



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Transcriptoma e expressão recombinante de peptidases do
fungo *Phanerochaete chrysosporium* em *Pichia pastoris***

Flávio Antônio de Oliveira Simões

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Transcriptoma e expressão recombinante de peptidases do fungo
Phanerochaete chrysosporium* em *Pichia pastoris

Flávio Antônio de Oliveira Simões

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Transcriptoma e expressão recombinante de peptidases do fungo
Phanerochaete chrysosporium* em *Pichia pastoris

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador(a): Professor Dr. Hamilton Cabral

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/09/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2019

SIMÕES, F.A.O.	Transcriptoma e expressão recombinante de peptidases do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em <i>Pichia pastoris</i>	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRPUSP 2019
----------------	---	--	------------------------------

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

Simões, Flávio Antônio de Oliveira

Transcriptoma e expressão recombinante de peptidases do fungo *Phanerochaete chrysosporium* em *Pichia pastoris*. Ribeirão Preto, 2019. 87 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Cabral, Hamilton.

1. *Peptidases recombinantes*. 2. *Aspartil peptidase*. 3. *Cisteíno peptidase*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Flávio Antônio de Oliveira Simões

Título do trabalho: Transcriptoma e expressão recombinante de peptidases do fungo *Phanerochaete chrysosporium* em *Pichia pastoris*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais e irmã que com muito carinho e amor sempre me ensinaram a buscar o melhor caminho, mesmo que para isso devesse passar por muitas dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Hamilton Cabral, pela paciência, orientação e incentivo que tanto contribuíram para minha formação e crescimento.

Aos meus pais, minha irmã e ao Rodrigo por sempre me apoiarem.

A todos do Laboratório de Tecnologia Enzimática, que foram meus companheiros por todo esse tempo e me ajudaram muito na realização desse trabalho.

A todos meus amigos e colegas que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq,) pelo apoio financeiro (processo: 165870/2017-6).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001

Ubi dubium ibi libertas: onde há dúvida, há liberdade

Provérbio Latim

RESUMO

SIMÕES, F.A.O. **Transcriptoma e expressão recombinante de peptidases do fungo *Phanerochaete chrysosporium* em *Pichia pastoris*. 2019.** 87f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Os fungos possuem uma grande diversidade genética e habitam os mais variados habitats. Esses microrganismos podem ser fontes de enzimas que atuam em condições de temperatura e pH que as tornam interessantes para bioprocessos industriais. O *Phanerochaete chrysosporium* possui em seu genoma genes do citocromo p450, além de uma grande variedade de oxidases e hidrolases, que incluem as peptidases. As peptidases estão envolvidas em diversas vias biológicas e possuem diversas aplicações industriais (indústria alimentícia, farmacêutica e têxtil). Duas peptidases (aspartil e cisteíno peptidases) produzidas pelo *P. chrysosporium* já foram identificadas em sua forma nativa por nosso grupo de pesquisa e a expressão recombinante dessas proteínas pode fornecer meios para a caracterização bioquímica e funcional. O sistema *Pichia pastoris* possui um eficiente sistema de secreção de proteínas e é capaz de realizar modificações pós-traducionais, produzindo enzimas recombinantes funcionalmente ativas. O objetivo deste estudo foi realizar o transcriptoma do fungo *Phanerochaete chrysosporium* para identificação e expressão recombinante de peptidases aspartil e cisteíno para estudos bioquímicos e funcionais. Para isso, o *P. chrysosporium* foi submetido à diferentes cultivos suplementados com farinha de pena (1%), ou caseína (1%), ou avicel (1%), ou azeite (1%). Foram feitos ensaios de atividade enzimática para peptidase, lacase, amilase, lipase, CMCase, xilanase e pectinase. Foram detectadas atividade para todas as enzimas em todas as condições, exceto pectinase e lipase. Os extratos suplementados com farinha de pena foram purificados em cromatografia de troca iônica e o N-terminal da aspartil e da cisteíno peptidases foi sequenciado via degradação de Edman. O micélio das culturas foi usado para extração do RNA e síntese do cDNA para a construção da biblioteca de transcritos, que gerou 33840 sequências. A biblioteca foi submetida a análise pelo UNIPROT e 7327 sequências foram identificadas (52% não enzimas e 48% enzimas). As classes enzimáticas com maior número de sequências foram das hidrolases, transferases e oxidorreduções, com 34%, 30% e 23%, respectivamente. Quanto as peptidases, 1208 foram anotadas como pertencentes a essa subclasse, sendo aspartil peptidases 16,2%, seguida de ômega peptidases 15,1%, de metalo peptidases 10,8%, serino peptidases 10,4% e cisteíno peptidases, 8,3%. A sequência obtida do N-terminal da aspartil peptidase foi utilizada para busca na biblioteca de transcritos. A busca revelou 5 isoformas da mesma sequência DN10508 (2, 6, 7, 10 e 11) e após a análise a isoforma 10 foi selecionada para expressão heteróloga. A busca da sequência da cisteíno peptidase foi feita através da anotação funcional da biblioteca e duas sequências foram encontradas DN7040, isoforma 1 e 3. A isoforma 3 foi selecionada para expressão heteróloga, após análise dos domínios e da massa teórica da sequência. As sequências selecionadas foram clonadas no vetor *pPICZαA*. Os clones de *P. pastoris* contendo as construções foram submetidos a um screening

(20 clones de cada construção) em mini biorreatores Corning, induzido com metanol. A atividade enzimática dos clones contendo a construção *pPICZ α A*-DN10508 (aspartil peptidase) mostraram que os clones 1 ($16,00 \pm 3,27$ U/mL), 2 ($14,44 \pm 1,12$ U/mL), 11 ($14,27 \pm 0,315$ U/mL), 4 ($14,27 \pm 0,086$ U/mL) e 5 ($14,15 \pm 2,15$ U/mL) obtiveram a maior atividade enzimática. A atividade enzimática dos clones contendo *pPICZ α A*-DN7040 (cisteíno peptidase) não apresentaram resultados promissores. Nas condições avaliadas foi possível induzir a expressão de diferentes classes enzimáticas. A biblioteca de transcritos gerou mais de 33 mil sequências e através dela, foi possível selecionar e expressar duas peptidases (aspartil e cisteíno peptidases) para a expressão heteróloga.

Palavras chave: Peptidases recombinantes, Aspartil peptidase, Cisteíno peptidase

ABSTRACT

SIMÕES, F.A.O. Transcriptome and recombinant peptidase expression from the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris*. 2019. 87p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Fungi can be found in a variety of habitats and have great genetic diversity. These microorganisms produce a variety of enzymes and some of these may work under specific temperature and pH conditions. *Phanerochaete chrysosporium* can completely degrade lignin. Its genome possess a large repertoire of genes related to lignin metabolism including cytochrome p450, oxidoreductase and hydrolases, which includes peptidase enzymes. Peptidase enzymes are involved in various biological pathways and have industrial applications (textile and food industry). Our research group have described two native peptidases (aspartyl and cysteine peptidase) with great potential for industrial application. Recombinant protein production could provide an efficient way for enzyme production and purification. *Pichia pastoris* expression system is widely used for recombinant protein expression, and it is described as efficient for both production and secretion of recombinant enzymes, it also is able to execute post-translational modifications. The aim of this study was to perform transcriptome analyses of the fungus *Phanerochaete chrysosporium* to identify and express two heterologous peptidase (aspartic and cysteine peptidase) in *P. pastoris* for biochemical and functional studies. *P. chrysosporium* was submitted to different bioprocesses supplemented with feather meal (1%), casein (1%), avicel (1%), or olive oil (1%). Enzymatic activities of peptidases, laccases, amylases, lipases, CMCases, xylanases and pectinases were determined. All activities were detected, except lipase and pectinase activities. Extracts supplemented with feather meal were purified by ion exchange chromatography and the N-terminal sequence of aspartic and cysteine peptidases were determined by Edman degradation. The mycelium was used for RNA extraction and cDNA synthesis. A transcript library was built using cDNA sequences, which generated 33840 sequences. The library was analyzed by UNIPROT and 7327 sequences were identified (52% non-enzymes and 48% enzymes). The largest class detected we hydrolases, transferases and oxidoreductases, with 34%, 30% and 23%, respectively. As for peptidases, 1208 were noted as peptidases, the highest number of its subclass were aspartic peptidase 16.2%, followed by omega peptidase 15.1%, metallo peptidase 10.8%, serinoe peptidase 10.4% and cysteine peptidase, 8,3%. The sequence obtained from the N-terminal aspartic peptidase was used to search the primary sequence in the transcript library. Five isoforms of the same sequence were find DN10508 (2, 6, 7, 10 and 11) and after sequence analysis isoform 10 was selected for heterologous expression. Cysteine peptidase sequence was found using the functional annotation in the library and two sequences were found DN7040, isoform 1 and 3. Isoform 3 was selected for heterologous expression after domain analysis. Sequences selected for recombinant expression were cloned into the pPICZαA vector, followed by transformation of *Pichia pastoris* KM71H cells. Fifty colonies were obtained for pPICZαA-DN10508 and 55 colonies for pPICZαA-DN7040. The colonies were

screened (20 colonies of each construct) in methanol-induced Corning mini bioreactors. Enzyme activities for the *pPICZ α A*-DN10508 (aspartyl peptidase) construct showed that colonies 1 (16.00 ± 3.27 U / mL), 2 (14.44 ± 1.12 U / mL), 11 (14.27 ± 0.315 U / mL), 4 (14.27 ± 0.086 U / mL) and 5 (14.15 ± 2.15 U / mL) had the highest enzymatic activities. Enzymatic activities of clones containing *pPICZ α A*-DN7040 (cysteine peptidase) showed no promising results. Under these conditions evaluated in the enzymatic assays, 5 out of 7 enzymes were detected. In addition, it was possible to construct a library of transcripts containing more than 33,000 sequences, select and perform recombinant expression of two peptidase using library sequences.

Key words: Recombinant peptidases, *Aspartic peptidase*, *Cysteine peptidase*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em madeira.	21
Figura 2 – Fluxograma experimental	38
Figura 3 – Atividade enzimática (peptidase, amilase, CMCase, lacase e xilanase) em diferentes extratos produzidos por <i>P. chrysosporium</i> , em relação ao tempo de cultivo.	40
Figura 4 – Eletroforese (gel 4 a 15%) e membrana de PVFD da fração não ligada da cromatografia de troca iônica.	42
Figura 5 – Alinhamento das sequências de proteínas obtidas após BLAST do N-terminal da aspartil peptidase.	44
Figura 6 – Eletroforese (gel 12%) da fração ligada da cromatografia de troca iônica.	45
Figura 7 – Análise da qualidade do cDNA obtido após síntese.	47
Figura 8 – Análise das sequências obtidas na biblioteca de transcritos.	48
Figura 9 – Alinhamento da sequência do N-terminal da aspartil peptidases com as sequências obtidas na BT.	50
Figura 10 – Predição de peptídeo sinal na sequência DN10508 isoforma 10 (aspartil peptidase).	51
Figura 11 – Domínios conservados na sequência DN10508 I 10 (aspartil peptidase).51	
Figura 12 – Predição de peptídeo sinal nas isoformas da sequência DN7040.	53
Figura 13 – Domínios conservados e alinhamento das sequências DN7040 isoformas 1 e 3.	54
Figura 14 – Géis de agarose mostrando a linearização das construções pPICZ α A-DN40508 e pPICZ α A-DN7040.	55
Figura 15 - Foto representativa da disposição dos clones de <i>P. pastoris</i> KM71H positivas para a construção pPICZ α A-DN10508 na placa contendo o meio.	56
Figura 16 - Atividade enzimática após 144 horas de indução dos clones 1 a 20 contendo a construção pPICZ α A-DN10508 (aspartil peptidase)	57
Figura 17 – Géis de poliacrilamida 12% após 144 horas de indução dos clones 1 a 20.	59
Figura 18 – Gel de poliacrilamida 15% exibindo as bandas do clone 1 após diferentes tempos de indução.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das peptidases.	24
Tabela 2 – Sequências de proteínas obtidas a partir do BLAST do N-terminal das aspartil peptidase.	43
Tabela 3 – Sequências de proteínas obtidas a partir do BLAST do N-terminal das cisteíno peptidase.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

AOX Álcool oxidase

BLAST Basic Local Alignment Search Toll

BMGY Buffered glycerol-complex medium

BMMY Buffered methanol-complex medium

BSA Bovine serum albumin

BT Biblioteca de transcritos

CMC Carboximetilcelulose

DNA Deoxyribonucleic acid

DNS Ácido dinitro salicilico

EC Enzyme Commission

GRAS Generally recognized as safe

IMAC Immobilized metal ion affinity chromatography

Mut Methanol utilization pathway

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TLP thaumatin like protein

YNB Yeast Nitrogen Base

YPD Yeast Peptone Dextrose

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Microrganismos como potencial biotecnológico	19
1.2 O potencial biotecnológico dos fungos filamentosos.....	20
1.2.1 O fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	20
1.3 Peptidases de origem microbiana	22
1.3.1 Classificação das peptidases e sua especificidade	22
1.4 Produção recombinante de proteínas	26
1.4.1 O sistema <i>Pichia pastoris</i>	27
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 Microrganismos e meio de manutenção	29
3.2 Cultivo submerso	29
3.3 Ensaio de atividade enzimática nos filtrados do cultivo submerso	29
3.3.1 Atividade de amilase, CMCase, pectinase e xilanase.....	29
3.3.2 Atividade de lacase.....	30
3.3.3 Atividade de lipase.....	30
3.3.4 Atividade de peptidase.....	31
3.4 Preparo e purificação do filtrado suplementado com farinha de pena	32
3.4.1 Cromatografia de troca iônica.....	32
3.5 Obtenção da sequência do N-terminal de peptidases.....	32
3.6 Extração do RNA total e construção da biblioteca de transcritos do fungo	33
3.7 Expressão da aspil e cisteíno peptidases recombinantes em <i>Pichia pastoris</i>	34
3.7.1 Vetor de clonagem.....	34
3.7.2 Preparo e transformação das células de <i>Pichia pastoris</i>	34

3.7.3 Screening dos clones positivos para as construções <i>pPICZαA</i> -DN10508 e <i>pPICZαA</i> -DN7040	35
3.7.4 Expressão em maior escala de proteínas recombinantes	36
3.7.5 Purificação de peptidases recombinantes por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC).....	36
3.8 Fluxograma experimental.....	37
4 RESULTADOS	37
4.1 Obtenção de enzimas nativas por cultivo submerso utilizando o fungo <i>P. chrysosporium</i>	37
4.2 Purificação por cromatografia de troca iônica e obtenção do N-terminal de peptidases nativas	40
4.2.1 Fração não ligada	40
4.2.2 Fração ligada	44
4.3 Construção e análise da biblioteca de transcritos (BT)	45
4.4 Obtenção da sequência primária de aminoácidos utilizando biblioteca de transcritos	48
4.4.1 Busca utilizando a sequência do N-terminal da aspartil peptidase	48
4.4.2 Busca da sequência da cisteíno peptidase utilizando anotação funcional	51
4.5 Transformação da <i>P. pastoris</i> KM71H	54
4.6 <i>Screening</i> dos clones positivos para a construção <i>pPICZαA</i> -DN7040 (cisteíno peptidase)	55
4.7 <i>Screening</i> dos clones positivos para a construção <i>pPICZαA</i> -DN10508 (aspartil peptidase)	56
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	78
ANEXO A – Controle da qualidade do gene DN10508 I10	78
ANEXO B – Controle da qualidade do gene DN7040 I3	81
ANEXO C – Análise da integridade do RNA extraído do <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	84
ANEXO D – Previsão de sítios passíveis de glicosilação da sequência DN10508 – I10.....	85
ANEXO E – Previsão de sítios passíveis de glicosilação da sequência DN7050 I3	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microrganismos como potencial biotecnológico

A utilização de microrganismos pela civilização humana data de 9000 A.C. (SINGH et al., 2016) sendo utilizados de forma espontânea (culturas mistas) em processos de conversão de alimentos (ZHANG; SUN; MA, 2017). Por volta de 6000 A.C. os egípcios e sumérios já utilizavam microrganismos para a produção de cerveja e pães. Após a descoberta de Pasteur, sobre o papel dos microrganismos na fermentação, essa tecnologia começou a ser amplamente empregada na obtenção de diversos produtos (ZHANG; SUN; MA, 2017).

Com o avanço tecnológico, o desenvolvimento de processos fermentativos (bioprocessos microbianos) expandiu o interesse científico em microrganismos para explorar seus potenciais. Desta forma, houve a possibilidade de produção de metabólitos específicos e em larga escala como, por exemplo, a produção de enzimas. Estas, por sua vez podem ser utilizadas como produto comercial para aplicação em diversos setores industriais (alimentício, químico, farmacêutico e de tecidos) e os produtos oriundos de suas aplicações são parte comum da vida diária (DA SILVA, 2017; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Neste sentido, diversos gêneros de bactérias (*Bacillus*, *Streptomyces* e *Pseudomonas*) e fungos (*Aspergillus* e *Penicillium*), além de plantas e animais, têm sido explorados na produção de enzimas ao longo do tempo.

Os microrganismos são a principal fonte de enzimas utilizadas em indústrias (ANBU et al., 2017). Eles apresentam uma série de vantagens em relação a outras fontes (plantas e animais), que incluem a facilidade no cultivo, grande diversidade e a capacidade de degradar substratos complexos (lignina, queratina), além de serem passíveis de modificações genéticas, utilizando a tecnologia do DNA recombinante (ANBU et al., 2017; DA SILVA, 2017; SINGH et al., 2016).

Recentemente, tem crescido o interesse na utilização dos microrganismos, e de suas enzimas, para a produção de biocombustíveis além de processos que envolvem o tratamento de resíduos industriais e poluentes (BARRECH, 2018; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; TAHA et al., 2018a). Grandes esforços têm sido feitos para encontrar linhagens de microrganismos que atuem em condições diversas de pH, temperatura e salinidade (ANBU et al., 2017; DA SILVA, 2017).

Os fungos podem ser fontes de enzimas que apresentem tais características pois possuem grande diversidade genética, tornando-os capazes de adaptar-se a diversos habitats do planeta. Além disso, apresentam capacidade de metabolizar polímeros complexos, como a lignina, por exemplo, sendo portanto, considerados alvos promissores para estudos voltados à melhoria e a obtenção de enzimas de interesse biotecnológico/industrial (SILVA et al., 2005).

1.2 O potencial biotecnológico dos fungos filamentosos

Os fungos são encontrados em todos os ecossistemas e conseguem se adaptar a situações extremas de pH e temperatura. Esses microrganismos são capazes de converter matéria orgânica em uma variedade de compostos e possuem um papel importante no ciclo do carbono (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016; FRAC et al., 2018). Estima-se que já foram descritas cerca de 100.000 espécies de fungos, entretanto algumas estimativas sugerem que o número de espécies existentes seja entre 3,5 a 5,1 milhões (O'BRIEN et al., 2005). A adaptação desses organismos aos diversos habitats é favorecida pela combinação de morfologia, da maquinaria bioquímica e de sua grande variabilidade genética (FRAC et al., 2018).

Os fungos são uma fonte sustentável para obtenção dos mais variados compostos e processos (MEYER et al., 2016). Apesar disso, apenas um número pequeno de gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* são utilizados em bioprocessos industriais (BENOCCI et al., 2017; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016). Algumas das várias outras espécies são utilizadas como fonte de enzimas, que podem ser expressas de forma recombinante, por exemplo (BENOCCI et al., 2017).

Alguns fungos filamentosos têm sido usados na indústria de processamento de alimentos por muitas décadas. O potencial industrial destes microrganismos e sua biodiversidade estimulam pesquisas para o desenvolvimento de processos de fermentação em larga escala, purificação de enzimas e métodos de melhoramento de linhagens, contribuindo para um aumento da utilização de fungos na indústria.

1.2.1 O fungo *Phanerochaete chrysosporium*

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* é um membro do filo Basidiomycota. Foi primeiramente descrito como *Sporotrichum pulverulentum*, o qual foi usado para descrever sua forma anamorfa. Geralmente é encontrado em florestas temperadas

pela América do Norte, Europa e Irã. O *P. chrysosporium* foi muito estudado devido à sua capacidade de degradar a lignina, além de uma variedade de compostos orgânicos (LI et al., 2010; SINGH; CHEN, 2008; TAHA et al., 2018b).

Figura 1 – *Phanerochaete chrysosporium* em madeira



Fote: <https://microbewiki.kenyon.edu/images/c/c1/Whiterot.jpg>

O *P. chrysosporium* é considerado uma linhagem modelo para o entendimento e desenvolvimento de processos envolvendo enzimas lignolíticas. Os componentes principais do sistema de degradação da lignina incluem Lignina Peroxidase (LiP) e Peroxidase dependente de manganês (MnP) (MARTINEZ et al., 2004). O sequenciamento de seu genoma relevou genes que codificam proteínas pertencentes às superfamílias do citocromo P450 e Glicose-Metanol-Colina oxidoredutases, enzimas também envolvidas no processo de degradação da lignina. O conjunto de enzimas secretadas pelo *P. chrysosporium* para quebra da lignina é tido como não específico e não seletivo. Desta forma é considerado um dos microrganismos que degrada mais eficientemente este polímero (MARTINEZ et al., 2004; SINGH; CHEN, 2008).

Além das enzimas anteriormente descritas, foram encontrados também genes que codificam para desidrogenases/redutases de cadeia pequena, aspartil peptidases e serino peptidases, produzindo assim uma variada gama de enzimas de oxirredução (LINKE et al., 2014; MARTINEZ et al., 2004).

Nos últimos anos o *P. chrysosporium* também tem sido utilizado para a biorremediação (HUANG et al., 2018; TAHA et al., 2018a). Esse fungo possui uma grande capacidade de degradação de compostos aromáticos devido ao grande potencial oxidativo de suas enzimas. O *P. chrysosporium* pode também degradar muitas substâncias tóxicas como pesticidas, hidrocarbonetos poli aromáticos, além de

compostos halogenados, trinitrotolueno (TNT) e outros poluentes como cianeto, tetracloreto de carbono e metais pesados (GUO; ZHU; LI, 2014; HUANG et al., 2017; SINGH; CHEN, 2008; TARHAN; TONGUL, 2017).

Apesar do grande potencial biotecnológico exibido pelo *P. chryso sporium* para a obtenção de enzimas oxidativas e hidrolíticas, informações sobre as peptidases produzidas por esse microrganismo ainda são escassas. A elucidação de informações referentes ao seu metabolismo e produção enzimática, além de informações sobre a estrutura e mecanismo de catálises destas enzimas podem fornecer as bases para a obtenção de enzimas com grande potencial biotecnológico (SINGH; CHEN, 2008).

1.3 Peptidases de origem microbiana

As peptidases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, plantas e microrganismos. Muitos estudos envolvendo peptidases de origem bacteriana são encontrados na literatura (ANBU, 2013; LI et al., 2013; SINGH et al., 2012). Entretanto, como principal problema, muitas peptidases extraídas de bactérias causam alergias, quando em contato com o homem. Além disso, a extração de enzimas bacterianas para a aplicação na indústria de detergentes revela um alto custo no processo de separação de células. Desta forma a obtenção de preparados enzimáticos livres de células bacterianas limita o seu uso (ALVES et al., 2007).

Enzimas extraídas de fungos filamentosos apresentam certas vantagens quanto à obtenção do preparado enzimático quando comparada as enzimas originárias de bactérias. A extração de enzimas fúngicas se dá facilmente pela filtração do meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos, pois os fungos secretam suas enzimas (WU et al., 2006). Dessa forma, as enzimas provenientes de fungos filamentosos são de baixo custo, pois podem ser facilmente obtidas sem que necessidade de lise das células (ALVES et al., 2007).

1.3.1 Classificação das peptidases e sua especificidade

As peptidases surgiram em estágio precoce da evolução das proteínas, os organismos que possuíam enzimas destrutivas, capazes de realizar reações de catabolismo e degeneração de aminoácidos, foram conservados ao longo da evolução (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008; PRAKASHAM et al., 2005).

Peptidases possuem uma classificação complexa, isso ocorre devido à sua grande diversidade estrutural e de ação (RAO et al., 1998). Estas enzimas são classificadas como hidrolases, Classe nº 3, e pertencem ao subgrupo 4 (E.C. 3.4) (RAO et al., 1998; SANDHYA et al., 2005)

A classificação das peptidases é mais criteriosa do que a apresentada acima, é dividida de acordo com três critérios: a) ligação peptídica a ser clivada (endopeptidases – atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica entre as regiões amino e carboxi-terminal, exopeptidases – atuam somente nas regiões terminais das cadeias polipeptídicas na região amino ou carboxi terminal; RAWLLING & BARRET, 1993), b) natureza química do sítio catalítico (aspártico, glutâmico, metálico, cisteíno, serino e treonino peptidases; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008), c) relações evolutivas, esta divisão é realizada em conformidade com a estrutura molecular. Dentro de cada família, há um número de subfamílias ou clãs exibindo diferentes dobras tridimensionais, mas conservando a disposição de resíduos no sítio ativo. Algumas dessas classificações são mostradas na tabela 1, a seguir.

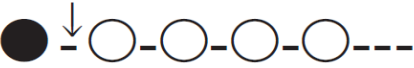
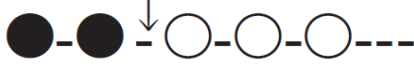

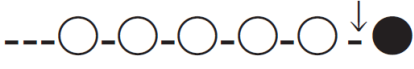
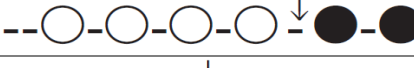

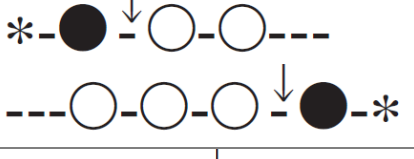
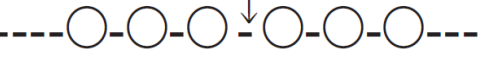
As peptidases podem ser divididas também quanto ao pH ótimo de atuação: ácidas (pH 2,0 – 6,0), neutras (pH 6,0 – 8,0) e alcalinas (pH 8,0 – 13,0; RAO et al., 1998).

A família de peptidase melhor caracterizada e mais fisiologicamente versátil é a das serino peptidases, exemplificada pelas enzimas tripsina, quimiotripsina, elastase e calicreína. A marca de seus sítios ativos é a tríade catalítica: ácido aspártico (Asp), histidina (His) e serina (Ser). A catálise ocorre via um estágio de transição intermediário durante os estágios de acilação e desacilação (KRAUT, 1977).

Estas enzimas possuem atividade na maioria das vezes em pH alcalino/neutro e apresentam diferentes especificidades em relação aos resíduos de aminoácidos que fazem parte da ligação peptídica alvo. Para classificar estas enzimas, inibidores irreversíveis como fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) entre outros, são utilizados (RAO et al., 1998).

As cisteíno peptidases incluem várias catepsinas de mamíferos; a papaína e a actinidina de plantas. O principal resíduo de aminoácido catalítico é a cisteína (Cys). A catálise ocorre via um éster tiol intermediário e é facilitada por cadeias adjacentes de histidina e ácido aspártico (BODE; HUBER, 1992).

Tabela 1 – Classificação das peptidases

Peptidases	Mecanismo de ação
Exopeptidases	
E.C.3.4.11 Aminopeptidase	
E.C.3.4.14 Dipeptidil peptidase	
E.C.3.4.14 Tripeptidil peptidase	
E.C.3.4.16 Serino carboxipeptidase	
E.C.3.4.17 Metalo carboxipeptidase	
E.C.3.4.18 Cistíno carboxipeptidase	
E.C.3.4.15 Peptidil dipeptidase	
E.C.3.4.13 Dipeptidase	
E.C.3.4.19 Omega peptidases	
Endopeptidases	
E.C.3.4.21 Serino peptidases	
E.C.3.4.22 Cisteíno peptidase	
E.C. 3.4.23 Aspartil peptidase	
E.C.3.4.24 Metalo peptidase	
E.C.3.4.25 Treonino peptidase	

Legenda: Os círculos vazios: resíduos de aminoácidos na cadeia de polipeptídeos; círculos em preto: indicam os aminoácidos terminais; asteriscos: bloqueio na porção terminal.

Fonte: RAO et al., 1998, adaptado

Geralmente, as cisteíno peptidases são ativadas apenas na presença de agentes redutores assim como a própria cisteína, mercaptoetanol e qualquer outro reagente que mantenha os grupamentos SH encontrados nestas enzimas em estado reduzido. Não são afetadas por agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Rao *et al.*, 1998).

Metalo peptidases são caracterizadas pela existência de um íon metálico bivalente para a obtenção de sua atividade máxima. A maioria delas possui zinco em seu sítio ativo, mas podem também conter cobalto e níquel (RAO et al., 1998). Diferentemente das cisteíno peptidases, a atividade destas enzimas pode ser inibida pela ação de agentes quelantes como o EDTA.

As metalo peptidases, carboxipeptidases A e B são exopeptidases homólogas, em estrutura e sítio ativo. A carboxipeptidase A atua preferencialmente no carbono aromático terminal e cadeias alifáticas de natureza hidrofóbica, enquanto a carboxipeptidase B atua diretamente sobre os resíduos básicos de arginina e lisina. A termolisina bacteriana é a única representante das metalo endopeptidases de estrutura e mecanismo de ação bem definidos. Seu sítio ativo é relacionado àquele das metalo carboxipeptidases (NEURATH, 1990).

O grupo das treonino peptidases possui 4 famílias e apresenta mecanismo de reação que se utiliza do álcool secundário de uma treonina localizada na região N-terminal da proteína como nucleófilo (BRANNIGAN et al., 1995; CHENG; GRISHIN, 2005).

O recente grupo das peptidases glutâmicas foi separado do grupo das peptidases aspárticas por ser insensível à pepstatina A (ODA, 2004). O mecanismo de hidrólise ainda não foi bem elucidado, mas sabe-se que o resíduo de ácido glutâmico atua como nucleófilo ativado por água (KONDO et al., 2010).

Aspartil peptidases são, na maioria das vezes, ácidas e possuem em seu sítio ativo um ácido aspártico essencial para exercer sua atividade catalítica. Essas enzimas são inibidas por pepstatina A, e possuem sensibilidade a compostos de diazoquetonio como diazoacetil-DL-norleucina metilester (DAN) e 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano (EPNP) (RAO et al., 1998). Este grupo de peptidases incluem a penicilopepsina bacteriana, a pepsina de mamíferos, a renina, a quimosina e certas peptidases fúngicas (NEURATH, 1990).

A habilidade das peptidases em discernir entre dois ou mais substratos que competem entre si ocorre em função das características físico-químicas dos subsítios desta subclasse de enzima e também dos substratos que interagem com a mesma (SCHECHTER; BERGER, 1967).

Schechter e Berger (1967) elaboraram a nomenclatura do sítio catalítico das peptidases, dividindo-o em séries de subsítios, sendo que cada subsítio acomoda um único e consecutivo resíduo de aminoácido do substrato. Os resíduos de aminoácidos dos substratos são numerados a partir do ponto de clivagem da ligação peptídica. A porção $P_n \dots -P_3-P_2-P_1$ está na direção aminoterminal, já a porção $P'_1-P'_2-P'_3 \dots -P'_n$ está na direção carboxiterminal do substrato, enquanto os subsítios correspondentes na peptidase são $S_n \dots -S_3-S_2-S_1-S'_1-S'_2-S'_3 \dots -S'_n$ (HAMIN NETO et al., 2017; SCHECHTER; BERGER, 1967).

1.4 Produção recombinante de proteínas

A produção de enzimas recombinantes pode oferecer vantagens quando comparada com a enzima purificada do microrganismo de origem. Dentre as diversas vantagens, a expressão recombinante pode produzir proteínas em concentrações maiores, além de facilitar, em alguns casos, as etapas de purificação (PEREIRA et al., 2004). Diversos sistemas como células de bactérias, fungos e leveduras, mamíferos e insetos, podem ser utilizados para a expressão recombinante e a escolha do sistema deve se basear nas características da proteína de interesse (SCHMIDT, 2004).

Dentre os sistemas bacterianos a *E. coli* é o mais utilizado. Estima-se que cerca de 30% dos produtos biofarmacêuticos recombinantes aprovados nos Estados Unidos foram produzidos por esse sistema. Outro importante sistema bacteriano é o *Bacillus subtilis*, ele apresenta algumas vantagens sobre a *E. coli* que inclui um potencial de secreção de proteínas, além de ser um sistema considerado seguro GRAS (generally recognized as safe, inglês; SCHMIDT, 2004).

A utilização sistemas de expressão bacterianos possui uma série de desvantagens. Usualmente estes sistemas apresentam instabilidades nos plasmídeos, além de não realizarem modificações pós traducionais, que são importantes para a estabilização da estrutura terciárias de algumas proteínas. Somado a isso, a ausência de um sistema de secreção e altas taxas de expressão podem levar a formação de corpos de inclusão (PORRO et al., 2011).

Os sistemas de expressão de células de leveduras foram desenvolvidos, inicialmente, como alternativas para solucionar os problemas apresentados pelos sistemas bacterianos. Esses sistemas, representados pela *S. cerevisiae*, possuem um sistema de secreção otimizado e realizam modificações pós traducionais, diferentemente das bactérias (AHMAD et al., 2014; JUTURU; WU, 2018).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada pela primeira vez como um sistema de expressão em 1980 e, ainda hoje, é um dos principais sistemas de expressão utilizados (WANG; HUANG; NIELSEN, 2017). Esse microrganismo foi o primeiro eucarioto a ter o genoma sequenciado, sendo fundamental para o entendimento sobre a organização do genoma e dos processos celulares em eucariotos (BAGHBAN et al., 2019). Apesar de apresentar grandes vantagens em relação aos sistemas bacterianos, a expressão de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae* pode gerar proteínas hiperglicosiladas. A hiperglicosilação pode diminuir a

atividade, no caso de enzimas, e aumentar a imunogenicidade (BAGHBAN et al., 2019; JUTURU; WU, 2018).

Diversos outros sistemas baseados em leveduras, além da *S. cerevisiae*, foram desenvolvidos, estes sistemas são classificados de acordo com a assimilação de metanol como fonte de carbono, podendo ser não metilotróficas ou metilotróficas. Dentre as leveduras classificadas como não metilotróficas, os sistemas mais comuns são: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailli*, *Pichia stipites*, *Kluyveromyces marxinus*, *Saccharomyces occidentalis* e *Zygosaccharomyces rouxii*. Os sistemas capazes de assimilar metanol (metilotróficas) incluem a *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia minuta* e *Candida boidinii* (BAGHBAN et al., 2019; SCHMIDT, 2004).

A *Pichia pastoris* tem se tornado um dos mais importantes na indústria, por possuir características que permitem maior produção e rendimento de proteínas recombinantes (AHMAD et al., 2014; JUTURU; WU, 2018).

1.4.1 O sistema *Pichia pastoris*

A *Pichia pastoris* foi utilizada primeiramente como proteína unicelular (*single cell protein*, *SCP*, sigla em inglês) na suplementação de ração animal, a obtenção biomassa era realizada por processo fermentativo que alcançava altas densidades celulares e utilizava metanol como fonte de carbono (GASSER; MATTANOVICH, 2018).

Esse sistema possui algumas vantagens em relação da *S. cerevisiae* que inclui a preferência pela via aeróbica e a capacidade de metabolizar o metanol através da via bioquímica conhecida como via da utilização de metanol, *MUT* (*methanol utilization pathway*, inglês), que é regulada por um forte promotor, álcool oxidase (AOX).

Essa via é completamente reprimida na presença de algumas fontes de carbono, como a glicose, mas é fortemente induzida na presença de metanol, chegando a constituir cerca de 20 a 30% das proteínas intracelulares totais. Dois genes regulam essa via, o AOX1, considerado um promotor forte, e o AOX2, um promotor fraco (BAGHBAN et al., 2019; JUTURU; WU, 2018; VOGL; GLIEDER, 2013).

Todas as linhagens de *P. pastoris* são derivadas da linhagem NRRL-Y 11430, uma linhagem auxotrófica que possui um ou alguns genes de seu metabolismo deletado. Baseando-se no metabolismo do metanol as linhagens podem ser classificadas de acordo com o gene, AOX1 e AOX2, deletado. Linhagens Mut⁺ contém

os dois genes, as linhagens Mut^r não possui AOX1 e AOX2 e Mut^s não possui o AOX1. Algumas linhagens comerciais, como a GS115 (his4) possui ambos AOX 1 e 2, a KM71, não possui o AOX1 e, a linhagem MC100-3 não possui os genes AOX e não é capaz de crescer em metanol (BAGHBAN et al., 2019; GASSER; MATTANOVICH, 2018; VOGL; GLIEDER, 2013).

Algumas linhagens de *P. pastoris* utilizam diferentes promotores como o GAP, além de promotores chamados de alternativos, como o DASS, PGK1, TEF1 AOD e PHO89 (VOGL; GLIEDER, 2013).

Os vetores comerciais de *P. pastoris* estão disponíveis comercialmente. Esses vetores usualmente contêm, principalmente, um sítio múltiplo de clonagem, promotor da AOX1, um sinal de secreção e um marcador de seleção, que pode ser um antibiótico (zeocina, blasticidina ou kanamicina). Os vetores pPICZ α , PichiaPink, GlycoSwitch são os mais utilizados (BAGHBAN et al., 2019; JUTURU; WU, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Análise do transcriptoma do fungo *Phanerochaete chrysosporium* para a identificação de peptidases aspartil e cisteíno para produção heteróloga e para estudos bioquímicos e funcionais.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar cultivo submerso, em diferentes condições, com o fungo *P. chrysosporium*;
- Determinar a atividade enzimática presente no extrato obtido do cultivo submerso do fungo em diferentes fontes;
- Construir uma biblioteca contendo as proteínas transcritas nas condições de cultivo;
- Identificar e selecionar sequências de peptidases utilizando a biblioteca de transcritos;
- Clonar e expressar os genes de peptidases em *Pichia pastoris*;
- Realizar a purificação e caracterização bioquímica (pH e temperatura) de peptidases heterólogas.

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismos e meio de manutenção

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi isolado de matéria orgânica em decomposição no solo. Este fungo é cultivado em placas contendo ágar batata dextrosado (PDA) à 30 °C por 7 dias. As culturas são mantidas em PDA a 4 °C para manutenção e são repicadas periodicamente para o uso.

3.2 Cultivo submerso

Os meios base para os cultivos submersos foram compostos de: KH_2PO_4 (0,7%), KHPO_4 (0,2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%), Citrato. $2\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), extrato de levedura (0,1%) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01%) e suplementados, separadamente, com farinha de pena (1%), ou azeite de oliva (1%), ou caseína (1%) ou avicel (1%). O pH inicial de todas as condições foi ajustado para 6,0.

O inóculo foi preparado após o cultivo do fungo por uma semana em erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL meio ágar batata dextrosado (PDA) inclinado. Após o cultivo, adicionou-se 20 mL de água ultrapura estéril à cultura, o micélio foi raspado e transferido para um novo frasco. Em cada frasco contendo o meio do cultivo, foi inoculado 1 mL de suspensão de micélio de *P. chrysosporium* (DA SILVA et al., 2017a, 2017b).

Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio. O tempo total de cultivo foi de 120 horas, a temperatura e a agitação foram mantidas em 30°C e a 120 rpm, respectivamente. A cada 24 horas, foram retirados 4 erlenmeyer, 1 para cada condição. Ao final, os cultivos foram filtrados e a atividade enzimática para amilase, CMCase, pectinase, peptidase, lipases e xilanase, foi determinada no filtrado.

3.3 Ensaio de atividade enzimática nos filtrados do cultivo submerso

3.3.1 Atividade de amilase, CMCase, pectinase e xilanase

Para avaliar a atividade de amilase, endoglucanase (CMCase), pectinase e xilanase, foram preparados diferentes substratos contendo amido solúvel (Synth), carboximetilcelulose (CMC-Synth), pectina cítrica (Vetec) e xilana de madeira de faia

(Sigma, X0502) na concentração de 0,5% em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0).

O tampão acetato de sódio foi aquecido a 85 °C e mantido sob agitação em agitador magnético. A massa de cada substrato, correspondente à 0,5% (m/v), foi então adicionada lentamente ao tampão até a formação de uma solução homogênea.

Para as reações, foram incubados 25 µL do filtrado juntamente com 25 µL de substrato. A reação foi interrompida, após 30 minutos, com a adição de 50 µL de solução ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Em seguida, as amostras foram transferidas para um banho fervente, 96 °C por 5 minutos. Ao final, adicionou-se 400 µL de água ultrapura, em cada tubo. Um branco, preparado após fervura dos extratos enzimáticos por 10 minutos, também foi submetido ao ensaio.

As amostras foram lidas em leitor de placas (ScpectraMax, Molecular Devices) no comprimento de onda de 540 nm. A liberação de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959). A unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µg de açúcar redutor sob as condições de ensaio.

3.3.2 Atividade de lacase

Para o ensaio de lacase, 50 µL do filtrado foi incubado com 100 µL de solução 1 mM de ácido 2,2'-azino-bis(3etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) por 10 minutos, de acordo com Ning et al. (2016). A reação foi interrompida pela adição de 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% a leitura da amostra foi realizada em leitor de placas (ScpectraMax, Molecular Devices) em 405 nm. Um branco, com a enzima desnaturada pela adição de TCA 10%, foi preparado e submetido a reação.

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 1 unidade sob as condições do ensaio (NING et al., 2016).

3.3.3 Atividade de lipase

O ensaio da atividade de lipase foi realizado após o preparo do substrato composto por uma solução de 8 mM de palmitato de p-nitrofenila (Sigma, N2752) solubilizado em 2 mL de isopropanol e uma segunda solução composta por 18 mL de tampão bicina (50 mM, pH 8,5), 10 mg de goma arábica e 50 µL de Triton X-100

(Sigma, 93418). Após o preparo das duas soluções, a solução contendo palmitato de p-nitrofenila foi mantida sob agitação branda enquanto a segunda foi vertida lentamente sobre ela.

O ensaio foi realizado de acordo com Pereira e colaboradores (2014), com modificações. Para a reação, 50 μL do filtrado foi incubado com 450 μL de substrato. A reação foi interrompida, após 30 minutos, pela imersão das amostras em banho a 96° C por 1 minuto, seguida de imersão em banho de gelo. Por fim, foi adicionado ao volume reacional 500 μL de solução saturada de tetraborato de sódio. A liberação de p-nitrofenol foi determinada pela leitura da reação em 410 nm em leitor de placas (SpectraMax, Molecular Devices), contra seus respectivos brancos. Os tubos brancos foram preparados após fervura do filtrado, por 5 minutos, e submetidos às mesmas condições dos tubos reacionais.

Para determinar a concentração de p-nitrofenol liberado durante a reação, foi utilizada a equação da reta obtida pela correlação entre os valores de x (concentração em $\mu\text{mol/mL}$) e y (ABS410nm). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μM de p-nitrofenol/min sob as condições do ensaio (PEREIRA et al., 2014).

3.3.4 Atividade de peptidase

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com ensaio caseinolítico descrito por Sarath; De La Motte; Wagner (1996), com algumas modificações. A mistura reacional foi composta por 200 μL de filtrado e 1 mL de solução caseína 1% (m/v; Sigma) dissolvida em tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M, pH 6,5. A reação foi realizada a 45 °C e interrompida com a adição de 0,6 mL de ácido tricloroacético 10% (TCA) após 120 minutos. Um branco, para cada reação, foi preparado após da desnaturação da enzima pela adição de TCA previamente a reação enzimática.

As amostras foram centrifugadas a 10000 x g durante 15 minutos a 25 °C, e a absorbância do sobrenadante foi mensurada em 280 nm em espectrofotômetro. Para cada tubo de reação foi preparado um tubo controle (branco), em que o TCA foi adicionado anteriormente a solução enzimática. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μM tirosina/min sob as condições de ensaio (MEYERS; AHEARN, 1977).

3.4 Preparo e purificação do filtrado suplementado com farinha de pena

Para essa etapa, foram selecionados os extratos suplementados com farinha de pena 1% com a maior atividade enzimática no ensaio caseinolítico, pontos a partir de 72 horas de cultivo. Os pontos selecionados foram concentrados em uma unidade de ultrafiltração Amicon® 50 mL (Millipore), com membrana de Ultracel® 5 kDa (Millipore), e dialisados com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. O volume final do extrato concentrado foi de, aproximadamente, 15 mL.

3.4.1 Cromatografia de troca iônica

Na etapa de purificação do filtrado concentrado, utilizou-se uma coluna de 10 mL Tricorn 10/50 empacotada com resina catiônica SOURCE™ 15S. O extrato concentrado foi dividido em alíquotas e para cada corrida foram injetados 2 mL de amostra na coluna. Para a eluição das enzimas de interesse, utilizou-se um gradiente (0 a 100%) de tampão acetato de sódio 50 mM suplementado com 200 mM de NaCl, de acordo com Da Silva et al. (2017), e foram coletadas alíquotas de 5 mL.

Após a cromatografia, duas frações foram obtidas e classificadas de acordo com a interação com a resina: a fração não ligada e a fração ligada. Conforme já descrito na literatura, a fração 'não ligada' contém uma aspartil peptidase como massa molecular de aproximadamente 38 kDa, positiva para o ensaio com o substrato Abz-KLRSSVQ-EDDnp e a fração 'ligada', corresponde à fração positiva para o ensaio com caseína, que contém uma cisteíno peptidase (aproximadamente 23 kDa) (DA SILVA et al., 2017a, 2017b).

3.5 Obtenção da sequência do N-terminal de peptidases

Para a obtenção do N-terminal, foram feitos diferentes *pools* das frações 'ligada' e 'não ligada', provenientes da cromatografia de troca iônica, que foram novamente concentradas em uma unidade de ultrafiltração Amicon® 50 mL (Millipore), com membrana Ultracel® 5 kDa (Millipore). As amostras foram dialisadas com água e o volume final foi de aproximadamente 15 mL de solução e, em seguida, elas foram congeladas (-80 °C) e liofilizadas. Após a liofilização, as amostras foram ressuspensas em 400 µL de água ultrapura.

As amostras foram submetidas a uma eletroforesese SDS-PAGE, utilizando um gel *Mini-PROTEAN®TGX™* (BIO-RAD, USA) 4-15% e tampão de cuba (Tris 14,4%,

Glicina 3% e SDS 1%). Após a eletroforese, o gel foi submetido ao blotting utilizando uma célula de transferência eletroforética *Trans-Blot® SD Semi-Dry* (BIO-RAD) e membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).

A transferência das proteínas para a membrana de PVDF ocorreu depois da aplicação de uma voltagem de 20 V por 50 minutos, na presença de uma solução de transferência (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 20% de Metanol (v/v), 1,3 mM SDS), pH 9,2. Após a transferência, a membrana foi imersa em uma solução corante (0,025% Comassie Brilliant Blue e metanol 40%) por 10 minutos, seguido da imersão em solução descorante (Metanol 50%), também por 10 minutos. As bandas correspondentes às enzimas de interesse (aspartil e cisteíno peptidases) foram enviadas para o sequenciamento do N-terminal via degradação de Edman.

O sequenciamento do N-terminal foi feito em parceria com o laboratório coordenado pela prof. Dra. Eliane Candiani Arantes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP.

3.6 Extração do RNA total e construção da biblioteca de transcritos do fungo

A biomassa de todas condições de cultivo (avicel 1%, azeite 1%, caseína 1% e farinha de pena 1%) foi misturada em um tubo Falcon (50 mL), de acordo com o tempo de cultivo, resultando em uma mistura de biomassas para cada ponto do cultivo (24-120 horas). A mistura de biomassas foi feita na tentativa de obter um proteoma mais amplo possível para cada ponto do cultivo. Os tubos contendo a mistura de biomassas foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos à -80 °C até a extração do RNA.

A extração do RNA foi feita após a maceração das amostras na presença de nitrogênio líquido, 50 mg do macerado de cada amostra foram transferidos para um microtubo *Eppendorf* de 2 mL, seguido da adição de 1 mL de Trizol. As análises de qualidade do RNAm extraído foram feitas pelo equipamento *Bioanalyzer 2100* (Agilent) utilizando o *RNA 6000 Nano Kit* (Agilent).

Para síntese do cDNA, as concentrações finais de todas as amostras de RNA total, extraídos anteriormente, foram ajustadas para 3,5 ng/μL e, em seguida, foi feito um *mix* contendo 2 μL de RNAm de todas as amostras. O *mix* foi utilizado para síntese do cDNA, através do kit *TruSeq RNA Sample Preparation v2 LS* (Illumina). Após a síntese do cDNA, uma nova análise da amostra foi realizada pelo *Bioanalyzer 2100* (Agilent) e, após essa etapa, a amostra seguiu para o sequenciamento.

A biblioteca de transcritos foi construída utilizando o *software Trinity*, utilizando as sequências obtidas do mix de cDNA. A predição das regiões codificadoras das sequências foi feita pelo *software TransDecoder* e a anotação funcional pelo *Trinotate*. Esta etapa foi feita em parceria com o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE, Campinas, SP.

3.7 Expressão da aspartil e cisteíno peptidases recombinantes em *Pichia pastoris*

Para a expressão de proteínas recombinantes, utilizou-se a cepa KM71H de *Pichia pastoris*.

3.7.1 Vetor de clonagem

Todos os experimentos foram realizados com o plasmídeo *pPICZαA*. O plasmídeo foi obtido da empresa BIOMATIK (EUA) já contendo os genes das peptidases. Os controles de qualidade das duas construções encontram-se nos anexos A e B.

3.7.2 Preparo e transformação das células de *Pichia pastoris*

Para o preparo das células, foi feito um pré-inóculo em que colônias de *P. pastoris* KM71H, inicialmente em uma placa contendo meio *yeast extract peptone dextrose ágar* (YPD ágar) (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2% e ágar 2%), foram transferidas para um tubo Falcon de 50 mL, contendo 5 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%) – pré-inóculo.

O pré-inóculo foi incubado por 8 horas, à 30 °C, sob agitação (250 rpm). Em seguida, 50 µL do pré-incóculo foi transferido para um frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio YPD (inóculo) e, novamente, incubado à 30 °C, 250 rpm. Após 16 horas de cultivo, a D.O.₆₀₀ foi determinada. Valores entre 1,0 a 1,5 foram aceitos.

O inóculo foi centrifugado à 1500 x g, por 10 minutos à 4 °C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de YPD e 2 mL de tampão HEPES (1 M, pH 7,0) e ao final adicionou-se 250 µL de ditioneitol (DTT) 1 M em 10 mM acetato de sódio (pH 5,2). Essa mistura foi incubada à 30 °C por 15 minutos em estufa e após

esse período, foi adicionado, aproximadamente, 38 mL de água gelada, seguida de uma nova centrifugação (1500 x g, por 10 minutos, 4 °C). Novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 25 mL de água gelada. Após uma nova centrifugação (1500 x g, 10 minutos, 4 °C), o *pellet* foi ressuspensão em 2 mL de sorbitol gelado, seguido de nova etapa de centrifugação e descarte do sobrenadante. Ao final, o *pellet* foi ressuspensão em 100 µL de sorbitol 1 M e foram coletadas alíquotas de 40 µL que foram utilizadas para a transformação.

Para a transformação das células de *P. pastoris*, 3 µg dos plasmídeos foram linearizados, utilizando 1 µL da enzima Pmel (Anza™ 24 Mssl), e purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). A transformação foi feita com a adição 500 ng de DNA linearizado às células competentes, seguido de eletroporação (1,5 KV; 25µF; 200Ω) em cubeta de 0,2 cm de largura e banho de gelo por 5 minutos. Após o banho de gelo, foram adicionados 1 mL de sorbitol 1 M e 1 mL de YPD às células eletroporadas que foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL e incubadas por 2 horas, 30 °C, em estufa.

Após o período de incubação, as células foram plaqueadas em meio *yeast extract peptone dextrose sorbitol ágar* (YPDS), suplementado com 100 µg/mL ou 500 µg/mL de Zeocina™ (Invitrogen, EUA). As placas foram incubadas em estufa, à 30 °C, por 48 horas. Os clones, isolados, positivos foram repicados em uma nova placa contendo o meio YPD ágar, suplementado com 100 µg/mL de zeocina, e numeradas de acordo com a ordem de repique. A placa foi, novamente, incubada à 30 °C, por 24 horas e, depois, foi mantida à 4 °C.

3.7.3 Screening dos clones positivos para as construções *pPICZαA-DN10508* e *pPICZαA-DN7040*

Os clones provenientes da placa contendo YPD ágar, suplementado com 100 µg/mL de zeocina, foram transferidas para diferentes mini biorreatores *Corning®* de 50 mL contendo, cada tubo, 10 mL de *Buffered Glycerol-complex Medium* (BMGY), composto por: meio base 70% (1% extrato de levedura e 2% peptona), Glicerol 10% (solução á 10%), *Yeast nitrogen base* 10% (Sigma) (Solução à 13,4 %), tampão fosfato 1M 10% e biotina 0,2% (solução à 0,02%). Todas as culturas foram incubadas em agitador às 250 rpm, 30 °C, por 48 horas.

Após 48 horas, as culturas em BMGY foram centrifugadas a 1500 x g, por 5 minutos, seguido de descarte do sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensão em 7 mL de *Buffered Methanol-complex Medium* (BMMY) (meio base 70%, Metanol 10% (solução à 5%), *Yeast nitrogen base* 10% (Sigma) (Solução à 13,4 %), tampão fosfato 1 M 10% e biotina 0,2% (solução à 0,02%). A indução foi iniciada com a adição de 0,75% de metanol às culturas seguido da retirada de uma alíquota de 100 µL (tempo zero de indução). A cada 24 horas de cultivo, foram retiradas alíquotas de 300 µL (24h – 144h) e adicionados 0,75% (v/v) de metanol. Um controle com a *Pichia pastoris* KM71H não transformada também foi submetida à indução em meio BMMY com metanol 0,75%.

Após o período de indução, os cultivos foram centrifugados (5 minutos, 3000 x g) e o sobrenadante foi analisado em SDS-PAGE e submetido a avaliação de atividade enzimática, utilizando o ensaio descrito no item 3.3.4. O controle contendo a *P. pastoris* sem as construções também foi submetido às análises.

3.7.4 Expressão em maior escala de proteínas recombinantes

Para a produção das duas enzimas recombinantes, os clones selecionados após *screening* foram cultivados, por 24 horas de cultivo (250 rpm a 30 °C) em tubo Falcon 50 mL contendo 10 mL de BMGY (pré-inóculo). Após esse período, o pré-inóculo foi vertido em um erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de BMGY (inóculo) que foi mantido a 250 rpm, 30 °C, por mais 24 horas.

Para a indução, as culturas foram centrifugadas (1500 x g, por 5 minutos) e o *pellet* foi ressuspensão em 100 mL de BMMY. A cada 24 horas de cultivo foram adicionados 0,75% de metanol na cultura. O tempo cultivo foi de 144 h, após o início da indução com metanol. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE.

3.7.5 Purificação de peptidases recombinantes por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)

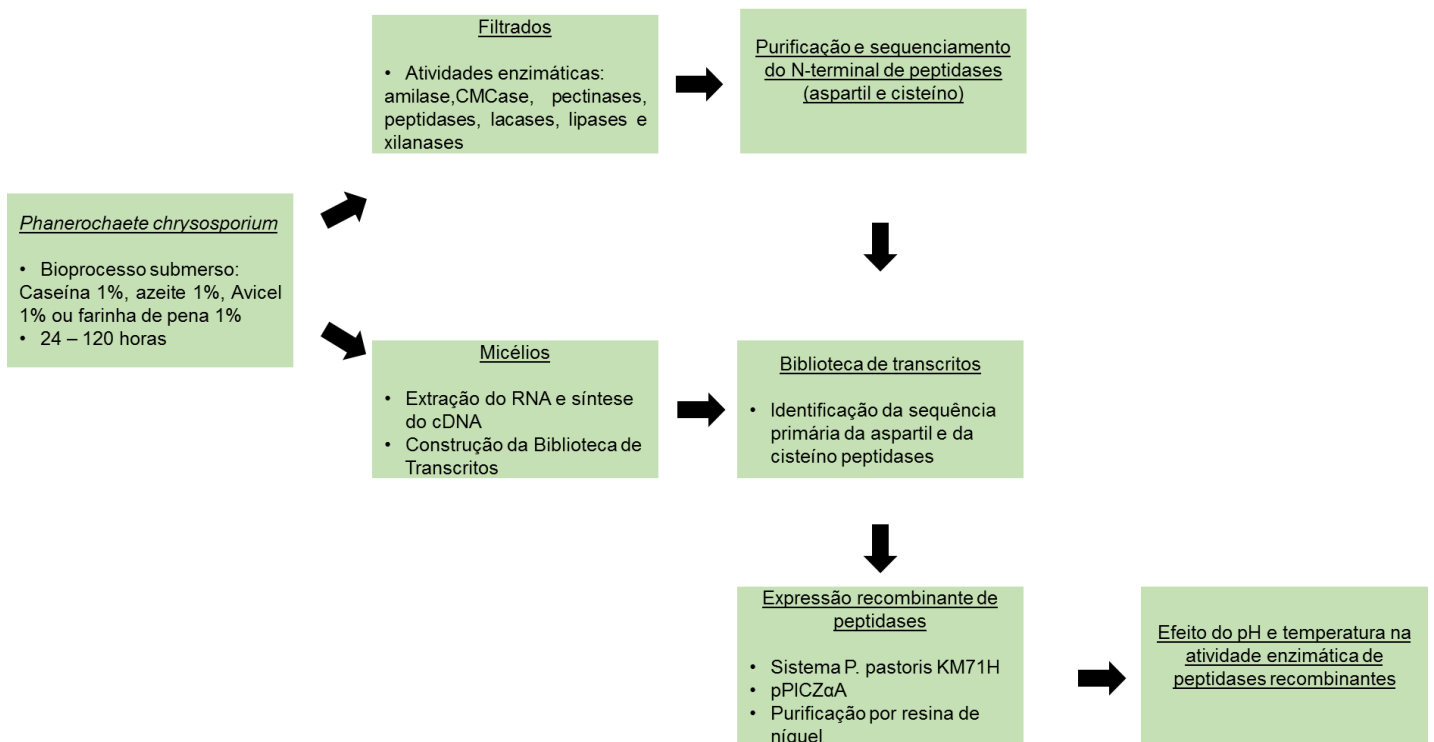
Após a indução da expressão das proteínas, as células de *P. pastoris* foram centrifugadas (5 minutos, 3000 x g) e o sobrenadante foi filtrado com membrana *MF® membrane filters* 0,45 µm (Millipore) e mantido em banho de gelo. Previamente à aplicação da amostra na coluna, foi adicionado, em uma proporção de 3 volumes de filtrado para 2, o tampão de lise (Tris 10 mM, NaH₂PO₄ 57 mM e NaCl 200 mM).

A mistura (filtrado e tampão de lise) foi aplicada em uma coluna *Tricorn* empacotada com 5 mL de resina *Ni Sepharose™ excel* (GE Healthcare). A eluição das proteínas recombinantes ocorreu após um gradiente de concentração (0 a 100%) do tampão de lise suplementado com Imidazol (250 mM). Foram coletadas alíquotas de 1 mL e as diferentes alíquotas foram analisadas em SDS-PAGE.

3.8 Fluxograma experimental

A Figura a seguir resume os experimentos descritos na seção:

Figura 2 – Fluxograma experimental



Fonte: autor

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de enzimas nativas por cultivo submerso utilizando o fungo *P. chrysosporium*

A caracterização dos filtrados mostrou que, nas condições avaliadas, o *P. chrysosporium* produziu uma variedade de enzimas de interesse industrial. A Figura 3,

a seguir, mostra a atividade enzimática detectada de amilase, lacase, lipase, peptidase, pectinase e xilanase nos tempos de 24 a 120 horas de cultivo com diferentes indutores.

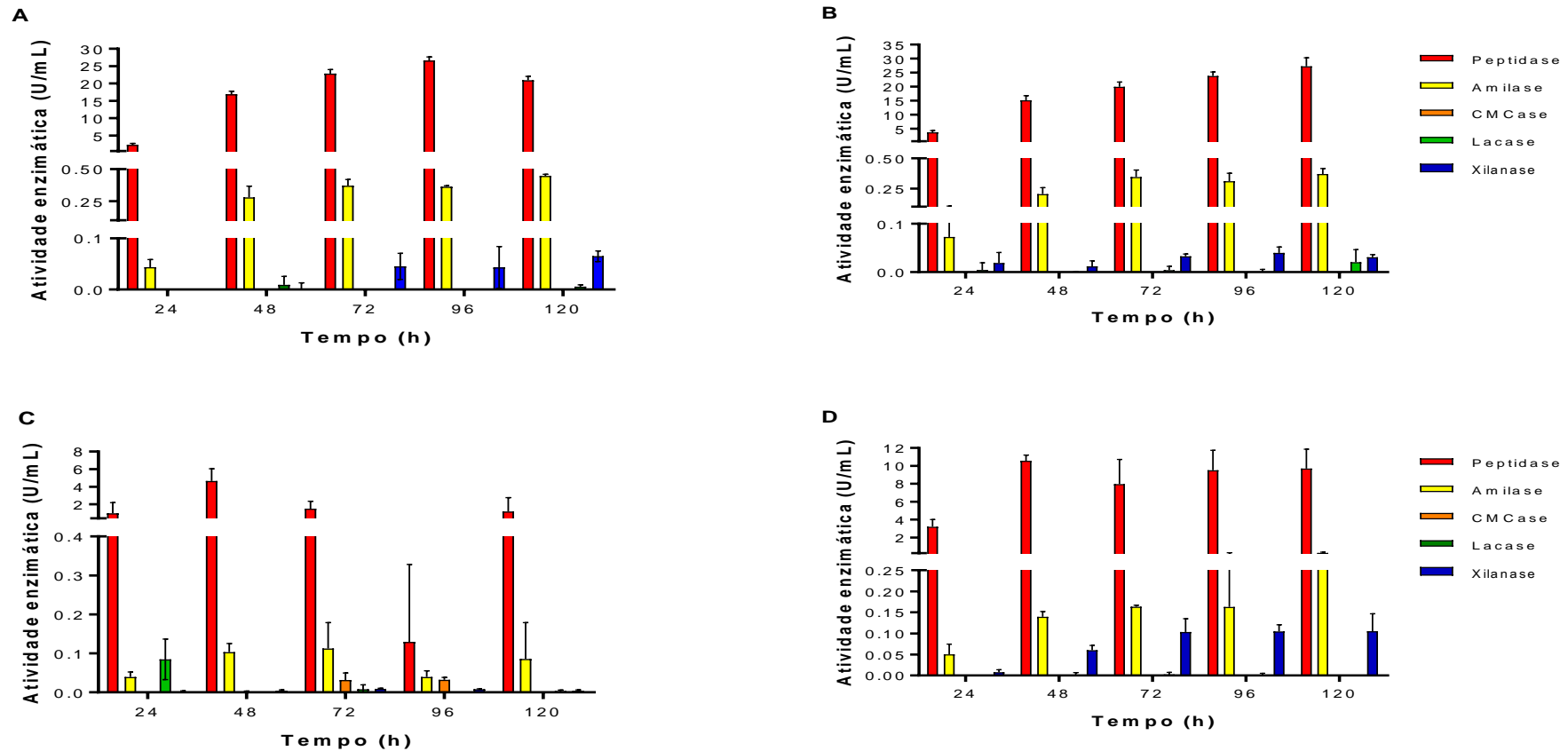
A atividade de peptidases foi observada em todas as condições e em todos os tempos avaliados (Figura 3). Os meios suplementados com farinha de pena e caseína, dois substratos proteicos, apresentaram as atividades mais expressivas para as peptidases, atingindo $23,6 \pm 5,21$ U/mL/min, no tempo de 72 horas, e $27,26 \pm 3,02$ U/mL/min com 120 horas de cultivo, respectivamente.

A atividade de amilase também foi observada em todas as condições e tempos avaliados. Novamente, as atividades mais expressivas foram observadas nos meios suplementados com farinha de pena e caseína, chegando a $0,45 \pm 0,01$ U/mL, para farinha de pena, e $0,37 \pm 0,04$ U/mL/min para caseína, ambos com 120 horas de cultivo. O meio suplementado com azeite 1% apresentou atividade máxima para amilases com 120 horas de cultivo e o meio suplementado com avicel entre 48 e 72 horas.

Os meios suplementados com caseína e avicel foram as duas únicas condições em que foram observadas atividades de CMC_{Case} e lacase. A CMC_{Case} foi observada apenas no meio suplementado com avicel, após 72 horas de cultivo e a lacase foi observada após 24 horas e após 120 horas nos meios contendo avicel e caseína, respectivamente.

A atividade de xilanase foi observada em todas as condições avaliadas entretanto, o meio suplementado com azeite de oliva apresentou as atividades mais expressivas, após 96 horas de cultivo, quando comparado às demais condições. Não se observou atividades de lipases e pectinases.

Figura 3 – Atividade enzimática em diferentes filtrados produzidos por *P. chrysosporium*. A figura mostra a atividade enzimática de peptidase, amilase, CMCase, lacase e xilanase, para os substratos caseína (1%), amido solúvel (0,5%), carboximetilcelulose (0,5%), ABTS (1 mM) e xilana de madeira de faia (0,5%), em relação ao tempo de cultivo. A reação ocorreu por 120 min, para peptidase, 10 min para lacase, e 30 min para as demais. Os meios foram suplementados com: (A) Farinha de pena 1%, (B) Caseína 1%, (C) Avicel 1% e (D) Azeite de Oliva 1%.



Fonte: autor

4.2 Purificação por cromatografia de troca iônica e obtenção do N-terminal de peptidases nativas

4.2.1 Fração não ligada

A Figura 4A, abaixo, mostra as bandas presentes na fração não ligada após cromatografia de troca iônica com resina Source 15S. A banda mais escura (Figura 4A, coluna 4, seta) corresponde à aspartil peptidase, previamente descrita por Da Silva et al. (2017b), com tamanho aproximado de 38 kDa.

Para obtenção do N-terminal, as proteínas foram transferidas do gel de gradiente (4-15%) para membrada de PVDF, conforme mostrado na figura 2B. A banda referente à proteína de interesse (Figura 4B, coluna 2, seta) foi recortada e enviada para o sequenciamento do N-terminal, via degradação de Edman.

Ao todo, 30 resíduos de aminoácidos foram identificados após a degradação de Edman, resultado na sequência: RTFTVYNG**APFTIC**PAM**FTXLNXGXAVPAY**. Algumas posições apresentaram variações dos resíduos, como, por exemplo, as posições 9, 15 e 18 (mostrados acima em vermelho). Considerando que a incerteza sobre os resíduos aumenta consideravelmente a partir do resíduo 18, apenas os resíduos 1 ao 18 (resíduos sublinhados acima) foram submetidos à análise utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*.

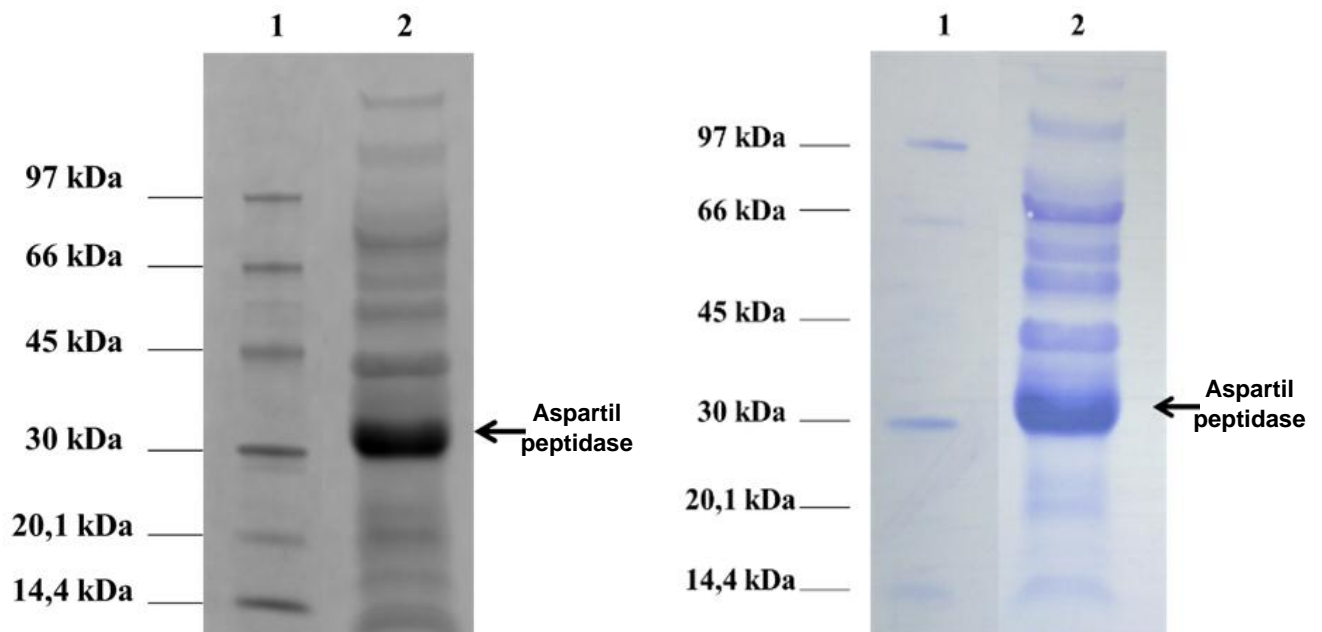
O alinhamento da sequência do N-terminal com as sequências do banco de dados do *BLAST* mostrou que há identidade de 94,44% com uma sequência de uma proteína hipotética do fungo *Phanerochaete carnosae*. Há também identidade, acima de 90%, com outras sequências de proteínas hipotéticas de outras espécies de fungos, como: *Fomitopsis pinicola* e *Postia placenta*, 93,75% e 92,31%, respectivamente. Os resultados também mostram que há identidades acima de 80% entre a sequência do N-terminal com sequências anotadas como 'proteínas tipo Taumatinas' (*TLP*, *inglês*) e osmotinas. As 10 primeiras sequências são mostradas na tabela a seguir (Tabela 2).

A figura 5, mostra a posição em que a sequência de resíduos de aminoácidos do N-terminal é alinhada às demais sequências obtidas pelo BLAST.

A sequência de resíduos do N-terminal obtido alinhou-se com as demais sequências após resíduo 31 das proteínas do banco de dados. Observa-se que a maioria dos resíduos das porções alinhadas com o N-terminal é idêntica (Figura 5, em

vermelho) em todas as proteínas. Além disso, as sequências de proteínas obtidas pelo *BLAST* apresentam muitos resíduos conservados entre si (Figura 5, em azul).

Figura 4 – SDS-PAGE e membrana de PVFD da fração não ligada da cromatografia de troca iônica. A figura (A) mostra o gel de gradiente (4 a 15%) após eletroforese SDS-PAGE da fração não ligada concentrada da cromatografia de troca iônica. O marcador é mostrado na primeira coluna. Na segunda coluna, indicada pela seta, é mostrada a banda correspondente à aspartil peptidase (aproximadamente 38 kDa). (B) Membrana de PVDF contendo a fração não ligada da cromatografia de troca iônica após etapa de transferência. A banda correspondente à aspartil peptidase (coluna 2) está indicada pela seta. Na coluna 1 (A e B) observa-se o marcador. As bandas do marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare) são: Fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).



Fonte: autor

A presença de resíduos anteriores a sequência do N-terminal, nas demais sequências sugere a presença de um peptídeo sinal. Uma vez que essa proteína foi encontrada no filtrado, ou seja, fora da célula, esses resultados corroboram os experimentos prévios ao sequenciamento do N-terminal.

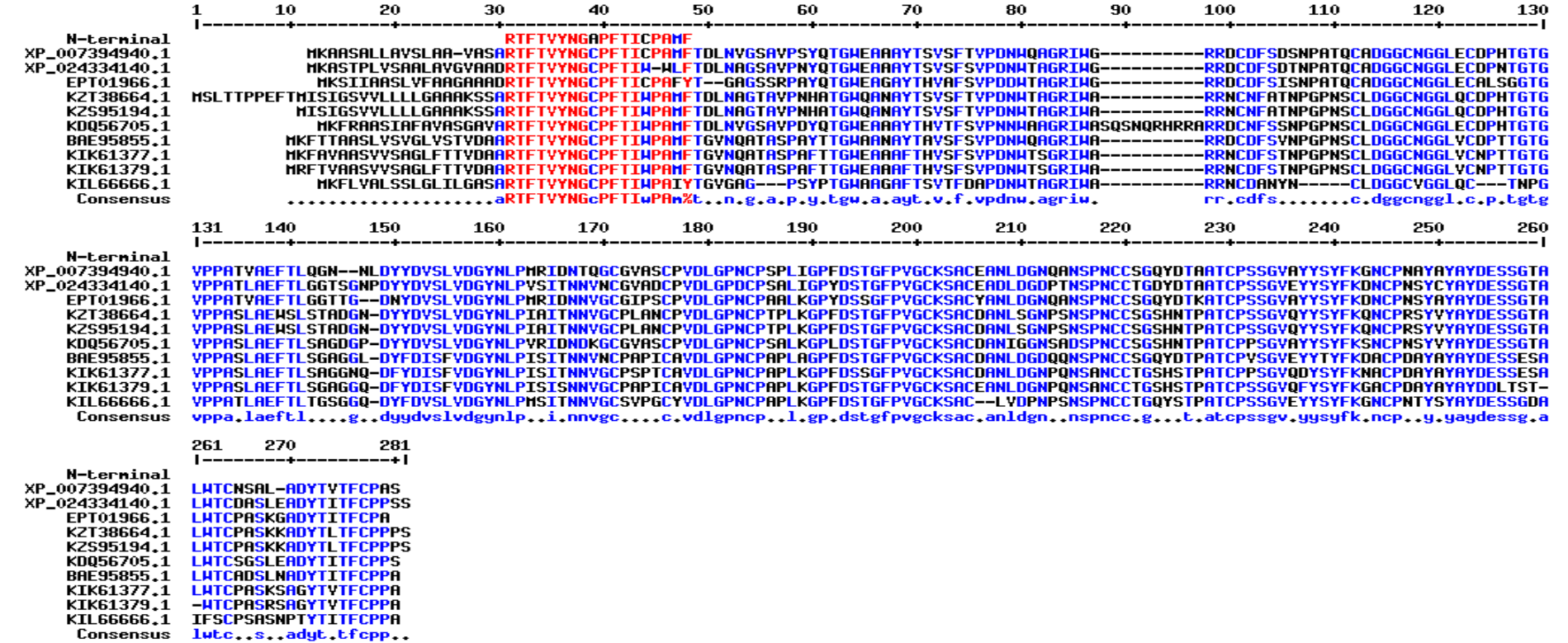
Tabela 2 – Identificação de proteínas obtidas por BLAST do N-terminal da aspartil peptidase.

Descrição	PM	PT	Cb	Valor-E	ID	Código de acesso
Proteína hipotética PHACADRAFT_254685 [<i>Phanerochaete carnos</i> a HHB-10118-sp]	59,2	59.2	100%	6e-09	94,44%	XP_007394940.1
Proteína hipotética FOMPIIDRAFT_102301 0 [<i>Fomitopsis pinicola</i> FP-58527 SS1]	50,7	50.7	88%	6e-06	93,75%	EPT01966.1
Proteína hipotética POSPLADRAFT_11858 52 [<i>Postia placenta</i> MAD-698-R-SB12]	40,5	40.5	72%	0.023	92,31%	XP_024334140.1
Proteína hipotética M378DRAFT_23310 [<i>Amanita muscaria</i> Koide BX008]	40,5	40.5	72%	0.023	92,31%	KIL66666.1
Osmotina, proteína tipo Taumatina [<i>Sistotremastrum suecicum</i> HHB10207 ss-3]	48,6	48.6	100%	3e-05	88,89%	KZT38664.1
Proteína hipotética JAAARDRAFT_179334 [<i>Jaapia argillacea</i> MUCL 33604]	48,6	48.6	100%	3e-05	88,89%	KDQ56705.1
Proteína tipo Taumatina [<i>Lentinula edodes</i>]	48,6	48.6	100%	3e-05	88,89%	BAE95855.1
Proteína hipotética GYMLUDRAFT_581762 [<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1]	48,6	48.6	100%	3e-05	88,89%	KIK61377.1
Osmotina, proteína tipo Taumatina [<i>Sistotremastrum niveocreameum</i> HHB9708]	48,6	48.6	100%	3e-05	88,89%	KZS95194.1
Proteína hipotética [<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1]	48,6	48.6	100%	3e-05	88,89%	KIK61379.1

Legendas: PM: pontuação máxima; PT: pontuação total; CB: cobertura; ID: identidade.

Fonte: autor

Figura 5 – Alinhamento das dez primeiras sequências de proteínas obtidas após BLAST do N-terminal da aspartil peptidase. Os resíduos na cor vermelha são idênticos e os resíduos em azul são conservados em mais de uma sequência. Identificação: XP_007394940.1: Proteína hipotética PHACADRAFT_254685 [*Phanerochaete carnos*a HHB-10118-sp] EPT01966.1: Proteína hipotética FOMPIDRAFT_1023010 [*Fomitopsis pinicola* FP-58527 SS1]; XP_024334140.1; Proteína hipotética POSPLADRAFT_1185852 [*Postia placenta* MAD-698-R-SB12]; KIL66666.1: Proteína hipotética M378DRAFT_23310 [*Amanita muscaria* Koide BX008]; KZT38664.1: Osmotina, proteína tipo Taumatina [*Sistotremastrum suecicum* HHB10207 ss-3]; KDQ56705.1: Proteína hipotética JAAARDRAFT_179334 [*Jaapia argillacea* MUCL 33604]; BAE95855.1: Proteína tipo Taumatina [*Lentinula edodes*]; KIK61377.1: Proteína hipotética GYMLUDRAFT_581762 [*Gymnopus luxurians* FD-317 M1]; KZS95194.1: Osmotina, proteína tipo Taumatina [*Sistotremastrum niveocremeum* HHB9708]; KIK61379.1: Proteína hipotética [*Gymnopus luxurians* FD-317 M1].

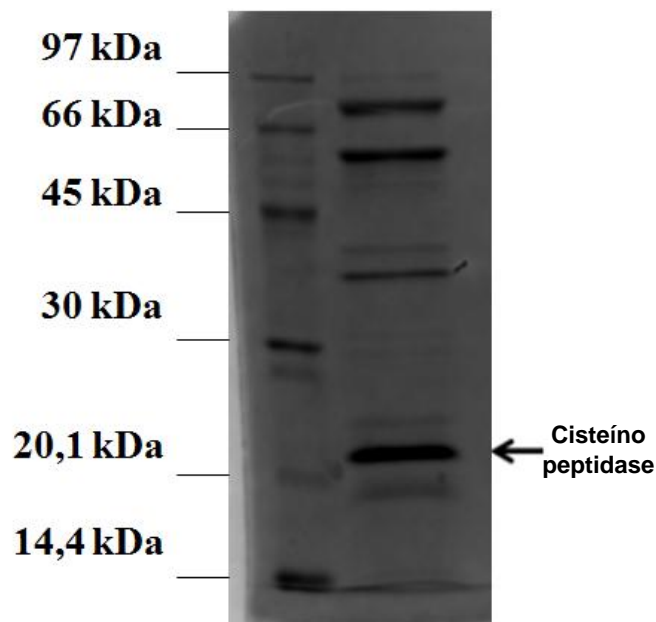


Fonte: autor

4.2.2 Fração ligada

A fração ligada corresponde a fração contendo a cisteíno peptidase. A atividade enzimática positiva para o ensaio da caseína (eluição da enzima) ocorreu com aproximadamente 29% da concentração do tampão B (Acetato de sódio 50mM suplementado com NaCl 200mM, pH 5,0), conforme descrito por DA SILVA et al., (2017a).

Figura 6 – SDS-Page da fração ligada. Gel (12%) após eletroforese SDS-PAGE da fração ligada concentrada da cromatografia de troca iônica. A banda correspondente à cisteíno peptidase (aproximadamente 23kDa) está indicada pela seta. O marcador é mostrado na primeira coluna. As bandas do marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare) são: Fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).



Fonte: autor

A sequência de resíduos de aminoácidos obtidas via degradação de Edman 'STYTGESGYQQTAGH' também foi submetida utilizando a ferramenta *BLAST*. As sequências obtidas, entretanto, mostraram baixa identidade com a sequência de resíduos obtidos pelo sequenciamento do N-terminal. Além disso, muitas das sequências obtidas foram de proteínas de origem bacteriana, identificadas como proteínas quimiotáticas aceptoras de metil, receptores transmembrana (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação de proteínas obtidas por *BLAST* do N-terminal da cisteíno peptidase

Descrição	PM	PT	Cb	Valor-E	ID	Código de acesso
Proteína quimiotática aceptora de metil [<i>Pseudomonas putida</i>]	31,6	31,6	80%	20	75%	WP_046785007.1
Multiespécie: Proteína quimiotática aceptora de metil [<i>Pseudomonas</i>]	31,6	31,6	80%	20	75%	WP_119688151.1
Proteína não caracterizada LOC107356646 [<i>Acropora digitifera</i>]	31,6	31,6	73%	20	81,82%	XP_015778739.1
Proteína quimiotática [<i>Pseudomonas putida</i>]	31,6	31,6	80%	20	75%	KHL72422.1
Proteína hipotética BleG1_3830 [<i>Bacillus lehensis G1</i>]	29,9	29,9	66%	80	71,43%	AIC96377.1
Glicosil Hidrolase [<i>Bacillus sp. BO</i>]	29,9	29,9	66%	80	71,43%	WP_095151202.1
Glicosil Hidrolase [<i>Bacillus sp. C1-1</i>]	29,9	29,9	66%	80	71,43%	WP_124742978.1
Multiespécie: proteína hipotética [<i>Bacillus</i>]	29,9	29,9	66%	80	71,43%	WP_055736373.1
Glicosil Hidrolase [<i>Bacillus lehensis</i>]	29,9	29,9	66%	80	71,43%	WP_038486328.1
Glicosil Hidrolase [<i>Bacillus lehensis</i>]	29,9	29,9	66%	80	71,43%	WP_134260232.1

Legendas: PM: pontuação máxima; PT: pontuação total; CB: cobertura; ID: identidade.

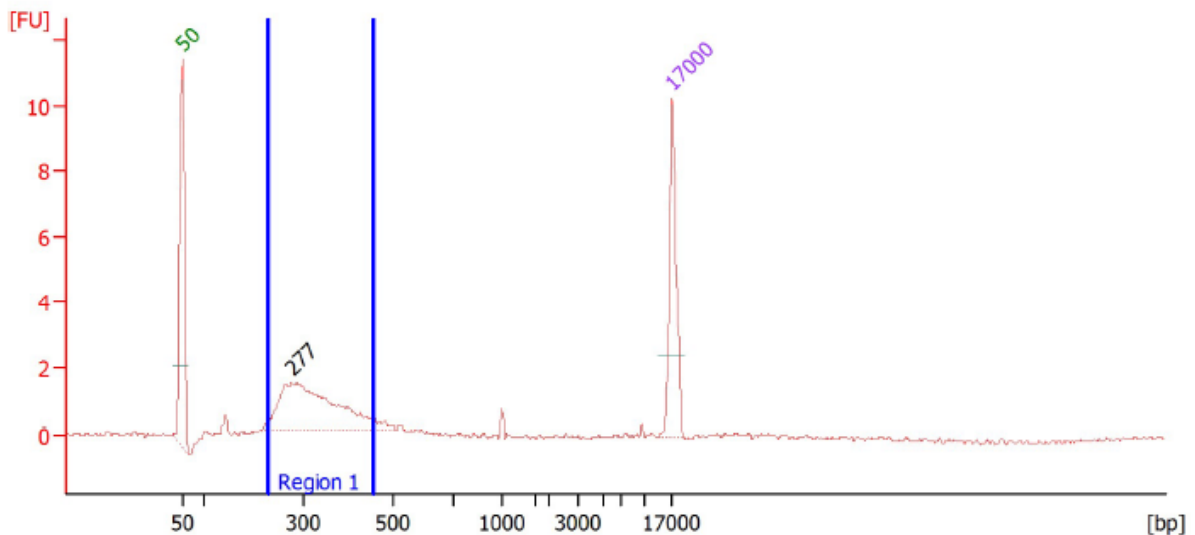
Fonte: autor

4.3 Construção e análise da biblioteca de transcritos (BT)

As análises da qualidade do RNA total extraído, de cada amostra encontram-se no anexo C. A extração resultou em um material de alta qualidade e em todas as amostras avaliadas o RNA obteve RNA *integrity number* maior que 8,9.

A Figura 7, a seguir, mostra a análise do cDNA, sintetizado por meio do mix de RNAm. Os fragmentos sintetizados apresentam tamanho médio de 277 pares de base.

Figura 7 – Análise da qualidade do cDNA obtido após síntese. Gráfico mostrando o tamanho médio das moléculas de cDNA sintetizadas a partir do mix de RNAm. A região que contém o sinal referente ao cDNA é referida como 'Region 1' e o tamanho médio das moléculas é de 277 pares de base. Os picos destacados com 50 e 17000 pares de bases são os padrões internos.



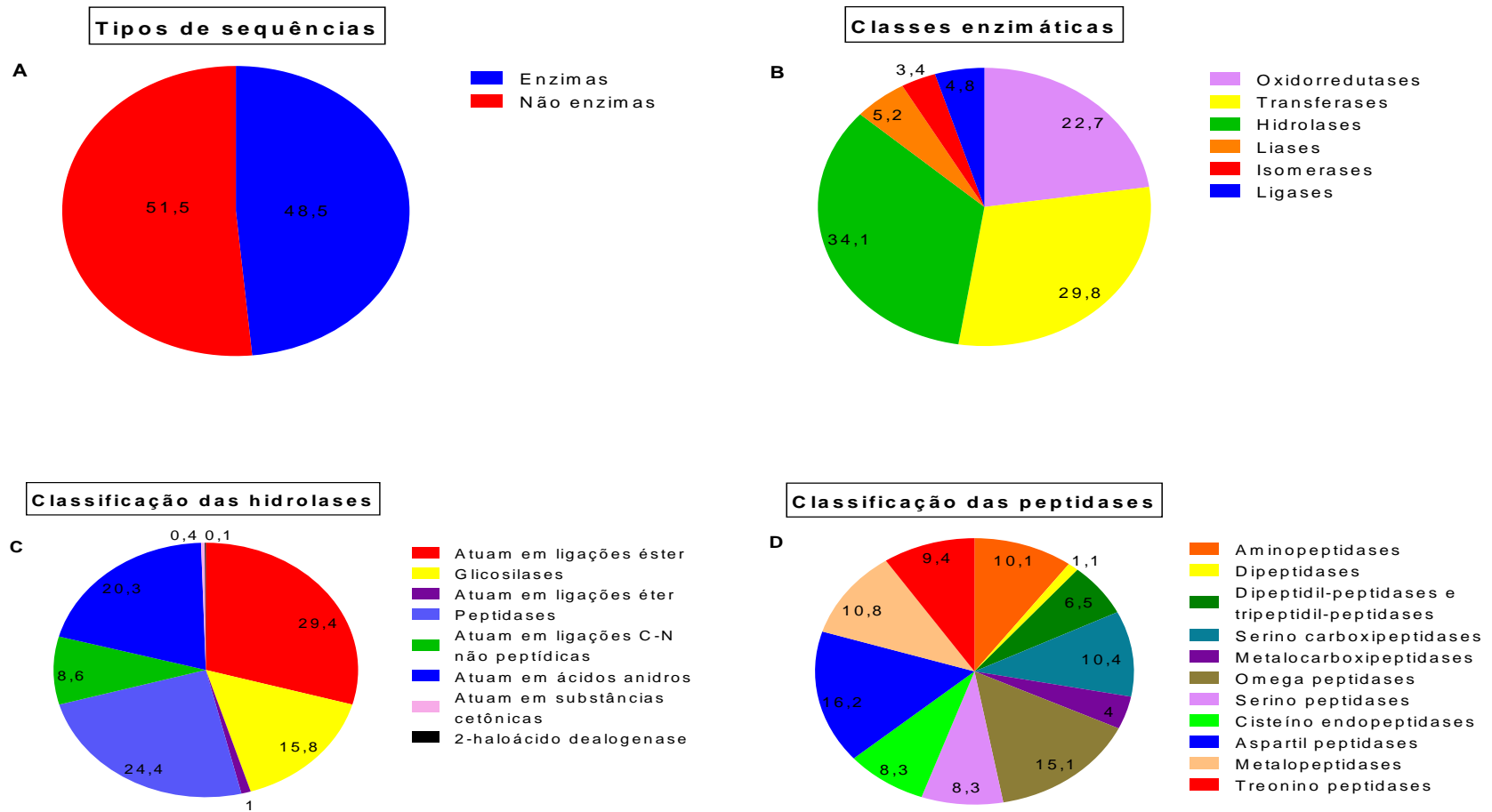
Fonte: autor

A montagem da biblioteca de transcritos, através dos fragmentos de cDNA sintetizados, gerou 33840 itens. As sequências foram submetidas a análise pelo UNIPROT e destas 7327 foram identificadas, sendo que 52% (3772 sequências) foram identificadas como não enzimas e 48% (3555 sequências) como enzimas (Figura 8A).

Dentre as sequências anotadas como enzimas, a análise feita no UNIPROT identificou sequências pertencentes às seis classes enzimáticas existentes, sendo o maior número de sequências pertencentes as classes das hidrolases, transferases e oxidoredutases, com 34%, 30% e 23%, respectivamente (figura 8B).

Uma vez que buscava-se identificar as sequências de peptidases para expressão heteróloga, análises mais detalhadas foram feitas quanto a classe das enzimas hidrolíticas, classe à qual pertence as peptidases, entre outras enzimas de interesse industrial. Sendo assim, as enzimas anotadas como hidrolases também foram categorizadas, conforme figura abaixo (Figura 8C). Essas proteínas mostram uma distribuição, relativamente, homogênea entre as que atuam em ligações éster, as peptidases, e as que atuam em ácidos anidros, com 29,3%, 24,3% e 20,2%, respectivamente, das sequências anotadas pelo UNIPROT (Figura 8C).

Figura 8 – Análise das sequências obtidas na biblioteca de transcritos. Análise foram feitas pelo banco de dados UNIPROT.



Fonte: autor

A figura 8D mostra as peptidases anotadas pelo UNIPROT. Ao todo 1208 sequências foram identificadas e classificadas em 11 subclasses (Figura 8D). A maior porcentagem de sequências anotadas foi para aspartil peptidases (16,2%), seguida de ômega peptidases (15,1%), de metalo peptidases (10,8%) e de serino peptidases (10,4%). Para a classe de cisteíno peptidases, 8,3% das sequências foram reconhecidas como pertencentes a esse grupo.

4.4 Obtenção da sequência primária de aminoácidos utilizando biblioteca de transcritos

4.4.1 Busca utilizando a sequência do N-terminal da aspartil peptidase

Por meio da biblioteca, utilizando a sequência do N-terminal, 5 isoformas da sequência DN10508, isoformas 2, 6, 7, 10 e 11. O alinhamento dessas sequências com o N-terminal mostrou que as isoformas 2, 10 e 11 são idênticas e as isoformas 6 e 7 apresentam variação na porção C terminal (figura 9).

A Tabela 1 (página 24) mostra que o alinhamento da sequência do N-terminal com as sequências obtidas pelo *BLAST* resulta em uma sequência *Phanerochaete carnososa* contendo 257 resíduos com 94% de identidade. Dessa forma, para a escolha da sequência, que será utilizada para expressão heteróloga optou-se por selecionar a sequência mais se aproximaria, em número de resíduos, com a proteína do *P. carnososa*.

Dentre as três isoformas com sequências diferentes, as isoformas 6, 7 e 10, a isoforma 10 (DN10508-I10) possui 257 resíduos. Essa isoforma foi selecionada para as próximas análises e expressão heteróloga da aspartil peptidase.

Para a análise da presença de peptídeo sinal a sequência DN10508 (isoforma 10) foi submetida a análise no *SignalP 5.0 server*. Os resultados (Figura 10) mostram que existe um sítio de clivagem entre os resíduos 18 e 19 da isoforma 10, coincidindo com início do alinhamento do N-terminal. Para a expressão heteróloga, a sequência referente ao peptídeo sinal foi retirada das construções.

Figura 9 – Alinhamento da sequência do N-terminal da aspartil peptidase com as sequências obtidas na BT. Identificação : DN10508_c1_g1_i10.p1: DN10508 isoforma 10; DN10508_c1_g1_i11.p1: DN10508 isoforma 11; DN10508_c1_g1_i2.p1: DN10508 isoforma 2; DN10508_c1_g1_i6.p1: DN10508 isoforma 6; DN10508_c1_g1_i7.p1: DN10508 isoforma 7. Os resíduos na cor vermelha são idênticos em todas as sequências e os resíduos em azul são conservados em mais de uma sequência.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
Sequencia_N_terninal
DN10508_c1_g1_i10.p1      RTFTVYNGAPFTICPAMF
DN10508_c1_g1_i11.p1      MKAASTLLAASLVAVASARTFTVYNGCPFTIIPAMF TDLNVGTAVPNYPTGWEAGAYTAVSFVDPDNKAGRIWGRRCDFSNPNPATQCADGGCNGGLLCAHTGTGVPATVAEFTLQDGNLDYYDV
DN10508_c1_g1_i2.p1      MKAASTLLAASLVAVASARTFTVYNGCPFTIIPAMF TDLNVGTAVPNYPTGWEAGAYTAVSFVDPDNKAGRIWGRRCDFSNPNPATQCADGGCNGGLLCAHTGTGVPATVAEFTLQDGNLDYYDV
DN10508_c1_g1_i6.p1      MKAASTLLAASLVAVASARTFTVYNGCPFTIIPAMF TDLNVGTAVPNYPTGWEAGAYTAVSFVDPDNKAGRIWGRRCDFSNPNPATQCADGGCNGGLLCAHTGTGVPATVAEFTLQDGNLDYYDV
DN10508_c1_g1_i7.p1      MKAASTLLAASLVAVASARTFTVYNGCPFTIIPAMF TDLNVGTAVPNYPTGWEAGAYTAVSFVDPDNKAGRIWGRRCDFSNPNPATQCADGGCNGGLLCAHTGTGVPATVAEFTLQDGNLDYYDV
Consensus                  nkaast.llaaslvavasaRTFTVYNGcPFTIIPAMFt.dlnvgt.avpnypt.gweagayt.avsf.vdpdnkagri.wgrrcdf.snpnpat.qcadggcnggllcdaht.gt.gvppat.vaeft.lqgdgnldyydv

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
Sequencia_N_terninal
DN10508_c1_g1_i10.p1      SLVDGYNLPHRIDNNKGCGIASCPVDLGPNCPSPLKGFDFSTGFPVGCRSACEANLDGNQANSNPCCSGQYNTAATCPPSGVAYYSYFKGNCPNAYAYAYDESSGTALWTCNSGLAAD--YTITFCPPN
DN10508_c1_g1_i11.p1      SLVDGYNLPHRIDNNKGCGIASCPVDLGPNCPSPLKGFDFSTGFPVGCRSACEANLDGNQANSNPCCSGQYNTAATCPPSGVAYYSYFKGNCPNAYAYAYDESSGTALWTCNSGLAAD--YTITFCPPN
DN10508_c1_g1_i2.p1      SLVDGYNLPHRIDNNKGCGIASCPVDLGPNCPSPLKGFDFSTGFPVGCRSACEANLDGNQANSNPCCSGQYNTAATCPPSGVAYYSYFKGNCPNAYAYAYDESSGTALWTCNSGLAAD--YTITFCPPN
DN10508_c1_g1_i6.p1      SLVDGYNLPHRIDNNKGCGIASCPVDLGPNCPSPLKGFDFSTGFPVGCRSACEANLDGNQANSNPCCSGQYNTAATCPPSGVAYYSYFKGNCPNAYAYAYGTYYIVLTRTQCS
DN10508_c1_g1_i7.p1      SLVDGYNLPHRIDNNKGCGIASCPVDLGPNCPSPLKGFDFSTGFPVGCRSACEANLDGNQANSNPCCSGQYNTAATCPPSGVAYYSYFSECARPSLVSGDLTMLDVQRATAPTRTPTPTVLSISFSPGLN
Consensus                  slvdgynlpridnnkgcgiascpvdlgpncpsplkgpfdstgfpvgcrsaceanldgnqansnpccsgqyntaatcppsgvayysyf.....t.....

261266
|----|

Sequencia_N_terninal
DN10508_c1_g1_i10.p1
DN10508_c1_g1_i11.p1
DN10508_c1_g1_i2.p1
DN10508_c1_g1_i6.p1
DN10508_c1_g1_i7.p1      AHDLCR
Consensus                  .....

```

Fonte: autor

4.4.2 Busca da sequência da cisteíno peptidase utilizando anotação funcional

A busca de uma sequência compatível com os resíduos obtidos pela degradação de Edman na BT não gerou nenhum resultado. Dessa forma, uma abordagem diferente foi utilizada para a obtenção da sequência primária da cisteíno peptidase.

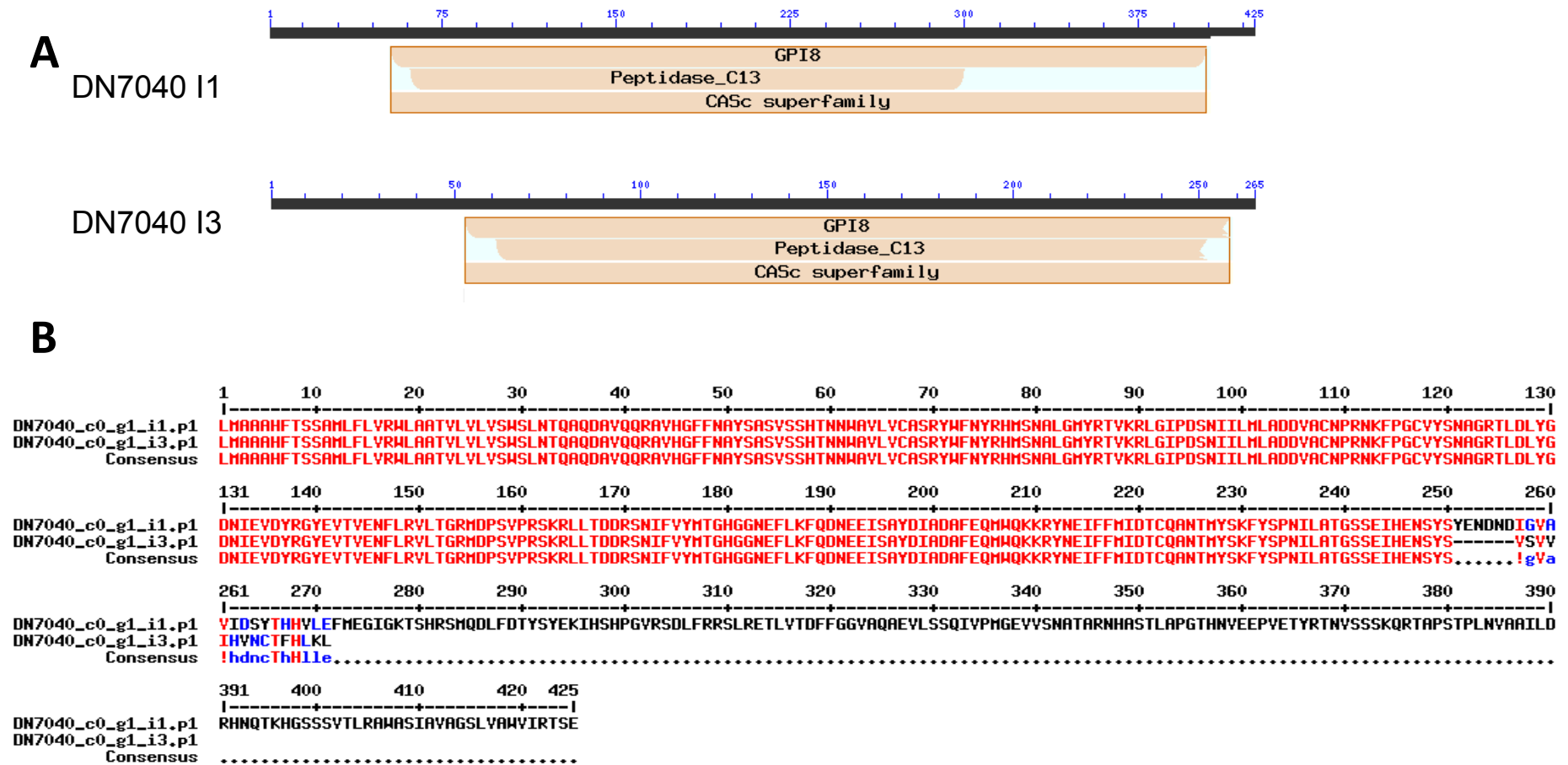
Durante a montagem da biblioteca, a anotação funcional das sequências foi realizada pelo *software Trinotate*. Algumas das sequências na BT foram identificadas como pertencentes a diferentes grupos de proteínas, foram geradas também, informações quanto a presença de peptídeo sinal nessas sequências. Uma busca por sequências anotadas como cisteíno peptidase e que contém peptídeo sinal resultou em duas sequências: as isoformas 1 e 3 da sequência DN7040. A predição para o peptídeo sinal das duas isoformas é mostrada a seguir (Figura 12), os domínios conservados e as sequências são mostrados na Figura 13A e 13B, respectivamente.

A massa molecular das duas isoformas também foi determinada e comparada com a massa descrita por Da Silva et al., (2017a), aproximadamente 23kDa. A isoforma I1 possui massa de aproximadamente 48 kDa e a isoforma 3 de 26 kDa, um valor bem próximo da massa proteínas nativa. Dessa forma, a sequência DN7040 isoforma 3 será utilizada para a expressão heteróloga.

A isoforma 3 foi submetida à previsão de resíduos passíveis de glicosilação (Anexo E). Nenhum sítio de glicosilação do tipo O foi encontrado (Anexo E-A), possuindo apenas 1 sítio de glicosilação do tipo N (Anexo E-B).

Para a expressão heteróloga, a sequência referente ao peptídeo sinal foi retirada das construções.

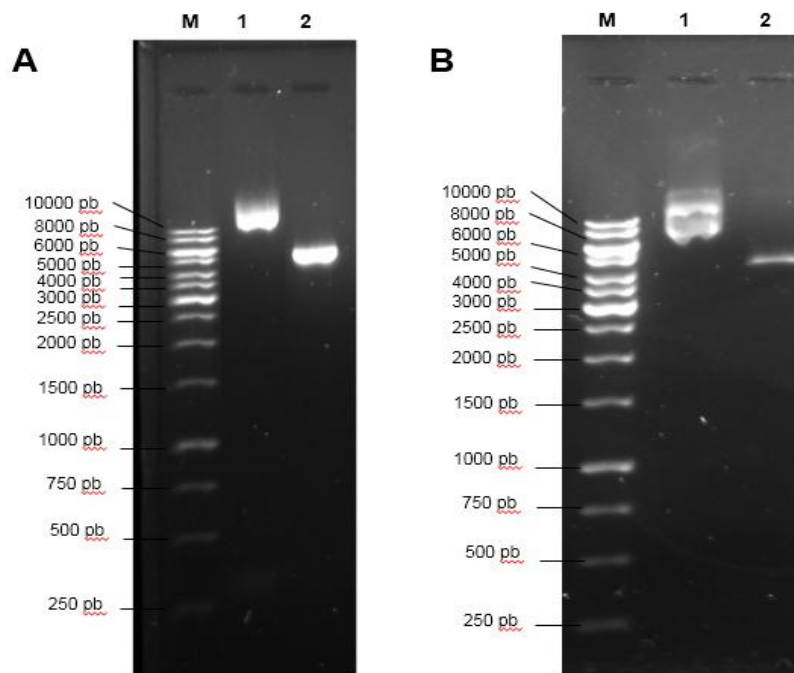
Figura 13 – Domínios conservados e alinhamento das sequências DN7040 isoformas 1 e 3. (A) Domínios presentes nas isoformas 1 e 3 das sequências DN7040. As posições dos resíduos de aminoácidos são mostradas em preto. Os *hits* não específicos GPI8 e Peptidase C13 ($7.89e^{-106}$ e $7.19e^{-46}$, respectivamente) e a superfamília CASc ($7.19e^{-46}$) são mostrados em rosa. Legenda: GPI8: glicosilfosfatidilinositol; Peptidase C13: Família C13 peptidases; CASc superfamily: superfamília das capazes. (B) Alinhamento das sequências obtidas após busca de cisteíno peptidases na BT. Identificação DN7040_c0_g1_i1,p1: DN7040 isoforma 1; DN7040_c0_g1_i3,p1: DN7040 isoforma 3



4.5 Transformação da *P. pastoris* KM71H

A figura 10 mostra os plasmídeos linearizados contendo as construções da aspartil (figura 14A) e da cisteíno peptidases (Figura 14B) selecionadas para expressão heteróloga.

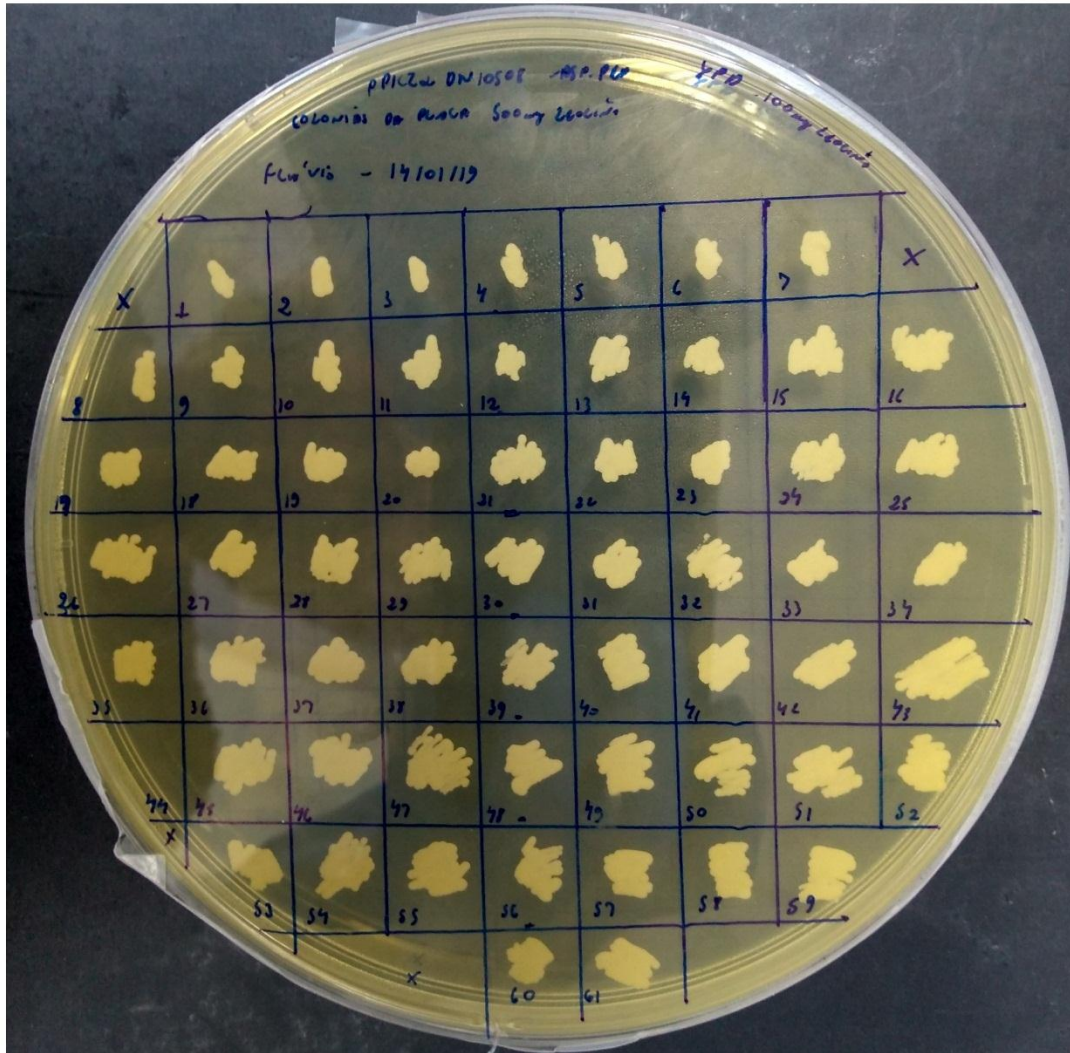
Figura 14 – Géis de agarose mostrando a linearização das construções. (A) Gel mostrando as diferentes conformações da construção *pPICZ α A-DN10508*. A coluna 1 mostra o plasmídeo não linearizado e a coluna 2 o plasmídeo linearizado. (B) A construção *pPICZ α A-DN7040* é mostrada na forma linearizada na coluna 2, na coluna 1 observa-se a forma não linearizada. O marcador é mostrado na coluna M. Padrão de bandas do marcador de peso molecular *gene ruler 1 kb DNA ladder*: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 e 250 bp.



Fonte: autor

Após as etapas de transformações, os clones isolados, positivos para o *pPICZ α A*, ou seja, que cresceram nos meios suplementados com zeocina, foram transferidas para uma nova placa e numeradas de acordo com a ordem de transferência. Para a construção *pPICZ α A-DN10508* foram coletados 50 clones e para *pPICZ α A-DN7040* foram coletadas 55. A figura 15 a seguir mostra a disposição dos clones nas placas.

Figura 15 – Foto representativa da disposição dos clones de *P. pastoris* KM71H positivas para a construção *pPICZ α A-DN10508*, selecionadas após transformação. Os clones são numerados de acordo com a ordem de transferência. Os quadrados que possuem um “X” estão vazios. Meio: YPD suplementado com 100 μ g/mL



Fonte: autor.

4.6 Screening dos clones positivos para a construção *pPICZ α A-DN7040* (cisteíno peptidase)

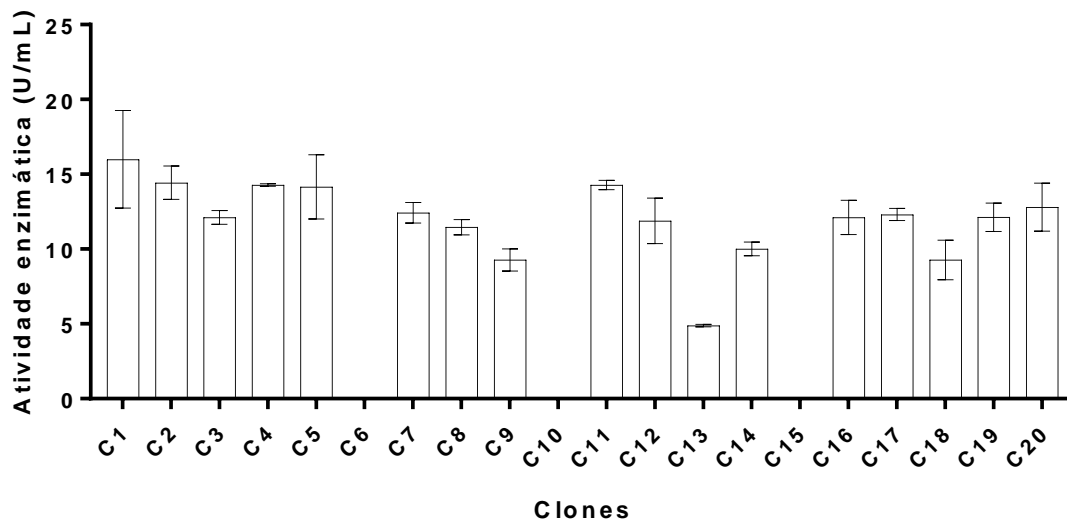
O *screening* ocorreu por 144 horas, sendo avaliados 20 clones para a construção. O sobrenadante de todos os clones foi submetido à atividade enzimática e análise por SDS-PAGE. A atividade enzimática foi realizada de acordo com ensaio caseinolítico (item 3.3.4). Não se detectou atividades enzimáticas nos clones avaliados. Nenhuma banda foi observada na análise por SDS-PAGE.

4.7 Screening dos clones positivos para a construção *pPICZ α A-DN10508* (aspartil peptidase)

O *screening* para avaliação da produção da peptidase pelos diferentes clones ocorreu, inicialmente, por 144 horas. Ao todo, 20 clones (1 ao 20) foram submetidas ao *screening*. O sobrenadante de todos os clones foi submetido à atividade enzimática e análise por SDS-PAGE. A atividade enzimática foi realizada de acordo com ensaio caseinolítico, com adaptações. O pH do substrato foi ajustado para 4,5, de acordo com os valores de pH ótimo obtidos por Da Silva et al., (2017b) para a proteína nativa e utilizou-se *bovine serum albumine* (BSA, Sigma), já que a caseína precipita no pH utilizado.

A atividade enzimática de todos os sobrenadantes dos clones em relação ao controle (*P. pastoris* KM71H) após 144 horas de indução são mostradas na figura 16, a seguir. Os sobrenadantes dos clones que apresentaram a maior atividade enzimática, em relação à KM71H foram: clone 1 ($16,00 \pm 3,27$ U/mL), 2 ($14,44 \pm 1,12$ U/mL), 11 ($14,27 \pm 0,315$ U/mL), 4 ($14,27 \pm 0,086$ U/mL) e 5 ($14,15 \pm 2,15$ U/mL) (Figura 13).

Figura 16 - Atividade enzimática após 144 horas de indução dos clones 1 a 20 contendo a construção *pPICZ α A-DN10508*



Fonte: autor

Os sobrenadantes dos diferentes clones também foram submetidos a análise por SDS-PAGE, mostrado a seguir (Figura 17). Não se observou uma banda que pudesse ser relacionada à aspartil peptidase.

O sobrenadante do clone 1, com maior atividade enzimática, foi submetida a uma nova análise através por SDS-PAGE, mostrada na figura 18A. Os diferentes tempos de indução mostram que, a partir de 48 horas de indução, uma banda com massa molecular superior a 30 kDa é visível (figura 18A). O sobrenadante do clone 1 foi submetido à cromatografia de afinidade por metal imobilizado e analisado por SDS-PAGE, o gel é mostrado a seguir (figura 18B). O gel apreseta duas bandas com maiores intensidades, uma banda com massa superior a 30 kDa e outra com massa superior a 66 kDa. A seta (figura 18B) indica a banda observada no gel (figura 18A) nos diferentes tempos de indução, sugerindo que essa banda é a banda referente à aspartil peptidase recombinante.

Figura 17 – SDS-PAGE (gel 12%) mostrando as bandas exibidas pelos sobrenadantes dos clones 1 ao 20 após 144 horas de indução. O clone correspondente é mostrado na parte superior de cada gel. Legenda: M: marcador; Controle: *P. pastoris* KM71H. As bandas do marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare) são: Fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

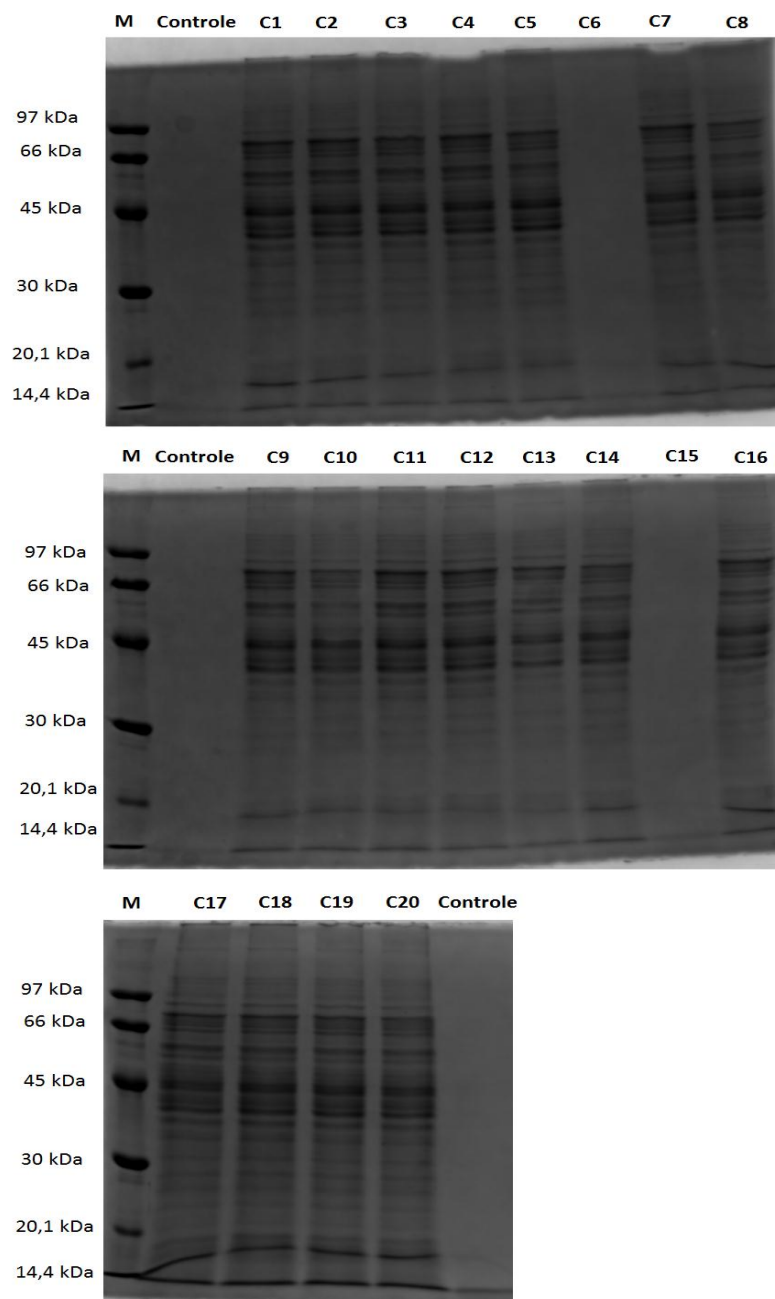
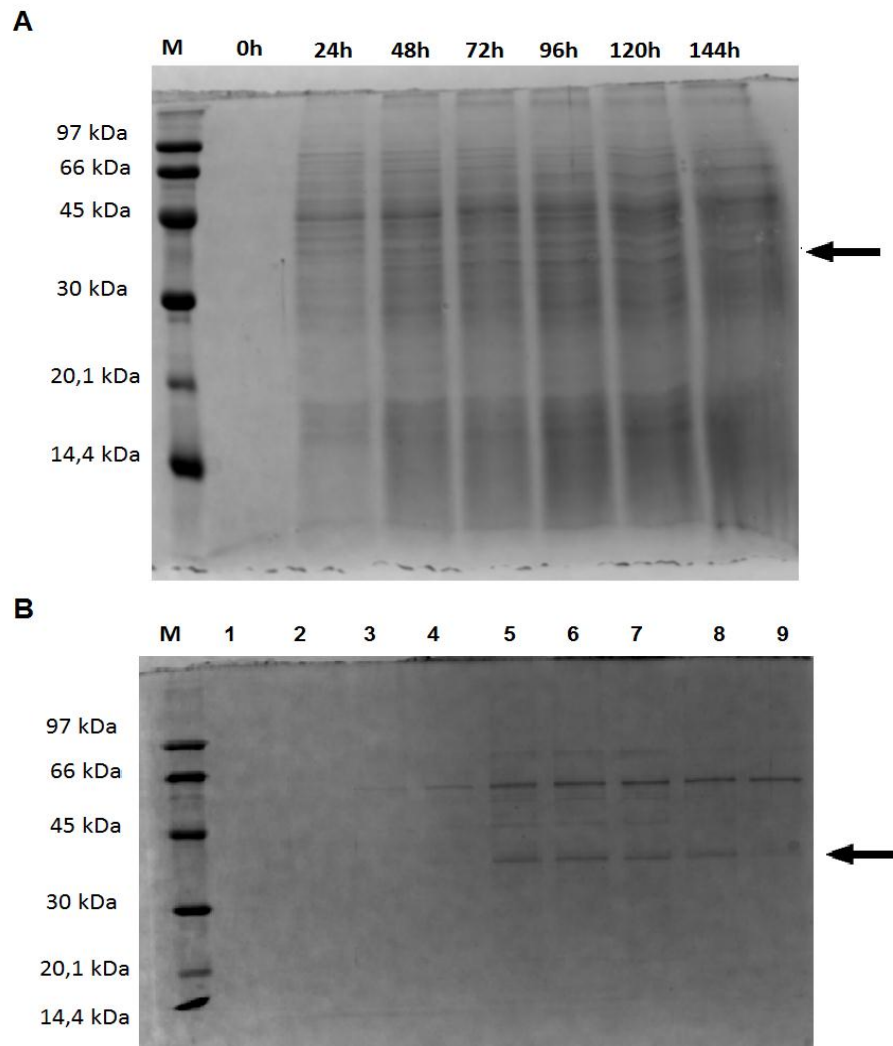


Figura 18 – SDS-PAGE (gel 15%) mostrando (A) as bandas exibidas pelo sobrenadante do clone 1 em diferentes tempos (0-144 horas) de indução. A seta indica uma banda com massa maior que 30 kDa que não é observada no tempo de indução de 24 horas. (B) Bandas exibidas nas diferentes alíquotas após purificação por IMAC. As alíquotas foram enumeradas de acordo com a ordem de eluição e as alíquotas 5, 6 e 7 correspondem ao pico exibido pelo cromatograma obtido com aproximadamente 20% da concentração do tampão B (dados não mostrados). A seta indica a banda correspondente à aspartil peptidase recombinante. As bandas do marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare) são: Fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).



5 DISCUSSÃO

O potencial do fungo *Phanerochaete chrysosporium* tem sido explorado há anos, principalmente devido a sua capacidade de degradação da lignina (GUPTA et al., 2016; MACDONALD et al., 2011; PASZCZYNSKI; CRAWFORD, 1995). O complexo metabolismo da lignina torna esse microrganismo especialmente interessante para obtenção de enzimas oxidativas e hidrolíticas, além de seu uso em processos de biotransformação e biorremediação (RODARTE-MORALES et al., 2012; SINGH; CHEN, 2008; TAHA et al., 2018a).

As atividades enzimáticas, apresentadas na Figura 3, mostram que a atividade de cinco das sete enzimas avaliadas foi detectada. Dentre essas atividades destaca-se, principalmente, as amilases, xilanases e peptidases. Essas enzimas apresentam um grande potencial de uso em diferentes tipos de indústria, como a de alimentos, farmacêutica e agrícola, uma vez que podem estar envolvidas em vários processos (GURUNG et al., 2013; NIGAM, 2013; NIRMAL, 2011).

As amilases e as xilanases têm ganhado destaque nos últimos anos devido ao seu potencial para aplicação em biocombustíveis. As amilases são enzimas que apresentam um papel crucial na processamento do amido nas indústrias (NIGAM, 2013).

As xilanases também possuem um papel importante no manejo de resíduos agroindustriais já que a hemicelulose é um dos principais componentes desses resíduos. Juntamente com a pectina e a lignina, a xilana é um dos principais componentes da hemicelulose e consiste na ligação de resíduos β -1,4 D-xilopiranosil (NIGAM, 2013; SILVA et al., 2005).

Outro grupo interessante de enzimas que apresentou atividade nos extratos são as lacases. Elas são tidas como parte do sistema de degradação da lignina, juntamente com as lignino e manganês peroxidases. Essas enzimas pertencem ao grupo das oxidoredutases e catalisam a oxidação de uma variedade de compostos e seus substratos incluem compostos aromáticos, íons metálicos e organometálicos (MATE; ALCALDE, 2017). Quase todas espécies de fungos *white-rot* foram descritas como produtoras, em algum grau, de lacases (BRIJWANI; RIGDON; VADLANI, 2010).

Juntamente com as amilases e xilanase, as lacases também possuem grande potencial de aplicação nas indústrias têxtil, de papel e farmacêutica. Além disso, essas enzimas possuem destaque no aproveitamento de biomassa, especialmente no aproveitamento da lignina, incluindo na produção de bioetanol (BUGG et al., 2011; MATE; ALCALDE, 2017).

As CMCase (endoglucanases) também apresentaram atividade nos extratos. Elas atuam através da hidrólise das ligações β -1,4 da celulose (GODOY et al., 2018). A atividade dessas enzimas foi detectada apenas no meio suplementado com avicel (celulose microcristalina), após 72 e 96 horas de cultivo (Figura 3C). O *P. chrysosporium* é conhecido por produzir uma variedade de celulases, incluindo celobiohidrolase, β -glicosidases e endoglucanases (HUY et al., 2016). Recentemente, as CMCase termoestáveis tem atraído atenção, uma vez que oferecem vantagens no processo de aproveitamento da lignina que incluem o aumento da solubilidade dos reagentes, diminuição do tempo de hidrólise e diminuição do risco de contaminação (HUY et al., 2016).

As peptidases apresentaram a maior atividade enzimática (Figura 3) dentre as enzimas avaliadas e, principalmente, nos meios suplementados com farinha de pena e caseína, que exibiram as maiores atividades entre as condições avaliadas. A farinha de pena é um resíduo agroindustrial, estima-se que sua composição possua mais de 70% de teor proteico (CAMPOS et al., 2017). Sua utilização como suplemento para a produção de enzimas pode ser uma boa alternativa para o manejo desse resíduo, gerando produtos com alto valor agregado.

Em nosso grupo de pesquisa duas dessas peptidases, na forma nativa, já foram caracterizadas e apresentaram características interessantes para processos industriais, atividade em pH baixo, como é o caso da aspartil peptidase, e especificidades no sítio catalítico, mostrada pelo cisteíno peptidase (DA SILVA et al., 2017a, 2017b). Na tentativa de obter mais informações sobre a sequência primária, de ambas, para a expressão recombinante, o N-terminal foi sequenciado.

O alinhamento da sequência de resíduos obtidos (Tabela 2 e Figura 5), da Aspartil peptidase utilizando o *BLAST*, resultou em sequências de proteínas hipotéticas, incluindo uma da espécie *Phanerochaete carnosus*, além de (osmotinas) e proteínas do tipo

taumatina (Tabela 1). Dentre as 100 sequências geradas pelo *BLAST* (dados não mostrados), nenhuma foi anotada como aspartil peptidase, entretanto as 10 primeiras sequências (tabela 1) são de espécies de fungos. Além disso, o valor-e muito baixo, somado aos valores de cobertura e identidade obtido pelo alinhamento das sequências, sugere que o alinhamento não ocorreu de forma aleatória, ou seja, os resultados são condizentes com a sequência de resíduos analisados.

O alinhamento dos resíduos da banda correspondente a cisteíno peptidase com as sequências obtidas pelo *BLAST* (tabela 2), revelou resultados menos promissores. Dentre as 10 sequências com maior identidade, nota-se que os valores-e foram maiores que 20 e a cobertura menor que 80% (tabela 2). Esses valores sugerem resultados inconclusivos. Além disso, as sequências são, majoritariamente, de proteínas de bactérias (proteína quimiotática aceptora de metil – proteína de membrana), incluindo até uma espécie de coral *Acropora digitifera*.

Diversos fatores podem influenciar na obtenção da sequência do N-terminal de uma proteína, utilizando a metodologia empregada. Um dos principais é a quantidade de proteína presente na banda. Quantidades pequenas podem dificultar a identificação dos resíduos. Além disso, a sobreposição de bandas no gel e a contaminação da membrana de PVDF, podem gerar resultados inconclusivos.

A biblioteca de transcritos gerou mais de 33 mil sequências. A qualidade das informações presentes na biblioteca de transcritos é determinada pela qualidade do RNA total extraído, uma vez que este será o molde para o cDNA. O nível de integridade do RNA foi medido através do RNA *integrity number (RIN)* (anexo C). O RIN permite classificar o RNA extraído em uma escala de 1 a 10, sendo que 1 é o maior grau de degradação e 10 o mais intacto (MUELLER, 2004). Em todas as amostras avaliadas o RIN foi maior que 8.

Dentre as 3555 sequências reconhecidas como enzimas (figura 8A), as classes que mais apresentaram sequências foram as hidrolases, transferases e oxidorreduções (Figura 8B). Essas classes têm sido associadas ao estilo de vida do *P. chrysosporium*, uma vez que estão diretamente relacionadas ao metabolismo da lignina (KERSTEN; CULLEN, 2007; MACDONALD et al., 2011; MARTINEZ et al., 2004).

As oxidorredutases corresponderam por 811 das sequências reconhecidas pelo UNIPROT (não mostrado) e dentre as atividades avaliadas, apenas a lacase pertence a esse grupo. A classe das transferases apresentou 1085 sequências. O metabolismo da lignina é classicamente atribuído ao envolvimento de enzimas oxidativas (lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases), entretanto estudos recentes têm mostrado que alguns microorganismos expressam transferases que podem clivar ligações da lignina (CHEN et al., 2011; KONTUR et al., 2019).

As hidrolases representaram o segundo maior grupo de sequências da BT. Com exceção da lacase todas as demais enzimas com atividades detectadas nos extratos (peptidases, CMCases, xilanases e amilases) são classificadas como hidrolases. A análise detalhada desse grupo (resultados não mostrados), mostra que há sequências reconhecidas como α -amilases (9 sequências), β -1,4-xilosidase (2 sequências), além de uma variedade de celulases e β -glicosidases. Uma única sequência foi reconhecida como endo-poligalacturonase (pectinase), entretanto nenhuma atividade foi detectada nos extratos.

A presença dessa sequência mostra que há limitações na detecção de atividade enzimática em extratos, uma vez que, fatores que influenciam na atividade enzimática, como pH e temperatura, podem ser inadequados para que certas enzimas exerçam sua atividade catalítica. Além disso, a presença de um RNAm não implica, necessariamente, na expressão de uma enzima ativa por diversos fatores: o RNAm pode ser degradado antes da tradução, a enzima pode estar inativada ou ser degradada após etapa de tradução ou ainda, a enzima pode não ser secretada para o meio.

A análise do transcriptoma foi direcionada para a busca de sequências reconhecidas como peptidases. As anotações fornecidas pelo UNIPROT revelaram que 24,4% das sequências da BT são reconhecidas como peptidases (Figura 8C), sendo esta a segunda maior porcentagem no grupo de sequências reconhecidos dentro das hidrolases na BT.

A busca da sequência da aspartil peptidase na BT utilizando sequência do N-terminal, mostrou que cinco isoformas de uma mesma sequência (DN10508 isoformas 2,6,7,10 e 11) possuíam uma mesma sequência de N-terminal (Figuras 8 e 9) diferenciando entre si apenas nas porções C-terminal. As sequências obtidas através do

BLAST do N-terminal mostram que existe uma identidade de 94,4% entre a proteína hipotética PHACADRAFT_254685 (tabela1) do *Phanerochaete carnosae* e a sequência do N-terminal obtida. Levando em consideração a proximidade das espécies e a qualidade dos resultados obtidos pelo alinhamento do N-terminal, a sequência DN10508 I 10 foi selecionada para as demais análises e expressão heteróloga.

O alinhamento da sequência DN10508 I10 utilizando o *BLAST* (não mostrado) confirmou que a sequência possui domínio conservados que a caracterizam como proteína tipo taumatina (figura 11). A família das taumatinas, conhecidas como proteínas doces, foi originalmente isolada de uma planta africana *Thaumatococcus danielli* (Benth.) As proteínas tipo taumatinas possuem sequências com similaridades às taumatinas. As osmotinas e as proteínas tipo taumatinas (TLP) possuem domínios conservados entre si e são usualmente descritas como parte do sistema de defesa contra patógenos em plantas, conferindo, principalmente, resistência à fungos (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

As proteínas tipo taumatinas possuem cerca de 200 resíduos de aminoácidos e, usualmente, possuem massa molecular entre 15 – 39 kDa (GRENIER et al., 1999; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010). As primeiras TLP descritas em fungos possuem atividade β -1,3-glucanases (GRENIER et al., 1999). As sequências que são reconhecidas como TLP possuem a assinatura da família das Taumatinas: G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C. Resíduos conservados de cisteína conferem a essas proteínas resistência à condições extremas de temperatura e pH (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

A massa molecular da sequência DN10508 I10 foi estimada em 25 kDa enquanto a massa na proteína nativa foi estimada em 36 kDa. A presença de sítios glicosilação nessa sequência sugere que a diferença entre as massas moleculares seja devido a modificações pós-traducionais. Essas modificações podem funcionar como tags para a secreção atuar na ativação de enzimas e aumentar a afinidade pelo substrato (GOETTIG, 2016).

A busca pela sequência da cisteíno peptidase foi feita através da anotação funcional da BT, uma vez que os resultados obtidos através do alinhamento do N-terminal no *BLAST*, geraram sequências com parâmetros pouco confiáveis. As duas isoformas da

sequência DN7040, isoformas 1 e 3, possuem domínios conservados da família das peptidases C13, conhecida como legumaina.

Essas proteínas foram identificadas pela primeira vez na década de 1980 em mudas do feijão *Phaseolus vulgaris* e no trematódeo *Schistosoma mansoni*. Dada sua localização e sua função nos vacúolos de plantas e sua especificidade na clivagem após os resíduos de aparagina, elas foram chamadas de enzimas de vacúolos ou asparagil endopeptidases (DALL; BRANDSTETTER, 2016; MÜNTZ; SHUTOV, 2002). As asparagil peptidases são membros da família C13 das cisteino peptidases por possuírem a região His¹⁴⁸-Gly-espçador-Ala-Cys¹⁸⁹ (DALL; BRANDSTETTER, 2016). Geralmente essas proteínas são enzimas intracelulares e pouco se sabe sobre a secreção dessas enzimas em fungos (DA SILVA et al., 2017a).

A seleção da sequência DN7040 foi feita tendo como critério de exclusão, a presença de um peptídeo sinal (figura 12). As duas isoformas obtidas, isoforma 1 e 3, apresentaram variações no reconhecimento dos domínios em suas sequências. A isoforma 1 apresentava uma sequência de resíduos bem superior à 3, sem que houvesse o reconhecimento dos domínios desses resíduos. Além disso, a massa molecular da cisteino peptidase nativa foi estimada em 23 kDa e a massa da I3 foi estimada em 26 kDa.

A sequência DN7040 também foi submetida à previsão de sítios de glicosilação. A análise mostrou que a sequência possui apenas 1 sítio previsto do tipo N (anexo E). Poucas cisteino peptidases possuem sítios de glicosilação, essas proteínas, geralmente, encontram-se dentro das células, entretanto legumainas encontradas fora da célula podem apresentar glicosilações do tipo N (GOETTIG, 2016).

A expressão recombinante da sequência DN10508 I10 foi realizada em 20 clones e as atividades relativas à *P. pastoris* KM71H mostraram que o clone 1 foi o que apresentou a maior atividade $16,00 \pm 3,27$ U/mL (Figura 15) entretanto, a análise por SDS-PAGE dos clones não mostrou nenhuma banda que pudesse ser associada a expressão da aspartil peptidase recombinante (Figura 17).

Muitas vezes, durante a indução da expressão, proteínas recombinantes podem ser degradadas por ação de peptidases. Alterações no pH, temperatura e falta de nutrientes podem causar a degradação da parede celular das leveduras, o que pode causar liberação de peptidases endógenas (SINHA et al., 2005). A análise por SDS-

PAGE do clone 1 mostrou que há uma banda acima de 30 kDa após 48 horas de indução, essa banda pode ser observada em todos os tempos, sem degradação aparente (FIGURA 18A). O processo de purificação (Figura 18B) revelou que a proteína representada por essa banda interage com a coluna utilizada de níquel *Sepharose*, indicando que essa proteína possui a *tag* presente na construção (calda de histidina). Apesar de purificada, novos ajustes devem ser feitos no processo, uma vez que se observa outras bandas no gel de purificação

Os clones contendo a sequência DN7040 I3 da cisteíno peptidase foram menos promissoras. Apenas os clones 11, 18 e 19 apresentaram atividades, em relação a *P. pastoris* KM71H (dados não mostrados). Os géis SDS-PAGE (não mostrados) também não revelaram nenhuma banda que pudesse ser relacionada a cisteíno peptidase.

Tomados em conjunto, os resultados mostram o potencial de aplicação biotecnológica exibido pelo *P. chrysosporium*, a análise de seu transcriptoma mostrou que esse microrganismo produz uma variedade de classes enzimáticas que podem ter aplicações industriais. Utilizando o sistema *P. pastoris* foi possível obter duas peptidases de forma recombinante, enquanto a aspartil peptidase apresentou resultados promissores, que permitiram a seleção de uma colônia para a purificação, a expressão recombinante da cisteíno peptidase ainda necessita de mais estudos para a seleção de clones promissoras.

6 CONCLUSÕES

Nas condições avaliadas, foram detectadas atividades enzimáticas de cinco das sete enzimas avaliadas, peptidases, xilanases, lacases, CMCases e amilases.

O RNA extraído a partir do micélio foi de boa qualidade e, após o sequenciamento do cDNA, a biblioteca de transcritos gerou 33840 sequências. Essas sequências foram analisadas pelo UNIPROT que reconheceu 7327 sequências, 48,5% dessas foram reconhecidas como enzimas, dentre as mais diversas classes.

Através da biblioteca de transcritos, foi possível obter e selecionar sequências de duas peptidases (aspartil e cisteíno peptidases) para a expressão heteróloga. Através do *screening* dos clones contendo o gene da aspartil peptidase foi possível selecionar um clone, que será utilizada nas etapas de purificação.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.

ALVES, A. C. V. et al. The correction of reaction rates in continuous fluorometric assays of enzymes. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 3, p. 471–479, abr. 2007.

ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 162–168, maio 2013.

ANBU, P. et al. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–3, 2017.

BAGHBAN, R. et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365–384, 25 maio 2019.

BARRECH, D. A Review on Mycoremediation—the fungal bioremediation. **Pure and Applied Biology**, v. 7, n. 1, p. 343–348, 2018.

BENOCCI, T. et al. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–25, 2017.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, n. 2, p. 433–451, mar. 1992.

BRANNIGAN, J. A. et al. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation.[erratum appears in Nature 1995 Dec 7;378(6557):644]. **Nature**, v. 378, n. November, p. 9–12, 1995.

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1–10, 2010.

BUGG, T. D. H. et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883–1896, 2011.

CAMPOS, I. et al. Hydrolyzed feather meal as a partial fishmeal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 476, n. March, p. 152–159, 2017.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 25 mar. 2016.

CHEN, M. et al. Understanding lignin-degrading reactions of ligninolytic enzymes: Binding affinity and interactional profile. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

CHENG, H.; GRISHIN, N. V. DOM-fold: A structure with crossing loops found in DmpA, ornithine acetyltransferase, and molybdenum cofactor-binding domain. **Protein Science**, v. 14, n. 7, p. 1902–1910, 2005.

CORPORATION, L. T. Pichia Expression Kit User Guide. **Invitrogen**, 2014.

DA SILVA, R. R. et al. Activity of a peptidase secreted by *Phanerochaete chrysosporium* depends on lysine to subsite S' 1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 474–483, jan. 2017a.

DA SILVA, R. R. et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Food Chemistry**, v. 225, p. 45–54, jun. 2017b.

DA SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 1–19, 3 set. 2017.

DALL, E.; BRANDSTETTER, H. Structure and function of legumain in health and disease. **Biochimie**, v. 122, n. October, p. 126–150, 2016.

FRAC, M. et al. Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–9, 2018.

GASSER, B.; MATTANOVICH, D. A yeast for all seasons – Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 17, 1 set. 2018.

GODOY, A. S. et al. Structure, computational and biochemical analysis of PcCel45A endoglucanase from *Phanerochaete chrysosporium* and catalytic mechanisms of GH45 subfamily C members. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

GOETTIG, P. Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1969, 25 nov. 2016.

GRENIER, J. et al. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1,3-glucans. **Plant Journal**, v. 19, n. 4, p. 473–480, 1999.

GUO, X.; ZHU, Z.; LI, H. Biodegradation of sulfamethoxazole by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Molecular Liquids**, v. 198, p. 169–172, out. 2014.

GUPTA, V. K. et al. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.

GURUNG, N. et al. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013.

HAMIN NETO, Y. A. A. et al. Analysis of the specificity and biochemical characterization of metalloproteases isolated from *Eupenicillium javanicum* using fluorescence resonance energy transfer peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–13, 2017.

HUANG, C. et al. Effect of *Phanerochaete chrysosporium* inoculation on bacterial community and metal stabilization in lead-contaminated agricultural waste composting. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 294–303, nov. 2017.

HUANG, Z. et al. Differential behaviors of silver nanoparticles and silver ions towards cysteine: Bioremediation and toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. **Chemosphere**, v. 203, p. 199–208, 2018.

HUY, N. D. et al. Characterization of a novel manganese dependent endoglucanase belongs in GH family 5 from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 2, p. 154–159, fev. 2016.

JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 1, p. 7–21, 2018.

KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading

Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 2, p. 77–87, 2007.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

KONDO, M. Y. et al. Studies on the Catalytic Mechanism of a Glutamic Peptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21437–21445, 9 jul. 2010.

KONTUR, W. S. et al. A heterodimeric glutathione S -transferase that stereospecifically breaks lignin's β (R)-aryl ether bond reveals the diversity of bacterial β -etherases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 6, p. 1877–1890, 8 fev. 2019.

LI, N. et al. Characterization of a unique proline iminopeptidase from white-rot basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochimie**, v. 92, n. 7, p. 779–788, jul. 2010.

LI, Q. et al. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 17 abr. 2013.

LINKE, D. et al. An alcohol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* with a distinct glycerol oxidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 61–62, p. 7–12, jul. 2014.

LIU, J. J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: Its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 5, p. 419–436, 2010.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease.

Journal of Biological Chemistry, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.

MACDONALD, J. et al. Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosae* during growth on coniferous and deciduous wood.

Applied and Environmental Microbiology, v. 77, n. 10, p. 3211–3218, 2011.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 695–700, 2004.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457–1467, nov. 2017.

MEYER, V. et al. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 6, 31 dez. 2016.

MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Extracellular Proteolysis by *Candida lipolytica*. **Mycologia**, v. 69, n. 3, p. 646, maio 1977.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 1959.

MUELLER, O. RNA Integrity Number (RIN). **Nano**, p. 1–17, 2004.

MÜNTZ, K.; SHUTOV, A. D. Legumains and their functions in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 340–344, ago. 2002.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 597–611, 2013.

NING, Y.-J. et al. An extracellular yellow laccase with potent dye decolorizing ability from the fungus *Leucoagaricus naucinus* LAC-04. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 837–842, dez. 2016.

NIRMAL, N. P. S. Fungal Proteases : An Overview. **International Journal of Biotech and Biosci**, v. 1, n. October, p. 1–40, 2011.

O'BRIEN, H. E. et al. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, 1 set. 2005.

PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R. L. Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 4, p. 368–379, 1995.

PEREIRA, L. A. et al. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 10, p. 892–900, ago. 2004.

PEREIRA, M. G. et al. Screening of filamentous fungi for lipase production: *Hypocrea pseudokoningii* a new producer with a high biotechnological potential. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 74–83, 7 jan. 2014.

PORRO, D. et al. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 939–948, 2011.

PRAKASHAM, R. S. et al. Alkaline Protease Production by an Isolated *Bacillus circulans* under Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Waste: Process Parameters Optimization. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 5, p. 1380–1388, 7 out. 2005.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, set. 1998.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, p. 30, 16 nov. 2016.

RODARTE-MORALES, A. I. et al. Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. **Biodegradation**, v. 23, n. 1, p. 145–156, 2012.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, jul. 2005.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157–162, abr. 1967.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 4, p. 363–372, 24 set. 2004.

SILVA, R. DA et al. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus miehe*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 235–241, set. 2005.

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 399–417, 20 dez. 2008.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

SINGH, S. K. et al. Purification, characterization and secondary structure elucidation of a detergent stable, halotolerant, thermoalkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 1479–1487, out. 2012.

SINHA, J. et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- γ ? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 1, p. 102–112, 5 jan. 2005.

TAHA, M. et al. Bioremediation of biosolids with *Phanerochaete chrysosporium* culture filtrates enhances the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Applied Soil Ecology**, v. 124, n. June 2017, p. 163–170, 2018a.

TAHA, M. et al. Bioremediation of biosolids with *Phanerochaete chrysosporium* culture filtrates enhances the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Applied Soil Ecology**, v. 124, n. November 2017, p. 163–170, 2018b.

TARHAN, L.; TONGUL, B. The induction of ligninolytic enzymes depending on menadione based oxidative stress and cell damages in *Phanerochaete chrysosporium*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 1–7, fev. 2017.

VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385–404, 2013.

WANG, G.; HUANG, M.; NIELSEN, J. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 48, p. 77–84, dez. 2017.

WU, T. Y. et al. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate.

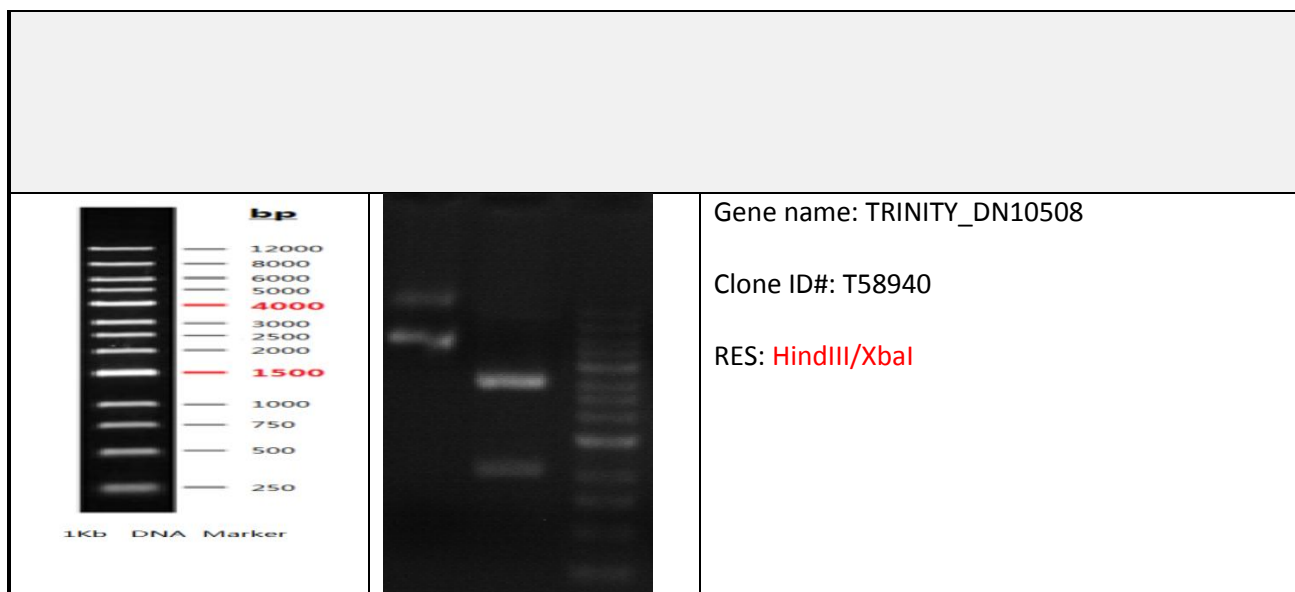
Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 6, p. 1223–1229, out. 2006.

ZHANG, Y. H. P.; SUN, J.; MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 4–5, p. 773–784, 2017.

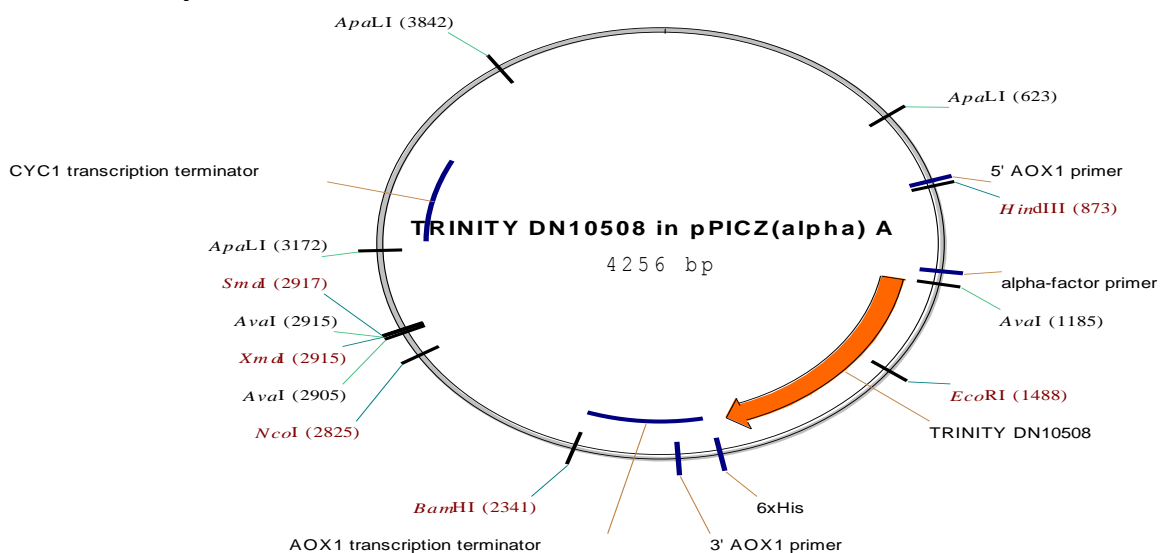
ANEXOS

ANEXO A – Controle da qualidade do gene DN10508 I10

Gene Name	TRINITY_DN10508	Order ID	SG180594-1
Lot#	T58940	Cloning Vector	pPICZ(alpha) A
Length (bp)	756	Cloning Sites	XhoI(CTCGAG)_XbaI(TCTAGA)
Quality Control			
Test Items	Specifications		Results
Sequencing Alignment	Sequencing data consistent with target		[X] Pass
Vector Sequence	Flanking sequence of cloning sites are correct		[X] Pass
Restriction Digest	Insert size is correct and no contaminated bands		[X] Pass
ORF Across Junction	Correct and consistent with target		N/A
PCR Amplification	Correct and no contaminated bands		[X] Pass
Endotoxin Level	Verified, <0.1 EU/μg (Endo-Free Preps Only)		N/A
Appearance	Clear, no foreign particles		[X] Pass
DNA Purity	Purity (A 260/A280 = 1.8 - 2.0)		[X] Pass
DNA Quantity	Actual yield (by A 260)		5μg/5μg
Comments			
<p>Delivery form: Lyophilized plasmid (TE lyophilized) containing the gene insert. It is stable at room temperature for extended period of time during shipping. The lyophilized plasmid can be dissolved in sterile TE buffer or nuclease-free water (neutral pH) depending on the established laboratory practice. After reconstitution, store the stock solution at -20°C or -80°C for long term storage. The lyophilized plasmid dissolved in TE buffer is stable for at least 6 months at 4°C while the lyophilized DNA dissolved in water is <u>NOT STABLE</u> at 4°C.</p> <p>a) Before opening the tube containing the plasmid, please briefly centrifuge the tube. Lyophilized plasmid could attach to the wall of the tube. Opening without centrifugation could cause DNA loss.</p> <p>b) Stock Solution: Reconstitute lyophilized plasmid (4ug or 10ug) in 40ul or 100ul of TE buffer or nuclease-free water (final concentration - 100ng/ul). To accurately determine the quantity of DNA present, please measure OD value of original stock at OD_{260nm} after reconstitution.</p> <p>c) Working Solution: make a 1:10 dilution of stock solution using TE buffer or nuclease-free water (final concentration - 10ng/ul)</p> <p>Transformation and Replating: Transform 2ul of stock solution into appropriate <i>E. coli</i> competent cells according to standard laboratory protocol. Plate the mixture on LB agar (with desired antibiotic selection) and incubate at 37°C for overnight. Select a well separated, <u>SINGLE</u> colony and inoculate in LB medium with desired antibiotic selection for overnight culture. Purify Plasmid DNA from overnight cultures, verify sequences and continue with project of interest. *It is important to select only a <u>SINGLE</u> colony for overnight culture.</p>			
Restriction Digestion			



Construct Map:



Detailed Sequence of the Whole Construct:

```

1  AGATCTAACA TCCAAAGACG AAAGGTTGAA TGAAACCTTT TTGCCATCCG ACATCCACAG
61  GTCCATTCTC ACACATAAGT GCCAAACGCA ACAGGAGGGG ATACACTAGC AGCAGACCGT
121 TGCAAACGCA GGACCTCCAC TCCTCTTCTC CTCAACACCC ACTTTTGCCA TCGAAAAACC
181 AGCCCAGTTA TTGGGCTTGA TTGGAGCTCG CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA
241 ACACCATGAC TTTATTAGCC TGTCTATCCT GGCCCCCCTG GCGAGGTTCA TGTTTGTTTA
301 TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC CCGAACATCA CTCCAGATGA GGGCTTTCTG
361 AGTGTGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC AAATGGCCCA AAATGACACG TTTAAACGCT
421 GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA TCTCATCCAA GATGAACATA GTTTGGTTCG
481 TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA GAAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT
541 CTTGTTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT
601 CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT
661 TTTTGGATGA TTATGCATTG TCTCCACATT GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT
721 GCTGATAGCC TAACGTCAT GATCAAAATT TAACTGTTCT AACCCCTACT TGACAGCAAT
781 ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT
841 ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA
901 CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTCGAAACG ATGAGATTTT CTTCAATTTT

```

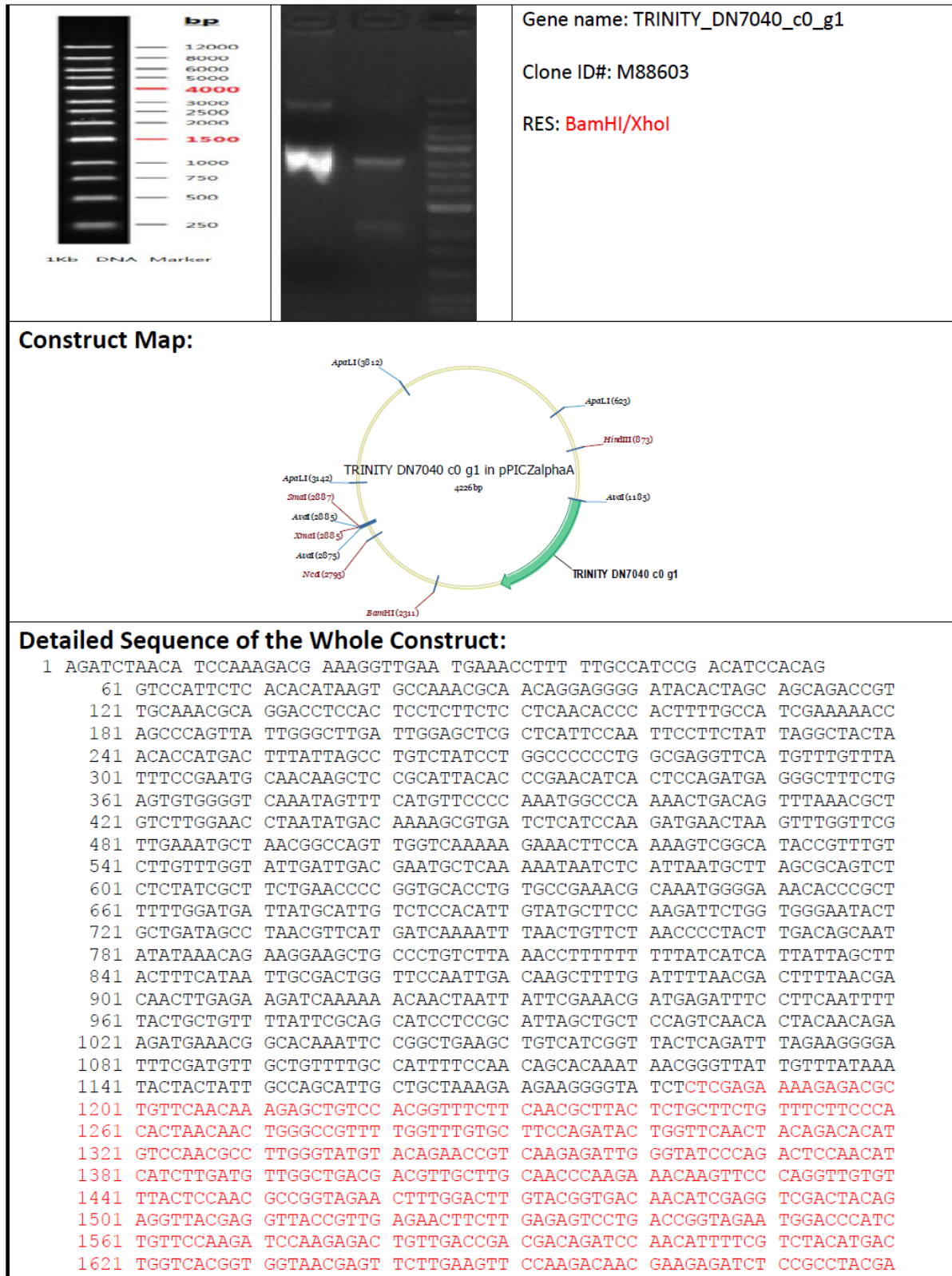
```

961 TACTGCTGTT TTATTTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT CCAGTCAACA CTACAACAGA
1021 AGATGAAACG GCACAAATTC CGGCTGAAGC TGTCATCGGT TACTCAGATT TAGAAGGGGA
1081 TTTTCGATGTT GCTGTTTTGC CATTTCCTAA CAGCACAAAT AACGGGTTAT TGTTTTATAAA
1141 TACTACTATT GCCAGCATTG CTGCTAAAGA AGAAGGGGTA TCTCTCGAGA AAAGAAGAAC
1201 CTTACCGTT TACAACGGTT GCCCATTAC TATCTGGCCA GCTATGTTCA CCGACTTGAA
1261 CGTTGGTACT GCCGTTCCAA ACTACCCAAC TGGTTGGGAA GCTGGTGCTT ACACTGCTGT
1321 TTCTTTCTCC GTTCCTGACA ACTGGAAGGC TGGTAGAATT TGGGGTAGAA GAAACTGCGA
1381 CTTCTCTAAC CCAAATCCAG CTACTCAATG TGCCGACGGT GGTGTGAATG GTGGTTTTGTT
1441 GTGTGATGCT CACACCGGTA CTGGTGTTCC ACCAGCTACT GTTGCTGAAT TCACTCTGCA
1501 AGGTGACGGT AACTTGGACT ACTACGACGT TTCTTTGGTC GACGGTTACA ACCTGCCAAT
1561 GAGAATCGAC AACAACAAAG GTTGTGGTAT CGCCTCCTGT CCAGTTGATT TGGGTCCAAA
1621 CTGTCCATCT CCACTGAAGG GTCCATTGCA CTCTACTGGT TTTCCAGTTG GTTGTAGATC
1681 CGCTTGTGAA GCCAACTTGG ACGGTAATCA AGCTAACTCC CCAAAGTGT GTTCCGGTCA
1741 GTACAACACT GCTGCTACTT GTCCACCATC TGGTGTGGCT TACTACTCCT ACTTCAAGGG
1801 TAACTGCCCA AACGCTTACG CCTACGCTTA CGATGAATCT TCCGGTACTG CTTTGTGGAC
1861 CTGTAACTCT GGTTTGGCTG CTGACTACAC CATCACTTTC TGTCCACCAA ACCATCACCA
1921 CCACCATCAT TAATCTAGAA CAAAAACTCA TCTCAGAAGA GGATCTGAAT AGCGCCGTCG
1981 ACCATCATCA TCATCATCAT TGAGTTTGTG GCCTTAGACA TGACTGTTCC TCAGTTCAAG
2041 TTGGGCACTT ACGAGAAGAC CGGTCTTGCT AGATTCTAAT CAAGAGGATG TCAGAATGCC
2101 ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCAATTTT GATACTTTTT TATTTGTAAC CTATATAGTA
2161 TAGGATTTTT TTTGTCATTT TGTTTCTTCT CGTACGAGCT TGCTCCTGAT CAGCCTATCT
2221 CGCAGCTGAT GAATATCTTG TGGTAGGGGT TTGGGAAAAT CATTGAGTT TGATGTTTTT
2281 CTTGGTATTT CCCACTCCTC TTCAGAGTAC AGAAGATTAA GTGAGACCTT CGTTTGTGCG
2341 GATCCCCCAC ACACCATAGC TTCAAAATGT TTCTACTCCT TTTTACTCT TCCAGATTTT
2401 CTCGGACTCC GCGCATCGCC GTACCACCTC AAAACACCCA AGCACAGCAT ACTAAATTTT
2461 CCCTCTTTCT TCCTCTAGGG TGTCGTTAAT TACCCGACT AAAGGTTTGG AAAAGAAAAA
2521 AGAGACCGCC TCGTTTCTTT TTCTTCGTCG AAAAAGGCAA TAAAAATTTT TATCACGTTT
2581 CTTTTTCTTG AAATTTTTTT TTTTAGTTTT TTTCTCTTTC AGTGACCTCC ATTGATATTT
2641 AAGTTAATAA ACGGTCTTCA ATTTCTCAAG TTTTCAAGTTT ATTTTTCTTG TTCTATTACA
2701 ACTTTTTTTA CTTCTTGTTT ATTAGAAAGA AAGCATAGCA ATCTAATCTA AGGGGCGGTG
2761 TTGACAATTA ATCATCGGCA TAGTATATCG GCATAGTATA ATACGACAAG GTGAGGAAC
2821 AAACCATGGC CAAGTTGACC AGTGCCGTTT CCGGTGCTCAG CGCGCGCGAG GTCGCGGAG
2881 CGGTCGAGTT CTGGACCGAC CGGCTCGGTT TCTCCCGGGA CTTCTGGGAG GACGACTTCG
2941 CCGGTGTGGT CCGGGACGAC GTGACCCTGT TCATCAGCGC GGTCCAGGAC CAGGTGGTGC
3001 CGGACAACAC CCTGGCCTGG GTGTGGGTGC GCGGCCTGGA CGAGCTGTAC GCCGAGTGGT
3061 CGGAGGTCGT GTCCACGAAC TTCGGGACG CCTCCGGGCC GGCCATGACC GAGATCGGCG
3121 AGCAGCCGTG GGGGCGGGAG TTCGCCCTGC GCGACCCGGC CGGCAACTGC GTGCACTTCG
3181 TGGCCGAGGA GCAGGACTGA CACGTCCGAC GGCGGCCAC GGGTCCCAGG CCTCGGAGAT
3241 CCGTCCCCCT TTTCTTTTGT CGATATCATG TAATTAGTTA TGTCACGCTT ACATTCACGC
3301 CCTCCCCCA CATCCGCTCT AACCGAAAAG GAAGGAGTTA GACAACCTGA AGTCTAGGTC
3361 CCTATTTATT TTTTATAGT TATGTTAGTA TTAAGAACGT TATTTATATT TCAAATTTTT
3421 CTTTTTTTTT TGTACAGACG CGTGTACGCA TGTAACATTA TACTGAAAAC CTTGCTTGAG
3481 AAGGTTTTTG GACGCTCGAA GGCTTTAATT TGCAAGCTGG AGACCAACAT GTGAGCAAAA
3541 GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC
3601 CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
3661 GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG
3721 ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT
3781 CAATGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT
3841 GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAAGTA TCGTCTTGAG
3901 TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCAGTGGTAA CAGGATTAGC
3961 AGACCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC
4021 ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
4081 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTGTTG
4141 AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG
4201 GGGTCTGACG CTCAGTGGA CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATC

```


ANEXO B – Controle da qualidade do gene DN7040 I3

Gene Name	TRINITY_DN7040_c0_g1	Order ID	SG180670-1
Lot#	M88603	Cloning Vector	pPICZalphaA
Length (bp)	726	Cloning Sites	XhoI(CTCGAG)- XbaI(TCTAGA)
Quality Control			
Test Items	Specifications	Results	
Sequencing Alignment	Sequencing data consistent with target	[X] Pass	
Vector Sequence	Flanking sequence of cloning sites are correct	[X] Pass	
Restriction Digest	Insert size is correct and no contaminated bands	[X] Pass	
ORF Across Junction	Correct and consistent with target	N/A	
PCR Amplification	Correct and no contaminated bands	[X] Pass	
Endotoxin Level	Verified, <0.1 EU/μg (Endo-Free Preps Only)	N/A	
Appearance	Clear, no foreign particles	[X] Pass	
DNA Purity	Purity (A 260/A280 = 1.8 - 2.0)	[X] Pass	
DNA Quantity	Actual yield (by A 260)	5μg/5μg	
Comments			
<p>Delivery form: lyophilized plasmid (TE lyophilized) containing the gene insert. It is stable at room temperature for extended period of time during shipping. The lyophilized plasmid can be dissolved in sterile TE buffer or nuclease-free water (neutral pH) depending on the established laboratory practice. After reconstitution, store the stock solution at -20°C or -80°C for long term storage. The lyophilized plasmid dissolved in TE buffer is stable for at least 6 months at 4°C while the lyophilized DNA dissolved in water is <u>NOT STABLE</u> at 4°C.</p> <p>a) Before opening the tube containing the plasmid, please briefly centrifuge the tube. Lyophilized plasmid could attach to the wall of the tube. Opening without centrifugation could cause DNA loss.</p> <p>b) Stock Solution: Reconstitute lyophilized plasmid (4ug or 10ug) in 40ul or 100ul of TE buffer or nuclease-free water (final concentration - 100ng/ul). To accurately determine the quantity of DNA present, please measure OD value of original stock at OD_{260nm} after reconstitution.</p> <p>c) Working Solution: make a 1:10 dilution of stock solution using TE buffer or nuclease-free water (final concentration - 10ng/ul)</p> <p>Transformation and Replating: Transform 2ul of stock solution into appropriate <i>E. coli</i> competent cells according to standard laboratory protocol. Plate the mixture on LB agar (with desired antibiotic selection) and incubate at 37°C for overnight. Select a well separated, <u>SINGLE</u> colony and inoculate in LB medium with desired antibiotic selection for overnight culture. Purify Plasmid DNA from overnight cultures, verify sequences and continue with project of interest. *It is important to select only a <u>SINGLE</u> colony for overnight culture.</p>			
Restriction Digestion			

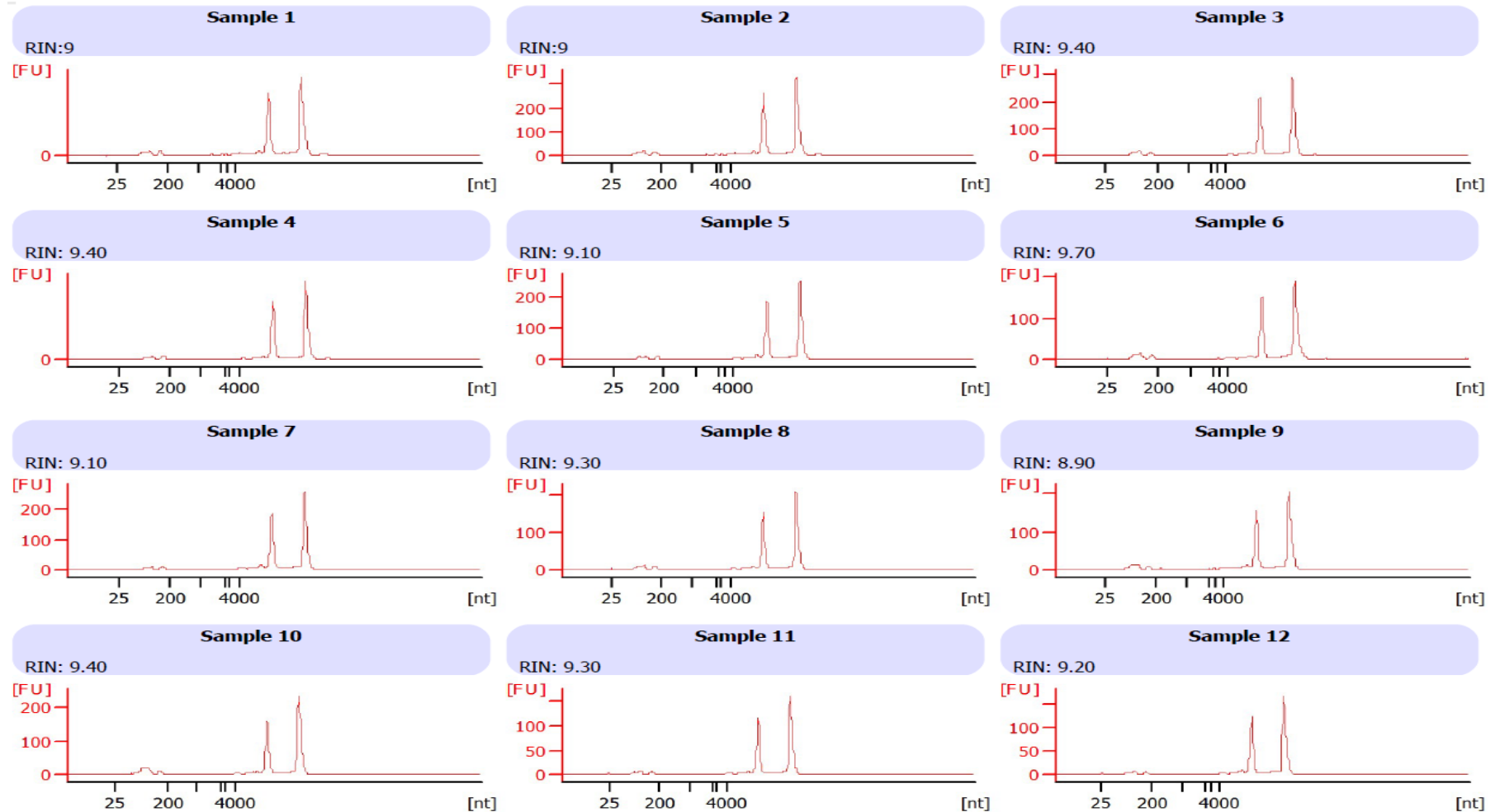


```

1681 TATGCTGAC GCTTTCGAGC AAATGTGGCA GAAGAAGAGA TACAACGAGA TCTTCTTCAT
1741 GATCGACACC TGTCAGGCCA ACACCATGTA CTCTAAGTTC TACTCCCCAA ACATCTTGGC
1801 TACTGGTTCC TCTGAGATTC ACGAGAATC TTACTCCGTT TCCGTTGTCA TCCACGTCAA
1861 CTGTACCTTC CACTTGAAGT TGCATCACCA TCACCACCAT TAATCTAGAA CAAAAACTCA
1921 TCTCAGAAGA GGATCTGAAT AGCGCCGTCG ACCATCATCA TCATCATCAT TGAGTTTGTGTA
1981 GCCTTAGACA TGACTGTTCC TCAGTTC AAG TTGGGCACTT ACGAGAAGAC CGGTCTTGCT
2041 AGATTCTAAT CAAGAGGATG TCAGAAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCATTTT
2101 GATACTTTTT TATTTGTAAC CTATATAGTA TAGGATTTT TTTGTCATTT TGTTTCTTCT
2161 CGTACGAGCT TGCTCCTGAT CAGCCTATCT CGCAGCTGAT GAATATCTTG TGGTAGGGGT
2221 TTGGGAAAAT CATTGAGTT TGATGTTTTT CTTGGTATTT CCCACTCCTC TTCAGAGTAC
2281 AGAAGATTAA GTGAGACCTT CGTTTGTGCG GATCCCCCAC ACACCATAGC TTCAAAATGT
2341 TTCTACTCCT TTTTACTCT TCCAGATTTT CTCGGACTCC GCGCATCGCC GTACCACTTC
2401 AAAACACCCA AGCACAGCAT ACTAAATTTT CCCTCTTCTC TCCTCTAGGG TGTCGTTAAT
2461 TACCCGTACT AAAGGTTTGG AAAAGAAAAA AGAGACCGCC TCGTTTCTTT TTCTTCGTCG
2521 AAAAAGGCAA TAAAAATTTT TATCACGTTT CTTTTTCTTG AAATTTTTTGT TTTTCTTTT
2581 TTTCTCTTTC AGTGACCTCC ATTGATATTT AAGTTAATAA ACGGTCTTCA ATTTCTCAAG
2641 TTTCACTTTC ATTTTTCTTG TTCTATTACA ACTTTTTTTA CTTCTTGTTT ATTAGAAAGA
2701 AAGCATAGCA ATCTAATCTA AGGGGCGGTG TTGACAATTA ATCATCGGCA TAGTATATCG
2761 GCATAGTATA ATACGACAAG GTGAGGAACT AAACCATGGC CAAGTTGACC AGTGCCGTTT
2821 CGGTGCTCAC CGCGCGGAC GTCGCCGAG CGGTGAGTT CTGGACCGAC CGGCTCGGGT
2881 TCCTCCGGGA CTTCGTGGAG GACGACTTCG CCGGTGTGGT CCGGGACGAC GTGACCCTGT
2941 TCATCAGCGC GGTCCAGGAC CAGGTGGTGC CGGACAACAC CCTGGCCTGG GTGTGGGTGC
3001 GCGGCTTGA CGAGCTGTAC GCCGAGTGGT CGGAGGTCTG GTCCACGAAC TTCCGGGACG
3061 CCTCCGGGCC GGCCATGACC GAGATCGGCG AGCAGCCGTG GGGGCGGGAG TTCGCCCTGC
3121 GCGACCGGCC CGGCAACTGC GTGCACTTCG TGGCCGAGGA GCAGGACTGA CACGTCCGAC
3181 GGCGGCCAC GGGTCCAGG CCTCGGAGAT CCGTCCCCCT TTTCTTTTGT CGATATCATG
3241 TAATTAGTTA TGTCACGCTT ACATTCACGC CCTCCCCCA CATCCGCTCT AACCGAAAAG
3301 GAAGGAGTTA GACAACCTGA AGTCTAGGTC CCTATTTAT TTTTATAGT TATGTTAGTA
3361 TTAAGAACGT TATTTATATT TCAAATTTT CTTTTTTTTT TGTACAGACG CGTGTACGCA
3421 TGTAACATTA TACTGAAAAC CTTGCTTGAG AAGGTTTTGG GACGCTCGAA GGCTTTAATT
3481 TGCAAGCTGG AGACCAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG
3541 GCCGCTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
3601 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT
3661 GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTCCG ACCCTGCCG TTACCGGATA CCTGTCCGCC
3721 TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTG
3781 GTGTAGGTCG TTCGCTCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC
3841 TGCGCCTTAT CCGGTAATA TCGCTTGAG TCCAACCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
3901 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGG ATGTAGGCGG TGCTACAGAG
3961 TTCTTGAAGT GGTGGCTTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT
4021 CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
4081 ACCGCTGGTA GCGGTGTTT TTTTGTGTC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA
4141 TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGA CAAAAACTCA
4201 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATC

```

ANEXO C – Análise da integridade do RNA extraído do *Phanerochaete chrysosporium*



Os gráficos mostram as análises realizadas pelo *Bioanalyzer 2100* (Agilent). Os *samples* 1-3 são a triplocata de 24 horas de cultivo, o mesmo ocorre com os *samples* 4-6 para 48 horas de cultivo. Os tempos de cultivo 72 horas (*samples* 7 e 8), 96 horas (*samples* 9-10) e 120 horas (*samples* 11 e 12) foram analisados em duplicata. O sinal correspondente ao rRNA é mostrado entre o [nt] (eixo x) 25 e 200 de todos os gráficos. O sinal acima de 4000 [nt] corresponde ao rRNAr.

ANEXO D – Previsão de sítios passíveis de glicosilação da sequência DN10508 – I10

A

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 19-7-12
##Type Protein
#seqname      source feature start end score strand frame comment
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 2 2 0.0140304 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 4 4 0.0181643 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 12 12 0.0721938 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 19 19 0.0214551 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 25 25 0.554213 . . #POSITIVE
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 32 32 0.305141 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 40 40 0.0900005 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 43 43 0.132958 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 45 45 0.0723208 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 64 64 0.307456 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 70 70 0.0831658 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 87 87 0.20701 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 89 89 0.429553 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 95 95 0.31576 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 100 100 0.073267 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 113 113 0.00763756 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 134 134 0.0438702 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 145 145 0.297837 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 153 153 0.186744 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 154 154 0.18867 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 162 162 0.0772691 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 175 175 0.29561 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 180 180 0.440532 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 185 185 0.521556 . . #POSITIVE
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 188 188 0.581455 . . #POSITIVE
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 192 192 0.182803 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 198 198 0.111776 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 215 215 0.12016 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 216 216 0.025643 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 218 218 0.0254977 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 222 222 0.139576 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 225 225 0.179341 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 232 232 0.00910911 . .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 234 234 0.0195645 . .
```

B

Asn-Xaa-Ser/Thr sequons in the sequence output below are highlighted in blue.
Asparagines predicted to be N-glycosylated are highlighted in red.

Output for 'Sequence'

Name: Sequence Length: 257

```
MKAASSTLLAASLVAVASARTFTVYNGCPFTIWPAMFIDLNVGTAVPNYPTGWEAGAYTVSFSVPDNNKAGRIWGRNCD 80
FSNPNPATQCADGGCNGGLLCD AHTGTGVPATVAEFTLQGDGNLDYDVS LVDGYNLP MRIDNNKGGCIASC PVDLGP N 160
CPSPLKGFDFSTGFPVGCRSACEANLDGNQANSNCCSGQYNTAATCPPSGVAYYSYFKGKCNAYAYAYDESSGTALWT 240
CNSGLAADYITITFCPPN
..... 80
..... 160
..... 240
..... 320
```

(Threshold=0.5)

No sites predicted in this sequence.

(A)Glicosilação do tipo O (B)Glicosilação do tipo N.

ANEXO E – Previsão de sítios passíveis de glicosilação da sequência DN7050 I3

A

```

##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 19-7-13
##Type Protein
#seqname      source  feature  start  end    score  strand  frame  comment
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  8      8      0.0495697  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  9      9      0.0512648  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  10     10     0.0188336  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  22     22     0.0149343  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  28     28     0.0888273  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  30     30     0.0834867  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  33     33     0.0205481  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  52     52     0.141491   .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  54     54     0.0150217  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  56     56     0.0162619  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  57     57     0.00544974 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  59     59     0.00943813 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  69     69     1.10177e-05 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  79     79     0.00554155 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  87     87     1.40793e-05 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  96     96     0.00338173 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  120    120    0.086127   .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  125    125    0.0144321  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  143    143    0.0144263  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  152    152    0.0257441  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  158    158    0.178742   .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  162    162    0.0133649  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  167    167    0.00973489 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  171    171    0.00297318 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  178    178    0.010097   .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  195    195    0.00381228 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  221    221    3.23143e-07 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  226    226    0.00297781 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  229    229    1.30482e-05 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  233    233    0.0154561  .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  239    239    0.00917624 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  241    241    0.00491002 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  242    242    0.00433914 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  248    248    0.00806622 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  250    250    0.010163   .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  252    252    0.00495855 .      .
SEQUENCE     netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  260    260    0.00374882 .      .
    
```

