deste inserto no pGEM-T, o produto da ligação foi usado para a transformação de células competentes de *E. coli* (DH5 α).

2.5.2 Características da seqüência de nucleotídeos e da seqüência protéica deduzida do cDNA *egl1* de *P. echinulatum*.

[0116] Após a obtenção do vetor pGEM-T-*egl1*/P.e, o cDNA *egl1* foi novamente seqüenciado e analisado utilizando diferentes ferramentas de Bioinformática, que estão disponíveis em rede no laboratório de Biologia Molecular (UnB) bem como as encontradas na rede mundial de computadores.

[0117] Utilizando estas ferramentas, pode ser identificado um cDNA de 1161pb. A proteína predita EGL1 apresenta 387 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular teórica de 41,1 KDa, ponto isoelétrico teórico de 4,99 e apresenta apenas um sitio potencial de N glicosilação. A proteína predita é formada por três diferentes domínios: um domínio catalítico; um domínio de ligação ao carboidrato (CBD, *Cellulose Binding Domain*) altamente conservado, envolvido na ligação da enzima ao substrato; e uma região de conexão entre os dois domínios anteriores (dobradiça). A análise da seqüência do domínio catalítico de EGL1 sugere que EGL1 de *P.echinulatum*, seja uma endoglicanase alcalina da família 5A de Glicosil hidrolases (EC 3.2.1.4) (Endo-1,4-beta-glicanase). A seqüência de EGL1 de *P. echinulatum* apresenta 78% de similaridade com a proteína de *Penicillium brasilianum*, 66% com *Aspergillus clavatus* NRRL 1 e *Neosartorya fischeri* NRRL 181, 65% com *Aspergillus fumigatus* Af293 e 64% com *Penicillium chrysogenum*. O domínio de ligação ao carboidrato da EGL1 de *P. echinulatum* pertence à família I dos CBDs. O domínio de ligação da EGL1 apresenta 84% de similaridade com o CBD de *Penicillium marneffe* ATCC 18224; *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus clavatus* NRRL 1. Segundo Takada *et al.*, (2002), poucas proteínas da família 5A apresentam o domínio de ligação ao carboidrato.

2.6 Expressão heteróloga do cDNA *egl1* em *Pichia pastoris*

2.6.1 Construção do vetor de expressão

[0118] A utilização de vetores de integração cromossomal são mais desejáveis, devido à baixa taxa de perda do vetor a cada geração,

apresentando uma real importância nos processos industriais para a manutenção de taxas de produção constantes. Os vetores com base no promotor AOX são muito utilizados para dirigir a expressão de diversas proteínas de interesse e podem levar a produção da proteína de interesse a atingir até 30% do total de proteínas expressas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

[0119] Desta forma, para analisar a expressão do cDNA *egl1* de *P. echinulatum* em *P. pastoris* sob controle do promotor induzível AOX1, foi construído o vetor de expressão pPIC9-*egl1*/P.e. O vetor pGEM-T-*egl1*/P.e foi digerido com as enzimas *Xho* I e *EcoR* I e o cDNA *egl1*, previamente purificado, e contendo os mesmos sítios de restrição nas extremidades 5' e 3', foi ligado ao vetor. Posteriormente o vetor construído, pPIC9-*egl1*/P.e, foi digerido com as enzimas *Bgl*II e *Stu*I liberando as seqüências de integração no genoma de *P. pastoris*.

[0120] Após a purificação do vetor linearizado, o mesmo foi ligado ao cDNA *egl1* purificado utilizando a enzima T4 DNA ligase. A clonagem do cDNA *egl1* foi direcionada de modo a entrar em fase com o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* codificado pelo vetor. Após transformação bacteriana (choque térmico), foram selecionados quatro clones transformantes e submetidos à extração do DNA plasmidial. De posse deste DNA, foi realizada uma digestão com as enzimas *Xho*I e *EcoR*I, liberando o fragmento de cDNA correspondente ao cDNA *egl1*. A análise do perfil de restrição comprovou a presença do inserto no vetor de expressão e a integridade do mesmo. Confirmada a clonagem, esse vetor foi denominado pPIC9-*egl1*/P.e.

[0121] Visando a integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris*, o vetor pPIC9-*egl1*/P.e foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl* II ou *Stu* I. A digestão com *Bgl* II promove a liberação do cassete de integração (~6,7 kb) e um segundo fragmento (~2,5kb), correspondente ao restante do vetor. A digestão com *Stu* I serviu para linearização do vetor. Após a digestão, esses fragmentos contendo o cassete de expressão e a marca *HIS4* expõem nas extremidades, seqüências do locus AOX1(*Bgl* II) e seqüências do locus

HIS4 (*Stu I*), para direcionar a integração, que pode ocorrer no *locus HIS4* ou no *locus AOX1* por substituição ou inserção.

[0122] Para controle negativo das análises de expressão da proteína heteróloga, o vetor pPIC9 original foi também digerido com as enzimas *BglII* ou *StuI* e usado para transformação de *P. pastoris*. Foi montado assim um vetor que foi digerido com as enzimas *Stu I* ou *Bgl II* para a transformação das linhagens de levedura denominadas GS115 e SMD 1168. Após a digestão os vetores foram identificados como: pPIC9-egl1/P.e/BglII; pPIC9-egl1/P.e/StuI, pPIC9/int/BglII e pPIC9/int/StuI. Sendo os dois últimos utilizados como vetores para controle negativo (sem o cDNA *egl1*).

2.6.2 Transformação de *P. pastoris* e detecção da atividade enzimática

[0123] As linhagens GS115 e SMD1168 de *P. pastoris* foram transformadas com o vetor de expressão construído anteriormente e devidamente linearizados. Pela presença do gene histinol desidrogenase (*HIS4*) nos vetores pPIC9 que complementam a mutação auxotrófica *his4* das linhagens GS115 e SMD1168, os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo-ágar (MD-ágar) sem histidina. Os controles negativos também foram utilizados para transformar as mesmas linhagens de *P. pastoris*.

[0124] Cada transformação resultou em cerca de 400 transformantes. Para seleção dos clones expressando a enzima EGL1, foram utilizados 96 clones de cada sistema (total de 384 clones avaliados) e submetidos a crescimento em meio líquido em placas *deep well*. Os transformantes foram inoculados em meio contendo metanol (BMMY) onde o promotor *AOX1* é eficientemente induzido. Os transformantes expressando a enzima recombinante foram selecionados pela análise do sobrenadante da cultura após a formação de açúcares redutores utilizando o método de DNS. Dos transformantes testados 100% apresentaram atividade enzimática, porém em níveis variados. A variação na atividade enzimática dos clones transformados com o cassete de

expressão é consistente com o uso de vetores integrativos e ao fato de que os diversos eventos de recombinação que governam a integração genômica das construções recombinantes podem também afetar os níveis de expressão heteróloga e levar a variação clonal. Neste caso, a integração do DNA exógeno pode ocorrer em múltiplas inserções e em diferentes *loci* (AOX1 ou HIS4), devido à organização da cromatina nos sítios de integração (Gerasimova & Corces, 2001).

[0125] Não foi detectada atividade enzimática nos sobrenadantes das culturas dos controles negativos (dados não mostrados). Quatro transformantes (um de cada transformação) dos sistemas de transformação que exibiram as maiores atividades enzimáticas foram analisados quanto a produção enzimática após 48 horas de indução em 25 mL de meio BMMY sob agitação. Como pôde ser observado, o clone C4 da linhagem SMD1168 contendo o plasmídeo pPIC9-egl1/P.e/Stul foi identificado como apresentando a maior atividade enzimática dentre os clones de cada sistema. Este clone passou a ser identificado como C4/SMD1168-egl1/P.e/Stul denominado (C4), que correspondente ao clone com integração do cassete de expressão no locus *HIS4*, do genoma da linhagem protease menos SMD1168 produtor de endoglicanase 1 de *P. echinulatum*, inserido no *locus* de *HIS4*. Posterior a esta identificação, foi realizada a identificação do fenótipo do clone selecionado com relação a utilização de metanol durante os processos fermentativos entre Mut^S (*Metanol utilization slow*) ou Mut^+ (*Metanol utilization plus*), em placas de petry contendo meio (MM) com e sem metanol. O clone selecionado foi identificado como sendo Mut^+ . Foram também realizados testes de estabilidade mitótica sendo o clone considerado estável mitoticamente após a passagem em meio com e sem histidina (marca de seleção do vetor) por 10 vezes, alternadamente. Após a confirmação destes resultados o clone C4/SMD1168-egl1/P.e/Stul, Mut^+ foi utilizado para testes de produção e caracterização enzimática.

[0126] Para a produção enzimática inicial foram realizadas fermentações com o clone selecionado, utilizando protocolo padrão de fermentação para *P.*

pastoris. Foram obtidos títulos de atividade de ~0,06 unidades internacionais por mL de enzima (UI/mL), no sobrenadante da cultura.

2.7 Otimização da produção enzimática (Clone C4/SMD1168-egl1/P.e /Stul).

[0127] A redução de custos na produção enzimática através do melhoramento dos meios de fermentação é uma etapa fundamental visando a aplicação industrial. A otimização é feita, tradicionalmente, variando-se um parâmetro e mantendo os outros constantes. No entanto, esta abordagem consome mais tempo e é incapaz de detectar o melhor meio devido, principalmente, à ausência da análise de interações entre os diferentes fatores (Damaso *et al.*, 2004). Uma das estratégias mais utilizadas para identificar a significância relativa dos parâmetros e encontrar as condições ótimas é baseada em experimentos estatísticos como os planejamentos fatoriais.

[0128] Desta forma, para aumentar a produção e atividade enzimática, foi realizado um planejamento experimental para a otimização do meio de cultivo do clone C4/SMD1168-egl1/P.e /Stul por um período de 120 horas de indução. Primeiramente foram realizados testes para a escolha da melhor fonte de nitrogênio entre uréia e YNB (fonte de nitrogênio padrão nos experimentos de fermentação de *P. pastoris*), em que não foram observadas diferenças significativas na densidade celular e na atividade enzimática produzida (dados não mostrados).

[0129] Posteriormente foi realizado um planejamento fatorial 2^3 variando a densidade celular inicial (OD_{600}), concentração de metanol e concentração da fonte de nitrogênio, descritos como fatores importantes na expressão protéica em *P. pastoris* (Macauley-Patrick *et al.*, 2005), sendo analisado a influência de cada fator e a interação entre eles na produção da enzima. A variável resposta foi a atividade enzimática em 72 horas de indução (máxima atividade). Nesses experimentos foi utilizado o YNB como fonte de nitrogênio, embora não tenha ocorrido diferença estatística entre as fontes testadas anteriormente, este apresentou uma discreta tendência para a melhora da atividade. A tabela 6

apresenta os resultados das atividades enzimáticas obtidas em cada experimento em 72 horas de indução.

Tabela 6. Resultado do planejamento fatorial completo (2^3), Experimento realizado em duplicata. Valores de atividade obtidos no tempo de 72 horas.

Experimento	% Fonte de Nitrogênio	% Metanol	OD₆₀₀ inicial	Atividade enzimática (UI/mL)
M1	4,02	1	10	0,07271
M2	1,34	1	10	0,07002
M3	4,02	0,5	10	0,09840
M4	1,34	0,5	10	0,09173
M5 *	4,02	1	1	0,10768
M6	1,34	1	1	0,08375
M7	4,02	0,5	1	0,07904
M8	1,34	0,5	1	0,06627

*Meio que apresentou maior atividade enzimática em 72 horas de fermentação. Este meio foi utilizado para a produção da enzima recombinante.

[0130] A partir dos resultados do planejamento experimental foi possível realizar a análise de variância (ANOVA), a qual é apresentada na tabela 7. Na análise de variância para a atividade enzimática como variável resposta, os fatores nos níveis avaliados não apresentaram significância individualmente, apenas a interação da densidade celular inicial vs % metanol apresentou significância estatística ($P < 0,05$), mostrando que com o aumento ou diminuição de ambos fatores a atividade enzimática pode ser aumentada. Embora a variável YNB não apresente níveis estatísticos significativos, a observação do comportamento desta variável nos distintos meios de cultivo nos sugere que esta deva ser posteriormente avaliada em novos experimentos. Quando analisada as variáveis metanol e YNB, foi possível observar que

independente da concentração de metanol utilizado a atividade permanece constante no decorrer dos experimentos em concentrações altas de YNB, o que nos permite sugerir a utilização de concentrações menores desta variável, barateando o processo produtivo.

[0131] Analisando os valores encontrados de atividade após a otimização do meio de cultivo, observamos um incremento na atividade enzimática relativa na ordem de 179,47%, utilizando o meio M5. O modelo estatístico apresentou um ajuste adequado aos resultados experimentais, já que o modelo explica 97,42 % (R^2) da variação dos dados.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática (UI/mL).

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F ₀	P
% Metanol (1)	0,000000	1	0,000000	0,001349	0,971498
OD ₆₀₀ inicial (2)	0,000004	1	0,000004	0,012284	0,914181
Nitrogênio (3)	0,000531	1	0,000531	1,727493	0,221240
*1 e 2	0,002186	1	0,002186	7,118755	0,025702
1 e 3	0,000013	1	0,000013	0,042032	0,8421
2 e 3	0,000187	1	0,000187	0,608390	0,455417
Erro	0,002764	9	0,000307		
Total	0,005684	15			

*Valores encontrados apresentaram significância estatística para a variável resposta atividade ($P < 0,05$).

[0132] Outros autores também utilizando o planejamento estatístico com o objetivo de otimizar parâmetros para a produção de proteínas heterólogas, encontraram distintas variáveis que se mostraram significativas. Damaso *et al.* (2004), analisando a expressão de β -1,4-xilanase em *P. pastoris* e otimizando a expressão através de um planejamento fatorial 2^3 com as mesmas variáveis,

concluíram que a densidade celular inicial era o fator mais importante para aumentar a produção da enzima. Neste caso, não houve influência do metanol ou da fonte de nitrogênio na produção. Hong *et al.* (2002) observaram que concentrações elevadas de metanol foram danosas para a expressão heteróloga de lacase. Por outro lado Daly & Hearn (2005), utilizando concentrações elevadas de metanol aumentaram os níveis de expressão de β -2-glicoproteína-I humana. Utilizando as mesmas variáveis, Araújo (2008), otimizou a produção de quimosina B em *P. pastoris*, encontrando as mesmas interações significativas obtidas neste trabalho para a produção da EGL1 de *P. echinulatum*.

[0133] Testes iniciais baseados na análise dos dados obtidos com os experimentos de otimização, possibilitaram a formulação de um meio onde as concentrações dos constituintes do meio estão ajustadas a valores intermediários aos utilizados no processo de otimização, resultando em um incremento na atividade enzimática (dados não mostrados).

[0134] Os experimentos realizados no presente trabalho são apenas estudos preliminares, havendo a necessidade de se estender os níveis dos parâmetros analisados e alterar as variáveis para se chegar a um meio de cultivo ótimo de indução que promova maiores níveis protéicos.

2.8 Expressão do cDNA *egl1* de *P. echinulatum* em *Pichia pastoris*

2.8.1 Detecção da atividade da enzima endoglicanase 1 em placa

[0135] Selecionado o clone C4+/SMD1168-egl1/P.e/Stul denominado (C4+), procedeu-se à detecção da possível atividade enzimática da proteína recombinante pela formação de halo de hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) em placa revelado pela coloração com vermelho do Congo (*Congo red*), após 96 horas de crescimento do transformante a 30°C. O clone transformante C4+ e um clone controle C27/SMD1168/int/Stul (transformado apenas com o vetor - não contendo o cDNA *egl1*) denominado (C27-) foram crescidos em meio MM+metanol 0,5% com 1% CMC. Após os procedimentos para a

detecção da hidrólise de CMC em placa, um halo de hidrólise foi observado apenas na região de crescimento do clone contendo o cDNA *egl1* de *P. echinulatum*. A formação do halo de hidrólise devido à atividade enzimática do clone contendo o cDNA *egl1*, de *P. echinulatum*, corrobora a idéia de que a atividade celulolítica produzida por *P. pastoris* tenha sido devido à expressão do cDNA *egl1* e que esta enzima é produzida e secretada de forma ativa.

2.8.2 Cinética de produção da endoglicanase *P. echinulatum* recombinante

[0136] O clone C4+ foi cultivado em meio líquido (M5) com o objetivo de se determinar o tempo de secreção da enzima, e também para a obtenção de uma quantidade suficiente de enzima para sua posterior caracterização bioquímica. Foram retiradas amostras nos tempos 6; 12; 24; 48; 72; 96 e 120 horas de cultivo, e estas foram analisadas para a detecção da atividade enzimática sobre CMC, segundo procedimento de Mandels *et al.* (1976), pela formação de açúcares redutores (Figura 3).

[0137] Embora existam distintos métodos para detectar a formação de açúcares redutores, a literatura tem mostrado a preferência por duas principais metodologias para a detecção destes açúcares nas análises enzimáticas: atividade de endoglicanase e ou FPase. Uma utiliza o método de Somogyi-Nelson (Ding *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2002; Picard *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Byeong-Cheol *et al.*, 2008) enquanto outros grupos utilizaram o método de Mandels *et al.* (1976) onde o DNS é empregado (Takashima *et al.*, 1997; Camassola *et al.*, 2004; Camassola & Dillon, 2006; Dillon *et al.*, 2006; Sehnem *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008; Wonganu *et al.*, 2008). Um terceiro método utilizado para avaliar principalmente a ação de endoglicanases é a viscosimetria (Molhoj *et al.*, 2001). Também existem métodos que envolvem a análise de alta performance utilizando cromatografia de detecção HPAEC-PAD (Koseki *et al.*, 2008; Wang & Jones, 1995 (CarboPAC)). Neste trabalho, optamos por avaliar a atividade enzimática utilizando o método de Mandels *et al.* (1976) com o uso do DNS, por ser a metodologia anteriormente utilizada

para a caracterização do complexo celulolítico de *P. echinulatum* (Sehnm *et al.*, 2006), para fins de comparação dos dados.

[0138] A cultura do clone de *P. pastoris* controle C27- também foi avaliada. Ambos os clones C4+ e C27- apresentaram o mesmo perfil de crescimento no meio de cultivo M5 nas primeiras horas de crescimento. Decorrido 48 horas do início da fermentação, as culturas apresentaram uma pequena diferença na taxa de crescimento celular mantendo a mesma cinética de crescimento até 120 horas. Os níveis de expressão enzimática do transformante C4+ aumentaram gradualmente acompanhando o aumento da densidade celular, chegando ao maior valor de atividade de enzima no tempo de 72 horas, onde títulos enzimáticos de aproximadamente 0,107 UI/mL foram obtidos (Figura 3). Em 96 horas de cultivo, a atividade enzimática apresentou um ligeiro declínio provavelmente devido à ação de proteases liberadas no meio de cultura em resposta a baixa disponibilidade de nutrientes (Mattanovich *et al.*, 2004). Outro fator que pode estar envolvido na diminuição da atividade enzimática, esta relacionado ao estresse metabólico das células por limitar outros processos celulares competindo por seus substratos (Mattanovich *et al.*, 2004).

[0139] Camassola *et al.* (2004) caracterizaram o complexo celulolítico de *P. echinulatum*, avaliando as atividades de FPAases e β -Glicosidade. Neste trabalho Camassola obteve títulos enzimáticos para FPAases ~ 0,78 UI/mL sobre papel de filtro. As medidas de FPAase são utilizadas para medir a atividade total de um determinado complexo enzimático, avaliando a atividade conjunta de distintas enzimas que somadas resultam em uma atividade única. A atividade encontrada para a enzima EGL1 de *P. echinulatum* produzida de forma heteróloga neste trabalho, embora apresente títulos enzimáticos relativamente baixos, são representativos da atividade de apenas uma enzima para a degradação do substrato lignocelulósico CMC.

2.9. Caracterização bioquímica da endoglicanase EGL1 recombinante.

[0140] Visto que as endoglicanases são precursoras de uma cascata de ações

para a degradação da celulose, diminuindo rapidamente o grau de polimerização e complexidade do substrato, gerando celo-oligossacarídeos que são alvos das celobiohidrolases e β -glicosidases (Teeri, 1997) se torna fundamental a caracterização da endoglicanase de *P. echinulatum* expressa de forma heteróloga em *P.pastoris*.

[0141] As endoglicanases também têm mostrado atividade na separação de hemicelulose e celulose da lignina, uma vez que algumas endoglicanases apresentam atividade em xiloglicanas (Suda & Giorgini, 2003; Lynd *et al.*, 2002).

[0142] Para a caracterização bioquímica da endoglicanase recombinante, foi utilizado o sobrenadante da cultura de crescimento celular centrifugado, diretamente nas reações. O sobrenadante foi obtido pelo crescimento celular do clone C4+ em 200 mL meio M5 por 72 horas. Os ensaios enzimáticos foram realizados por 30 minutos nas condições pré-estabelecidas, pela análise da formação de açúcares redutores, método do DNS (Mandels *et al.*, 1976).

2.9.1 Atividade enzimática da EGL1 recombinante em diferentes pHs

[0143] A enzima EGL1 expressa de forma heteróloga em *P. pastoris* apresentou maior atividade em pH 7,0 mantendo cerca de 84% da atividade relativa em pH 6,0, ~88% em pH 8,0 e pH 9 (tampão Tris-HCl 100 mM). Embora não tenha apresentado diferença estatística nos valores de atividade entre estes pHs, apresentou uma variação no percentual de atividade relativa. Em ensaio realizado com tampões de diferentes composições, pode ser observada uma variação na atividade enzimática. Em tampão acetato pH 6,0 (100 mM) a enzima apresentou menor atividade relativa ~77% comparada a atividade encontrada em tampão Tris-HCl (100 mM) no mesmo pH ~83%, indicando que a composição do tampão pode afetar a atividade enzimática.

2.9.2 Atividade enzimática de EGL1 recombinante em diferentes temperaturas

[0144] O ensaio para se determinar a temperatura ótima, foi realizado nas

temperaturas de 10; 30; 40; 50; 60; 70°C em tampão Tris-HCl pH 7 (100 mM), sendo observado uma variação estatística significativa ($P < 0,05$) nas atividades enzimáticas encontradas nas diferentes temperaturas. A melhor atividade foi obtida a temperatura de 60°C, acompanhada pelos valores de atividade relativa nas temperaturas de 50 e 70°C de ~80% e ~73% respectivamente. Nas temperaturas restantes a atividade enzimática relativa ficou abaixo dos 40%.

2.9.3 Estabilidade térmica de EGL1 recombinante

[0145] O ensaio para determinar a estabilidade térmica para a atividade de EGL1 foi realizado em pH 7,0, tampão Tris-HCl 100mM. Das temperaturas escolhidas para os ensaios (50; 60;70°C) a enzima apresentou alta atividade na faixa de 50 a 60°C e um decréscimo na atividade à temperatura de 70°C, mesmo assim, mantendo cerca de 83% de atividade após 1 hora de pré-incubação nesta temperatura. Nas temperaturas testadas o comportamento da enzima se assemelha ao comportamento de enzimas termotolerantes, mantendo alta atividade por um longo período de tempo (Wonganu *et al.*, 2008). À temperatura de 50°C a atividade enzimática não variou significativamente durante as 24 horas de análise, mantendo valores de atividade relativa semelhantes aos encontrados em zero hora.

[0146] Os tratamentos a 60°C confirmaram o experimento anterior onde a temperatura ideal foi estabelecida. A melhor atividade entre os experimentos de termoestabilidade foi observada a 60°C, sendo que em uma hora de pré-tratamento térmico, foi observada uma elevação na atividade enzimática, embora não diferindo estatisticamente, mas apresentando percentuais distintos, sugerindo que a enzima possa ser ativada por tratamento térmico, apresentando títulos enzimáticos superiores ao tratamento controle no tempo zero. Decorrido 24 horas de pré-tratamento térmico a atividade enzimática final resultou em cerca de 98% da atividade inicial

[0147] Na temperatura de pré-tratamento de 70°C a enzima apresentou um

comportamento distinto dos anteriores. Pode ser observada uma redução na atividade residual logo na primeira hora de pré-tratamento, chegando a aproximadamente 84% da atividade residual inicial, decaindo gradualmente durante o tempo de pré-incubação. Fato este que corrobora os dados encontrados para a temperatura de 60°C, como sendo a temperatura ideal para atividade de EGL1 de *P. echinulatum*. Decorridas 4 horas de pré-tratamento a enzima apresentou ~35% de atividade residual, contrastando com a maior atividade relativa encontrada para esta enzima a 60°C no mesmo tempo de pré-incubação. Decorridas 24 horas de pré-incubação a atividade residual chegou a cerca de 0,07% da atividade inicial. Os ensaios enzimáticos foram realizados por 30 minutos na temperatura de 60°C, pH 7, após diferentes tempos de pré-incubação.

[0148] Os dados obtidos com os testes realizados para a caracterização de pH, temperatura ótima e estabilidade térmica, não estão de acordo com os encontrados para a caracterização do complexo enzimático de *P. echinulatum* (Camassola *et al.*, 2004), no qual foi utilizado todo complexo celulolítico e não uma enzima isolada, sendo atribuídos ótimos para valores de pH entre 4 e 5 em tampão citrato 50 mM e maior estabilidade térmica à temperatura de 55°C. Para a atividade de FPAases, os autores sugerem que uma temperatura de 60°C possa ser a ideal.

[0149] Os dados encontrados para a endoglicanase recombinante EGL1, produzida de forma heteróloga, referentes a pH, temperatura ótima e estabilidade térmica, mostram valores superiores aos relatados por estes autores. A temperatura sugerida para atividade de FPAases na reação e a mesma encontrada para a atividade de EGL1 recombinante expressa em *P.pastoris*. Existem indícios de uma diferença em relação ao pH ótimo do complexo enzimático de *P. echinulatum*, de acordo com o tempo de indução do sistema celulolítico deste fungo sugerindo a secreção de diferentes enzimas. Nas primeiras horas de indução é observada a atividade CMCase em pH alcalino no meio de cultivo, seguido da expressão de outras enzimas ácidas

com o aumento do tempo de indução (Dillon, comunicação pessoal).

[0150] Outros complexos enzimáticos no gênero *Penicillium* também tem sido estudados. Jorgensen *et al.* (2003) encontrou três distintas endoglicanases no extrato bruto de *P. brasilianum*. Bhat & Wood (1989) encontraram oito distintas endoglicanases no extrato de *P. piniphilum*. Baseado nestes dados e avaliando o tempo de indução utilizado neste trabalho para a extração do RNA total e construção da biblioteca de cDNA, fica evidente que o banco foi construído sob a indução do sistema celulolítico, mas possivelmente o tempo de indução não tenha sido o ideal para a total expressão deste sistema.

[0151] Segundo Camassola *et al.* (2004), a alta estabilidade térmica do complexo de *P. echinulatum* é uma característica desejada para a aplicação em processos de hidrólise enzimática, produção de xarope de glicose, exibindo um grande potencial para a sua utilização na indústria têxtil e produção de álcool combustível. Associado a estes fatos os valores de pH encontrados para a endoglicanase recombinante expressa de forma heteróloga em *P.pastoris* vem ao encontro das características desejadas pela indústria têxtil, onde a utilização de celulasas alcalinas são preferidas, pois evitam a redeposição de corante durante os processos de descolorimento dos tecidos de algodão, sendo esta uma característica ótima para a realização deste processo (Anish *et al.*, 2007). Características semelhantes também foram encontradas por outros autores utilizando *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga para endoglicanase de diferentes microrganismos (Shibuya & Kikuchi, 2008; Ding *et al.*, 2001).

2.9.4 Atividade enzimática de EGL1 recombinante sobre diferentes substratos

[0152] A atividade de EGL1 recombinante foi testada sobre celulose microcristalina e papel de filtro sendo comparada com a atividade obtida para CMC. Os resultados encontrados, mostram que a enzima recombinante presente no sobrenadante da cultura do clone C4+ de *P. pastoris*, apresentou uma atividade sobre papel de filtro de aproximadamente 0,065 UI/mL e sobre

celulose microcristalina de cerca de 0,033 UI/mL, estas atividades foram comparadas em valores relativos com a atividade encontrada para o substrato CMC a qual foi de cerca de 0,111 UI/mL. Embora a enzima EGL1 apresente o domínio de ligação ao carboidrato (CBD), que é importante para a atividade enzimática de celulasas em substratos cristalinos (Linder & Teeri, 1996), as endoglicanases tem atividade preferencial sobre regiões amorfas da fibra de celulose o que explica a maior atividade encontrada sobre papel filtro e CMC. Na celulose microcristalina as fibras são mais organizadas (compactadas) exibido uma maior resistência ao ataque de endoglicanases. Porém estas enzimas podem apresentar um forte efeito sinérgico de degradação desse substrato quando associada a celobiohidrolases (CBH) (Takashima *et al.*, 1999).

[0153] Foram realizados ensaios enzimáticos sobre os substratos sintéticos pNPC (p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo) e MUC (4-metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo), com a finalidade de apenas detectar a atividade de EGL1 nesses substratos. Esses ensaios foram realizados com o sobrenadante da cultura do transformante C4+ bem como o clone controle C27-. Estes extratos foram utilizados sem terem sido fervidos e logo após a sua fervura a 100°C por 5 minutos. Não foi detectada atividade de EGL1 sobre o substrato pNPC, o que coincide com os dados de Takashima *et al.* (1997). Já quando utilizado o substrato MUC, foi detectada atividade, onde o celobiosídeo é clivado da molécula de 4-metilumbeliferona, gerando um produto fluorescente. Este resultado indica que a enzima apresenta atividade sobre celo-oligosacarídeos curtos, apesar de apresentar atividade enzimática preferências por cadeias longas de celo-oligosacarídeos. A atividade pode ser comprovada pela emissão de fluorescência quando a reação é exposta a luz ultravioleta.

2.9.5 Efeito de íons sobre a atividade de EGL1 recombinante

[0154] O efeito de íons sobre a atividade de ENG1 recombinante, foi verificado adicionando ao sistema de reação, 4 mM do sal correspondente, e determinada

a atividade nas condições ótimas de pH e temperatura. Uma segunda reação foi realizada com uma concentração maior do sal para se observar o comportamento da enzima.

[0155] Os resultados observados quando utilizado 4 mM dos sais, indica que a atividade enzimática foi pouco afetada, a maior interferência foi observada quando o íon Ca^{++} foi adicionado ao sistema, seguido pelos íons Cu^{++} , Mg^{++} , NH_4^+ , Zn^{+++} , Al^{+++} tendo a atividade enzimática diminuído para cerca de 85 a 90% da atividade padrão (reação sem a adição de íons) (dados não mostrados)

[0156] Picard *et al.* (2007) trabalharam com a caracterização do complexo enzimático de *Penicillium* sp, analisando a interferência de íons (Ag^+ , Cu^{++} , Mg^{++} ; NH_4^+ , Ca^{++} , Zn^{++} ; Ba^{++} , Co^{++} , Hg^{++} , Fe^{+++} , Mn^{++} , Pb^{++} , Ni^{++}) sobre a atividade relativa. Embora utilizando concentrações maiores dos íons (10mM) obteve resultados semelhantes aos obtidos com a concentração de 4 mM utilizada neste trabalho.

[0157] Vários autores atribuem ao íon mercúrio a propriedade de inibição enzimática, a adição de mercúrio na reação ocasionou um aumento na atividade enzimática, em percentual relativo de atividade, resultado que contradiz distintos autores quando estudando diferentes enzimas e ou complexos enzimáticos (Ding *et al.*, 2002; De-Marco & Felix, 2007; Picart *et al.*, 2007; Galdino, 2008). Com o propósito de avaliar melhor este resultado foram utilizadas diferentes concentrações do íon mercúrio em distintas reações para observar as concentrações inibitórias da atividade da EGL1 recombinante. Foram utilizadas as concentrações 4; 6; 8; 12; 16; 20; 25 e 30 mM do íon mercúrio na reação, e analisada a atividade enzimática após 30 minutos de incubação em pH e temperatura ideal. Realizadas as reações pode ser observado que a atividade enzimática diminui com o aumento da concentração do íon na solução. Verificou-se que a maior atividade enzimática ocorreu na concentração de 4mM do íon na reação sendo inclusive superior à atividade padrão (dado não mostrado), e diminuindo até sua total inibição na concentração de 25 mM. Esta concentração foi utilizada como parâmetro para

uma nova avaliação da interferência de íons na atividade da enzima EGL1 recombinante. A inibição da atividade enzimática provocada pelo íon mercúrio pode indicar a importância do agrupamento indol da cadeia lateral de alguns aminoácidos na função da enzima, como referido anteriormente por Graupta *et al.* (2003) e Ramirez-Zanvala *et al.* (2004).

[0158] Realizadas as reações utilizando os mesmos íons, agora na concentração determinada anteriormente para o íon mercúrio (25 mM), foi possível observar um comportamento distinto com relação a atividade enzimática relativa. O padrão observado anteriormente não se mostrou reproduzível com o aumento na concentração de alguns íons. Comparando estatisticamente os dados obtidos com as duas concentrações pode ser observado que as atividades não diferiram significativamente com os íons Mg^{++} , Al^{+++} , Co^{++} , NH_4^+ , Mn^{++} e Cu^{++} . Por outro lado a utilização dos íons Ca^{++} , Hg^{++} , Zn^{+++} e Fe^{+++} , apresentaram uma variação estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos realizados. Quando avaliado a atividade relativa em função da reação padrão, podemos observar que com a adição dos íons Zn^{+++} , Fe^{+++} e Cu^{++} ocorreu um decréscimo na atividade, que anteriormente se mostrava próxima a padrão, agora apresenta percentuais inferiores a 55% da atividade relativa. Para os demais íons testados, não foi observado diferenças na atividade enzimática. Com o aumento da concentração do íon cálcio na reação a atividade enzimática apresentou um aumento altamente significativo comparado a atividade padrão. Utilizando a concentração de 4 mM a atividade apresentou um decréscimo na atividade específica, já quando utilizado a concentração de 25 mM a atividade relativa se mostrou altamente significativa ($P < 0,01$), chegando a percentual de 364,03% acima da atividade padrão, evidenciando uma alta correlação entre o Ca^{++} e a atividade da enzima (Tabela 8). Resultados semelhantes foram encontrados por Molhoj *et al.* (2001) quando caracterizaram uma endoglicanase de *Brassica napus*, utilizando concentrações de cálcio superiores (40mM) as utilizadas neste testes.

Tabela 8 – Efeito de distintos íons na atividade de EGL1 de *P. echinulatum*

Íon 25 mM	Atividade relativa%
Padrão	100
Mg ⁺⁺	93,45
*Mn ⁺⁺	123,5
Al ⁺⁺⁺	82,25
*Hg ⁺⁺	0
Co ⁺⁺	120,5
*Cu ⁺⁺	55,13
*Fe ⁺⁺⁺	34
**Ca ⁺⁺	364,03
NH ₄ ⁺	101
*Zn ⁺⁺⁺	26,73

[0159] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Vetores biológicos heterólogos **caracterizados** pelo cassete de expressão compreender:

- a) pelo menos um promotor heterólogo;
- b) pelo menos uma SEQ ID nº1.

2. Vetores biológicos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** pela SEQ ID Nº 1 ser obtida a partir de *P.echinulatum* A02S1 (DSM18942).

3. Vetores, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender vetores de clonagem, de expressão e/ou de transporte, bem como a mistura dos mesmos.

4. Vetores, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo vetor ser o vetor de expressão de *P. pastoris*.

5. Processo de produção de celulasas **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) obter a SEQ ID nº1;
- b) inserir o material de a) em pelo menos um vetor biológico heterólogo;
- c) contactar o material de b) com um meio que permita a produção de celulasas.

6. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pela SEQ ID Nº 1 ser obtida a partir de *P.echinulatum* A02S1 (DSM18942).

7. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pela obtenção da SEQ ID Nº 1 e indução do sistema celulolítico do fungo *P. echinulatum* compreenderem o cultivo em meio para a produção de micélio, coletado em papel de filtro, lavado e inoculado em meio MPIC contendo fonte de carbono específica (BCA).

8. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo vetor biológico compreender vetores de clonagem, de expressão e/ou de transporte, bem como a mistura dos mesmos.

9. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 8,

caracterizado pelo vetor ser o vetor de expressão de *P. pastoris*.

10. Composição enzimaticamente ativa, **caracterizada** por compreender:

a) celulase da SEQ ID n°2;

b) excipientes e carreadores farmacologicamente aceitáveis.

11. Uso de composição, conforme definido na reivindicação 10, **caracterizado** por ser utilizado em processos industriais na modificação de tecidos, bioestonagem, descoloramento de tecidos, biopolimento, detergentes, preparo de alimentos e demais processos que envolvam enzimas com ação celulolítica.

12. Método de modificação de tecidos **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de contactar, direta ou indiretamente, uma celulase da SEQ ID n°2 com o tecido a ser modificado.

FIGURAS

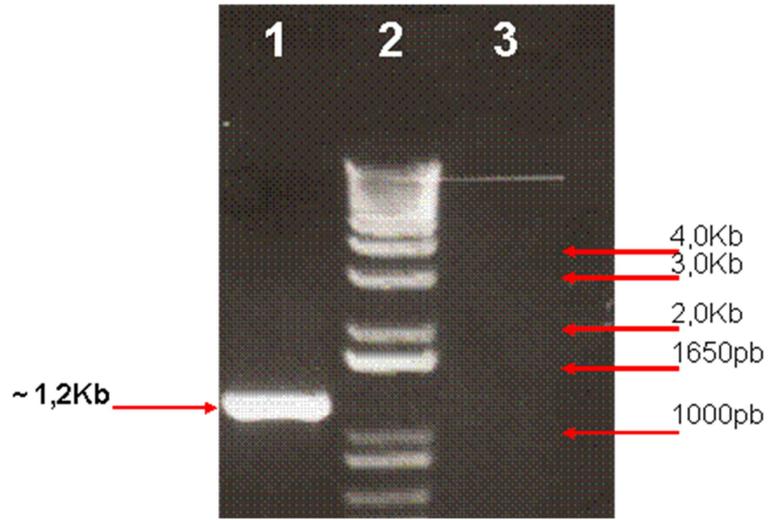


Figura 1

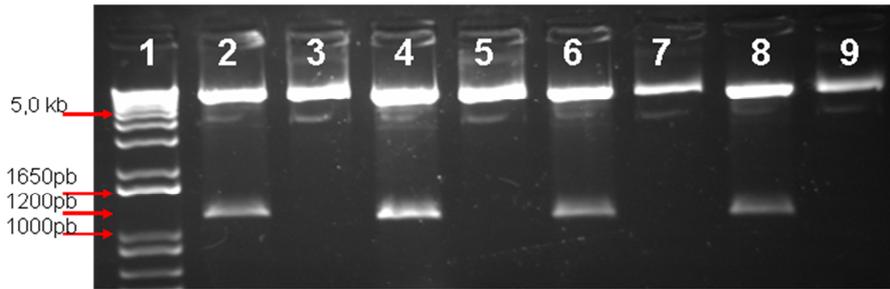


Figura 2

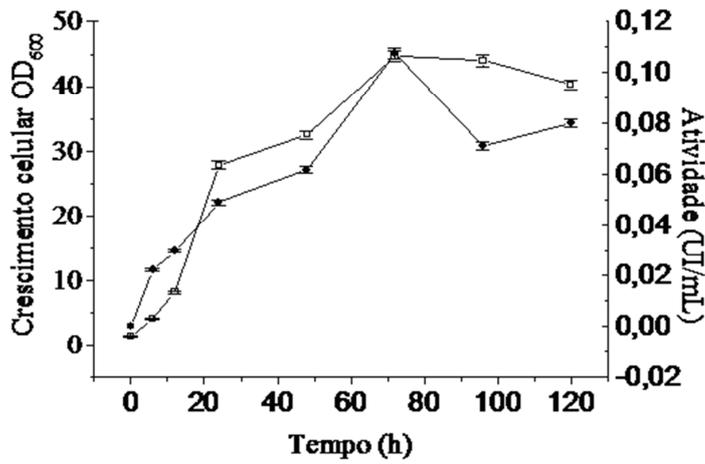


Figura 3

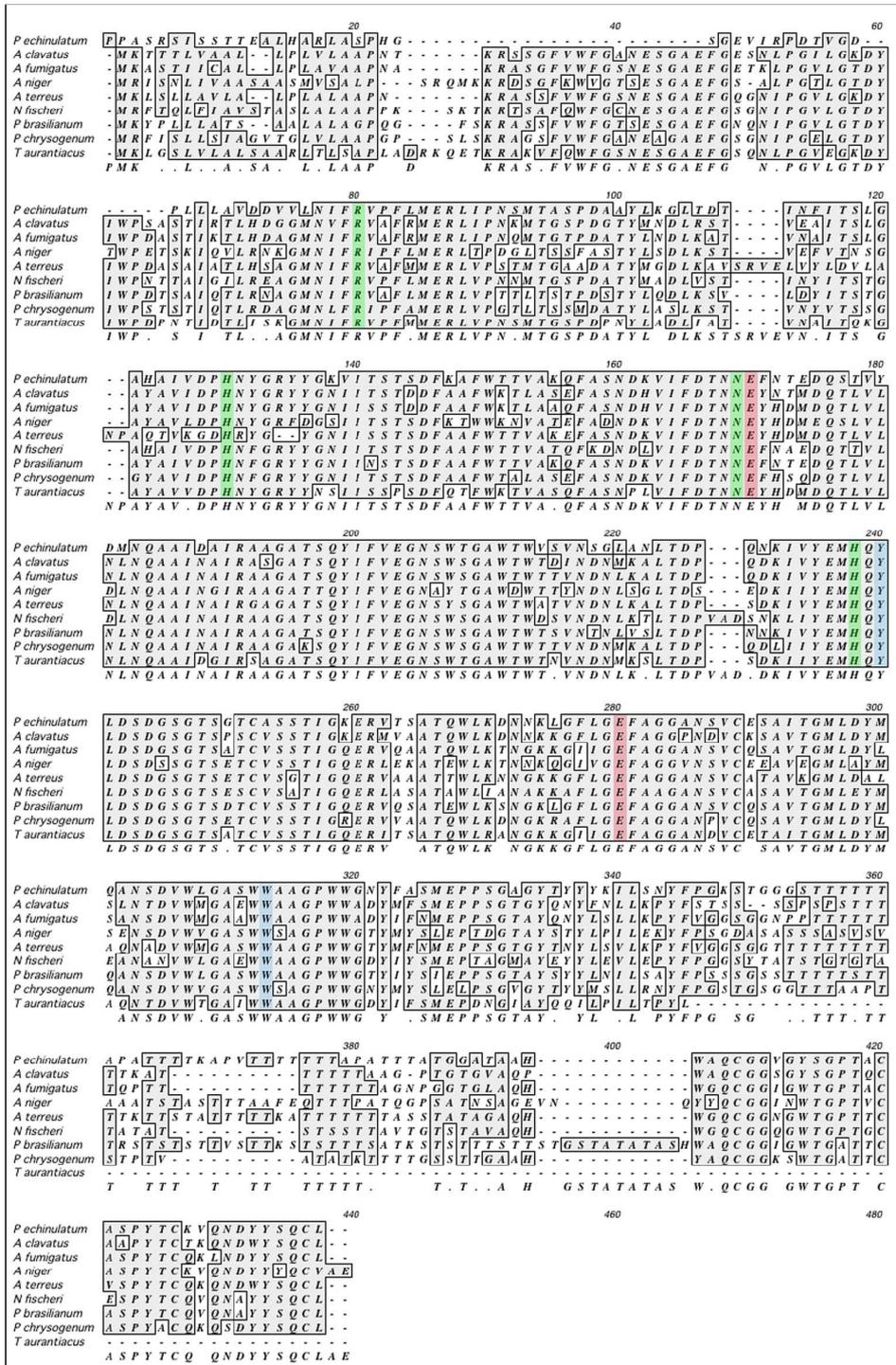


Figura 4