

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

Clonagem e expressão heteróloga do gene codificante da α -Amilase de *Bacillus licheniformis*
DSM13 em *Pichia pastoris*

HELBER ABELLINI ASTOLPHO

Manaus-Amazonas
Março/2012

HELBER ABELLINI ASTOLPHO

Clonagem e expressão heteróloga do gene codificante da α -Amilase de *Bacillus licheniformis*
DSM13 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/2012

A Instrução que você segue,
Determina o futuro que você cria.

Mike Murdock

Dedico:

Aos meus pais, Ronaldo Astolpho e Arlete M. Abellini Astolpho, que sempre me amaram, incentivaram e me apoiaram incondicionalmente. A minha querida irmã Rebeca e ao meu eterno avô Alberto Abellini (In memorian). Vocês são minha grande referência de vida. Amo muito vocês!

Agradecimento Institucional

Agradeço a PETROBRÁS pelo financiamento deste trabalho, 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 e ao Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas por toda estrutura física e suporte técnico laboratorial.

Agradecimentos

A Deus que me sustenta e fortalece e me ensina a contar meus dias para que meu coração alcance sabedoria. Meu amigo fiel, a ele minha eterna gratidão.

Aos meus pais Ronaldo e Arlete que com muita dedicação e amor me incentivaram e apoiaram em todos os momentos desde a minha chegada a Manaus para a realização deste trabalho. Muito obrigado pela oportunidade que vocês me propiciaram, tendo que superar a distância e muita, mas muita saudades e pelas inúmeras palavras de apoio e carinho que recebi durante toda a minha vida. Palavras me faltam para expressar a gratidão e o amor que tenho por vocês.

A minha irmã Rebeca, tão importante em minha vida. Obrigado por sua amizade, pelos conselhos e palavras que me fizeram vencer muitas dificuldades, obrigado por tantas alegrias proporcionadas, te amo muito.

Ao meu orientador e mentor, o Professor Dr. Spartaco Astolfi Filho pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas ideias e valiosas sugestões e pela confiança depositada. Sua sabedoria e amor pela ciência me contagia para avançar e conquistar.

Ao mestre Edson Júnior do Carmo, pelos inúmeros ensinamentos, dicas de bancada, pela paciência e incentivo. Valew negão por sua amizade e por toda ajuda oferecida nesses momentos do mestrado.

Aos professores Dr. Edmar Vaz de Andrade, Dr. Carlos Gustavo Nunes e Dra. Leonor Alves de Oliveira, muito obrigado pelos ensinamentos e pelos momentos de auxílio com os experimentos no laboratório, a ajuda de vocês foi essencial para a conclusão desta dissertação.

Ao grupo de Biotecnologia da UFAM e ao pessoal do laboratório de Tecnologia de DNA e Proteoma, pessoas que foram extremamente importantes neste período. Enedina Nogueira, Tiago Oliveira, Rogério Neves, Andrézão, Lanna Lôbo, Anita, Mirna, Luciana, Elza, Bruna Protti, Jonathan, Hugo Valério, Henrique Bello, Elson Sadalla, Rafael, Andrea Listik, Erika Izumi, Dona Regina. Obrigado pela ajuda, auxílio e boa convivência no laboratório e pela amizade de cada um de vocês.

Aos grandes amigos Daniel, Pedro e Hugo, que muito me ajudaram e proporcionaram muitos momentos de alegrias, risadas e festas. Estivemos próximos em muitos momentos, nos quais eu recebi amizade, força, companheirismo e incentivo.

À galera do mestrado 2010 do curso de genética do INPA (Renato, Pedro, Daniel, Fábio, Olavo, Gisele Torres, Giselle Moura, Paola, Tati, Eliane e Suélen). Galera, obrigado pelo apoio e amizade compartilhada. Em especial quero agradecer ao amigo Olavo que me

recebeu em sua casa no início de tudo, tornando muito mais fácil minha estadia em Manaus e a amiga Suélen pelas inúmeras ajudas prestadas com os experimentos.

Ao grande amigo que considero como meu irmão Vitor Hugo Beloti (Vitão), que mesmo na grande distância sempre me incentivou, apoiou e ofereceu uma amizade verdadeira.

A toda minha família, em especial ao meu querido vô Demélio, vó Ana e vó Irma e aos muitos colegas de Mococa e Araraquara. Obrigado pelas orações e palavras de ânimo quando foi preciso.

Resumo

A manipulação genética de micro-organismos permite a produção de enzimas com alto valor biotecnológico com aplicação em vários processos industriais. A enzima α -amilase de *Bacillus licheniformis* é amplamente utilizada nas indústrias de álcool, açúcar, cerveja e panificação para a hidrólise do amido inicial, clivando as ligações glicosídicas α -(1,4). Um sistema de expressão de proteínas heterólogas que tem sido utilizado com sucesso é o sistema da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar o gene que codifica a α -amilase de *B. licheniformis* DSM13 na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* e após analisar a proteína recombinante secretada. O gene foi inserido no genoma de *P. pastoris* utilizando o vetor pPIC9 sendo então produzida e secretada pela levedura. A atividade enzimática máxima foi observada no sobrenadante do clone B8 (345,4 U/mL). Houve variação quanto ao peso molecular da enzima entre os clones analisados por gel SDS-PAGE. A enzima apresentou temperatura ótima de atividade de 70°C, considerável estabilidade na presença de cálcio, pH ótimo de 7,0 e também manteve-se estável por um período de dois meses quando incubada a 4 °C. Os valores de K_m e $V_{máx}$ aparentes calculado para o extrato bruto do clone A7 foram de 10,74 mg/mL e 416,66 U/mL respectivamente.

Palavras-chave: Expressão heteróloga; Enzima recombinante; *Pichia pastoris*; caracterização enzimática; etanol.

Abstract

Genetic manipulation of microorganisms allows the production of enzymes with high biotechnological value with application in various industrial processes. The enzyme α -amylase from *Bacillus licheniformis* is widely used in industries to produce alcohol, sugar and beer, and its activity involves hydrolysis of starch cleaving the glycosidic bonds α -(1,4). The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been used successfully for heterologous protein expression, becoming an efficient expression system. The objective of this study was to clone and to express the gene encoding α -amylase from *Bacillus licheniformis* DSM13 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and also to analyze the recombinant protein secreted. The gene was inserted into the genome of *P. Pastoris* using the pPIC9 vector and after the induction process the protein was produced and secreted by the yeast. The maximum enzyme activity was observed in the supernatant of the clone B8 (345,4 U/mL). Variations in molecular weight of the enzymes among the clones were detected by SDS-PAGE gel analysis. The enzyme showed optimum activity at 70 °C, pH optimum of 7.0 and its activity remained stable for a period of two months when maintained at 4 °C. The K_m and $V_{m\acute{a}x}$ apparent values calculated for the crude extract clone A7 were 10.74 mg/mL and 416.66 U/mL, respectively.

Keywords: heterologous expression; recombinant enzyme; *Pichia pastoris*; enzyme characterization; ethanol.

Sumário

1 - Introdução.....	1
1.1 - Tecnologia do DNA recombinante.....	1
1.2 - Enzimas de origem microbiana no contexto biotecnológico.....	2
1.3 - Processamento do amido	3
1.3.1 - O amido e suas estruturas	3
1.3.2 - Enzimas envolvidas na hidrólise do amido	5
1.3.4 - Hidrólise do amido	6
1.4 - Produção de biocombustível a partir do amido de mandioca.....	8
1.5 - α -amilase de <i>Bacillus licheniformis</i>	9
1.6 - Expressão de proteínas heterólogas em <i>Pichia pastoris</i>	11
1.6.1 – Fenótipos da levedura e sistema de integração no genoma	13
2 - Justificativa	15
3 - Objetivos	17
3.1 - Objetivo Geral	17
3.2 - Objetivos específicos.....	17
4 - Material e Métodos.....	18
4.1 - Fluxograma das atividades desenvolvidas.....	18
4.2 - Linhagens de micro-organismos utilizados	19
4.3 - Meios de cultivo utilizados.....	19
4.4 - Estratégias de clonagem	19
4.4.1 - Obtenção do gene da α -amilase de <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13.	19
4.4.2 - Isolamento do gene da α -amilase no vetor pGEM-Tamy.....	20
4.4.3 - Clonagem do gene no vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	21
4.4.4 - Confirmação da construção do vetor de clonagem TOPO- <i>amy</i> por análise de restrição e PCR	23
4.5 - Construção do vetor de expressão pPIC- <i>amy</i>	24
4.5.1 - Vetor de expressão pPIC9	24
4.5.2 - Digestão dos vetores TOPO- <i>amy</i> e pPIC9	24
4.5.3 - Subclonagem do gene da α -amilase no vetor de expressão pPIC9	25
4.6 - Transformação de <i>E. coli</i> DH10B por eletroporação	26
4.6.1 - Preparo de células <i>E. coli</i> eletrocompetentes	26
4.6.2 - Transformação das células DH10B eletrocompetentes	26
4.7 - Confirmação da construção do cassete de expressão pPIC- <i>amy</i>	27
4.7.1 - PCR para verificação da presença do inserto no vetor de expressão.....	27
4.7.2 - Análise de restrição	27
4.8 - Quantificação e Linearização do vetor de expressão pPIC- <i>amy</i>	27
4.9 - Transformação da levedura <i>Pichia pastoris</i> GS115 por eletroporação.....	28
4.9.1 - Preparo de células (leveduras) eletrocompetentes.....	28
4.9.2 - Eletroporação da hospedeira <i>P. pastoris</i> GS115	28
4.9.3 - Integração do cassete de expressão no genoma da levedura	29
4.10 - Seleção dos clones produtores da α -amilase de <i>B. licheniformis</i> em meio sólido	29
4.11 - Produção de α -amilase de <i>Bacillus licheniformis</i> em meio líquido	30
4.11.1- Cinética de indução enzimática	30

4.11.2 - Indução da produção da α -amilase em meio líquido	30
4.12 - Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE corado pelo método <i>Coomassie Blue G250</i>	31
4.13 - Dosagem da atividade enzimática dos clones produtores da α -amilase	31
4.13.1 - Ensaio enzimático para quantificação da atividade dextrinizante pelo método de FUWA.....	31
4.14 - Caracterização enzimática	32
4.14.1 - Determinação do pH ótimo	32
4.14.2 - Determinação da temperatura ótima.....	32
4.14.3 - Determinação da estabilidade térmica utilizando o íon Ca^{2+}	33
4.14.4 - Estabilidade em relação ao tempo de estocagem da enzima	33
4.15 - Parâmetros cinéticos: Determinação dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a α -amilase recombinante.....	33
5 - Resultados e Discussão	34
5.1 - PCR do gene da α -amilase no vetor pGEM-Tamy e construção do vetor de clonagem TOPO-amy.....	34
5.2 - Análise de restrição e PCR do vetor construído TOPO-amy.....	35
5.3 - Construção do vetor de expressão	37
5.4 - Análise da construção do cassete de expressão pPIC-amy.....	39
5.5 - Linearização do plasmídeo de expressão pPIC-amy e transformação da levedura	40
5.6 - Seleção dos clones produtores da α -amilase de <i>B. licheniformis</i> em meio sólido	42
5.7 - Produção de α -amilase em meio líquido e cinética de indução.....	44
5.7.1 - Relação entre densidade celular e a atividade enzimática	46
5.8 - Análise em gel SDS-PAGE da enzima secretada.....	47
5.9 – Caracterização enzimática	49
5.9.1 – Determinação do pH ótimo da ação catalítica	50
5.9.2 - Efeito da temperatura e termoestabilidade sob a atividade enzimática	51
5.9.3 - Estabilidade da α -amilase a 4°C	54
5.10 - Parâmetros cinéticos da enzima recombinante (K_m e $V_{m\acute{a}x}$).....	55
6 - Conclusões.....	57
7 -Referências bibliográficas.....	58
Apêndice A - Meios de cultivo.....	66

Lista de Figuras

Figura 2. Estrutura da amilopectina. Ramificações unidas por ligações α -(1,6).....	5
Figura 3. Esquema adaptado de Crabb e Mitchinson, 1997. Etapas enzimáticas no processamento de amido suspensos em frutose, mostrando o uso de enzimas, condições e parâmetros de processamento típico. As setas indicam os pontos de ajuste dentro do processo para os componentes de pH e / ou de íons. DE = "dextrose equivalente "; O termo "% Dx "é a porcentagem de dextrose na solução.	7
Figura 4. Estrutura terciária da α -amilase de <i>B. licheniformis</i> . O cálcio e os íons de sódio ligadas à proteína em seu forma nativa são mostrados. Domínio A, mostrado em vermelho, o domínio B é de cor azul e o domínio C na cor verde (Nazmi <i>et al.</i> , 2006).	11
Figura 5. Via metabólica do metanol em <i>P. pastoris</i> . AOD - Álcool oxidase; DAS - Dihidroxicetonasintase; CTA – catalase; FALDH - Formaldeído desidrogenase; FDH - Formato desidrogenase (Adaptado de Cereghino e Cregg, 2000).	13
Figura 6. A figura mostra o resultado de uma inserção do plasmídeo entre as cópias duplicadas dos genes HIS4/his4 (Invitrogen, 2002).	14
Figura 7. Resultado de uma inserção por adição do cassete de expressão no <i>locus</i> correspondente ao promotor AOX1 (Invitrogen, 2002).	14
Figura 8. A figura mostra um evento de substituição de genes no <i>locus</i> AOX1 (Invitrogen, 2002).	15
Figura 9. Vetor de clonagem pCR [®] 2.1-TOPO utilizado para clonagem do gene da α -amilase de <i>B. licheniformis</i> (Invitrogen, 2006).	21
Figura 10. Esquema do processo de ação da enzima topoisomerase I (Invitrogen, 2006).	22
Figura 11. Vetor de expressão pPIC9 (Invitrogen TM) que foi utilizado para expressar e secretar a α -amilase em <i>Pichia pastoris</i> (Invitrogen, 2006).	24
Figura 12. Perfil eletroforético da reação de amplificação do gene da α -amilase via PCR com os <i>primers</i> Ramy e Famy. Amostras 1 e 2 – gene α -amilase amplificado. C- (controle negativo da reação). M - Marcador de massa molecular de 1 Kb (Promega).	34
Figura 13. Análise dos produtos da PCR das amostras 1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 10; 13 e 14 que foram amplificados no vetor TOPO-amy. M - Marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas).	35
Figura 14. Análise do perfil de restrição dos plasmídeos recombinantes com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> das amostras 6, 7 e 13 e vetor de expressão pPIC9 linearizado. M – marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).	36
Figura 15. Perfil eletroforético dos produtos gênicos e do vetor de expressão pPIC9 purificados. M – marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).	37
Figura 16. Perfil eletroforético da ligação do gene ao vetor de expressão. Coluna 1 - sistema sem enzima ligase. Coluna 2 - Sistema contendo a enzima T4 ligase após a ligação. M - Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).	38
Figura 17. Mapa físico do múltiplo sítio de clonagem (MSC) do vetor de expressão pPIC9. Setas demonstram os sítios de restrição para clonagem do gene de interesse.	38
Figura 18. Perfil eletroforético do resultado da PCR dos clones recombinantes contendo o cassete de expressão. As amostras 5 e 6 não apresentaram o <i>amplicon</i> de tamanho esperado. (C-) controle negativo da reação. M = Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).	39

Figura 19. Análise de restrição do cassete de expressão pPIC- <i>amy</i> . Amostras 1 e 2 confirmando a correta construção do vetor com o tamanho das bandas esperadas. M - Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas).	40
Figura 20. Perfil eletroforético dos produtos da digestão com a enzima de restrição <i>Bgl</i> II. M- Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).	41
Figura 21. Fotografia mostrando os transformantes da levedura <i>P. pastoris</i> no meio de cultivo MD após eletroporação com o vetor de expressão.	42
Figura 22. Fotografia mostrando a revelação com vapor de iodo dos clones produtores da enzima recombinante. Visualização dos halos formados após indução das leveduras.	42
Figura 23. Cinética de indução enzimática com os nove clones produtores da enzima recombinante.	44
Figura 24. Gráfico dos níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone B8.	46
Figura 25. Gráfico dos níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone A7.	47
Figura 26. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE da enzima recombinante secretada pelos nove clones. Clone GS115 controle negativo da expressão. Setas indicam as bandas correspondentes à enzima secretada. M – Marcador de massa molecular (10-200 kDa).....	48
Figura 27. Cinética de expressão do clone B8 nos diferentes tempos de indução (24, 48, 72, 96 e 120 horas). C-: Controle negativo da expressão. M – Marcador de massa molecular.....	49
Figura 28. Efeito do pH sobre a atividade de α -amilase produzida pelos clones A5, B8 e D14.	50
Figura 29. Gráfico mostrando o efeito da temperatura sob a atividade relativa da α -amilase. Máxima atividade aferida em 70 °C pelos três clones analisados.	52
Figura 30. Termoestabilidade da enzima α -amilase incubada por 60 minutos nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C.....	53
Figura 31. Gráfico mostrando a estabilidade da enzima α -amilase em função do tempo de incubação à 4 °C. ANOVA-Dunnett ($p < 0,0001$).	54
Figura 32. Gráfico da concentração do substrato em função da velocidade inicial da reação obtidos a partir do clone A7.....	55
Figura 33. Gráfico dos duplos recíprocos obtido pela cinética enzimática do clone A7.....	56

1 – Introdução

1.1 - Tecnologia do DNA recombinante

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante na década de 70, novos procedimentos foram desenvolvidos permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado clonagem gênica. Técnicas provenientes da microbiologia, bioquímica, imunologia e genética microbiana, permitiram a manipulação e análise do DNA (Nascimento *et al*, 2003).

A tecnologia do DNA recombinante tem uma ampla aplicação que vem permitindo o isolamento e o estudo da regulação da expressão gênica de centenas de organismos eucariontes, recombinação gênica entre espécies distintas, estudos de genes humanos cujos alelos mutantes conferem algum distúrbio, genes associados ao desenvolvimento embrionário, genes relacionados a apoptose, inferências de estrutura e funcionalidade de proteínas entre outras. A tecnologia do DNA recombinante também é uma potente alternativa que permite o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico (Astolfi- Filho *et al.*, 2005).

A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. De acordo com Burns e Bottino (1991), o processo geral baseia-se em três enfoques experimentais principais. A produção de fragmentos de DNA de fontes diferentes que contenham as sequências gênicas de interesse, seguido da reunião desses segmentos em uma molécula de DNA capaz de se replicar, normalmente um plasmídeo bacteriano chamado vetor, e a transformação de células bacterianas com a molécula recombinante de modo que elas se repliquem e então se expressem.

O desenvolvimento desta nova tecnologia só foi possível pela descoberta das enzimas de restrição no final dos anos de 1960. Este tipo de enzima atua como uma espécie de "tesoura biológica" que, após reconhecer determinada sequência nucleotídica, faz corte bifilamentar na ligação açúcar-fosfato da molécula de DNA, produzindo fragmentos (Pierce, 2004).

Essas enzimas foram descobertas a partir de estudos a respeito do sistema de restrição-modificação de células infectadas por bacteriófagos. As enzimas de restrição ou nucleases de restrição são divididas em várias classes, dependendo da estrutura, da atividade e dos sítios de reconhecimento e clivagem. Entre elas, as enzimas do Tipo II são consideradas as mais importantes para a engenharia genética, pois são proteínas monoméricas ou diméricas e clivam o DNA no mesmo sítio do seu reconhecimento. O sítio de reconhecimento deste tipo

de enzima é normalmente uma sequência palindrômica (Arber e Linn, 1969; Astolfi - Filho *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2003).

Como consequência do desenvolvimento desta tecnologia, ampliou-se a possibilidade de explorarmos um número de variantes enzimáticas geradas por evolução *in vitro* para uma determinada aplicação. O emprego de organismos modificados por engenharia genética tem permitido o desenvolvimento de tecnologias aplicadas na obtenção de monômeros petroquímicos e outros compostos de elevado interesse industrial.

1.2 - Enzimas de origem microbiana no contexto biotecnológico

De acordo com a sua origem, as enzimas podem ser classificadas em: enzimas microbianas, enzimas de origem animal e enzimas de origem vegetal (Lima *et al.*, 2001).

O uso de células microbianas como fonte de enzimas foi largamente implementado em escala industrial, permitindo não só o aumento na produção de enzimas já obtidas por processos convencionais, mas também a produção de novas enzimas de interesse comercial (Demain, 2000). As enzimas de origem microbiana possuem vantagens como a obtenção de elevadas concentrações através de manipulação genética e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de micro-organismos super produtores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso (Timmis e Demain, 1998).

As enzimas produzidas por micro-organismos de origem bacteriana ou fúngica têm potencial aplicação em um grande número de processos industriais, como na indústria de alimentos, fermentação, indústria têxtil, papel-celulose, indústria de detergentes, indústrias farmacêuticas, produtos químicos e biomédicos, ração animal, sacarificação do amido, cerveja, e indústrias de destilação (Guimarães *et al.*, 2006; Souza e Magalhães, 2010).

Alguns organismos denominados termofílicos, produzem enzimas que possuem propriedades únicas de estrutura e função para termoestabilidade e atividade ótima em temperaturas acima de 70 °C. Enzimas termofílicas podem servir como sistema modelo para biólogos, químicos e físicos interessados na compreensão dos sistemas de evolução enzimática, mecanismos moleculares para termoestabilidade de proteínas, e o limite superior da temperatura para a função da enzima (Vieille e Zeikus, 2001).

Esse conhecimento pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias mais eficientes de engenharia de proteínas e uma vasta gama de aplicações biotecnológicas. As enzimas termofílicas podem funcionar em níveis elevados de sal, sob condições altamente alcalinas, e em condições ambientais extremas (acidez, pressão, etc) (Adams e Kelly, 1995;

Jaenicke e Bohm, 1998). Intrinsecamente estável e ativa em altas temperaturas, essas enzimas oferecem maiores vantagens biotecnológicas sobre enzimas mesofílicas (atividade ótima entre 25 °C a 50 °C). Uma vantagem é expressar essas enzimas termofílicas em hospedeiros mesofílicos, tornando mais fácil sua purificação por tratamento químico. Outra vantagem é a termoestabilidade dessas enzimas, que estão associadas a maior resistência à desnaturantes químicos (como um solvente ou cloridrato de guanidina), e a realização de reações enzimáticas a altas temperaturas permitem maiores concentrações de substrato, menos riscos de contaminação microbiana, e as taxas de reação são superiores (Vieille e Zeikus, 2001).

O crescente número de enzimas caracterizadas a partir de organismos termofílicos, e o advento recente das poderosas ferramentas da engenharia genética, sugerem um crescente uso dessas enzimas em uma variedade de aplicações. Na biologia molecular com a fabricação e o desenvolvimento de enzimas do tipo DNA polimerases e DNA ligases, na indústria de degradação de celulose, e na indústria de processamento do amido com o uso das enzimas α -amilases, β -amilases, glucoamilases, xilose isomerases, pululanases e amilopululanases (Bentley e Williams, 1996; Bergquist e Morgan, 1992).

1.3 - Processamento do amido

1.3.1 - O amido e suas estruturas

O amido é a principal substância de reserva de muitas culturas economicamente importantes tais como o trigo, milho, arroz, batata e mandioca, além de oferecer cerca de 80% das calorias consumidas pelo homem. Ele é armazenado nas células das sementes, raízes e tubérculos, depositados na forma de grânulos que apresentam forma e dimensões diversas (Cereda *et al.*, 2003).

O mercado de amido vem crescendo nos últimos anos, levando à busca de produtos com características específicas que suportam os requisitos da indústria. A produção de amidos modificados é uma alternativa que está em constante evolução para superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e assim aumentar a utilidade deste polímero para aplicações industriais. Sua produção mundial foi estimada em 70 milhões de toneladas no ano de 2010 (abam.com).

O amido é uma matéria-prima de caráter renovável, biodegradável e não tóxica e tem sido utilizado na indústria de alimentos como ingrediente, ao mesmo tempo com valor calórico e melhorador das propriedades funcionais em sistemas alimentícios. Dependendo do tipo, o amido pode, entre outras funções, servir para facilitar o processamento, fornecer

textura, servir como espessante, fornecer sólidos em suspensão e proteger os alimentos durante o processamento (Smith, 1982). Além disso, os amidos são importantes fontes de carboidratos para processos de fermentação etanólica (Cereda *et al.*, 2003).

A estrutura do amido consiste de resíduos de α -D-glicose que se associam por ligações glicosídicas formando dois tipos de compostos, a amilose e a amilopectina (Tester *et al.*, 2004).

A amilose (Figura 1) é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de D-glicose, contendo em média 99% de ligações α -(1,4). Seu grau de polimerização (DP) é controverso e parece ser dependente do vegetal de origem e do estágio de crescimento (Buléon *et al.*, 1998; French, 1984; Galliard, 1987). O peso molecular desse polímero é variável com a fonte e as condições de processamento empregadas na extração do amido, podendo conter de 200 a 700 resíduos de glicose, tendo seu peso molecular aproximado de 1×10^5 a 1×10^6 Da (Tester *et al.*, 2004).

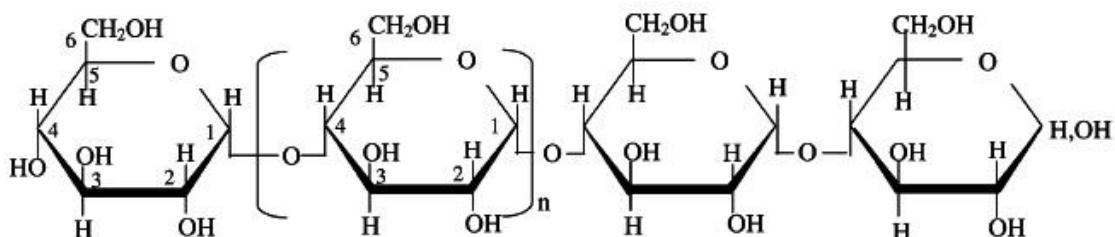


Figura 1. Estrutura química da amilose. Cadeia linear de α -D-glicose ligadas por ligações α -(1,4).

A amilopectina (Figura 2) é uma molécula ramificada formada por unidades de D-glicose ligadas em α -(1,4) e com 5 a 6% de ligações α -(1,6) nos pontos de ramificação (Buléon *et al.*, 1998). A grande maioria dos amidos contém 20 a 30% de amilose e 70 a 80% de amilopectina, sendo que essa razão varia com a fonte botânica. O peso molecular da amilopectina é da ordem de 1×10^7 a 1×10^9 Da. O comprimento das ramificações é variável, porém é comum apresentarem entre 20 a 30 unidades de glicose. Em presença de iodo a amilopectina apresenta coloração avermelhada e é estável em soluções aquosas diluídas (Biliaderis, 1991).

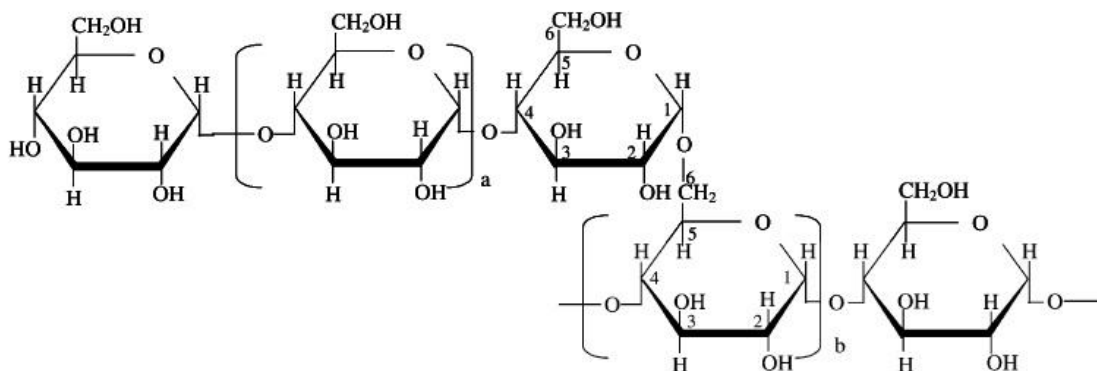


Figura 2. Estrutura da amilopectina. Ramificações unidas por ligações α -(1,6).

1.3.2 - Enzimas envolvidas na hidrólise do amido

As amilases são enzimas responsáveis pela degradação da molécula de amido e estão amplamente distribuídas na natureza. Elas constituem uma classe de enzimas industriais que representam aproximadamente 30% da produção de enzimas do mundo, sendo de grande importância na biotecnologia atual (Van der Maarel *et al.*, 2002).

As amilases hidrolisam moléculas de amido gerando diversos produtos incluindo dextrinas e polímeros menores compostos por unidades de glicose. Três domínios distintos caracterizam a estrutura geral dessas enzimas e estão divididas em grupos de acordo com sua atividade catalítica (Asghari *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2003).

Segundo Gupta e colaboradores (2003), as amilases são divididas em dois grupos, as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido gerando oligossacarídeos lineares ou ramificados de vários comprimentos. Essas enzimas clivam as ligações glicosídicas α -(1,4) presentes nas cadeias de amilose ou amilopectina. A enzima α -amilase (E.C. 3.2.1.1) é a mais conhecida.

As exoamilases podem clivar ligações glicosídicas α -(1,4) externas, a exemplo da β -amilase (E.C. 3.2.1.2) ou ambas as ligações α -(1,4) e α -(1,6) como é o caso da amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3) e glicosidase (E.C. 3.2.1.2.0) (Ayer, 2005). Existem também mais dois grupos de amilases, as desramificadoras e as transferases. As enzimas desramificadoras consistem em um terceiro grupo de enzimas conversoras do amido que são: pululanase hidrolase tipo I (neopululanase, EC 3.2.1.135) que rompe as ligações glicosídicas α -(1,4) formando panose, pululanase tipo I (EC 3.2.1.41) que hidrolisa especificamente as

ligações glicosídicas α -(1,6) para formar maltotriose e pululanase tipo II (amilopululanase) que rompe tanto as ligações glicosídicas α -(1,6) e α -(1,4) (Bertoldo *et al.*, 1999; Morais, 2004; Roy *et al.*, 2003).

As transferases constituem o grupo das enzimas conversoras ou modificadoras que podem quebrar as ligações α -(1,4) da molécula doadora, transferindo parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase (EC.2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação α -(1,4) e ao mesmo tempo ligam a extremidade redutora à não redutora. Essas enzimas são muito utilizadas nas indústrias cosméticas, farmacêuticas e de alimentos (Tachibana, 1999).

1.3.4 - Hidrólise do amido

A hidrólise do amido pode ser feita de duas formas, utilizando ácidos ou enzimas como catalisador (Carioca e Arora, 1984). A hidrólise enzimática tem várias vantagens em relação a hidrólise ácida, pois é mais específica, gera menos subprodutos e os rendimentos são mais elevados. As condições para a hidrólise enzimática são mais leves, portanto, etapas de refino para remover cinzas e cor do hidrolizado é minimizado. Com isso, a hidrólise enzimática do amido tem sido praticada em escala industrial por muitos anos e está gradualmente substituindo o tradicional processo de hidrólise ácida (Ayer, 2005).

A hidrólise do amido em produtos que contenham glicose, maltose, etc é provocada pela degradação controlada e realizada em diferentes fases como demonstrada na figura 3. (Crabb e Mitchinson, 1997).

A primeira fase consiste na gelatinização do amido que é necessário para aumentar a acessibilidade do substrato e melhorar a taxa de hidrólise. A gelatinização é o processo de transformação do amido granular em pasta viscoelástica. Durante o aquecimento de dispersões de amido em presença de excesso de água, inicialmente ocorre o inchamento de seus grânulos até temperaturas nas quais ocorre o rompimento dos grânulos, com destruição da ordem molecular e mudanças irreversíveis nas suas propriedades. A temperatura na qual ocorre este tipo de transformação é chamada de temperatura de gelatinização (Andrade e Souza, 2000; Barks *et al.*, 2008).

O processo de gelatinização ocorre simultâneo ao processo de liquefação. O objetivo da liquefação é converter uma suspensão concentrada de amido granular em uma solução solúvel de cadeias longas de dextrinas. Isso ocorre por uso de amilases termoestáveis

normalmente nas faixas de pH entre 6,0 e 6,2 a uma temperatura de 95°C (Crabb e Mitchinson, 1997).

Subsequente ocorre o processo de sacarificação, sendo a remoção de resíduos de glicose catalisada por uma exoamilase (glicoamilase). Normalmente essa enzima é isolada do fungo *Aspergillus niger* ou de espécies relacionadas. Para sacarificação, o pH do sistema é ajustado para 4,2 - 4,5 e os sólidos secos são diluídos para 30-32%. A glicose será o substrato para futuras fermentações (Bon *et al.*, 2008).

Em processos de modificação e conversão do amido em xaropes ricos em frutose, ocorre a isomerização dos açúcares formados. Para isso a mistura de dextrose é refinada, o carvão é filtrado, os sólidos secos são concentrados para mais de 40% e o pH é ajustado para níveis neutros (7,0 a 8,0). Então a enzima glicose isomerase isomeriza o aldeído do açúcar (D-glicose) para a forma de D-frutose. (Crabb e Mitchinson, 1997).

Os substratos formados pela hidrólise do amido além de serem utilizados nas indústrias alimentícias, podem servir para produção de etanol carburante como fonte alternativa de combustível.

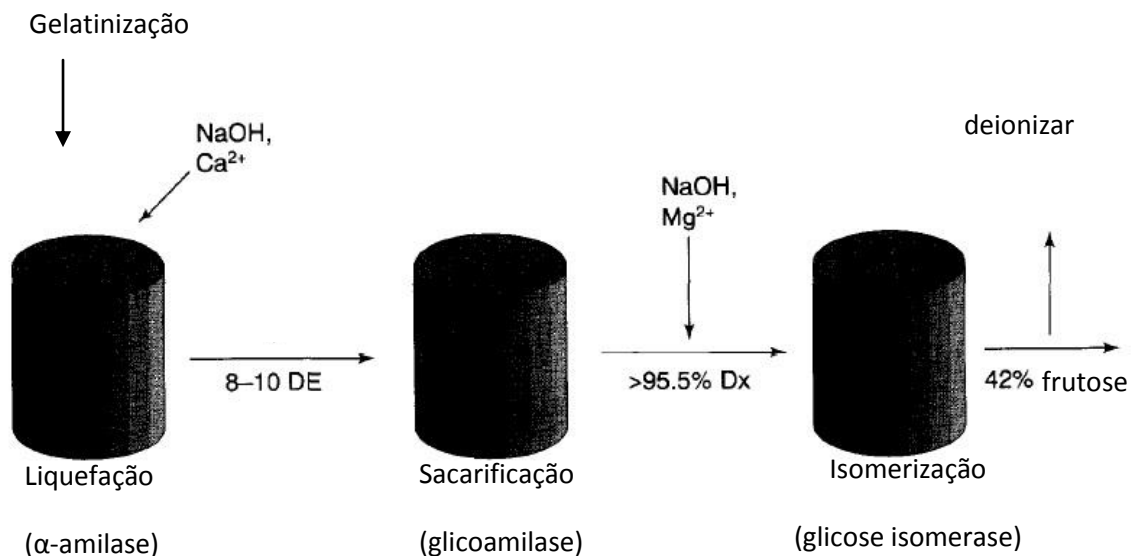


Figura 3. Esquema adaptado de Crabb e Mitchinson, 1997. Etapas enzimáticas no processamento de amido suspensos em frutose, mostrando o uso de enzimas, condições e parâmetros de processamento típico. As setas indicam os pontos de ajuste dentro do processo para os componentes de pH e / ou de íons. DE = "dextrose equivalente "; O termo "% Dx "é a porcentagem de dextrose na solução.

1.4 - Produção de biocombustível a partir do amido de mandioca

A preocupação ambiental, principalmente com o excesso de emissão de gases de efeito estufa na atmosfera e a busca por soluções alternativas para o consumo do petróleo, desde a década de 1970 até hoje, reforçam cada vez mais a importância da produção comercial dos biocombustíveis. As principais razões para o interesse na utilização dos biocombustíveis são minimizar os efeitos das emissões veiculares na poluição local, principalmente nas grandes cidades, diminuir a dependência externa de petróleo, por razões de segurança de suprimento ou impacto na balança de pagamentos e controlar a concentração de gases de efeito estufa na atmosfera (Leite e Leal, 2007).

A crise do petróleo que se instaurou nas últimas décadas, aliada ao aumento da demanda por combustíveis e à crescente preocupação com o meio ambiente, preconizou a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo (Pousa 2007). As pesquisas se concentraram no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo. Isso colocou a biomassa em um papel de destaque, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (Suarez, 2009).

A produção do álcool oriundo da cana-de-açúcar, da mandioca ou de qualquer outro insumo deveria ser incentivada por meio da expansão da oferta de matérias-primas, com especial ênfase no aumento da produção agrícola, da modernização e ampliação das destilarias existentes e da instalação de novas unidades produtoras, anexas a usinas ou autônomas, e de unidades armazenadoras. Sendo assim em 14 de novembro de 1975, foi criado no Brasil, o Programa Nacional do Álcool ou *Proálcool*, com o objetivo de estimular a produção do álcool, visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos. Nesse período, o governo incentivou a produção de álcool a partir de várias espécies vegetais como a mandioca, babaçu, batata-doce e cana-de-açúcar (Garnero, 1980).

O plantio da cana-de-açúcar possuía forte tradição do nosso país desde a época colonial em razão da produção de cachaça. Além disso, o etanol produzido a partir da cana obteve melhores condições na implantação de sua estrutura, em comparação ao etanol produzido a partir de outras fontes vegetais. Isto fez do Brasil um líder mundial na produção e utilização de álcool combustível (Marcoccia, 2007). Porém, a produção do etanol não se limita apenas na utilização da cana-de-açúcar como matéria-prima, mas também de outras fontes vegetais, podendo-se destacar a mandioca, o milho, o sorgo sacarino e resíduos

agroindustriais lignocelulósicos. A utilização dessas matérias-primas depende das questões climáticas e oferta de produtos. O Brasil, devido sua grande diversificação territorial e climática, pode usufruir de diversas culturas com características para a produção de etanol (Menezes, 1980).

Em algumas regiões do país, o clima e solo se tornam impróprio para o plantio da cana-de-açúcar, que necessita para um bom desenvolvimento uma precipitação pluviométrica de 1.200 a 1.300 mm anuais, terras profundas, com textura média e boa capacidade de retenção de água, e ainda a acidez do solo deve situar-se na faixa de pH 5,5 a 6,5 (Zink *et al.*, 1978). Uma alternativa para esse problema é a produção de etanol a partir do amido de mandioca, que produz álcool de qualidade superior podendo apresentar outras aplicações além de combustível. Além disso, a mandioca é uma raiz que não requer muitas exigências de clima e solo, podendo ser produzida de maneira sustentável em diversas regiões do país, melhorando assim a renda de muitas famílias que dependem da agricultura (Cereda *et al.*, 2003).

A produção de etanol a partir do amido da mandioca também possibilita a transferência de tecnologias, diminuição dos custos de transporte e gera uma ampla distribuição do produto para importação ou exportação (Cereda *et al.*, 2003). Porém a produção de etanol a partir do amido da mandioca necessita de um pré-tratamento com processos de liquefação e sacarificação através de ácidos ou enzimas biológicas, que quebram a macromolécula do amido em açúcares, para o posterior processo de fermentação. Esse pré-tratamento como diferença do processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar ainda é, à primeira vista, uma desvantagem para o amido, mas, por outro lado, esses carboidratos se apresentam em maiores concentrações por unidade de matéria prima vegetal, o que significa uma vantagem, por diminuir, consideravelmente, o manuseio dos significativos volumes mássicos, com implicações em investimentos, custeio do sistema, custos de logística, energia, mão de obra e remoção de resíduos (ABAM, 2010).

Como se observa o amido é uma importante fonte de carboidratos para processos de fermentação etanólica e as pesquisas com as enzimas biológicas (amilases) são de grande relevância para o desenvolvimento da produtividade agrícola.

1.5 - α -amilase de *Bacillus licheniformis*

As α -amilases estão entre as enzimas mais importantes na biotecnologia atual. A gama de aplicações técnicas são muito amplas, tendo potencial aplicação em processos dos setores de alimentos, indústria têxtil, indústria papeleira, detergentes, indústrias farmacêuticas,

medicamentos, química analítica, panificação, bem como em processos envolvidos na liquefação do amido para a produção de xaropes de frutose ou na produção de etanol combustível (Magalhães e Souza, 2010; Nazmi *et al.*, 2006).

As α -amilases são universalmente distribuídas entre os reinos (animal, vegetal, microbiano) sendo que ao longo das últimas décadas pesquisas têm sido desenvolvidas com α -amilases produzidas por uma grande variedade de micro-organismos (fungos, leveduras, bactérias e actinomicetos). No entanto, as enzimas a partir de fontes fúngicas e bacterianas têm dominado os setores industriais. A principal vantagem do uso de micro-organismos para a produção de amilases é a capacidade de produção econômica em massa e a fácil manipulação para se obter enzimas de características desejadas (Pandey *et al.*, 2000).

Bacillus licheniformis é uma bactéria mesofílica Gram-positiva que forma endósporos e podem ser isoladas de solos e material vegetal em todo o mundo. O organismo nunca foi relatado como patogênico para animais ou plantas e é usado extensivamente para produção em larga escala industrial de exoenzimas, uma vez que podem secretar grandes quantidades de proteínas de até 20-25 g/L (Veith *et al.*, 2004). Outros produtos que podem ser produzidos através de cepas de *B. licheniformis* são as amilases (Declerck *et al.*, 2000; Yuuki *et al.*, 1985).

A α -amilase de *B. Licheniformis* é amplamente utilizada nas indústrias de álcool, açúcar e cerveja para a hidrólise do amido inicial, clivando as ligações glicosídicas α -(1,4). Sua estrutura possui três domínios: A, B e C (Figura 4). O domínio A é formado por uma típica estrutura em barril $(\beta/\alpha)_8$, o domínio B é estabelecido como uma protrusão a partir do domínio A, e o lado C-terminal do barril contém o sítio ativo e conservados sítios de ligação para o cálcio.

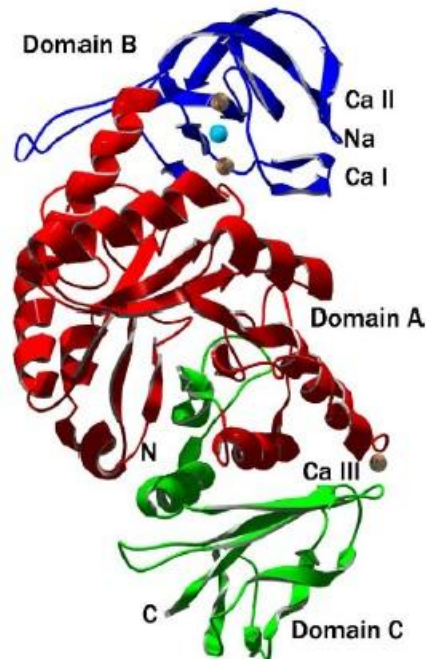


Figura 4. Estrutura terciária da α -amilase de *B. licheniformis*. O cálcio e os íons de sódio ligadas à proteína em sua forma nativa são mostrados. Domínio A, mostrado em vermelho, o domínio B é de cor azul e o domínio C na cor verde (Nazmi *et al.*, 2006).

O cálcio (Ca^{2+}) pode atuar na estabilização da estrutura tri-dimensional e como ativador alostérico (Muralikrishna, 2005).

A determinação da atividade dessa enzima pode ser baseada na intensidade da cor do iodo, aumento de açúcares redutores na solução e diminuição da viscosidade da suspensão de amido (Priest, 1977).

Devido ao fato de muitos micro-organismos secretarem 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* e mais eficientemente para leveduras (Sreekrishna *et al.*, 1997).

1.6 - Expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris*

Sistemas de expressão em leveduras oferecem vantagens consideráveis em relação a sistemas procarióticos ou a outros sistemas eucarióticos, onde são capazes de secretar proteínas e realizar processos de modificação relacionados à secreção, também combinam a facilidade de manipulação genética e crescimento relativamente rápido a altas densidades celulares (Gellisen, 2000). Nas últimas décadas a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* se

tornou um modelo de sucesso para a produção de proteínas heterólogas. Os principais fatores que contribuíram para o sucesso e a rápida aceitação desse sistema incluem a fácil manipulação genética, a capacidade da levedura produzir proteínas heterólogas em altos níveis, e fazer várias modificações pós-traducionais eucarióticas, como glicosilação, formação de pontes de dissulfeto e processamento proteolítico, e ainda a viabilidade do sistema de expressão como *Kit* comercialmente disponível (Cereghino e Cregg, 2000). Um benefício adicional do sistema de *P. pastoris* é que os promotores fortes estão disponíveis para conduzir a expressão de um gene heterólogo de interesse, permitindo a produção de grandes quantidades da proteína-alvo com relativa facilidade técnica e menor custo do que a maioria dos outros sistemas eucarióticos.

A levedura *P. pastoris* pode utilizar o metanol como fonte de carbono e energia (Cereghino e Cregg, 2000; Sreerikshna *et al.*, 1997). Os altos níveis de expressão estão relacionados a promotores induzíveis ou constitutivos (Almeida *et al.*, 2005). Entre eles há o forte promotor induzível e regulável por metanol, derivado do gene da proteína álcool oxidases 1 (*AOX1*) de *P. pastoris* usado para transcrever genes heterólogos. O mecanismo de ativação do promotor do gene *aox1* ocorre 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.

Existem dois genes que codificam a enzima álcool oxidase nessa levedura, o gene *aox1* e *aox2*. Os produtos desses genes possuem uma alta similaridade em relação às suas sequências e funções, porém mais de 95% da atividade enzimática da álcool oxidase é atribuída a 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*. Tem sido demonstrado que o RNA mensageiro do gene *aox1* pode incluir até 5% do RNA poli A⁺ total (Daly e Hearn, 2005).

Na presença de metanol como fonte de carbono, a via metabólica se inicia pela oxidação do metanol para formar formaldeído e peróxido de hidrogênio, reação catalisada pela enzima álcool oxidase (*AOX*). A enzima está presente dentro de uma organela chamada peroxissomo junto com outra enzima, a catalase que degrada o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, devido sua toxicidade à célula (Cregg *et al.*, 1989). Uma parte do formaldeído gerado pela enzima (*AOX*) deixa o peroxissomo e é metabolizado no citoplasma para formação de dióxido de carbono por duas desidrogenases, reações que são uma fonte de energia para as células que crescem em metanol. O formaldeído que resta na célula é assimilado para formar constituintes celulares por um caminho cíclico que se inicia com a

condensação do formaldeído com xilulose 5-monofosfato, reação catalisada pela ação da enzima sintase dihidroxiacetona (DHAS) (Figura 5) (Cereghino e Cregg, 2000).

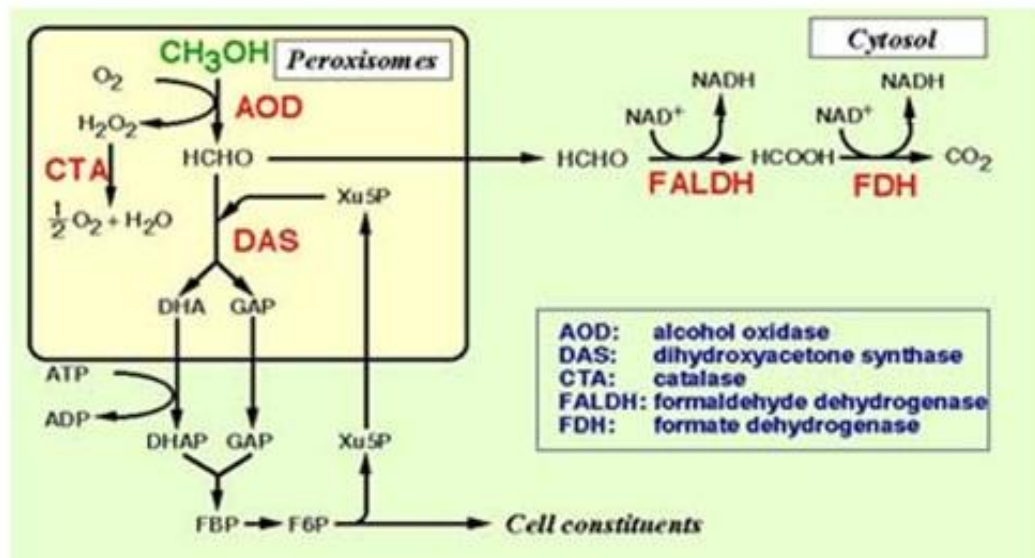


Figura 5. Via metabólica do metanol em *P. pastoris*. AOD - Álcool oxidase; DAS - Dihidroxiacetona sintase; CTA - catalase; FALDH - Formaldeído desidrogenase; FDH - Formato desidrogenase (Adaptado de Cereghino e Cregg, 2000).

1.6.1 – Fenótipos da levedura e sistema de integração no genoma

A integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* possibilita a caracterização de três fenótipos diferentes, que estão relacionados com a metabolização do metanol. Os fenótipos são classificados como Mut⁺ (*Methanol Utilization Plus*), Mut^S (*Methanol Utilization Slow*) e Mut⁻ (*Methanol Utilization Minus*). O fenótipo Mut⁺ caracteriza as leveduras que possuem os genes *aox1* e *aox2* funcionais no seu genoma e possuem crescimento que aproxima daquele apresentado pela levedura selvagem. O fenótipo Mut^S possui somente o gene *aox2* ativo, enquanto que o gene *aox1* não é funcional. Por fim o fenótipo Mut⁻ possui os dois genes *aox* inativos impossibilitando a metabolização de metanol (Cregg *et al.*, 1985).

Os dois diferentes mecanismos desta integração do cassete de expressão ao genoma da hospedeira são por adição ou substituição gênica (Cregg *et al.*, 1993; Tuite *et al.*, 1999). A integração por adição pode ocorrer com vetores circulares ou linearizados no *locus his4* (Figura 6) ou na região homóloga *AOX1* (Figura 7). Essas recombinações homólogas entre

vetor e genoma da hospedeira, ocorrem por um evento de *crossing-over* simples, também podendo ocorrer inserções em *tandem* gerando transformantes multicópias (Daly e Hearn, 2005).

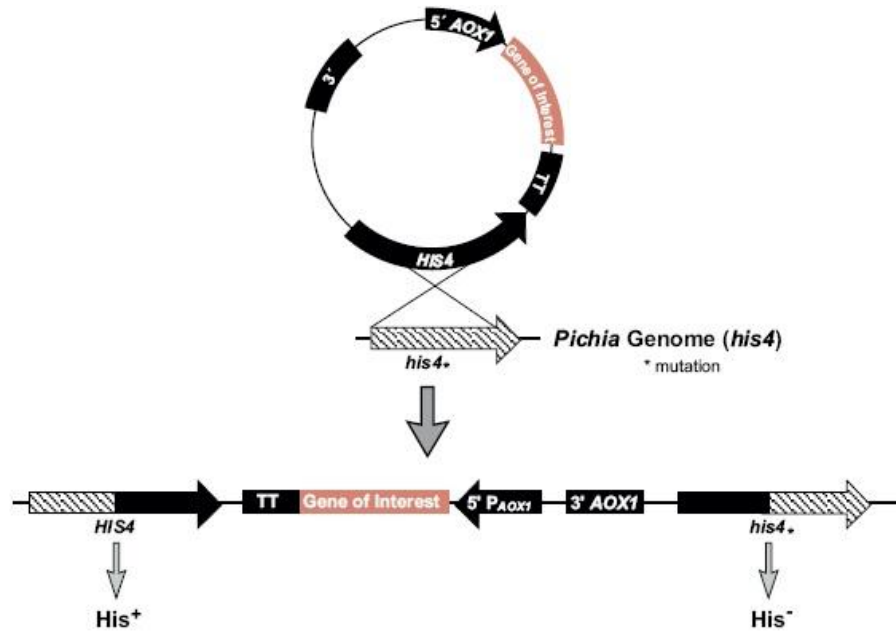


Figura 6. A figura mostra o resultado de uma inserção do plasmídeo entre as cópias duplicadas dos genes HIS4/his4 (Invitrogen, 2002).

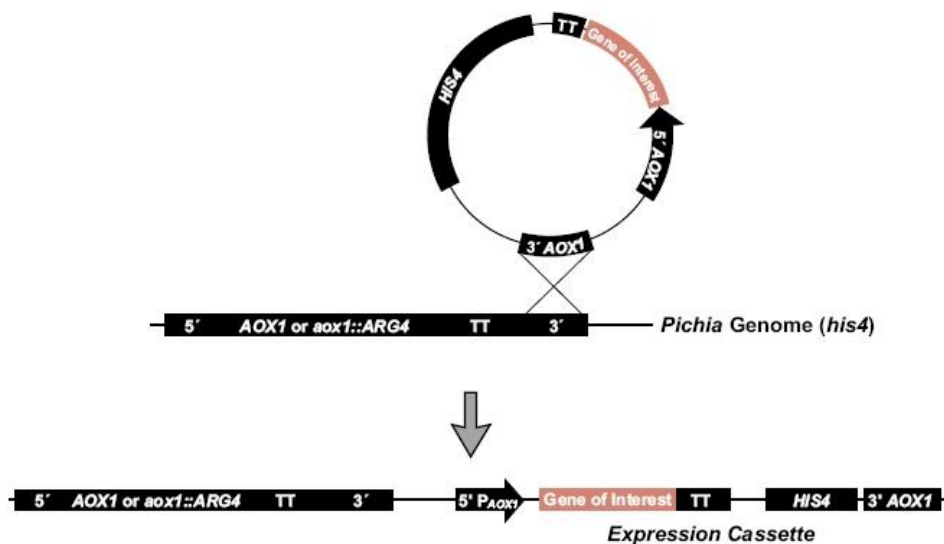


Figura 7. Resultado de uma inserção por adição do cassete de expressão no *locus* correspondente ao promotor AOX1 (Invitrogen, 2002).

A integração por substituição gênica ocorre através de um duplo *crossing-over* entre o vetor e o genoma da hospedeira. Esse evento ocorre entre o promotor *AOX1* e a região 3'*AOX1*. Isto resulta na remoção completa da região codificadora do gene *AOX1* (Figura 8).

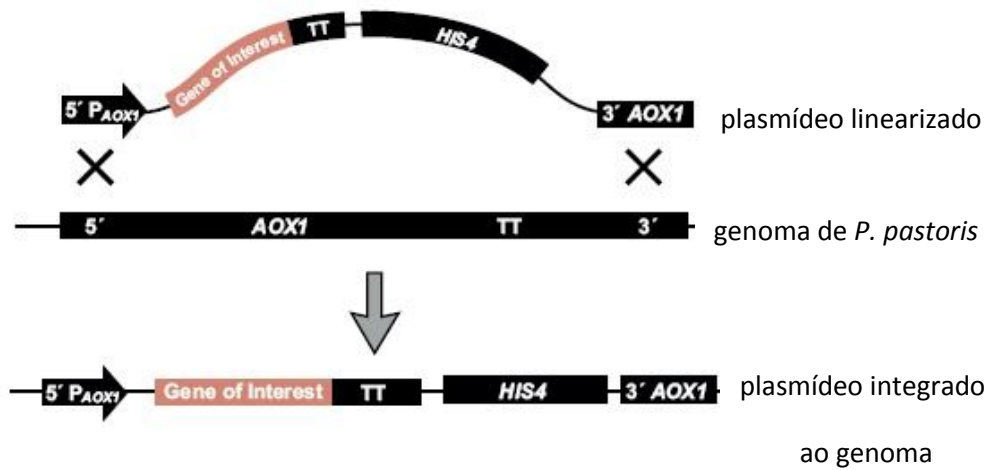


Figura 8. A figura mostra um evento de substituição de genes no *locus* AOX1 (Invitrogen, 2002).

2 - Justificativa

As enzimas de origem microbiana têm potencial aplicação em diversos processos industriais, além disso, a manipulação genética de alguns micro-organismos possibilita a produção de enzimas com alto valor biotecnológico e também algumas vantagens como a produção de enzimas para escala industrial, condições de cultivo a baixo custo e flexibilidade nas condições de uso para determinados processos industriais.

Outras fontes alternativas de matéria-prima para a produção do etanol no Brasil permitiu um aumento no desenvolvimento da produtividade agrícola e economia do país, além de contribuir para a redução das emissões de CO₂ e SO₂. Uma dessas fontes de matéria-prima é o amido. Porém a produção de etanol a partir do amido é uma atividade que necessita de um pré-tratamento com enzimas amilolíticas. Esse pré-tratamento ocorre através dos processos de liquefação e sacarificação que transforma a macromolécula do amido em açúcares para o posterior processo de fermentação. O processo de liquefação é realizado pelas α -amilases que são consideradas como as enzimas mais importantes na biotecnologia atual, além de possuir uma gama de aplicações técnicas em processos dos setores de alimentos, indústria têxtil, indústria papelreira, detergentes, indústrias farmacêuticas, medicamentos, química analítica, panificação, bem como em processos envolvidos na liquefação do amido para a produção de xaropes de frutose. Com isso, a produção dessas enzimas é de considerável importância, pois possibilita a realização dessas atividades e contribui também com o desenvolvimento de novas tecnologias para produção do biocombustível no país. Além disso, aumenta a distribuição do produto gerado para importação ou exportação utilizando fontes de matéria-prima de caráter renovável visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Clonar e expressar o gene que codifica a α -amilase de *B. licheniformis* DSM13 na levedura metilotrófica *P. pastoris* e analisar a proteína recombinante secretada.

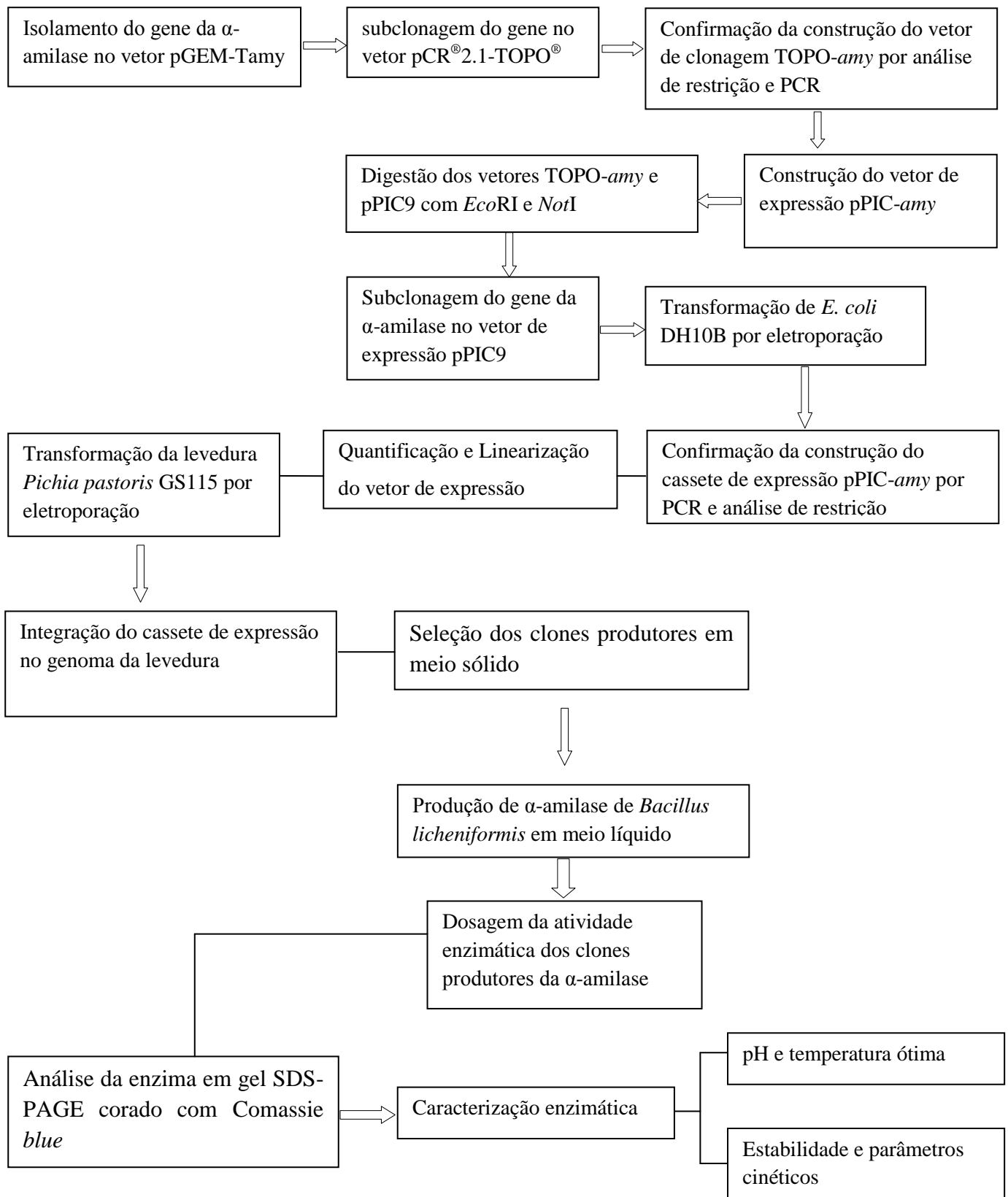
3.2 - Objetivos específicos

- Clonar o gene da α -amilase no vetor pCR[®]2.1-TOPO
- Subclonar o gene da α -amilase no vetor de expressão pPIC9.
- Obter clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 capazes de expressar o produto gênico de interesse.
- Induzir a expressão da proteína
- Analisar e caracterizar parcialmente o produto recombinante

4 - Material e Métodos

4.1 - Fluxograma das atividades desenvolvidas

Os quadros abaixo ilustram as principais atividades realizadas no presente trabalho



4.2 - Linhagens de micro-organismos utilizados

- *E. coli* DH10B™ genótipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL nupG*. Esta linhagem possibilitou que o DNA exógeno presente nos vetores de clonagem e expressão fosse manipulado e multiplicado através da transformação e clonagem dessas bactérias.*

- *E. coli* TOP10™ genótipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*. Esta linhagem foi utilizada para transformação quimiocompetente do vetor de clonagem TOPO-*amy*, que contém o gene correspondente a α -amilase de *B. licheniformis*.*

- *P. pastoris* GS115 (Invitrogen®), genótipo: *his4* (deleção do gene que sintetiza a quarta enzima que participa da síntese de histidina) e fenótipo Mut⁺ e His⁻ (Incapacidade de produzir histidina). Esta linhagem possui uma mutação no gene da *histidinol desidrogenase* (*his4*), o que a impede de sintetizar o aminoácido histidina, permitindo assim fazer a seleção de transformantes por complementação auxotrófica em meio mínimo sem histidina. Esta linhagem foi utilizada para expressão da enzima recombinante α -amilase.

4.3 - Meios de cultivo utilizados

Os meios de cultivo usados para o crescimento bacteriano de *Escherichia coli* foram:

- Luria Bertani (LB)
- S.O.B e S.O.C

Para manipulação da levedura *P. pastoris* foram utilizados os meios de cultivos YPD, MD, BMGY e BMMY.

A composição de cada meio de cultivo e as soluções estoques para o preparo dos mesmos estão apresentadas no APÊNDICE A na página 66.

4.4 - Estratégias de clonagem

4.4.1 - Obtenção do gene da α -amilase de *Bacillus licheniformis* DSM13.

O DNA genômico de *B. licheniformis* correspondente a linhagem DSM13 foi cedido pelo Instituto de Genética da Universidade de Bayreuth, Alemanha. O gene correspondente a

α -amilase foi amplificado pela técnica de PCR e clonado em vetor pGEM-T easy por Oliveira (2009).

4.4.2 - Isolamento do gene da α -amilase no vetor pGEM-Tamy

O gene da α -amilase presente no vetor PGEM-T easy foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se a enzima Taq DNA Polimerase *High-Fidelity* (InvitrogenTM) e os iniciadores *Ramy* e *Famy* previamente sintetizados (Tabela 1). Foram inseridos nas extremidades dos oligonucleotídeos *Ramy* e *Famy* as sequências de corte correspondentes às enzimas de restrição *Not* I e *Eco* RI respectivamente, para a realização de uma clonagem direcional do gene ao vetor de expressão.

A reação de amplificação foi elaborada em um volume total de 25 μ L em termociclador Veriti Thermal cycler (Applied Biosystems). Foram utilizados aproximadamente 20 ng de DNA, 1 U (unidade) de *Taq* DNA polimerase *High-Fidelity* (InvitrogenTM), tampão da enzima *Taq* 1X; 0,25 mM de uma mistura de dNTPs (2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfatos), 1 mM de MgCl₂, 5 pmol de cada iniciador e água deionizada esterilizada que completasse o volume de 25 μ L.

O programa utilizado para amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/2 minutos; seguidos de 35 ciclos (ciclo = 94°C/35 segundos; 60°C/40 segundos; 58°C/1,5 minutos); e um ciclo de extensão final a 58°C/5 minutos.

O *amplicon* foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores *Ramy* e *Famy*

Iniciadores	Sequência	Sítio de restrição
<i>Ramy</i>	5'CG GCGGCCGC CTATCTTTGAACATAAATTGAAAC3'	<i>Not</i> I
<i>Famy</i>	5'CG GAATTC AAATCTTAAAGGGACGCTGATG3'	<i>Eco</i> RI

4.4.3 - Clonagem do gene no vetor pCR[®] 2.1-TOPO[®]

O vetor pCR[®] 2.1-TOPO (Figura 9) apresenta um tamanho de 3931 pares de bases, genes que conferem resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina, origem de replicação funcional em *E. coli*, um gene *lacZα* (e seu promotor) para a enzima β-galactosidase, e uma região de origem de replicação para vetores tipo pUC.

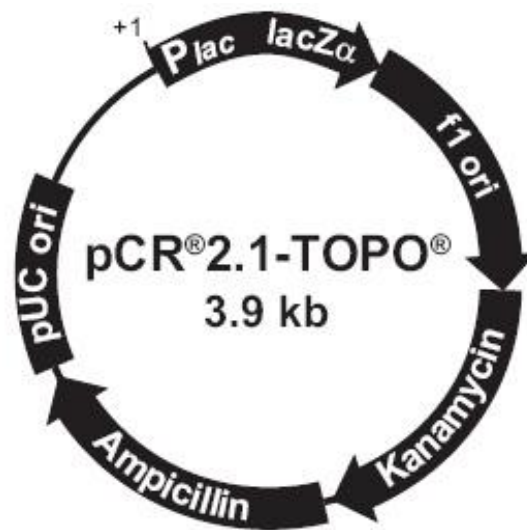


Figura 9. Vetor de clonagem pCR[®] 2.1-TOPO utilizado para clonagem do gene da α-amilase de *B. licheniformis* (Invitrogen, 2006).

O produto da PCR (gene da α-amilase) foi clonado no vetor pCR[®] 2.1-TOPO[®] conforme as recomendações do fabricante (invitrogen). Esse tipo de clonagem se diferencia da clonagem padrão por utilizar a enzima Topoisomerase I do vírus *Vaccinia* ao invés da enzima ligase do fago T4.

A topoisomerase I se liga ao DNA duplex do vetor circular em um sítio específico e cliva a ligação fosfodiéster após a região 5'- CCCTT em uma única fita (Shuman, 1991). A energia da quebra dessa ligação é conservada por meio de uma ligação covalente entre o fosfato 3' da fita clivada e o resíduo Tyrosil (Tyr-274) da topoisomerase I (Figura 10). A ligação fosfo-tyrosil entre o DNA e a enzima pode eventualmente ser atacada pela hidroxila 5' da fita original do vetor de clonagem (Shuman, 1994).

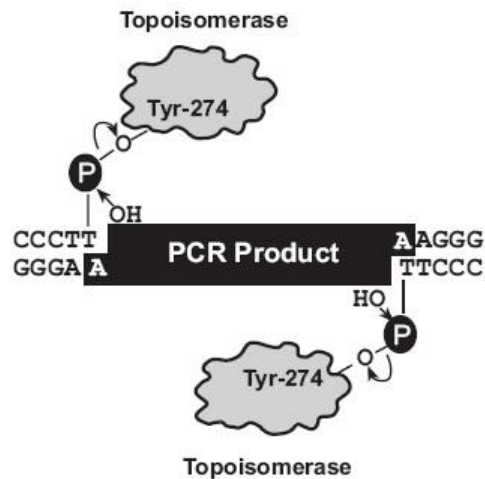


Figura 10. Esquema do processo de ação da enzima topoisomerase I (Invitrogen, 2006).

Ao final da PCR a enzima *Taq* polimerase adiciona uma única desoxiadenosina nas extremidades 3' do *amplicon*, possibilitando assim a ligação do inserto ao vetor TOPO pela ação da enzima topoisomerase I.

Após a construção do vetor de clonagem TOPO-*amy* (gene α -amilase + vetor TOPO), realizou-se a transformação química das células da linhagem TOP10™ conforme descrito abaixo:

- Foram adicionados (sem ressuspender) 2 μ L do sistema de ligação no tubo contendo as células quimiocompetentes.
- O tubo foi incubado por 20 minutos no gelo
- Em seguida as células foram incubadas por 30 segundos a 42°C
- Imediatamente transferiu-se o tubo para o gelo
- Adicionou-se ao tubo 250 μ L de meio S.O.C fornecido pelo fabricante (Invitrogen)
- As células foram incubadas durante 1 hora a 37°C sob agitação (200 rpm)
- O sistema de transformação foi semeado nos volumes de 10 e 25 μ L em meio LB sólido contendo 100 μ g/mL do antibiótico ampicilina (Incubadas a 37°C *overnight*).
- Quinze colônias foram selecionadas aleatoriamente e repicadas para o meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina.
- Após 16 horas de crescimento, foi realizada a extração do DNA plasmidial com o *kit*: “Ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit” de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare).

4.4.4 - Confirmação da construção do vetor de clonagem TOPO-*amy* por análise de restrição e PCR

Após a etapa de extração do DNA plasmidial, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X (Tris 40mM, ácido bórico 40 mM e EDTA 0,5M) para a confirmação do produto de extração.

Para a confirmação da presença do gene da α -amilase no vetor TOPO, foi realizado uma digestão analítica com as endonucleases de restrição *Eco* RI e *Not* I conforme descrito na tabela 2. A confirmação da liberação da sequência codificadora da α -amilase foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado em luz ultravioleta.

Tabela 2. Sistema utilizado para digerir o vetor TOPO-*amy* com as enzimas *Not* I e *Eco* RI.

Reagentes	Volume (μ L)
H ₂ O	10,35
Tampão 10X	1,5
BSA	0,15
<i>Eco</i> RI (20 U/ μ g)	0,5
<i>Not</i> I (10 U/ μ g)	0,5
vetor Topo- <i>amy</i>	2
Total	15

A análise por PCR também foi realizada com o intuito de se confirmar a construção do vetor de clonagem TOPO-*amy*. As condições da PCR foram as seguintes: tampão da enzima 10X, 1 mM MgCl₂, 25 mM de dNTP, 5 ng/ μ L de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), aproximadamente 20 ng de DNA e água deionizada esterilizada completando para um volume final de 25 μ L. As reações foram conduzidas em termociclador Veriti Thermal cycler (Applied Biosystems), e o programa para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/2 minutos; seguido de 35 ciclos (94°C/35 s, 60°C/40 s, 58°C/90 s); e um ciclo de extensão final a 58°C/5 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

4.5 - Construção do vetor de expressão pPIC-amy

4.5.1 - Vetor de expressão pPIC9

O vetor utilizado para expressar a α -amilase na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, foi o vetor de expressão pPIC9 (Invitrogen™) (Figura 11). Este vetor possui 8023 pb, a sequência codificadora do fator- α da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que é responsável pela secreção da proteína heteróloga, um gene de resistência ao antibiótico ampicilina, uma marca de seleção auxotrófica para as leveduras com genótipo *his4* e origem de replicação para a bactéria *E. coli*. O vetor pPIC9 ainda possui as regiões *HIS4* e *AOX1* homóloga ao genoma da hospedeira que é responsável pela integração do cassete de expressão em seu genoma. Também está presente uma região de múltiplos sítios de clonagem, e o forte promotor induzível e regulável por metanol, derivado do gene da proteína álcool oxidase 1 (*AOX1*) de *Pichia pastoris* usado para transcrever genes heterólogos.

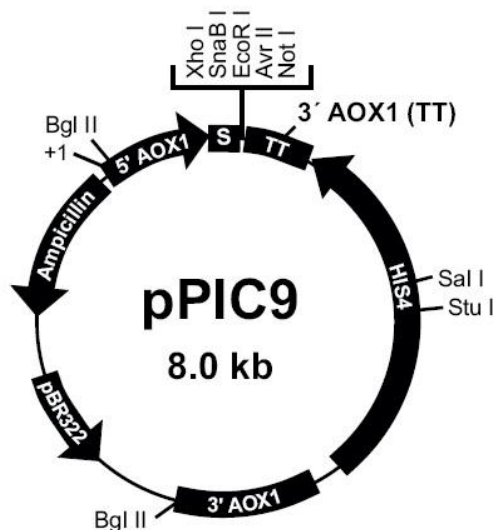


Figura 11. Vetor de expressão pPIC9 (Invitrogen™) que foi utilizado para expressar e secretar a α -amilase em *Pichia pastoris* (Invitrogen, 2006).

4.5.2 - Digestão dos vetores TOPO-amy e pPIC9

Para a construção do vetor de expressão da α -amilase, fez-se necessário retirar o inserto do vetor TOPO-amy e inseri-lo no vetor pPIC9. A primeira etapa consistiu de uma dupla digestão enzimática em ambos os vetores com as mesmas endonucleases de restrição, para que a ligação do inserto ao vetor de expressão ocorresse em fase de leitura correta. Os vetores TOPO-amy e pPIC9 foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I

(New England Biolabs). O sistema de digestão foi incubado em estufa a 37 °C durante 2 horas, sendo utilizado 1 U/ μ g de cada enzima (*Eco* RI e *Not* I) e aproximadamente 100ng de DNA. Procedeu-se uma análise qualitativa dos produtos das digestões por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

A segunda etapa consistiu do processo de purificação em gel de agarose do inserto liberado e do vetor pPIC9 linearizado. O procedimento de purificação foi realizado utilizando o *kit* comercial “*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*” seguindo as recomendações do fabricante (GE Healthcare). Este processo foi necessário para a realização da subclonagem do gene da α -amilase no vetor de expressão pPIC9.

4.5.3 - Subclonagem do gene da α -amilase no vetor de expressão pPIC9

A subclonagem consistiu da ligação do gene purificado ao vetor de expressão pPIC9 linear. A DNA ligase do fago T4 foi a enzima responsável por ligar o gene ao vetor de expressão. O sistema de ligação foi realizado de acordo com o sistema descrito na tabela 3.

Tabela 3. Sistema de ligação do gene ao vetor de expressão pPIC9.

Reagentes	Volume (μ L)
H ₂ O	0,5
Tampão da ligase 10X	1,5
Inserto (260 ng/ μ L)	4,5
Vetor (500 ng/ μ L)	7,5
Ligase (400 U/ μ g)	1
Total	15

Segundo as especificações do fabricante da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs), a reação foi incubada por 18 horas a 16 °C.

Após a reação de ligação do inserto ao vetor de expressão pPIC9, foi realizado o processo de precipitação com o objetivo de concentrar o sistema de ligação e retirar o tampão da reação para que a transformação da hospedeira ocorresse com sucesso. Para a precipitação utilizou-se o sistema de ligação; 1/10 V de acetato de amônia 7,5M e 2,5 V de etanol 100% gelado. A mistura foi incubada por 4 horas e após procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm

por 15 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. A última etapa da precipitação foi o descarte do sobrenadante e a secagem do *pellet* em temperatura ambiente. O *pellet* seco foi redissolvido em 10 µL de água deionizada estéril e estocado a 4 °C.

4.6 - Transformação de *E. coli* DH10B por eletroporação

4.6.1 - Preparo de células *E. coli* eletrocompetentes

Bactérias *E. coli* (linhagem DH10B) foram preparadas para se tornar eletrocompetentes e receber os plasmídeos resultantes da ligação (pPIC-*amy*). Uma única colônia de *E. coli* DH10B foi inoculada em 20 mL de meio LB e incubada em shaker a 37°C *overnight*. Em seguida, 1 mL dessa cultura foi inoculado em 300 mL de meio LB líquido (sem a presença de antibióticos) e levado ao shaker a temperatura de 37°C até atingir a O.D₆₀₀ = 0,7. O frasco contendo a cultura com a O.D desejada foi resfriado em gelo por 1 hora e seu volume foi distribuído em tubos de 50 mL. A seguir iniciou-se as etapas de centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e em seguida ressuspensão gentilmente com 10 mL de glicerol 10% gelado e estéril. As etapas de centrifugação e lavagens dos *pellets* foram repetidas sete vezes. Na última lavagem, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de glicerol 10% gelado, aliquoteado em volume de 80 µL, congelados imediatamente e estocados em freezer – 80°C, tornando assim as células eletrocompetentes.

4.6.2 - Transformação das células DH10B eletrocompetentes

A transformação foi realizada com a adição de 1 µL (~50ng) do plasmídeo recombinante em 80 µL de células eletrocompetentes em cubeta de eletroporação previamente resfriada. Após 5 minutos no gelo as células foram submetidas a pulso elétrico de 1,9kV (200 Ω) em eletroporador (Mod. Eletroporator 2510 Eppendorf) com o objetivo de permitir a entrada do vetor recombinante na bactéria. Posteriormente as células foram inoculadas em 1 mL de meio SOC e o conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. Esse microtubo foi incubado a 37° sob agitação (150 rpm) por 1 hora.

Em seguida a suspensão bacteriana foi semeada nos volumes de 25, 50, 100 e 150 µL em 4 placas contendo meio LB sólido e 200 µg/mL de ampicilina. As placas por sua vez, foram incubadas a 37°C durante 16 horas. Devido à presença do antibiótico ampicilina, foi possível fazer a seleção das bactérias transformadas.

Após o crescimento dos transformantes, foram coletadas 13 colônias aleatoriamente. Em seguida, estas colônias foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina para a extração do DNA plasmidial recombinante. Após 16 horas de crescimento, foi realizado a Mini-prep com o *kit*: “Ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit” de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare).

4.7 - Confirmação da construção do cassete de expressão pPIC-amy

4.7.1 - PCR para verificação da presença do inserto no vetor de expressão

Na reação de PCR, utilizou-se o DNA plasmidial extraído das 13 colônias. Os iniciadores 5'AOXI (5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3') e 3' AOXI (5' CAAATGGCATTCTGACATCC 3') foram previamente sintetizados possuindo sequências específicas que anelam no vetor de expressão pPIC9. Isto permite amplificar somente a região em que gene de interesse (α -amilase) se localiza. As reações foram elaboradas em termociclador Veriti Thermal cycler (Applied Biosystems), e o programa para as ampliações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/2 minutos; seguido de 35 ciclos (94°C/35 s, 62°C/40 s, 72°C/90 s); e um ciclo de extensão final a 72°C/5 minutos. Procedeu-se uma eletroforese em gel de agarose 1%, para análise da presença do produto da PCR correspondente ao gene de interesse.

4.7.2 - Análise de restrição

A análise de restrição também foi utilizada para a confirmação da construção do plasmídeo recombinante pPIC-amy. O vetor foi submetido a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I. A análise da digestão e confirmação da correta construção do vetor recombinante pPIC-amy foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

4.8 - Quantificação e linearização do vetor de expressão pPIC-amy

Os plasmídeos recombinantes (pPIC-amy) extraídos das amostras 3, 12 e 13 foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) para serem utilizados no processo de transformação da hospedeira *P. pastoris*.

Após a quantificação do DNA, foi realizada a linearização dos vetores dessas amostras utilizando a endonuclease de restrição *Bgl* II (New England Biolabs). Na reação de linearização foi utilizado o tampão da enzima NEB3 10X (New England Biolabs), 2U

(Unidades) da enzima *Bgl*III, aproximadamente 7 µg de DNA e água deionizada estéril para o volume final de 35 µL. A reação foi incubada a 37°C por 3 horas e após visualizada em gel de agarose 1%.

Após o processo de linearização dos vetores, os mesmos foram precipitados com 1/10 V de acetato de amônia 7,5M e 2,5 V de etanol 100% gelado para concentrar o sistema de expressão e retirar o tampão da reação para que a transformação da hospedeira ocorresse com sucesso.

4.9 - Transformação da levedura *P. pastoris* GS115 por eletroporação

4.9.1 - Preparo de células (leveduras) eletrocompetentes

As leveduras *P. pastoris* da linhagem GS115 foram inoculadas em frascos *erlenmeyer* contendo 10 mL do meio YPD líquido. As condições de cultivo foram a 30°C por 24 horas. Cerca de 150 µL deste pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio YPD. A cultura foi incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma densidade óptica (D_{600}) de 1,5. As células foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos na temperatura de 4°C e resuspensas em 25 mL de sorbitol 1M gelado. As etapas de lavagem com sorbitol foram repetidas por mais cinco vezes. Na última lavagem o *pellet* foi ressuspensão em somente 1 mL de sorbitol 1M gelado. As leveduras eletrocompetentes foram aliqüotadas no volume de 80 µL em microtubos estéreis sendo imediatamente estocadas na temperatura de -80°C.

4.9.2 - Eletroporação da hospedeira *P. pastoris* GS115

No processo de transformação da hospedeira para a integração do cassete de expressão ao seu genoma, foram utilizadas 80 µL de células eletrocompetentes homogeneizadas com aproximadamente 5 µg do DNA linearizado em 10 µL do tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; *pH* 8,0). As células eletrocompetentes e o DNA plasmidial foram submetidos as seguintes condições: 1500 V, 200 Ω, utilizando o equipamento Eletroporator 2510 (Eppendorf). Foi adicionado imediatamente às células eletroporadas 1 mL de sorbitol 1 M gelado, e o conteúdo foi transferido para um microtubo. Volumes de 50, 100, e 150 µL do sistema de transformação foram semeadas diretamente em placas do tipo Petri contendo o meio mínimo MD, e incubadas em repouso a 30°C durante três dias. Os clones recombinantes foram selecionados no meio de cultivo mínimo MD, que não apresenta em sua composição o

aminoácido histidina, utilizado como marca de seleção auxotrófica para o crescimento das colônias recombinantes.

4.9.3 - Integração do cassete de expressão no genoma da levedura

A recombinação homóloga para integração do cassete de expressão no genoma da hospedeira pode ocorrer no *locus his4* ou no *locus AOX1*. Quando a recombinação ocorre no *locus AOX1* por um duplo *crossing-over* entre regiões do vetor e do genoma, a região codificadora *aox1* é removida resultando em uma levedura com fenótipo Mut^S (*Methanol utilization slow*), que cresce lentamente em meio com metanol devido a perda do gene da enzima álcool oxidase 1 que é mais ativa. Quando a recombinação homóloga ocorre por um *crossing-over* simples levando a inserção gênica no *locus his4* ou no *locus AOX1*, o fenótipo resultante da levedura é Mut⁺ (*Methanol utilization plus*), que metaboliza o metanol eficientemente.

4.10 - Seleção dos clones produtores da α -amilase de *B. licheniformis* em meio sólido

Os clones recombinantes de *P. pastoris* selecionados no meio de cultivo mínimo MD foram induzidos por metanol a expressar e secretar a enzima α -amilase. A primeira etapa consistiu na transferência de 96 clones que cresceram no meio MD para o meio de cultura BMG-Y. Esses clones foram incubados por 3 dias a 30 °C para o aumento do crescimento celular devido a presença de glicerol e nutrientes ricos presentes no meio de cultivo. Após essa etapa os clones recombinantes foram transferidos para o meio de cultivo indutor BMM-Y que contém em sua composição 1% de amido e 0,5% de metanol. Estes, foram incubados por mais 3 dias a 30 °C. Os clones presentes no meio BMM-Y foram distribuídos em Grids numerados nas placas de Petri, facilitando assim a visualização e seleção dos produtores da enzima recombinante.

A cada 24 horas foi adicionado metanol na concentração de 0,5% nas tampas das placas contendo os clones a fim de induzir a expressão da α -amilase pelo sistema de expressão da levedura metilotrófica *P. pastoris*.

Foi utilizada a coloração de vapor de iodo, método descrito por Astolfi Filho *et al.*, (1986) para visualizar halos translúcidos ao redor das colônias que tiveram a enzima de interesse expressa. Como o vapor de iodo possui alta toxicidade para as células, os clones recombinantes foram repicados em replica *plate* em meio MD para estoque antes de proceder a coloração via vapor de iodo.

Também foram feitas as medidas do diâmetro dos halos e da colônia dos clones produtores de α -amilase. Essa medida foi realizada com o auxílio de um paquímetro para a realização do índice de amilolise (Ia), que é dado pela fórmula $Ia = (dh^2/dc^2)$, onde dh = diâmetro do halo e dc = diâmetro da colônia.

4.11 - Produção de α -amilase de *B. licheniformis* em meio líquido

4.11.1- Cinética de indução enzimática

A indução da expressão enzimática proporcionou a formação do extrato enzimático no meio líquido BMM-Y que foi coletado nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 120 horas, permitindo assim análises da atividade enzimática e a construção de uma curva de crescimento das células de *Pichia pastoris* recombinantes.

4.11.2 - Indução da produção da α -amilase em meio líquido

Nove clones que foram selecionados anteriormente em meio MD por apresentarem atividade enzimática devido a formação de halos translúcidos ao redor da colônia, foram repicados em 30 mL de meio BMG-Y e incubados a 30°C sob agitação de 200 rpm/min por aproximadamente 16 horas até atingir uma densidade óptica ($D.O_{600}$) igual a 6. Também foi inoculado em meio líquido um clone da linhagem GS115 que não produz a enzima recombinante, servindo assim como controle negativo da produção enzimática. Em seguida os clones que atingiram a O.D desejada foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O *pellet* formado foi ressuscitado em 200 mL do meio indutor BMM-Y em frascos de 1 L. A indução da expressão enzimática se iniciou com a adição de metanol 0,5% à cultura a cada 24 horas.

O tempo de produção da enzima teve duração de 120 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em triplicata nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 120 horas e armazenadas em microtubos de 1,5 mL. Todas as alíquotas retiradas foram centrifugadas a 12000 rpm a 4°C e os sobrenadantes foram recuperados e estocados a -20°C. O primeiro lote da triplicata dos sobrenadantes serviu para a realização dos ensaios enzimáticos, o segundo foi utilizado para a confecção do gel SDS-PAGE para confirmação da expressão da proteína, e o terceiro lote dos sobrenadantes foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda 600 nm para a construção da curva de crescimento dos clones induzidos. O crescimento celular obtido foi convertido para g/L utilizando a fórmula $(g/L)=0,22 \times D.O. 600 \text{ nm}$ (Nakano *et al.*, 2006).

4.12 - Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE corado pelo método Coomassie Blue G250

A análise da proteína recombinante secretada pela levedura *P. pastoris* foi feita por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Os sobrenadantes dos nove clones obtidos durante a cinética de indução foram precipitados em acetona e TCA (10%). O precipitado foi ressuspenso em 30 μ L de tampão de amostra de eletroforese 1X para SDS-PAGE (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% azul de bromofenol p/v; 4% SDS v/v; β -mercaptoetanol 4%; 20% glicerol v/v). Em seguida as amostras foram fervidas em banho maria por 5,0 minutos, e incubadas imediatamente em gelo até aplicação no gel.

Foram preparados dois géis de poliacrilamida para a corrida eletroforética, sendo o gel separador na concentração de 12% e o gel concentrador 5%. A eletroforese foi realizada em sistema Hoefer-Se 600 Ruby (Amersham Biosciences) em tampão de corrida Tris-glicina 1X pH 8,3 por 8 horas em voltagem de 250V. Foi utilizado como marcador de massa molecular o marcador PageRuler™ Unstained-Protein ladder (Fermentas Life Sciences) que mede uma faixa de 10 a 200 kDa (Kilo Daltons).

Após a corrida as amostras foram coradas com a solução de Azul Brilhante de Coomassie G250. Essa coloração consiste de 0,1% de Coomassie G250 p/v, ácido fosfórico 2% v/v, sulfato de amônio 10% p/v e metanol 20% v/v. Inicialmente o gel foi incubado por 30 minutos na solução fixadora (Ácido acético 10%; metanol 40%; H₂O mili-Q) seguido de uma incubação *over-night* em uma solução de *Coomassie* coloidal para a detecção das proteínas. A última etapa foi a descoloração do gel em água destilada. A imagem do gel corado foi capturada via *scanner*.

4.13 - Dosagem da atividade enzimática dos clones produtores da α -amilase

4.13.1 - Ensaio enzimático para quantificação da atividade dextrinizante pelo método de FUWA

O método utilizado para quantificação das dextrinas liberadas pela ação catalítica da enzima α -amilase sobre a molécula do amido foi de acordo com Fuwa (1954). A dosagem da atividade enzimática foi feita com os nove clones que foram selecionados para a indução da enzima. Os 9 clones selecionados foram denominados de A5; A7; B8; B20; C13; C22; D10; D14 e D17.

Para calcular os valores da atividade enzimática dos clones fez-se necessário a construção de uma curva padrão de amido. A construção da curva foi realizada pelas variações de concentração de amido variando de 0,025 a 1%. A leitura das absorvâncias em espectrofotômetro das diferentes concentrações de amido gerou uma equação da reta que foi utilizada para fazer os cálculos da atividade enzimática.

Para o ensaio enzimático, o reagente FUWA foi confeccionado utilizando Iodeto de Potássio 10%, Iodo 1% e água destilada, nas proporções de 1V/1V/3V respectivamente. Inicialmente adicionou-se 140 μ L de solução de amido 1% diluída em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,9. Em seguida foi adicionado 60 μ L do extrato enzimático diluído 50X e incubado a 90 °C por 20 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 200 μ L de ácido acético 1M, seguido da adição de 200 μ L do reagente FUWA e 9,4 mL de água para a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 660 nm.

Uma unidade de atividade dextrinizante foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto.

4.14 - Caracterização enzimática

4.14.1 - Determinação do pH ótimo

A metodologia utilizada para a avaliação da atividade enzimática em diferentes pHs foi realizada também pelo método dextrinizante de FUWA. Foram escolhidos os extratos enzimáticos dos clones A5, B8 e D14 para a determinação do pH ótimo da enzima recombinante.

Para determinação do pH ótimo da α -amilase produzida por *P. pastoris*, foi confeccionado uma solução misturando os reagentes:

- Glicina 50 mM
- Ácido acético 50 mM
- Fosfato de sódio dibásico 50 mM

Esta solução atinge uma faixa de pH que varia de 2,0 a 12,0. O ajuste do pH foi realizado em intervalos de 1,0. Para pH ácido, a solução foi calibrada utilizando ácido clorídrico 50% e para pH alcalino a solução foi calibrada com NaOH 1M.

4.14.2 - Determinação da temperatura ótima

Os extratos enzimáticos dos clones A5, B8 e D14 foram incubados no pH ótimo estabelecido para enzima e nas temperaturas de 40 a 100°C seguindo intervalos de 10°C entre

si. A determinação da temperatura ótima também foi realizada nas condições do método dextrinizante (Fuwa, 1954).

4.14.3 - Determinação da estabilidade térmica utilizando o íon Ca^{2+}

Para avaliar a estabilidade térmica da enzima recombinante em relação a temperatura, o extrato enzimático dos 3 clones (A5; B8; D14) foram pré-incubados por 60 minutos nas temperaturas de 60, 70 e 80°C no pH ótimo da enzima. A cada 15 minutos foram coletados uma alíquota do extrato para proceder a dosagem da atividade enzimática utilizando o método dextrinizante. Foram acrescidos na reação Cloreto de Cálcio (CaCl_2) na concentração de 5 mM conforme descrito por Hmidet *et al.*, 2008.

4.14.4 - Estabilidade em relação ao tempo de estocagem da enzima

A enzima recombinante produzida foi estocada por um período de 60 dias na temperatura de 4°C. A atividade enzimática foi avaliada a cada 10 dias durante este período de incubação. O intuito foi determinar se a enzima manteve sua ação catalítica quando estocada em geladeiras nessa temperatura. Os ensaios novamente seguiram o método dextrinizante de Fuwa que quantifica as dextrinas liberadas pela ação catalítica da enzima.

4.15 - Parâmetros cinéticos: Determinação dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a α -amilase recombinante

Para a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes do extrato enzimático, o mesmo foi incubado em diferentes concentrações de amido. A concentração do substrato variou de 5 a 90 mg/mL. O ensaio de atividade enzimática foi realizado nas condições padrões de temperatura e pH. Os dados obtidos a partir dessa incubação em diferentes concentrações foram utilizados para construir um gráfico com os valores reais de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima.

5 - Resultados e Discussão

5.1 - Isolamento do gene da α -amilase no vetor pGEM-Tamy e construção do vetor de clonagem TOPO-amy

O isolamento do gene da α -amilase de *B. licheniformis* DSM13 que estava clonado no vetor pGEM-T easy conforme realizado por Oliveira (2009), foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase. A amplificação do gene foi feita através dos pares de *primers* *Ramy* e *Famy* utilizando a enzima *High-Fidelity* (InvitrogenTM) que minimiza a possibilidade de erros na síntese de fragmentos de DNA de interesse. Para a reação, foram utilizadas duas amostras mais um controle negativo (Figura 12).

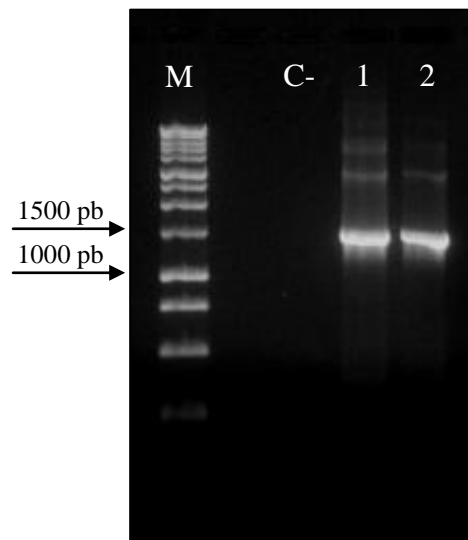


Figura 12. Perfil eletroforético da reação de amplificação do gene da α -amilase via PCR com os *primers* *Ramy* e *Famy*. Amostras 1 e 2 – gene α -amilase amplificado. C- (controle negativo da reação). M - Marcador de massa molecular de 1 Kb (Promega).

Conforme se observa no perfil eletroforético (Figura 12), os *amplicons* gerados nas duas amostras foram de aproximadamente 1500 pares de bases, resultados consistentes com os apresentados por Ivanova e colaboradores (1993), indicando que o gene da α -amilase de *B. licheniformis* foi totalmente amplificado. Também observamos algumas bandas inespecíficas no gel que não corresponde ao gene. Estas bandas podem ser removidas na reação de PCR por aumento da temperatura de anelamento dos iniciadores ou concentração de $MgCl_2$.

Na amplificação foram inseridos dois sítios de restrição correspondentes às endonucleases *Eco* RI e *Not* I nas extremidades 5' e 3' respectivamente. Essa inserção foi essencial para realizar a clonagem direcional do gene de interesse no vetor de expressão pPIC9, etapa que ocorreu subsequente a clonagem do gene ao vetor pCR[®]2.1-TOPO[®].

No final da reação da PCR a polimerase *High-Fidelity* adicionou na extremidade 3'OH do DNA uma desoxiadenosina o que possibilitou a ligação do gene no vetor de clonagem pCR[®]2.1-TOPO[®]. Essa ligação ocorreu pela ação da enzima topoisomerase I. O vetor TOPO-*amy* construído foi inserido em *E. coli* linhagem TOP10[™] para sua multiplicação. A seleção dos clones e a confirmação da construção do vetor foram realizadas em seguida.

5.2 - Análise de restrição e PCR do vetor construído TOPO-*amy*

As hospedeiras *E. coli* TOP10 foram transformadas por eletroporação com o vetor TOPO-*amy* e foram obtidos diversos transformantes que cresceram em meio de cultivo LB contendo 100 µg/mL do antibiótico ampicilina. Após foram selecionados aleatoriamente 14 clones para a realização da extração do DNA plasmidial.

A confirmação da sequência codificante da α -amilase no vetor TOPO via PCR pode ser observada na figura 13. Das 14 amostras utilizadas na reação, observamos a amplificação do gene em 10 clones. O tamanho esperado do *amplicon* também foi confirmado no perfil eletroforético.

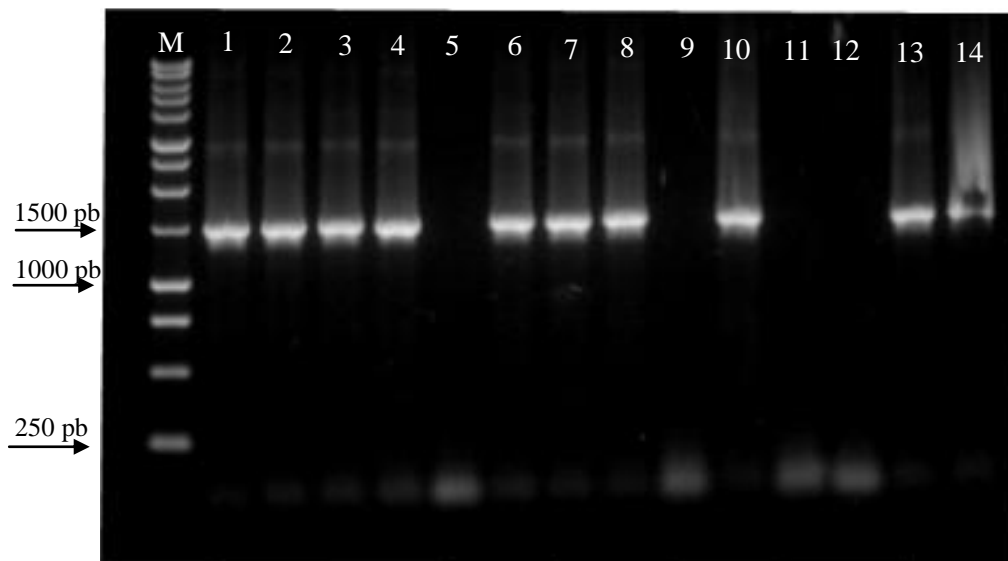


Figura 13. Análise dos produtos da PCR das amostras 1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 10; 13 e 14 que foram amplificados no vetor TOPO-*amy*. M - Marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas).

Após a reação da PCR, também foi realizada uma digestão analítica para a confirmação do inserto no vetor de clonagem. Foram utilizadas para a montagem do sistema de digestão as amostras 6, 7 e 13. Os plasmídeos foram duplamente digeridos com as endonucleases *Eco* RI e *Not* I, sendo também linearizado o vetor de expressão pPIC9 com as mesmas enzimas de restrição conforme mostrado na figura 14.

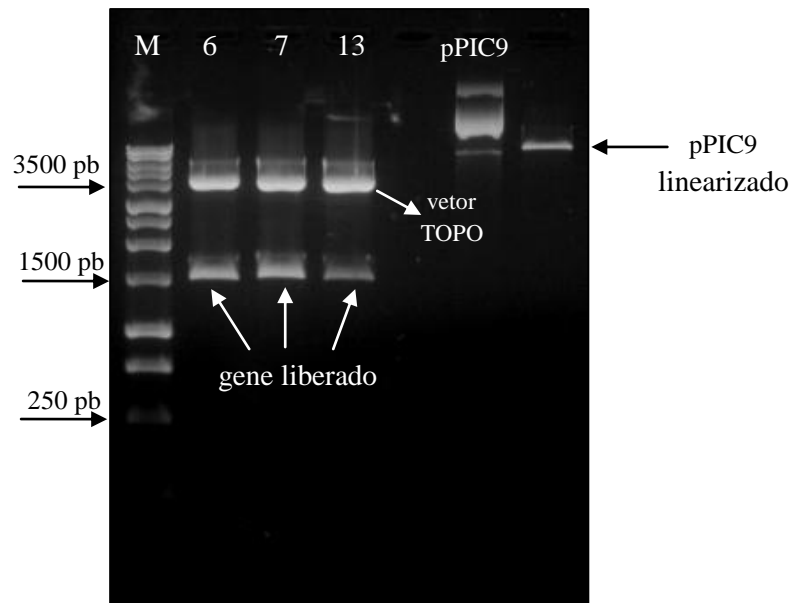


Figura 14. Análise do perfil de restrição dos plasmídeos recombinantes com as enzimas *Eco* RI e *Not* I das amostras 6, 7 e 13 e vetor de expressão pPIC9 linearizado. M – marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).

Podemos observar na figura 14 as flechas que indicam a liberação do inserto que apresenta massa molecular de aproximadamente 1500 pares de bases conforme o esperado. Também visualizamos o vetor linear TOPO com 3900 pb e a linearização do vetor de expressão pPIC9 afim de se obter extremidades coesivas semelhantes para direcionar a clonagem do gene neste vetor. As enzimas utilizadas no sistema foram escolhidas devido a inserção de seus respectivos sítios nas extremidades 5' e 3' do gene por PCR conforme descrito no item 5.1. Após a confirmação da construção do vetor TOPO-*amy*, foi realizado a construção do vetor de expressão pPIC-*amy*.

5.3 - Construção do vetor de expressão

Para a expressão do gene da α -amilase na levedura *P. pastoris* foi utilizado o vetor de expressão pPIC9. Na montagem do vetor de expressão os plasmídeos (6, 7 e 13) e o vetor pPIC9 foram novamente digeridos com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Not* I. Após a digestão, o gene liberado e o vetor de expressão linearizado foram purificados do gel de agarose. Os produtos da digestão purificados pelo *kit* da GE Helthcare foram visualizados analiticamente em gel de agarose 0,8% conforme mostrado na figura 15.

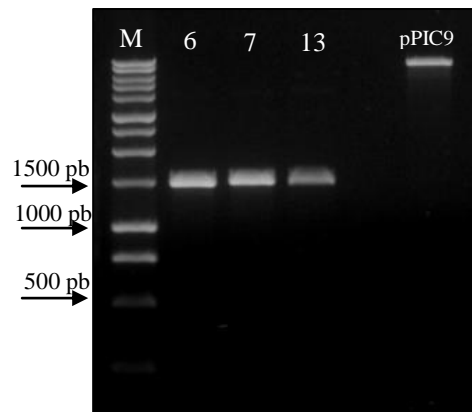


Figura 15. Perfil eletroforético dos produtos gênicos e do vetor de expressão pPIC9 purificados. M – marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).

O gene da α -amilase purificado foi subclonado ao vetor de expressão pela ação da enzima T4 DNA ligase. Na figura 16 observamos o perfil eletroforético do sistema de ligação. A primeira coluna demonstra o sistema sem a presença da enzima T4 ligase e na segunda coluna é visualizado o sistema de ligação. Observa-se uma grande diferença entre a altura da banda do sistema que contém a enzima ligase e a coluna que não contém, indicando que o resultado da ligação do gene ao vetor de expressão ocorreu de forma eficiente.

A ligação direcional do fragmento ao vetor foi realizada após a sequência promotora do gene AOX1. Na figura 17 é demonstrado o mapa físico do múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9. No mapa podemos observar os sítios das enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I, local correspondente a ligação do gene ao vetor. Também visualizamos a sequência sinal do fator alfa de *S. cerevisiae* responsável pelo endereçamento da proteína formada e a região de término de transcrição (TT) do gene AOX1, que foram mantidas após a subclonagem.

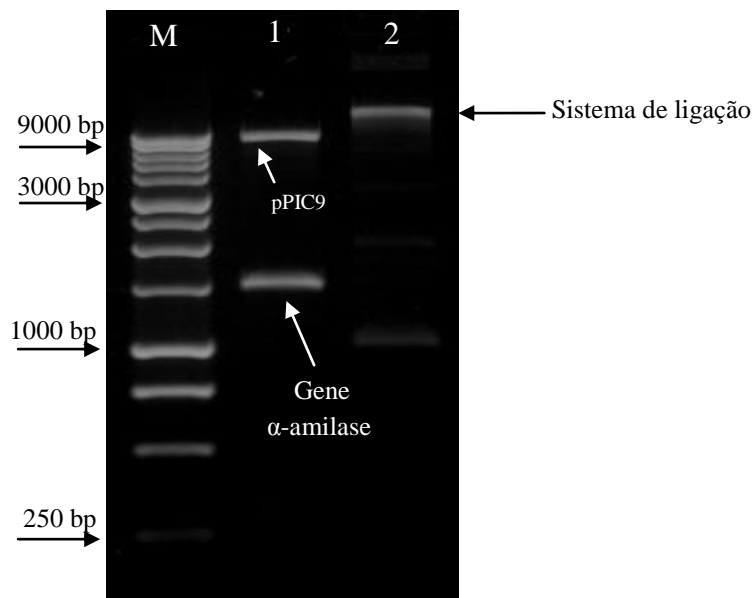


Figura 16. Perfil eletroforético da ligação do gene ao vetor de expressão. Coluna 1 - sistema sem enzima ligase. Coluna 2 - Sistema contendo a enzima T4 ligase após a ligação. M - Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).

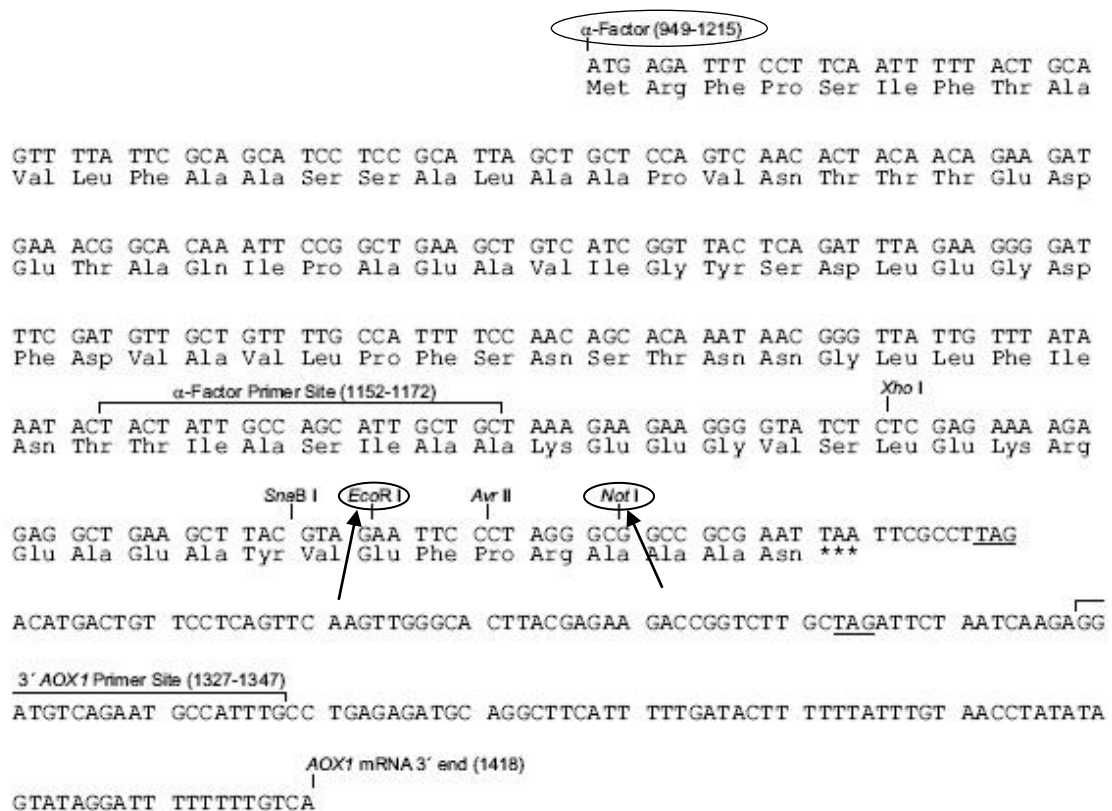


Figura 17. Mapa físico do múltiplo sítio de clonagem (MSC) do vetor de expressão pPIC9. Setas demonstram os sítios de restrição para clonagem do gene de interesse.

5.4 - Análise da construção do cassete de expressão pPIC-*amy*

O sistema de ligação foi precipitado e as hospedeiras da linhagem DH10B foram transformadas por eletroporação. Após a transformação, treze colônias foram selecionadas aleatoriamente do meio de cultivo contendo ampicilina. Procedeu-se então a extração do DNA plasmidial e a confirmação da construção do cassete de expressão via PCR e análise de restrição.

Na reação da PCR foram utilizados os iniciadores AOX que possui sequencias específicas de anelamento do múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9 possibilitando a amplificação do gene de interesse. O resultado da PCR é observado na figura 18, onde 11 clones apresentaram a banda correspondente ao gene do presente estudo. O tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 2000 pares de bases, tamanho plausível com o local de anelamento dos *primers* no MSC do vetor.

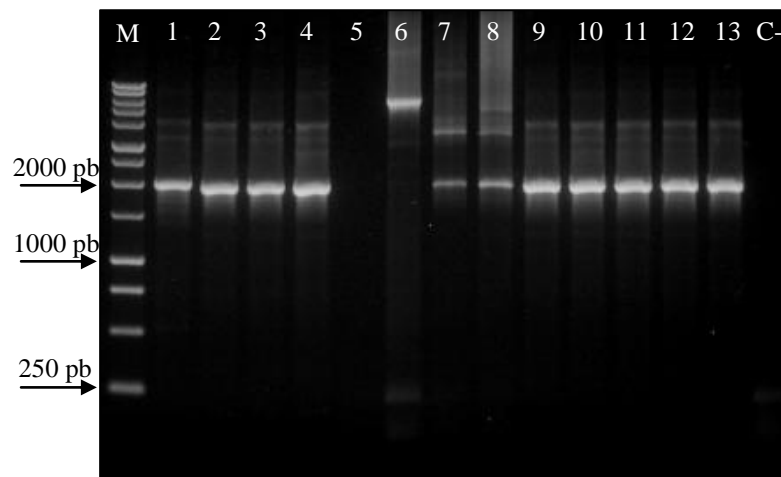


Figura 18. Perfil eletroforético do resultado da PCR dos clones recombinantes contendo o cassete de expressão. As amostras 5 e 6 não apresentaram o *amplicon* de tamanho esperado. (C-) controle negativo da reação. M = Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas).

Para maior confiabilidade do resultado da construção do plasmídeo recombinante pPIC-*amy* realizou-se a análise de restrição com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. O resultado dessa digestão foi avaliado em gel de agarose que revelou o fragmento liberado correspondente ao gene de estudo e o vetor de expressão com o tamanho esperado de 8000 pares de bases, assim como representado na figura 19. Com esse resultado foi confirmada a correta construção do cassete de expressão.

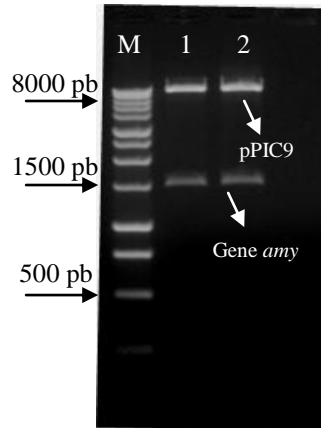


Figura 19. Análise de restrição do cassete de expressão pPIC9-*amy*. Amostras 1 e 2 confirmando a correta construção do vetor com o tamanho das bandas esperadas. M - Marcador de massa molecular 1Kb (Fermentas).

Os onze clones que apresentaram a banda de tamanho esperado tiveram seu DNA plasmidial quantificado em espectrofotômetro Nanodrop. Os clones 3, 12 e 13 foram escolhidos para transformar a levedura *Pichia pastoris*. A quantidade de DNA determinada foi de 224,8; 230,1 e 288,6 ng/ μ L respectivamente.

5.5 - Linearização do Plasmídeo de expressão pPIC9-*amy* e transformação da levedura

A figura 20 mostra a linearização do vetor dos três clones utilizados para transformar a hospedeira. Na primeira coluna visualizamos o vetor circular, nas colunas 2, 3 e 4 observamos duas bandas. A banda superior corresponde ao cassete de expressão com extremidades *AOX1* e a banda inferior corresponde ao fragmento de menor massa molecular, possuindo sequencias de origem de replicação em *E. coli*, o gene de resistência a ampicilina dentre outras.

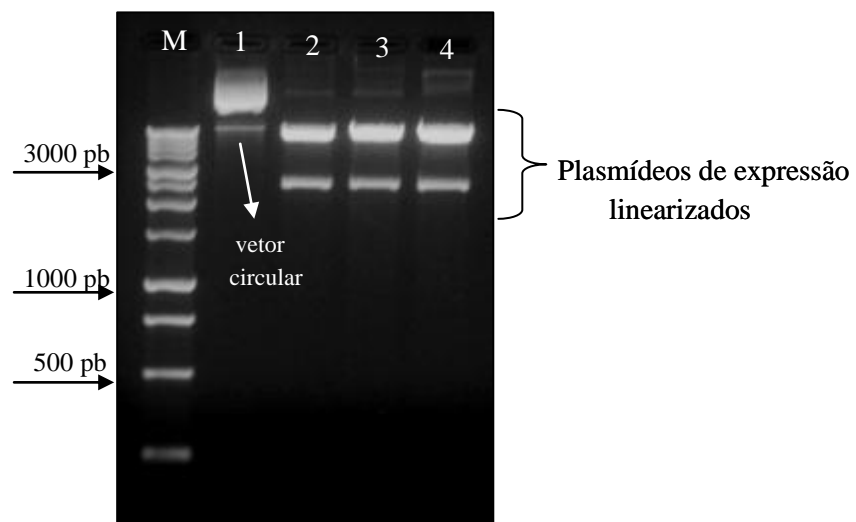


Figura 20. Perfil eletroforético dos produtos da digestão com a enzima de restrição *Bgl* II. M-Marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).

A linearização do vetor de expressão permite que a integração ocorra de forma mais eficiente no genoma da hospedeira. Esta linearização pode ser realizada nos diferentes sítios correspondentes às enzimas *Sac* I, *Stu* I, *Sal* I, *Not* I, e *Bgl* II (Invitrogen, 2002). O sítio de restrição escolhido foi correspondente à enzima *Bgl* II. Essa enzima possui dois sítios de clivagem que flanqueiam a região promotora 5' *AOXI* e a região 3' *AOXI* do vetor de expressão. Nesta estratégia podem ocorrer integrações de adição ou substituição gênica por eventos de simples ou duplo *crossing-over* entre as regiões do vetor e do genoma. Isto resulta na obtenção de dois fenótipos da levedura *P. pastoris* (Mut^+ ou Mut^S).

Segundo Cregg e colaboradores (1993), a levedura metilotrófica *P. pastoris* linhagem GS115 não apresenta em seu material genético vetores episomais. Com isso, para que ocorra a expressão de genes exógenos na levedura, é fundamental a integração do material genético no seu genoma.

De acordo com Daly e Hearn (2005) a integração do cassete de expressão ocorre em *locus* específicos no genoma da levedura o que gera transformantes geneticamente estáveis. Essa integração pode ocorrer por inserção ou substituição de genes por recombinação homóloga.

A introdução do cassete de expressão no cromossoma da levedura pode ser alcançado por diversas maneiras, incluindo a formação de esferoplastos, eletroporação e tratamentos com cloreto de lítio. No presente estudo a transformação da levedura foi feita por eletroporação com aproximadamente 5 μ g de DNA e os transformantes que cresceram por meio de seleção auxotrófica são mostrados na figura 21.

Ao todo foram selecionados 96 clones transformantes (His^+) capazes de crescer em meio mínimo para realizar os testes quanto à produção da enzima recombinante.

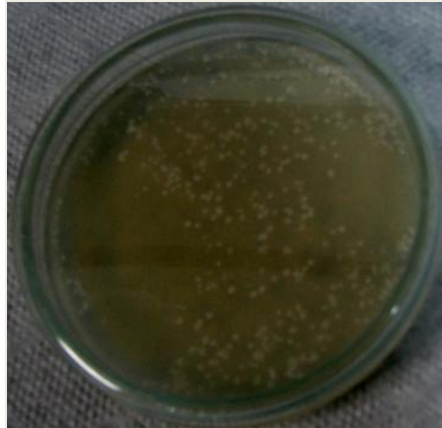


Figura 21. Fotografia mostrando os transformantes da levedura *P. pastoris* no meio de cultivo MD após eletroporação com o vetor de expressão.

5.6 - Seleção dos clones produtores da α -amilase de *B. licheniformis* em meio sólido

A seleção dos clones produtores da enzima recombinante foi feita com os 96 transformantes previamente selecionados, sendo que destes, 80,2 % foram considerados produtores. Os noventa e seis clones foram divididos em 4 placas e após o período de indução com metanol, foi feita a revelação dos halos com vapor de iodo. Na figura 22 observamos uma placa de Petri contendo 20 clones que produziram halos ao redor da colônia, 3 clones não produtores e um controle positivo de α -amilase de *B. subtilis*.

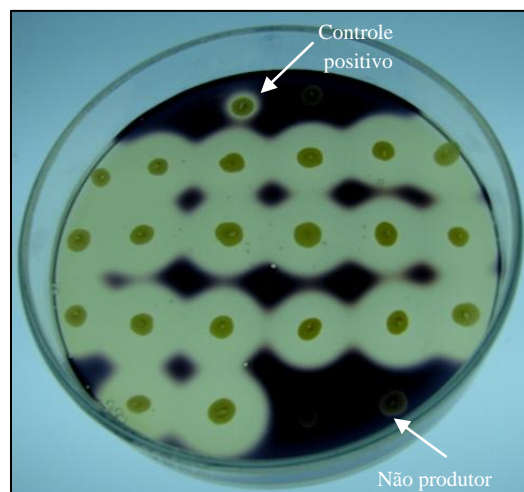


Figura 22. Fotografia mostrando a revelação com vapor de iodo dos clones produtores da enzima recombinante. Visualização dos halos formados após indução das leveduras.

De acordo com Astolfi Filho e colaboradores (1986), a α -amilase produzida tem a capacidade de clivar o amido que ao ser corado com vapor de iodo revela a formação de halos

translúcidos ao redor das colônias. As regiões circundantes dos clones que não produzem a enzima coram-se de roxo.

A pequena diferença no tamanho dos halos apresentados na figura 22 pode estar relacionada com a variação do número de cópias do cassete de expressão contendo o gene da α -amilase integrado por adição no cromossomo da levedura (Kato *et al.*, 2001).

O índice de amilolise é o resultado da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. Foram escolhidos nove clones que apresentaram os maiores índices para a expressão da enzima recombinante em meio líquido. Os índices de amilolise dos nove clones selecionados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Índice de amilolise dos nove clones utilizados nos testes de cinética enzimática e produção da enzima em meio líquido.

Clone	Índice de amilolise (dh^2/dc^2)
A5	10,75
A7	10,04
B8	12,67
B20	11,98
C13	10,79
C22	10,07
D10	10,36
D14	11,74
D17	11,81

Observamos que o maior índice apresentado foi correspondente ao clone B8, enquanto que o menor foi aferido do clone A7. Após o cálculo dos índices de amilolise, os nove clones selecionados foram então utilizados na indução da enzima recombinante em meio líquido.

5.7 - Produção de α -amilase em meio líquido e cinética de indução

A indução da expressão da α -amilase teve a duração de 120 horas e nesse período foi avaliado o crescimento celular de todos os clones. Os dados obtidos nesse experimento podem ser observados na figura 23 onde é mostrado o aumento progressivo da atividade enzimática em relação ao tempo de indução dos nove clones.

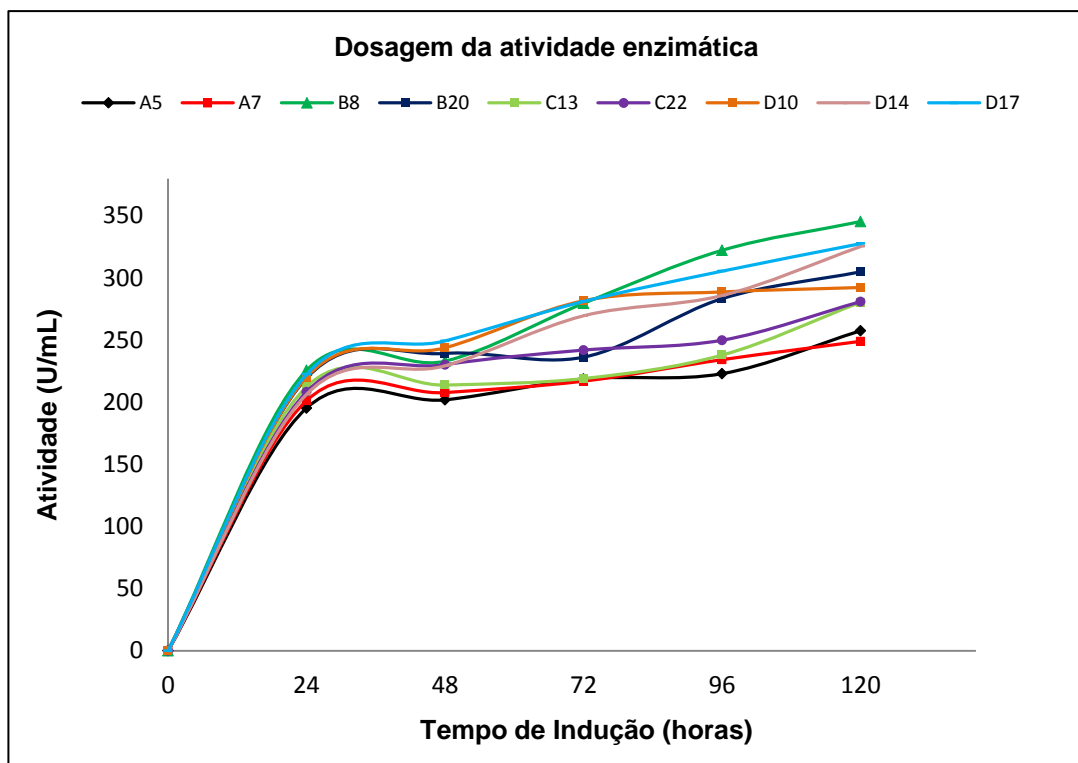


Figura 23. Cinética de indução enzimática com os nove clones produtores da enzima recombinante.

A α -amilase recombinante de *B. licheniformis* secretada pelos clones, apresentou maior atividade enzimática ao final das 120 horas de indução, porém foi observada uma variação da atividade nos sobrenadantes dos clones testados. De acordo com os dados obtidos, o clone B8 foi o que exibiu a maior atividade enzimática entre os sobrenadantes testados (345,4 U/mL), enquanto que o clone A7 obteve o menor valor de atividade enzimática (248,9 U/mL).

Os resultados da atividade enzimática dextrinizante obtido com o clone B8 (345,4 U/mL) são superiores aos demonstrados por autores que utilizaram outros micro-organismos para a expressão da enzima α -amilase, utilizando cultura em frascos com agitação.

Zhang e colaboradores (2001) expressaram α -amilase em *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o promotor *SUC2*. A atividade relativa máxima obtida em 35 horas de produção foi de 11,8 U/mL.

Outros trabalhos também contextualizam a menor atividade obtida em relação ao presente estudo. Os autores Hmidet *et al.*, (2008) clonaram, expressaram e purificaram a enzima α -amilase de *Bacillus licheniformis* na hospedaria *E. coli*, obtendo uma atividade máxima de 178,5 U/mg após sua purificação.

A produção da enzima α -amilase tem sido relatada em diversos trabalhos. A enzima pode ser expressa em diversos micro-organismos recombinantes ou ser produzida utilizando diferentes estratégias. Nestes estudos observamos à análise das atividades relativas e específicas da enzima recombinante.

A atividade da α -amilase de *Pyrococcus furiosus* expressa em *E. coli* teve sua atividade específica relatada a 3,9 U mg⁻¹ a 98 °C (Dong *et al.*, 1997). Shiina e colaboradores (2007) relataram a expressão da α -amilase de *B. stearothermophilus* em *E. coli* transformada com o vetor pHI301A. Segundo esses autores a maior atividade enzimática obtida foi de 8,2 U/mL em 13 horas de indução. Os autores Shahhoseini e Ghaemi (2003) analisaram a atividade da α -amilase de *B. licheniformis* transformando *E. coli BL21* com o vetor de expressão pMSH320. Após 15 horas de indução foi descrito uma atividade específica de 2,35 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína no sobrenadante e 4,31 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína na fração intracelular.

A expressão da α -amilase de organismos eucariotos também é descrita na literatura. Choi e Park (2006) expressaram a α -amilase de glândulas salivares de ratos em *Pichia pastoris*. A atividade da enzima não purificada, utilizando metanol como única fonte de carbono chegou a 720 U/mL em 3 dias de indução.

A variação no perfil da atividade enzimática obtida nos sobrenadantes dos clones do presente estudo pode ser explicada por diversos fatores que estão relacionados com a produção de proteínas pelo sistema de expressão heterólogo, assim como pela simples composição do meio de cultivo, fisiologia e viabilidade genética das células. Dentre estes também podemos citar a sequência sinal que é responsável pela secreção do produto expresso. A sequência sinal é de extrema importância para o correto endereçamento da proteína secretada e para o correto processamento da proteína madura sem que suas funções biológicas sejam alteradas (Paifer *et al.*, 1994). Essa variação é semelhante às variações observadas na formação dos halos formados em meio sólido e já foi descrita em outros trabalhos com expressão de amilases em *P. pastoris* (Uehara *et al.*, 2000).

5.7.1 - Relação entre densidade celular e a atividade enzimática

A relação entre a densidade celular e a atividade enzimática dos clones B8 e A7, podem ser visualizadas nas figuras 24 e 25. Esses clones foram aqueles que apresentaram a maior e menor atividade enzimática, respectivamente, nos testes de indução em meio líquido. A densidade celular medida em g/L do clone B8 foi de 1,55 g/L e a densidade do clone A7 foi de 1,34 g/L. Podemos observar pelas curvas de crescimento das leveduras que a cultura permaneceu em fase exponencial de crescimento celular.

A estratégia de indução foi realizada por metanol que além de induzir a expressão do gene de interesse, também determina a taxa de crescimento específico das leveduras sendo um dos fatores mais importantes para maximizar a produção da proteína recombinante, uma vez que todas as reações bioquímicas para a formação de produtos são direta ou indiretamente associada ao crescimento celular (Zhang, 2000).

As curvas correspondentes às atividades enzimáticas dos clones B8 e A7 visualizadas nas figuras 24 e 25 também mostram que não houve queda na ação catalítica ao final da indução no tempo de 120 horas. A influência de fatores como a liberação de proteases endógenas após a morte celular das leveduras que poderiam atacar a enzima recombinante comprometendo sua conformação proteica total ou simplesmente modificando o seu sitio de ação catalítica pode ter sido ínfima, não comprometendo a taxa da atividade enzimática.

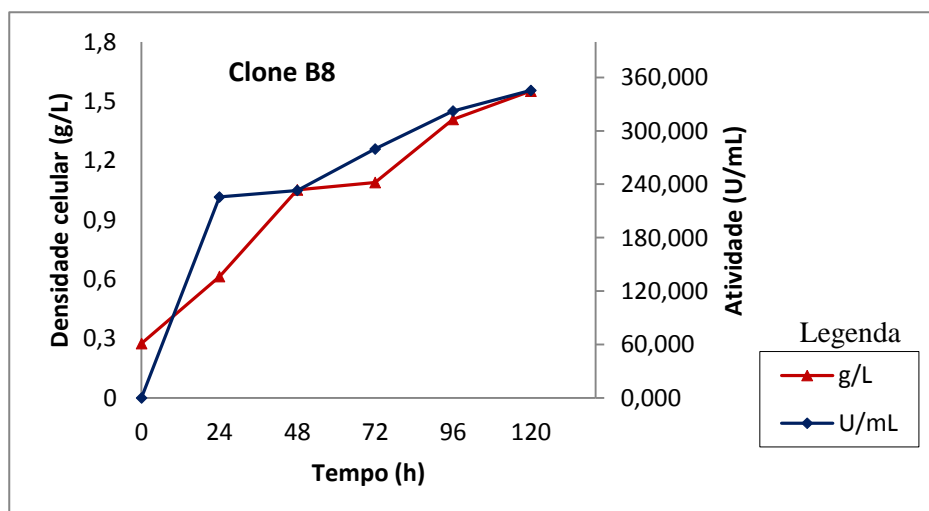


Figura 24. Gráfico dos níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone B8.

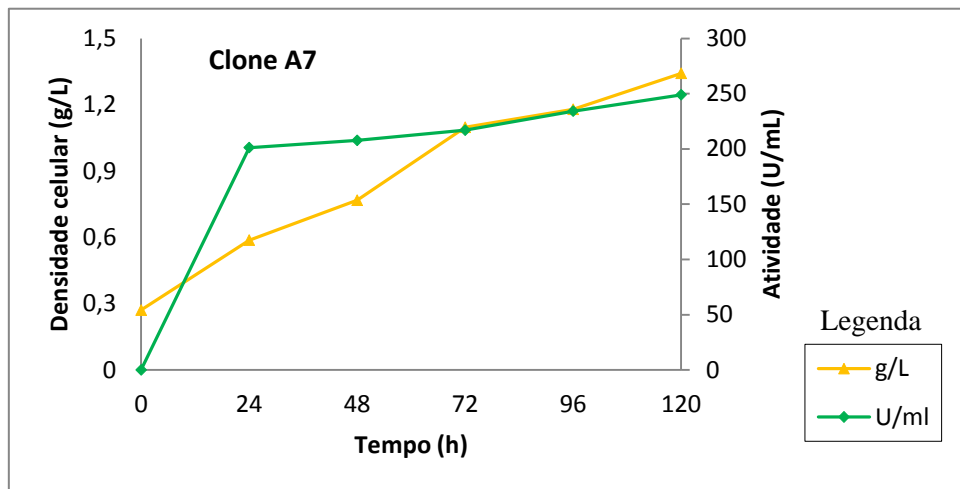


Figura 25. Gráfico dos níveis de secreção da proteína recombinante relacionada com a densidade celular do clone A7.

Observamos também o comportamento de um aumento progressivo dos valores da atividade nas primeiras 24 horas de indução. Esse tipo inclinação sugere que o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente (Torres e Moraes, 2001).

5.8 - Análise em gel SDS-PAGE da enzima secretada

As proteínas recombinantes secretadas pelos nove clones foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), onde foi possível visualizar duas bandas correspondentes à enzima α -amilase que estão indicadas por duas setas (Figura 26). Observamos também o controle negativo da expressão representado pelo clone GS115. O perfil de bandas dos clones analisados no presente trabalho teve variações quanto a massa molecular. Esta variação foi de 65 a 74 kDa aproximadamente.

A massa molecular da enzima recombinante de *B. licheniformis* observada no presente estudo difere de trabalhos reportados com a mesma enzima. Sibakov e Palva (1984) isolaram e clonaram o gene da α -amilase de *B. licheniformis* linhagem ATCC 14580 no vetor do bacteriófago λ 1059. Segundo os autores, a enzima apresentou uma massa molecular de 58 kDa. Kim e colaboradores (1992), isolaram e clonaram o gene correspondente a mesma enzima no vetor pBR322 e expressaram em *E. coli*. Eles reportaram a massa molecular da α -amilase foi de 64 kDa. Hmidet e colaboradores (2008), também expressaram o gene que

codifica para enzima α -amilase de *B. licheniformis* linhagem NH1 na hospedeira *E. coli* BL21. Eles reportaram a massa molecular de 58 kDa da enzima purificada. Na literatura também encontramos citações de algumas linhagens de *B. licheniformis* que apresenta a enzima α -amilase com massa molecular bastante distinto. Krishnan e Chandra (1983), purificaram e caracterizaram a enzima α -amilase da linhagem CUMC305 e estimaram sua massa molecular correspondente a 28 kDa.

No presente estudo, foram observadas bandas correspondentes a proteínas com diferentes massas moleculares. A diferença observada nas massas moleculares das bandas dos clones analisados pode ser explicada pela glicosilação efetuada pela levedura durante o amadurecimento proteico. A glicosilação é a modificação pós-traducional mais comum que precede a secreção de proteínas e ocorre no lúmen do retículo endoplasmático. A levedura *Pichia pastoris* é capaz de realizar ambos os tipos de glicosilação (O- e N-Linked) (Goochee *et al.*, 1991; Daly e Hearn, 2004).

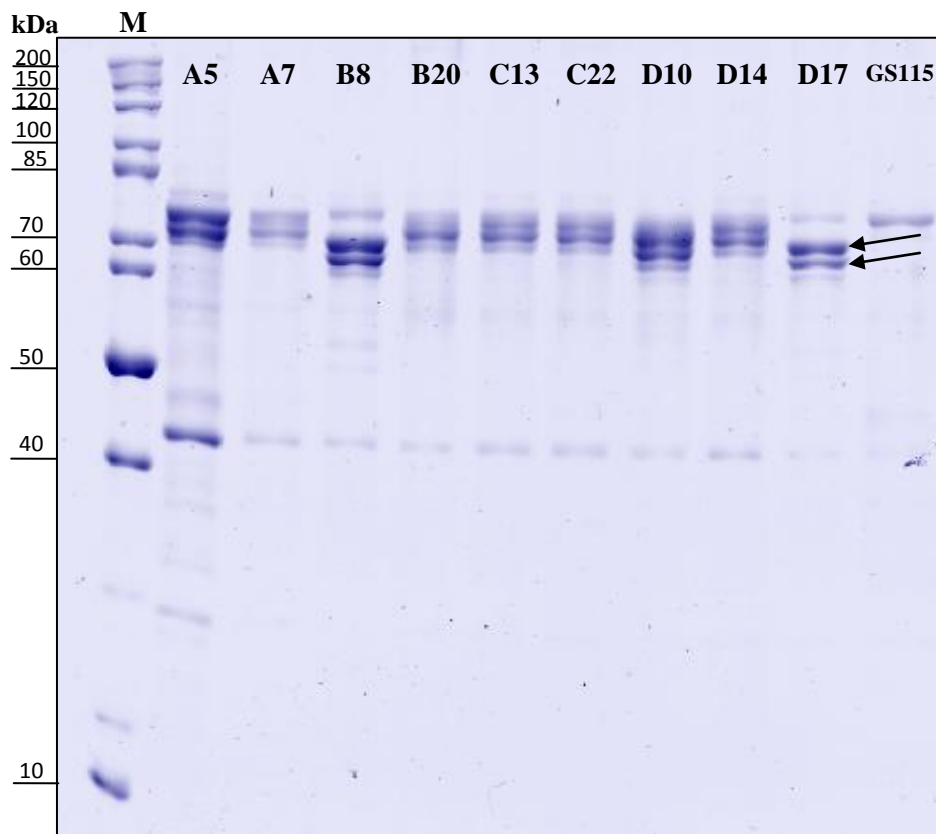


Figura 26. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE da enzima recombinante secretada pelos nove clones. Clone GS115 controle negativo da expressão. Setas indicam as bandas correspondentes à enzima secretada. M – Marcador de massa molecular (10-200 kDa).

Uma observação importante é com relação aos clones B8 e D17 (figura 26). Pela análise do gel notamos que entre os clones analisados foram os que menos glicosilaram. Porém nos testes de atividade enzimática foram os clones que exibiram maiores atividades. Esse resultado sugere que o processo de glicosilação de uma enzima de origem procariótica pode acarretar em redução da atividade enzimática.

O resultado da cinética de expressão da enzima secretada é mostrado na figura 27. Podemos observar pela intensidade das bandas que a máxima expressão ocorre no tempo de 120 horas de indução, resultados consistentes aos demonstrados no item 5.7. Observamos também que o controle negativo da expressão (clone GS115) apresenta algumas bandas que corresponde a proteínas endógenas da levedura *P. pastoris*. Essas bandas não são visualizadas nos clones recombinantes, que passam a ter sua maquinaria genética voltada para expressão da proteína heteróloga.

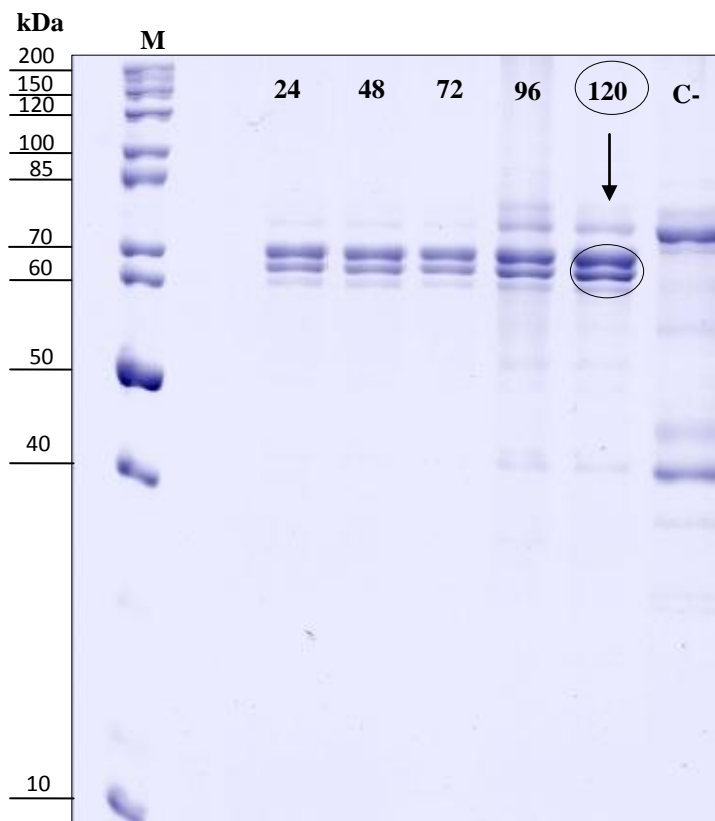


Figura 27. Cinética de expressão do clone B8 nos diferentes tempos de indução (24, 48, 72, 96 e 120 horas). C-: Controle negativo da expressão. M – Marcador de massa molecular.

5.9 – Caracterização enzimática

5.9.1 – Determinação do pH ótimo da ação catalítica

A enzima recombinante secretada pelos clones A5, B8 e D14 foi avaliada em diferentes pHs a fim de determinar o pH ótimo de atividade. Os dados mostram que a enzima secretada apresenta melhor funcionalidade em pH neutro, mantendo alta atividade relativa na faixa que vai de 7,0 a 8,0, tendo o máximo de atividade enzimática em pH 7,0 para os 3 clones analisados (Figura 28).

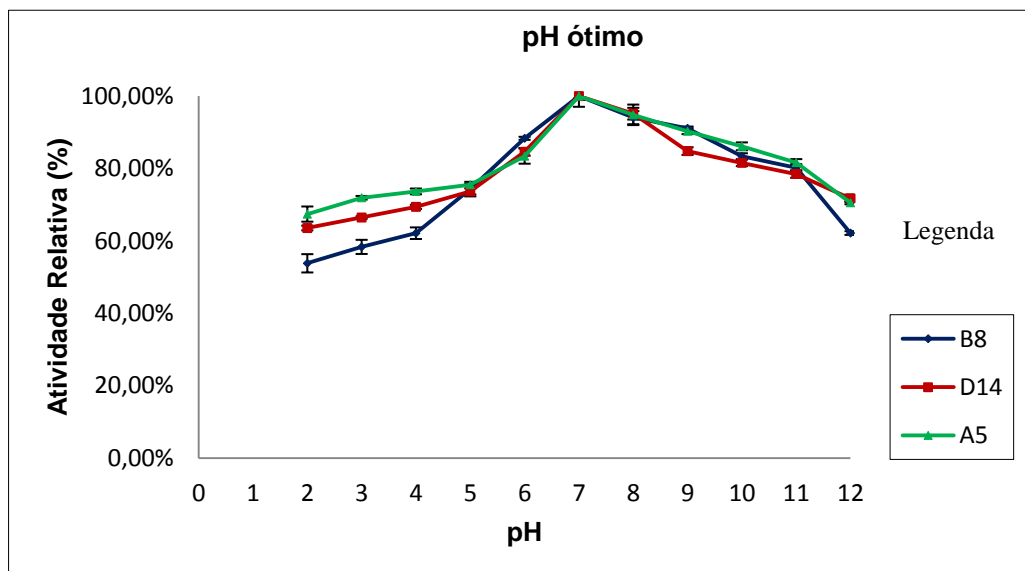


Figura 28. Efeito do pH sobre a atividade de α -amilase produzida pelos clones A5, B8 e D14.

Variação de pH ótimo para a atividade relativa da enzima α -amilase de *B. licheniformis* tem sido citado na literatura. Saito (1973) relatou que uma cepa de *B. licheniformis* isolada do solo produziu uma α -amilase com atividade relativa estável medida entre o pH 6,0 e 11,0. Morgan e Priest (1981) caracterizaram uma α -amilase termoestável da cepa de *B. licheniformis* NCIB 6346 e verificaram que a sua atividade era estável entre o pH 7,0 e 10,0, tendo seu pH ótimo em 7,0, valor que corresponde ao descrito no presente estudo.

Os autores Medda e Chandra (1980) também estudaram a atividade da enzima da cepa CUMC305 de *B. licheniformis* e verificaram que a enzima mostrou uma ampla faixa de atividade nos pHs de 4,0 a 10, mantendo uma atividade substancial na faixa alcalina, tendo o seu pH ótimo medido em 9,5. Hmidet e colaboradores (2008) relataram que a α -amilase do

mesmo microrganismo expressa em *E. coli* teve seu pH ótimo aferido em 6,5, no entanto em pH 7,0 a enzima reteve 95% de sua atividade máxima. Outros estudos realizados com a caracterização da α -amilase de duas linhagens de *B. licheniformis*, sendo uma mutante e outra selvagem, revelaram um pH ótimo para a atividade enzimática igual a 6,0. Segundo o estudo, a enzima da linhagem mutante exibiu atividade em faixas mais amplas de pH comparado com a linhagem selvagem (Lee *et al.*, 2006).

No presente estudo, a enzima também mostrou-se ativa em pHs alcalinos nos três clones analisados, retendo cerca de mais de 80% de sua atividade nos pHs 9,0 e 10,0 (Figura 28). Em algumas indústrias, como por exemplo a de detergentes, α -amilases com atividade em pHs alcalinos são muito utilizadas (Gupta, 2003).

5.9.2 - Efeito da temperatura e termoestabilidade sob a atividade enzimática

O efeito da temperatura sob a atividade enzimática da enzima recombinante é visualizado na figura 29. A temperatura ótima em que a enzima obteve a máxima atividade hidrolisante para os três clones analisados foi em 70 °C. No entanto podemos observar que na temperatura de 80 °C a enzima reteve cerca de 80% de sua atividade relativa para os clones A5 e D14 e 89,74% para o clone B8. Na temperatura de 90 °C sua atividade foi aferida em aproximadamente 75% para os clones B8 e D14 e 71,97% para o clone A5. Essas variações na atividade enzimática relativa dos três clones analisados em relação ao efeito da temperatura podem estar relacionadas com pequenas diferenças no processamento da enzima realizado pelo sistema de expressão/secreção de *P. Pastori* e também devido a taxa de produção.

Alguns trabalhos relatados na literatura mostram diferentes temperaturas em que a enzima α -amilase de *B. licheniformis* age no substrato, sendo que algumas destas são caracterizadas como termoresistentes. Tomazic e Klibanov (1988) demonstram que uma α -amilase caracterizada teve sua temperatura ótima em 90 °C. Segundo esses autores, a termoresistencia pode estar relacionada com interações iônicas adicionais envolvendo alguns resíduos específicos de lisina (Lys-385 e Lys-88 ou Lys-253).

Encontramos também citações de temperaturas ótimas para α -amilase de *B. licheniformis* abaixo de 50 °C. Saito e Yamamoto (1975) reportaram que a temperatura ótima caracterizada para a enzima foi de 45 °C. Em trabalhos recentes, Hmidet e colaboradores (2008) relataram a temperatura ótima de 90 °C para enzima, sendo que na temperatura de 100 °C a enzima ainda reteve 95% de sua atividade. Morgan e Priest (1981) relataram que a

enzima da cepa NCIB 6346 obteve a máxima atividade na temperatura de 70 °C, assim como a temperatura descrita no presente trabalho como é mostrado na (Figura 29).

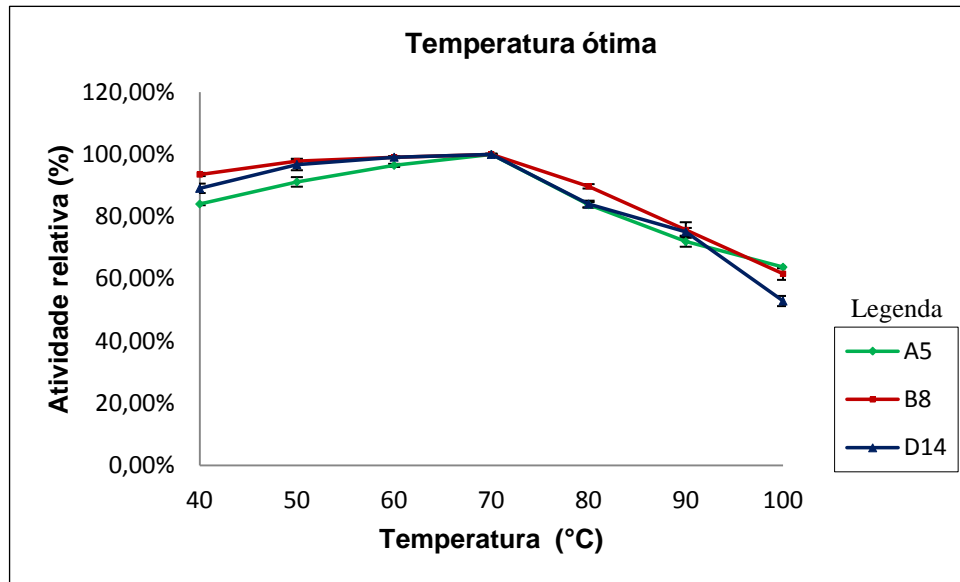


Figura 29. Gráfico mostrando o efeito da temperatura sob a atividade relativa da α -amilase. Máxima atividade aferida em 70 °C pelos três clones analisados.

Após os testes do efeito da temperatura sob a atividade, foi realizada a análise da estabilidade térmica da enzima. Os testes de termoestabilidade com o clone B8 nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C com presença ou ausência do íon cálcio são demonstrados na figura 30. Na temperatura de 60 °C com a presença de 5 mM de CaCl_2 , observamos que a enzima manteve 100% de sua atividade após uma hora de incubação. Na temperatura de 70 °C após os 60 minutos de incubação, notamos que sem a presença de cálcio a enzima reteve 47,4% de sua atividade, enquanto que na presença do íon, a enzima reteve 81,8% de sua atividade. Já na temperatura de 80 °C com a presença do íon, a enzima teve 42,6% de sua atividade relativa retida após o período de incubação. Este resultado comprova que o íon Ca^{2+} exerce grande influência na estabilidade da enzima nas temperaturas analisadas.

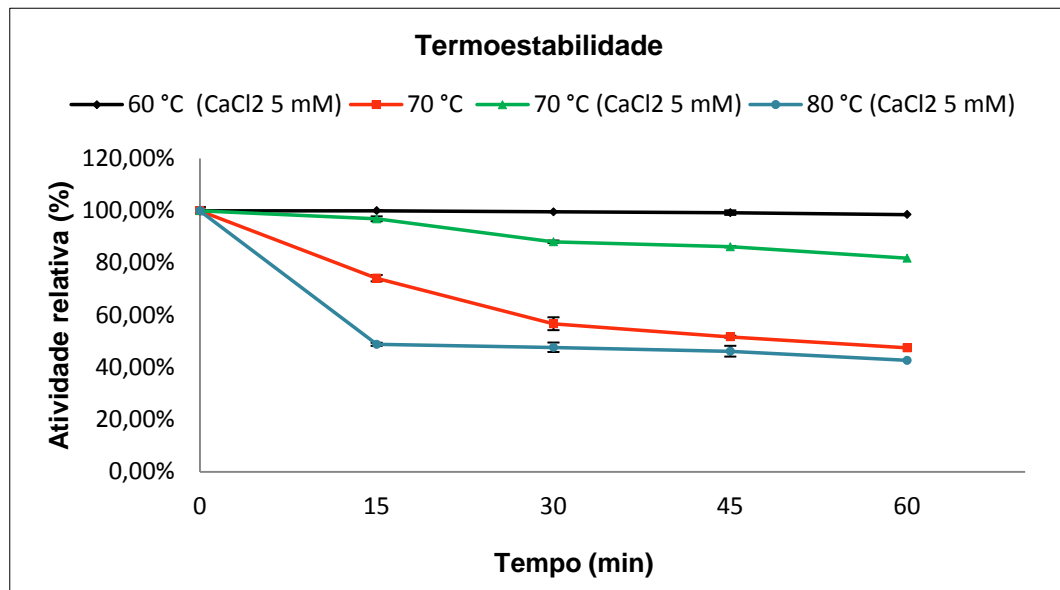


Figura 30. Termoestabilidade da enzima α -amilase incubada por 60 minutos nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C.

Muitos trabalhos com a adição do íon cálcio para aumentar a termoestabilidade da enzima α -amilase são reportados na literatura. Ivanova e colaboradores (1993) incubaram a enzima na presença de 1,0 mM e 5,0 mM do íon Ca^{2+} . Segundo os autores, os dados para a atividade residual após a incubação da enzima a 85 °C em tampões contendo diferentes concentrações de CaCl_2 , mostrou que o cálcio é um estabilizador da enzima. A meia-vida da enzima foi de 30 minutos na presença de 1,0 mM e mais de 120 minutos quando aumentaram a concentração para 5,0 mM de CaCl_2 . Declerck e colaboradores (2003) investigaram a possibilidade de aumentar ainda mais a termoestabilidade das variantes Q264S–N265Y da enzima α -amilase de *B. licheniformes*. A termoestabilidade das enzimas do tipo selvagem e mutante foi testado medindo as atividades residuais após incubação em alta temperatura seguido por um período de resfriamento em gelo. Os autores acrescentaram a concentração de 0,1 mM de CaCl_2 nos extratos enzimáticos diluídos e verificaram que o íon também influencia na estabilidade da enzima. É relatado também pelos autores que mutações pontuais na estrutura da enzima como substituições combinadas de sete aminoácidos, podem aumentar em até 23 °C a estabilidade da enzima em relação a enzima do tipo selvagem. Mutações do tipo Asn172Arg (N172R) induziu um aumento de 2 vezes na meia-vida da enzima a 80 °C. Assim como mutações His156Tyr (H156Y) e Ala181Thr (A181T) foram identificadas pela indústria

Novozymes (Dinamarca) que aumentam o desempenho da α -amilase de *B. licheniformis* nos processos industriais com relação a estabilidade térmica (Bisgard-Frantzen *et al.*, 2000).

Como se observa, a variação da atividade relativa em diferentes temperaturas ou a estabilidade térmica da enzima recombinante está relacionada com diversos fatores que agem no processamento ou na estrutura da enzima, possibilitando produtos com características diferenciadas.

5.9.3 - Estabilidade da α -amilase a 4°C

A figura 31 mostra os dados da estabilidade da enzima recombinante na temperatura de 4 °C. Segundo a análise dos dados, após o período de 60 dias de estocagem a enzima teve apenas 5% de perda da sua atividade catalítica. Essa perda se iniciou a partir dos 30 dias de armazenagem. A atividade relativa máxima medida no último dia de incubação foi de 95,83%.

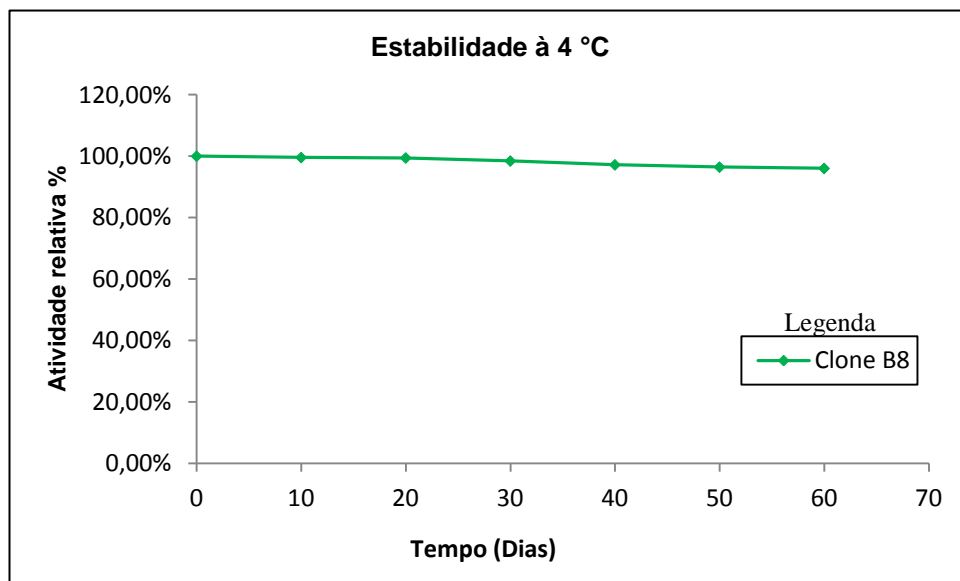


Figura 31. Gráfico mostrando a estabilidade da enzima α -amilase em função do tempo de incubação à 4 °C. ANOVA-Dunnett ($p < 0,0001$).

Este resultado se torna interessante para indústrias que necessitam armazenar as enzimas, visto que quase toda a atividade enzimática é mantida por um período de dois meses de armazenagem a 4 °C.

5.10 - Parâmetros cinéticos da enzima recombinante (K_m e $V_{máx}$)

Na figura 32 é demonstrado o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação catalisada pela enzima α -amilase. O aumento da concentração do substrato eleva a velocidade de reação até um determinado ponto e após observa-se a saturação da enzima. Na verificação dos parâmetros cinéticos aparentes (K_m e $V_{máx}$) da enzima não purificada, foi utilizado apenas o extrato bruto do clone A7.

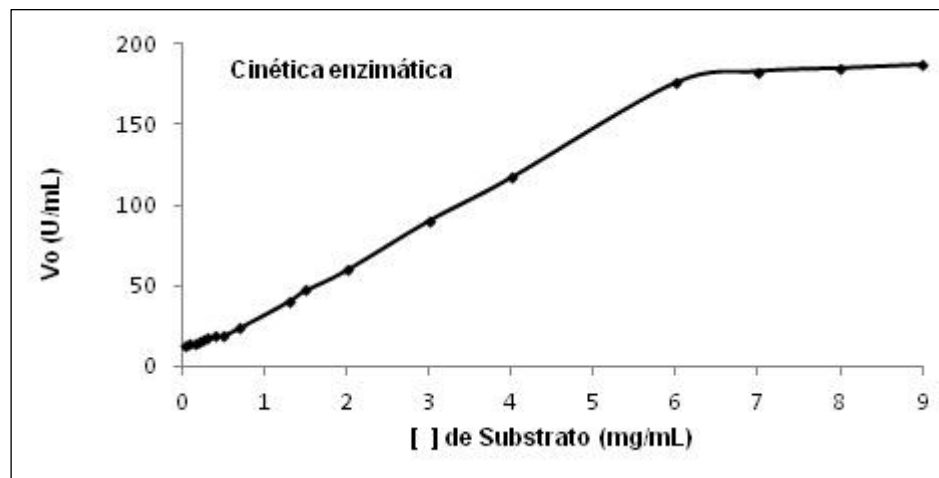


Figura 32. Gráfico da concentração do substrato em função da velocidade inicial da reação obtidos a partir do clone A7.

Os valores de K_m e $V_{máx}$ aparentes foram calculados a partir da construção do gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk que está representado na figura 33. Esse tipo de gráfico é resultado da relação dos valores inversos dos eixos velocidade inicial (V_0) e concentração do substrato $[S]$. A linha 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 $V_{máx}$. O sobrenadante avaliado apresentou K_m aparente no valor de 10,74 mg/mL e $V_{máx}$ igual a 416,66 U/mL.

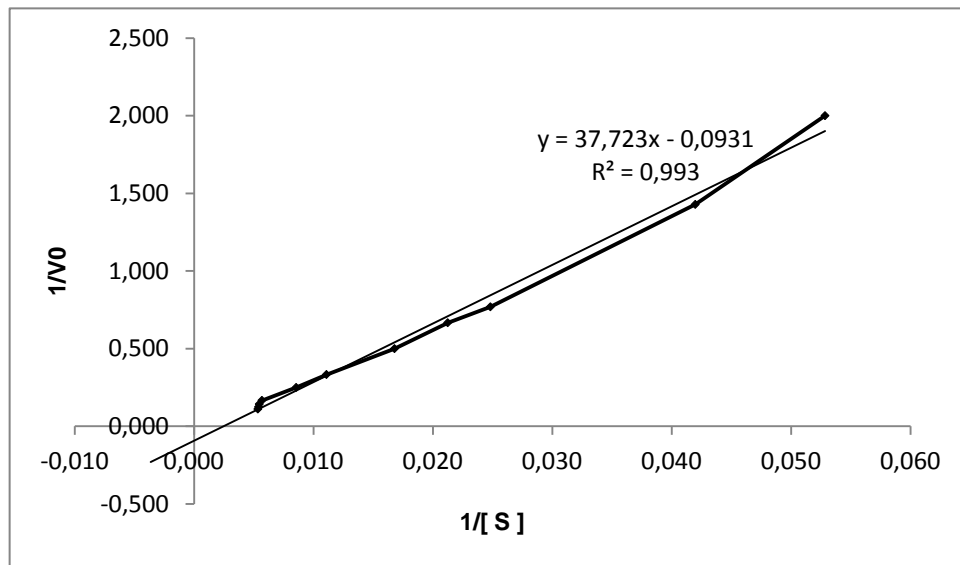


Figura 33. Gráfico dos duplos recíprocos obtido pela cinética enzimática do clone A7.

O valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) é muito importante na caracterização da cinética enzimática indicando a quantidade necessária de substrato para saturar a enzima. Diferentes valores destes parâmetros cinéticos são encontrados na literatura. Müller (2008) caracterizando alfa-amilase de *B. subtilis* produzida em *P. pastoris* observou diferentes valores de K_m para enzima quando presente no sobrenadante e após a enzima ter sido purificada. Para o extrato bruto do clone S2 os valores de K_m foi de 10,2 mg/mL e a velocidade máxima foi de 526,3 U/mL e para alfa-amilase purificada os valores de K_m e $V_{máx}$ foram de 43,8 mg/mL e 1000 U/mL respectivamente. Ivanova e colaboradores (2003) analisaram um K_m de 0,9 mg/mL e um $V_{máx}$ de 62,5 U/mL para a enzima alfa-amilase de *B. licheniformis*.

Os resultados obtidos com a cinética enzimática indicam que o sobrenadante do extrato bruto se apresenta como uma boa alternativa para utilização na hidrólise do amido, não havendo sempre a necessidade da utilização da enzima purificada, reduzindo os custo de produção.

6 - Conclusões

- O fragmento codificante da α -amilase de *B. licheniformis* foi isolado e clonado eficientemente nos vetores de clonagem e expressão;
- Os clones recombinantes de *P. pastoris* foram capazes de expressar e secretar a enzima α -amilase ativa.
- A maior produção da α -amilase recombinante foi observada após 120 horas de indução.
- O peso molecular do produto secretado apresentou variações nos clones testados.
- Observou-se maior atividade da proteína em pH neutro, o pH da atividade ótima foi de 7,0.
- A enzima recombinante apresentou considerável estabilidade em sua temperatura ótima e aumentou sua estabilidade na presença do íon cálcio.
- A enzima manteve-se estável por dois meses quando mantida a 4°C.

7 - Referências bibliográficas

ABAM, 2010. Produção de álcool da mandioca. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca (www.abam.com.br). Acesso: 09/01/2011.

Adams, M. W. W.; and Kelly, M.R. 1995. Enzymes from microorganisms from extreme environments. *C&E News* (73): 32–42.

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.

Andrade C.T.; Souza R. C. R.2000. Investigação dos Processos de Gelatinização e Extrusão de Amido de Milho. Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro. *Polímeros* vol.10 n.1 São Carlos Jan./Mar.

Arber W.; Linn Stuart. 1969. DNA Modification and Restriction. *Annual Review of Biochemistry*, (38): 467-500.

Asghari M.S.; Khajeh K.; Moradian F.; Ranjbar B.; Naderi-Manesh H. 2004. Acid-induced conformational changes in *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase: appearance of a molten globule like state. *Enzyme and microbial Technology*, (35): 51-57.

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.; Galembeck E.V.; Faria J.B.; Schemberg A.C.F. 1986. Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Bio/Technology*, (4): 311–315.

Aiyer V.P.2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*,4 (13): 1525-1529.

Barks T.; Marieke E.; Bruins M.E.; Master M.A.; Anja E.M.; Janssen M.A.E.; Boom R.M. 2008. Effect of Gelatinization and Hydrolysis Conditions on the Selectivity of Starch Hydrolysis with r-Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56): 488-495.

Bentley, I. S.; and Williams, C.E. 1996. Starch conversion. In: T. Godfrey and S. I. West (ed.). *Industrial enzymology*, 2nd ed. Stockton Press, New York, N.Y. p. 339-357.

Bergquist, P. L.; and Morgan, W.H. 1992. The molecular genetics and biotechnological application of enzymes from extremely thermophilic eubacteria. In R. A. Herbert and R. J. Sharp (ed.). *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. Chapman & Hall, New York, N.Y. p. 44–75.

Bertoldo, C.; Duffner, F.; Jorgensen, P.L.; Antranikian, G. 1999. Pullulanase type I from *Fervidobacterium pennavorans* ven: cloning, sequencing and expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, (65): 2084–2091.

Bisgard-Frantzen H.S.A.; Norman B.; Pedersen S.; Kjaeruff F.S; Outtrup H.; Borchert T.V. 2000. Development of industrially important α -amylase. *J Appl Glycosci*, (46): 199–206.

Biliaderis, C.G.1991. The structure and interactions of starch with food. *Physiology and Pharmacology*, (69): 60-78.

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

Buleón, A.; Colonna, P.; Planchot, V.; Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int, J. Biol. Macromol*, (23): 85-112.

Burns, G. W. e Bottino, P. J. 1991. *Genética* 6ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 728pp.

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

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. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, (10): 422-427.

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

Choi B.D.; Park E.Y.2006. Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, (41): 390–397.

- Crabb D.W.; Mitchinson C. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Tibtech*, (15): 349-352.
- 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.; 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 proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, (18): 119-138.
- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C. 2000. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase. *J Mol Biol*, (301): 1041–1057.
- Declerck N.; Machius M.; Joyet P.; Wiegand G.; Huber R.; Gaillardin C. 2003. Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and modulation of its stability over a 50°C temperature range. *Protein Engineering*, 4 (16): 287–293.
- Demain, A. L. 2000. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*, (18): 499-514.
- Dong, G.; Vieille, C.; Savchenka A.; Zeikus, G.J.1997. Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding Extracellular α -Amylase from *Pyrococcus furiosus* and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, (63): 3569–3576.
- Fuwa, H. A.1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *Journal of Biochemistry*, (41): 583-603.
- French, D.1984. Organization of granules. *Starch: chemistry and technology*, 2 ed, 183-247.
- Galliard, D.T.; Bowler, P.1987. Morphology and composition of starch. *Applied Chemistry*, (13): 55-78.
- Garnero, M. 1980. Energia: o futuro é hoje, São Paulo, ANFAVEA.

Gellisen, G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, (54): 741-750.

Goochee, C.F., Gramer, M.J., Andersen, D.C., Bahr, J.B. and Rasmussen, J.R. 1991. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology*, (9): 1347-1355.

Guimarães, S.H.L.; Peixoto-Nogueira, C.S.; Michelin, M.; Rizzatti, S.C.A.; Sandrim, C.V.; Zanoelo, F.F.; Aquino, M.M.C.A.; Junior, B.A.; Polizeli, M.T.L.M. 2006. Seleção de fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Brazilian Journal of Microbiology*, 4 (37): 474-480.

Gupta R.; Gigras P.; Mohapatra H.; Goswami V. K.; Chauhan B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, (38): 1599–1616.

Hmidet N.; Bayouhd A.; Berrin G.J.; Kanoun S.; Juge N.; Nasri M. 2008. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* (43): 499–510.

Ivanova N.V.; Dobrova E.P.; Emanuilova E.I. 1993. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Biotechnology*, (28): 277-289.

Jaenicke, R.; and Bohm, G. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (8):738–748.

Kato S.; Ishibashi M.; Tatsuda D.; Tokunaga H.; Tokunaga M. 2001. Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary α -amylase secreted from methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, (18): 643–655.

Kim, I.C., Cha, J.H., Kim, J.R., Jang, S.Y., Seo, B.C., Cheong, T.K., Lee, D.S., Choi, Y.D., Park, K.H., 1992. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* (267): 22108–22114.

Krishnan T.; Chandra A.K. 1983. Purification and Characterization of α -Amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and environmental Microbiology*, (46): 430-437.

Lee S.; Oneda H.; Minoda M.; Tanaka A.; Inouye K. 2006. Comparison of Starch Hydrolysis Activity and Thermal Stability of Two *Bacillus licheniformis* α -Amylases and Insights into Engineering α -Amylase Variants Active under Acidic Conditions. *J. Biochem.* (139): 997–1005.

- Leite, C.C.R.; Leal, V.L.R.M. 2007. O biocombustível no Brasil. *Novos estud. - CEBRAP*, nº. 78.
- Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. 2001. *Biotechnology Industrial*. Ed. Edgard Blücher Ltda 1ª ed., v. 3, São Paulo. p. 351-412.
- Magalhães O.P.; Souza M.P. 2010. Application of Microbial Amylase in Industry – A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, (41): 850-861.
- 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.
- Medda S.; Chandra A.K. 1980. New Strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing Thermostable α -Amylase Active at Alkaline pH. *Journal of Applied Microbiology*, 1 (48): 47–58.
- Menezes, T.J.B. 1980. Etanol o combustível do Brasil. Editora agrônômica Ceres, São Paulo.
- Moraes, L. M. P. 2004. Enzimas como agentes biotecnológicos. Amilases In: Said, S.; Pietro, R, C, L. R. (E.d). *Legis Summa*: Ribeirão Preto, São Paulo. p. 223-242.
- Morgan F.J.; Priest F.G. 1981. Characterization of a Thermostable α -Amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. *Journal of Applied Microbiology*, 1 (50): 107–114.
- Muller G. 2008. Clonagem e Expressão do gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* variedade D2 na levedura *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 110pp.
- Muralikrishna, G.; Nirmala, M. 2005. Cereal α -amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers*, (60): 163-173.
- Nascimento, A. A. C. *et al.* 2003. Tecnologia do DNA Recombinante. São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. (www.morpheus.fmrp.usp.br/td/download_apostila.php). Acesso em: 16/10/ 2010.
- 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.

- Nazmi A.R.; Reinisch T.; Hinz J.H. 2006. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (453): 18–25.
- Oliveira T.S. 2009. Clonagem e Expressão do gene que codifica α -amilase de *Bacillus licheniformis* em *Bacillus subtilis*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 91pp.
- Paifer E.; Margolles E.; Cremata J.; Montesino R.; Herrera L.; Delgado J.M. 1994. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*, (10): 1415–1419.
- Pandey A.; Nigami P.; Soccol C.R.A.; Singh D. Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem*, (31): 135–152.
- Pierce, A. B. 2004. *Genética: Um Enfoque Conceitual 5ª Edição*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
- Pousa, G.P.A.G.; Santos, A.L.F.; Suarez, P.A.Z. 2007. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, (35):5393–5398.
- Priest F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. 1977. *Bacteriol Rev* (41): 53-71.
- Roy, A.; Ben Messaoud, E.; Bejar, S. 2003. Isolation and purification of an acidic pullulanase type II from newly isolated *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, (33): 720-724.
- Saito N. A Thermophilic Extracellular α -Amylase from *Bacillus licheniformis*. 1973. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (166): 290-298.
- Saito N.; Yamamoto K. 1975. Regulatory Factors Affecting α -Amylase Production in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, (121): 848-856.
- 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.
- Sibakov M.; Palva I. 1984. Isolation and the 5'-end nucleotide sequence of *Bacillus licheniformis* α -amylase gene. *Journal of Biochemistry*, (145): 567-572.
- Smith, P.S.1982. Starch derivatives and their use in foods, *Food carbohydrates*. p.237-269.
- Souza, M.P.; Magalhães, O.P. 2010. Application of microbial - amylase in Industry – a Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, (41): 850-861.

Suarez, A.Z.P.; Santos, F.A.L.; Rodrigues, P.J.; Alves, B.M. 2009. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, 32 (3): 768-775.

Shahhoseini M.; Ziaee1 A.; Ghaemi N. 2003. Expression and secretion of an α -amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene. *Journal of Applied Microbiology*, (95): 1250–1254.

Shiina S.; Ohshima T.; Sato M. 2007. Extracellular production of α -amylase during fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* using pulsed electric field. *Journal of Electrostatics* (65): 30–36.

Shuman S.1991. Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is Sequence Specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (88). 10104-10108.

Shuman S. 1994. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem*, (269): 32678-32684.

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.

Tachibana Y .; Akiko Kuramural K.;Naoki Shirasaka N.;Yuji Suzuki Y.; Tomoko Yamamoto T.; Fujiwara S.; Masahiro Takagi M.; Imanaka T.1999. Purification and Characterization of an Extremely Thermostable Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from a Newly isolated Hyperthermophilic Archaeon, a *Thermococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, (65): 1991-1997.

Tester, R. F.; Qi, J. K. X. 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, (39): 151–165.

Timmis K. N.; Demain A. L. 1998. Ecology and industrial microbiology. Strange bedfellows. *Current Opinion in Microbiology*, (1): 267-270.

Tomazic J.S.; Klibanov M.A. 1988. Why Is One *Bacillus* α -Amylase More Resistant against Irreversible Thermoinactivation Than Another? *The journal of Biological Chemistry*, 7 (263): 3092-3096.

Torres F.A.G.; Moraes L.M.P. 2001. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, p. 20–22.

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. 90 (Eds).

Protein expression - A practical approach. University Press, Oxford, United States, New York. p. 61-100.

Uehara H.; Choi D.B.; Park E.Y.; Okabe M. 2000. Expression of mouse α -amylase gene in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, (5): 7–12.

Van der Maarel M.J.E.C.; Van der Veen B.; Uitdehaag J.C.M.; Leemhuis H.; Dijkhuizen L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal Biotechnology*, (94):137–55.

Veith B.; Herzberg C.; Steckel S.; Feesche J.; Maurer K.H.; Ehrenreich P.; Bäumer S.; Henne A.; Liesegang H.; Merkl R.; Ehrenreich A.; Gottschalk G. 2004. The Complete Genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with Great Industrial Potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, (7): 204-211.

Vieille, C.; Zeikus, J.C. 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and biology reviews*, 1 (65): 1-43.

Yuuki, T.; Nomura T.; Tezuka H.; Tsuboi A.; Yamagata H.; Tsukagoshi N.; Udaka S. 1985. Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *Bacillus licheniformis*: Comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying amylases deduced from the DNA sequences. *J Biochem*, (98): 1147–1156.

Zhang W.; Bevins M.A.; Plantz B.A.; Smith L.A.; Meagher M.M. 2000. Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimizing the Production of a Recombinant Protein, the Heavy-Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin, Serotype A. *Papers in Biotechnology*. Paper 18.

Zhang X.; Zhaojie X.; Zhao B.; Cen P. 2001. Enhancement of production of cloned α -amylase by lactic acid feeding from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using a *SUC2* promoter. *Biotechnology Letters* (23): 259–262.

Zink, F.; Gonçalves, R.; Passos, R.M. 1978. Cultura de cana-de-açúcar. Boletim técnico n° 121 da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, p.15.

Apêndice A - Meios de cultivo

A.1 - Meios de cultura bacteriano

Meio LB (Luria Bertani): cultivo da cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen™)

Composição do meio:

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	5 g/L
Ágar	15 g/L

Meio SOB: transformação bacteriana por eletroporação.

Composição do meio:

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

Meio SOC: transformação bacteriana por eletroporação

Composição do meio:

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

Os meios foram autoclavados a 120°C por 15 minutos e em seguida foi adicionado o antibiótico ampicilina na concentração final de 100 µg/mL, quando necessário.

A.2 - Meios de cultura para levedura *Pichia pastoris*

Meio de cultura YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium): Esse meio de cultura foi utilizado para manter o crescimento da linhagem GS115 da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.

Composição do meio:

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

Este meio de cultura foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos, e após foi adicionado solução de glicose 2% filtrada e o antibiótico ampicilina na concentração de 100µg/mL para evitar o crescimento de contaminantes.

Meio de cultura MD (*Minimal Dextrose Medium*): Este meio de cultura foi utilizado para selecionar as colônias recombinantes de *Pichia pastoris*. Devido sua função, não é acrescentado o aminoácido histidina (marca de seleção auxotrófica) para o crescimento das colônias recombinantes.

Composição do meio:

YNB (<i>yeast nitrogen bases</i>)	1,34 %
Biotina	4 x 10 ⁻⁵ %
Glicose	2 %
Ágar	20 g/L

Para meio líquido o volume da solução foi completado com água esterilizada e deionizada, e para o meio sólido o volume foi completado com ágar. Em ambos os meios foram adicionados 100 µg/mL de ampicilina para evitar o crescimento de contaminantes.

Meio de cultura BMG-Y (*Buffered Glycerol Complex Medium*) – Este meio de cultura contendo glicerol e um complexo tamponado, foi utilizado para aumentar a massa celular das leveduras.

Composição do meio:

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0	10 mM
YNB	1,34 %

Biotina	4 x 10 ⁻⁵ %
Glicerol	1 %

Para meio líquido o volume da solução foi completado com água esterilizada e deionizada, e para o meio sólido o volume foi completado com ágar. Também foi adicionado ao meio 100 µg/mL de ampicilina para evitar o crescimento de contaminantes.

Meio de cultura BMM-Y (*Buffered Methanol Complex Medium*) - Este meio complexo tamponado foi utilizado para induzir a levedura *Pichia pastoris* expressar a proteína heteróloga.

Composição do meio:

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0	10 mM
YNB (<i>yeast nitrogen bases</i>)	1,34 %
Biotina	4 x 10 ⁻⁵ %
Metanol	0,5 %

A mistura foi completada com água esterilizada e deionizada para o meio líquido. Para meio BMM-Y sólido, foi utilizado ágar esterilizado para completar o volume. Também foram adicionados aos meios 100 µg/mL do antibiótico ampicilina.

Todas as soluções de preparo para os meios de culturas foram esterilizadas por autoclavagem a 120 °C, ou passaram por filtração.

A.3 - Soluções Estoques

Glicerol (50 %)

Foi misturado o volume de 500 mL de glicerol a 500 mL de água deionizada e após foi realizado a esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos.

YNB - 10X

Composição:

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

Modo de preparo:

Foram dissolvidos 3,4 g de YNB e 10 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 90 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

Glicose (20%) - 10X

Modo de preparo:

Vinte gramas de glicose foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Biotina (0,02 %) - 500X

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.

Tampão fosfato 1M, pH 6,0 (500 mL)

Modo de preparo:

A quantidade de 11,5g de K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico anidro) e 59g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) foram dissolvidos em 500 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 6,0 e a solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos.