INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPGGCBEV

Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*

EDSON JÚNIOR DO CARMO

Manaus – Amazonas
Março/2010

EDSON JÚNOR DO CARMO

Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*

Orientador: Spartaco Astolfi Filho, Dr

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – Amazonas
Março/ 2010

C287 Carmo, Edson Júnior do
Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* / Edson Júnior do Carmo .--- Manaus: [s.n.], 2010.
xix, 115 f.: il. color.

Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus, 2010
Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. *Aspergillus awamori*. 2. Expansão gênica. 3. Clonagem. 4. Enzimas recombinantes. 5. *Pichia pastoris*. 6. Expressão heteróloga. 7. Etanol. I. Título.

CDD 19. ed. 589.20415

SINOPSE

A enzima glicoamilase é classificada como uma exoamilase e possui atividade sacarificante sobre o amido, hidrolisando-o em glicose. Foi desenvolvido um sistema de expressão de proteínas heterólogas utilizando a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* para a produção de glicoamilase do fungo *Aspergillus awamori*. A proteína secretada se mostrou ativa e de boas características em aplicações industriais.

Palavras-chave: 1. Enzima recombinante 2. Amido 3. Expressão Heteróloga. 4. Etanol

Dedico:

Às pessoas que sempre me apoiaram, especialmente, à minha família, à memória de meu pai Raimundo S. Carmo razão maior de minha persistência, quem muito em vida me incentivou e me inspirou, e a minha mãe Marlene do Carmo, causa absoluta da alegria e da força que sempre tive, minha grande referência de fortaleza.

Sucesso...!!!
Spartaco Astolfi Filho

Agradecimento Institucional

Os meus agradecimentos aos financiadores e apoiadores da pesquisa científica, à PETROBRÁS pela aprovação do projeto macro, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo apoio institucional, ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do INPA pela estrutura acadêmica, ao Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas por toda estrutura física e suporte técnico-laboratorial. Sou muito grato!

Agradecimentos Pessoais

A realização desta dissertação contou com a colaboração de diversas pessoas que direta e indiretamente, presentes ou mesmo distantes, contribuíram para que este trabalho fosse finalizado. A todas estas pessoas que me apoiaram em questões técnicas, intelectuais, profissionais e inclusive emocionais, estendendo a mais sincera gratidão e agradeço especialmente:

Ao brilhante Dr. Spartaco Astolfi-Filho, pesquisador, professor, orientador e acima de tudo a sua pessoa carismática que transborda ética e amor profundo pela ciência. Obrigado professor pela confiança e oportunidade de eu ingressar no grupo de pesquisa, aceitando me orientar depois de eu muito ter insistido e ter dito que tudo seria novo para mim.

À Gabriela Müller, mestre espetacular e dinâmica que me passou alguns ensinamentos de engenharia genética. Valeu Gabi pelos ensinamentos, paciência, dicas, orientação, confiança, amizade e por sempre ter me incentivado. Sem a sua figura tudo teria sido muito mais difícil.

Ao programa de genética do INPA, pelo apoio de sempre, à coordenação do programa e acima de tudo às secretárias. Agradecimento especial à Alessandra Marques por sempre ser prestativa e solicita.

Aos docentes do PPGGCBEv pela contribuição na formação acadêmica e amadurecimento profissional.

À contribuição dos professores doutores avaliadores do projeto de dissertação Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, Dr. Élgion Lúcio da Silva Loreto e Dra. Elizabete José Vicente.

Aos doutores avaliadores da qualificação projeto Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse, Dr. José Odair Pereira e Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva.

Aos doutores membros da banca de defesa da dissertação Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg, Dr. João Lúcio de Azevedo, Dr. Jorge Luis López-Lozano, Dr. André Luis Willerding, Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva.

A toda minha família pelo incentivo e amor que recebo, isso sem dúvida me impulsionou e sempre continuará. Agradeço o crédito, confiança e o carinho de meus pais, Marlene Carmo e Raimundo S. Carmo (*in memorian*), mantenedores da minha razão de viver, minha fonte de onde buscar forças, coragem, lealdade, humildade para ir

em frente e aos meus irmãos, Rose, Ede e Rogério pelo carinho, amizade, amor, respeito, preocupação e por torcer que eu seja feliz. Obrigado família!!!

À galera do mestrado 2008 e aos agregados, a turma do barulho do curso de genética do INPA (Daniela, Deyla, Mauro, Joel, Bárbara, Mariana, Alexandre, Edivaldo, Graciela, Gabriela, Melina e a agregada Leila). Galera, obrigado pelo apoio, amizade compartilhada, força, alegria, risadas nos momentos de distração. Estivemos próximos em muitos momentos, nos quais eu recebi amizade e conforto quando realmente muito precisei, formamos uma família de malucos que deixaram suas casas em rumo ao horizonte.

Ao grupo da Biotecnologia da UFAM e ao pessoal do laboratório de Tecnologia de DNA e Proteoma, pessoas com quem convivi profissionalmente durante o mestrado e que foram importantes neste período. Dina, Mirna, Jonso, Marcos, Tiago, Rogério Neves, Gabi (evadida I), Gisele, Ciça, André, Isabele (evadida II), Danielle, Profa. Isabel, Diego, Andrea, Lanna, Auriene, Fabiano, Profa. Leonor, Prof. Edmar, Anita, PH, Carol, Aleandro, Elza, Patrícia, Lívio, Marcelo, Roberto, Alexandra e Deborah. Agradecimento especial à Dina, esteio do laboratório, sempre disposta a contribuir, pessoa a quem recorri por infinitas vezes e que sempre tinha uma solução para tudo, obrigado Dina, inclusive pelas broncas que recebi quando fazia algo de errado, que na realidade nem era eu quem fazia, era sempre culpa da Mirna.

À amiga Deyla “Tanna” Oliveira, a baixinha esquentada, parceira nas madrugadas de laboratórios, de horas de discussão de artigos científicos no Thaz Mania Pub, por compartilhar comigo momentos de vivencia mais bizarros nesses dois anos.

À sempre risonha Dona Regina, e a Lucina. Aos amigos da secretaria do CAM Roberto Lira, Josué, Edson e da secretaria do PPGBIOTEC, pelos favores pretados.

Às meninas lindas, tão lindas, mais lindas que todas as outras também ditas lindas, Bárbara, Leila e Mari. Esta é a frase de efeito que usava antes de pedir qualquer coisa. Valeu meninas pela amizade, paciência e diversões, agradeço por sempre tentarem me arrastar para farra quando sempre eu resistia ferrenhamente e dizia que não ia, até que não sei como estivesse lá.

Aos amigos Eduardo (Abu) e Junior (Cabeça) que me receberam em Manaus e proporcionaram que as coisas não se tornassem tão difícil a um marinheiro de primeira viagem.

Às dicas de transformação bacteriana do companheiro de laboratório Rogério de Oliveira Neves.

À Daniela, menina hilária, amiga, obrigado pela amizade e carinho. Pelos diversos momentos legais e engraçados como o da pipoca e do arroz alucinógenos, do piano imaginário e tantos outros acontecimentos não menos impactantes. Valeu por me tornar "o cara" por ter a sua companhia nas festas, das quais éramos os últimos a sair.

Ao amigo José Maria Cabral pela cordialidade de sempre.

Ao amigo Rogério J. C. Frazão, pessoa excepcional e cativante que me concedeu sua amizade, e me fez rir com suas "brincadeiras excêntricas" e suas manias mais que peculiares. Obrigado por ter me proporcionado alegria, por me distrair em muitos momentos e ter contribuído com meu crescimento pessoal.

Aos amigos da turma de biologia da UFMT *Mergus sp.* que apesar da distancia por vezes se fizeram presentes, diminuindo a enorme saudade.

Ao pessoal do laboratório de Genética Animal da UFMT, pelos ensinamentos iniciais em pesquisa científica, pela amizade e por ter me ajudado a segurar a barra logo que cheguei em Manaus, Ademil, Oesley, Liano, Elisangela, Sandra, Carlos, Edson Lourenço, Rodrigo e Diones, muito obrigado.

A todos em Cuiabá que contribuíram com a campanha do jabá em meu favor encabeçada pela amiga Joseana. Muito obrigado!!! Valeu Jose!!!

Às mulheres da minha vida Janaína, Joliane, Joseana, Michelle, Karene e Paula pela amizade de sempre, por torcerem por mim e se fazerem presentes mesmo estando distantes.

À Deus, por ter me iluminado e me dado forças durante um dos períodos mais difíceis de toda a minha vida.

Resumo

A utilização de produtos biotecnológicos, especialmente proteínas e enzimas no setor industrial, tem aumentando significativamente em nível mundial. A glicoamilase é uma das principais enzimas responsáveis pela hidrólise do amido para a formação de xarope de glicose, matéria-prima utilizada pela indústria de alimentos e como fonte de carbono em processos fermentativos diversos. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido utilizada com sucesso para expressão de várias proteínas de interesse biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o sistema de expressão heteróloga utilizando a levedura *P. pastoris* para a produção da enzima. O cDNA da glicoamilase isolado do fungo *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1 foi inserido no genoma de *P. pastoris* utilizando o vetor de expressão pPIC9, baseado no promotor AOX, gerando clones recombinantes de fenótipos Mut^+ e Mut^S cultivados sob agitação constante para a produção e secreção da proteína. As atividades das enzimas foram avaliadas utilizando o método DNS que quantifica açúcares redutores resultantes da clivagem das moléculas de amido. A máxima atividade enzimática observada no sobrenadante bruto do clone com fenótipo Mut^+ foi 7.7 U/mL e do clone transformante Mut^S foi 6.9 U/mL. Os dois clones secretaram glicoamilases com 116 kDa que apresentaram diferentes poder catalítico, mas foram bioquimicamente semelhantes, com mesma temperatura de atividade ótima a 60ºC, elevada ação catalítica em pH ácido que varia de 4.5 a 2.5 com atividade máxima em pH 3.5 e suas estabilidades frente ao pH do meio de reacional, possuindo portanto, características desejáveis para uso em alguns processos bioindustrias. Ambos os produtos se mantiveram estáveis quando os extratos brutos foram incubados a temperatura de 4Cº por 60 dias, mantendo perto de 100% da atividade máxima. No entanto, a enzima produzida por *P. pastoris* Mut^+ apresenta maior estabilidade térmica, retendo cerca de 70% de atividade residual quando incubada por 60 minutos a 60Cº, contra menos de 10% de atividade residual observada para a enzima expressa pelo clone Mut^S, avaliada nas mesmas condições. Diferentes modificações pós-traducionais poderiam estar envolvidos na pronunciada diferença de estabilidade térmica das proteínas produzidas por *P. pastoris* que tem se mostrado um excelente sistema de expressão de proteínas.

Palavras-chave: *Pichia pastoris*, Expressão Heteróloga, Fenótipos Mut^+ e Mut^S , Glicoamilase.

Abstract

The utilization of biotechnological products, mainly proteins and enzymes in the industrial sector, has been increased considerably worldwide. Glucoamylase is of main enzyme responsible for the hydrolysis of starch for the formation of glucose syrup, raw material used by the food industry and carbon source in diverse fermentative process. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been successfully used for the expression of some heterologous proteins of biotechnological interests. The aim of this work was to evaluate the system of proteins heterologous expression using the yeast *P. pastoris* for enzyme production. The glucoamylase cDNA isolated from *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1 was inserted into *P. pastoris* genome using vector pPIC9, based in the AOX promoter, generating recombinant clones of Mut^{+} and Mut^{S} phenotypes and grown under constant agitation for enzyme production and secretion. Enzymes activity was measured utilizing DNS method that it quantifies resultant sugar-reducing of the breaking of starch molecules. Maximum enzymatic activity observed in the crude supernatant of Mut^{+} clones phenotype was 7.7 U/mL and Mut^{S} clones phenotype was 6.9U/mL. Both clones producing glucoamylases with 116 kDa that they had presented different to be able catalytic, but they had been biochemically similar with same temperature of optimum activity of 60ºC, high catalytic action in pH acid that it varies of 4.5 the 2.5 with maximum activity in pH 3.5 and its stability front pH of reaction way, possessing therefore, characteristics desirable for use in some processes bioindustries. Both the products if had kept steady when the crude extracts had been kept the temperature at 4Cº during 60 days, keeping close to 100% of the maximum activity. However, the enzyme produced for Mut^{+} *P. pastoris* presents greater thermal stability, holding back about 70% of residual activity when kept during 60 minutes at 60Cº, against less than 10% of observed residual activity for the express enzyme for Mut^{S} clone, evaluated in the same conditions. Different modifications post-translational could be involved in the sharp difference of thermal stability of proteins produced for *P. pastoris* that if it has shown an excellent system of protein expression.

Key-words: *Pichia pastoris*, Heterologous expression, Mut^{+} and Mut^{S} phenotypes, Glucoamylase.

Sumário

Lista de Figuras xvii
1 - Introdução 1
1.1 - Enzimas como produto da biotecnologia 1
1.1.2 - Produção de proteínas a partir de engenharia biotecnológica 1
1.2 - Enzimas utilizadas na produção do etanol 2
1.2.1 - As amilases 3
1.2.2 - Glicoamilase 4
1.3 - Produção de etanol carburante 7
1.4 - Hidrólise do amido 9
1.5 - Sistemas de expressão heteróloga 11
1.5.1 - *Pichia pastoris* como sistema de expressão de genes exógenos 12
1.5.1.1 - Metabolismo do metanol 14
1.5.1.2 - Linhagens de P. pastoris 16
1.5.1.3 - Vetores de expressão 16
1.5.1.4 - Fenótipos da levedura e formas de integração no genoma de *P. pastoris* ..17
2 - Justificativa 20
3 - Objetivos 22
3.1 - Objetivo Geral 22
3.2 - Objetivos Específicos 22
4 - Material e métodos 23
4.1 - Linhagens de hospedeiras. 23
4.2 - Meios de cultivo. 23
4.3 - Plasmídeos utilizados. 23
4.4 - Estratégias de clonagem 27
4.4.1 - Isolamento do cDNA de glicoamilase 27
4.4.2 - Construção do vetor pTPG 28
4.4.2.1 - Clonagem do fragmento isolado no vetor pCR4-TOPO 28
4.4.2.2 - Transformação bacteriana por eletroporação 28
4.4.2.3 - Preparo de células *E. coli* eletrocompetentes 28
4.4.2.4 - Eletroporação da hospedeira E. coli Top 10 29
4.4.2.5 - Identificação do cDNA da glicoamilase no vetor pTPG por PCR de colônia 29

4.4.2.6 - Extração de DNA plasmidial 30
4.4.2.7 - Identificação do inserto no vetor pTPG por análise de restrição 30
4.5 - Construção do vetor de expressão pPG.....30
4.5.1 - Digestão do vetor de expressão pPIC9 e do vetor construído pTPG 30
4.5.2 - Subclonagem do cDNA da glicoamilase no vetor de expressão pPIC9 (montagem do vetor pPG para expressão em *Pichia pastoris*) 31
4.5.3 - Identificação do cDNA da glicoamilase no vetor pPG por PCR de colônia..31
4.5.4 - Identificação do cDNA da glicoamilase no vetor pPG por análise de restrição 32
4.6 - Transformação da levedura *P. pastoris* GS115.....32
4.6.1 - Preparo de células leveduriformes eletrocompetentes 32
4.6.2 - Linearização do vetor de expressão pPG para transformação e integração do cassete de expressão no *locus AOX1* por substituição gênica 33
4.6.3 - Eletroporação da hospedeira *P. pastoris* GS115.....33
4. 7 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio sólido 34
4.7.1 - Seleção dos clones produtores de glicoamilase 34
4.7.2 - Seleção de fenótipos Mut^+ e Mut^S dos clones recombinantes.....35
4.8 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio líquido.....35
4.8.1 - Cinética de indução enzimática.....35
4.8.2 - Minicultura em meio líquido para indução 35
4.8.3 - Indução em frasco de clones recombinantes com fenótipos Mut^+ 35
4.8.4 - Indução em frasco de clones recombinantes com fenótipos Mut^S 36
4.9 - Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE 37
4.9.1 - Coloração de proteínas por Azul Brilhante de *Coomassie* G250.....37
4.10 - Ensaios enzimáticos para a determinação da ação do produto gênico.....37
4.10.1 - Análise quantitativa da atividade enzimática – determinação do produto pelo método DNS 37
4.11 - Caracterização da glicoamilase produzida por *P. pastoris* 38
4.11.1 - Quantificação de proteínas totais 38
4.11.2 - Determinação do *pH* ótimo da ação catalítica.....39
4.11.3 - Determinação da estabilidade da glicoamilase em relação ao *pH* 39

4.11.4 - Determinação da temperatura ótima 39
4.11.5 - Determinação da estabilidade térmica da glicoamilase.....39
4.11.6 - Estabilidade glicoamilásica 4ºC 40
4.12 - Parâmetros cinéticos da enzima recombinante.....40
4.12.1 - Determinação dos valores de *Km* e *Vmáx* para a glicoamilase recombinante 40
5 - Resultados e Discussão.....41
5. 1 - Isolamento do cDNA de glicoamilase, construção do vetor pTPG.....41
5.2 - Identificação do inserto no vetor pTPG por PCR de colônia e confirmação da orientação por análise de restrição com a endonuclease *Not*I 43
5.3 - Construção do vetor de expressão pPG.....45
5.4 - Identificação do inserto no vetor pPG por PCR de colônia e confirmação da correta construção por análise de restrição com as endonucleases *Eco*RI e *Not*I 48
5.5 - Transformação da levedura e integração do cassete de expressão na hospedeira *P. pastoris*.....50
5.6 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio sólido 51
5.6.1 - Seleção dos clones produtores de glicoamilase 51
5.6.2 - Seleção dos fenótipos Mut^+ e Mut^S dos clones recombinantes de *P. pastoris* 52
5.7 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio líquido.....54
5.7.1 - Cinética de indução enzimática.....54
5.7.1.1 - Produção de glicoamilase em minicultura 54
5.7.1.2 - Produção de glicoamilase recombinante em meio líquido em frascos agitados.....57
5.8 - Caracterização bioquímica da glicoamilase 63
5.8.1 - Determinação do *pH* ótimo da ação catalítica.....63
5.8.2 - Determinação da estabilidade da glicoamilase em relação ao *pH* 65
5.8.3 - Determinação da temperatura ótima 67
5.8.4 - Determinação da estabilidade térmica da glicoamilase.....68
5.8.5 - Estabilidade da glicoamilase a 4ºC 70
5.9 - Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE 71

5.10 - Cálculos dos parâmetros cinéticos (*Km e Vmáx*) 73
6- Conclusões.....76
7 - Referências Bibliográficas 77
8 - APÊNDICE A - MEIOS DE CULTIVO 93
8.A.1 - MEIOS DE CULTIVO BACTERIANO.....93
8.A.2 - MEIOS DE CULTIVO DE LEVEDURAS *P. PASTORIS* 93
8.A.3 - SOLUÇÕES ESTOQUES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTIVO PARA *P. PASTORIS* 95

Lista de Figuras

Figura 1. Imagem da estrutura estendida da glicoamilase de *A. awamori.* No lado esquerdo o domínio catalítico (DC), ao centro o filamento ligante ou "*linker*" (L) e à direita o domínio de ligação ao substrato (DLS). Extraído de Lemos *et al*., 2003. 5

Figura 2. Esquema da estrutura tridimensional da glicoamilase de. *A awamori*. As alfa-hélices são representadas pelos cilindros, os sítios de O-glicosilação estão representados pelos hexágonos únicos e os sítios de N-glicosilação são simbolizados pelas cadeias de hexágonos. (Extraído de Aleshin *et al*., 1992). 6

Figura 3. Representação da estrutura polimérica do amido. A primeira cadeira linear representa a amilose e a segunda cadeia ramificada representa a amilopectina..... 9

Figura 4. Via metabólica do metanol em P. pastoris. 1-Álcool oxidase; 2-Catalase; 3-Formaldeído desidrogenase; 4-Formato desidrogenase; 5-Dihidroxicetona sintase; 6-Dihidroxicetona quinase; 7-Frutose 1,6-bifosfato aldolase; 8-Frutose 1,6-bisfosfatase (Cereghino e Cregg, 2000). 15

Figura 5. Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no *locus HIS4* (Invitrogen, 2006)..... 18

Figura 6. Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no *locus AOX1* (Invitrogen, 2006). 18

Figura 7. Esquema da forma de integração por substituição gênica do gene *aox1* acarretando mudança no fenótipo da levedura hospedeira (Invitrogen, 2006)..... 19

Figura 8. Plasmídeo pG5 com o cDNA da glicoamilase clonado para expressão com o promotor PGK. 24

Figura 9. Plasmídeo comercial pCR4-TOPO utilizado para a subclonagem do cDNA da glicoamilase isolado do pG5..... 25

Figura 10. Vetor pPIC9 utilizado para a clonagem do cDNA da glicoamilase e sua expressão em *P. pastoris* 26

Figura 11. Perfil eletroforético dos produtos obtidos após amplificação do cDNA da glicoamilase de *A. awamori*. Colunas 1 e 2 – cDNA *GLA*; M – Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega)..... 41

Figura 12. Plasmídeo pTPG com aproximadamente 5 kb, oriundo da ligação do fragmento amplificado correspondente ao cDNA da glicoamilase ao vetor pCR4-TOPO. 42

Figura 13. Análise eletroforética dos produtos da PCR de colônia realizada com os transformantes pPTG. B= Branco da reação de amplificação; += Controle positivo; 1-14= fragmento amplificado correspondente ao cDNA da glicoamilase; M= Marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas). 43

Figura 14. Análise do perfil de restrição com enzima *Not* I para verificação da orientação do inserto no vetor de clonagem. 3 a 14 = Plasmídeos pTPG digeridos com *Not* I, M= marcador de peso molecular 1Kb. 44

Figura 15. Mapa do múltipliplo sítio de clonagem (MSC) do vetor pTPG. A seta espessa mostra o sítio de clivagem de *Not*I utilizado na análise de restrição e a seta fina indica a posição do sitio de *Not*I da extremidade do inserto após a clonagem. Modificado do manual TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, (www.invitrogen.com). 45

Figura 16. Perfil eletroforético dos plasmídeos pTPG digeridos com *Eco*RI e *Not*I. Sistema 1 – Plasmídeos isolados dos clones 03, 07 e 09; Sistema 2 – Plasmídeos isolados dos clones 10 e 14. M= Marcador de peso molecular 1Kb. 46

Figura 17. Análises eletroforética mostrando o cDNA da glicoamilase e o vetor pPIC9 linearizado, ambos os tratados com as enzimas com *Eco*RI e *Not*I e purificados. Colunas 1 e 2 – cDNA da glicoamilase; 3 – Vetor de expressão pPIC9 linearizado; M – Marcador de peso molecular 1 Kb..... 46

Figura 18. Sequência do cassete expressão do vetor pPIC9 mostrando os sítios de restrição para clonagem da sequência do cDNA da glicoamilase com a sequência sinal do plasmídeo (SS). As setas indicam o local de clonagem direcionada do cDNA da glicoamilase. 47

Figura 19. Mapa do plasmídeo recombinante construído pela ligação do cDNA da glicoamilase ao vetor pPIC9. O plasmídeo pPG tem cerca de 9,9 kb, possuí as características do vetor comercial pPIC9 e contém o fragmento codificante da glicoamilase introduzido em seu cassete de expressão. 48

Figura 20. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do cDNA da glicoamilase por PCR de colônia. CN – Controle Negativo; CP – Controle positivo amplificado do pG5; Colunas 01 a 15 – Clones analisados..... 49

Figura 21. Perfil eletroforético do produto de digestão dupla dos plasmídeos pPG com as enzimas *Eco*RI e *Not*I. 1 – pTPG digerido com *Eco*RI e *Not*I; M – Marcador de peso molecular 1 Kb; 01, 07, 09, 10, 14, 15 – plasmídeos pPG duplamente digeridos; 2 – pPIC9 intacto; 3 – pPIC9 digerido com *Eco*RI e *Not*I. A seta indica o fragmento *GLA*. 50

Figura 22. Perfil eletroforético do produto de digestão do plasmídeo recombinante pPG com *Bgl*II, utilizados para transformação em *P. pastoris*. A banda superior mostra o fragmento correspondente ao cassete de expressão do pPG contendo o cDNA *GLA* e na banda inferior tem-se o fragmento que possuí a região de origem de replicação em *E. coli*, o gene de resistência a ampicilina e outras sequências do pPIC9. 51

Figura 23. Fotografia da placa utilizada para seleção dos clones transformantes produtores de glicoamilase pela formação de halos translúcidos em torno das colônias. A seta indica o controle positivo para produção da proteína de fusão alfa-amilase/glicoamilase..... 53

Figura 24. Gráfico que mostra o índice de amilolise (I.a) da glicoamilase (*GLA*) produzida por *P. pastoris* recombinante. C^+= Controle positivo para formação de halos (enzima de fusão alfa-amilase/glicoamilase); P1, P2, P14, P19 e P20= clones recombinantes de fenótipo Mut^+ utilizados para produção de *GLA*; P46= Clone Mut^+ de menor I.a (não analisado); S1, S2, S3, S10 e S12= Clones Mut^S para expressão da enzima; S19= Menor I.a entre os clones de crescimento lento em meio com metanol (não analisado)..... 55

Figura 25. Cinética da produção de glicoamilase em minicultura: A) Clones Mut^+ (P19) induzidos por 72 horas, B) Clones Mut^S (S10) cultivados por 120 horas. 56

Figura 26. Gráfico da atividade de glicoamilase dos clones Mut^+ (P19) e Mut^S (S10) em função do tempo de indução por metanol, à 30ºC, com agitação de 200 rpm..... 59

Figura 27. Níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone de fenótipo Mut^S em meio de cultivo. ■ - Densidade Celular (g/L); ♦ - Atividade Enzimática (U/mL). 61

Figura 28. Níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone de fenótipo Mut^+em meio de cultivo. ■ - Densidade Celular (g/L); ♦ - Atividade Enzimática (U/mL). 62

Figura 29. Efeito do *pH* sobre a atividade de glicoamilase produzida pelo clone Mut^+ (P19) e clone Mut^S (S10)..... 64

Figura 30. Estabilidade da glicoamilase frente incubação por 24 horas em tampão McIlvane com diferentes valores de *pH*. P19: Enzima produzida por *P. pastoris* de fenótipo Mut^+ e S10 glicoamilase secretada pelo clone Mut^S..... 66

Figura 31. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da glicoamilase. P19: Enzima produzida por *P. pastoris* de fenótipo Mut^+ e S10 glicoamilase secretada pelo clone Mut^S. 68

Figura 32. Termotolerância da glicoamilase incubada pura por 60 minutos a 60ºC..... 69

Figura 33. Efeito do tempo de estoque a 4ºC sobre a ação catalítica da glicoamilase P19 e S10. 70

Figura 34. Análise eletroforética da glicoamilase secretada. A) Clone Mut^+: GS115=Levedura *Picha pastoris* GS115 não recombinante; 0, 24, 48 e 72 sobrenadante de cada tempo de indução. B) Clone Mut^S: GS115=Levedura *P. pastoris* sem transformar; 0, 24, 48, 72, 96 e 120 extrato enzimático. BSA= Albumina soro bovina utilizada como referencia de peso molecular (69 kDa). 72

Figura 35. Análise eletroforética da glicoamilase recombinante secretada. P19 proteína produzida pelo clone Mut^+; S10 proteína secretada pelo clone Mut^S; M= Marcador de peso molecular 116 kDa. 73

Figura 36. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade glicoamilásica do clone de fenótipo Mut^+. 74

Figura 37. Gráfico dos duplos recíprocos obtido pela cinética enzimática da glicoamilase do clone Mut^+. 75

1 - Introdução

1.1 - Enzimas como produto da biotecnologia

1.1.2 - Produção de proteínas a partir de engenharia biotecnológica

A utilização de produtos biotecnológicos, especialmente proteínas e enzimas, no setor industrial, vem aumentando significativamente em nível mundial. Assim inúmeros esforços foram realizados no sentido de aperfeiçoar seus processos de produção de forma a se obter melhores rendimentos e valores de produtividade mais elevados. Nesta esfera, os microrganismos apresentam considerável interesse biológico devido suas biomoléculas constituírem modelos naturalmente interessantes para aplicação em bioprocessos ou para ser otimizadas na tentativa de melhores qualidades (Gomes *et al.*, 2007).

A produção e obtenção de moléculas nativas produzidas por organismos selvagens compreende um conjunto de operações que incluem o tratamento da matéria prima, o preparo de meio de propagação e produção, seguido das etapas de separação e purificação do produto (Bon *et al*., 2008). Entretanto, se identificava vários problemas, como a difícil triagem e manutenção de organismos selvagens, os baixos rendimentos na produção pelos processos tradicionais, a necessidade de produtos mais puros e a limitação na obtenção de moléculas mais complexas ou que não eram sintetizadas por tais organismos.

Com a possibilidade de acesso e manipulação quase que sem limitações das biomoléculas de origens animal, vegetal e de maneira mais intensa, as dos microrganismos, uma enorme variedade de genes e seus produtos puderam ser engenheirados utilizando ferramentas genéticas desenvolvidas pela tecnologia do DNA recombinante e outras técnicas moleculares, fazendo da biotecnologia molecular um campo da ciência de elevado interesse e bastante promissor (Astolfi Filho *et al*., 2005), visando melhorias na obtenção biotecnológica dos mais variados produtos.

Nas três últimas décadas, a engenharia genética tem sido empregada com sucesso para transferir um gene de interesse biotecnológico de um organismo a outro. Assim, meios de manipulação e transformação genética foram criados possibilitando que os genes fossem estudados e expressos de forma a se obter melhores características para as várias utilizações, resultando em trabalhos como expressão do gene de insulina humana em microrganismos (Astolfi Filho *et al.*, 2000), humanização de anticorpos

(Pimentel, 2008), caracterização molecular de promotores gênicos (Almeida *et al.*, 2005) expressão de proteínas de fusão (Moraes *et al.*, 1995, Moraes, *et al.*, 1999), produção de proteínas termoestáveis (Laderman, *et al.*, 1993; Savchenko *et al.*, 2002), expressão de genes alterados por mutação sítio dirigida *in vitro* (Raid, 2007; Yang *et al.*, 2007), produção de enzimas amilolíticas (Astolfi Filho *et al*., 1986; Fukusumi *et al.*, 1988; Pimenta *et al.*, 1991; Schenberg *et al*., 1993; Müller, 2008; Oliveira, 2009), produção e expressão de biocatalizadores através do sistema de *Cell Surface Display* (Jiang *et al*., 2008), além de novas abordagens para melhorar as técnicas disponíveis (Arnau *et al.*, 2010)

A engenharia genética aplicada á biotecnologia , além de substituir processos e obtenção de produtos tradicionais, apresenta grandes perspectivas de melhoria no bem estar da população por meio de melhores soluções para problemas de saúde, alimentação, energia, materiais e meio ambiente.

1.2 - Enzimas utilizadas na produção do etanol

Amido de diversas origens e os vários produtos da biomassa são considerados fontes alternativas da produção de etanol e necessitam ser desdobrados em moléculas menores para a fermentação alcoólica. Para isso são empregadas enzimas hidrolases específicas para cada tipo de substrato. Visto que o Brasil é um dos países detentores de maior potencial na geração de matérias primas renováveis (Bon *et al.*, 2008) o aprimoramento de processos desses materiais seria bastante benéfico ao desenvolvimento tecnológico é industrial do país no setor alcooleiro.

Para o desdobramento das matérias primas lignocelulósicas (resíduos agroindustriais e florestais), constituídas principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, é requerido pré-tratamento físico ou químico e só após são aplicadas enzimas celulolíticas (Brethauer e Wyman 2009). A aplicação do pré-tratamento pode ser drástica de forma a comprometer a qualidade dos produtos e tornar os processos com custos mais elevados (Soccol *et al*., 2009). As enzimas lignocelulósicas, como as celulases, hemicelulases e lignocelulasese, são produzidas por uma diversidade de microrganismos pertencentes aos gêneros de fungos filamentosos *Trichoderma, Penicillim, Aspergillus e Humicola* e também por gêneros bacterianos como *Bacillus, Cellulomonas e Clostridium*. Segundo Soccol *et al.,* (2009), estes microrganismos produzem uma mistura complexa de enzimas que coletivamente tem especificidade por

ligações β-1,4-glicosídicas constituintes dos materiais lignocelulósicos e podem eficientemente hidrolisá-los para fermentação em etanol.

Já as matérias primas amiláceas são menos resistentes a ação enzimática, bastando para tal em alguns casos de rápido tratamento térmico e subsequente hidrólise com uso de enzimas amilases, que neste caso, convertem o amido em monômeros de glicose para a utilização em processos fermentativos e consequente produção de álcool (Aiyer, 2005).

1.2.1 - As amilases

As amilases constituem uma imensa família de enzimas que clivam as ligações glicosídicas do amido (Aiyer 2005; Cereda *et al.*, 2003), liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose.

Estas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações desde indústria de alimentos, detergentes, têxtil, indústrias de papel até a indústria do setor alcooleiro. Apesar da existência de fontes das amilases vegetais e animais, as enzimas microbianas geralmente encontram em maior variedade de tipos e apresentam vasta demanda industrial (Pandey *et al*., 2000). Atualmente, considerável quantidade de amilases microbianas está disponível comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de seu processamento.

As amilases podem ser divididas em quatro tipos de acordo com a sua atividade catalítica (Cereda *et al.,* 2003, Moraes, 2004).

As **endoamilases**, que são enzimas capazes de clivar as ligações glicosídicas alfa-D-(1,4) presentes no interior das cadeias de amilose e amilopectina do amido, tendo como produto final oligossacarídeos de tamanhos variados, como dextrina limites. Entre este grupo de enzimas destacam-se as hidrolases alfa-amilases (Aiyer, 2005);

As **exoamilases** que hidrolisam ligações glicosídicas alfa-D-(1,4) externas como a β-amilase ou ambas as ligações alfa-D-(1,4) e alfa-D-(1,6) glicosídicas, produzindo somente glicose, a exemplo da glicoamilase (Goto *et al*., 2004; Bott *et al*., 2008);

Enzimas **desramificadoras** que hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas alfa-D-(1,6), das quais a exemplo têm-se a enzima pululanase (Aiyer, 2005; Dong *et al*., 1997);

E por fim, há ainda as amilases **transferases** que quebram ligações glicosídicas alfa-D-(1,4) da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase e ciclodextrina glicosiltranferase são assim classificadas (Moraes, 2004).

1.2.2 - Glicoamilase

A glicoamilase ou amiloglicosidase (1,4-alfa-D-glicano glicanoglicoidrolase E.C.3.2.1.3) é uma enzima extracelular, que rompe as ligações alfa-1,4 do amido a partir da extremidade não redutora até a obtenção de monômeros de glicose (Chen *et al.*, 2007; Yang *et al.,* 2008). Em menor velocidade, a glicoamilase também atua hidrolisando as ligações alfa-1,6 em posições terminais, sugerindo-se, portanto que a ação da enzima ocorre através de um mecanismo multisseriado no qual a glicoamilase atua aleatoriamente em toda a molécula de substrato (Lemos *et al.*, 2003).

Em alguns casos, outras moléculas, além das frações amilose e amilopectina do amido, como glicogênio, dextrinas e maltose são hidrolisadas pela enzima, que atua também sobre as ligações glicosídicas a partir do terminal não redutor da cadeia de alfa-glicanos, gerando alfa-D-glicose (Nunberg *et al.,* 1984).

Também chamadas de enzimas de sacarificação, são capazes de hidrolisar completamente o amido em incubações por longos períodos (Púglia, 2006), porém em uma faixa estreita de temperatura. São enzimas usadas em amidos resfriados já liquefeitos com a ação da enzima alfa-amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas. As glicoamilases são amplamente utilizadas na indústria alimentícia para a produção de xaropes com alto teor de glicose e também empregada na produção de álcool e xarope com alto teor de frutose. Lemos *et al.,* (2003) complementam que vários microrganismos e plantas produzem a enzima, das quais a maior parte disponibilizada comercialmente é produzida por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus* sendo que entre os mesófilos a enzima produzida por *Aspergillus* é mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do *pH* 4,5, e em temperaturas de 50-60ºC

sendo, entretanto, rapidamente inativada em temperaturas acima de 60ºC. Estes valores de *pH* e temperatura ótimas são comumente encontrados em diversos trabalhos científicos (Zanin, 1989; Costa, 1996).

No gênero *Aspergillus*, a glicoamilase é codificada por um único gene, porém existem no mínimo duas formas variáveis da proteína devido às modificações sofridas na sequência de aminoácidos. Durante o processo de dobramento ocorrem glicosilações, formação de pontes de dissulfeto e proteólise da proteína, a partir de que, pode se classificar suas duas formas mais conhecidas: Glicoamilase I (GAI) e Glicoamilase II (GAII), embora vários autores identifiquem outras formas que variam no grau de glicosilação (Silva Jr *et al*., 1997).

A glicoamilase I é a forma completa da proteína contendo 616 aminoácidos, possui 75 kDa e é constituída por um domínio catalítico (DC), um domínio de ligação ao substrato (DLS) e uma sequência altamente glicosilada entre estes dois domínios (L), denominada *linker* (Figura 01). A variante, glicoamilase II de 514 aminoácidos e 54 kDa, possui o domínio catalítico, a região O-glicosilada, porém, por processamento de proteólise perde o domínio de ligação ao substrato (Nascimento *et al*., 1998; Sauer *et al.*, 2000). Segundo Silva Jr *et al*., (1997), ambas as formas da enzima são ativas e podem ser distinguidas quanto a capacidade de ligar ao amido cru. A forma I possui esta habilidade e pode atuar substancialmente na molécula de amido natural enquanto que a isoforma II só pode atuar em amido gelatinizado.

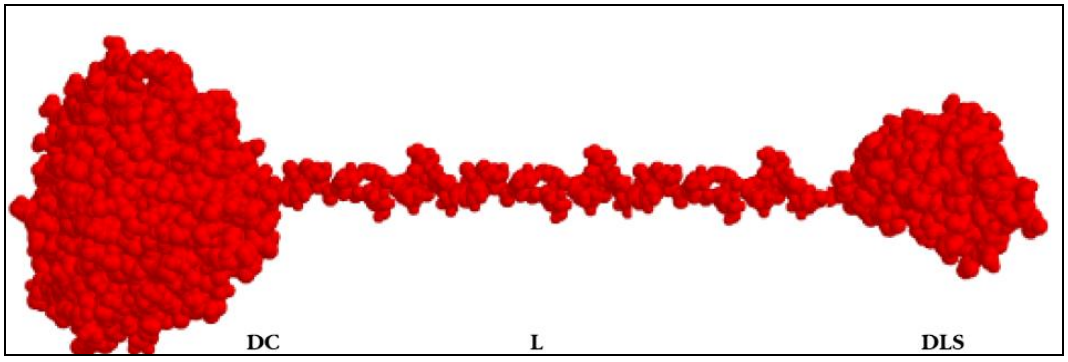

Figura 1. Imagem da estrutura estendida da glicoamilase de *A. awamori.* No lado esquerdo o domínio catalítico (DC), ao centro o filamento ligante ou "*linker*" (L) e à direita o domínio de ligação ao substrato (DLS). Extraído de Lemos *et al*., 2003.

A proteína possui ainda dois sítios de N-glicosilação localizados nos resíduos Asn 171 e Asn 395 (Lemos *et al.,* 2003) e sua estrutura em forma de alteres é apenas uma conformação simplificada, uma vez que a estrutura real da glicoamilase não foi completamente determinada (Cardona *et al.,* 1997), embora a organização dos domínios da molécula tenha sido deduzida por técnicas biofísicas.

A glicoamilase produzida pelo fungo filamentoso *A. awamori* é caracterizada por possui uma estrutura em barril alfa/alfa no domínio catalítico altamente compactada e vários resíduos glicídicos, o que lhe confere considerável estabilidade. Aleshin *et al*., (1992) estudaram a estrutura cristalina da glicoamilase de *A. awamori* e propuseram uma modelo esquemático para a forma enovelada de parte da proteína (Figura 02). O domínio catalítico é constituído por treze alpha hélices, das quais doze se arranjam dentro da estrutura do barril, consistindo de seis alpha hélices externas e seis internas que envolvem o sítio catalítico em forma de funil.

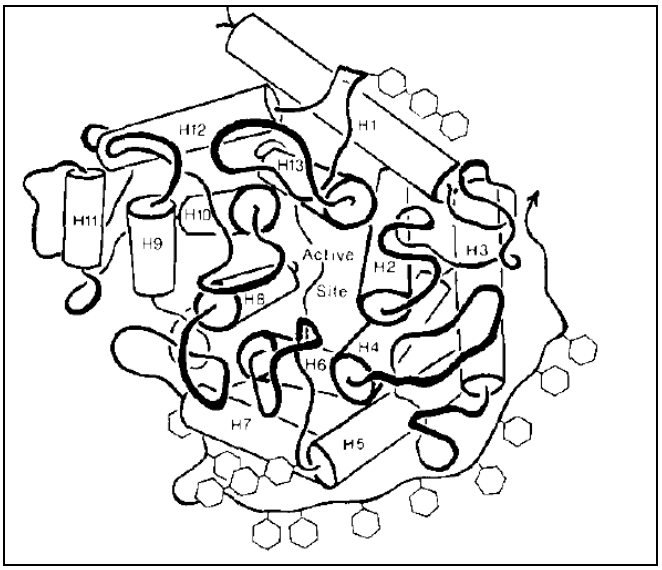

Figura 2. Esquema da estrutura tridimensional da glicoamilase de. *A awamori*. As alfa-hélices são representadas pelos cilindros, os sítios de O-glicosilação estão representados pelos hexágonos únicos e os sítios de N-glicosilação são simbolizados pelas cadeias de hexágonos. (Extraído de Aleshin *et al*., 1992).

1.3 - Produção de etanol carburante

As fontes renováveis de energia têm sido as soluções atuais tanto para minimizar os problemas ambientais como para aumentar a segurança no suprimento energético, uma vez que elas podem, em muitos casos, substituir as fontes convencionais de origem fóssil (Santos, 2007).

Depois de passadas algumas décadas desde as primeiras produções de etanol no Brasil e de crises do setor petroleiro mundial, ressurge nos dias atuais a proposta de estudar novas fontes de sua obtenção para inserção na matriz energética, uma vez que o etanol possui a vantagem de ser obtido a partir de fontes renováveis, ser produzido no país com autossuficiência e ser menos tóxico (Costa Neto *et al*., 2000).

O etanol pode ser obtido por vários processos tendo como fonte matérias primas vegetais, possui aproximadamente 35% de oxigênio em sua composição e uma combustão pouco poluente, ou seja, sua queima resulta predominantemente em calor, sem presença de fuligem típica dos combustíveis de origem do petróleo.

A preocupação para utilização de biocombustíveis alternativos veio inicialmente com o desabastecimento de combustíveis no período da Primeira Guerra Mundial, amadurecendo a ideia de produção de etanol no Brasil com a obrigatoriedade de adição de 5% e posteriormente 42% de álcool na gasolina importada (Garnero, 1980; Sachs, 2005). Na atualidade, as questões ambientais e acordos internacionais também têm contribuído para a valorização dos biocombustíveis que em suma é ditada pelos fatores econômicos, ecológicos e geopolíticos. Neste contexto, Bon *et al.* (2008), discutem que para a implantação de novas formas de produção de biocombustível, é fundamental que se considere a preservação do meio ambiente, a biodiversidade, a qualidade e a disponibilidade da água e o uso ordenado da terra para a produção de alimentos.

A pesar da boa eficiência na exploração de etanol a partir de cana de açúcar, que teve sua produção consolidada nos anos de 1970 com o advento do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), que faz do país um líder mundial na produção e utilização de álcool combustível, a produção de etanol a partir da mandioca é defendida pois produz álcool de qualidade superior podendo apresentar outras aplicações além de carburante (Cereda *et al*., 2003). Trinta anos depois da criação do PROÁLCOOL, e dentro de uma nova crise internacional do petróleo, o País depara-se com o desafio de aumentar consideravelmente a produção de etanol, não apenas para atender ao aumento da demanda interna, mas também para exportar este combustível (Bon *et al.*, 2008).

O álcool a partir de cana obteve melhores condições na implantação de sua estrutura, em detrimento ao álcool produzido de outras fontes vegetais como, por exemplo, amido de mandioca e matéria lignocelulósica, que não dispunham de meios produtivos desenvolvidos e confiáveis (Marcoccia, 2007; Soccol *et al*., 2009) ou os processos de seus tratamentos eram incipientes. Entretanto, a produção de álcool, que é realizada em poucos estados brasileiros, poderia a partir do amido de mandioca ser incentivada, de forma sustentável e ecologicamente viável, em regiões nas quais as condições de solo são impróprias para o cultivo da cana de açúcar e apropriadas para o plantio dessa raiz, que é pouco exigente em fertilidade do solo, já que a o plantio de cana de açúcar é realizado em terras aráveis de boa qualidade. A produção, portanto, poderia ser feita em regiões de baixa densidade demográfica e de baixa renda per capita, como forma de melhorar a distribuição de renda no País e a transferência de tecnologias (Cereda *et al*., 2003), além de diminuir os custos do transporte e a distribuição do produto gerado.

A utilização de etanol como combustível para queima seja puro, ou como aditivo, não é a única utilização que se pode dar a este produto. O uso como futuro elemento na geração de energia elétrica em células a combustíveis, equipamentos com eficiência energética superiores aos motores de combustão interna, é uma das possibilidades, além da elaboração de seus derivados e subprodutos como: amida, butila, etila, vinila, borrachas sintéticas, PVC e compostos plásticos em substituição a diversos elementos hoje provenientes do petróleo (Marcoccia, 2007).

Os processos atuais de produção do etanol se dividem basicamente em dois: o primeiro se faz pela utilização da fermentação direta dos açúcares existentes nas matérias primas, como caldo de cana, melaço, caldo de sorgo; o segundo decorre da fermentação indireta das matérias primas, que tenham características amiláceas ou celulósicas como grão de cereais, mandioca, batata e bagaço de cana.

A produção de álcool a partir de amido de mandioca possui algumas etapas no processo que são diferentes aos usados no processamento de cana de açúcar, os quais se baseiam principalmente no preparo da matéria prima e no sistema de fermentação. A cana de açúcar passa apenas por um processo simples para extração e fermentação do açúcar sacarose que se encontra no seu colmo, no entanto, é de difícil obtenção o xarope de sacarose puro. A mandioca por possuir amido, passa por etapas de conversão desta macromolécula ramificada em açúcares e depois sua fermentação, que ocorre após a

liquefação e sacarificação do amido com o uso atrativo de enzimas biológicas ou ainda de ácidos que são menos atraentes e eficientes (ABAM, 2006), por liberar subprodutos indesejáveis. Entretanto, a mandioca possui quantidades maiores de carboidratos por unidade de matéria prima e pode proporcionar extratos de glicose altamente puros, o que por consequência acaba tendo bons rendimentos, e justifica os investimentos na produção de etanol a partir de amido.

Os avanços biotecnológicos têm proporcionado condições ideais e ganhos de produtividade na fermentação de amido pela melhoria dos usos de linhagens de leveduras e de produção de enzimas bioengenheiradas.

1.4 - Hidrólise do amido

O amido é um dos mais abundantes polímeros encontrados na natureza e é constituído de dois compostos de elevado peso molecular, a amilose e a amilopectina (Aguero, 1998; Gonçalves, 2007). A amilose é formada por resíduos de alfa-D-glicose unidos por ligações alfa-1,4. A amilopectina é uma estrutura altamente ramificada, na qual os resíduos de alfa-D-glicose unidos por ligações alfa-1,4 são interconectados por ligações alfa-1,6 (Lehninger, 2006).

Na Figura 03 é apresentada uma representação da estrutura do amido, o qual tem suas moléculas constituintes variáveis em proporção de acordo com a fonte da matéria prima da qual é isolado.

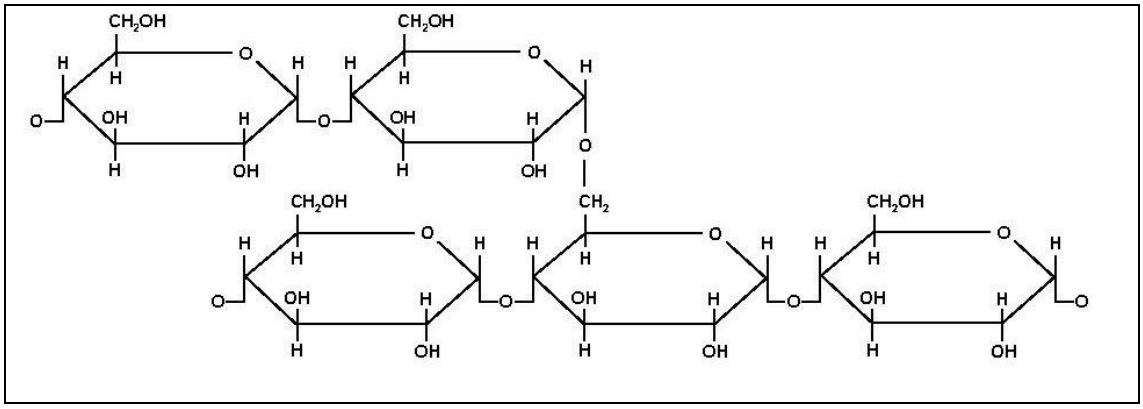

Figura 3. Representação da estrutura polimérica do amido. A primeira cadeira linear representa a amilose e a segunda cadeia ramificada representa a amilopectina.

As indústrias alimentícias são as maiores consumidoras de amido, entretanto, este polímero é usado também em diversos fins industriais destacando-se seu uso como espessante, ligante ou estabilizante em diferentes segmentos da indústria de alimentos nos processos de engomagem e acabamento nas indústrias têxteis, e para dar corpo e acabamento em vários produtos originários da indústria papeleira, tendo aplicações ainda na indústria química, metalúrgica, plástica, lavanderias (Leonel e Cereda, 2002; Silva, 2006) e recentemente este produto tem atraído a atenção do setor energético para a produção de etanol carburante (Leonel e Cabello, 2000; Palma, 2003).

No Brasil, uma das culturas com grande potencial na produção de amido para o setor de combustíveis é a plantação de mandioca, produto de onde os hidrolisados podem ser elaborados com vantagens competitivas através de processos mais rentáveis e com menores investimentos, devido às características particulares dos substratos amiláceos, tais como, maior concentração de açucares, menor tempo de geleificação e menores teores de proteínas e lipídeos (Surmely *et al.*, 2003).

O amido pode ser desdobrado em moléculas menores tanto pela hidrólise química quanto pela hidrólise enzimática (Carioca e Arora, 1984).

No processo químico, são usados ácidos minerais, tendo como principal produto pirodextrinas e glicose (Filho e Mendes, 2003). É um tratamento barato e bastante difundido nas indústrias brasileiras, porém apresenta maiores dificuldades na obtenção de produtos de boas qualidades e exige cozimento sob pressão com temperatura alta (Cereda *et al.*, 2003; Surmely *et al.*, 2003). Na hidrólise enzimática, apesar dos custos um pouco mais elevados, uma vez que no Brasil grande parte das enzimas são importadas do mercado internacional, ainda existem diversas vantagens na obtenção dos hidrolisados de amido. Os produtos são de simples obtenção indo de glicose a dextrinas de maior pureza por ter menos resíduos indesejáveis. Neste processo faz se o uso de enzimas amilolíticas que vão agir mais facilmente no amido na presença de água e calor (Surmely *et al.*, 2003).

Diferentes hidrolases amilases são utilizadas industrialmente para a produção de oligos ou monossacarídeos a partir do amido. Independente da origem do amido e dos produtos resultantes há três passos em seu tratamento com enzimas (Bertoldo e Antranikian, 2002; Gomes *et al.*, 2007).

O primeiro passo é feito com a solubilização do amido, que acontece em meio aquoso a altas temperaturas, pois os polímeros de amilose são insolúveis em água na

temperatura ambiente, havendo alcalinização e posterior adição de cálcio no meio. A liquefação do amido é o segundo passo, que acontece por uso de endoamilases como alfa-amilases termoestáveis de origem microbiana. Ocorre em faixas de *pH* entre 6,0 e 6,2 a 95ºC, produzindo dextrinas ramificadas e oligossacarídeos lineares. Por último, a finalização da liquefação ocorre por redução do *pH* da solução para a realização do terceiro passo, a sacarificação, que ocorre a 60ºC em faixas de *pH* entre 4,2 a 4,5 por cerca de 96 horas, sendo utilizadas exoamilases como glicoamilases de origem fúngica e amilases desramificadoras como a pululanase, neste passo, o uso de diferentes enzimas pode fornecer produtos e subprodutos diferenciados, mas principalmente glicose que será o substrato para a fermentação.

Os substratos da fermentação alcoólica são, subsequentemente, metabolizados por um agente biológico adequado, via de regra leveduras, e, após o consumo do substrato, o agente biológico é separado do meio fermentado para posterior reaproveitamento. Assim o líquido resultante, após o consumo dos componentes do meio de fermentação é destilado para se concentrar o etanol produzido (Bon *et al.*, 2008).

1.5 - Sistemas de expressão heteróloga

Devido muitos microrganismos secretar quantidades limitadas de enzimas ou outras proteínas e peptídeos, a expressão heteróloga em outras células hospedeiras tem sido empregada para potencializar a obtenção desses produtos de interesse biotecnológico. Neste sentido, diversos sistemas de expressão de genes heterólogos foram desenvolvidos para procariotos como *Escherichia coli* (Laderman *et al.*, 1993; Hannig e Makrides, 1998; Baneyx, 1999; Terpe, 2006; Vaz, 2008; *e Bacilus sp.* (Yang *et al.*, 2001) e mais eficientemente para leveduras (Sreekrishna *et al.*,1997).

Os sistemas de expressão procarióticos são em princípio úteis por produzir proteínas recombinantes a partir de genes de origem tanto procariótica quanto eucariótica. Porém, em muitos casos, as proteínas eucarióticas sintetizadas por bactérias são instáveis, não possuem atividade biológica e podem ser contaminadas com toxinas bacterianas (Rodrigo, 2004). Em *E. coli*, que é o sistema de expressão procariótico bem mais usado, Vaz (2008) aponta que a expressão da proteína recombinante pode ser considerada um processo estranho à célula, ou seja, não fazendo parte do seu conjunto metabólico natural e geralmente acaba causando problemas à célula hospedeira que

reage às condições adversas de várias formas, dificultando a obtenção da proteína de interesse. Para evitar estes e outros problemas na obtenção de produtos como proteínas, enzimas e hormônios, sistemas de expressão heteróloga eucarióticos utilizando leveduras foram desenvolvidos e são mais atrativos quanto a sua eficiência na elaboração final dos produtos expressos e secretados.

Os microrganismos eucarióticos são bons modelos para expressão heteróloga por ser de fácil manipulação genética e de bom crescimento, assim como os sistemas procarióticos, porém possuem a particularidade de apresentar a capacidade de realizar modificações pós-traducionais nas proteínas (Cregg, 1993), além de altos níveis de expressão. A primeira levedura selecionada para tal fim, devido amplo conhecimento sobre sua genética e fisiologia (Cregg, 1993; Sreekrishna *et al.*, 1997) foi *Saccharomyces cerevisiae*. Devido a estas vantagens e a possibilidade de se modificar as vias metabólicas a fim de aumentar o rendimento da produção, muitos genes heterólogos foram expressos neste organismo para diversas finalidades (Astolf Filho *et al.*, 1986; Siqueira, 2006). Sistemas eucarióticos de expressão utilizando as leveduras *Kluyveromices marxianus* (Kostova *et al.*, 2008), *Hansenula polymorpha* (Gillissen, 2000) e *Pichia pastoris* (Cregg, 1993) dentre outros eucariotos como fungos do gênero *Aspergillus* (Zhang *et al*., 2008) e até microalgas (Kim *et al*., 2002) também se mostraram eficientes, não apenas na expressão do gene, mas em alguns casos, também na secreção da proteína.

1.5.1 - *Pichia pastoris* como sistema de expressão de genes exógenos

As leveduras são fungos que se apresentam predominantemente na forma unicelular, usualmente se reproduzindo por gemulação ou brotamento. Como células simples, crescem e se reproduzem muito rapidamente, e são mais eficientes na realização de alterações químicas por causa de sua relação área/volume (Carvalho *et al.*, 2006).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica (Sreekrishna *et al.*, 1997; Cereghino e Cregg, 1999; Tuite *et al.*, 1999; Sunga *et al.*, 2008) do grupo dos ascomicetos homotálicos, usualmente seu estado vegetativo é na forma haplóide que se multiplica assexuadamente via brotamento.

Na década de 80, a Companhia *Phillips Petroleum*, juntamente com a *Salk Institute Biotechnology/Industrial Inc*. (SIBIA, La Jolla, USA), avaliaram o potencial de *P. pastoris* como sistema para produção de proteína heterólogas. Desde então, esta levedura tem sido amplamente utilizada na produção de proteínas de interesse acadêmico e biotecnológico (Cereghino e Cregg, 2000).

A partir daí a levedura *P. pastoris* têm se mostrado um modelo de sucesso de produção de proteínas heterólogas, já que além de ser de fácil manipulação, produz e secreta altos níveis da proteína desejada e faz as modificações necessárias no polipeptídio nascente, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (Cereghino e Cregg, 2000; Hamilton, 2003).

Segundo Torres e Moraes (2001), a maioria das proteínas expressas pela levedura é glicosilada e o tamanho da cadeia de carboidratos adicionados por ela é bem menor que aquele adicionado por *S. cerevisiae*. A estrutura destes oligossacarídeos é muito similar à adicionada em mamíferos e, por não ser capaz de adicionar manoses terminais com ligações alfa-1,3, como *S. cerevisiae*, em geral as proteínas produzidas em *P. pastoris* são menos imunogênicas. Diferentemente de outras leveduras utilizadas para expressão de genes exógenos *P. pastoris* normalmente não realiza hiperglicosilação da proteína secretada, não interferindo portanto, nos processos de enovelamento e dobramento finais da proteína madura (Cregg *et al.*, 1989; Guo *et al.*, 2008).

Dentre as características vantajosas de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga, destaca-se o fato desta levedura ter o *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e converter de 30 a 40% do seu peso em proteínas (Torres e Moraes, 2001). Outra vantagem da utilização deste modelo de produção é a possibilidade de se utilizar metanol como indutor da expressão do gene heterólogo (Ayed *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato de que, por ser uma levedura metilotrófica, a *P. pastoris* pode usar metanol como única fonte de carbono e energia reduzindo os custos de produção heteróloga (Sreekrishna *et al.*, 1997; Cereghino e Cregg, 2000).

Os sistemas de expressão em *P. pastoris* são mais eficazes para expressar genes e secretar seus produtos que em seus organismos nativos, codificam proteínas que naturalmente são secretadas em baixos níveis (Higgins e Cregg, 1998). Os altos níveis de expressão estão relacionados ao forte promotor induzível e regulável por metanol, derivado do gene da proteína álcool oxidase 1 (*AOXI*) de *P. pastoris* usado para

transcrever genes heterólogos e a expressão do gene *aox1* é fortemente controlada transcricionalmente em duas etapas: primeiro, através de um processo de repressão/desrepressão e, em seguida, por um mecanismo de indução, tendo como repressor a glicose e indutor o metanol.

Proteínas heterólogas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas em grandes quantidades tanto intracelularmente como secretadas ao meio de cultura e devido ao fato desta levedura secretar poucas proteínas nativas (Cregg *et al*., 1993), a purificação de proteínas heterólogas no sobrenadante da cultura é facilitada.

1.5.1.1 - Metabolismo do metanol

Nesta levedura, há dois genes para enzima álcool oxidase, o gene *aox1* e o gene *aox2*. Embora os produtos destes genes sejam bastante similares quanto suas sequências e funções, mais de 95% da atividade enzimática da álcool oxidase (*AOX*) é atribuída à expressão do gene *aox1* em presença de metanol (Cregg *et al.* 1993). Isso é resultado da maior força do promotor do gene *aox1* comparado ao seu similar *aox2* quando induzidos, onde é vista uma porcentagem em torno de 5% para o RNA mensageiro do gene *aox1* entre todos os tipos de RNAs (Cregg e Madden, 1988).

Com metanol agindo como indutor, a via metabólica se inicia com a oxidação do metanol para formar formaldeído e peróxido de hidrogênio, reação que é catalisada pela enzima álcool oxidase *(AOX)* presente na organela chamada peroxissomo. O peróxido de hidrogênio que apresenta toxicidade para a célula é então rapidamente degradado em água e oxigênio (Cregg *et al.,* 1989) pela enzima catalase. O formaldeído produzido será a base para a obtenção de energia para o crescimento da levedura e é metabolizado no citoplasma até a formação de dióxido de carbono. Dentro do peroxissomo, parte do formaldeído será convertida em outros precursores de constituintes celulares. As reações envolvidas no metabolismo do metanol estão indicadas na Figura 04.

Por vezes, o alto rendimento das proteínas expressas sob ação do *AOXI*, encontra uma de suas limitações que é a aplicação do metanol, um subproduto do petróleo, o que poderia não ser apropriado para produtos alimentícios (Cereghino e Cregg, 1999). Assim, outros promotores têm sido descritos para expressão heteróloga em *P. pastoris* (Almeida *et al*., 2005; Mack *et al*., 2009), sendo alguns destes promotores baseados em genes constitutivos do próprio organismo. Contudo, a vantagem do sistema *AOX1* é a

sua forte condição regulada de ativação e repressão durante o crescimento da levedura que passa a ser vantajosa em casos em que se almejam altos níveis de expressão de proteínas heterólogas (Torres e Moraes, 2001) foco de muitos processos de produção biotecnológica de proteínas recombinantes.

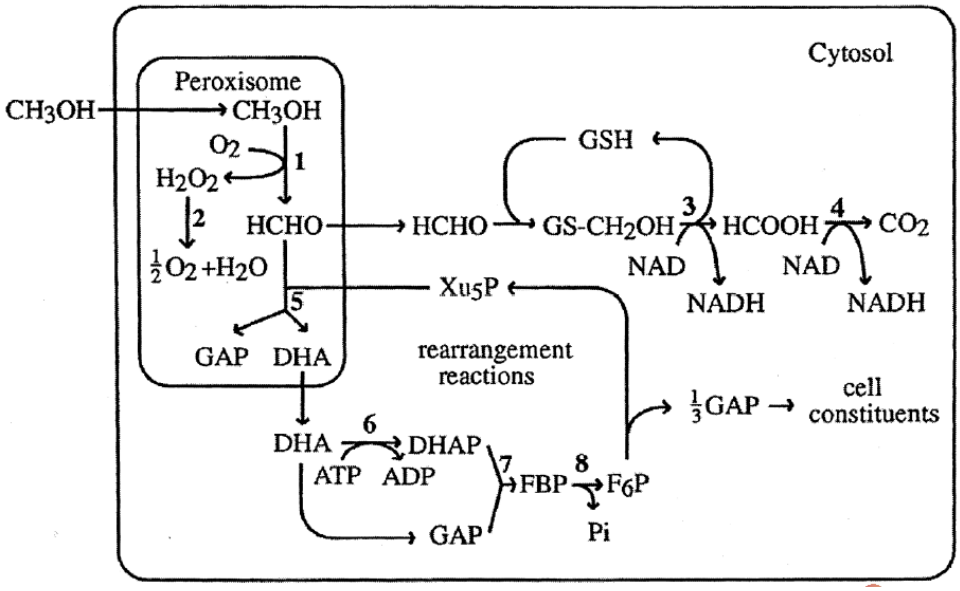

Figura 4. Via metabólica do metanol em P. pastoris. 1-Álcool oxidase; 2-Catalase; 3-Formaldeído desidrogenase; 4-Formato desidrogenase; 5-Dihidroxicetona sintase; 6-Dihidroxicetona quinase; 7-Frutose 1,6-bifosfato aldolase; 8-Frutose 1,6-bisfosfatase (Cereghino e Cregg, 2000).

Em muitos trabalhos recentes é reportada a eficiência na secreção, em altos rendimentos de proteínas expressas ativas nesta levedura metilotrófica, como a expressão da proteína humana de ligação ao retinol (Wysocka-Kapcinska *et al*., 2010), funcionalidade do receptor Fc neonatal humano (Lee *et al*., 2009), proteínas antifúngicas (López-García *et al*., 2009), altos níveis de expressão de endoquitinase (Lee *et al*., 2010) e ainda Mack *et al*., (2009) que fazem a comparação entre proteínas expressas sob ação do promotor *AOX1* e do promotor FDH (Formato Desidrogenase) de *Pichia*, e descrevem a superioridade do nível de secreção para o promotor *AOX1*.

1.5.1.2 - Linhagens de P. pastoris

Considerando a eficiência das características da levedura metilotrófica como sistema de expressão, foram desenvolvidas algumas linhagens mutantes de *P. pastoris*, as quais segundo Cregg *et al.,* (1989) foram derivadas do organismo tipo selvagem NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories,* Peoria, Ill).

As linhagens foram desenvolvidas com mutações auxotróficas para proporcionar a seleção de transformantes. Há também mutantes com os genes da enzima álcool oxidase nocauteados determinando fenótipos diferenciados quanto à assimilação de metanol, em outro caso, para minimizar os problemas de liberação de proteases no meio de cultivo foram desenvolvidas linhagens que não possui genes que codificam algumas proteases, garantindo melhor qualidade do produto secretado no meio de cultivo. Outras linhagens foram projetadas para expressar genes de proteínas específicas integrados no genoma da hospedeira e podem ser utilizadas como controle de expressão extra ou intracelular (Invitrogen, 2006).

1.5.1.3 - Vetores de expressão

Existem muitos vetores comerciais que podem ser usados para expressar proteínas em *P. pastoris*. Os vetores de expressão são geralmente integrativos, os quais possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene *aox1,* além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada o gene histidinol desidrogenease (*his* 4) e ainda em alguns há o fator alfa de *S. cerevisiae* como sinal de secreção do peptídeo (De Paula, 2006).

São vetores bifuncionais (*shuttle vectors*), pois são utilizados para transformar tanto leveduras e a bactéria *E. coli*. As marcas de seleção para vetores de expressão podem ser auxotróficas para *P. pastoris* e dominantes para seleção bacteriana. Nas hospedeiras, quando deleções ou mutações gênicas impedem a síntese de aminoácidos essenciais para a nutrição da levedura, diz-se em seleção de marca auxotrófica. No caso de genes que conferem resistência a algum antibacteriano, tem-se uma seleção de marca dominante.

Alguns vetores do sistema expressão possibilitam a secreção de proteínas heteróloga através de uma sequência sinal introduzida logo depois da região promotora.

Entre as sequências sinais de secreções mais utilizadas há o peptídeo do fator sexual α(α-MF) de *S. cerevisiae*, mas podem ser substituídas por sequências sinais da proteína nativa a ser expressa. Várias abordagens têm sido feitas para lançar novos vetores para a levedura sob ação de outros promotores que não o *AOX1* (Almeida *et al*., 2005; Mack *et al*., 2009).

1.5.1.4 - Fenótipos da levedura e formas de integração no genoma de *P. pastoris*

A forma com a qual o cassete de expressão se integra no genoma de *P. pastoris* possibilita caracterizar três fenótipos diferentes, que se relacionam com a habilidade da levedura em metabolizar metanol. Tais fenótipos são o Mut^+ (*Methanol Utilization Plus*), nos quais as linhagens de hospedeira apresentam os genes *aox1* e *aox2* funcionais no seu genoma e possuem crescimento que aproxima daquele apresentado pela levedura selvagem, o fenótipo Mut^S (*Methanol Utilization Slow*), dependente da fraca transcrição do gene *aox2* uma vez que possui o gene *aox1* não funcional, e por fim o fenótipo Mut^- (*Methanol Utilization Minus*) que possui os dois genes *aox* inativos impossibilitando a metabolização de metanol, e a levedura não cresce na carência de outros nutrientes (Cregg *et al.*, 1985).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a integração e transformação em *P. pastoris* podem ser feitos por adição ou por substituição gênica (Cregg *et al.*, 1993; Tuite *et al.*, 1999).

Na integração por adição, uma linhagem mutante auxotrófica é transformada com vetores circulares ou linearizados em uma única marca de seleção, no *locus his4* ou no promotor *AOX1* (Daly e Hearn, 2005). Recombinações homólogas entre sequências compartilhadas pelo vetor linearizado e pelo genoma da hospedeira, ocorrem, resultando na integração por um evento de *crossover* simples em frequência de 50 a 80% das vezes e inserções em *tandem* podem ocorrer com eventos de recombinação repetidos gerando transformantes multicópias.

Em adições no lócus *his4*, quando leveduras de fenótipo Mut^+ são transformadas com vetores linearizados na região *HIS4* o fenótipo dos transformantes não é alterado (Figura 05). Já a inserção por adição utilizando AOX pode ocorrer por recombinações entre as regiões AOX do vetor com sequências de homologia do genoma de *P. pastoris*, também resultando em fenótipo Mut^+, por não inativar o gene aox1 (Figura 06).

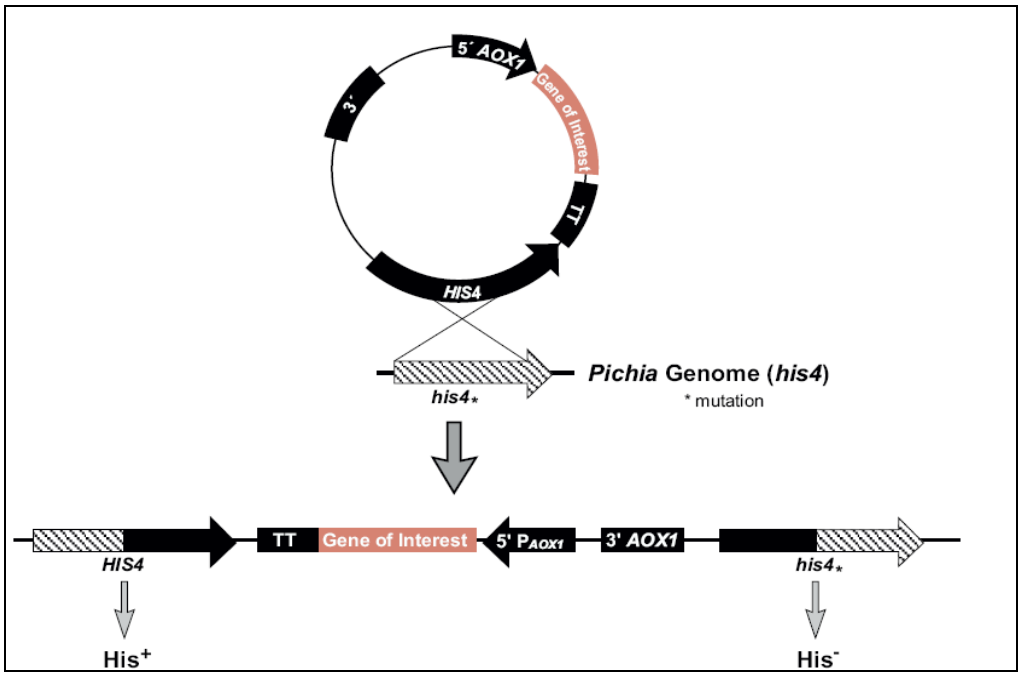

Figura 5. Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no *locus HIS4* (Invitrogen, 2006).

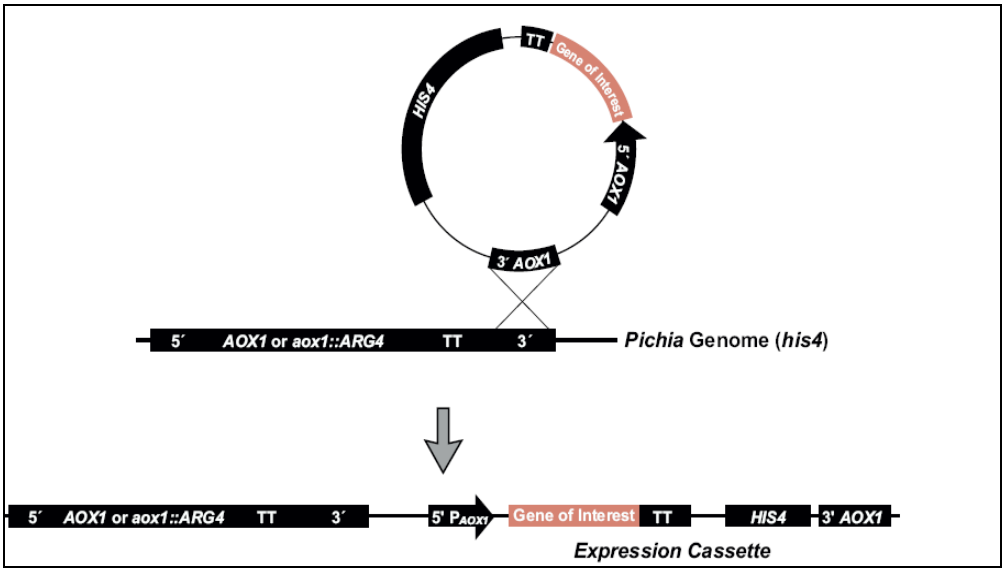

Figura 6. Esquema da integração no genoma da levedura por adição gênica no *locus AOX1* (Invitrogen, 2006).

Na integração por substituição gênica, o gene *aox1* é deletado e substituído pela ocorrência de duplo *crossover* no *locus aox1*, que ocorrem após dupla digestão do vetor de expressão, ficando o cassete de expressão e o vetor flanqueados pelas sequências 5` e 3` no *locus aox1* (Tuite *et al.*, 1999). Esta estratégia ocasiona em transformantes de cópias únicas com frequência de 10 a 20% dos eventos de transformação (Figura 07).

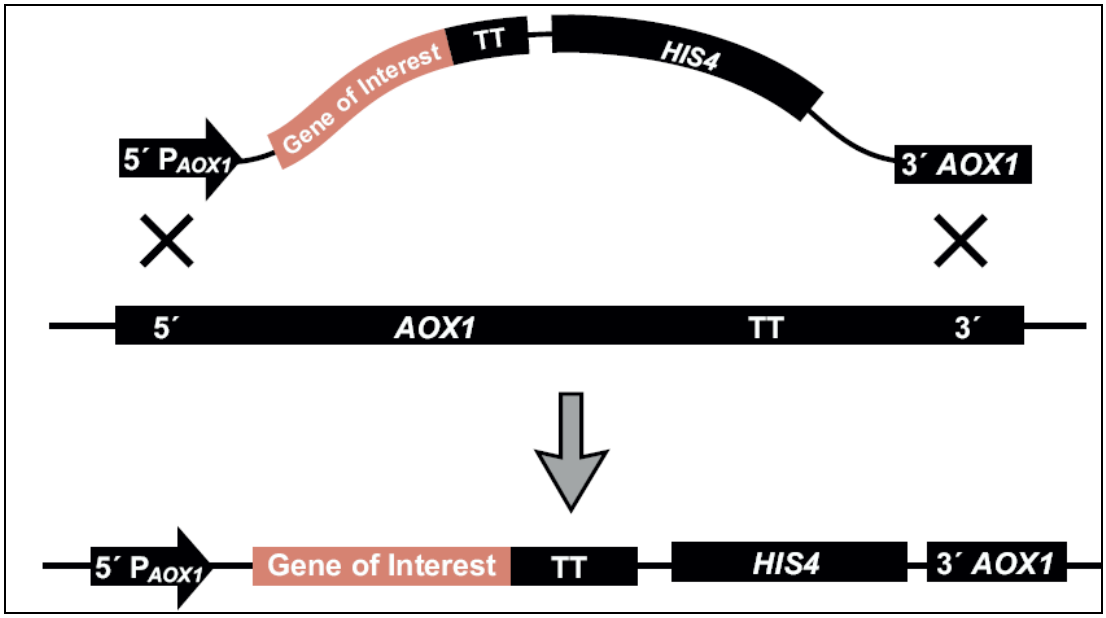

Figura 7. Esquema da forma de integração por substituição gênica do gene *aox1* acarretando mudança no fenótipo da levedura hospedeira (Invitrogen, 2006).

A integração pode ocorrer tanto em copia única do cassete de expressão quanto por várias cópias. Transformantes de cópias únicas em *P. pastoris* podem ser eficientes para forçar a transcrição do gene exógeno, embora transformantes de múltiplas cópias supostamente teriam maiores potencialidades (Sunga *et al.*, 2008).

P. pastoris como um eficiente sistema de expressão de genes exógenos pode ser visto em trabalhos de diversos autores Cregg e Madden, (1988); Cregg *et al.*, (1989); Fierobe *et al.*, (1997); Whittaker e Whittaker, (2000); Daoud *et al.*, (2001); Inan e Meagher, (2001); Oledzka *et al.*, (2003); Liu *et al.*, (2005); Chen *et al.*, (2007); Boettner *et al.*, (2007); Müller, (2008); Tsai *et al.*, (2008); Sunga *et al.*, (2008); Wysocka-Kapcinska *et al.*, (2010); Lee *et al.*, (2010) e entre muitos outros.

2 - Justificativa

Alterações no suprimento ou no uso de petróleo, que é responsável por grande parte do fornecimento de energia primária do planeta, teriam desdobramentos econômicos, políticos e sociais importantes na sociedade.

Com o intuito de minimizar esta possibilidade, o uso de matérias primas como amido de mandioca ou de produtos da biomassa vindo de resíduos agroindustriais como a celulose, hemicelulose e lignina, para a produção de etanol é bastante incentivada, tendo em seus processos mais rentáveis a utilização de enzimas biológicas (Soccol *et al*., 2009).

As enzimas são produtos bastante explorados pela indústria biotecnológica, onde são amplamente utilizadas em várias aplicações. Enzimas de microrganismos possuem vantagens sobre equivalentes de origem animal ou vegetal, tais como menores custos de produção, produção em larga escala industrial, amplo aspecto de características físico-químicas e elevada especificidade da ação biocatalisadora.

A crescente demanda na produção de etanol para diversas aplicações requer processos menos complexos e mais rentáveis no tratamento das matérias primas utilizadas. Entre as fontes alternativas o amido tem demonstrado possibilidade de proporcionar maiores rendimentos do produto quando tratados com enzimas, em detrimento dos tratamentos químicos (Bon *et al.*, 2008). Assim o uso de enzimas é de considerável importância e atrativo, por estas serem produzidas por uma diversidade de microrganismos e industrialmente por diferentes técnicas incluindo fermentação submersa, contínua e a fermentação em estado sólido, numa quantidade e qualidade desejada, utilizando os microrganismos naturais ou os bioengenheirados.

O emprego de enzimas amilolíticas na produção de etanol a partir de substratos amiláceos mostra-se ainda mais vantajoso por trazer redução dos custos permitindo que as etapas de sacarificação (hidrólise do amido em glicose) e fermentação sejam realizadas concomitantemente, melhorando a eficiência da conversão do amido (Nikolié *et al*., 2010). Neste cenário, a glicoamilase é uma enzima sacarificante de elevada potencialidade em tal aplicação, uma vez que possui ampla ação catalítica podendo atuar em toda a molécula de substrato levando às unidades menores fermentáveis.

Embora a hidrólise enzimática tenha se consolidado como o procedimento mais efetivo pelos rendimentos observados, por não gerar inibidores formados na hidrólise ácida e pelas vantagens ambientais, a sua viabilidade econômica está relacionada aos

custos das enzimas, que no Brasil é obtida em sua grande maioria pela importação, elevando portanto, os custos do tratamento enzimático.

Devido a esta forte dependência do setor de produção de proteínas brasileiro ao mercado internacional, faz-se necessário o desenvolvimento de processo e formas variadas de produção interna. Para tanto, o emprego da biotecnologia é indispensável na tentativa de se desenvolver meios modernos e satisfatórios que potencialize o desenvolvimento e a consolidação do mercado de produção de enzimas no Brasil.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Clonar e expressar o cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* na levedura *Pichia pastoris* e analisar o produto gênico recombinante.

3.2 - Objetivos Específicos

1) Amplificar o cDNA da glicoamilase de *A. awamori* clonado no vetor pG5 utilizando iniciadores específicos e inserir sítios de restrição para a clonagem direcionada;

2) Clonar a sequência codificadora da glicoamilase no vetor pCR4-TOPO.

3) Subclonar o cDNA de interesse no vetor pPIC9, que será utilizado para expressão em *P. pastoris*;

4) Obter transformantes da linhagem de *P. pastoris* GS115 capazes de expressar o cDNA e secretar seu produto ativo;

5) Induzir a expressão do cDNA e secreção da proteína de interesse em *P. pastoris* e caracterizar o produto recombinante.

4 - Material e métodos

4.1 - Linhagens de hospedeiras.

As linhagens de hospedeiras utilizadas foram:

- *Eschrichia coli* TOP 10: F' [lacI^{q}Tn10$_{(tel^{R})}$]$^{-}$*mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str®) *end*A1 *nupG* (Invitrogen™ - TOPO TA Cloning). Esta linhagem possibilitou a realização de manipulações genéticas, como a propagação e multiplicação de DNAs plasmidiais provenientes da ligação do fragmento gênico aos vetores de clonagem e expressão.

- *Pichia pastoris* GS115: genótipo *his4* e fenótipo Mut^{+} e *HIS* $^{-}$. Linhagem que possui mutação no gene histidinol desidrogenase (*his4*), o que a impede de sintetizar o aminoácido histidina. Esta linhagem foi utilizada para expressão da enzima recombinante pela transformação com um vetor carregando a marca selecionável HIS4 e o cDNA para glicoamilase.

4.2 - Meios de cultivo.

Os meios de cultivo foram o Luria Bertani (LB), SOB e SOC para o crescimento bacteriano de *E. coli*. Para manipulação da levedura *P. pastoris* foram utilizados os meios de cultivos YPD, MD, MM, BMGY-U e BMMY-U.

A composição de cada meio de cultivo e a fórmula de algumas soluções estão apresentadas no APÊNDICE A na pagina 93.

4.3 - Plasmídeos utilizados.

Os plasmídeos utilizados nas manipulações genéticas foram:

Plasmídeo pG5: 9,7 kb, um vetor bifuncional de origem de replicação em *E. coli* e em *S. cerevisiae,* apresenta a marca de seleção dominante que confere resistência a ampicilina e uma marca de seleção auxotrófica LEU2 (Figura 08). Promotor e terminação de transcrição do gene constitutivo que codifica a enzima *Phosphoglycerate Kinase* (PGK)

de *S. cerevisiae* e o cDNA da glicoamilase de *A. awamori* previamente isolado por Astolfi Filho *et al*., (1990) *apud* Moraes *et al*., (1995).

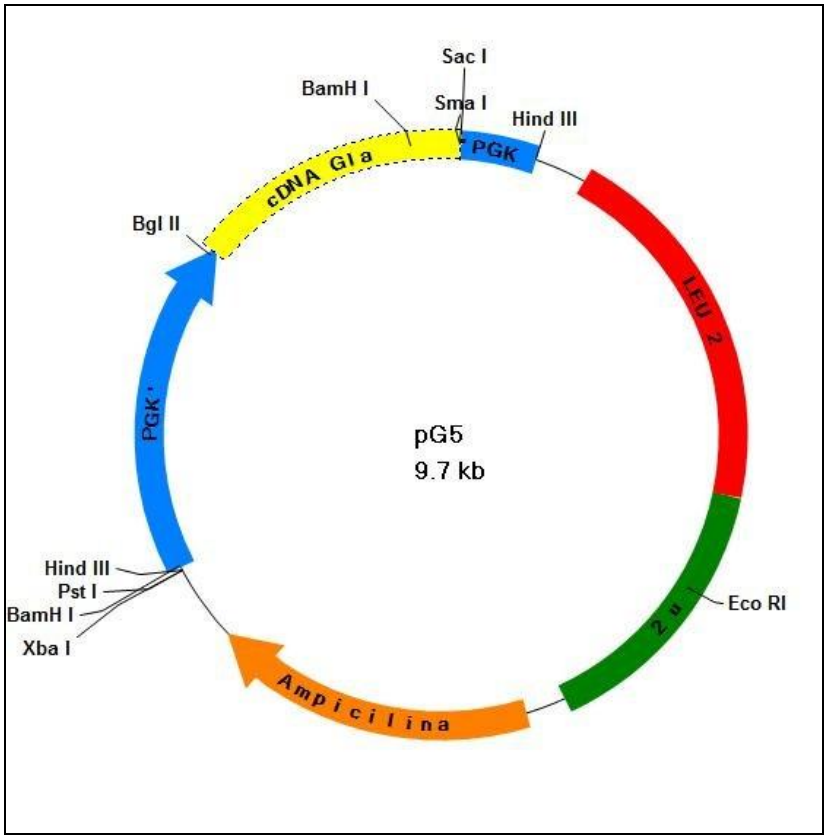

Figura 8. Plasmídeo pG5 com o cDNA da glicoamilase clonado para expressão com o promotor PGK.

Plasmídeo pCR4-TOPO (Invitrogen ™): com 3.9 kb, apresenta genes que conferem resistência à ampicilina e canamicina, origem de replicação funcional em *E. coli* (pUCori), promotor T7, promotor *lac*, o fragmento *lacZα* ligado com o gene camicase *ccdB*, região de múltiplos sítios de clonagem, duas bases timina livre em cada extremidade 3', as quais tem o processo de ligação com qualquer fragmento de DNA realizado pela energia de ativação de uma topoisomerase próxima ao nucleotídeo imediatamente ligado nas timinas livres. Este vetor, (Figura 09), foi utilizado para clonagem do cDNA da glicoamilase isolado do vetor pG5 resultando então no vetor de clonagem pTPG.

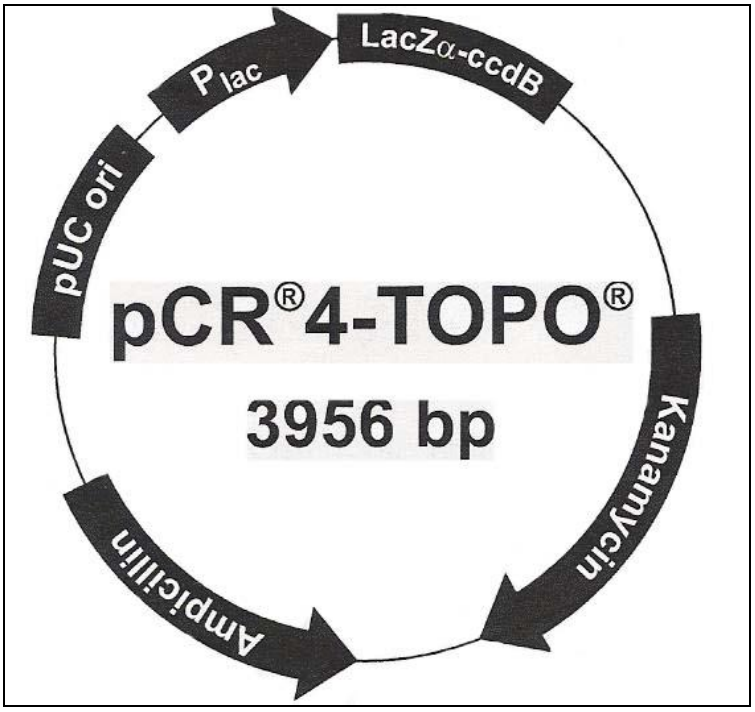

Figura 9. Plasmídeo comercial pCR4-TOPO utilizado para a subclonagem do cDNA da glicoamilase isolado do pG5

Plasmídeo pTPG: com aproximadamente 5,8 kb, oriundo da ligação do fragmento amplificado correspondente ao cDNA da glicoamilase ao vetor pCR4-TOPO este vetor foi utilizado para transformações bacterianas, análise de sua correta construção via PCR de colônia e estoque de DNA recombinante. Apresenta genes que conferem resistência à ampicilina e canamicina, origem de replicação funcional em *E. coli* (pUCori), promotor T7, promotor *lac*, o fragmento *lacZα* ligado com o gene camicase *ccdB* e região de múltiplos sítios de clonagem. Este vetor está apresentado na pagina 42.

pPIC9 (Invitrogen ™): com 8 kb, possui o promotor do gene da enzima Álcool Oxidase I *(AOX1)* induzível por metanol, sequência codificadora do peptídeo sinal do gene do fator alfa de *S. cerevisiae*, origem de replicação funcional em *E. coli*, sítios para integração no genoma de *P. pastoris* nas regiões *HIS4* ou *AOX1*, região de múltiplos sítios de clonagem, marca de seleção auxotróficas para leveduras (*HIS4*) e gene que confere resistência à ampicilina. O vetor pPIC9 foi usado para construção do vetor pPG para expressão do cDNA de glicoamilase e secreção da enzima recombinante (Figura 10).

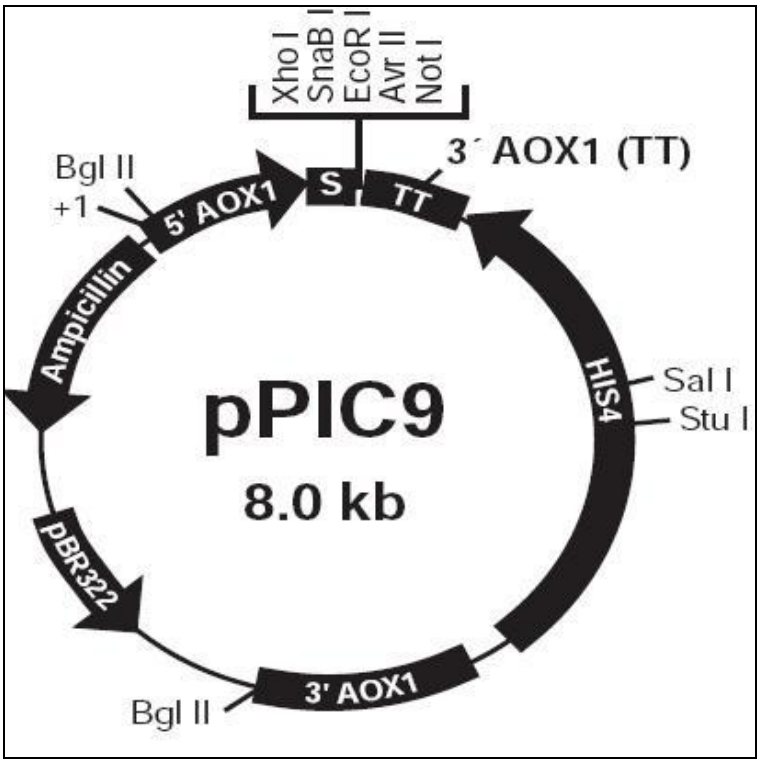

Figura 10. Vetor pPIC9 utilizado para a clonagem do cDNA da glicoamilase e sua expressão em *P. pastoris*

O plasmídeo pPG: tem cerca de 9,9 kb possuí as características do vetor comercial pPIC9, o promotor *AOX1*, sequência codificadora do peptídeo sinal do gene do fator-alfa de *S. cerevisiae*, origem de replicação funcional em *E. coli* (pBR322), sítios para integração no genoma de *P. pastoris* em *HIS4* ou *AOX1*, região de múltiplos sítios de clonagem, marca de seleção auxotróficas para leveduras (*HIS4*), gene que confere resistência à ampicilina e mais o fragmento codificante de glicoamilase em leitura aberta no múltiplo sítio de clonagem logo após a sequência do peptídeo sinal (SS) do fator-alfa de *S. cerevisiae* e antes do término de transcrição do gene *AOX1* (TT). O plasmídeo pPG está apresentado na página 48.

4.4 - Estratégias de clonagem

4.4.1 - Isolamento do cDNA de glicoamilase

O cDNA codificante da enzima glicoamilase (*GLA*) foi isolado a partir do plasmídeo pG5 (Figura 07) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se a Taq DNA Polimerase *High-Fidelity* (Invitrogen^{TM}), com iniciadores previamente sintetizados contendo os sítios de restrição *Eco*RI e *Not*I em suas extremidades 5' e 3' respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a amplificação e isolamento do cDNA *GLA* a partir do vetor pG5.

Iniciador 5'-3'	***Sítio de Restrição***
Pamy F – G**GAATTC**GCGACCTTGGATTCATGGTTG	***Eco*RI**
Pamy R - AT**GCGGCCGC**CTACCGCCAGGTGTCAGTCA	***Not*I**

A reação de amplificação foi realizada em dois microtubos distintos para minimizar a possibilidade de ocorrer mutações na sequência amplificada. Para cada tubo usou-se 20 ng de DNA, tampão 1X, 1 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 pmol de cada iniciador, 5,0 U de enzima Taq DNA polimerase *High-Fidelity* e água deionizada esterilizada que completasse o volume de 50 μL.

A programação da reação de polimerização foi composta por desnaturação inicial a temperatura de 95°C por 5 minutos, seguida de ciclo de 45 vezes passando por passos de desnaturação a 95ºC por 1 minuto, anelamento dos iniciadores com as fitas moldes na de temperatura de 65ºC por 45 segundos, extensão das novas fitas por 2 minutos a 72ºC e um passo de extensão final de 5 minutos a 72ºC.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio 0,5 μg/mL e visualizados sob luz ultravioleta (UV) para conferência de suas qualidades.

4.4.2 - Construção do vetor pTPG

4.4.2.1 - Clonagem do fragmento isolado no vetor pCR4-TOPO

Nesta estratégia de clonagem aproveitou-se as bases adenina das extremidades 3'OH da fita dupla do fragmento, inserida pela ação terminal transferase da Taq DNA polimerase ao término da reação de amplificação, o que possibilitou sua ligação ao vetor de clonagem pCR4-TOPO pela complementaridade com as timinas livres presentes em suas extremidades, obtendo desta forma o vetor pTPG contendo o fragmento de interesse.

A reação de ligação procedeu-se a temperatura ambiente por 20 minutos de acordo com especificações do fabricante.

4.4.2.2 - Transformação bacteriana por eletroporação

4.4.2.3 - Preparo de células *E. coli* eletrocompetentes

Células de *E. coli* TOP 10 foram cultivadas e tornadas eletrocompetentes após sucessivas lavagens com glicerol 10,0%, a partir de que são aptas para receber DNA exógeno por meio eletroporação. Para isso, uma única colônia da bactéria foi inoculada em 20 mL de meio LB, e levada ao shaker à 37ºC overnight. Tomou-se 1 mL dessa cultura que foi inoculada em 300 mL de LB, (sem antibióticos) e mantido em agitação até atingir $O.D_{600}$ =0,5. Após, o frasco contendo a cultura foi esfriado no gelo por 1 hora e então a cultura foi dividida em tubos cada um com 50 mL de capacidade e centrifugados a 3.500 g por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado imediatamente e as células ressuspensas gentilmente até soltar e dissolver o *pellet*, usando 10 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Em seguida ocorreu nova centrifugação a 3.500 g por 8 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão de cada *pellet* novamente em 10 mL de glicerol 10% gelado e estéril. Estas lavagens foram repetidas por mais 4 vezes centrifugando as células. O *pellet* foi ressuspenso em 15 mL de glicerol 10% gelado e estéril, centrifugado e agora ressupenso em 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril. As células eletrocompetentes foram alíquotadas em volume de 80 uL, congeladas imediatamente e estocadas em freezer na temperatura de -80ºC.

4.4.2.4 - Eletroporação da hospedeira E. coli Top 10

A transformação consiste na indução de descargas elétricas de alta voltagem que atravessam uma suspensão bacteriana por mili segundos, criando poros na parede e na membrana celular, possibilitando a integração do DNA exógeno para dentro da célula hospedeira.

As bactérias eletrocompetentes foram retiradas do freezer -80ºC e deixadas descongelando em banho de gelo por 10 minutos, foi transferido 1 *u*L do DNA plasmidial pTPG para o tubo contendo a bactéria, repassando a mistura para uma cubeta de 1mm que foi incubada no gelo por 5 minutos. Foi aplicado um pulso elétrico de 1900 Volts em aparelho de eletroporação (Mod. Eletroporator 2510 Eppendorf). Imediatamente após a pulso elétrico foi adicionado 1 mL de meio LB líquido, transferindo o conteúdo para um microtubo de 1,5 mL. Incubou-se a 37º por 1 hora, com agitação lenta seguido de semeadura em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 200 μg/mL e mantida em estufa bacteriológica a 37ºC por 16 horas. O volume de células para o cultivo em placas variou de 25 a 300 μL. Os clones foram inicialmente selecionados por apresentarem resistência ao antibiótico ampicilina, que apenas é conferida se o plasmídeo é inserido na hospedeira. A seleção também é dada pela observação de que células crescidas possivelmente receberam o vetor com o fragmento que ao ser clonado no plasmídeo, interrompe a síntese do produto do gene camicase que confere letalidade à hospedeira.

4.4.2.5 - Identificação do cDNA da glicoamilase no vetor pTPG por PCR de colônia

Para a confirmação da presença do inserto nos clones transformantes foi realizada a PCR de colônia de 14 clones, escolhidos aleatoriamente, que consistiu em palitar as colônias crescidas, dissolvê-las em 5 μL de água deionizada estéril. Foram utilizados 2,5 μL da suspensão como DNA, tampão 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,3 mM de dNTPs, 0,2 *p*mol de cada iniciador, 5,0 U de enzima Taq DNA polimerase e água deionizada esterilizada para que completasse o volume de 12,5 μL.

A amplificação seguiu por desnaturação de 5 minutos a 95ºC, ocorrendo em 34 ciclos compostos de 1 minuto de desnaturação a 95ºC, 45 segundos a 65ºC para

anelamento dos primers iniciadores específicos para glicoamilase, seguidos de extensão a 72ºC por 2 minutos, com 5 minutos de extensão final em mesma temperatura.

O perfil eletroforético para visualização dos produtos de amplificação se deu em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) e visualizada sob luz ultravioleta (UV).

4.4.2.6 - Extração de DNA plasmidial

Após análise de migração eletroforética foram selecionados seis clones recombinantes e realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare) que possui soluções atuantes nas fases de lise celular, desproteinização, lavagem e eluição do DNA plasmidial. Os plasmídeos purificados foram estocados a -20ºC para análises posteriores.

4.4.2.7 - Identificação do inserto no vetor pTPG por análise de restrição

Os plasmídeos pTPG extraídos foram tratados com a enzima de restrição *Not*I (New England Biolabs) para reforçar a confirmação da presença e a orientação do inserto. As condições para a reação de digestão foram: tampão NEB3 1X, 0,5 U da enzima *Not*I, 50 ng de pPTG e água que completasse para o volume de 6,0 μL. A reação foi incubada a 37ºC por 2 horas. A migração eletroforética para visualização do produto da digestão se deu em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) e visualizada sob luz ultravioleta (UV).

4.5 - Construção do vetor de expressão pPG

4.5.1 - Digestão do vetor de expressão pPIC9 e do vetor construído pTPG

Para construção do vetor de expressão o plasmídeo pTPG foi digerido duplamente com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Not*I (New England Biolabs) para a liberação do inserto correspondente ao cDNA da glicoamilase. As mesmas enzimas também foram utilizadas para digestão dupla do vetor comercial pPIC9 íntegro. Os sistemas de digestão que foram compostos pelos vetores com DNA alvo, enzimas de restrição, tampões que melhor interagem com as duas enzimas e água deionizada estéril.

A visualização dos produtos das digestões se deu por eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

As bandas correspondentes ao inserto liberado do vetor pPTG e àquela do vetor de expressão pPIC9 linearizado foram purificadas do gel de agarose utilizando o kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) seguindo suas especificações para proceder posteriormente a subclonagem do cDNA de glicoamilase no vetor pPIC9 e construção do vetor pPG.

4.5.2 - Subclonagem do cDNA da glicoamilase no vetor de expressão pPIC9 (montagem do vetor pPG para expressão em *Pichia pastoris*)

O cDNA da glicoamilase purificado foi clonado no múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9 utilizando as extremidades *Eco*RI e *Not*I. A reação de ligação foi mediada pela ação da enzima T4-DNA ligase (Amersham) e incubada durante 16 horas a 16ºC.

O produto da ligação foi introduzido nas células de *E. coli* TOP 10 por eletroporação para geração de múltiplas cópias do vetor recém montado. As células transformadas foram semeadas em meio LB sólido, onde os clones recombinantes foram selecionados pela sua resistência ao antibiótico ampicilina (200 μg/mL) e tiveram a presença do inserto confirmada pela realização de uma reação de PCR de colônia utilizando 15 clones. Após receber o fragmento correspondente ao cDNA *GLA* o vetor pPIC9 foi denominado pPG.

4.5.3 - Identificação do cDNA da glicoamilase no vetor pPG por PCR de colônia

Os transformantes foram retirados do meio de crescimento e transferidos para microtubos contendo 5 μL de água deionizada estéril. Foram utilizados como DNA 2,5 μL desta suspensão misturada a tampão 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,3 mM de dNTPs, 0,2 *p*mol de cada iniciador, 0,08 U de enzima Taq DNA polimerase e água deionizada estéril que completasse o volume de 12,5 μL. A amplificação ocorreu utilizando os iniciadores específicos para glicoamilase descritos na Tabela 01 (pag. 27), ocorrendo pelos passos de desnaturação inicial de 5 minutos a 95ºC, seguido de 34 ciclos

compostos de 1 minuto de desnaturação a 95ºC, 45 segundos a 65ºC para anelamento dos primers iniciadores, com temperatura de extensão a 72ºC por 2 minutos, e mais 5 minutos de elongação final em mesma temperatura.

Os produtos resultantes da PCR de colônia foram verificados quanto sua qualidade e concentração em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) e visualizado sob luz UV. Como os iniciadores possuem sequências que permitem amplificar o exato fragmento da região codificadora da glicoamilase, a visualização de amplificação confirma também o sucesso da subclonagem do cDNA no vetor de expressão e a construção do vetor pPG.

4.5.4 - Identificação do cDNA da glicoamilase no vetor pPG por análise de restrição

Tendo sido pré-confirmada a presença do inserto no vetor de expressão pPG pelos produtos de amplificação, foi realizada extração de DNA plasmidial de pPG alocados nas células bacterianas hospedeiras, utilizando-se o kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare), seguindo suas especificações. Os plasmídeos pPG foram analisados por digestão dupla com as enzimas *Eco*RI e *Not*I (New England Biolabs) para a confirmação da presença do inserto no vetor de expressão em *P. pastoris*.

4.6 - Transformação da levedura *P. pastoris* GS115

4.6.1 - Preparo de células leveduriformes eletrocompetentes

Para a transformação da levedura metilotrófica foi feita preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, as quais após o impulso elétrico passariam a conter em seu genoma o cDNA da glicoamilase contido no vetor pPG linearizado com a enzima *Bgl* II, proporcionando a integração do cassete de expressão.

A competência da levedura em receber DNA exógeno foi obtida após crescer uma colônia de *P. pastoris* em 5 mL de meio YPD em um *erlenmeyer* de 125 mL por 24 horas a 30 °C sob agitação. Deste pré-inóculo foram retirados 0,5 mL e incubados em 500 mL de meio YPD mantidos em crescimento durante a noite até atingir uma OD_{600} = 1,3-1,5. Atingindo o crescimento necessário as células foram centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 500 mL de água gelada estéril. Esse passo foi repetido por mais duas vezes utilizando em cada repetição 250 mL de água gelada

estéril. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1 M gelado estéril, centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas com 0,5 mL de sorbitol 1M, completando para um volume final de 1,5 mL após a homogeneização vagarosa. Ao final deste passo as células são consideradas competentes e foram estocadas em alíquotas de 80 μL em temperatura de -80ºC.

4.6.2 - Linearização do vetor de expressão pPG para transformação e integração do cassete de expressão no *locus AOX1* por substituição gênica

O plasmídeo recombinante pPG foi linearizado utilizando a endonuclease de restrição *Bgl* II, (New England Biolabs), que possui dois sítios de clivagem, deixando o vetor com duas extremidades livres flanqueadas pela região AOX1. A reação foi realizada com tampão NEB3 1X, 120U da enzima *Bgl* II, 18 μg de DNA e água deionizada estéril para o volume final de 250 μL, incubada a 37ºC por 2 horas e visualizada em gel de agarose 1%.

A integração no genoma da hospedeira ocorre por recombinação homóloga dupla, devido ao vetor de expressão estar linearizado. Neste tipo de recombinação, ocorre a substituição do gene *aox1* no genoma da levedura pelo cassete de expressão contendo o gene de interesse, podendo modificar o fenótipo das células hospedeiras para Mut^S. Nesta estratégia de integração poderão ser obtidos dois fenótipos de levedura *P. pastoris* GS115: o fenótipo Mut^S que apresentará a substituição do gene *aox1* e o fenótipo Mut^+, apresentado por leveduras onde não ocorreu a substituição do gene *aox1*, mas sim a integração do cassete de expressão que é possível quando ocorre recombinações simples sem perda do gene mais ativo da enzima álcool oxidase.

4.6.3 - Eletroporação da hospedeira *P. pastoris* GS115

Na estratégia de transformação da levedura, 80 μL de células de *P. pastoris* eletrocompetentes foram homogeneizadas com 10 μg do DNA previamente linearizado com um volume máximo de 10 μL em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). A mistura foi transferida para uma cubeta de 2 mm e incubada em gelo por 5 minutos. A eletroporação ocorreu em aparelho do tipo Eletroporator 2510 (Eppendorf), utilizando-se a voltagem de 1500 V, sendo imediatamente adicionado à cubeta 1 mL de

sorbitol 1 M gelado que auxilia na recuperação da parede celular da célula leveduriforme. Transferiu-se o conteúdo para um microtubo e volumes de 50, 100, 200 e 300 μL das células recém transformadas foram semeados diretamente em placas do tipo Petri contendo o meio mínimo MD e incubadas para crescimento por três dias a 30ºC. Os clones recombinantes foram selecionados pelas suas habilidades de crescerem em meio sem o aminoácido histidina, utilizado como marca de seleção auxotrófica.

4. 7 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio sólido

4.7.1 - Seleção dos clones produtores de glicoamilase

Os clones transformantes de *P. pastoris* que apresentaram habilidade de crescimento em meio mínimo sem histidina foram utilizados para o *screening* da sua capacidade de expressar e secretar glicoamilase recombinante em meio sólido em placas do tipo Petri. Para tanto, todos os clones foram semeados em meio BMGY-U para o crescimento celular e as culturas foram incubadas a 30°C por três dias. Após, os clones foram transferidos para o meio BMMY-U contendo amido 1% e metanol 0,5% para induzir a expressão e incubados por 3,0 dias a 30°C. A cada 24 horas foi adicionado metanol 0,5% nas tampas das placas das culturas a fim de manter a indução da expressão gênica. Os clones produtores da enzima foram revelados pela coloração das culturas em placas contendo o meio BMMY-U, pelo método descrito por Astolfi Filho *et al*., (1986) que utiliza vapor de iodo para visualização de halos translúcidos ao redor das colônias daqueles clones que tiveram o fragmento de interesse expresso. Antes de proceder a coloração com vapor de iodo, os clones foram repicados em meio MD sólido para estoque, visto que o iodo representa severa toxicidade para as células. Para os clones produtores da enzima, foi realizada a medida do diâmetro do halo e da colônia, para a realização do índice de amilolise (Ia), que é dado pela fórmula Ia = dh/dc, onde dh = diâmetro do halo e dc = diâmetro da colônia, uma forma qualitativa de medir a atividade da enzima glicoamilase secretada no meio.

4.7.2 - Seleção de fenótipos Mut$^+$ e Mut^S dos clones recombinantes

Para determinação dos fenótipos dos clones recombinantes hábeis na expressão do gene de interesse, os mesmos foram semeados no sistema de réplica *plating* em meio MD e MM e incubados a 30°C por três dias com adição de metanol 0,5% nas placas com MM. A diferença na velocidade de crescimento dos clones no meio MM revelou seus respectivos fenótipos. Células com crescimento mais rápido foram tidas como Mut$^+$, diferentemente das Mut^S que crescem mais lentamente quando metanol é a única fonte de carbono por não possuir o gene *aox1*.

4.8 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio líquido

4.8.1 - Cinética de indução enzimática

Estes procedimentos permitiram a análise quantitativa da atividade enzimática e a construção de uma curva de crescimento das células de *P. pastoris* recombinantes.

4.8.2 - Minicultura em meio líquido para indução

Antes de proceder a indução em grande quantidade de meio de culturas em frascos de 500 mL, os clones foram cultivados em placas do tipo *Deep-well* com poços de 2 mL. Os recombinantes foram incubados inicialmente em 2 mL de meio BMGY-U por três dias. A cultura foi centrifugada 3000 g/ 8 min, descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio para indução da expressão gênica (BMMY-U). O cultivo foi incubado por 72 horas para os clones Mut$^+$ e por 120 horas para clones de fenótipos Mut^S, sendo novamente centrifugados a 3000 g/ min e utilizados para medidas da atividade enzimática. Após esta análise, os recombinantes positivos para produção da proteína ativa em meio líquido foram cultivados de forma apropriada de acordo com cada fenótipo.

4.8.3 - Indução em frasco de clones recombinantes com fenótipos Mut$^+$

A indução da expressão gênica dos clones Mut$^+$ foi realizada a partir de repiques dos clones em placas contendo o meio MD com ampicilina. Após o crescimento, os clones obtidos foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGY-U em frascos de

250 mL, os quais foram incubados a 30°C sob agitação de 200 rpm/min, até atingir uma $D.O_{600nm}$=2-6, por tempo de aproximadamente 18 horas. Ao atingir a $D.O_{600nm}$ necessária, as culturas foram centrifugadas (3000 g/10 min) e ressuspensas em 100 a 200 mL de meio de indução da expressão (BMMY-U) para que a cultura, agora mantida em frascos de 1 L, atingisse $D.O_{600nm}$ =1. A cada 24 horas foi adicionado metanol 0,5% à cultura para forçar a ativação do promotor AOX1 que consequentemente leva a transcrição do gene da glicoamilase sendo secretada para o meio após sua tradução.

Após o início da indução, que teve duração de 144 horas, alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de cultivo. As amostras foram centrifugadas a 10000 g/8 minutos a 4°C em centrifuga refrigerada e os sobrenadantes foram recuperados e estocados a -20°C para se realizar os ensaios e a caracterização enzimática. A curva de crescimento de *P. pastoris* durante a indução foi realizada pela coleta de células em cada um dos tempos e medida a D.O. no comprimento de onda 600 nm. O crescimento celular obtido foi convertido para g/L utilizando a fórmula (g/L)=0,22 x D.O. 600 nm (Nakano *et al.*, 2006).

4.8.4 - Indução em frasco de clones recombinantes com fenótipos Mut^S

Clones recombinantes selecionados e identificados como possuidores de fenótipo Mut^S, foram inoculados em 50 mL de meio BMGY-U em frascos de 250 mL. Estas culturas foram incubadas sob agitação de 200 rpm/min a temperatura de 30°C, até que atingissem DO_{600nm} = 9,0-10 cultivadas por cerca de três dias. Posteriormente as células em cada cultura foram centrifugadas (3000 g/10 min) e ressuspensas em 5,0 mL de meio BMMY-U e inoculadas em fracos de 250 mL contendo 20-30 mL do mesmo meio de modo que a densidade celular final correspondente da nova cultura fosse uma DO_{600nm}= 10. As culturas foram inoculadas a 30°C e mantidas em agitador a 200 rpm/min por 144 horas com a adição de metanol 0,5% a cada 24 horas para indução da transcrição gênica.

Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas até se completar 144 horas de cultivo. Parte das amostras foi centrifugada a 10000 g/8 minutos a 4,0°C e os sobrenadantes foram recuperados e estocados a -20°C para a realização da análise da proteína secretada no meio. A medida das densidades celulares ocorreram em espectrofotômetro

no comprimento de onda 600 nm para a construção da curva de crescimento dos clones Mut^S cultivados.

4.9 - Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE

A proteína recombinante secretada foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme modificações da metodologia descrita por Sambrook *et al.*, (1989). A uma alíquota de 120 μL de cada sobrenadante obtido durante a cinética de indução foi adicionado 1,5 mL de acetona 100% gelada e o sistema de precipitação foi incubado em gelo por 1,0 hora, após incubação o sistema foi centrifugado 12000 g/10 minutos a 4ºC, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi seco em temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em 20 μL tampão de amostra de eletroforese 1X para SDS-PAGE (200 mM Tris pH 6,8; 0,1% azul de bromofenol p/v; 4% SDS v/v; β-mercaptoetanol; 20% glicerol v/v) e as amostras foram fervidas em banho maria por 5,0 minutos, incubadas imediatamente em gelo até a aplicação no gel. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel concentrador de 4,0% e separador de 10%. A eletroforese foi realizada por 4 horas em voltagem de 250 V. Após a eletroforese, as proteínas separadas foram coradas com a solução de Azul Brilhante de *Coomassie*.

4.9.1 - Coloração de proteínas por Azul Brilhante de *Coomassie* G250

Após a eletroforese o gel foi incubado durante a noite em uma solução de *Coomassie* coloidal que tem a capacidade de detectar proteínas e é constituída de 0,1% de *Coomassie* G250 p/v, ácido fosfórico 2% v/v, sulfato de amônio 10% p/v e metanol 20% v/v. Após o período de incubação o gel foi imerso em banho de água deionizada para perder o excesso de corante até que obtivesse um contraste desejado para ter sua imagem capturada via *scanner*.

4.10 - Ensaios enzimáticos para a determinação da ação do produto gênico

4.10.1 - Análise quantitativa da atividade enzimática – determinação do produto pelo método DNS

A caracterização quantitativa da atividade sacarificante da glicoamilase foi realizada após a obtenção dos sobrenadantes da fase de indução utilizando o método

DNS descrito por Miller (1959). Este reagente é composto por ácido 3,5 dinitro-salicílico, sal de Rochelle, fenol, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio. O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração escura.

Foi adicionado a 30 μL dos sobrenadantes da enzima, 20 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e 50 μL de solução de amido solúvel 1,0% (Merck), seguindo incubação em a 60°C por 30 minutos, após o que, foi adicionado 750 μL do reagente DNS, para que a reação fosse paralisada. A mistura foi fervida por 5 minutos proporcionando a formação de coloração, em seguida foi rapidamente resfriada em banho de gelo e o volume foi completado para de 5,0 mL pela adição de 4,15 mL de água destilada. O material foi homogeneizado e lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O branco para a reação foi feito com a adição de 20 μL da solução de tampão acetato de sódio, 50 μL de solução de amido 1%, 30 μL de água destilada, 750 μL do reagente DNS e 4,15 mL de água destilada.

Os valores das absorvâncias foram utilizados para medir a atividade da enzima nos ensaios. A curva padrão para o cálculo enzimático utilizou concentrações de glicose que variaram de 0,1 a 5,0 mg/mL.

Uma unidade de atividade sacarificante de glicoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 μmol de glicose por minuto.

4.11 - Caracterização da glicoamilase produzida por *P. pastoris*

4.11.1 - Quantificação de proteínas totais

Para expressar a ação enzimática em atividade específica foi necessário quantificar as proteínas presentes no meio. A quantificação das proteínas totais solúveis nos sobrenadantes de cultivo da levedura *P. pastoris* foi realizada utilizando o kit de Ensaio de Proteínas BCA (BioAgency) que é baseado na metodologia descrita por Lowry *et al.,* (1951).

O volume de 5,0 µL dos sobrenadantes centrifugados foi diluído em 45 µL de água deionizada e adicionados a 1,0 mL da mistura dos reagentes do Kit BCA. O preparado foi incubado a 37ºC por 30 minutos e posteriormente lido em espectrofotômetro no comprimento de onde de 562 nm. O branco da reação foi feito usando 50 µL de água deionizada misturados a 1,0 mL da mistura dos reagentes do Kit

BCA. A concentração de proteínas totais foi determinada pela equação de uma curva padrão feita com solução de albumina de soro bovino em concentrações entre 0 e 70 μg/mL.

4.11.2 - Determinação do *pH* ótimo da ação catalítica

A metodologia utilizada para a avaliação da atividade enzimática em diferentes *pH* foi feita pelo método de DNS, como especificado na seção 4.10.1.

Para determinação do *pH* ótimo da enzima produzida em *P. pastoris*, foi utilizado o tampão McIlvane com diferentes *pH* variando entre 2,0 a 8,0 com pontos de 0,5 de intervalos.

4.11.3 - Determinação da estabilidade da glicoamilase em relação ao *pH*

Para esta caracterização a enzima foi incubada na proporção 1:1 com tampão McIlvane, que permite variação do *pH* na faixa de 2,0 a 8,0, com intervalos de 0,5 pontos. A atividade enzimática foi avaliada utilizando o mesmo método para determinação do *pH* ótimo.

4.11.4 - Determinação da temperatura ótima

Extratos da enzima recombinante foram incubados em diferentes temperaturas (30 a 100°C), no *pH* ótimo estabelecido para enzima, utilizando o método DNS para avaliar a atividade enzimática. Neste momento do trabalho foi estabelecida a temperatura na qual a enzima tem melhor ação catalítica.

4.11.5 - Determinação da estabilidade térmica da glicoamilase

Para avaliar a resistência da enzima recombinante à temperatura, o extrato enzimático foi incubado por 60 minutos a 60ºC. A cada 15 minutos eram feitas coletas de amostras para a dosagem da atividade enzimática utilizando o método DNS.

4.11.6 - Estabilidade glicoamilásica 4ºC

A proteína produzida foi estocada por 60 dias em temperatura de 4ºC. Durante este período de incubação a atividade enzimática foi avaliada a cada 10 dias para determinar se a enzima mantêm sua ação catalítica quando estocada não congelada fora de *freezers*. Os ensaios novamente seguiram aplicando o método de DNS que quantifica os açucares redutores resultantes da hidrolise enzimática do amido.

4.12 - Parâmetros cinéticos da enzima recombinante

4.12.1 - Determinação dos valores de *Km* e *Vmáx* para a glicoamilase recombinante

Na caracterização dos parâmetros cinéticos aparentes, a enzima produzida foi incubada para reagir com diferentes concentrações de amido. A concentração do substrato variou de 0,0025 a 0,25 mg/mL. O ensaio de atividade enzimática foi realizado nas condições padrões para enzima e os dados foram utilizados para plotar um gráfico dos duplos recíprocos que determina os valores reais de *Km* e *Vmáx* da enzima.

5 - Resultados e Discussão

5. 1 - Isolamento do cDNA de glicoamilase, construção do vetor pTPG

A reação em cadeia da polimerase para amplificação da região codificante da glicoamilase de *A. awamori* teve como DNA molde o cDNA *GLA* que estava clonado no plasmídeo pG5 (Moraes *et al.*, 1995). A reação foi realizada com a enzima Taq DNA Polimerase *High-Fidelity* que permite a polimerização de sequências de DNA de grande extensão com menor possibildade de erros, além de possuir uma atividade terminal transferase, onde a enzima adiciona um nucleotídeo de adenina, que foi utilizado para a clonagem no vetor pCR4-TOPO. Na Figura 11 podemos visualizar o cDNA da glicoamilase amplificado após os ciclos da reação da PCR.

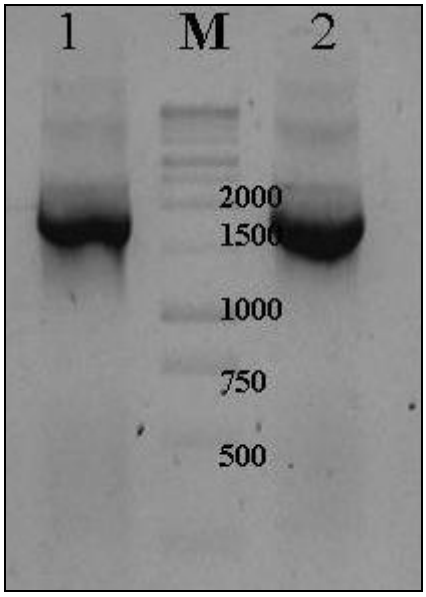

Figura 11. Perfil eletroforético dos produtos obtidos após amplificação do cDNA da glicoamilase de *A. awamori*. Colunas 1 e 2 – cDNA *GLA*; M – Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega).

O cDNA *GLA* foi amplificado em dois tubos separadamente, tubos 1 e 2, e os produtos foram misturados posteriormente. O produto da amplificação apresentou pelo resultado da eletroforese (Figura 11) um peso molecular de aproximadamente 2000 pares de bases (pb), indicando a amplificação completa do cDNA da enzima o que está

de acordo com Fierobe *et al*., (1997) que reportaram o peso molecular aproximado para o cDNA da glicoamilase de *A. awamori*. A amplificação ocorreu inserindo sítios de restrição das endonucleases *Eco*RI e *Not*I nas extremidades 5’ e 3’ respectivamente do fragmento, que foi amplificado sem a região que codifica a sequência sinal nativa da proteína.

Com a adição de um nucleotídeo adenina nas extremidades 3'OH foi possível a inserção do cDNA *GLA* no vetor de clonagem pCR4-TOPO, criando o plasmídeo pTPG (Figura 12). O sistema de ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* para multiplicar vetor pTPG e a seleção dos clones está descrita a seguir.

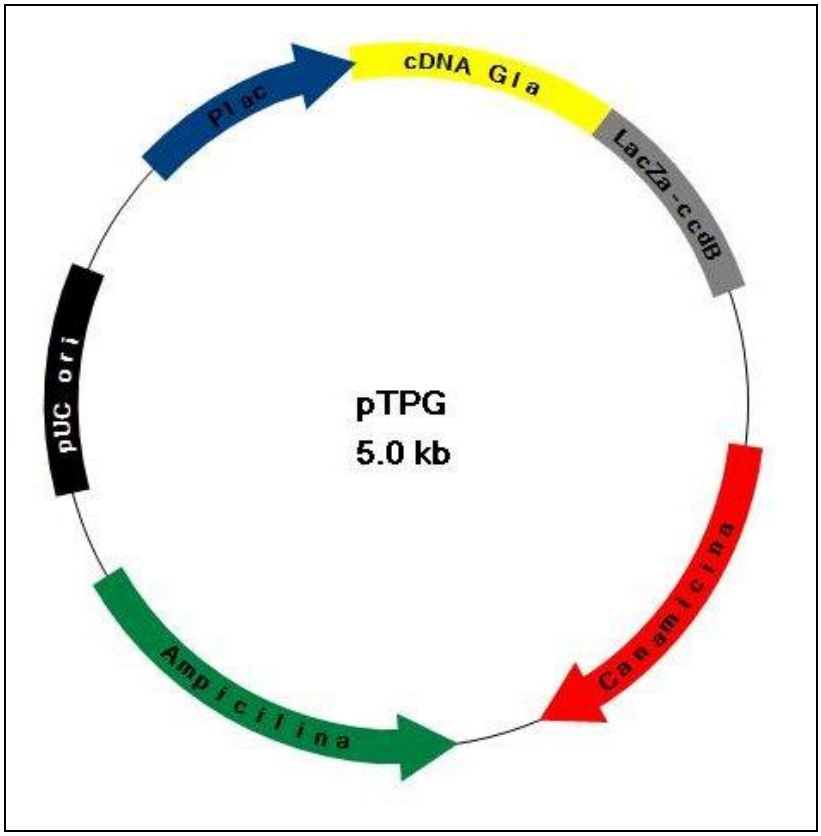

Figura 12. Plasmídeo pTPG com aproximadamente 5 kb, oriundo da ligação do fragmento amplificado correspondente ao cDNA da glicoamilase ao vetor pCR4-TOPO.

5.2 - Identificação do inserto no vetor pTPG por PCR de colônia e confirmação da orientação por análise de restrição com a endonuclease *Not*I

Após a transformação por eletroporação da hospedeira *E. coli* com o vetor pTPG foram obtidos clones transformantes que haviam crescido no meio de cultura com 200 μg/mL de ampilicina. Foram selecionados aleatoriamente 14 clones transformantes para a confirmação da inserção do plasmídeo via PCR de colônia como mostra a Figura 13. As bandas visualizadas possuem o peso molecular de aproximadamente 2000 pb confirmando a presença do cDNA no vetor de clonagem pTPG.

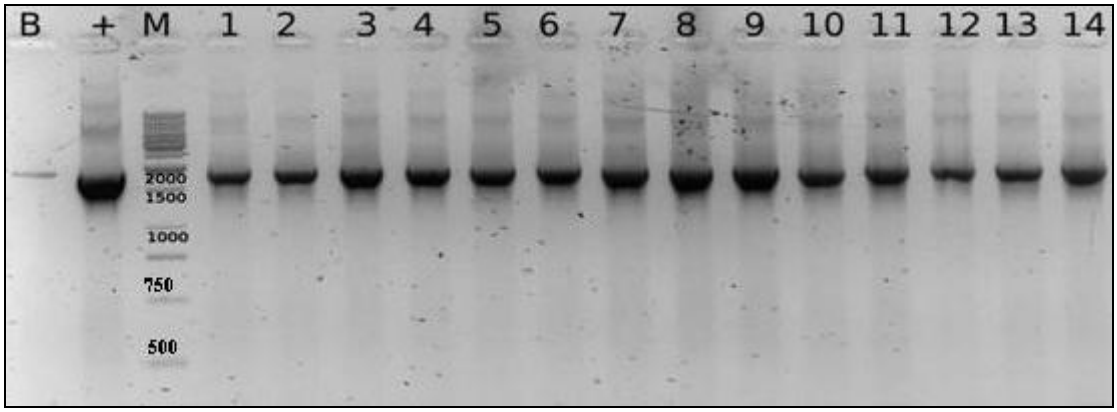

Figura 13. Análise eletroforética dos produtos da PCR de colônia realizada com os transformantes pPTG. B= Branco da reação de amplificação; += Controle positivo; 1-14= fragmento amplificado correspondente ao cDNA da glicoamilase; M= Marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas).

Confirmada a inserção via amplificação por PCR de colônia foram selecionados 06 clones recombinantes de *E. coli* (03, 07, 08, 09, 10 e 14), para a extração do plasmídeo pTPG e análise de restrição por digestão com a enzima *Not* I, para reforçar a confirmação da presença e verificar a orientação do inserto de glicoamilase no vetor construído. A escolha dos clones para extração de material plasmidial baseou-se na visualização de maior intensidade de banda no gel de agarose.

Na Figura 14 podemos visualizar a imagem da eletroforese dos fragmentos digeridos por *Not*I. O cDNA da glicoamilase está clonado a cerca de 10 pb de um sítio de *Not* I do pTPG (Figura 15), o que não libera a região codificante da glicoamilase se a inserção ocorre no mesmo sentido de transcrição do promotor *lac*. Caso ocorra a liberação, o fragmento foi clonado de forma inversa. Pode-se observar que o clone 08

apresenta um perfil eletroforético diferenciado do esperado, talvez apenas por excesso de material, no entanto, foi excluído dos experimentos seguintes.

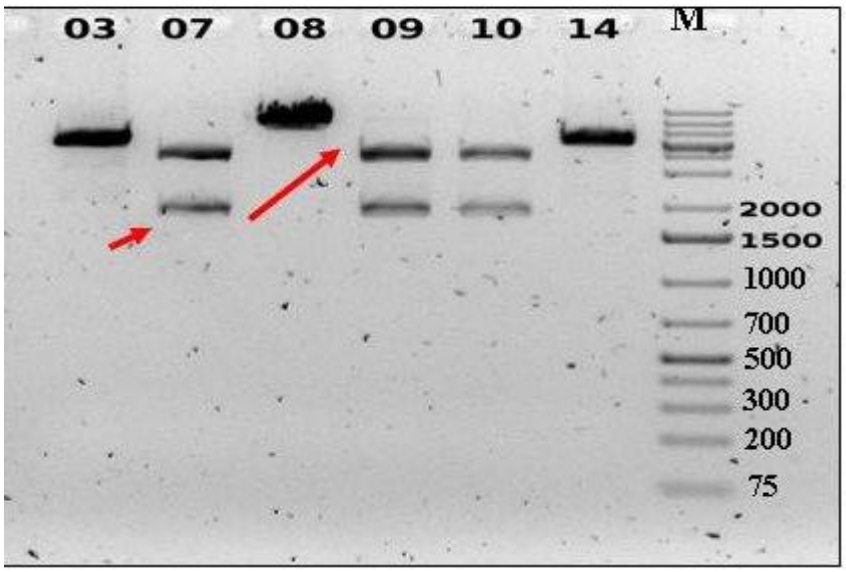

Figura 14. Análise do perfil de restrição com enzima *Not* I para verificação da orientação do inserto no vetor de clonagem. 3 a 14 = Plasmídeos pTPG digeridos com *Not* I, M= marcador de peso molecular 1Kb.

Os plasmídeos dos clones 07, 09 e 10 apresentam a liberação do inserto de peso molecular 2000 pb (seta menor) que estão clonados na direção inversa em relação ao promotor *lac* do pTPG, os fragmentos superiores correspondem ao plasmídeo pCR4-TOPO em sua forma linear (seta maior). Já os plasmídeos isolados dos clones 03 e 14 apresentam o inserto clonado na direção correta em relação ao promotor do pTPG, por isso, não é visualizada a liberação do fragmento correspondente ao cDNA da glicoamilase. A análise da orientação do inserto além de reforçar a confirmação da sua presença no vetor nos casos de inserção inversa, ainda é importante na análise dos dados de sequenciamento para que se saiba a orientação em que a sequência é analisada, entretanto, para clonagem direcionada, em que o fragmento é tratado com enzimas de restrição específicas, sua orientação no vetor pTPG não o impede de ser utilizado. A análise de sequenciamento não foi realizada no pTPG, sendo seguida diretamente a construção do vetor de expressão.

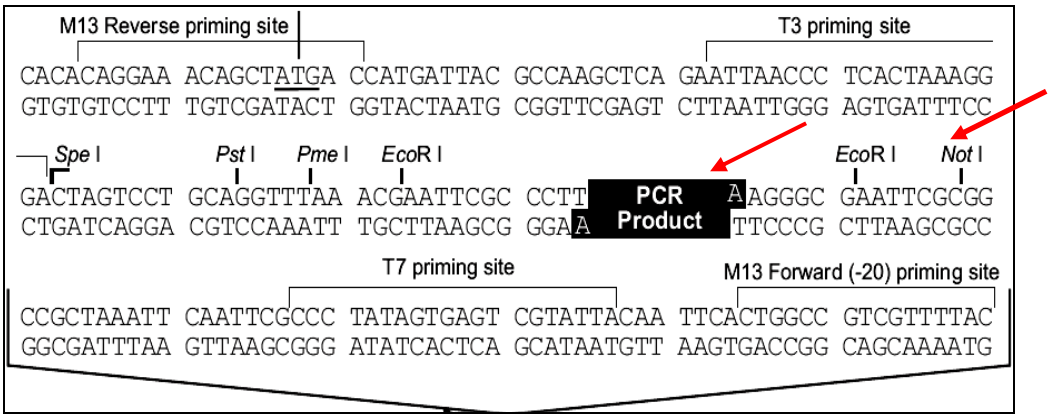

Figura 15. Mapa do múltipliplo sítio de clonagem (MSC) do vetor pTPG. A seta espessa mostra o sítio de clivagem de *Not*I utilizado na análise de restrição e a seta fina indica a posição do sitio de *Not*I da extremidade do inserto após a clonagem. Modificado do manual TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, (www.invitrogen.com).

5.3 - Construção do vetor de expressão pPG

Para a expressão do cDNA da glicoamilase na levedura *P. pastoris* foi utilizado o vetor de expressão pPIC9 (Figura 10). Para montar o vetor de expressão pPG, os plasmídeos pTPG foram misturados e digeridos com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Not*I para liberação do fragmento do cDNA da glicoamilase. O vetor pPIC9 intacto também foi clivado com as mesmas endonucleases afim de se obter extremidades coesivas semelhantes para direcionar a clonagem do cDNA neste vetor de expressão.

A clivagem do vetor de clonagem pTPG liberou o fragmento de peso molecular de cerca de 2000 pb o qual era esperado para o cDNA da glicoamilase, Figura 16 seta simples (sistemas 1 e 2).

Na figura 17 é observado o perfil de digestão do plasmídeo pPIC9 linearizado pela clivagem por *Eco*RI e *Not*I (coluna 3, seta dupla) para receber posteriormente o fragmento *GLA* isolado. Nas colunas 1 e 2 da eletroforese é observado apenas o fragmento codificador da glicoamilase, seta simples.

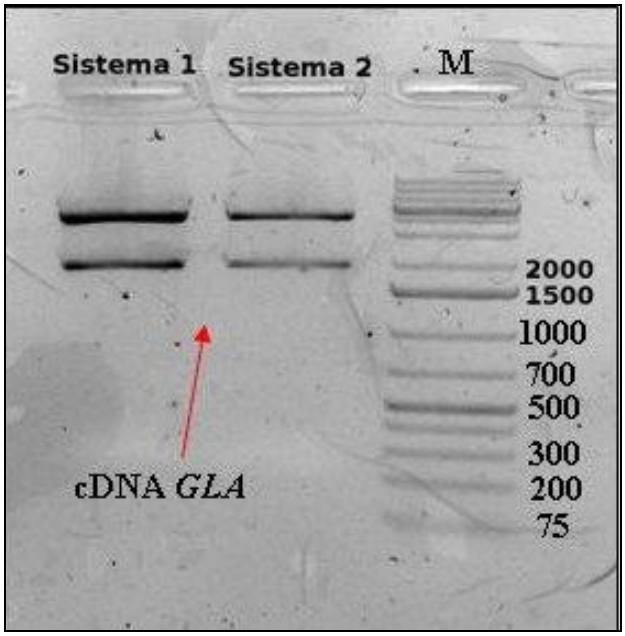

Figura 16. Perfil eletroforético dos plasmídeos pTPG digeridos com *Eco*RI e *Not*I. Sistema 1 – Plasmídeos isolados dos clones 03, 07 e 09; Sistema 2 – Plasmídeos isolados dos clones 10 e 14. M= Marcador de peso molecular 1Kb.

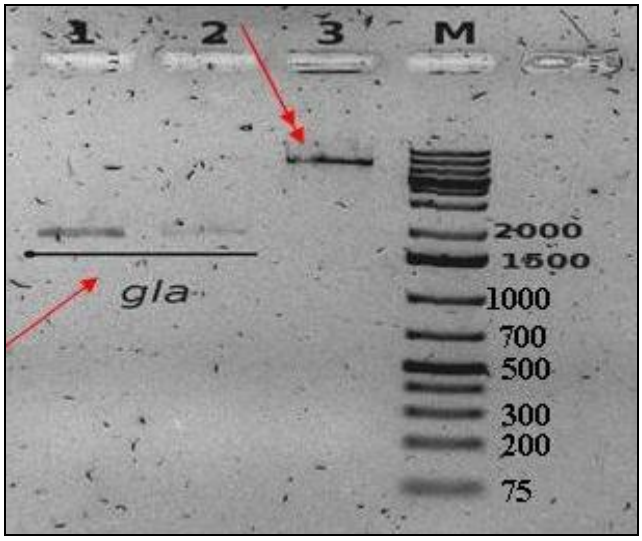

Figura 17. Análises eletroforética mostrando o cDNA da glicoamilase e o vetor pPIC9 linearizado, ambos os tratados com as enzimas com *Eco*RI e *Not*I e purificados. Colunas 1 e 2 – cDNA da glicoamilase; 3 – Vetor de expressão pPIC9 linearizado; M – Marcador de peso molecular 1 Kb.

O cDNA *GLA* e o vetor de expressão em *P. pastoris* foram purificados do gel de agarose para construção do novo vetor de expressão. A Figura 18 mostra o mapa físico do vetor pPIC9, em destaque (setas) o local de clivagem do múltiplo sítio de clonagem (MSC) e de inserção do fragmento de interesse. A ligação do fragmento ao vetor linearizado se fez pela ação da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). O cDNA *GLA* foi clonado após a sequência promotora do gene *AOX1* seguida da sequência sinal do fator-alfa de *S. cerevisiae* e anteriormente à região de término de transcrição (TT) do gene *AOX1*. Este novo vetor de expressão foi denominado pPG (Figura 19).

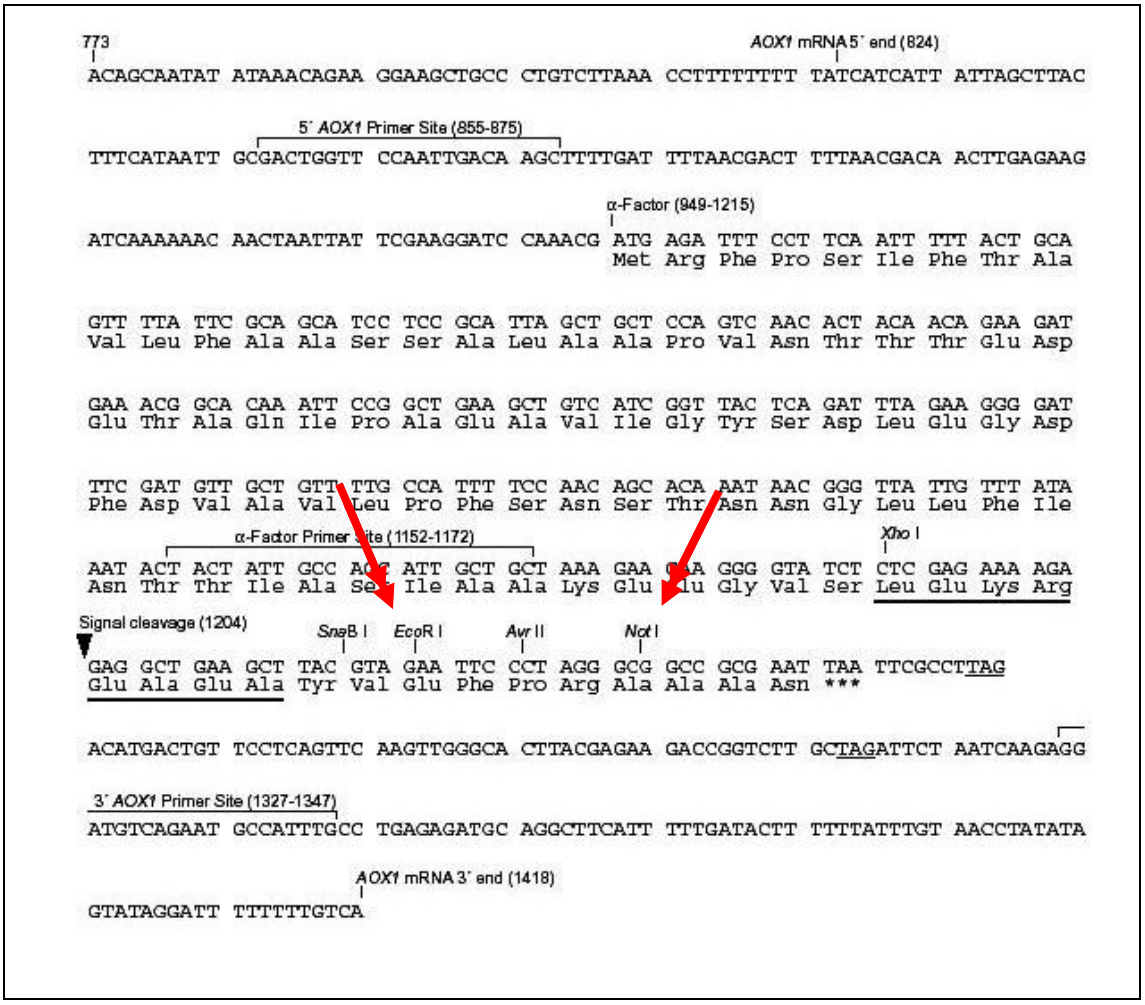

Figura 18. Sequência do cassete expressão do vetor pPIC9 mostrando os sítios de restrição para clonagem da sequência do cDNA da glicoamilase com a sequência sinal do plasmídeo (SS). As setas indicam o local de clonagem direcionada do cDNA da glicoamilase.

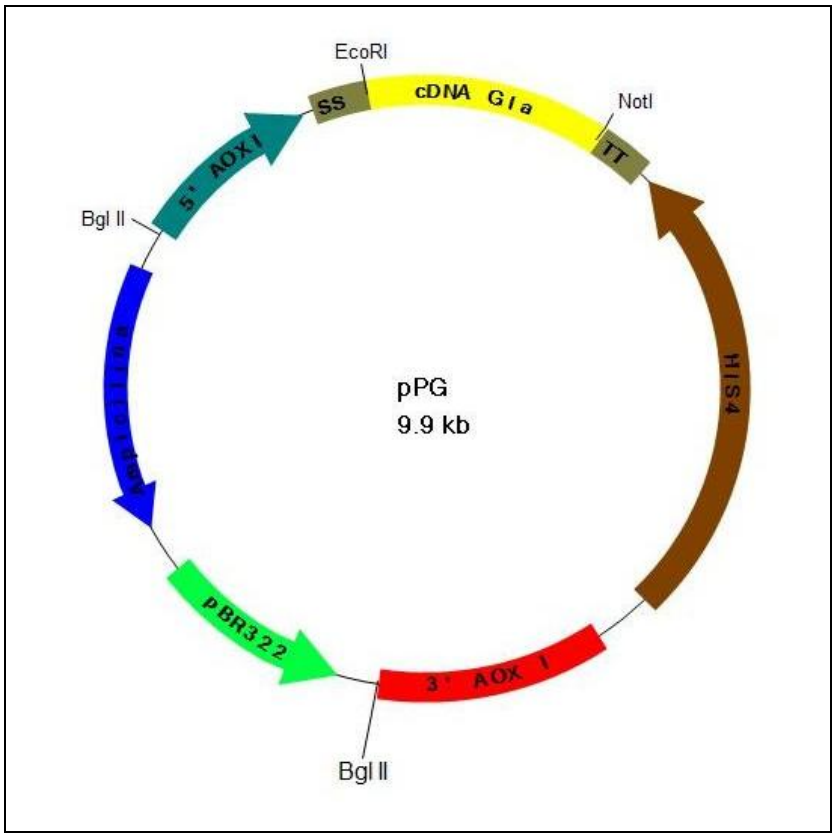

Figura 19. Mapa do plasmídeo recombinante construído pela ligação do cDNA da glicoamilase ao vetor pPIC9. O plasmídeo pPG tem cerca de 9,9 kb, possuí as características do vetor comercial pPIC9 e contém o fragmento codificante da glicoamilase introduzido em seu cassete de expressão.

5.4 - Identificação do inserto no vetor pPG por PCR de colônia e confirmação da correta construção por análise de restrição com as endonucleases *Eco*RI e *Not*I

Após a ligação do cDNA *GLA* no vetor de expressão pPIC9, células da bactéria *E. coli* TOP 10 foram transformadas por eletroporação e entre os clones transformantes foram selecionados aleatoriamente 15 destes para análise da inserção do cDNA no novo vetor. Para a confirmação de quais clones carregavam o plasmídeo recombinante pPG

foi realizada uma PCR de colônia destes clones utilizando os iniciadores específicos descritos na Tabela 1.

Na figura 20 podemos visualizar o resultado da PCR de colônias com os clones transformantes usados como fonte de DNA. Dos 15 clones selecionados, apenas 07 deles apresentaram o inserto clonado no vetor de expressão. É observado que a banda de amplificação apresentada possui a mesma altura da banda visualizada para o controle positivo, que é produto da PCR realizada para isolar o cDNA do vetor pG5, indicando que o produto da amplificação de fato corresponde ao cDNA da glicoamilase clonado no vetor de expressão pPG.

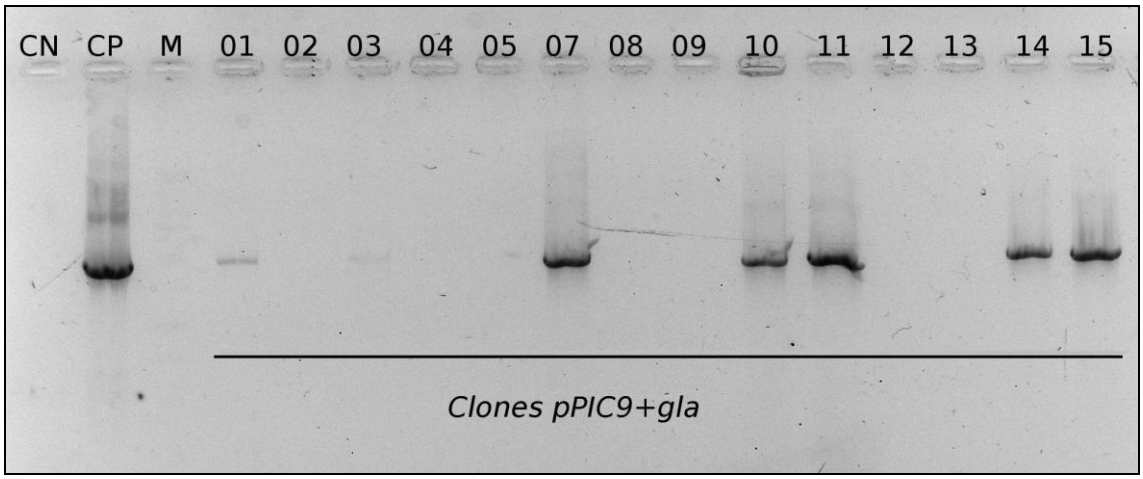

Figura 20. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do cDNA da glicoamilase por PCR de colônia. CN – Controle Negativo; CP – Controle positivo amplificado do pG5; Colunas 01 a 15 – Clones analisados.

A partir deste resultado, foram utilizados estes seis clones (01, 07, 10, 11, 14 e 15) que continham o plasmídeo recombinante para extração do seu DNA plasmidial.

Para a verificação da correta construção do pPG, o DNA plasmidial dos seis clones selecionados foram submetidos a digestão dupla com *Eco*RI e *Not*I. A Figura 21 mostra o resultado da digestão do pPG com *Eco*RI e *Not*I com a consequente liberação de um fragmento de 2000 pb de peso molecular correspondente ao cDNA da glicoamilase. Após essa confirmação, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar a levedura *P. pastoris* por eletroporação.

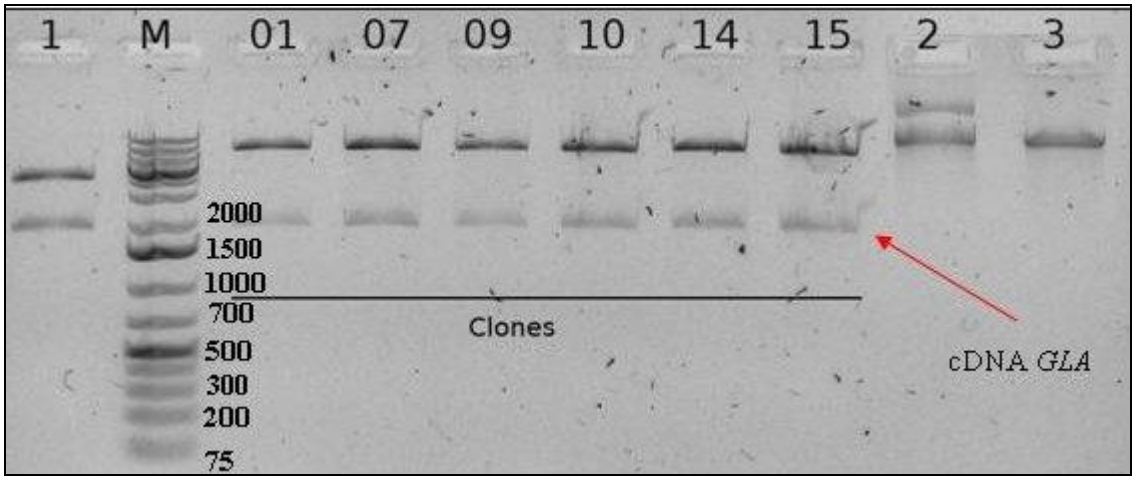

Figura 21. Perfil eletroforético do produto de digestão dupla dos plasmídeos pPG com as enzimas *Eco*RI e *Not*I. 1 – pTPG digerido com *Eco*RI e *Not*I; M – Marcador de peso molecular 1 Kb; 01, 07, 09, 10, 14, 15 – plasmídeos pPG duplamente digeridos; 2 – pPIC9 intacto; 3 – pPIC9 digerido com *Eco*RI e *Not*I. A seta indica o fragmento *GLA*.

5.5 - Transformação da levedura e integração do cassete de expressão na hospedeira *P. pastoris*

Para potencializar a transformação da levedura *P. pastoris* GS115 com o DNA exógeno, a linearização do vetor de expressão é apropriada para melhor integração do cassete de expressão no genoma hospedeiro. A levedura *P. pastoris* não apresenta vetores episssomais na constituição do seu material genético, sendo o material exógeno incorporado no seu genoma em sítios específicos tais como *HIS4 e AOX1* (Cregg, *et al*., 1993).

O plasmídeo recombinante de expressão pPG foi digerido com a enzima *Bgl*II que cliva o vetor em duas posições que flanqueiam a região promotora 5' *AOX1* e a região 3' *AOX1* do vetor, que por identidade com o genoma de *P. pastoris* possibilita a recombinação homóloga dupla entre estas sequências e o seu genoma. A integração do cassete de expressão então ocorre por substituição gênica no genoma hospedeiro. Nesta estratégia, a região codificante do gene *AOX1* é removida completamente e é substituída pelo fragmento de interesse. A Figura 22 mostra por eletroforese o plasmídeo pPG linearizado com a enzima *Bgl*II, a banda superior corresponde ao cassete expressão com extremidades *AOX1*, a banda que mais migrou é o fragmento menor que possui a origem de replicação em *E. coli*, o gene de resistência a ampicilina e outras sequências.

Este produto da digestão foi precipitado com NaCl e utilizado 10 µg de DNA para a transformação da levedura *P. pastoris* GS115 His^-/Mut^+ por eletroporação. Para a seleção dos clones cujos cassetes de expressão foram integrados no seu genoma, o produto da transformação foi semeado em meio mínimo sem histidina (MD) e após o crescimento de clones recombinantes (His^+), o que levou de 36 a 48 horas, procedeu-se o repique dos transformantes por sucessivas vezes no mesmo meio mínimo, para avaliar a estabilidade dos clones transformantes a capacidade de crescer em meio sem histidina. Ao todo foram selecionados 300 clones transformantes (His^+) capazes de crescer em meio mínimo e todos se mantiveram estáveis após dez sucessivos repiques.

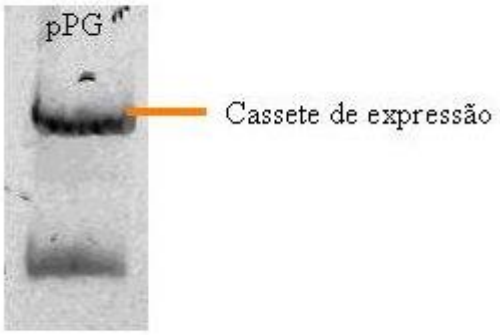

Figura 22. Perfil eletroforético do produto de digestão do plasmídeo recombinante pPG com *Bgl*II, utilizados para transformação em *P. pastoris*. A banda superior mostra o fragmento correspondente ao cassete de expressão do pPG contendo o cDNA *GLA* e na banda inferior tem-se o fragmento que possuí a região de origem de replicação em *E. coli*, o gene de resistência a ampicilina e outras sequências do pPIC9.

5.6 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio sólido

5.6.1 - Seleção dos clones produtores de glicoamilase

Todos os transformantes His^+ selecionados foram testados quanto à produção da enzima em meio contendo amido 1%. A ação catalítica da glicoamilase secretada foi visualiza pela sua capacidade de clivar o amido do meio de cultivo.

A enzima ao ser secretada cliva as moléculas poliméricas constituintes do amido que ao ser corado com vapor de iodo revela a formação de halos translúcidos ao redor

das colônias incubadas (Astolfi Filho *et al*., 1986). As diferenças nos tamanhos dos halos estão relacionadas com o tamanho da colônia (Heimo *et al*., 1997) e com a quantidade da enzima secretada.

Entre os 300 clones His^+ testados foram verificados halos de diâmetros diferenciados ao redor de 97 colônias (Figura 23).

5.6.2 - Seleção dos fenótipos Mut^+ e Mut^S dos clones recombinantes de *P. pastoris*

Após a seleção dos clones recombinantes capazes de secretar a proteína ativa em meio sólido, estes foram selecionados quanto ao fenótipo pela velocidade de crescimento em meio contendo metanol como única fonte carbono. A integração no genoma da levedura proporcionou a seleção de 71,1% de clones His^+ classificados como tendo o fenótipo Mut^+ (69 clones) e apenas 28,9% possuidores do fenótipo Mut^S, 28 do total de clones.

A clivagem do vetor de expressão por *Bgl*II propicia a estratégia para mudança do fenótipo da linhagem hospedeira *P. pastoris* GS115 His^- de Mut^+ para o fenótipo Mut^S devido a eventos de dupla recombinação e a perda do gene *AOX1* que codifica a enzima álcool oxidase mais ativa em processos metabólicos. Sreekrishna *et al.*, (1997) apontam que a frequência da perda do gene da enzima é da ordem de 1 a 5 entre 20 transformantes His^+, gerando os recombinantes de fenótipo Mut^S quando o vetor está linear cujas extremidades são homólogas as regiões 5’ e 3’ do *lócus* cromossômico *AOX1*. No entanto, mesmo articulando a estratégia para que ocorra a substituição, podem haver casos em que ocorra a inserção do cassete expressão por eventos de recombinação simples entre as sequências homologas do vetor e do genoma da levedura. A quantidade de clones com cópias inseridas por adição (clones Mut^+) é explicada pela maior possibilidade de ocorrer um único evento de *crossover* que eventos duplos do qual gera transformantes Mut^S pela substituição gênica.

A proporção encontrada é de certa forma concordante com o proposto pelos autores visto que foram obtidos mais clones de fenótipo Mut^+ com 69 clones que Mut^S com 28 colônias. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Daly e Hearn, (2005); que obtiveram eficiência de integração por substituição de aproximadamente 28% após a transformação mediada por polietilenoglicol (PEG), dados também concordantes aos encontrados por Uehara *et al*., (2000). Entretanto, Müller, (2008), transformando a

levedura pelo método de eletroporação obteve 61,5% de clones de fenótipo Mut^S e 38,5% com fenótipo Mut^+.

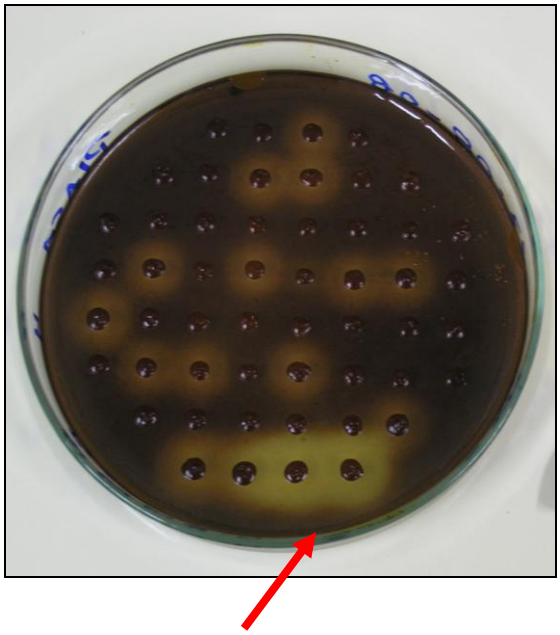

Figura 23. Fotografia da placa utilizada para seleção dos clones transformantes produtores de glicoamilase pela formação de halos translúcidos em torno das colônias. A seta indica o controle positivo para produção da proteína de fusão alfa-amilase/glicoamilase.

Em crescimento no meio MD com glicose, é visto que a hospedeira *P. pastoris* apresenta crescimento similar entre os clones em meio de cultivo suplementado com glicose (MD), mas observa-se crescimento diferenciado em meio com metanol, que é metabolizado pela hospedeira. Transformantes que receberam o cassete de expressão via substituição do gene *AOX1* (Mut^S) crescem muito lentamente em comparação com aqueles onde houve integração por adição (Mut^+) quando metanol é a única fonte de carbono disponível.

Essa diferença de crescimento pode ser essencial na escolha da forma de integração genética dependendo da utilização e aplicação do produto recombinante que será expresso na levedura. Para expressão intracelular, é conveniente usar células de fenótipo Mut^S porque a produção da proteína endógena álcool oxidase será pequena possibilitando maior eficiência em passos de purificação da proteína recombinante. Já para secreção é reportado o uso eficiente tanto de leveduras com fenótipos Mut^S quanto Mut^+ sem muitas diferenças significativas.

Os clones de fenótipo Mut^+ foram denominados com a letra P (*Plus*) e àqueles Mut^S receberam a letra S (*Slow*) para indicar seus respectivos fenótipos.

5.7 - Produção de glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* em meio líquido

5.7.1 - Cinética de indução enzimática

5.7.1.1 - Produção de glicoamilase em minicultura

Após a seleção dos fenótipos dos clones recombinantes, foram escolhidos 10 clones para expressar a enzima recombinante glicoamilase em meio líquido para análise da atividade e outros características bioquímicas da proteína. A escolha foi com base no índice de amilolise (seção 4.7.1) que é realizado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro de sua respectiva colônia. Foram selecionados 5 clones de fenótipo Mut^+, três dos quais de maior halo de degradação do amido observado em meio sólido e 5 recombinantes de fenótipo Mut^S com mesmo critério de escolha. Foram avaliados clones com os dois fenótipos para selecionar quais destes melhor secretavam a enzima glicoamilase, visto que na literatura especializada não está estabelecido qual fenótipo é o melhor, sendo encontrado diversos trabalhos científicos em que o produto recombinante pode ser melhor secretado tanto por clones Mut^S quanto por Mut^+.

Na Figura 24 são observados os valores dos índices para os recombinantes (P e S) escolhidos para indução, bem como o índice de amilolise de um controle positivo (C^+) que é um clone de *P. pastoris* transformado com a informação genética da proteína de fusão alpha-amilase/glicoamilase para degradação de amido. As barras P46 e S19 foram incluídas na figura para demonstrar os menores valores de degradação de amido de fenótipos Mut^+ e Mut^S respectivamente, porém estes dois clones não tiveram a glicoamilase recombinante expressa para análises posteriores.

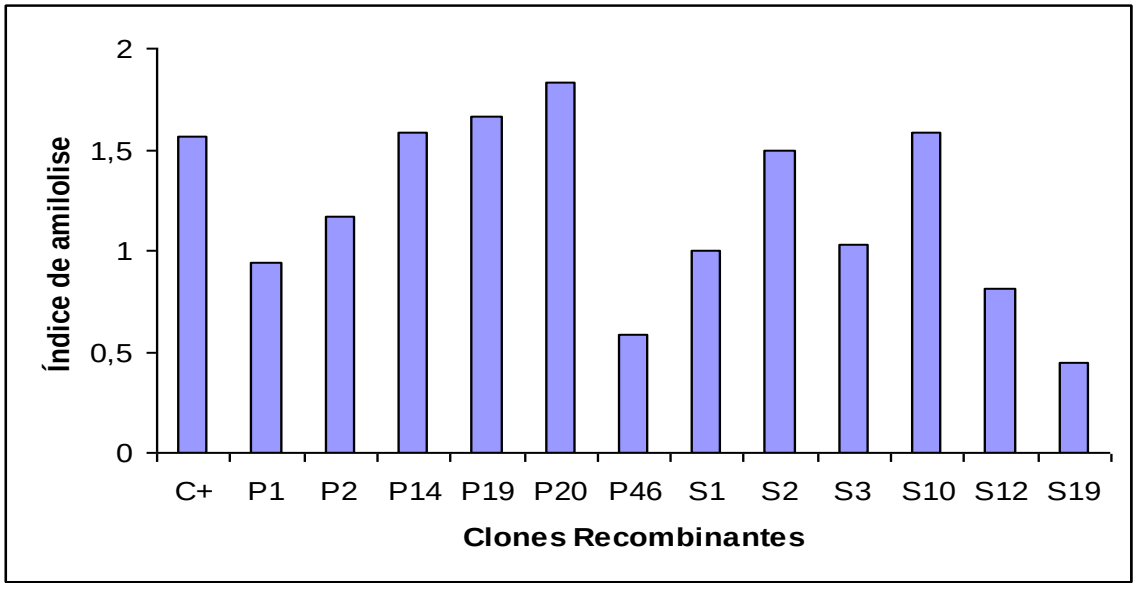

Figura 24. Gráfico que mostra o índice de amilolise (I.a) da glicoamilase (*GLA*) produzida por *P. pastoris* recombinante. C^+= Controle positivo para formação de halos (enzima de fusão alfa-amilase/glicoamilase); P1, P2, P14, P19 e P20= clones recombinantes de fenótipo Mut^+ utilizados para produção de *GLA*; P46= Clone Mut^+ de menor I.a (não analisado); S1, S2, S3, S10 e S12= Clones Mut^S para expressão da enzima; S19= Menor I.a entre os clones de crescimento lento em meio com metanol (não analisado).

A análise preliminar da funcionalidade da proteína foi primeiro testada a partir da produção em micultura de apenas 2 mL de caldo. A realização deste teste é bastante útil para a triagem rápida de clones produtores de proteína ativa em meio líquido. Todos os clones incubados secretaram glicoamilase recombinante ativa capaz de degradar eficientemente seu substrato. Como esperado, a atividade da enzima funcional tem certa proporcionalidade com os tamanhos de halos de degradação de seu substrato observados aos redores das colônias no momento do *screenig* dos recombinantes produtores de glicoamilase em meio sólido visto na Figura 23, no entanto em alguns casos esta relação pode não ser observada. A Figura 25 A e B, apresenta o resultado do teste rápido de atividade enzimática. Entre os clones de fenótipo Mut^+ (clones P), a diferença na atividade enzimática entre aqueles que apresentaram maiores índices de amilolise e os de menores índices foi bem mais pronunciada (Figura 25 A) quando comparada com o grupo dos clones de fenótipo Mut^S nomeados de clones S (Figura 25 B), que não apresentaram grande variação na velocidade máxima de atividade da enzima produzida. Como pode se observar os clones P19 e S10 foram aqueles que apresentaram melhor

atividade enzimática em meio caldo e por isto foram escolhidos para a produção da enzima em escala maior para caracterizações posteriores.

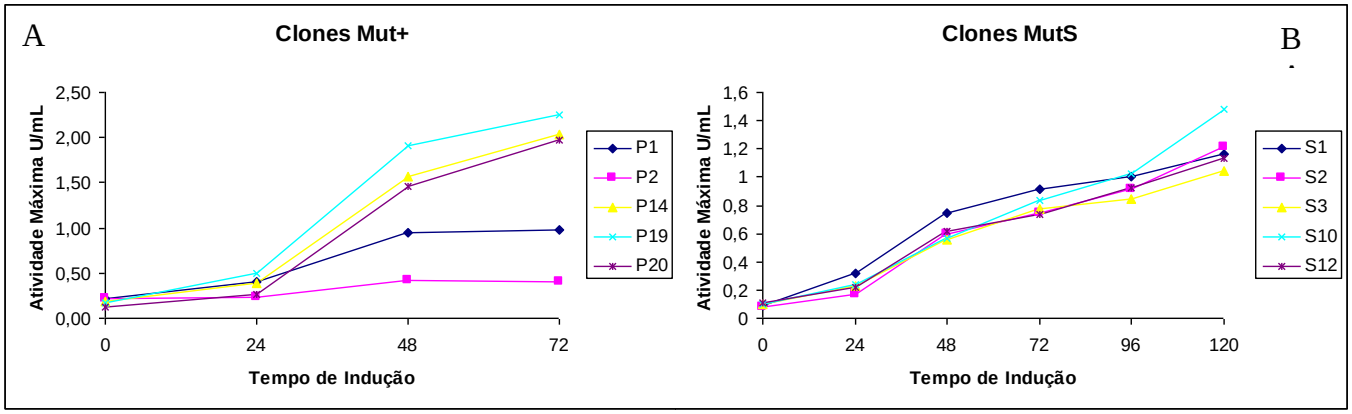

Figura 25. Cinética da produção de glicoamilase em minicultura: A) Clones Mut^{+} (P19) induzidos por 72 horas, B) Clones Mut^{S} (S10) cultivados por 120 horas.

A diferença da ação catalítica da glicoamilase recombinante produzida pelos clones pode estar relacionada com alguns fatores como quantidade de proteína produzida pelo clone ou seu perfil de modificações pós-traducionais ocorrido em cada caso. Na Tabela 02 são apresentados os valores da quantificação de proteínas totais secretada por cada clone de *P. pastoris* medidas pelo método BCA ao término da indução.

Tabela 02: Quantidade de proteínas expressa pelos clones recombinantes de *P. pastoris* dada por µg/mL medida por BCA. P = Clones de fenótipos Mut^{+} cultivados durante 72 horas e S= clones de fenótipos Mut^{S} cultivados durante 120 horas.

Clones	**P1**	**P2**	**P14**	**P19**	**P20**	**S1**	**S2**	**S3**	**S10**	**S12**
Proteína µg/mL	327	370	331	377	275	318	336	318	374	338

Pode ser observado que apesar do tempo de indução ser diferente para clones dos fenótipos avaliados, a secreção da proteína recombinante é quase que igualitária em seu término. Embora não haja variação discrepante da quantidade de proteínas expressas entre os clones de *P. pastoris*, é observada maior quantidade de glicoamilase secretada pelos clones P19 e S10, o que poderia justificar sua melhor atividade máxima quando avaliada nos ensaios enzimáticos pelo método DNS. No entanto percebe-se que alguns

dos clones com menores atividades de glicoamilase apresentaram maior rendimento de produção da proteína que outros com proteína mais ativas (Tabela 02 e Figura 25). O clone P2 expressou aproximadamente 26% mais proteínas que o clone P20 que teve maior ação catalítica de glicoamilase recombinante, confirmando que não há relação entre quantidade de proteína e poder catalítico. Quando se compara o índice de amilolise com a quantidade de proteína produzida, não há relação concordante para todos os casos (Tabela 02 e Figura 24).

A produção e ação catalítica de proteínas heterólogas podem ainda ser relacionadas com a quantidade de cópias do cassete de expressão integrada no genoma da levedura. Eventos de inserção múltiplas no genoma da hospedeira pode ocorrer espontaneamente em baixa frequência que pode ser de 1 a 10% dos transformantes (Invitrogen, 2006). Neste trabalho não foram feitas análises para determinar a dosagem de genes nos clones, comumente feitas empregando a técnica para a análise de *Southern Blot* com sondas de DNA (Liu *et al*., 2005), seleção baseada no aumento do nível de resistência a antibióticos (Sreekrishna *et al*., 1997) ou por técnicas mais resolutivas como aplicação de PCR semirresolutiva (Sato *et al.*, 2009) e ainda de maior precisão como a PCR quantitativa em tempo real qPCR (Ting-Ting *et al.*, 2006). Contudo, diversos autores têm observado que o alto número de cópias no genoma hospedeiro não tem sido relacionado com altos rendimentos de produção da proteína recombinante (Cregg *et al*., 1985). Mack *et al*., 2009 expressaram proteínas exógenas tanto em *P. pastoris* quanto em *P. angusta* e verificaram variações de rendimentos protéicos para clones com diferentes dosagens do cassete de expressão, clones com 9 números de cópias expressaram mais proteínas que clones com 19 cópias, por exemplo. A multiplicidade de cópias exógenas integradas no genoma da levedura recombinante poderia levar a debilidade da maquinaria celular nos processos transcricionais e traducionais e ainda saturar a sua via de empacotamento e secreção proteica.

5.7.1.2 - Produção de glicoamilase recombinante em meio líquido em frascos agitados

Os clones recombinantes P19 e S10, escolhidos por apresentar maior atividade enzimática em minicultura, tiveram a expressão induzida por metanol em maior quantidade de meio indutor de acordo com seus respectivos fenótipos (seções 4.8.3 e

4.8.4) e mantidos por 144 horas em frascos agitados. Após a indução a glicoamilase recombinante secretada em meio líquido foi analisada quanto sua atividade catalítica pelo método DNS.

O perfil de secreção entre os dois clones não foi muito semelhante ao encontrado para a proteína expressa em minicultura em placas do tipo *Deep-well* pois os valores de atividade enzimática foram maiores e as curvas traçadas apresentam dinâmicas diferenciadas .

O clone de fenótipo Mut^+ secretou 7,7 U/mL de glicoamilase avaliada nas condições padrões estabelecidas para a enzima utilizando tampão acetato de sódio no *pH* 4,5. A Figura 26 apresenta os resultados da atividade da proteína secretada por *P. pastoris* em função do tempo durante 144 horas de cultivo dos clones selecionados. O valor de atividade enzimática para a enzima do clone Mut^S foi ligeiramente menor com o valor de 6,9 U/mL.

A glicoamilase de *A. awamori* nativa foi extensamente estudada quanto a sua estrutura física (Aleshin *et al*., 1996; Harris *et al*., 1993), quanto sua produção em meios com diferentes fontes de nutrientes (Bon e Webb, 1993; Pavezzi *et al*., 2008) e algumas propriedades bioquímicas são dadas para enzima mutageneizada. Para a proteína tipo selvagem ou sem alteração em sua sequência, alguns trabalhos reportam suas características produzidas em sistemas de expressão heteróloga em *S. cerevisiae* (Moraes *et al*., 1995, 1999; Ekino *et al*., 2002; Pavezzi *et al*., 2008) e com menos frequência em *P. pastoris* (Fierobe *et al*., 1997; Heimo *et al.*, 1997). No entanto a proteína de outros microrganismos incluindo espécies do gênero *Aspergillus* é vastamente citada por diversos tipos de estudos (Chen *et al*., 2007).

Heimo *et al*., (1997), expressaram glicoamilase de *A. awamori* em *P. pastoris*. A atividade da enzima não purificada produzida em frascos agitados variou de 0,51 a 0,89 U/mL e os melhores produtores também foram clones de fenótipos Mut^+. Quando os autores cultivaram a levedura em fermentador em condições ajustáveis obtiveram um salto da atividade enzimática para 30U/mL com ganho considerável de massa celular pela levedura. Em comparação a estes dados, as *GLAs* recombinantes apresentadas no presente estudo, produzidas em frascos agitados liberaram entre 6,9 e 7,7 U/mL utilizando o extrato enzimático bruto, valores bem acima daqueles obtidos por Heimo *et al.*, (1997) que foram inclusive menores que os valores de atividade quando as leveduras foram cultivadas em miniculturas de 2 mL onde observa-se atividade

enzimática de 1,5 e 2,2 para os dois clones de escolha. Com isso, a possibilidade de cultivar os clones de *P. pastoris* em fermentadores sob condições ajustadas de aeração, agitação e manutenção de nutrientes poderia potencializar a produção de glicoamilase recombinante secretada pela hospedeira. No entanto, Fierobe *et al*., (1997) que produziram e purificaram glicoamilase de *A. awamori* também em *P. pastoris* cultivada tanto em minicultura quanto em cultivo em grande escala, relatam que a expressão da proteína em minicultura apresentou melhores rendimentos alcançando 7,8 U/mL da enzima purificada e 3,2 U/mL quando a indução da expressão foi realizada em larga escala. Possivelmente, passos futuros de purificação da glicoamilase produzida poderá nos proporcionar maiores desempenho da ação catalítica da enzima.

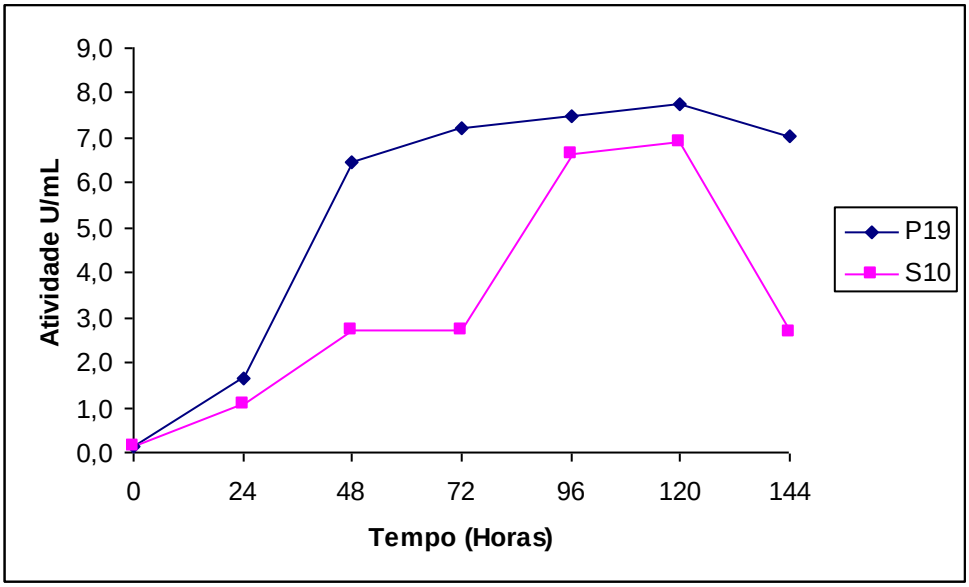

Figura 26. Gráfico da atividade de glicoamilase dos clones Mut^{+} (P19) e Mut^{S} (S10) em função do tempo de indução por metanol, à 30ºC, com agitação de 200 rpm.

Observa-se que o clone P19 apresenta rápido e considerável aumento da produção de glicoamilase a partir de 24 até 48 horas de indução mantendo um pequeno aumento durante os tempos analisados. A máxima atividade é atingida entre 96 e 120 horas de cultivo, sendo que a partir disto temos pequena queda na atividade de glicoamilase (Figura 26). O mesmo comportamento foi encontrado por Liu *et al*., (2005) que expressaram em *P. pastoris* a glicoamilase do fungo *Rhizopus oryzae* e obtiveram a secreção rápida da enzima até 48 horas de indução passando para aumento gradual até 120 de cultivo.

O clone S10 comportou-se de maneira diferente resultando em discreto e progressivo aumento da atividade enzimática até 48 horas que se manteve constante até 72 horas, seguida aumento do nível de secreção entre 72 e 96 horas, mantido quase que constante até 120 horas caindo dramaticamente após este período (Figura 26).

A queda na atividade enzimática pode estar relacionada com a morte celular da levedura *P. pastoris* após o sexto dia de cultivo. As figuras 27 e 28 demonstram a relação crescimento celular com a atividade máxima da proteína.

A Figura 27 mostra que para o clone S10 o aumento da atividade enzimática ocorre acompanhando o crescimento de massa celular até 48º hora de cultivo da levedura, a partir do qual essa relação é perdida e a estagnação de crescimento celular observada em 120 horas leva a forte queda atividade da glicoamilase recombinante. A enzima secretada pelo clone P19 (Figura 28) apresenta aumento rápido na atividade até 48 horas de cultivo que acompanha o crescimento celular, mas comportou-se de forma diferente daquela produzida por S10. A atividade máxima não declina subitamente quando a densidade celular começa a cair e ao final da indução o valor da atividade não é muito diferente do valor obtido no melhor tempo de indução.

Muitos fatores genéticos e ambientais podem influenciar a eficiência da produção de proteínas recombinantes em sistemas de expressão de genes heterólogos. A queda na ação catalítica ao final da indução pode estar relacionada com a liberação de proteases endógenas após a morte celular das leveduras que poderiam atacar a glicoamilase recombinante comprometendo sua conformação proteica total ou simplesmente modificando o seu sitio de ação catalítica. Higgins e Cregg, (1998), reportam que embora isso possa ser possível, algumas poucas proteínas exógenas expressas em *P. pastoris* em meio de cultura, podem de fato ser degradadas por proteases. A queda observada na atividade enzimática pode ser resultado tanto da liberação das proteases quanto de outras moléculas do metabolismo microbiano, que possuem maiores concentrações no fim do tempo de cultivo pelo crescimento avançado das leveduras, e então diminuiriam a ação catalítica da glicoamilase recombinante.

O tempo de cultivo para a indução da síntese de proteínas pode influenciar na sua secreção. Para o sistema de expressão em *P. pastoris* esse período pode variar entre 72 a 96 horas para clones de fenótipos Mut^+ e entre 120 a 144 horas para clones de fenótipos Mut^S. No entanto, são necessárias alterações das condições de fermentação para avaliar as melhores condições de obtenção do produto de interesse. A expressão da

glicoamilase foi avaliada por 144 horas para ambos os fenótipos com máxima atividade em 120 horas tanto para Mut^S quanto para Mut^+, período em que não se observou morte celular na cultura, observado pelo comportamento da curva de crescimento celular (Figuras 27 e 28). Isso sugere que a diminuição da atividade enzimática após este período pode de fato estar relacionada com liberação de peptidases por *P. pastoris* ou outros metabólitos da levedura.

Para fazer a caracterização bioquímica da glicoamilase recombinante produzida em *P. pastoris* foram utilizadas as amostras do tempo de cultivo que apresentaram maior atividade catalítica antes de ocorrer morte celular na cultura.

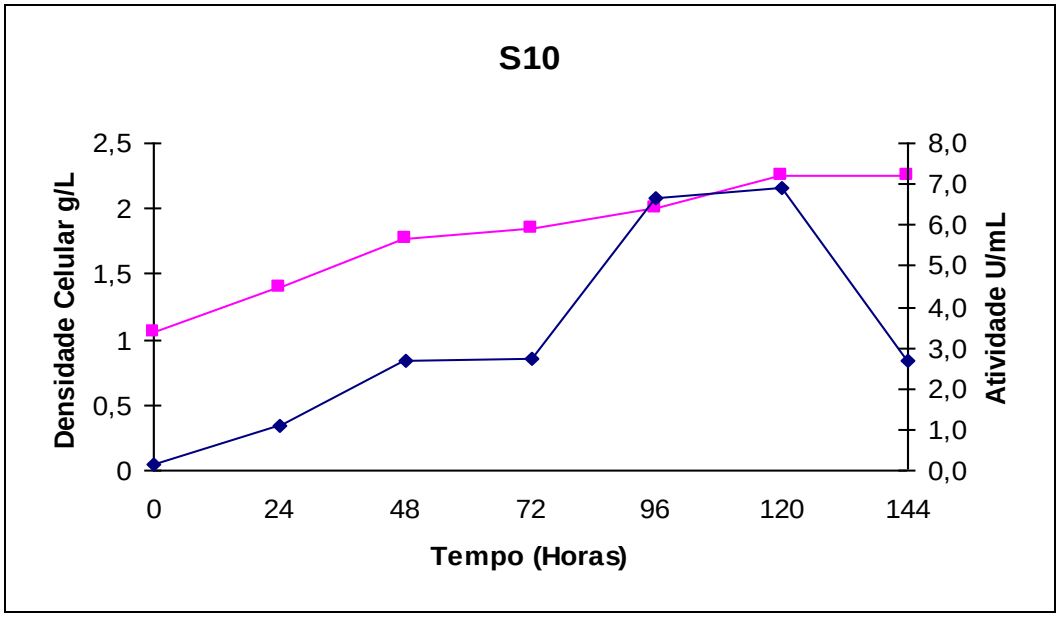

Figura 27. Níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone de fenótipo Mut^S em meio de cultivo. ■ - Densidade Celular (g/L); ♦ - Atividade Enzimática (U/mL)**.**

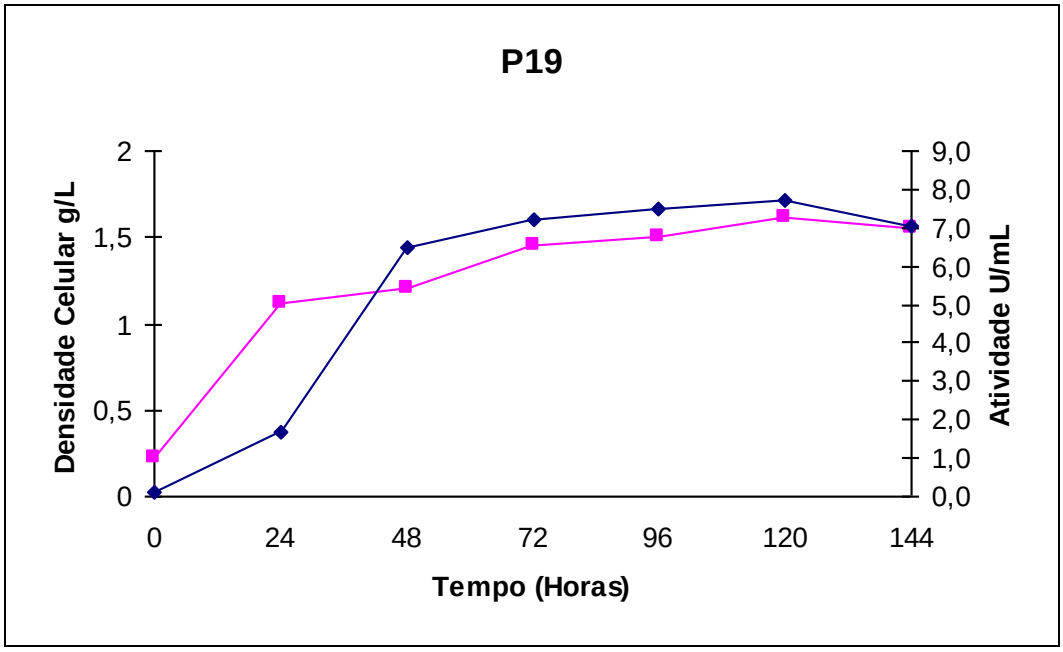

Figura 28. Níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone de fenótipo Mut$^+$em meio de cultivo. ■ - Densidade Celular (g/L); ♦ - Atividade Enzimática (U/mL).

A síntese/secreção da proteína é dada pela suplementação do meio de cultivo com o reagente metanol. O comportamento das curvas de atividade enzimática pode confirmar a eficiência do forte promotor *AOXI*, regulado transcricionalmente após a adição de agente indutor no meio de cultura (Figuras 27 e 28). Segundo Torres e Moraes (2001) o início da transcrição no promotor *AOX1* é altamente eficiente, o que se observa na inclinação da curva de atividade enzimática. Essa característica fez da levedura metilotrófica um excelente sistema de expressão heteróloga com grande sucesso de aplicação desde o seu desenvolvimento nos anos de 1980 (Cregg *et al*., 1985) tanto para pesquisas acadêmicas quanto para a produção industrial.

A Tabela 03 sintetiza dados de produção de glicoamilase em *P. pastoris* do presente trabalho.

Tabela 03: Produção de glicoamilase recombinante.

Clones recombinantes	**Índice de amilolise**	**Concentração Celular (g/L)**	**Atividade Enzimática U/mL**	**Proteínas Totais (µg/mL)**	**Atividade Específica (U/mg)**
Mut$^+$ (P19)	1,7	1,6	7,7	500	**15,4**
Mut^S (S10)	**1,6**	**2,2**	**6,9**	**373.7**	**18,5**

Estudo realizado por Bon e Webb (1993), referente à otimização da produção de glicoamilase endógena secretada pelo fungo filamentoso *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1, utilizando 2 mL de extrato enzimático para análises, relata a atividade da 15 U/mL de atividade enzimática e 2,0 U/mg de atividade específica quando o fungo foi cultivado em meio suplementado com amido 3% e condições ajustadas de nutrientes. Em nosso trabalho, embora não tenha sido otimizado ainda o processo de produção de glicoamilase, foi obtida a atividade de 7,7 U/mL, a qual após melhoria de condições de cultivo da levedura pode se igualar ou ser super a produção feita por *A. awamori* 2B 361 U2/1, um mutante sequencial da linhagem NRRL 3112, geneticamente melhorada para utilização na indústria alemã.

É observado que sistemas de expressão heteróloga são vantajosos para obtenção de proteínas e outros produtos. No entanto, foi reportado que transformantes de *S. cerevisiae* contendo o cDNA da glicoamilase de *A. awamori* produziram a enzima que rendeu 2,62 U/mL para clones com uma única cópia do DNA e 5,28 U/mL para clones com 5 cópias avaliada pelo método DNS (Ekino *et al*., 2002). Um outro perfil de produção pela levedura também foi observado por Flory *et al*., (1994), quando estudaram a enzima que exibiu 0.09 U/mL de atividade. Esses resultados reforçam que a levedura *P. pastoris* é um bom sistema de expressão heteróloga.

5.8 - Caracterização bioquímica da glicoamilase

Após o processo fermentativo, o extrato enzimático bruto produzido foi analisado bioquimicamente quanto aos *pH* e temperatura de melhor ação catalítica e maior estabilidade, e seus parâmetros cinéticos aparentes.

5.8.1 - Determinação do *pH* ótimo da ação catalítica

As variações no *pH* podem exercer muitas alterações nas reações catalisadas por enzimas. A glicoamilase recombinante teve o *pH* de melhor atividade avaliada sob o efeito do tampão citratro-fosfato (McIlvane) com potencial hidrogeniônico variando de 2,0 a 8,0 com intervalos de 0,5 pontos.

Os dados mostram que a enzima secretada por *P. pastoris* apresenta melhor funcionalidade em *pH* ácido, mantendo alta atividade na faixa que vai de 2,0 a 4,5 com máximo de atividade enzimática em *pH* 3,5 (Figura 29).

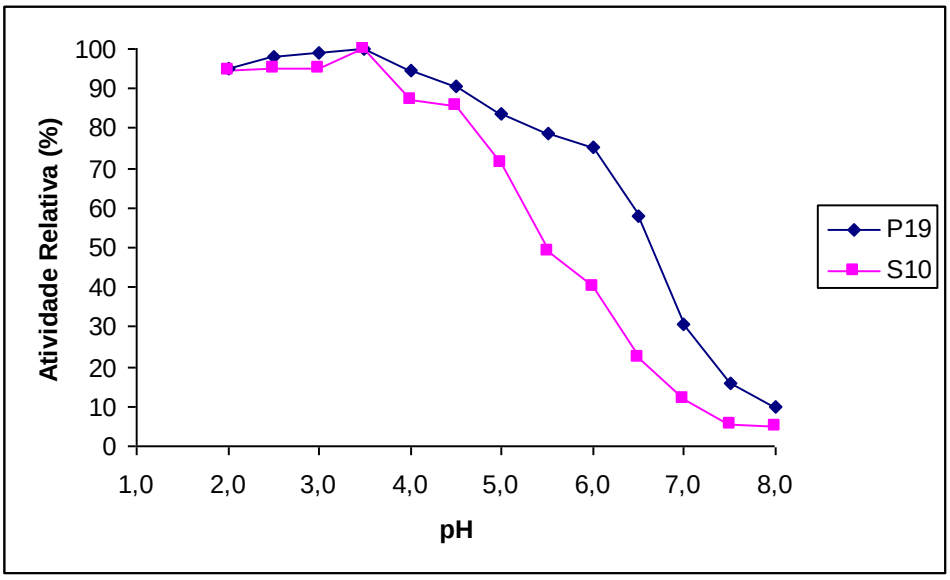

Figura 29. Efeito do *pH* sobre a atividade de glicoamilase produzida pelo clone Mut^+ (P19) e clone Mut^S (S10).

O *pH* ótimo para glicoamilase de fungos do gênero *Aspergillus* varia de 4,0-6,5 sendo muito recorrente a descrição do valor 4,5 (Norouzian *et al.*, 2006), valores de *pH* variando de 3,0 a 5,5 foram encontrados quando a enzima foi imobilizada em polianelina (Silva *et al*., 2005). O cDNA da glicoamilase expresso em *P. pastoris* foi clonado em *S. cerevisiae* por Moraes *et al*., (1999) e caracterizaram o *pH* 6,0 como o ótimo da enzima purificada avaliada por DNS, já Pavezzi *et al*., (2008) reportam o *pH* 4,0 como ótimo para a enzima também expressa em *S. cerevisiae.*

A enzima secretada pelo clone Mut^+ reteve em *pH* abaixo do determinado como ótimo (*pH* 3,5), quase 100% da atividade relativa com pouco mais de 99% de sua atividade em *pH* 3,0; caindo para 97% em *pH* 2,5; 95% em *pH* 2,0.

Para os valores acima de *pH* 3,5, a enzima retém 94, 90 e 83% em *pH* 4,0, 4,5 e 5,0 respectivamente, a partir dos quais começa um declínio da atividade, sobretudo a partir de *pH* 6,5 (57%) chegando a apenas 10% de sua atividade relativa em *pH* 8,0 sendo considerada não funcional em *pHs* alcalinos e portanto não foram avaliadas nestas condições.

Atuações diferenciadas de enzimas produzidas em sistema de expressão heteróloga *P. pastoris* pode ser devido à habilidade da levedura realizar diversas modificações pós-traducionais. As enzimas dos dois clones analisados apresentaram as mesmas características quanto ao *pH*, com diferenças apenas nos valores da atividade relativa. Para o clone de fenótipo Mut^S obtivemos 95% da atividade máxima em *pH* 3,0; 94% tanto para *pH* 2,5 e 2,0. Mais de 80% é obtida em *pH* 4,0 e 4,5; mantendo menos de 50% da ação catalítica em *pHs* superiores que 5,5, ver Figura 29. Variações na ação catalítica da enzima em diferentes *pH* pode ser dada pelas características dos próprios aminoácidos constituintes da glicoamilase que dependendo de suas cadeias laterais agem como ácidos ou bases fracos e realizam funções críticas no sítio ativo da enzima, alterando portanto sua funcionalidade.

Enzimas atuantes em *pH* ácido são mais eficientemente empregada na hidrólise do amido que tem as suas ligações glicosídicas mais estáveis em condições alcalinas e no entanto, rompe-se facilmente em condições ácidas. Assim, se o amido é tratado com essas enzimas específicas dessa natureza, o resultado é um fracionamento mais eficiente e ágil do polímero.

5.8.2 - Determinação da estabilidade da glicoamilase em relação ao *pH*

A Figura 30 mostra os resultados do estudo da estabilidade da proteína recombinante incubada em diferentes *pH* durante 24 horas na temperatura de 25ºC. A glicoamilase se apresentou mais estável quando incubada em *pH* 3,5 e mostrou-se de considerável estabilidade desde *pH* 2,0 a 5,0 retendo mais de 80% da atividade relativa da enzima, com queda dramática ao ser incubada em *pH* 6,0, 7,0 e 8,0.

Caracterizações de glicoamilase extraídas em espécies do gênero *Aspergillus* reportam *pH* de estabilidade no valor de 4,5 (Bahar *et al*., 1998), 5,0 (Gomes *et al*., 2005) e na faixa de *pH* que varia de 5,0 a 7,0 (Pavezzi *et al*., 2008).

Os valores de *pH* em que a glicoamilase apresentou maior atividade e melhor estabilidade são características desejáveis em alguns processos industrias em que os produtos são obtidos em meio ácido. A enzima, portanto, pode ser aplicada na obtenção de xaropes de glicose para a produção de refrigerantes, no processamento cítrico para produção de suco de frutas, entre outros.

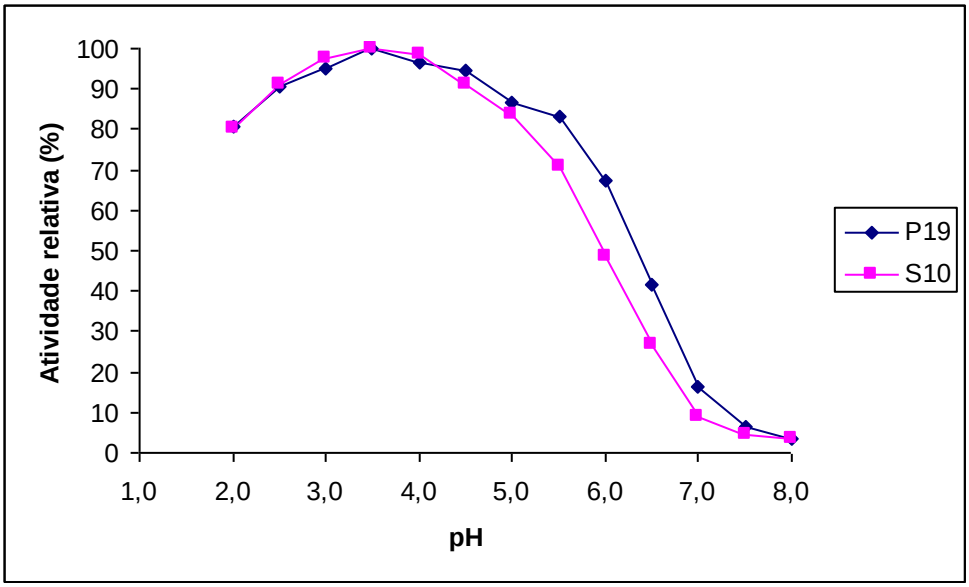

Figura 30. Estabilidade da glicoamilase frente incubação por 24 horas em tampão McIlvane com diferentes valores de *pH*. P19: Enzima produzida por *P. pastoris* de fenótipo Mut^+ e S10 glicoamilase secretada pelo clone Mut^S.

Na produção de etanol a enzima poderia ser aplicada eficientemente em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) que consiste na hidrólise do substrato pela enzima na presença do microrganismo fermentador, reduzindo o tempo do processo de produção (Nikolié *et al*,. 2010; Krishna *et al*., 1998). Após o inicio do cultivo da levedura *S. cerevisiae* o *pH* é drasticamente reduzido em consequência do consumo de açucares e nutrientes que levam à acidificação do meio pela liberação de sal de amônia ou de metabólitos do microrganismo, com possível liberação de ácidos orgânicos e do próprio etanol.

Segundo Montesinos e Navarro (2000), uma das vantagens do sistema SSF seria a eliminação do efeito de inibição da glicoamilase pelo excesso de glicose liberada no meio de hidrólise, uma vez que a levedura estaria concomitantemente assimilando e fermentando este açúcar, propiciando desempenho superior ao processo.

5.8.3 - Determinação da temperatura ótima

A temperatura é um dos fatores que muito influenciam na eficiência da atividade enzimática, pois pode aumentar ou diminuir a energia disponível durante as reações. A glicoamilase foi avaliada para a determinação de atividade máxima nas temperaturas que variaram de 30 a 100 ºC em tampão citrato-fosfato *pH* 3,5.

Pela visualização da Figura 31 é observada que a glicoamilase tem boa ação catalítica nas temperaturas de 50 a 70ºC, com máxima atividade a 60ºC, confirmando a temperatura descrita na literatura para essa enzima que varia de 50 a 60ºC (Costa 1996) e é a mesma determinada por Moraes *et al*., (1999).

Temperatura ótima maior que 60ºC não é comumente reportada para a enzima de espécies do gênero *Aspergillus*, porém é encontrada para enzimas de fungos termofílicos. Thorsen *et al*., (2006), fizeram a identificação e caracterização da enzima glicoamilase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* que apresentou a temperatura ótima de 70ºC. No entanto, Vieille e Zeikus (2001) apresentam que é rara a ocorrência de glicoamilase em organismos termofílicos ou hipertermofílicos.

A enzima S10 apresentou atividade relativa de 92,7% em 50ºC, seguido de 84,1% para 70ºC e 61,4 a 40ºC. A levedura de fenótipo Mut^+ secretou a enzima P19 que reteve 97,7 % de sua atividade máxima a 70ºC, 96,8% quando incubada a 50ºC e 64,8% na temperatura de 40ºC. Com o aumento da temperatura ocorre perda dramática da ação catalítica chegando a 100ºC com perda de mais de 80%.

A influência da temperatura sobre a atividade enzimática deve ser entendida em duas fases distintas. Em princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos da velocidade da reação por aumentar a energia cinética entre as moléculas do sistema. Já, temperaturas acima do intervalo compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima alteram ligações químicas que mantém sua estrutura tridimensional ocasionando a perda da conformação nativa e poder de catálise enzimática.

Em processos industriais a temperatura de atuação da enzima se faz de grande importância devido a muitos dos processos necessitarem de temperaturas elevadas, como é o caso do processamento do amido. Assim, diversos esforços têm sido feitos para melhoria de produção de enzima mais termoestáveis

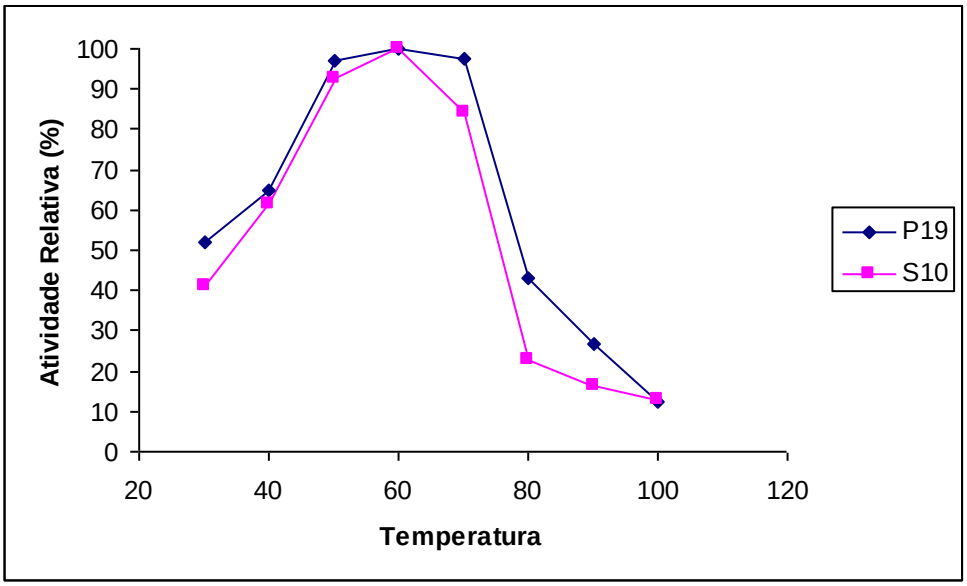

Figura 31. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da glicoamilase. P19: Enzima produzida por *P. pastoris* de fenótipo Mut^{+} e S10 glicoamilase secretada pelo clone Mut^{S}.

5.8.4 - Determinação da estabilidade térmica da glicoamilase

Uma vez estabelecida a temperatura ótima da enzima avaliada em seu melhor *pH* de ação catalítica foi realizada a análise da estabilidade térmica da enzima.

A análise da termotolerância foi realizada incubando a enzima pura na temperatura de 60ºC dosando a atividade enzimática a cada 15 minutos até que se completasse 1 hora de incubação.

Novamente, a enzima produzida pelo clone de fenótipo Mut^{+} apresentou superioridade de resistência a temperatura quando comparada com o produto do clone de fenótipo Mut^{S}. Após 15 minutos à 60ºC, a enzima retém 97,5% de sua atividade máxima obtida quando não incubada à 60ºC, determinada como 100%. É observada 86,8 e 79,8% de atividade residual quando a enzima do clone Mut^{+} foi incubada à 30 e 45 minutos respectivamente, retendo mais da metade da atividade (58,3%) após 1 hora de incubação (Figura 32).

O clone Mut^{S} produziu glicoamilase menos resistente a temperatura, a enzima mantém pouco mais de 6,0% ao término do período de incubação, 8,2 % após 45 minutos e 79,3% com 15 minutos à 60ºC (Figura 32).

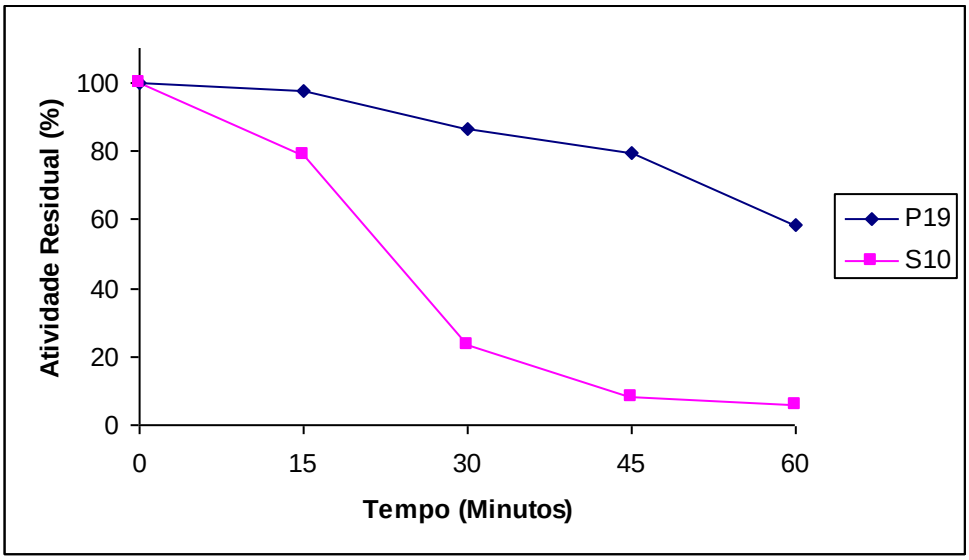

Figura 32. Termotolerância da glicoamilase incubada pura por 60 minutos a 60ºC.

A queda observada na eficiência da ação catalítica da enzima é dada pela sua desnaturação. Segundo Gomes *et al*., (2007), a termoestabilidade está diretamente relacionada ao dobramento da proteína, o qual é estabilizada por equilíbrio entre forças do seu dobramento e desdobramento. Com o tratamento térmico muitas das interações que mantém a estrutura tridimensional de uma proteína, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pareamento de íons e forças de van der Waals (Gomes *et al*., 2007), podem ser rompidas e a molécula se desdobra perdendo sua funcionalidade. A termoestabilidade é ditada principalmente pelos fatores intrínsecos relacionados às estruturas primárias e secundárias da proteína, os aminoácidos constituintes, o caráter hidrofóbico por exemplo. Teng *et al.*, (2007) descreveram que a glicosilação em determinadas proteínas podem aumentar a sua termotolerância devido maior estabilização da estrutura proteica.

Os dados indicam que a enzima secretada pela hospedeira *P. pastoris* é de considerável termoestabilidade com cerca de 80% de atividade residual até o 45º minutos do tratamento térmico. Maior termoestabilidade poderia ser obtida se a enzima fosse incubada junto com tampão de reação que possivelmente estabilizaria a sua estrutura. Porem, o resultado obtido é concordante ao apresentado por Fierobe *et al*., (1977) que mostraram alta atividade residual da enzima também a 60º, quando a incubaram por apenas 5 minutos em várias temperaturas, sendo inativada em temperaturas superiores a 60º.

5.8.5 - Estabilidade da glicoamilase a 4ºC

A proteína produzida foi estocada por 60 dias em temperatura de 4ºC. Os dados constantes na Figura 33 evidenciam que a enzima não perde a atividade catalítica no tempo testado, retendo quase toda a atividade máxima durante o período de incubação.

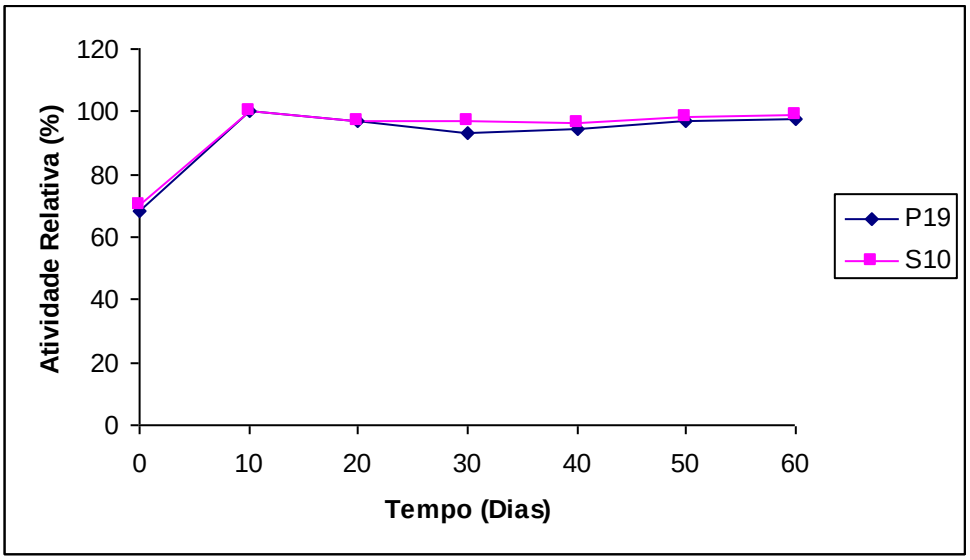

Figura 33. Efeito do tempo de estoque a 4ºC sobre a ação catalítica da glicoamilase P19 e S10.

É observado que a enzima atinge atividade máxima logo que mantida incubada, alcançando valor superior ao encontrado quando o ensaio enzimático foi realizado após o extrato enzimático ser descongelado para ser mantida o 4ºC (0 dia), onde apresentou 70% da atividade máxima relativa.

Os valores obtidos foram bem próximos para os dois extratos brutos onde vemos que após incubação a 4ºC a atividade atingiu o máximo de velocidade ao décimo dia, mantendo quase que a constância deste valor durante todo o tempo de análise que teve em seu término mais de 90% da atividade máxima.

Esta mudança na reação enzimática da glicoamilase nos dá a informação de que no extrato enzimático resultante da centrifugação do meio de cultivo de crescimento da levedura, pode conter algumas moléculas ou íons que acabariam interferindo de alguma forma no processo catalítico. Estes elementos podem interagir com a enzima dificultando sua ação de catálise sobre o substrato, no entanto, seriam mais instáveis em

longo período de incubação após o descongelamento do extrato enzimático e seriam rapidamente degradados deixando melhores condições para a formação do complexo enzima/substrato. Há na literatura, descrição de pequenas moléculas glicídicas que podem atuar como inibidores da glicoamilase (Sauer *et al*., 2000). Por outro lado, o efeito potencializador da ação enzimática poderia ser causado por algum tipo de substância que se estabilizaria em 4ºC e coatuaria na reação enzimática agindo positivamente como efetora no processo. Por fim, visto que a temperatura é fator de forte influencia sobre a cinética da reação enzimática, o aumento da atividade observado na Figura 33 pode ser causado simplesmente pela estabilização da própria estrutura proteica que adquire melhor conformação e consequentemente se tornaria mais funcional sobre o amido.

5.9 - Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE

As proteínas recombinantes secretadas pelos clones P19 e S10 foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS/PAGE).

Na Figura 34 A, temos a glicoamilase produzida pelo clone da levedura de fenótipo Mut^+ induzida com metanol durante 72 horas (Mini-indução em placas *Deep-well*). É observada uma secreção gradual da enzima recombinante no meio de cultura em função do tempo. Ao término do cultivo a banda correspondente à proteína de interesse é mais espessa e visível devido à secreção em alto nível pela hospedeira pela força do promotor *AOX1*. Ainda na Figura 34 A é possível a visualização de duas bandas correspondentes a glicoamilase, uma banda superior maior (seta simples) e outra menor mais abaixo (setas duplas).

Esta diferença nos pesos moleculares das bandas pode sugerir o efeito de processamento diferenciado, como glicosilação ou outras modificações, efetuadas pela levedura durante o amadurecimento protéico. Desta forma a banda superior vista no gel estaria muito glicosilada diferentemente da banda inferior que teria menos resíduos de glicosilação. É descartada a possibilidade de esta segunda banda corresponder à isoforma tipo II da glicoamilase visto que esta variante da enzima possui aproximadamente 54 kDa (Silva Jr *et al*., 1997) e estaria bem abaixo da banda correspondente ao BSA de 69 kDa utilizada no gel como marcador. No entanto, pode corresponder a seguimentos oriundos de proteólise.

Diferentemente do observado para o clone de fenótipo Mut^+, o perfil eletroforético da proteína produzida pela levedura Mut^S apresentou apenas uma banda no gel de poliacrilamida (Figura 34 B, seta simples). Isso demonstra que o clone secretou a enzima com mesmo grau de glicosilação que não levou à diferença de peso molecular dos produtos expressos. Mais uma vez é observada que a expressão ocorre de maneira gradual em função do tempo de aplicação do indutor metanol aplicado a cada 24 horas na concentração de 0,5%.

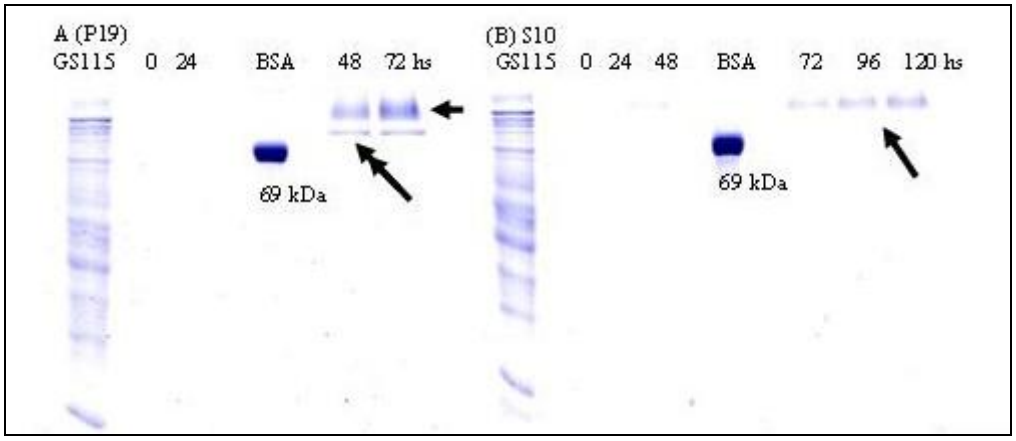

Figura 34. Análise eletroforética da glicoamilase secretada. A) Clone Mut^+: GS115=Levedura *Picha pastoris* GS115 não recombinante; 0, 24, 48 e 72 sobrenadante de cada tempo de indução. B) Clone Mut^S: GS115=Levedura *P. pastoris* sem transformar; 0, 24, 48, 72, 96 e 120 extrato enzimático. BSA= Albumina soro bovina utilizada como referencia de peso molecular (69 kDa).

O perfil da migração eletroforética confirma a eficiência do sistema de expressão na levedura *P. pastoris*. Na revelação dos dois géis, a coluna GS115 corresponde ao sobrenadante da levedura não transformada, e foi utilizada como controle negativo da expressão de glicoamilase recombinante. Para GS115 são vistas várias bandas de proteínas endógenas, o que não se percebe para os clones recombinantes que passam a ter quase que toda a sua maquinaria genética voltada para transcrição do cDNA da glicoamilase sob a ação da força do promotor do gene que codifica a enzima álcool Oxidase (AOX1). Esta característica da levedura *P. pastoris* é de grande importância quando se pretende a expressão em altos níveis de uma proteína ou peptídeos, já que a indução por metanol inibe a secreção de outras proteínas da hospedeira.

Para estimar com maior precisão o peso molecular da glicoamilase recombinante secretada no meio de cultivo as enzimas produzidas em fracos agitados foram analisadas SDS-PAGE. A enzima apresentou um peso molecular de aproximadamente 116 kDa quando secretada pelos dois clones cultivados (Figura 35). O tamanho é superior ao esperado para o produto do cDNA *GLA* que foi expresso em *S. cerevisiae*. Moraes *et al*., (1999) reportam o peso molecular de 99 kDa para a glicoamilase de *A. awamori*, Fierobe *et al*., (1997) caracterizaram a proteína de 94 kDa e a enzima estudada por Heimo *et al*., (1997) apresentou peso molecular de 75 kDa.

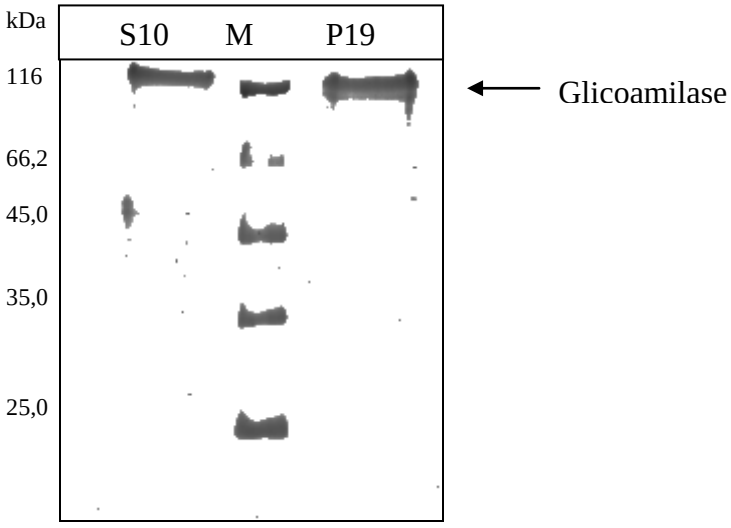

Figura 35. Análise eletroforética da glicoamilase recombinante secretada. P19 proteína produzida pelo clone Mut^{+}; S10 proteína secretada pelo clone Mut^{S}; M= Marcador de peso molecular 116 kDa.

5.10 - Cálculos dos parâmetros cinéticos (*Km e Vmáx*)

Como pode se observar, as análises da glicoamilase secretada pelos recombinantes de *P. pastoris* indicam que as características da proteína P19 são superiores às da S10. Na verificação dos parâmetros cinéticos aparentes *Km* e *Vmáx* da glicoamilase não purificada, foi utilizado apenas o extrato bruto com a enzima secretada pelo clone de fenótipo Mut^{+} (P19).

A ação da enzima foi testada quando incubada com diferentes concentrações do substrato amido. O aumento da concentração do substrato eleva a velocidade de reação, mas somente até um determinado ponto que corresponde ao valor da concentração do amido em que a capacidade catalítica da glicoamilase atinja o máximo (velocidade

máxima), não aumentando mesmo que a concentração do amido seja aumentada. A Figura 36 demonstra essa relação onde a velocidade da atividade amilásica é crescente até certas concentrações de amido.

A concentração de amido para atividade máxima foi 0,15 mg/mL e a partir daí, é observada a saturação da enzima. No gráfico, o valor da concentração do substrato necessária para se alcançar a metade da velocidade máxima (1/2 $V_{máx}$) corresponde a K_m, a constante de Michaelis-Menten (Campbell e Farrell, 2007).

O valor dessa constante (K_m) é muito importante na caracterização da cinética enzimática, pois uma enzima pode ter o mesmo valor de atividade máxima que outras, porém dificilmente terá o mesmo valor de K_m, que indicará que a quantidade necessária de substrato para saturar a enzima é diferente (Vieira, 2003).

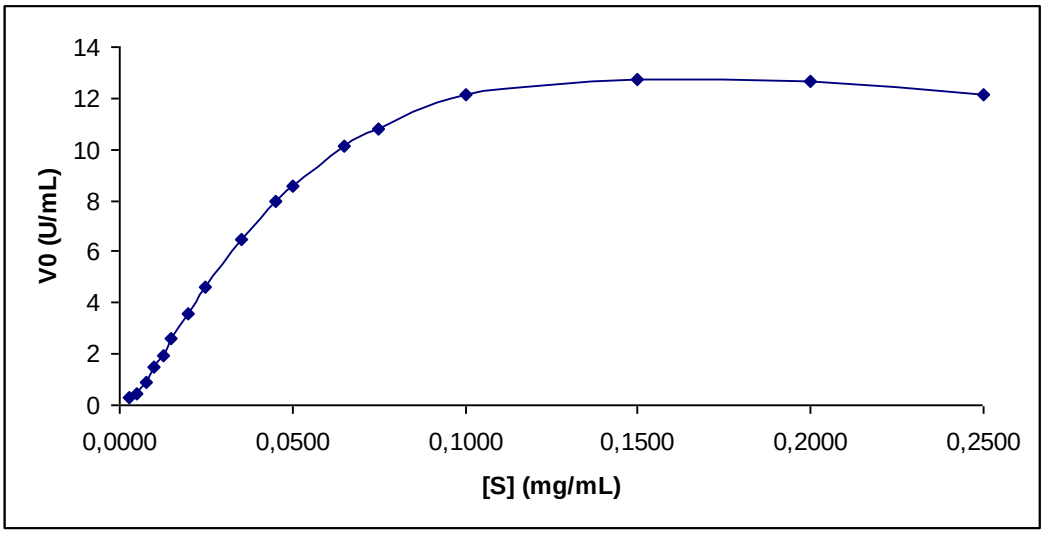

Figura 36. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade glicoamilásica do clone de fenótipo Mut^+.

Melhores observações são visualizadas pela modificação da Figura 36, através do gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk apresentado na Figura 37. Esse tipo de gráfico é resultado da relação dos valores inversos dos eixos velocidade inicial (V_0) e concentração do substrato [S] que terá inclinação $K_m/V_{máx}$ na qual a intercepção será $1/V_{máx}$ no eixo de $1/V_0$ e intercepção de $-1/K_m$ no eixo de 1/[S], permitindo determinar com mais precisão a $V_{máx}$ do que o gráfico onde é plotado simplesmente V_0 em função de [S].

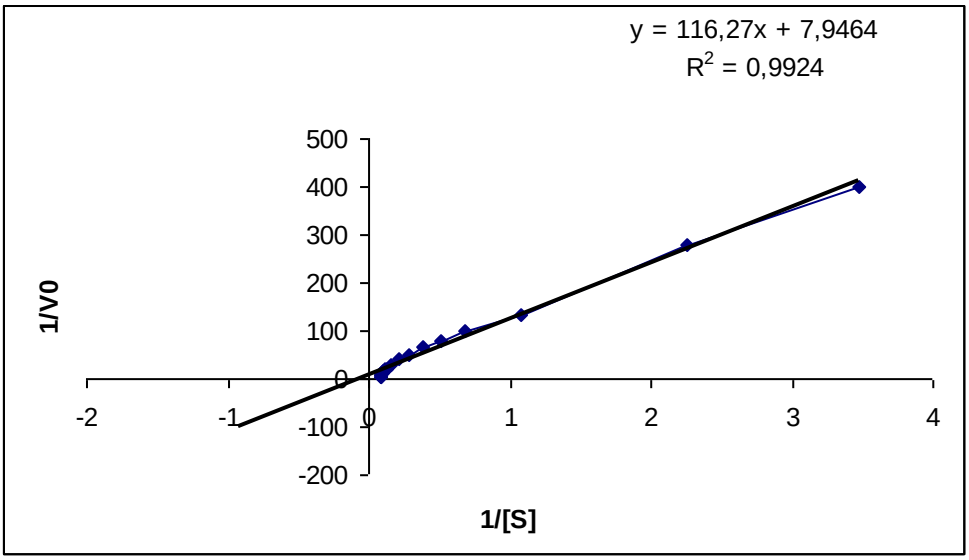

Figura 37. Gráfico dos duplos recíprocos obtido pela cinética enzimática da glicoamilase do clone Mut$^+$.

O sobrenadante avaliado apresentou K_m aparente no valor de 14, 6 mg/mL e $V_{máx}$=0,13 U/mL. Fierobe *et al*., (1998) apresentam valores de K_m para a glicoamilase isolada de *A. awamori* que variam de 15 a 38 quando os substratos eram isomaltooligossacarideos e valores entre 3 a 150 quando a hidrólise usava alguns outros sacarídeos como substrato, os autores não avaliaram o efeito da concentração do amido no estudo. O tipo de substrato é fator importante na determinação da constante K_m e da $V_{máx}$ reação. Outros trabalhos fazem a caracterização dos parâmetros cinéticos de glicoamilase, no entanto não utilizam amido como substrato (Sauer *et al*., 2000) ou não determinam as unidades de atividade enzimática utilizada neste trabalho, isso impossibilita a comparação dos parâmetros cinéticos obtidos com os dados constantes na literatura.

Müller (2008) caracterizando alfa-amilase de *Bacillus subtilis* produzida em *P. pastoris* observou menores valores de K_m para enzima quando presente no sobrenadante bruto que após a enzima ter sido purifica. Indicando que o extrato enzimático bruto pode ser empregado eficientemente em alguns processos industriais que fazem uso de hidrólise enzimática e não requerem necessariamente produtos purificados.

6- Conclusões

- O fragmento codificante da glicoamilase foi isolado e clonado eficientemente nos vetores de clonagem e expressão;

- A construção do vetor de expressão pPG a partir do pPIC9 permitiu a construção de clones recombinantes de *P. pastoris* capazes de expressar e secretar glicoamilase ativa;

- A enzima produzida por clones de fenótipo Mut^{+} teve poder catalítico superior a enzima secreta por *P. pastoris* Mut^{S}.

- O peso molecular do produto secretado (116 kDa) mostrou-se superior ao esperado (99 kDa).

- Observou-se maior atividade e estabilidade da proteína em *pHs* mais ácidos que alcalinos, o *pH* de atividade ótima foi 3,5.

- A glicoamilase recombinante apresentou considerável estabilidade em sua temperatura ótima.

- A enzima se fez estável por longos períodos quando mantida a 4ºC.

7 - Referências Bibliográficas

ABAM, 2006. Álcool de mandioca atrai investimentos. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, 13 (www.abam.com.br). Acesso: 26/19/2008.

Aguero, J.M.Z. 1998. *Estudo da Inativação da Glicoamilase e da Influência de Fosfatos na Produção da Enzima em Cultivos de Aspergillus awamori.* Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 123pp.

Aiyer, P. V. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 4:1525-1529.

Aleshin, A. Golubev, A.; Firsov, L. M.; Honzatko, R. B. 1992. Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.2-A Resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 267:19291-19298.

Aleshin, A. E.; Stoffer, B.; Firsov, L. M.; Svesson, B.; Honzatko, R. B. 1996. Crystallographic complexes of glucoamylase with maltooligosaccharide analogs: Relationship of stereochemical distortions at the nonreducing end to the catalytic mechanism. *Biochemistry*, 35:8319-8328.

Almeida, J. R. M., Moraes, L. M. P., Torres, F. A. G. 2005. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGKI) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 22:725-737.

Arnau, C., Ramon, R., Casas, C., Valero, F. 2010. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and Microbial Technology*, doi:10.1016/j.enzmictec.2010.01.005.

Astolfi Filho, S.; Galembeck, E.; Faria, J. B.; Frascino, A. C. S. 1986. Stable yeast transformants that secrete funcional α-amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Bio/Biotchnology*, 4: 311-315.

Astolfi Filho, S.; Azevedo, M. O.; Pereira, J. O.; Xavier, M. A. S. 2005. *Noções Básicas de tecnologia do DNA recombinante***.** Ed. EDUA, Manaus, Amazonas. 61pp.

Astolfi Filho, S.; Lima, B. D.; Thiemann, J. E.; Souza, H. R. T.; Vilela, L. U. S. 2000. Vector for expression of heterologous protein and methods for extracting recombinant protein and for purifying isolated recombinant insulin. Patent No 6,068,993.

Ayed, A.; Rabhi, I.; Dallagi, K.; Kallel, H. 2008. High level production and purification of human interferon alfa2b in high cell density culture of *Pichia pastoris. Enzyme and Microbial Technology,* 42:173-180.

Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Corrent Opinion in Biotechnology*, 10: 411-421.

Bahar, T.; Çelebi, S. S. 1998. Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles. *Enzyme and Microbial Technology*, 23:301-304.

Bertoldo C.; Antranikian G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria**.** *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:151–160.

Boettner, M.; Steffens, C.; Mering, C. V. 2007. Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in yeast *Pichia pastoris* – A comparative view on 79 human genes. *Journal of Biotechnology,* 130:1-10.

Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. 2008. *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e mercado*. Interciência. Rio de Janeiro, Brasil. 305pp.

Bon, E. P. S.; Webb, C. 1993. Glucoamylase production and nitrogen nutrition in *Aspergillus awamori*. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 39:349-369.

Bott, R.; Saldajeno, M.; Cuevas, W.; Ward, D.; Scheffers, Aehle, W.; Karkehabadi, S.; Sandgren, M.; Hansson, H. 2008. Three-dimensional structure of an intact glycoside

hydrolase family 15 glucoamylase from *Hypocrea jecorina. Biochemistry,* 47:5746-5754.

Brethauer, S.; Wyman, C. E. 2009. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology,* doi:10.1016/j.biortech.2009. 11. 009.

Campbell, M. K.; Farrell, S. O. 2007. *Bioquímica*.Thomson, [S. l.]. 265pp.

Cardona, F.; Goti, A.; Brandi, A.; Scarselli, M.; Niccolai, N.; Mangani, S. 1997. Molecular dynamics simulations on the complexes of glucoamylase II (471) from *Aspergillus awamori* var. X100 with 1-deoxynojirimycin and lentiginosine. *Journal of Molecular Modeling,* 3:249-260.

Carioca, J. O. B; Arora, H. L. 1984. *Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas***.** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 331pp.

Carvalho, G. B. M.; Bento, C.V.; Silva, J. B. A. 2006. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: Primeira parte – As leveduras. *Analytica*, 25:36-42.

Cereda, M. P.; Vilpoux, O. F.; Demiate, I. M. 2003. Amidos modificados. *In*: Cereda, M. P. Vilpoux, O. (*Eds*). *Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. Vol. 3. Fundação Cargill, São Paulo, SP. p. 246-333.

Cereghino, G. P. L.; Cregg, J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris. FEMS Microbiology Reviews,* 24: 45-66.

Cereghino, G. P. L.; Cregg, J.M. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:422-427.

Chen, J.; Zhang, Y. Q.; Zhao, C. Q.; Li, A. N.; Zhou, Q. X.; Li, D. C. 2007. Cloning of a gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris. Journal of Applied Microbiology*, 103:2277-2284.

Costa, J. A. V. 1996. *Estudo da Produção de Amiloglucosidase por Aspergillus Níger NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 203pp.

Costa Neto, P. R.; Rossi, L. F. S.; Zagonel, G. F.; Ramos, L. P. 2000. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, 23: 531-537.

Creeg, J. M.; Barringer, K. J.; Hessler, A. Y. Madden, K. R.; 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3376-3385.

Creeg, J. M.; Madden, K. R.; Barringer, K. J.; Thill, G. P. e Stillman, C. A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia*. . *Molecular and Cellular Biology*, 9: 1316-1323.

Cregg, J. M.; Madden, K. R. 1988. Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol*, 29:33-44.

Cregg, J.M.; Vedvick, T. S.; Raschke, W. C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11:905-910.

Daly, R.; Hearn, M. T. W. 2005. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition***,** 18:119-138.

Daoud, J. C. R.; Georges, E.; Gros.; P. 2001. Functional expression of multidrug resistence 1 in *Pichia pastoris. Biochemistry*, 40:8307-8316.

De Paula, J. N. L. M. 2006. *O uso potencial do inibidor de alfa-amilase de trigo 0.53 no controle de Bruquídeos*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília DF. 87 pp.

Dong, G.; Vieille, C.; Zeikus, J. G. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3577-3584.

Ekino, K.; Hayashi, H.; Moriyama, M. Matsuda, M.; Goto, M.; Yoshino, S.; Furukawa, Kensuke. 2002. Engineering of polyploid *Saccharomyces cerevisiae* for secretion of large amounts of fungal glucoamylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5693-5697.

Fierobe, H-P.; Mirgorodskaya, E.; Frandsen, T. P.; Roepstorff, P.; Svensson B. 1997. Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-tipe mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: comparison with wild-tipe recombinant glucoamylase prudeced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hots. *Protein Expression and Purification*, 9: 159-170.

Fierobe, H-P.; Clarke, A. J.; Tull, D.; Svesson, B. 1998 . Enzymatic properties of the cysteinesulfinic acid derivative of the catalytic-base mutant Gla400-Cys of glucoamylase from Aspergillus awamori. *Biochemistry*, 37:3753-3759.

Filho, W. G. V.; Mendes, B.P. 2003. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. *In*: Cereda, M. P. Vilpoux, O. (*Eds*). *Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. Vol. 3. Fundação Cargill, São Paulo, SP. p. 530 -575.

Flory, N.; Gorman, M.; Coutinho, P. M.; Ford, C.; Reilly, P.J. 1994. Thermosensitive mutants of *Aspergillus awamori* glucoamylase by random mutagenesis: inactivation kinetics and structural interpretation. *Protein Eng.*, 7, 1005-1012.

Fukusumi, S., Kamizono, A., Horinouchi, S & Beppu, T. 1988. Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable amylase gene from na anaerobic thermophile, *Dctyoglomus themophihm*. *European Journal Biochemistry*, 174: 15-21.

Garnero, M. 1980. Energia: o futuro é hoje, São Paulo, ANFAVEA,

Gillissen, G. 2000. Heterologous protein prodution in methylotrophic in yeasts. *Apllied Microbiology and Biotechnology*, 54:741-750.

Gomes, E.; Souza, R. S.; Grandi, R. P.; Silva, R. 2005. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 78-82.

Gomes, E.; Guez, M. A. U.; Martin, N.; Silva, R. 2007. Enzimas termoestáveis, fontes produção e aplicação. *Química Nova*, 30: 136- 145.

Gonçalves, M. F. V. 2007. *Tratamento térmico dos amidos de batata-doce (Ipomoea batatas L.) e de mandioquinha-salsa (Arracaccia xanthorrhiza.) sob baixa umidade em microondas*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 91pp.

Goto, M.; Noriko, S.; Oka, T.; Sameshima, Y.; Ekino, K.; Furukawa, K. 2004. Thr/Ser-rich domain of *Aspergillus* Glucoamylase is essential for secretion. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 68:961-963.

Guo, M.; Hang, H.; Zhu, T.; Zhuang, J. C.; Zhang, S. 2008. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzime and Microbial Technology*, 42: 34-345.

Hamilton, S. R.; Bobrowicz, P.; Bobrowicz, B.; Davidson, R. C.; Li, H.; Mitchell, T.; Nett, J. H.; Rausch, S.; Stadheim, T. A. Wischnewski, H.; Wildt, S.; Gerngross, T. U. 2003. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*, 301:1244-1246.

Hanning, G.; Makrides, S. C. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 16: 54-60.

Harris, E. M. S.; Aleshin, A. E.; Firsov, S. L. M.; Honzatko'J, R. B. 1993. Refined structure for the complex of 1 – deoxynojirimycin with glucoamylase form *Aspergillus awamori* var. X 100 to 2.4-A resolution. *Biochemistry*, 32:1618-1626.

Heimo, H.; Palmu, K.; Suominen, I. 1997. Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. *Protein Expression and Purification,* 10:70-79.

Higgins, D. R.; Cregg, J. M. 1998. Pichia protocols: Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods in Molecular Biology,* 103:1-15.

Inan, M.; Meagher, M. M. 2001. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris. Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92:337-341.

Invitrogen. 2004. TOPO TA Cloning kit for sequencing. [S. l.]. User Manual.

Invitrogen. 2006. *Pichia* Expression Kit: A Manual of methods for expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. [S.l]. User Manual.

Jiang, Z., Gao, B., Ren, R., Tao, X., Ma, Y., Wei, D. 2008. Efficient display of active lipase LipB52 with a *Pichia pastoris* cell surface display system and comparison with the LipB52 display on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. *BMC Biotechnology,* 8: 1-7.

Kim, D. H.; Kim, Y. T.; Cho, J. J.; Bae, J. H.; Hur, S. B.; Hwang, I.; Choi, T. J. 2002. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea. Marine Biotechnology*, 4: 63-73.

Kostova, D. D.; Petrova, V. Y.; Kujumdzieva, A. V. 2008. Over-expression of DAAO and catalase in *Kluyveromyces marxianus* through media optimization, permeabilization and GA stabilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 42:113-120.

Krishna, S. H.; Prasanthi, K.; Chowdary, G. V.; Ayyanna, C. 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochemistry,* 33:825-830.

Laderman, K. A.; Davis, B. R.; Krutzsch, H. C.; Lewis, M. S.; Griko, Y. V.; Privalov, P. L.; Anfinsen, C. B. 1993. The purification and characterization of an extremely thermostable α-amylase from the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus. The Journal of Biological Chemistry*, 268: 24394-24401.

Lee, C. H.; Choi, D. K.; Choi, H. J. ; Song, M, Y. ; Kim, Y. S. 2009. Expression of soluble and functional human neonatal Fc receptor in *Pichia pastoris. Protein Expression and Purification,* doi:10.1016/j.pep.2009.12.004.

Lee, G. S.; Koh, H. Y.; Han, S. J.; Park, H.; Na, D. C.; Kim, II-C.; Lee, H. K.; Yim. J. H. 2010. Expression of recombinante endochitinase from the antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. *Protein Expression and Purification,* doi:10.1016/j.pep.2010.01.017.

Lehninger, A. L. 2006. *Principles of biochemistry*. University of Wisconsin-Madison, [S.l.]. 248pp.

Lemos, C. M. Y.; Fuchs, E.; Gomes, E.; Silva, R. 2003. Glicoamilase: estrutura e termoestabilização. *Biotech. Ciên. & Desenvolv.,* 31: 86-94.

Leonel, M,; Cereda, M. P. 2002. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 22: 65-69.

Leonel, M.; Cabello, C. 2000. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca: Glicose e álcool. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 19: 280-291.

Liu, S. H.; Chou, W. I.; Sheu, C. C.; Chang, M. D. – T. 2005. Improved secretory production of glucoamylase in *Pichia pastoris* by combination of genetic manipulations. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 326:817-824.

López-García, B.; Moreno, A. B.; Segundo, B. S.; Ríos, V. D.; Manning, J. M. Gavilanes, J. G.; Martínez-del-Pozo, A. 2009 Production of the biotechnologically relevante APF from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expession and Purification*. doi:10.1016/j.pep.2009.11.002

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., Randall, J.R.. 1951. Protein measurements with the folin reagent. *J. Biol. Chem*, 193: 265–275.

Mack, M.; Wannemacher, M.; Hobl, B.; Pietschmann, P.; Hock, B. 2009. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. *Protein Expression and Purification*, 66:165-171.

Marcoccia, R. 2007. *A participação do etanol brasileiro em uma nova perspectiva na matriz energética mundial*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 95pp.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent determination of reducing sugar. *Ana. Chemistry,* 31:420-428.

Montesinos, T.; Navarro, J. M. 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae. Enzyme and Microbial Technology*, 27:362-370.

Moraes, L. M. P., Astolfi Filho, S.; Oliver, S. G. 1995. Development of yeast strain for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that Express alfa-amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 43: 1067-1076.

Moraes, L. M. P., Astolfi Filho, S.; Ulhoa, C. J. 1999. Purification and some properties of an amylase glucoamylase fusion protein form *Saccharomyces cerevisiae. World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15: 561-564.

Moraes, L. M. P. 2004. Amilases *In*: Said, S.; Pietro, R, C, L. R. *(E.d)*. *Enzimas como agentes biotecnológicos.* Legis Summa: Ribeirão Preto, São Paulo. p. 223-242.

Müller, G. 2008. *Clonagem e expressão do gene da alfa-amilase de Bacillus subtilis variedade D2 na levedura Pichia pastoris.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 108pp.

Nascimento, H. J.; Soares, V. F.; Bon, E. P. S.; Silva Jr, J. G. 1998. Extracellular proteolytic processing of *Aspergillus awamori* GAI into GAII is supported by physico-chemical evidence. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 71/72:641-651.

Nakano, A.; Lee, C. Y.; Yoshida, A.; Matsumoto, T.; Shiomi, N.; Katoh, S. 2006. Effects of methanol feeding methods on chimeric alpha-amylase expression in continuous culture of *Pichia pastoris. Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101:227-231.

Nikolié, S.; Mojovié, L.; Rakin, M.; Pejin, D.; Pejin, J. 2010. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.02.063.

Norouzian, D.; Akbarzadeh, A.; Scharer, J. M.; Moo-Young, M. 2006. Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*, 24:80-85.

Nunberg, J. H.; Meade, J. H.; Cole, G.; Lawyer, F. C.; Mc Cabe, P.; Schweickart, V.; Tal, R.; Wittnan, V. P.; Flatgard, J. E.; Innis, M. A. 1984. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori. Molecular and Cellular Biology,* 4: 2306-2315.

Oledzka, G.; Dabrowski, S.; Kur, J. 2003. High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 29:223-229.

Oliveira, T. S. 2009. *Clonagem e expressão do gene que codifica alfa-amilase de Bacillus licheniformis em Bacillus subtilis.* Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 91pp.

Palma, M.B. 2003. *Produção de xilanases por Thermoascus aurantiacus em cultivo em estado sólido*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 113pp.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Soccol, S. V. T.; Singh, D.; Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 31:135-152.

Pelczar, M. J.; Reid, R.; Cham, E. C. S. 1981. *Microbiologia*. McGraw-Hill, Brasil. 466pp.

Pavezzi, F. C.; Gomes, E.; Silva, R. 2008. Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:108-114.

Pimenta, A. L., Rosato, Y. B e Astolfi-Filho, S. 1991. Expression of a subcloned alfa-amylase gene under the control of a *Xanthomonas campestris* promoter. *Microbiology letters*, 90: 11-18 1991.

Pimentel, B. M. S. 2008. *Humanização e expressão de fragmentos de anticorpos anti-PLA_2 de Bothrops atrox.* Dissertação de mestrado, Universidade Brasília, Brasília, DF. 117PP.

Púglia, Á. L. 2006. *Desempenho de leveduras selvagens com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativo* Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista,Botucatu, São Paulo. 42pp.

Raid, D. E. 2007. *Evolução dirigida da alfa-amilase de Bacillus subtilis.* Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 71pp.

Rodrigo, A. S. 2004. *Estudi del metabolisme central del carboni de Pichia pastoris*. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcellona, Barcelona, Espanha. 324pp.

Romanos, M. A.; Scorer, C. A. ; Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8:423-488.

Sachs, I. 2005. Os biocombustíveis estão chagando à maturidade. *Democracia viva*, 29: 26-31.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659pp.

Santos, M. A. 2007. *Inserção do biodiesel na matriz energética brasileira: Aspectos técnicos e ambientais relacionados ao seu uso em motores combustíveis*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 118pp.

Sato, R.; Matsumoto, T.; Hidaka, N.; Imai, Y.; Abe, K.; Takahashi, S.; Yamada R. H.; Kera, Y. 2009. Cloning and expression of carp acetylcholinesterase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinante enzyme. *Protein Expression and Purification,* 65:205-212.

Sauer, J.; Sigurskjold, B. W.; Christensen, U.; Frandsen, T. P. Mirgorodskaya, E.; Harrison, M.; Roepstori, P.; Svesson, B. 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysical Acta,* 1543:275-293.

Savchenko, A.; Vielle, C.; Kang, S.; Zeikus, J. G. 2002. *Pyrococcus furiosus* alfa-amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry*, 41: 6193-6201.

Schenberg, A. C. G.; Vicente, E, J.; Astolfi Filho, S. 1993. Expression of heterologous amylases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência e Cultura*, 54:181-191.

Silva, G. 2006. *Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais na produção de glicoamilase.* Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina. 95pp.

Silva, R. N.; Asquieri, E. R.; Fernandes, K. F. 2005. Imobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. *Process Biochemistry*, 40: 1155-1159.

Silva Jr, J. G. Nascimento, H. J.; Soares, V. F.; Bon, E. P. S.; 1997. Glucoamylase isoenzymes tailoring through medium composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63/65:87-95.

Siqueira, S. J. L. 2006. *Clonagem do cDNA da endoglicanase2 de Himicola grisea var. thermoidea e sua expressão em Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 89pp.

Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S.; Medeiros, A. B.; Karp, S. G.; Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarelo, A. P.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A.; Bon, E. P. S.; Moraes, L. M. P.; Araújo, J. A.; Torres, F. A. G. 2009. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, doi:10.1016/j.biortech.2009.11.067.

Sreekrishna, K.; Brankamp, R. G.; Kropp, K. E.; Blankenship, D. T.; Tsay, J. T.; Smith, P. L.; Wierschke, J. D.; Subramaniam, A.; Birkenberger, L. A. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris. Gene*, 190:55-62.

Sumerly, R.; Avarez, H.; Cereda, M. P.; Vilpoux, O. F. 2003. Hidrólise do amido *In*: Cereda, M. P. Vilpoux, O. (*Eds*). *Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. Vol. 3. Fundação Cargill, São Paulo, SP. p. 377-448.

Sunga, A. J.; Tolstorukov, I.; Cregg, J. M. 2008. Posttransformation vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*., 8: 870-876.

Teng, D.; Fan, Y.; Yang, Y.; Tian, Z.; Luo,J.; Wang, J. 2007. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1,4 – glucanase gene and its expression in *Picha pastoris*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 74: 1074 – 1083.

Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology Biotechnology*, 72: 211-222.

Thorsen, T. S.; Johnsen, A. H. Josefsen, K. Jensen, B. 2006. Identification and characterization of gluamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus. Biochimica et Biophysica Acta*, 1764:671-676.

Ting-Ting, Y.; Yan-Min, W., Jian-Long, G.; Zheng-Xiang, W. 2006. Overproduction of glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger* harboring multiple copies of *glaA*. *Chinese Journal of Biotechnology,* 22:567-571.

Torres, F. A. G.; Moraes, L. M. P. 2001. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento,* 20-22. Disponível em: <www.biotecnologia.com.br>

Tsai, C. T.; Huang, C-T. 2008. Overexpression of the *Neocallimastix frontalis* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica. Enzyme and Microbial Technology*, 42:459-465.

Tuite, M. F.; Clare, J. J.; Romanos, M. A. 1999. Expressing cloned genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris. In*: HIGGINS, S. J.; HAMES, B. D.

(Eds). *Protein expression – A pratical approach.* University Press, Oxford, United States, New York. p. 61-100.

Uehara, H.; Choi, D. B.; Park, E. Y.; Okabe, M. 2000. Expression of alfa-amylase gene in methylotrophic yeast *Pichia pastoris. Biotechnology Bioprocess Engineering,* 5: 7-12.

Vaz, M. R. F. 2008. *Estudo do cultivo de dois clones de Escherichia coli recombinantes (eIF, LACK) para a expressão de antígenos da Leishmania chagasi*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte. 79pp.

Vieille, C.; Zeikus, G. J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology reviews,* 65:1-43.

Vieira, R. 2003. Fundamentos de bioquímica. Universidade Federal do Pará, [S. l]. 147pp.

Whittaker, M. M.; Whittaker, J. W. 2000. Expression of recombinante galactose oxidase by *Pichia pastoris. Protein Expression and Purification*, 20:105-111.

Wysocka-kapcinska, M.; Sandoval, J. A. C.; Pal, A.; Findlay, J. B. C. 2010. Expression and characterization of recombinant human retinol-binding protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification,* doi:10.1016/j.pep.2010.01.015.

Yang, L.; Dai, X.; Hou, J.; Ma, C.; Wang, C.; Wu, Z.; Li, M. 2008. Construction of Rhizopus arrhizus glucoamylase gene suitable for expression in distinct host: introns spliced artificially by PCR. *Mol. Biol. Rep.*, 35: 9-15.

Yang, S.; Huang, H.; Zhang, R.; Huang, X.; Li, S.; Yuan, Z. 2001. Expressão and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis. Protein Expression and Purification,* 21: 60-64.

Yang, S. J.; Min, B. C.; Kim, Y. W.; Jang, S. M.; Lee, B. H. Park, K. H. 2007. Changes in the catalytic properties of *Pyrococcus furiosus* termoestable amylase by mutagenesis of the substrate binding site. *Apllied and Environmental Microbiology*, 73: 5607-5612.

Zanin, G. M. 1989. *Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglucosidase imobilizada*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 187pp.

Zhang, J.; Pan, J.; Guan, G.; Li, Y.; Xue, W.; Tang, G. 2008. Expression and high-yield production of extremely hermostable bacterial xylanaseB in *Aspergilus niger*. *Enzyme Microbial Technology*, 43:513-516.

8 - APÊNDICE A - MEIOS DE CULTIVO

8.A.1 - MEIOS DE CULTIVO BACTERIANO

Meio LB (Luria Bertani): cultivo da cepa de *E. coli* TOP 10.

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ágar	15 g/L

Meio SOB: transformação bacteriana por eletroporação.

Bacto-triptona	2,0 %
Extrato de levedura	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Meio SOC: transformação bacteriana por eletroporação.

Estoque de Mg	1 mL
Estoque de glicose	1 mL
Meio SOB	98 mL

Os meios foram autoclavados a 120°C por 15 minutos. A seguir adicionava-se o agente antimicrobiano apropriado: ampicilina, na concentração final de 100 μg/mL, quando necessário.

8.A.2 - MEIOS DE CULTIVO DE LEVEDURAS *P. PASTORIS*

Meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*): manutenção da linhagem *P. pastoris* GS115.

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	2 %
Ágar	20 g/L

Este meio foi esterilizado por autoclavagem e as soluções de glicose previamente filtrada e ampicilina na concentração de 100 μg/mL foram adicionadas posteriormente.

MD (*Minimal Dextrose Medium*) - meio mínimo com glicose e sem histidina para seleção de células transformantes de *P. pastoris.*

YNB	1,34 %
Biotina	4×10^{-5} %
Glicose	2 %
Ágar	20 g/L

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e adicionados 100 μg/mL de ampicilina.

MM (*Minimal Methanol Medium)* - meio mínimo com metanol sem histidina para seleção de clones com fenótipos Mut^{s}.

YNB	1,34 %
Biotina	4×10^{-5} %
Metanol	0,5 %
Ágar	20 g/L

A mistura foi completada para o volume final com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e recebeu ampicilina na concentração 100 μg/mL.

BMGY-U (*Buffered Glycerol Complex Medium*) - meio complexo tamponado, com glicerol para o aumento de massa celular de *P. pastoris.*

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0	10 mM
YNB	1,34 %
Biotina	4×10^{-5} %
Glicerol	1 %

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100 μg/mL de ampicilina.

BMMY-U (*Buffered Methanol Complex Medium)* - meio complexo tamponado, com metanol para indução da expressão da proteína heteróloga

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0	10 mM
YNB	1,34 %
Biotina	4×10^{-5} %
Metanol	0,5 %

A mistura foi completada com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100 μg/mL de ampicilina.

As soluções utilizadas na preparação de meios de culturas e todas outras suspensões ou soluções utilizadas ao longo dos experimentos foram esterilizadas por autoclavagem ou filtração.

8.A.3 - SOLUÇÕES ESTOQUES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTIVO PARA *P. PASTORIS*

10X YNB

Yeast Nitrogen Base	3,4 %
Sulfato de amônio	10 %

Dissolver 3,4 g de YNB em 90 mL de água destilada. Adicionar 10 g de $(NH_4)_2SO_4$ e esperar dissolver. Esterilizar por filtração. A solução foi estocada a 4 °C.

500X Biotina (0,02 %)

Para o preparo desta solução, 20 mg de biotina foi dissolvida em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

100X Histidina (0,4 %)

A solução foi preparada utilizando 400 mg de L-histidina foram dissolvidas em 100 mL de água destilada. Esta solução pode ser aquecida até 50°C para facilitar a dissolução. Em seguida foi esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

10X Glicerol (10 %)

Glicerol no volume de 5 mL de glicerol foi misturado a 900 mL de água e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.

10X Glicose (20%)

Vinte gramas (20 g) de glicose foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Tampão fosfato 1M, pH 6,0 (100mL)

A quantidade de 13,2 de K_2HPO_4 foram combinados com 86,8 mL de KH_2PO_4. O *pH* deve ser confirmado e ajustado, se necessário. Foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.