



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Produção de quimosina bovina em clones de
Komagataella phaffii contendo múltiplas cópias do gene
codificador**

Carolina de Souza Baptistello

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Coorientadora: Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco

Brasília, 2019

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Produção de quimosina bovina em clones de
Komagataella phaffii contendo múltiplas cópias do gene
codificador

Carolina de Souza Baptistello

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Coorientadora: Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 2019

Trabalho realizado no laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Fernando Araripe Gonçalves Torres e apoio financeiro do CNPq.

Banca examinadora

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Universidade de Brasília
Presidente da banca

Prof. Dra. Ana Gilhema Gómez Duran
Universidade de Brasília
Examinadora externa

Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha
Universidade de Brasília
Examinadora interna

Prof. Dra. Lídia Maria Pepe Moraes
Universidade de Brasília
Membro suplente

AGRADECIMENTOS

À minha amada mãe, pelo amor e apoio incondicionais. Por ser meu exemplo e me ensinar que a empatia é o mais nobre dos sentimentos. Sim, eu te escolhi!! TE AMO!

Ao Tiago, por toda ajuda científica e principalmente por tornar meus dias mais felizes e fáceis. Obrigada por sonhar comigo.

Aos professores Fernando, Janice e Lídia por me receberem tão gentilmente no Lab2. Por todos os ensinamentos e por estarem sempre disponíveis ao esclarecimento de dúvidas. Vocês foram essenciais na minha formação.

Aos queridos amigos do Lab2 Rainha: Dani, Robs, Ana Laura, Luiza, Yasmim, Myrna, Igor, Vivis, Chris, Vanessa, Catarina e Francisco. Obrigada por todas as discussões e ajudas científicas, pelo companheirismo, festas e cafés na copa. Tudo foi mais divertido com vocês. Quero agradecer especialmente o Marciano por toda generosidade ao me introduzir na vida científica. Nunca vou me esquecer que foi você que me ensinou a pipetar hahaha.

Aos meus amigos da Bthek, especialmente aos lindos Lucas e Alê que me ajudaram a conciliar o mestrado e o trabalho na reta final e me deram apoio emocional.

Às professoras da banca por aceitarem meu convite e por me mostrarem a beleza das proteínas ainda na graduação.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Quimosina.....	1
1.2. A levedura <i>Komagataella phaffii</i>	7
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. ESTRATÉGIA.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Materiais	14
4.1.1. Linhagens de microrganismos	14
4.1.2. Meios de cultura	14
4.1.3. Soluções para DNA	16
4.1.4. Soluções para proteína.....	17
4.1.5. Kits comerciais	18
4.1.6. Marcadores moleculares	18
4.1.7. Enzimas	18
4.1.8. Vetores.....	19
4.1.9. Oligonucleotídeos iniciadores	20
4.2. Métodos	20
4.2.1. Construção dos vetores de expressão	20

4.2.2.	Preparação de DNA plasmidial (miniprep)	20
4.2.3.	Eluição de banda de DNA	21
4.2.4.	Precipitação de DNA	21
4.2.5.	Transformação de Levedura	21
4.2.6.	Triagem dos transformantes em placas tipo Deep Well	22
4.2.7.	Triagem dos transformantes em frasco.....	22
4.2.8.	Determinação do número de cópias integradas	22
4.2.9.	Estabilidade genética	23
4.2.10.	Real Time PCR.....	23
4.2.11.	Teste de coagulação.....	23
4.2.12.	Produção de quimosina em frasco em meio YPD	24
4.2.13.	Produção de quimosina em frasco em meio BMGY	24
4.2.14.	Produção de quimosina em frasco em meio UAB.....	24
4.2.15.	Produção de quimosina em frasco em meio BMD	25
4.2.16.	Precipitação de proteína com TCA.....	25
4.2.17.	SDS-PAGE	25
4.2.18.	Purificação por Cromatografia de Gel Filtração.....	26
4.2.19.	Concentração das frações	26
4.2.20.	Teste de deglicosilação.....	26
4.2.21.	Efeito da temperatura na atividade enzimática e termoestabilidade.....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1.	Construção do vetor de expressão.....	28
5.2.	Transformação de levedura.....	33
5.3.	Determinação do número de cópias e estabilidade genética.....	35
5.4.	Otimização do modo de produção da quimosina.....	36
5.5.	Purificação da quimosina.....	47
5.6.	Efeitos da temperatura na atividade enzimática.....	50

5.7. Considerações Gerais.....	51
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. ANEXO	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da quimosina bovina.....	2
Figura 2. Micelas de caseínas.....	5
Figura 3. Consumo de queijo per capita no Brasil.	7
Figura 4 Esquema da estratégia utilizada para o desenvolvimento do projeto.....	13
Figura 5 Clonagem do gene CHYM.....	29
Figura 6. Esquema da construção do vetor PGK_CHYM.....	30
Figura 7. Perfil de restrição do vetor pPGK_CHYM.	31
Figura 8. Perfil de restrição do vetor pBS5Sld-CHYM.	32
Figura 9. Perfil de restrição do vetor pBSCh3ld-CHYM.	32
Figura 10. Determinação do número de cópias do gene CHYM e estabilidade genética das linhagens selecionadas.	36
Figura 11. Curva de crescimento celular em meio YPD das linhagens selecionadas. ..	38
Figura 12. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando meio YPD das linhagens selecionadas.....	38
Figura 13. Perfil de proteínas secretadas em meio YPD das linhagens selecionadas. ..	39
Figura 14. Curva de crescimento celular em meio BMGY das linhagens selecionadas.	40
Figura 15. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando meio BMGY das linhagens selecionadas.....	41
Figura 16. Perfil de proteínas secretadas em meio BMGY das linhagens selecionadas..	41
Figura 17. Curva de crescimento celular do cultivo em meio BMD das linhagens selecionadas.	42
Figura 18. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando meio BMD das linhagens selecionadas.....	43
Figura 19. Perfil de proteínas secretadas em meio BMD das linhagens selecionadas. 44	
Figura 20. Curva de crescimento celular do cultivo em meio UAB das linhagens C32 e M12.....	45
Figura 21. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando o meio UAB das linhagens selecionadas.....	46
Figura 22. Perfil de proteínas secretadas em meio UAB das linhagens C32 e M12.	46

Figura 23. Cromatograma da cromatografia de gel filtração para purificação da quimosina bovina.....	48
Figura 24. Atividade enzimática das frações cromatográficas contendo quimosina bovina.	48
Figura 25. Purificação e estado de glicosilação da quimosina recombinante.	49
Figura 26. Efeito da temperatura na atividade enzimática e termoestabilidade da quimosina recombinante.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas de origem microbiana e vegetal utilizadas.....	3
Tabela 2. Produção, importação e exportação de queijo pelo Brasil no ano de 2015.....	6
Tabela 3. Enzimas de restrição utilizadas.....	18
Tabela 4. Vetores utilizados.....	19
Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizado.....	20
Tabela 6. Reagentes utilizados para SDS-PAGE 12%	25
Tabela 7. Atividade enzimática dos clones transformantes em placas tipo <i>deep well</i> ..	34
Tabela 8. Atividade enzimática do sobrenadante dos cultivos em frasco dos clones transformantes ..	35
Tabela 9. Atividade enzimática do sobrenadante dos cultivos dos clones transformantes em frasco.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μF	Microfarad
μL	Microlitro
Ω	Ohm
Å	Angstrom
AC	Antes de cristo
ADP	Adenosina difosfato
APS	Persulfato de amônio
Asp	Aspartato
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
C	Carbono
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
g	Gramma
<i>g</i>	Força gravitacional
Glc	Glicano
Gly	Glicina
H ₂ O	Água
His	Histidina
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
L	Litro
Lys	Lisina
M	Molar

Man	Manose
Met	Metionina
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
N	Nitrogênio
nm	Nanometro
OD600	Densidade celular medida através da absorbância em 600nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
p/v	Peso por volume
qPCR	PCR quantitativa
rpm	Rotação por Minuto
RNA	Ácido ribonucleico
rDNA	DNA ribossomal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Ser	Serina
t	Tonelada
TCA	Ácido tricloroacético
Thr	Treonina
V	Volts
Xaa	Qualquer aminoácido

RESUMO

Quimosina é uma aspartil protease que catalisa a reação de hidrólise da κ -caseína, provocando a coagulação do leite. Esta enzima é amplamente utilizada na indústria queijeira, devido à sua especificidade e baixa atividade proteolítica, o que confere características organolépticas desejáveis e alto rendimento a produção de queijo. Neste trabalho, a quimosina bovina B foi produzida em *K. phaffii* e purificada. Para obtenção das linhagens contendo múltiplas cópias do gene da quimosina foram utilizados vetores integrativos com o gene CHYM sob o controle do promotor do gene *PGK1* e a marca de seleção auxotrófica *leu2-d*. O cassete de expressão é flanqueado por sequências de homologia a três loci genômicos: *PGK1*, 5S rDNA e uma sequência repetitiva do cromossomo 3. Clones selecionados de cada construção foram analisados quanto ao número de cópias, estabilidade genética e produção enzimática em frascos utilizando meios de cultura distintos. Os clones P33 (integração no locus *PGK1*), R5 (integração no locus 5S rDNA) e C32 (integração em uma sequência repetitiva do cromossomo 3) apresentam 20, 23 e 2 cópias respectivamente e todos se mostraram estáveis em meio de cultivo não seletivo. O maior valor de atividade enzimática foi obtido em meio YPD para clone C32 (183 UAC.mL⁻¹). A quimosina recombinante foi purificada por cromatografia de gel filtração e analisada por SDS-PAGE. Foram encontradas duas formas da quimosina recombinante, uma com massa molecular de ~36 kDa, correspondente à enzima ativa e uma com massa molecular maior que corresponde a enzima glicosilada.

Palavras-chave: quimosina bovina, *Komagataella phaffii*, integração múltipla, *leu2-d*

ABSTRACT

Chymosin is an aspartic protease that catalyzes the hydrolysis reaction of k-casein, causing the milk clotting. This enzyme is widely used in the cheese industry, because its high specificity and low proteolytic activity, which gives desirable organoleptic properties and higher yield of cheese production. In this work, the bovine chymosin was produced in *K. phaffii* and purified. To obtain the strain containing multi-copy of chymosin gene integrative vector with *CHYM* gene under control of *PGK1* promoter and the auxotrophic selection marker *leu2-d* have been used. The expression cassette is flanked by homology sequences to three target genomic loci: *PGK1*, 5S rDNA or a repetitive sequence of chromosome 3. Select clone of each construction was analyzed for copy number, genetic stability and the enzymatic production in flask using different culture media. The clones P33 (integration at the *PGK1* locus), C32 (integration at repetitive sequence of chromosome 3) e R5 (integration at 5S rDNA) showed 20, 23 e 2 copies respectively and were unstable in non-selective culture media. The highest enzymatic activity was obtained in YPD media by C32 clone (183 UAC.mL⁻¹). The recombinant chymosin was purified by gel filtration chromatography and analyzed by SDS-PAGE. Two forms of recombinant chymosin were found, one with molecular weight of ~36 kDa, which corresponds to active enzyme and another with higher molecular weight which corresponds to active and glycosylated enzyme.

Key-words: bovine chymosin, *Komagataella phaffii*, multiple integration, *leu2-d*;

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Quimosina

Quimosinas (EC 3.4.23.4) são aspartil proteases encontradas no abomaso de filhotes de ruminantes. Sua função é aumentar a digestão de proteínas pelo bezerro, através da clivagem da κ -caseína do leite ingerido. A hidrólise da κ -caseína provoca a coagulação do leite, que se torna pastoso e tem sua velocidade de passagem pelo estômago diminuída, favorecendo assim a atuação de outras proteases gástricas.

A quimosina bovina é codificada por uma sequência de DNA contendo 9 exões e 8 íntrons. O gene da quimosina é polimórfico e apresenta duas formas alélicas distintas, a quimosina A e B. A única diferença entre elas é a presença de um aspartato na posição 244 na isoforma A e glicina, na mesma posição, na isoforma B. Essa mudança resulta em uma diferença de carga entre elas e por consequência mudanças no ponto isoelétrico. A quimosina A tem uma maior atividade específica sobre a κ -caseína, contudo também possui menor estabilidade quando comparada à quimosina B (KUMAR et al., 2010; ZINOVIEVA; MU, 2002). Na mucosa gástrica a proteína é sintetizada na forma de pré-pró-quimosina, um polipeptídeo de 381 resíduos de aminoácidos e 42,1 kDa, no qual os primeiros 16 aminoácidos do N-terminal constituem uma sequência sinal responsável por guiar a enzima para a membrana plasmática, etapa importante para sua secreção no lúmen gástrico. Apenas o zimogênio inativo contendo 365 aminoácidos e 40,8 kDa é secretado e ao encontrar um ambiente ácido sofre autocatálise, perdendo 42 aminoácidos e se tornando a enzima ativa de 36 kDa. (ATTALLAH, 2007; BARKHOLT PEDERSEN; ASBAEK CHRISTENSEN; FOLTMANN, 1979; KATSUHIKO et al., 1982; KUMAR et al., 2010; NOSEDA et al., 2016)

A quimosina bovina é uma proteína bilobular formada por 9 alfa hélices e 29 folhas beta (Figura 1). É observada a presença de três pontes de dissulfeto, Cys⁴⁵-Cys⁵⁰, Cys²⁰⁶-Cys²¹⁰ e Cys²⁵⁰-Cys²⁸³, sendo Cys²⁵⁰-Cys²⁸³ indispensável para o dobramento da pré-quimosina. Os resíduos Asp³⁴ e Asp²¹⁶, que constituem o sítio catalítico, estão presentes no motivo conservado do grupo das aspartil proteases, Asp-Thr-Gly (YEGIN; DEKKER, 2013). Os resíduos catalíticos são orientados de frente para o outro na estrutura tridimensional, através de uma complexa rede de pontes de hidrogênio, que é formada pela interação dos resíduos 31-35 com os resíduos 214-218 e um átomo de água central. O resíduo Asp³⁴ funciona como uma base de Lewis, ou seja, recebe prótons, enquanto Asp²¹⁶ atua como um ácido de Lewis, doando prótons (THERON, 2013).

INTRODUÇÃO

A primeira etapa do processo de catálise por quimosina, se dá pela ligação de uma molécula de água aos dois resíduos aspárticos através de ligações de hidrogênio. Logo depois, Asp³⁴ remove um próton da molécula de água e segue o ataque nucleofílico da molécula de água contra o carbono da carbonila da ligação peptídica do substrato. Simultaneamente, Asp²¹⁶ doa um próton para o átomo de oxigênio da carbonila do substrato. Em sequência, o nitrogênio da ligação peptídica do substrato recebe um hidrogênio de Asp³⁴, enquanto o próton do oxigênio de Asp²¹⁶ é transferido para o oxigênio da carbonila do substrato a ser clivado. Isso promove a quebra da ligação C-N, gerando dois peptídeos menores como produto. Como Asp²¹⁶ se torna negativamente carregado é possível que novas reações catalíticas aconteçam (THERON, 2013).

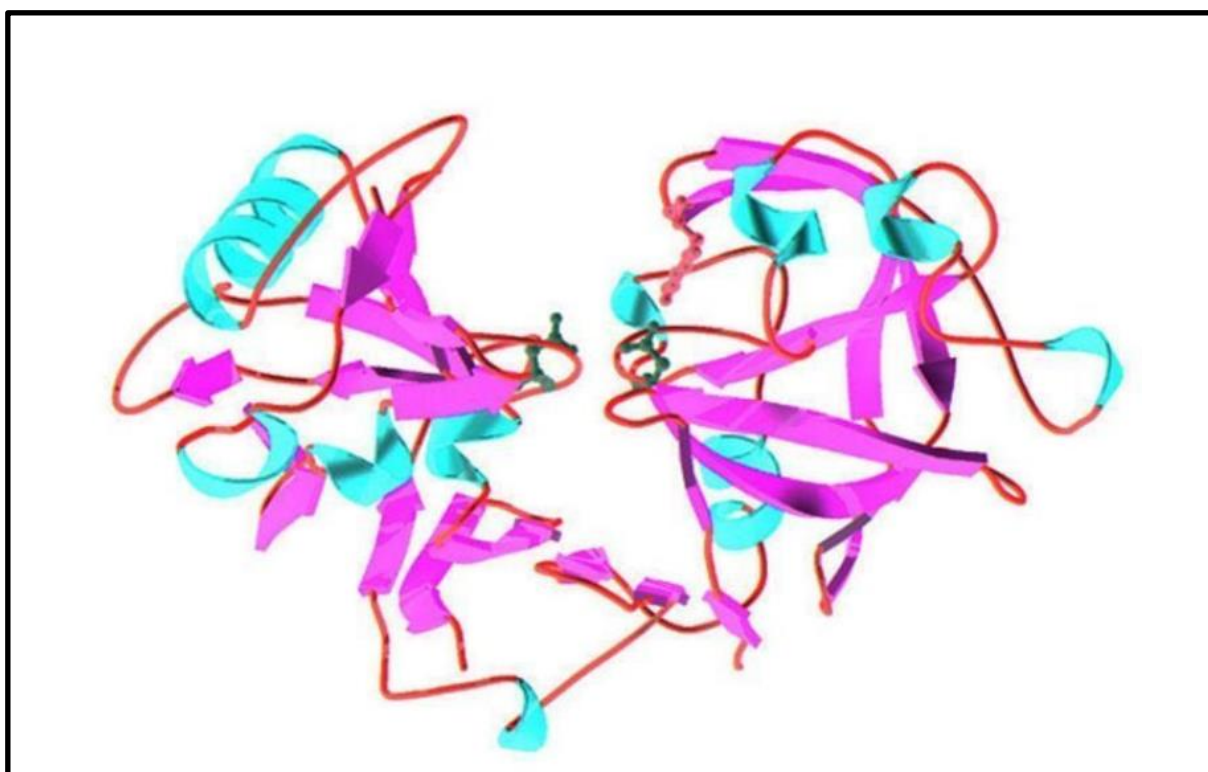


Figura 1. Estrutura tridimensional da quimosina bovina. Em rosa, folhas β , em azul α -hélices e em verde, os resíduos catalíticos Asp³⁴ e Asp²¹⁶. Fonte: MEROPES (<https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/structure?mid=A01.006>)

A quimosina é utilizada para fabricação de queijo e é obtida tradicionalmente a partir do estômago de ruminantes. Neste processo, os bezerros são abatidos e seu abomaso é retirado, lavado, cortado em tiras e tratado com uma solução de cloreto de sódio (12-20%) para extração enzimática. Após a extração, a solução gerada é filtrada e purificada por precipitação salina. Apesar da constituição desta solução enzimática ser rica em

INTRODUÇÃO

quimosina (80-90%), esta não é pura e normalmente contém em torno de 10-20% de pepsina (FERNANDES, 2013). Este tipo de abordagem é limitada e relativamente de alto custo, além de apresentar risco de contaminação por patógenos e esbarrar em questões éticas e religiosas, sendo desaprovada pelos consumidores vegetarianos. Por esse motivo, a quimosina tem sido progressivamente substituída por coagulantes de origem microbiana e vegetal assim como pela versão recombinante (YEGIN; DEKKER, 2013).

Muitas enzimas capazes de coagular o leite foram isoladas de microrganismos e vegetais (tabela 1), a fim de substituir o uso de quimosina animal. Entretanto, por possuírem baixa especificidade e alta atividade proteolítica, conferem ao queijo um sabor amargo indesejado e menor produtividade em relação ao queijo produzido por coagulação utilizando quimosina. Dessa forma, a utilização de quimosina recombinante é priorizada em relação a enzimas coagulantes de outras fontes, pois essa confere características organolépticas desejáveis e alto rendimento ao queijo, do mesmo modo que a quimosina nativa (KUMAR et al., 2010; YEGIN; DEKKER, 2013).

Tabela 1. Enzimas de origem microbiana e vegetal utilizadas.

Origem microbiana (espécies)	Referência	Origem vegetal (espécies)	Referências
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(DA SILVA et al., 2017)	<i>Cynara cardunculus</i>	(CORDEIRO; PAIS; BRODELIUS, 1998)
<i>Mucor spp.</i>	(YEGIN et al., 2011)	<i>Moringa oleifera</i>	(PONTUAL et al., 2012)
<i>Aspergillus oryzae</i>	(SHATA, 2005)	<i>Cirsium vulgare</i>	(LUFRAÑO et al., 2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	(MENG et al., 2018)	<i>Bromelia hieromyni</i>	(BRUNO et al., 2010)

O primeiro ingrediente de alimento feito através da tecnologia do DNA recombinante, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1990, foi a quimosina bovina produzida em *Escherichia coli* K-12. A versão recombinante da quimosina é segura e por isso recebe o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), além disso, é pura, diferentemente da extraída da forma tradicional, pois não contém traços de pepsina (FLAMM, 1991). Desde essa aprovação, a quimosina foi produzida utilizando diferentes plataformas de expressão, como na planta de tabaco (WEI et al., 2016), nos fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus awamori* (CARDOZA et al., 2003; YOON et al., 2013), nas leveduras *Komagataella phaffii* e *Kluyveromyces*

INTRODUÇÃO

lactis (NOSEDA et al., 2016; O’SULLIVAN; FOX, 1991) e na bactéria *Bacillus subtilis* (PARENTE et al., 1991). Foram produzidas também quimosinas provenientes de outros animais como de camelo (WANG et al., 2015), caprino (TYAGI et al., 2016), búfalo (VALLEJO et al., 2008) e iaque (LUO et al., 2016).

O leite é uma solução coloidal formada por água, gordura, açúcares, sais minerais e três grupos proteicos distintos, as proteínas do soro, as proteínas associadas com a fase lipídica e as caseínas. O maior conteúdo de nitrogênio presente no leite provém das caseínas, que podem ser divididas em α -S1, α -S2, β e κ e são classificadas como fosfoproteínas, por possuírem grupamentos fosfato ligados à sua cadeia peptídica. As caseínas são hidrofóbicas e essa característica e se agreguem em solução aquosa formando micelas com tamanho médio de 100 nm (figura 2) (KUMAR et al., 2010; PAYENS, 1982; TYAGI et al., 2016).

O grupamento fosfato, abundante nas caseínas α e β , ao interagir com íons de cálcio promove a fusão e precipitação das micelas. Por outro lado, a κ -caseína possui um único resíduo de fosfato e, por isso, é solúvel na presença de íons de cálcio. Esta apresenta também propriedades anfipáticas, a porção N-terminal é hidrofóbica e interage com as demais caseínas enquanto a porção C-terminal é hidrofílica. Estas peculiaridades, permite a estabilização do sistema coloidal, pelo isolamento por repulsão eletrostática das micelas individuais, prevenindo a coagulação espontânea do leite (AGEITOS et al., 2006; FREITAS et al., 2017).

INTRODUÇÃO

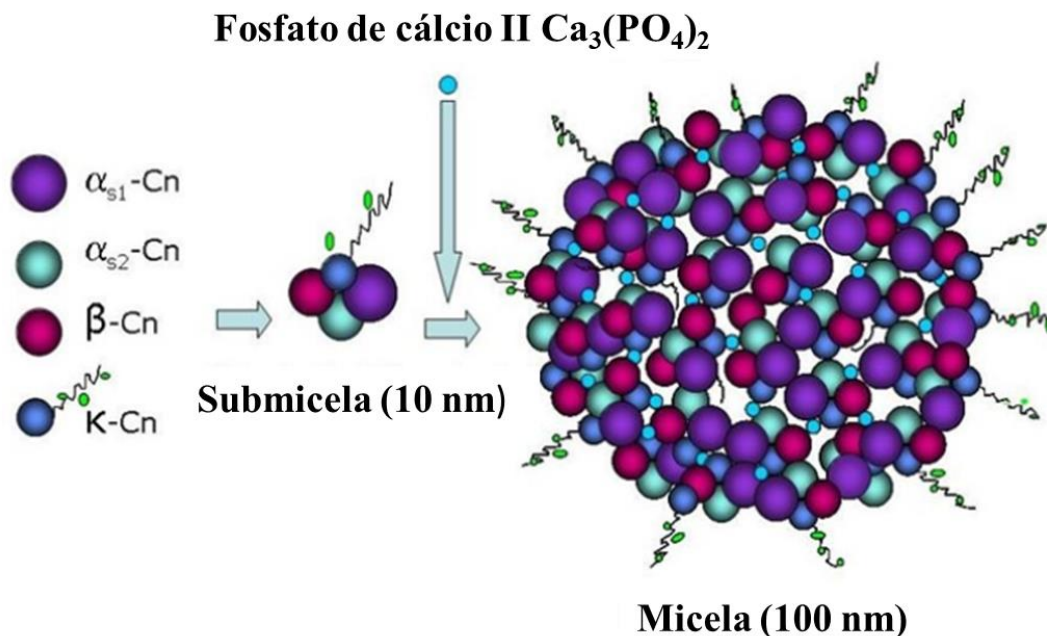


Figura 2. Micelas de caseínas. Representação da constituição de micela e submicela de caseína.

O papel da quimosina é de interromper o isolamento eletrostático, permitindo a fusão e precipitação das micelas através da clivagem da κ -caseína. A quimosina reconhece os resíduos His⁹⁸ e Lys¹¹¹ e cliva a ligação peptídica entre os resíduos Phe¹⁰⁵ e Met¹⁰⁶ da κ -caseína bovina, liberando duas cadeias peptídicas, uma solúvel denominada macropeptídeo que passa a compor o soro do leite e uma segunda cadeia insolúvel, chamada para- κ -caseína, que permanece nas micelas de caseínas, mas se torna sensível aos íons de cálcio (FOLTMANN, 1992; FOX; MCSWEENEY, 1997; MELLANBY, 1912; VREEMAN et al., 1986). A precipitação das caseínas origina grandes coágulos que são usados como matéria prima na produção do queijo.

A produção de queijo é um processo biotecnológico muito antigo, datando de 6.000 AC, embora só tenha sido bem estabelecida durante o império romano (FOX; MCSWEENEY, 1997). No Brasil, o primeiro registro de fabricação de queijo data de 1581 e ocorreu na vila de São Salvador, Bahia de Todos os Santos (DINIZ, 2013). Atualmente, a produção de queijos no Brasil é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). A legislação brasileira define queijo como: “O produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soro lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas,

INTRODUÇÃO

de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL, 1996).

Os diferentes tipos de queijos existentes podem ser separados em três superfamílias, com base no método de coagulação utilizado, sendo eles a coagulação enzimática, que corresponde a aproximadamente 75% dos queijos produzidos, a coagulação ácida ou láctica e a coagulação pela combinação de aquecimento e adição de um ácido ou um sal. Os queijos produzidos pela coagulação ácida e por coagulação térmica são, normalmente, consumidos frescos, enquanto os queijos produzidos por coagulação enzimática são em sua maioria maturados ou curados (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

A ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo), estima que dos 34 bilhões de litros de leite inspecionados produzidos no Brasil em 2015, cerca de 11 bilhões de litros foram manufaturados em queijo, totalizando 1.105.431 toneladas do produto (tabela 2). Em 2010, a produção de queijo era estimada em 750.000 toneladas, o que representa um aumento de 47% na produção em cinco anos.

O consumo de queijo pela população brasileira ainda é baixo em relação a outros países, segundo a ABIQ o consumo médio per capita de queijos era de 5,1 kg ao ano em 2013 no Brasil contra 11,5 kg na Argentina e 25 kg na Itália e França. Contudo, estimativas mostram que o consumo brasileiro tende a crescer, podendo chegar ao patamar de 11 kg por habitante em 2030 (figura 3).

Tabela 2. Produção, importação e exportação de queijo pelo Brasil no ano de 2015.

	Produção (t)	Importações (t)	Exportações (t)	Total (t)
Produção nacional	1.105.431	21.550	2.522	1.124.459
Grandes <i>Commodities</i> ¹	750.215	11.787	747	761.255
<i>Commodities</i> intermediárias ²	285.104	7.053	1.223	290.934
Queijos Especiais ³	70.112	2.710	552	72.270

Fonte: ABIQ e Revista Balde Branco.

¹ - Queijo muçarela, prato e requeijão culinário.

² - Queijo fundido, processado, fresco, minas padrão, coalho e parmesão ralado.

³ - Queijos com mofo brancos e azuis, amarelos especiais, suíços, duros e semiduros e queijos de massa fiada.

INTRODUÇÃO

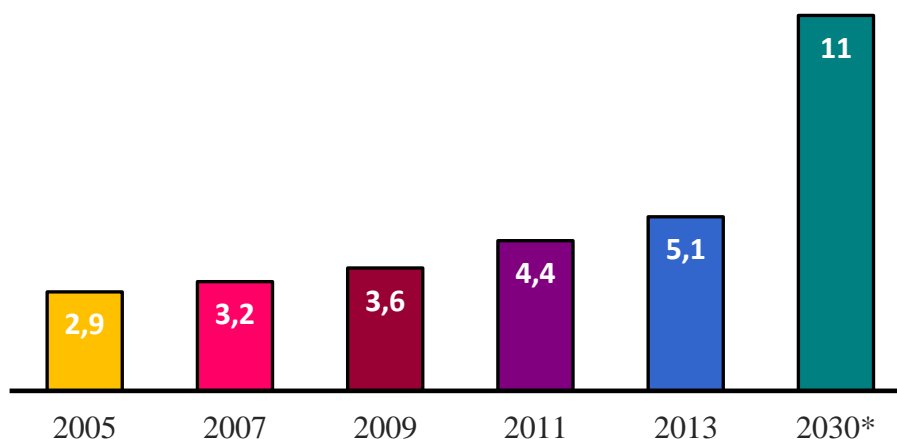


Figura 3. Consumo de queijo per capita no Brasil. Consumo de queijo em kg pela população brasileira entre os anos de 2005 e 2013 e uma estimativa de consumo para o ano de 2030 feita pela ABIQ.

1.2. A levedura *Komagataella phaffii*

K. phaffii é uma levedura isolada pela primeira vez em 1920 de uma castanheira na França por Alexandre Guilliermond, e classificada na ocasião como *Zyмосaccharomyces pastori*. Mais tarde, em 1956 uma nova cepa desta levedura foi isolada de um carvalho negro na Califórnia, Estados Unidos, por Herman Phaff, e classificada como *Pichia pastoris*. Em 1995 *P. pastoris* foi reclassificada e passou a pertencer ao novo gênero *Komagataella*. Após novos estudos filogenéticos, em 2005, o gênero *Komagataella* foi dividido em duas espécies, *K. pastoris*, que inclui o isolado francês e cepas como a CBS 704 e *K. phaffii* que inclui o isolado americano e cepas como a GS115 e a X33. (GUILLIERMOND, 1920; KURTZMAN, 2005; PHAFF; KNAPP, 1956; YAMADA et al., 1995; ZAHRL et al., 2017)

K. phaffii é uma plataforma de expressão heteróloga amplamente utilizada, especialmente, para proteínas eucarióticas. Uma das suas vantagens é a capacidade de atingir alta densidade celular em fermentadores, 100 g.L⁻¹ de biomassa celular, usando meios de cultivo simples (CREGG; VEDVICK; RASCHKE, 1993). Outra vantagem seu sistema de secreção eficiente e a baixa secreção de proteínas endógenas, o que facilita a purificação de proteínas heterólogas secretadas (ROMANOS, 1995). Além disso, *K. phaffii* apresenta fácil manipulação genética, pois utiliza ferramentas moleculares equivalentes às desenvolvidas para *Saccharomyces cerevisiae*, e possui a capacidade de fazer modificações pós traducionais típicas de eucariotos (CEREGHINO; CREGG, 2000; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

INTRODUÇÃO

K. phaffii é uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de crescer utilizando metanol como única fonte de carbono. Essa característica levou a Companhia *Phillips Petroleum* à utilizá-la como *single-cell protein* (SCP) para alimentação animal. Contudo, devido à crise do petróleo de 1970, o preço do metanol obtido a partir do gás natural metano aumentou, tornando inviável economicamente a utilização de *K. phaffii* como SCP. Em 1980, a *Phillips Petroleum* iniciou uma parceria com o *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, INC* (SIBIA) com o objetivo de desenvolver linhagens de *K. phaffii* voltadas para expressão de proteínas heterólogas. SIBIA construiu vetores e linhagens, assim como estabeleceu protocolos para manipulação genética em *K. phaffii*. Seu sistema de expressão era focado na utilização de metanol como fonte de carbono, por essa razão seus vetores continham o promotor dos genes *AOX1* ou *AOX2* controlando os genes de interesse (DAMASCENO; HUANG; BATT, 2012; JUTURU; WU, 2017; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

O promotor *AOX1* (P_{AOX1}) é um promotor forte e altamente regulado que controla a expressão da enzima álcool oxidase 1, que participa da primeira etapa da via de metabolização do metanol, oxidando o metanol em formaldeído e peróxido de hidrogênio. O mRNA de *AOX1* constitui aproximadamente 5% do mRNA total celular, quando a célula é crescida em metanol, mas é indetectável em outras fontes de carbono (CEREGHINO; CREGG, 2000; CREGG; HIGGINS, 1995). A regulação do P_{AOX1} apresenta dois mecanismos: a repressão da transcrição na presença de glicose e a indução da transcrição na presença de metanol, sendo que a ausência de glicose não é suficiente para ativação do promotor (TSCHOPP et al., 1987). Apesar da utilização do P_{AOX1} ser eficiente e a literatura reportar um substancial número de proteínas heterólogas que foram expressas utilizando esse sistema, como amilase murina, lipase e a interleucina 3 humana (DAGAR et al., 2016; KATO et al., 2001; YU et al., 2007), o uso do metanol é um fator limitante para produções em larga escala. O metanol é um álcool tóxico para humanos, inflamável e volátil, isso demanda instalação de itens de segurança no ambiente de produção e de estocagem do reagente, que são onerosos. O câmbio entre duas fontes de carbono, o glicerol para formação de biomassa e o metanol para indução, aumenta a complexidade do processo fermentativo e exige a utilização de sondas *online*. E devido a sua toxicidade, o uso do metanol não é permitido para indústria farmacêutica e alimentícia. (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Por essas razões, o promotor P_{AOX1} está sendo substituído, em alguns casos, por promotores constitutivos como *GAP*, *TEF1* e *PGK1*.

INTRODUÇÃO

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP) é a enzima da glicólise responsável pela catálise da reação reversível de oxidação e fosforilação da molécula de glicerol-3-fosfato dando origem a 1,3 bifosfoglicerato. O gene *GAP* em *K. phaffii* possui uma ORF de 999 pares de bases que codificava uma proteína de 333 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 35,4 kDa. *GAP* é constitutivamente expresso e seu promotor é considerado forte, contudo foi observado que o nível de expressão varia de acordo com a fonte de carbono em que a levedura é crescida. O cultivo em glicose apresenta o maior nível de mRNA do *GAP*, enquanto que o cultivo em glicerol e metanol possuem 66% e 33% desta expressão, respectivamente. (WATERHAM et al., 1997).

O fator de alongamento da tradução 1- α (TEF1- α) é responsável pelo transporte correto dos aminoacil-tRNAs para o ribossomo, sendo uma das mais abundantes proteínas solúveis presentes nas células eucarióticas. O gene *TEF1* em *K. phaffii* possui uma ORF de 1380 pares de bases que codifica para um polipeptídeo de 459 aminoácidos com peso molecular de 50,1 kDa. O gene *TEF1* é expresso constitutivamente e seu promotor também é considerado forte, principalmente quando a levedura é crescida em meio com alta concentração de glicose ou em condições de carbono limitante (AHN et al., 2007).

A 3-fosfoglicerato quinase é uma enzima da via glicolítica que catalisa a reação de transferência de um grupo fosfato para uma molécula de ADP, produzindo 3-fosfoglicerato e ATP. O gene *PGK1* de *K. phaffii* possui uma ORF de 1251 pb que codifica para uma proteína de 416 aminoácidos. A enzima Pkg1 é expressa constitutivamente, podendo representar até 5% das proteínas totais da célula, por isso seu promotor é considerado forte. Foi observado que o nível de mRNA de um gene repórter sob o controle do promotor P_{PGK1} foi duas vezes maior quando *K. phaffii* foi cultivada em glicose, em comparação a glicerol. (DE ALMEIDA; DE MORAES; TORRES, 2005). O promotor P_{PGK1} foi utilizado com sucesso para expressão de diversas proteínas, como a α -amilase, a glicoamilase, a quimosina bovina, a quimosina de camelo e a proinsulina (ANASTÁCIO, 2014; ARAÚJO, 2008; ASSUNÇÃO, 2015; SANTIAGO, 2016).

Embora o promotor utilizado tenha grande influência sobre a eficiência da expressão de um gene, outros fatores genéticos e fisiológicos são determinantes na produtividade de uma proteína heteróloga. Potenciais gargalos na expressão de proteínas heterólogas incluem o número de cópias do gene de interesse, o correto processamento, dobramento e secreção da proteína e a escolha adequada da marca de seleção (DAMASCENO; HUANG; BATT, 2012)

INTRODUÇÃO

Em levedura, a passagem das proteínas heterólogas pela via secretória permite que mudanças pós traducionais ocorram, como a maturação proteolítica, a glicosilação e a formação de pontes de dissulfeto (DAMASCENO; HUANG; BATT, 2012; MONTESINO et al., 1998). A *N*-glicosilação em levedura ocorre na sequência consenso Asn-Xaa-Thr/Ser e o oligossacarídeo adicionado é originado a partir do Gl3Man9GlcNAc2 (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999). Estudos com invertase de *S. cerevisiae* secretada por *K. phaffii* mostrou que os oligossacarídeos adicionados a essa proteína continham oito ou nove resíduos de manose (Man8-9GlcNAc2). Já a invertase secretada pelo organismo nativo possui uma maior cadeia de oligossacarídeos, contendo 150 resíduos de manose (Man150GlcNAc2) (MONTESINO et al., 1998). O padrão de glicosilação de *K. phaffii* é mais próximo ao encontrado em proteínas de mamíferos e, portanto, menos imunogênico que o padrão encontrado em *S. cerevisiae*. Em adição, a hiperglicosilação em *S. cerevisiae* pode levar ao mal dobramento proteico e ao acúmulo das proteínas heterólogas no retículo endoplasmático (VIEIRA GOMES et al., 2018). Em contrapartida a glicosilação de proteínas secretadas pode aumentar a solubilidade e evitar a agregação de proteínas na via secretória. O efeito da glicosilação na eficiência de secreção e na atividade é diferente para cada proteína, devendo ser feito um estudo de cada caso individualmente (YEGIN; DEKKER, 2013).

Outro fator importante na produção de proteínas heterólogas em *K. phaffii* é o número de cópias do gene de interesse na célula hospedeira. Um alto número de cópias pode levar ao aumento do nível de mRNA e em muitos casos isto leva ao aumento da expressão, sobretudo, para proteínas intracelulares (PIVA et al., 2017). Uma estratégia utilizada para obter clones de *K. phaffii* contendo múltiplas cópias do gene de interesse é o uso de marcas auxotróficas defectivas. Essas marcas utilizam genes de vias biossintéticas sob o controle de um promotor truncado. Isto resulta na baixa transcrição do gene e pode levar ao aumento do número de cópias integrado como forma de compensação, permitindo que a célula cresça em meio mínimo (KAZEMI SERESHT et al., 2013).

Não há produção nacional de quimosina recombinante, desta forma, os laticínios brasileiros são dependentes da utilização de quimosina de fonte animal, do uso de proteases microbianas e vegetais ou da importação da quimosina recombinante, o que torna a produção mais onerosa. Considerando a importância econômica da indústria do queijo para o país, é interessante a construção de uma cepa produtora de quimosina,

INTRODUÇÃO

utilizando como plataforma de expressão um microrganismo seguro e facilmente escalonável como *K. phaffii*.

Previamente em nosso laboratório foi desenvolvido uma linhagem de *K. phaffii* que produz quimosina bovina sobre o controle do P_{PGKI} (ARAÚJO, 2008). O presente trabalho representa uma iniciativa para investigar se poderia haver um aumento da produção de quimosina utilizando a estratégia de obtenção de clones multicópia desenvolvida por nosso grupo (BETANCUR, 2017) e que utiliza vetores com marca auxotrófica defectiva.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de uma linhagem de *K. phaffii* contendo múltiplas cópias do gene CHYM.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Construção do vetor de expressão PGK_CHYM contendo o gene codificador da quimosina bovina sob o controle do promotor P_{PGKI} assim como a marca de seleção *leu2-d*.
- 2) Obtenção da linhagem de *K. phaffii* com a construção do item 1.
- 3) Obtenção das linhagens com os vetores pBS5Sld-CHYM e pBSCh3ld-CHYM para integração múltipla no rDNA e cromossomo 3, respectivamente.
- 4) Seleção dos melhores produtores através do teste de coagulação do leite.
- 5) Análise o número de cópias do gene codificador integrado nas linhagens selecionadas.
- 6) Análise estabilidade genética das linhagens selecionadas.
- 7) Comparação da produção enzimática nos cultivos em frasco utilizando diferentes meios de cultivo.
- 8) Purificação a quimosina bovina recombinante.
- 9) Caracterização enzimática.

ESTRATÉGIA

3. ESTRATÉGIA

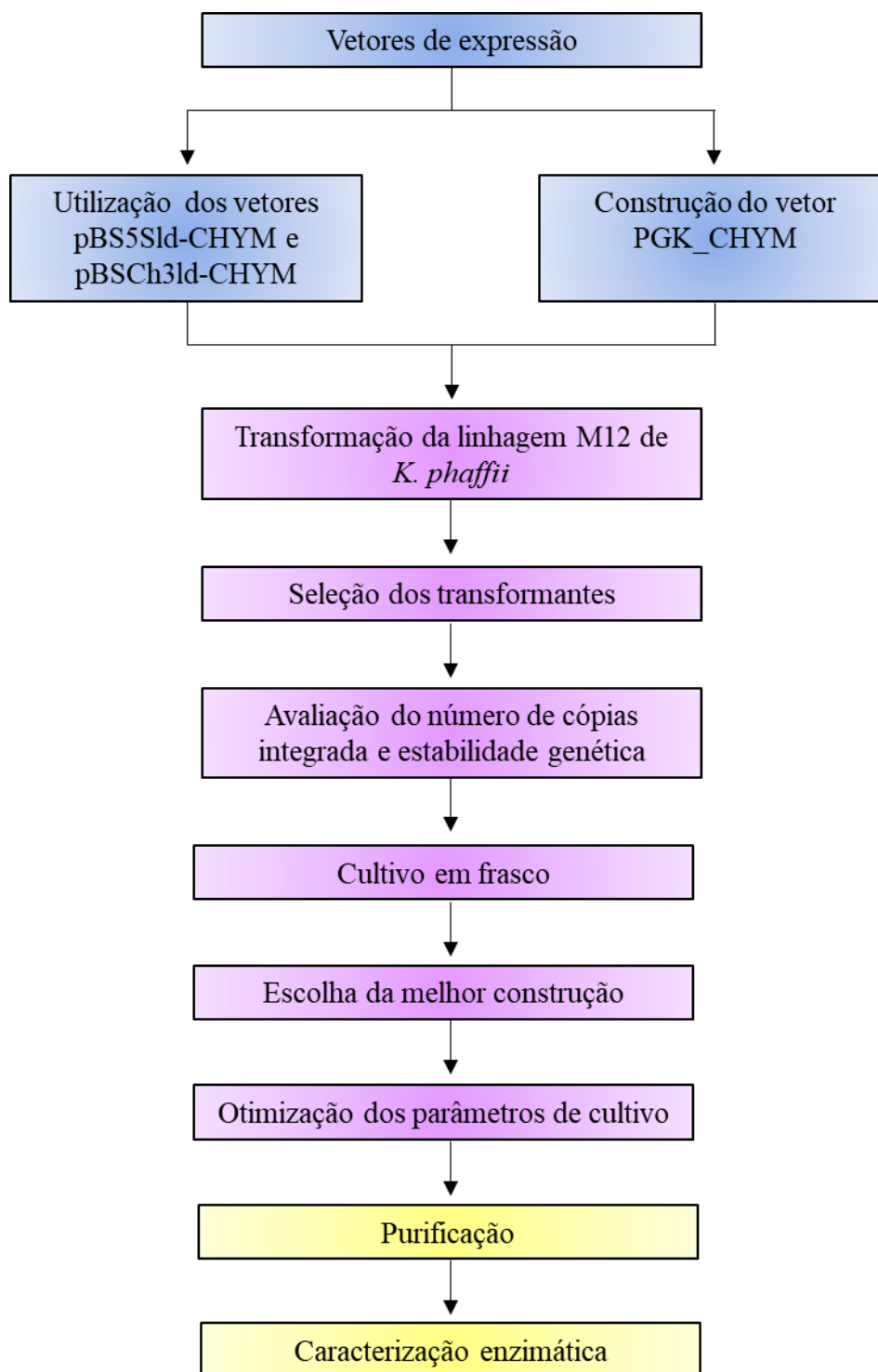


Figura 4. Esquema da estratégia utilizada para o desenvolvimento do projeto. Em azul, etapas de construção de vetores e confirmação de construção. Em lilás, etapas de seleção de linhagem e produção enzimática. Em amarelo, etapas de caracterização enzimática.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagens de microrganismos

Escherichia coli XL10-Gold (Stratagene)

Komagataella phaffi M12 (Ocampo, 2014)

4.1.2. Meios de cultura

BMGY (*Buffered Glycerol- Complex Medium*)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Fosfato de potássio	100 mM
YNB com sulfato de amônio	1,34% (p/v)
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Glicerol	1% (v/v)

LB (*Luria-Bertani*)

Peptona	1% (p/v)
Cloreto de Sódio	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Para LB sólido adicionar ágar 1,5% (p/v)	
Ajustas para pH 7,0	

MD (*Minimal Dextrose*)

YNB	1,34% (p/v)
Glicose	1% (p/v)
Biotina	4 x 10 ⁻⁵ % (p/v)
Para MM sólido adicionar ágar 1,5% (p/v)	
Adicionar de leucina 0,08% (p/v) para crescimento da linhagem M12	

BMD (*Buffered Minimal Dextrose*)

Tampão fosfato de potássio	100 mM pH 6,0
YNB	1,34% (p/v)

MATERIAIS E MÉTODOS

Biotina	$4 \times 10^{-5} \%$ (p/v)
Glicose	2% (p/v)

BMGY (*Buffered Minimal Glycerol*)

Peptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)
Tampão fosfato de potássio	100 mM pH 6,0
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	$4 \times 10^{-5} \%$ (p/v)
Glicerol	1% (v/v)

Meio UAB (Adaptado)

Base

Ácido cítrico	0,18 % (p/v)
Cloreto de cálcio $2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2 \times 10^{-3} \%$ (p/v)
Fosfato de amônio monobásico	1,446 % (p/v)
Sulfato de magnésio $7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05% (p/v)
Cloreto de potássio	0,09% (p/v)
Glicerol	2% (v/v)
Ajusta para pH 5,4	
Adicionar 4,5 mL de elementos traços	
Adicionar 2 mL Biotina	$4 \times 10^{-4} \%$

Elementos traços

Sulfato de cobre $5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,6% (p/v)
Iodeto de sódio	$8 \times 10^{-3} \%$ (p/v)
Sulfato de manganês	0,52% (p/v)
Molibdato de sódio	0.017% (p/v)
Ácido bórico	$2 \times 10^{-3} \%$ (p/v)
Cloreto de cobalto	0.05% (p/v)
Sulfato de zinco	4.212 % (p/v)
Cloreto de manganês	2,89% (p/v)
Sulfato de Ferro $7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.5% (p/v)

MATERIAIS E MÉTODOS

Ácido sulfúrico 5 mL.L⁻¹

YPD (*Yeast Peptone Dextrose*)

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Para YPD sólido adicionar ágar 2% (p/v)

4.1.3. Soluções para DNA

TE

Tris-HCl 10 mM pH 8,0

EDTA 1 mM pH 8,0

Solução II

Hidróxido de sódio 0,2M

SDS 1% (p/v)

Preparar no momento do uso.

Solução III

Acetato de sódio 5 M

Ajustar o pH para 4,8 com ácido acético glacial

Clorofane

Clorofórmio 1 V

Fenol equilibrado 1 V

Clorofil

Clorofórmio 24 V

Álcool isoamílico 1 V

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

Tris-Acetato 2 M pH 8,0

MATERIAIS E MÉTODOS

EDTA 0,05 M pH 8,0

Tampão de amostra DNA

TAE 20X 50% (v/v)
Glicerol 30% (v/v)
Azul de bromofenol 0,25% (p/v)

4.1.4. Soluções para proteína

Solução leite desnatado

Leite em pó desnatado (Molico- Nestlé) 12% (p/v)
Cloreto de cálcio 20 mM
Tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,0

Tampão Tris-Glicina 5X

Trizma base 125 mM
Glicina 0,96M
SDS 0,1% (p/v)

Tampão de amostra proteína 2X

Tris-HCl 200 mM pH 6,8
SDS 4% (p/v)
 β -Mercaptoetanol 4% (v/v)
Glicerol 20% (v/v)
Coomassie brilliant G-250 0,1% (p/v)

Solução corante Coomassie Blue

Coomassie brilliant G-250 0,25% (p/v)
Metanol 30% (v/v)
Ácido acético glacial 7% (v/v)

Solução descorante

Metanol 30% (v/v)

MATERIAIS E MÉTODOS

Ácido acético glacial

7% (v/v)

4.1.5. Kits comerciais

Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega)

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

NEBuilder® HiFi DNA Assembly (New England BioLabs)

iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD)

Reagents for measurement of glucose concentration (BioSystems)

4.1.6. Marcadores moleculares

O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, (Thermo Fisher Scientific)

1kb plus DNA ladder, (Thermo Fisher Scientific)

2-log DNA ladder, (New England Biolabs)

Pierce™ Unstained Protein MW Marker, (Thermo Fisher Scientific)

4.1.7. Enzimas

Para PCR foi utilizada a enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific).

Todas as enzimas de restrição foram adquiridas na *New England Biolabs* (tabela 3).

Tabela 3. Enzimas de restrição utilizadas.

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão
BamHI	G [^] GATC_C	NEBuffer 3.1
BglII	A [^] GATC_T	NEBuffer 3.1
HindIII	A [^] AGCT_T	NEBuffer 2.1
NotI	GC [^] GGCC_GC	NEBuffer 3.1
PmeI	GTTT_ [^] AAAC	NEBuffer CutSmart
PvuI	CG_AT [^] CG	NEBuffer 3.1
SacII	CG_GC [^] GC	NEBuffer CutSmart
XhoI	C [^] TCGA_G	NEBuffer 3.1

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.8. Vetores

Os vetores utilizados neste trabalho estão listados e suas características e origens descritas na tabela 4.

Tabela 4. Vetores utilizados.

Vetor	Descrição
pPGK_CYM	Vetor construídos neste trabalho para expressão da quimosina bovina. O gene CHYM está sob o controle do promotor P_{PGK1} . A marca de seleção auxotrófica <i>leu2-d</i> .
pBS5Sld_CHYM	Vetor construído no laboratório de biotecnologia de levedura para expressão de CHYM. O gene está sob o controle do promotor P_{PGK1} . A marca de seleção auxotrófica <i>leu2-d</i> . O cassete de expressão está flanqueado por uma sequência com homologia ao uma região do DNA ribossomal 5S.
pBSCh3ld_CHYM	Vetor construído no laboratório de biotecnologia de levedura para expressão da quimosina bovina. O gene está sob o controle do promotor P_{PGK1} . A marca de seleção auxotrófica <i>leu2-d</i> . O cassete de expressão está flanqueado por uma sequência com homologia ao uma região repetitiva presente no cromossomo 3.
pKGFP-ld	Vetor construído no laboratório de biotecnologia de levedura para expressão do gene <i>eGFP</i> . O gene está sobre o controle do promotor P_{PGK1} . A marca de seleção auxotrófica <i>leu2-d</i>
pPIC9	Vetor comercial de expressão contendo o gene <i>HIS4</i> (Thermo Fisher Scientific)

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.9. Oligonucleotídeos iniciadores

Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados quimicamente e estão descritos na tabela 5. Em negrito estão marcados os sítios de restrição

Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizado.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5' → 3')	Sítios de restrição
CHYM5'	CAATTGATTACGAAAGGATCCATGAGATTCC CATCTATCTTCAC	BamHI
CHYM3'	TGATGATGGTCGACGCGGCCGCTTAGATAG CCTTAGCCAAACCA	NotI
qCHYM5'	TTGCTTGTGAGGGTGGTTGT	
qCHYM3'	AGCACCGATAGCTTGTGGA	
qHIS5'	GTGTATCCTGGCTTGGCATCT	
qHIS3'	GCCAAGTACGGTGTGACGTT	

4.2. Métodos

4.2.1. Construção dos vetores de expressão

O gene sintético da quimosina bovina (Araújo, 2008) foi amplificado do vetor pBS5Sld-CHYM utilizando os oligonucleotídeo iniciadores CHYM5' e CHYM3'. O produto da PCR foi clonado por recombinação homóloga no vetor pKGFp-IId usando o sistema NEBuilder, seguindo as instruções do fabricante, dando origem ao vetor pPGK_CHYM.

4.2.2. Preparação de DNA plasmidial (miniprep)

As colônias de interesse foram cultivadas em 5 mL de LB, contendo canamicina, na concentração de 50 µg.mL⁻¹, durante a noite, a 37 °C e rotação de 200 rpm. Após esse período 3 mL da cultura foram coletados e centrifugados a 3.000 g por 2 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 µL de TE e incubadas por 5 minutos. Posteriormente 360 µL da solução II foram adicionadas ao sistema e incubo por 5 minutos. Foram adicionados então, 300 µL da

MATERIAIS E MÉTODOS

solução III ao sistema, este foi incubado por 5 minutos, e centrifugado a 10.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Eppendorf contendo 10 µL de RNase A 10 mg.mL⁻¹ e incubado por 30 minutos a 37 °C. Foram adicionados 300 µL de clorofane a essa mistura e agitado com vortex por 1 minuto e centrifugar a 5.000 g por 5 minuto. A fase aquosa foi transferida para outro Eppendorf, e 300 µL de clorofil foram adicionados, o sistema foi agitado com vortex por 1 minuto e centrifugado a 5.000 g por 5 minutos. Foram adicionados 2 volumes de etanol 100% gelado, incubado por 1 hora no gelo e centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartando. O *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco ressuspenso em 100 µL de água milliQ.

4.2.3. Eluição de banda de DNA

Os fragmentos de DNA foram eluídos do gel de agarose com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) seguindo as orientações especificadas pelo fabricante.

4.2.4. Precipitação de DNA

Adicionar 10 µL de acetato de sódio 3 M a 90 µL de DNA, adicionar 2,5 volumes de etanol 100% e incubar a -20 °C durante a noite. Após esse tempo centrifugar a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C, descartar o sobrenadante e lavar duas vezes com etanol 70%, centrifugar a 10.000 g por 2 minutos e ressuspende em 10 µL de água milliQ.

4.2.5. Transformação de Levedura

A levedura foi cultivada em 5 mL de YPD em frasco tipo Erlenmeyer de 125 mL por 15 horas. Em seguida 500 µL da cultura foram transferidos para outro Erlenmeyer de 125 mL com 5 mL de YPD. Foi inoculada em fraco tipo Erlenmeyer de 1.000 mL com 100 mL de YPD quantidade de célula necessária para atingir uma OD600 entre 1,3 e 1,5. As células foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas com 100 mL de água gelada estéril. As células foram coletadas por centrifugação e novamente e ressuspendidas em 50 mL de água gelada estéril, esse passo foi repetido duas vezes. As células coletadas por centrifugação foram ressuspendas em 4 mL de sorbitol 1 M gelado estéril,

MATERIAIS E MÉTODOS

centrifugadas novamente e ressuspensas em 300 μ L sorbitol 1 M gelado estéril. Foram misturados 80 μ L de células competentes a 5 μ g ou 10 μ g de DNA linearizado. Essa mistura foi transferida para cubeta de eletroporação e incubada no gelo por 5 minutos. A eletroporação ocorreu sob as seguintes condições: 1.500 V, 400 Ω e 25 μ F. Imediatamente adicionou-se 1 mL de sorbitol 1 M gelado estéril. As células submetidas a eletroporação foram plaqueadas em meio MD. As centrifugações foram feitas a 1.500 g por 5 minutos a 4 °C

4.2.6. Triagem dos transformantes em placas tipo Deep Well

Os transformantes foram cultivados em placa do tipo *deep well* de 96 poços contendo 1 mL de meio MD por 72 horas a 28 °C e 200 rpm. A cultura foi centrifugada a 2.000 g por 5 minutos e o sobrenadante usado para teste de coagulação (item 4.2.11).

4.2.7. Triagem dos transformantes em frasco.

Para selecionar o melhor clone de cada construção, os clones que tiveram maior atividade enzimática em placas *deep well* foram crescidos em frasco.

Para isso uma colônia recém recuperada do freezer -80 °C em placa MD foi transferida para um frasco tipo Erlenmeyer de 125 mL com 10 mL de meio MD e crescida por 48 horas a 28 °C e agitação de 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para fazer um inóculo em frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL com 25 mL de BMGY nas condições anteriores. O experimento foi feito em duplicata.

4.2.8. Determinação do número de cópias integradas

Uma colônia recém recuperada do freezer -80° em placa contendo meio MD foi transferida para frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL com 25 mL de meio MD e crescida por 48 horas a 28 °C e agitação de 200 rpm. Após esse período foram usados 12 ml do cultivo para extração do DNA genômico usando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Este DNA foi utilizado como DNA molde para qPCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.9. Estabilidade genética

O restante da cultura utilizado para avaliação do número de cópias foi utilizado como pré-inóculo em uma cultura feita em Erlenmeyer de 250 mL com 40 mL de meio YPD e crescido por 24 horas a 28° e agitação de 200 rpm. Após esse período 400 µL da cultura foram transferidos para um novo Erlenmeyer de 250 mL com 40 mL de meio YPD, esse processo foi repetido por 7 dias totalizando 84 gerações. O DNA genômico foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Este DNA foi usado como molde para qPCR.

4.2.10. Real Time PCR

Para realização da qPCR foi utilizado o reagente iTaq™ Universal SYBR® Green supermix da Bio-Rad e o Rotor-Gene Q da Quiagen seguindo as instruções dos fabricantes. Os DNAs genômicos extraídos para avaliar número de cópias (1ª geração) e estabilidade genética (84ª geração) foram utilizados como DNA molde. O gene *HIS4* foi usado como controle endógeno (*housekeeping gene*) para normalizar a quantidade de DNA aplicado em cada reação, pois este gene possui uma única cópia no genoma de *K. phaffii*.

As curvas padrões de concentração de DNA foram feitas com os plasmídeos pPGK_CHYM e pPIC9 para quantificação do gene CHYM e do gene *HIS4*, respectivamente. Os plasmídeos foram diluídos para concentração de 10⁸ moléculas por µL e posteriormente para as concentrações de 10⁷, 10⁶, 10⁵ e 10⁴ moléculas por µL. O *threshold* foi escolhido manualmente seguindo a recomendação do fabricante.

4.2.11. Teste de coagulação (ARAÚJO, 2008)

Para mensurar a atividade enzimática, 100 µL da amostra foram adicionadas a 400 µL da solução de leite desnatado (item 4.1.4) pré-aquecidos a 37 °C. O sistema foi incubado na mesma temperatura até a formação de coágulos. Quando o tempo de coagulação foi inferior a 90 segundos a amostra foi diluída em tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,0 e as unidades de atividade enzimática de coagulação encontradas multiplicadas pelo fator de diluição. A unidade de atividade de coagulação corresponde a quantidade de enzima necessária para coagular os 400 µL da solução de leite em 5

MATERIAIS E MÉTODOS

minutos. A unidade de atividade enzimática de coagulação (UAC) pode ser calculada utilizando a fórmula abaixo:

$$\left(\frac{\text{Solução de leite } (\mu\text{L})}{\text{Sobrenadante } (\mu\text{L})} \right) * \left(\frac{5}{t(\text{minutos})} \right)$$

4.2.12. Produção de quimosina em frasco em meio YPD

Uma colônia isolada em meio MD recém recuperada do freezer -80 °C foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de YPD e crescida por 48 horas a 28 °C e 200 rpm. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 3.000 g por 5 minutos e o pellet lavado com água destilada estéril nas mesmas condições de centrifugação. As células lavadas foram usadas para inoculo em Erlenmeyer de 1.000 mL com 100 mL de YPD crescidas nas condições anteriores por 44 horas. Durante as coletas foi realizado teste de glicose com kit da BioSystems e quando ocorreu esgotamento da glicose foi feita alimentação com 2% de glicose. O experimento foi feito em triplicata.

4.2.13. Produção de quimosina em frasco em meio BMGY

Uma colônia isolada em meio MD recém recuperada do freezer -80°C foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de BMGY e crescida por 72 horas a 28°C e 200 rpm. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 3.000 g por 5 minutos, as células ressuspendidas em meio BMGY e usadas para inoculo em Erlenmeyer de 1.000 mL com 100 mL de BMGY e crescidos nas condições anteriores por 65 horas. O experimento foi feito em triplicata.

4.2.14. Produção de quimosina em frasco em meio UAB

Uma colônia isolada em meio MD recém recuperada do freezer -80°C foi transferida para um tubo de fundo cônico de 50 mL com 5 mL de UAB e crescida durante a noite a 28 °C e 200 rpm. Posteriormente os 5 mL de cultura foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de UAB e crescido por 48 horas a 28 °C e 200 rpm. O cultivo foi centrifugado a 3.000 g por 5 minutos a 4 °C e as células ressuspendidas em UAB e usado para o inoculo em Erlenmeyer de 1.000 mL com 100 mL de UAB crescidas nas condições anteriores por 65 horas. O experimento foi feito em triplicata.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.15. Produção de quimosina em frasco em meio BMD

Uma colônia isolada recém recuperada do freezer -80°C foi transferida para um tubo de fundo cônico de 50 mL com 5 mL de meio BMD e crescida durante 48 horas a 28°C e 200 rpm. Posteriormente 1,5 mL do cultivo foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio BMD e crescido por 96 horas a 28°C e 200 rpm. O cultivo foi centrifugado a 3.000 g por 5 minutos a 4°C e as células ressuspendidas em BMD e usado para o inoculo em Erlenmeyer de 1.000 mL com 100 mL de BMD crescidas nas condições anteriores por 91 horas. O experimento foi feito em triplicata.

4.2.16. Precipitação de proteína com TCA

Uma solução de TCA 100% foi adicionada as amostras proteicas na proporção de 1:4. O sistema foi incubado a -20°C durante a noite. Após esse período foi centrifugado a 14.000 g por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com acetona 100% nas mesmas condições de centrifugação, porém por 10 minutos. O *pellet* seco foi ressuspendido em tampão de amostra de proteína 1X e utilizado para análise em SDS-PAGE.

4.2.17. SDS-PAGE

Para análise por eletroforese das amostras precipitadas com TCA 100% foi feito um gel de poliacrilamida com a malha de 12%. Os reagentes utilizados para gel concentrador e para o gel separador estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6. Reagentes utilizados para SDS-PAGE 12%

	Gel concentrador 5%	Gel separador 12%
Acrilamida 30%	0,33 mL	2 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	1,3 mL
Tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	0,25 mL	-
H ₂ O	1,4 mL	1,6 mL
SDS 10%	20 μL	50 μL
APS 10%	20 μL	50 μL
TEMED	2 μL	2 μL

MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.18. Purificação por Cromatografia de Gel Filtração

A linhagem C32 foi cultivada por 38 horas em frasco tipo Erlenmeyer de 1.000 mL contendo 150 mL de meio YPD a 28 °C e agitação de 200 rpm em triplicata. Os sobrenadantes desses cultivos foram concentrados 30 vezes através do sistema Amicon com membrana de nitrocelulose com *cut-off* de 10 kDa e posteriormente concentrados 60 vezes com o Amicon Ultra-0,5 mL de 3K da Millipore. Foi aplicado 1 mL desta amostra na coluna Hiload 16/600 superdex 200 pg (GE Healthcare), sistema Akta Pure (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0). A eluição foi realizada com fluxo constante de 0,8 mL por minuto do mesmo tampão. Foram coletadas frações de 2 mL. As frações que possuíam atividade enzimática foram reunidas e concentradas.

4.2.19. Concentração das frações

As amostras cromatográficas foram concentradas utilizando o Amicon Ultra-0,5mL de 3 kDa da Millipore, seguindo especificações do fabricante e utilizadas para o teste de deglicosilação.

4.2.20. Teste de deglicosilação

Para verificar a presença de *N*-glicosilação na quimosina recombinante foi usada a enzima PNGase F (Sigma-Aldrich, USA). Para isso aproximadamente 100 µg da proteína (volume máximo de 30 µL) foram misturados a 10 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5) e a 2,5 µL de uma solução de 0,2% de SDS com 100 mM de 2-mercaptoetanol e aquecido a 100°C por 5 minutos. Após esse período o sistema foi resfriado a temperatura ambiente e foram adicionados 2,5 µL da solução 15% de Triton X-100 seguida da adição de 1 µL da enzima PNGase F e incubação de 3 horas a 37 °C. A análise foi feita por SDS-PAGE.

4.2.21. Efeito da temperatura na atividade enzimática e termoestabilidade

Para determinar em qual temperatura a quimosina bovina recombinante tem maior atividade enzimática foi realizado o mesmo teste de coagulação do leite descrito em

MATERIAIS E MÉTODOS

matérias e métodos item 4.2.11, contudo a temperatura de incubação variou de 10 °C a 60 °C com intervalo de 10 °C. Para esse teste utilizou-se a enzima purificada.

Para determinar em qual temperatura ocorre a desnaturação da quimosina e consequentemente a perda de atividade enzimática foi realizado o teste de estabilidade térmica, para isso a enzima purificada foi incubada por uma hora a temperatura de 10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C 50 °C ou 60 °C. Após esse período foi realizado o teste de coagulação do leite descrito em materiais e métodos item 4.2.11.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção do vetor de expressão.

Pra avaliar a produção de quimosina bovina em linhagens de *K. phaffii* contendo múltiplas cópias do gene CHYM sob o controle do promotor P_{PGK1} , foi construído o vetor PGK_CHYM, que direciona a integração para o locus *PGK1* e que apresenta o alelo defeutivo *leu-2d* para facilitar a seleção de clones com múltiplas cópia do vetor integrado no genoma da levedura. Neste trabalho também foram utilizados os vetores pBS5Sld-CHYM e pBSCh3ld-CHYM, construídos anteriormente no Laboratório de Biotecnologia de Leveduras, que possuem o gene CHYM sob o controle do promotor P_{PGK1} , a marca *leu2-d* e direcionam a integração para o locus 5S rDNA e para uma sequência repetitiva do cromossomo 3, respectivamente. Essas sequências aumentam a chance de integração de múltiplas cópias do vetor no genoma de *K phaffii* (BETANCUR, 2017).

Para construção do plasmídeo PGK_CHYM, o gene da quimosina bovina e o fator alfa, um peptídeo sinal de *Saccharomyces cerevisiae*, foram amplificados do vetor pBS5Sld-CHYM usando os oligonucleotídeos iniciadores CHYM5' e CHYM3' (figura 5a). O fragmento amplificado é flanqueado por regiões de homologia ao vetor pKGFP-ld e possui aproximadamente 1,3 kb. Este amplicon foi ligado ao fragmento resultante da digestão do vetor pKGFP-ld com as enzimas BamHI e NotI de aproximadamente 4,7 kb (Figura 5b), através do sistema NEBuilder, seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, o sistema foi utilizado na transformação de *Escherichia coli* XL10-Gold e os clones foram selecionadas em placas com meio LB com canamicina $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O plasmídeo foi extraído dos clones selecionados e depois analisado por perfil de restrição. A construção do vetor está exposta esquematicamente na figura 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

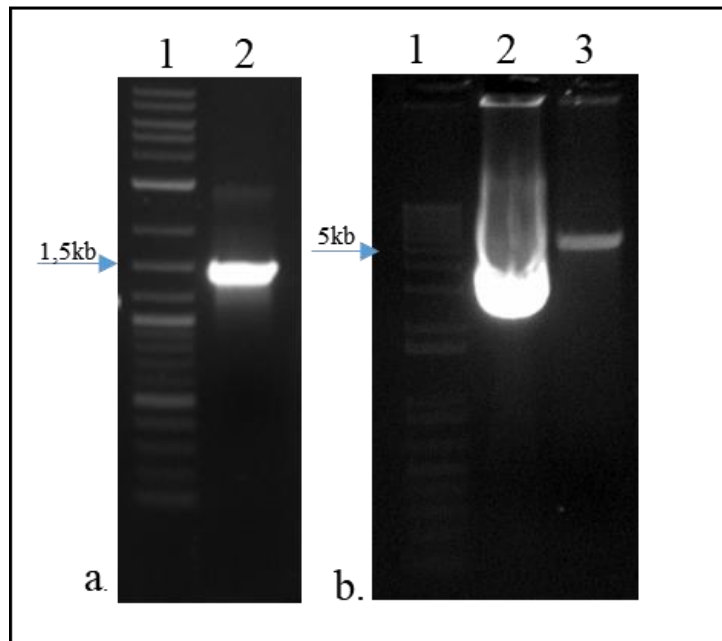


Figura 5. Clonagem do gene CHYM. a) Amplificação do gene da quimosina juntamente com a sequência do fator alfa. O fragmento foi amplificado por PCR e analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e possui tamanho esperado de 1372 pb. Marcador utilizado: 2-log DNA ladder, (New England Biolabs). b) Digestão do vetor pKGFp-I α . O vetor foi digerido utilizando as enzimas BamHI e NotI e o fragmento de 4,7 kb eluído e analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1) marcador, 2) vetor intacto e 3) fragmento de 4,7 kb eluído. Marcador utilizado 1kb plus DNA ladder, (Thermo Fisher)

Para confirmar a construção do vetor PGK_CHYM foi feito o perfil de restrição do plasmídeo utilizando quatro sistemas de digestão. No primeiro sistema foram usadas as enzimas BamHI e NotI que liberaram um fragmento de 1370 pb correspondente ao gene da quimosina bovina juntamente com o fator alfa e outro fragmento de 4760 pb correspondente ao restante do vetor, no segundo o vetor foi digerido com BamHI e BglII liberando fragmento de 640 pb que corresponde ao promotor P_{PGK1} e outro fragmento de 5500 pb correspondente ao restante do vetor, no terceiro o vetor foi digerido com PvuI que linearizou o vetor e no último sistema o vetor foi digerido com HindIII que também linearizou o vetor (figura 7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

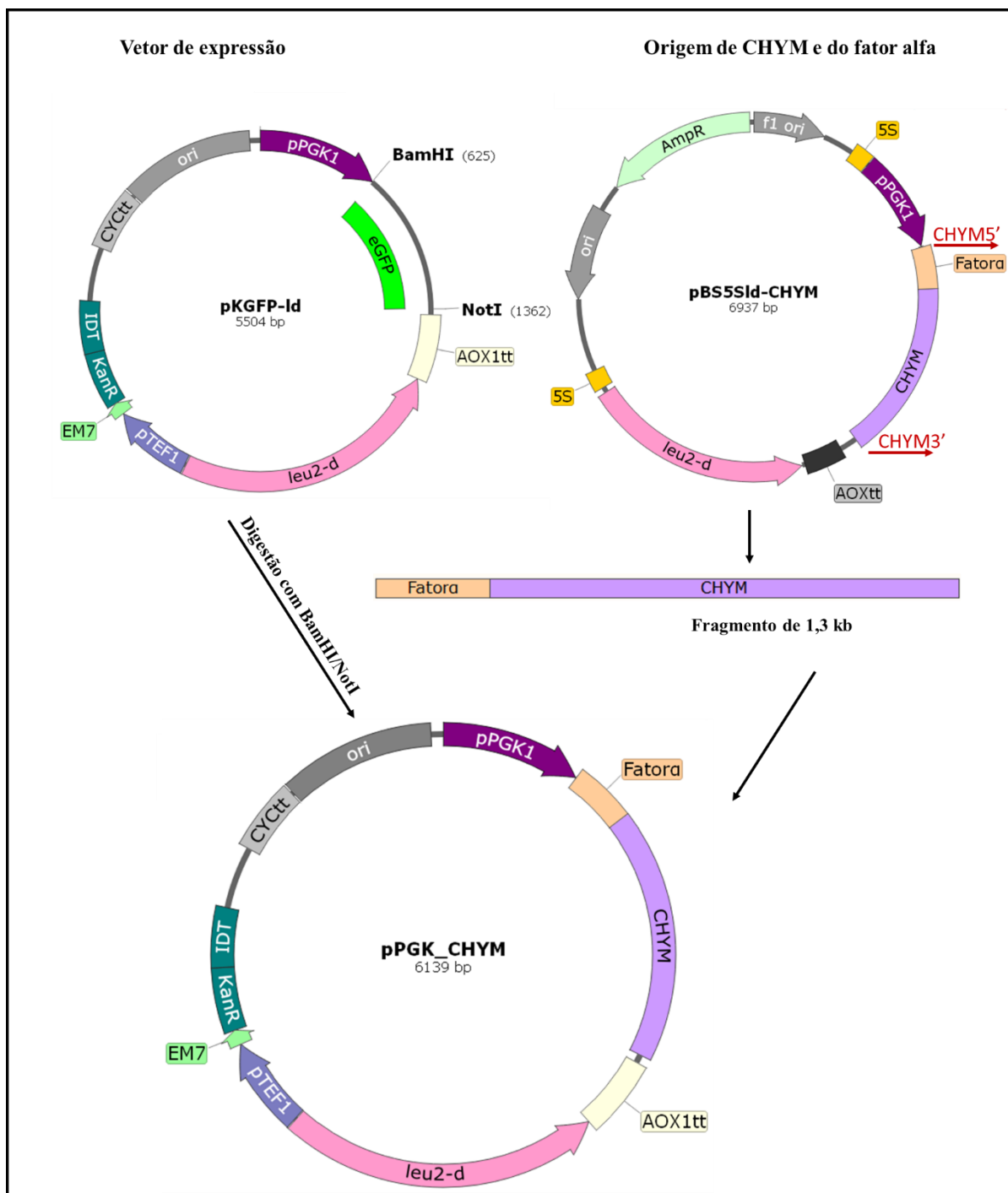


Figura 6. Esquema da construção do vetor PGK_CHYM. Em vermelho, região de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores CHYM5' e CHYM3'.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

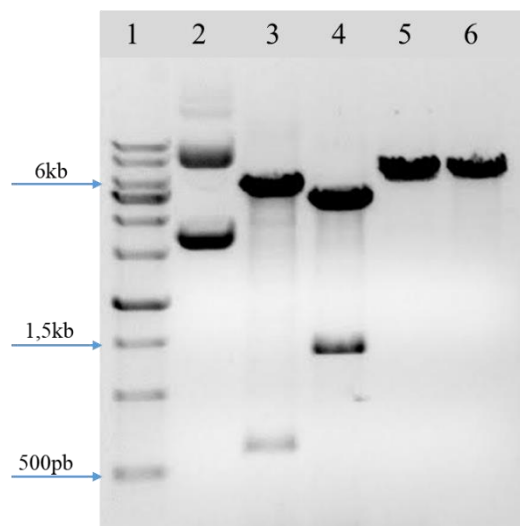


Figura 7. Perfil de restrição do vetor pPGK_CHYM. Fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O vetor obtido foi digerido com diferentes enzimas de restrição com objetivo de confirmar a construção. 1) marcador molecular, 2) vetor intacto, 3) vetor digerido com BamHI e BglII liberando fragmentos de 5500 pb e 640 pb, 4) vetor digerido com as enzimas BamHI e NotI liberando fragmentos de 4760 pb e 1370 pb, 5) vetor digerido com PvuI que lineariza o vetor, 6) vetor digerido com HindIII que lineariza o vetor. Marcador molecular utilizado: O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Também foi feito o perfil de restrição para confirmar a sequência dos vetores pBS5Sld-CHYM e pBSCh3ld-CHYM, que foram construídos em trabalhos anteriores. O vetor pBS5Sld-CHYM foi digerido com três sistemas de enzimas de restrição diferentes. No primeiro foi utilizada a enzima PmeI liberando o fragmento de 4075 pb correspondente ao cassete de expressão e o fragmento de 2862 pb correspondente ao restante do vetor, no segundo sistema a digestão foi realizada com as enzimas XhoI e NotI que liberou o fragmento de 1123 pb correspondente a quimosina e outro fragmento de 5814 pb correspondente ao restante do vetor e por último o vetor foi digerido com PvuI que liberou três fragmentos de 5395 pb, 1046 pb e 496 pb confirmando assim a presença no promotor *P_{PGK1}*.

O vetor pBSCh3ld-CHYM foi digerido com quatro sistemas de enzimas de restrição distintos. No primeiro foi utilizada a enzima PmeI que liberou o fragmento de 4011 pb correspondente ao cassete de expressão e o fragmento de 2862 pb correspondente ao restante do vetor, no segundo sistema foram usadas as enzimas XhoI e NotI que liberou o fragmento de 1123 pb correspondente a quimosina e de 5750 pb correspondente ao restante do vetor, no terceiro sistema o vetor foi digerido com PvuI liberando 3 fragmentos de 464 pb, 1046 pb e 5363 pb confirmando a presença do promotor *P_{PGK1}* e

RESULTADOS E DISCUSSÃO

por último foi feita a digestão com SacII liberando os fragmentos de 3914 pb e 2959 pb que confirma a presença das regiões de homologia ao cromossomo 3.

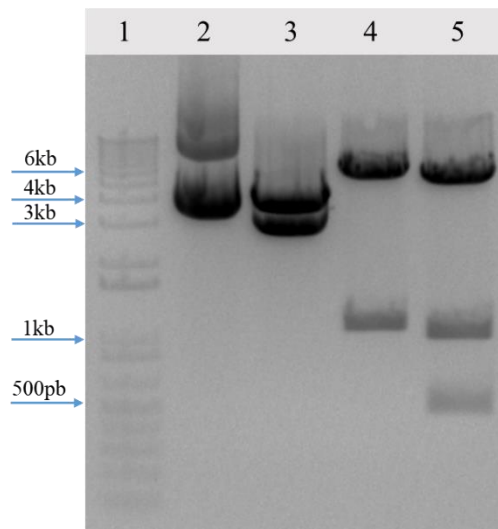


Figura 8. Perfil de restrição do vetor pBS5SId-CHYM. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1) marcador molecular, 2) vetor intacto, 3) vetor digerido com PmeI liberando fragmentos de 4075 pb e 2862 pb, 4) vetor digerido com XhoI e NotI liberando os fragmentos de 5814 pb e 1123 pb, 5) vetor digerido com PvuI liberando fragmentos de 5395pb, 1046 pb e 496 pb. Marcador molecular utilizado: 1kb plus DNA ladder, (Thermo Fisher Scientific).

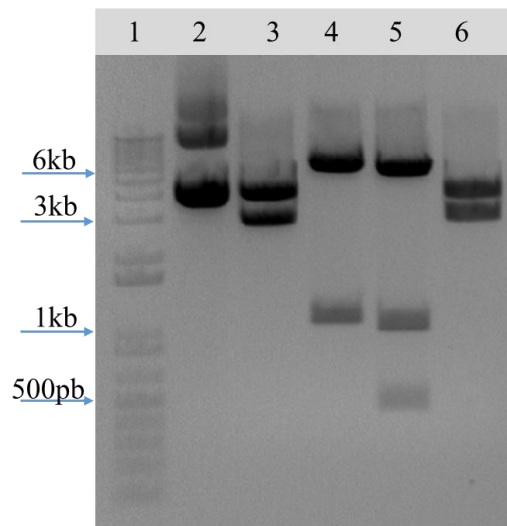


Figura 9. Perfil de restrição do vetor pBSCh3Id-CHYM. Fragmentos foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1) marcador molecular, 2) vetor intacto, 3) vetor digerido com PmeI liberando os fragmentos de 4011 pb e 2862 pb, 4) vetor digerido com XhoI e NotI liberando os fragmentos de 1123 pb e 5750 pb, 5) vetor digerido com PvuI liberando fragmentos de 5363 pb, 1046 pb e 464 pb 6) vetor digerido com SacII liberando fragmentos de 3914 pb e 2959 pb. Marcador molecular utilizado: 1kb plus DNA ladder, (Thermo Fisher Scientific)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2. Transformação de levedura.

Após a obtenção dos vetores de expressão necessários foi iniciada a etapa de transformação da linhagem M12 de *K. phaffii* e a seleção de clones produtores da quimosina bovina.

Foram digeridos 10 µg dos vetores pBS5Sld-CHYM e pBSCh3ld-CHYM com a enzima PmeI e 5 µg do vetor pPGK_CHYM com a enzima PvuI. Posteriormente, o DNA digerido foi precipitado e usado para transformação da linhagem M12 de *K. phaffii* por eletroporação. Logo após a transformação, as leveduras foram recuperadas em meio MD para selecionar os clones que tiveram a prototrofia restaurada. As colônias transformantes começaram a aparecer na placa de transformação somente após cinco dias de incubação e estas apresentaram tamanhos diferentes entre elas. Foram obtidas 52 colônias transformantes com a construção pBSCh3ld-CHYM, 23 colônias transformantes da construção pBS5Sld-CHYM e 137 colônias transformantes da construção PGK_CHYM. Os transformantes foram crescidos em placas de 96 poços tipo *deep well* contendo meio MD e o sobrenadante utilizado para teste de coagulação. A tabela 7 mostra atividade enzimática dos transformantes que apresentaram atividade.

Foi encontrada uma alta porcentagem de clones nas transformações utilizando os vetores pBS5Sld-CHYM e PGK_CHYM que não apresentaram atividade enzimática, cerca de 87% e 98%, respectivamente. Foi sugerido na literatura que clones transformante, com integração da marca *leu2-d*, sem atividade enzimática sofreram a integração de apenas uma cópia do vetor ou perderam o cassete de expressão por recombinação intramolecular, ficando com cópias insuficientes para recuperação da prototrofia (BETANCUR, 2017).

Os clones que apresentaram maior atividade enzimática em placas *deep well* de cada construção, foram crescidos em frasco tipo Erlenmeyer com meio BMGY por 72 horas e amostras foram retiradas nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas para teste coagulação. A cultura foi iniciada com a OD₆₀₀ 0,3. A tabela 8 mostra a quantificação enzimática média dos clones.

Os clones C32, R5 e P33 apresentaram maior atividade enzimática quando cultivados em placas de 96 poços tipo *deep well* utilizando meio MD e quando cultivados em frasco utilizando BMGY, por esse motivo foram selecionados para as próximas etapas deste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7. Atividade enzimática dos clones transformantes em placas tipo *deep well*.

pBSCh3Id-CHYM		pBS5SId-CHYM		pPGK_CHYM	
Clones	Atividade enzimática (UAC.mL ⁻¹)	Clones	Atividade enzimática (UAC.mL ⁻¹)	Clones	Atividade enzimática (UAC.mL ⁻¹)
C2	12,5	R5	12,5	P2	2,5
C3	10	R6	5,5	P15	2,5
C6	10	R18	10	P33	6,25
C7	10				
C8	10				
C9	10				
C10	10				
C11	10				
C12	10				
C15	10				
C16	10				
C17	12,5				
C19	12,5				
C23	11				
C25	11				
C26	11				
C27	11				
C28	10				
C29	9				
C30	12,5				
C31	9				
C32	14				
C33	14				
C34	11				
C36	10				
C37	14				
C38	11				
C40	10				
C41	10				
C42	10				
C43	10				
C44	12,5				
C45	8,3				
C47	8,3				
C48	12,5				

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 8. Atividade enzimática do sobrenadante dos cultivos em frasco dos clones transformantes.

Clones	Atividade em 24 h (UAC.mL ⁻¹)	Atividade em 48 h (UAC.mL ⁻¹)	Atividade em 72 h (UAC.mL ⁻¹)
C32	1,3	48,3	70
C33	1,3	41,6	40
R5	0	70	130
R18	0	1,45	3,12
P2	0	0	5
P15	25	25	57
P33	36	36	57

5.3.Determinação do número de cópias e estabilidade genética

Após a seleção das melhores linhagens de cada construção baseada em sua produção enzimática, foram feitos testes com o objetivo de analisar a quantidade de cópias e a estabilidade do gene que expressa a quimosina bovina recombinante (CHYM) integrado no genoma das linhagens selecionadas. Foram realizadas reações de qPCR com o DNA genômico extraído das linhagens em meio seletivo e após o cultivo em 84 gerações em meio complexo não seletivo.

A linhagem C32 possui duas cópias do gene CHYM integrado ao genoma e após cultivo em meio não seletivo, manteve apenas uma cópia. A linhagem R5 possui 23 cópias do gene CHYM integrado ao genoma e ao final do cultivo em meio não seletivo permaneceu com três cópias integradas e a linhagem P33 possui 20 cópias do gene CHYM integradas ao genoma e ao final do cultivo em meio não seletivo perdeu todas as cópias (figura 10). A instabilidade genômica em meio não seletivo pode estar relacionada a integração *in tandem* do cassete de expressão. Este tipo de arranjo pode sofrer recombinação intramolecular e o gene de interesse pode ser eliminado por falta de pressão seletiva.

Foi observado em trabalho anterior que clones com integração no locus *PGK1*, com até 20 cópias do gene da *GFP*, possuíam grande estabilidade genética, diferentemente do observado para quimosina bovina. No mesmo trabalho foi reportado que a integração múltipla no locus 5S rDNA dos genes da *GFP* e de uma amilase foi altamente instável, esse fenômeno também foi observado para quimosina bovina (BETANCUR, 2017). Contudo no presente trabalho não foi realizado nenhum teste para confirmar o locus de integração, portanto não é possível uma análise robusta do resultado obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A marca de seleção *leu2-d* é pouco expressa na célula, por isso era esperado que a prototrofia celular só fosse restaurada com número de cópias elevado, contudo a linhagem C32, que apresenta apenas duas cópias integradas ao genoma, possui crescimento celular semelhante, em meio sem leucina, às linhagens P33 e R5 que possuem 20 e 23 cópias, respectivamente. Este dado está de acordo com o encontrado por Betancur (2017), que obteve uma linhagem de *K. phaffii* produtora de amilase, com duas cópias do gene *AMY*, utilizando a marca *leu2-d*. Este clone produtor de amilase também perdeu 50% das cópias do gene *AMY* quando crescido em meio não seletivo, assim como a linhagem C32 do presente trabalho.

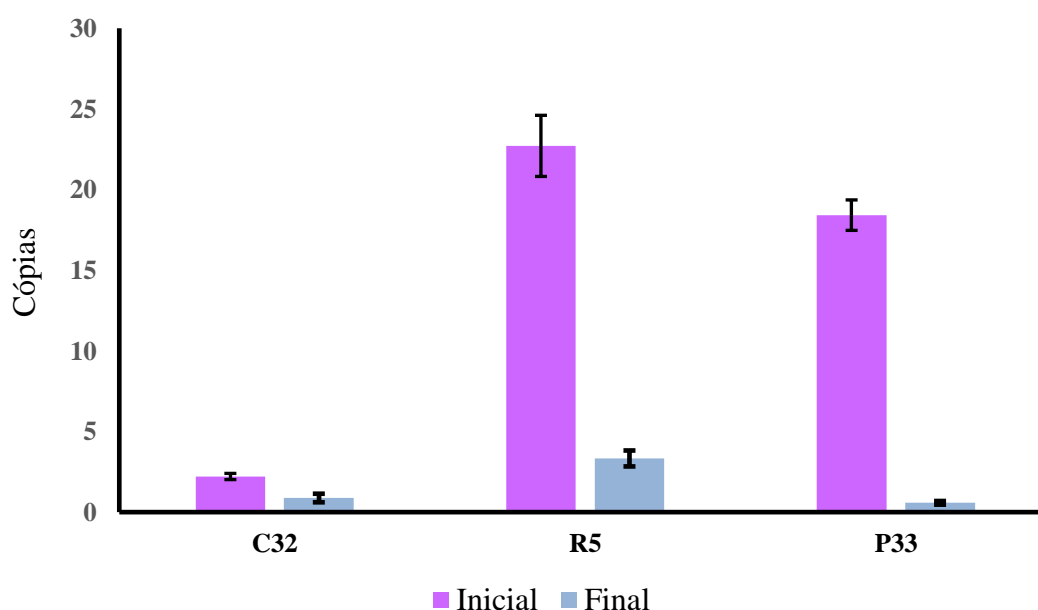


Figura 10. Determinação do número de cópias do gene CHYM e estabilidade genética das linhagens selecionadas. Para análise do número de cópias integradas, as linhagens foram cultivadas em meio seletivo. Para análise de estabilidade genética as linhagens foram cultivadas em meio não seletivo por 84 gerações. O DNA genômico de ambas as culturas foi extraído e usado como DNA molde para qPCR. O experimento foi realizado em triplicada e o erro padrão é apresentado no gráfico.

5.4.Otimização do modo de produção da quimosina

Para encontrar a melhor condição para produção de quimosina bovina, foram realizados cultivos em frascos tipo Erlenmeyer utilizados quatro meios de cultura diferentes

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Cultivo em YPD

Para uma avaliação inicial do crescimento celular e da produção enzimática das linhagens selecionadas nas etapas anteriores foi realizado o cultivo em frasco utilizando o meio YPD, um meio complexo padrão para o crescimento de *K. phaffii*. As linhagens C32, R5 e P33, assim como o controle M12 foram cultivados por 44 horas. Amostras de 3 mL do meio no início do cultivo e após 15 horas, 18 horas, 21 horas, 24 horas, 38 horas e 44 horas para o teste de coagulação de leite e análise por eletroforese. Para reduzir o tempo de fermentação, o cultivo foi iniciado com OD600 próxima a 4, essa estratégia diminui o desvio de nutrientes da formação de biomassa para produção da proteína recombinante pois as células se encontram com uma velocidade menor de crescimento.

A linhagem C32 apresentou maior crescimento em relação às outras linhagens transformantes, 1,7 vezes maior do que a linhagem R5 e 1,3 vezes maior do que a linhagem P33 (figura 11), sendo também a linhagem que apresentou maior atividade enzimática, 4 vezes maior do que a linhagem R5 e 3,1 vezes maior do que a linhagem P33, após 44 horas de fermentação (figura 12). Como a linhagem C32 é a que apresenta o menor número de cópias do gene CHYM integrado no genoma, é possível inferir que a presença de múltiplas cópias desse gene seja prejudicial às células. Aumentar o número de cópias do gene de interesse com objetivo de aumentar a produção da proteína heteróloga é uma estratégia eficiente até um determinado número de cópias. Esse limite é produto-dependente e extrapolar esse valor leva ao decréscimo da expressão em muitos casos. Isso se deve sobretudo à limitação na translocação pela membrana, ao processamento da sequência sinal, ao mal dobramento proteico dentro do retículo endoplasmático e à diminuição de recursos nutricionais e de precursores. (HOHENBLUM et al., 2004; MACAULEY-PATRICK et al., 2005)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

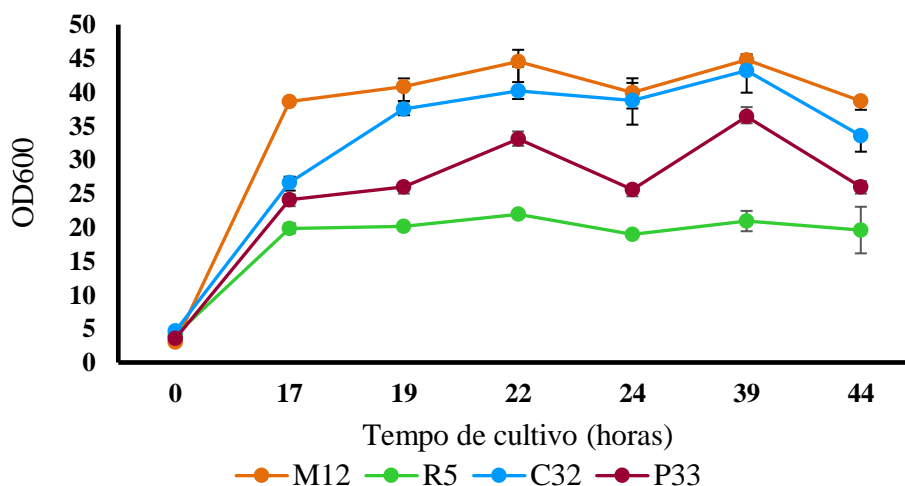


Figura 11. Curva de crescimento celular em meio YPD das linhagens selecionadas. Cultivo em frasco utilizando meio YPD para produção de quimosina das linhagens C32, R5, P33 e do controle negativo M12 por 44 horas. O crescimento é mensurado a partir da absorbância no comprimento de onda de 600nm. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

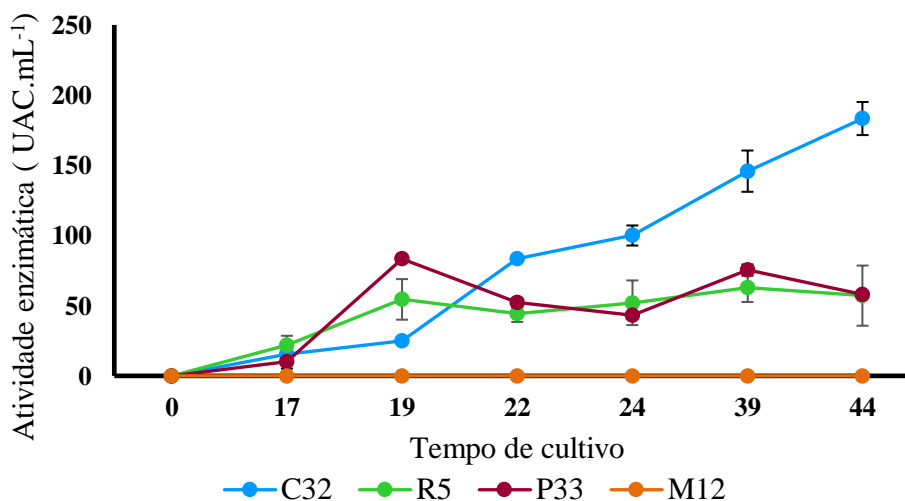


Figura 12. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando meio YPD das linhagens selecionadas. Atividade enzimática em UAC.mL⁻¹ do sobrenadante do cultivo em meio YPD das linhagens C32, R5, P33 e do controle negativo M12. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

Foi realizada análise por eletroforese em gel SDS-PAGE para avaliar a presença ou ausência da quimosina no sobrenadante, assim como avaliar se a proteína está na sua forma ativa ou na forma de pró-quimosina (figura 13). Após 17 horas de cultivo é possível observar apenas a pró-quimosina, que apresenta massa molecular de ~40 kDa. A partir de 19 horas de cultivo, há o aparecimento de uma proteína com peso molecular de ~36 kDa que corresponde à quimosina ativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse resultado pode ser explicado pela autoclivagem da pró-quimosina em pH ácido, considerando que o crescimento de *K. phaffii* promove a acidificação do meio de cultura (figura 13). A pró-quimosina sofre ativação por autocatálise a partir da remoção proteolítica da porção N-terminal. Este processo pode ocorrer de duas formas distintas, em pH 4,5 a reação de ativação gera a quimosina ativa pela remoção dos resíduos de aminoácidos 1-42 da pró-quimosina, e em pH 2,0 a reação de ativação gera a pseudoquimosina pela remoção dos resíduos de aminoácidos 1-27 da pró-quimosina (MCCAMAN; CUMMINGS, 1986). O meio de cultura a partir de 19 horas de cultivo apresentou pH próximo a 4, o que sugere que a autocatálise gerou a quimosina ativa.

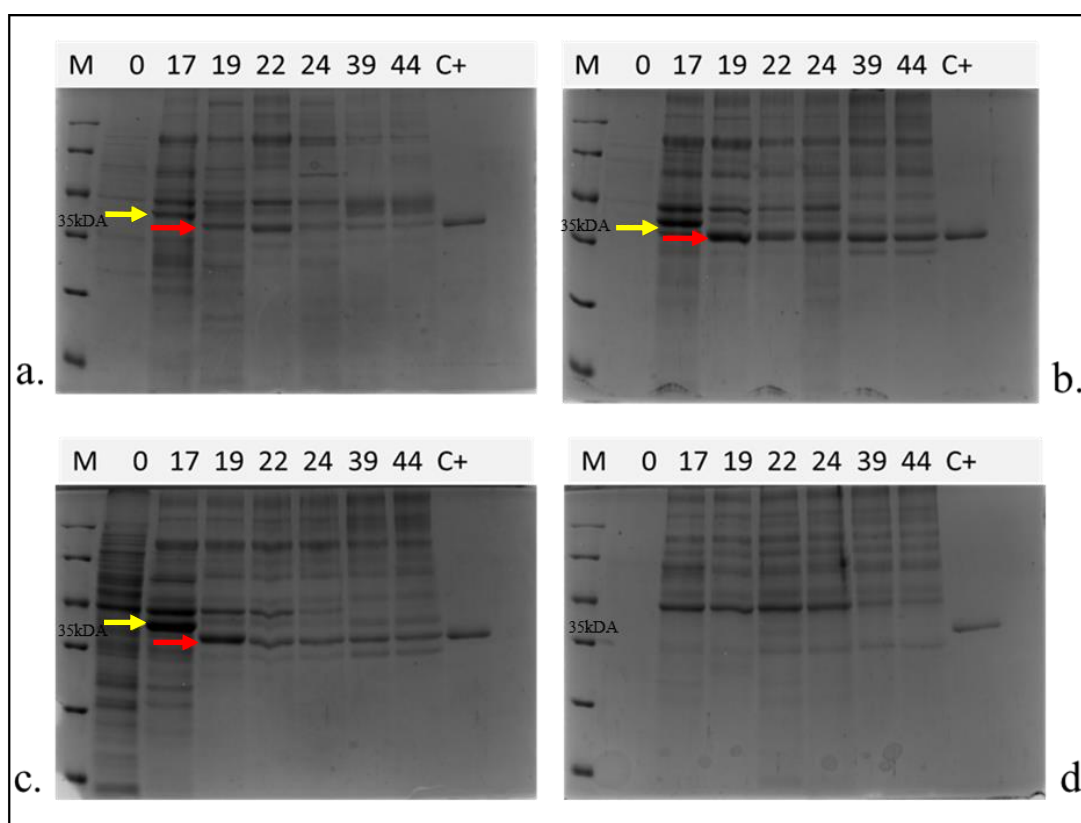


Figura 13. Perfil de proteínas secretadas em meio YPD das linhagens selecionadas. Foram analisados por SDS-PAGE 12% 250 μ L sobrenadante do cultivo em YPD das linhagens R5, C32, P33 e M12 no início do cultivo e nos tempos de 17 horas, 19 horas, 22 horas, 24 horas, 39 horas e 44 horas. a) linhagem R5. b) linhagem C32. c) linhagem P33. d) M12 (Controle negativo). C+ é uma quimosina comercial. A quimosina tem 36 kDa. As setas amarelas indicam a pró-quimosina e as setas vermelhas indicam a quimosina ativa. Marcador molecular utilizado: Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific).

5.4.2. Cultivo em meio BMGY

O glicerol tem o preço menor que o da glicose, pois é um subproduto da fabricação do biodiesel, desta forma, seu uso é interessante em fermentações em larga escala, pois diminui os custos de produção. Para avaliar qual linhagem possui maior produtividade enzimática em meio complexo contendo glicerol como fonte de carbono, as linhagens

RESULTADOS E DISCUSSÃO

C32, R5, P33 e M12 foram cultivadas por 65 horas em meio BMGY. Foram coletados 1,5 mL de meio cultura no início e nos tempos de 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 39 horas, 42 horas, 44 horas e 65 horas para teste de coagulação e análise em SDS-PAGE (figuras 14, 15 e 16).

Foi observado um crescimento similar entre as três linhagens transformantes e o controle negativo. As linhagens transformantes também apresentaram atividade enzimática semelhante entre si. Contudo a atividade enzimática obtida no cultivo em meio BMGY foi menor do que a atividade enzimática obtida no cultivo em meio YPD, isto pode ter relação com a taxa de transcrição do promotor P_{PGK1} que é maior em glicose do que em glicerol.

Foi realizada análise do sobrenadante por eletroforese em gel SDS-PAGE para verificar a presença de quimosina, assim como avaliar se a proteína está na sua forma ativa ou na forma de pró-quimosina. A partir de 18 horas é possível observar a presença da pró-quimosina e após 24 horas de cultivo é possível observar somente a presença da quimosina ativa (figura 16).

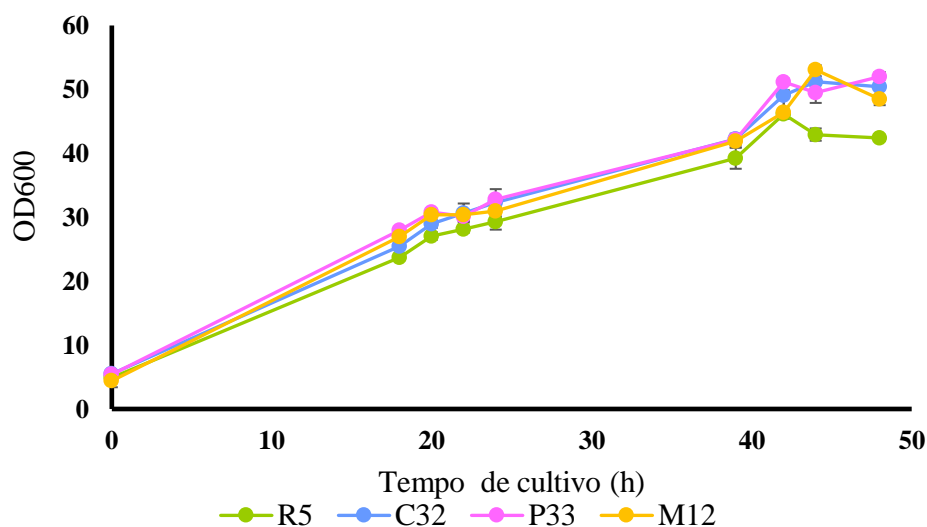


Figura 14. Curva de crescimento celular em meio BMGY das linhagens selecionadas. Cultivo em frasco utilizando meio BMGY para produção de quimosina das linhagens C32, R5, P33 e do controle negativo M12 por 65 horas. O crescimento foi mensurado a partir da absorbância no comprimento de onda de 600nm. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

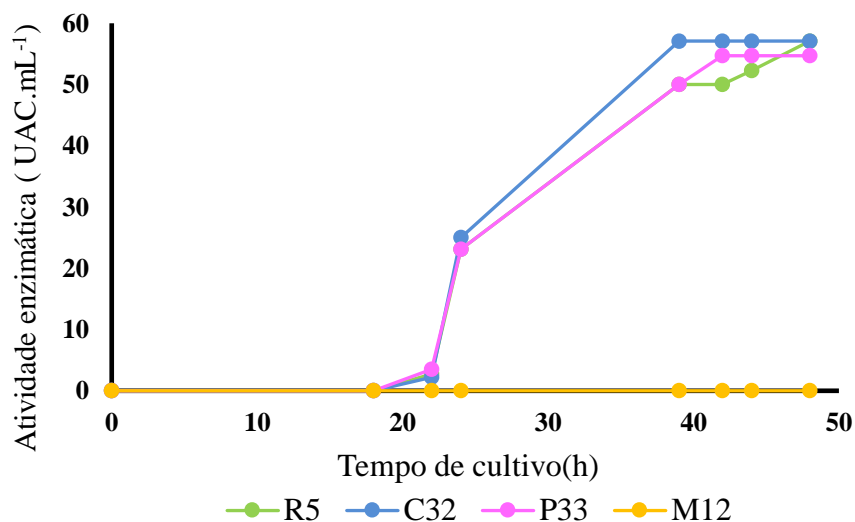


Figura 15. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando meio BMGY das linhagens selecionadas. Atividade enzimática em UAC.mL⁻¹ do sobrenadante do cultivo em meio BMGY das linhagens C32, R5, P33 e do controle negativo M12. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

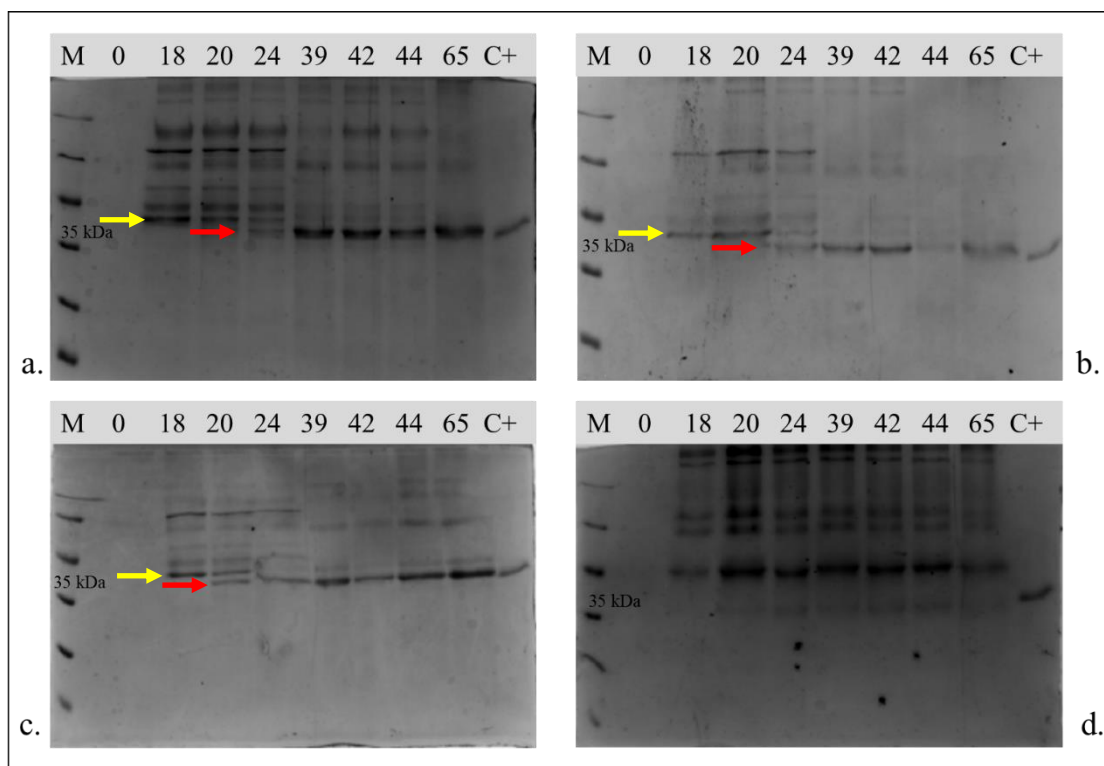


Figura 16. Perfil de proteínas secretadas em meio BMGY das linhagens selecionadas. Foram analisados por SDS-PAGE 12% 250 μ L sobrenadante do cultivo em BMGY das linhagens R5, C32, P33 e M12 no início do cultivo e nos tempos de 18 horas, 20 horas, 24 horas, 39 horas, 42 horas, 44 horas e 65 horas. a) Linhagem R5 b) Linhagem C32. c) Linhagem P33 d) M12 (Controle negativo). C+ é uma quimosina comercial. A quimosina tem ~36 kDa. As setas vermelhas indicam a quimosina ativa e as setas amarelas indicam a pró-quimosina. Marcador molecular utilizado: Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.3. Cultivo em meio BMD

As linhagens produtoras de quimosina recombinante obtidas neste trabalho utilizam a marca auxotrófica defectiva *leu2-d*, sendo assim os meios de cultivo que não contenham leucina podem ser usados para exercem pressão seletiva sobre os clones transformantes. Para analisar esse efeito, as linhagens C32, R5, P33 e M12 foram crescidas por 91 horas em meio BMD, sendo adicionado leucina apenas na cultura da linhagem M12. Amostras de 3 mL foram retiradas no início do cultivo nos tempos de 24, 48, 72 e 91 horas para realização de teste de coagulação e análise do perfil proteico por SDS-PAGE (figuras 17, 18 e 19).

Todos as linhagens produtoras de quimosina apresentaram crescimento celular semelhante, independentemente do número de cópias, quanto a produção enzimática a linhagem R5 apresentou atividade enzimática 31% maior do que as linhagens C32 e P33.

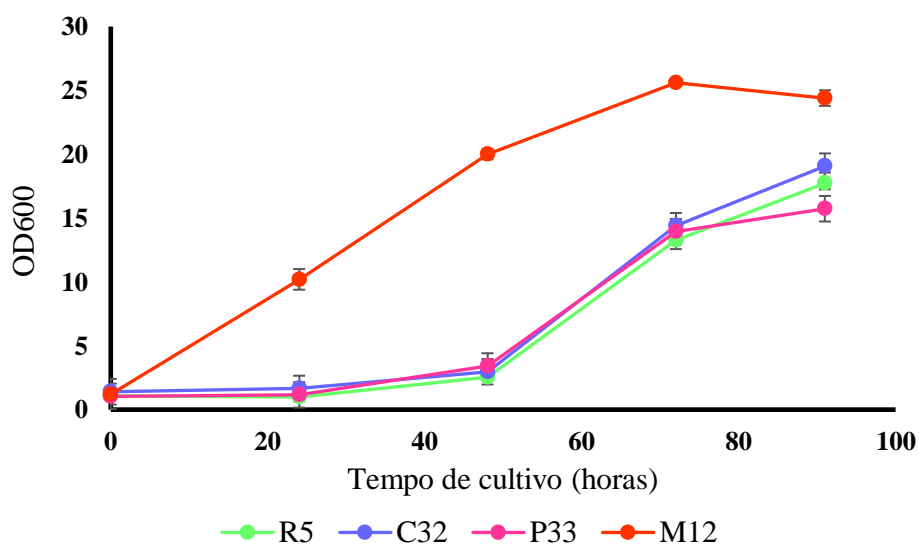


Figura 17. Curva de crescimento celular do cultivo em meio BMD das linhagens selecionadas. Cultivo em frasco utilizando meio BMD para produção de quimosina das linhagens C32, R5, P33 e do controle negativo M12 por 91 horas. O crescimento é mensurado a partir da absorbância no comprimento de onda de 600 nm. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

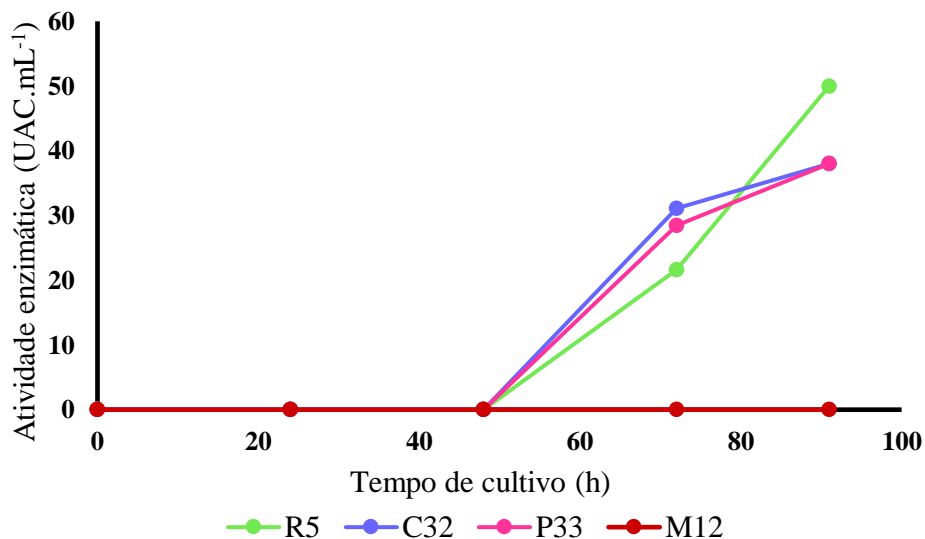


Figura 18. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando meio BMD das linhagens selecionadas. Atividade enzimática em UAC.mL⁻¹ do sobrenadante do cultivo em meio BMD das linhagens C32, R5, P33 e do controle negativo M12. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

Foi realizada análise por eletroforese em gel SDS-PAGE para avaliar a presença ou não da quimosina no sobrenadante, assim como avaliar se a proteína está na sua forma ativa ou na forma de pró-quimosina. A partir de 72 horas de cultivo, é possível observar o aparecimento de uma banda com tamanho correspondente ao da quimosina bovina (figura 19).

As proteínas endógenas são expressas em baixa quantidade neste meio, facilitando o processo de purificação, porém o cultivo em meio BMD apresentou uma fase lag extensa e metade da densidade celular obtido no cultivo em meio YPD. Além disso, a fermentação neste meio (incluindo as etapas de pré-inóculo) perdurou 235 horas contra 92 horas de cultivo em meio YPD. Levando em consideração que a produção de proteínas heterólogas é normalmente proporcional a densidade celular (CEREGHINO; CREGG, 2000) e que em um processo industrial a precificação de um produto contabiliza a hora-máquina e a hora-homem, o meio BMD deve ser melhorado para produção em larga escala (MIGUEL JÚNIOR, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

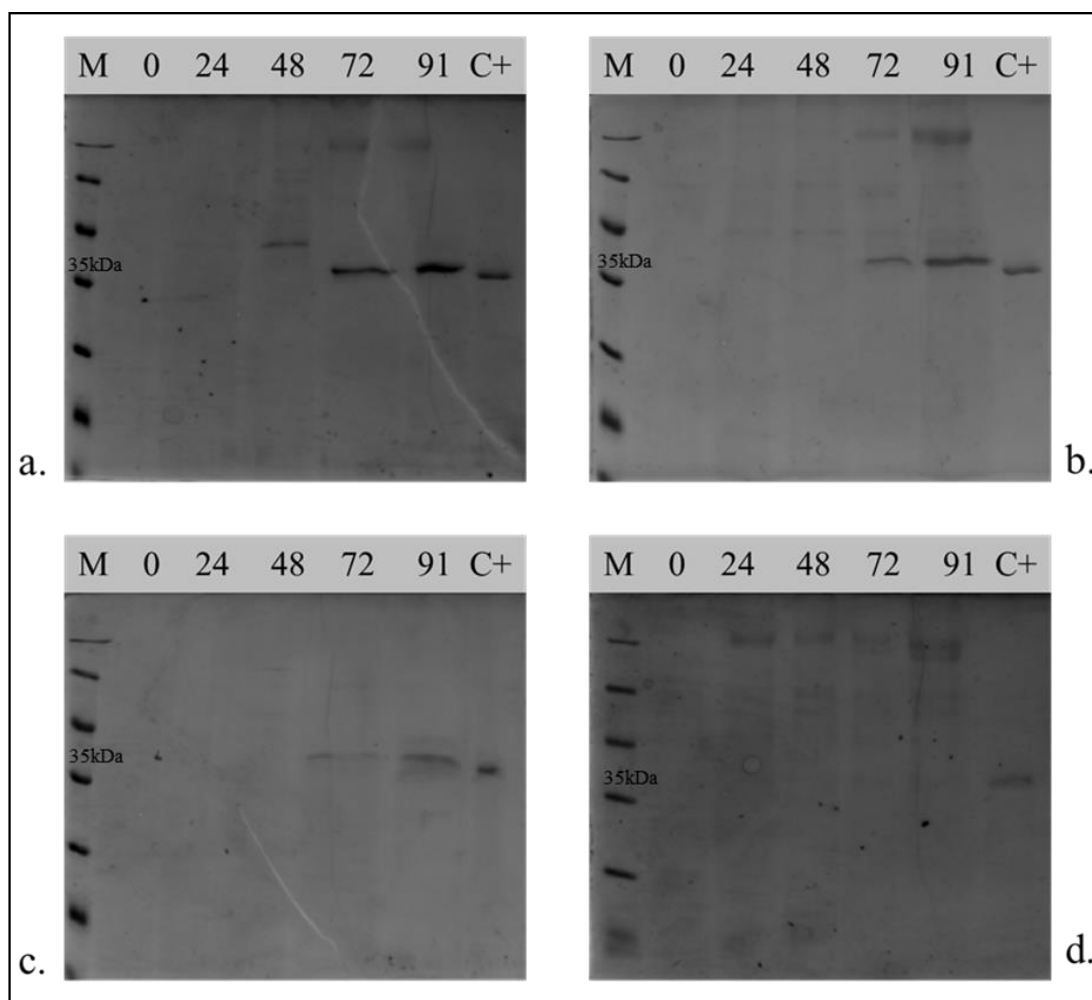


Figura 19. Perfil de proteínas secretadas em meio BMD das linhagens selecionadas. Foram analisados por SDS-PAGE 12% 1 mL sobrenadante do cultivo em BMD das linhagens R5, C32, P33 e M12 no início do cultivo e nos tempos de 24 horas, 48 horas, 72 horas e 91 horas. a) Linhagem R5 b) Linhagem C32. c) Linhagem P33 d) M12 (Controle negativo). C+ é uma quimosina comercial. A quimosina tem 36 kDa. Marcador molecular utilizado: Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific).

5.4.4. Cultivo em meio UAB

O meio de cultivo utilizado na indústria deve ser preferencialmente definido e de baixo custo, de modo a tornar a produção economicamente viável e padronizável, além de facilitar a etapa de purificação. Para avaliar a viabilidade da produção de quimosina em um meio definido e otimizado para produção de proteínas heterólogas em *K. phaffii*, a linhagem C32, que apresentou melhor atividade enzimática em YPD, foi crescida no meio UAB durante 71 horas. Foram coletados 3 mL do sobrenadante da cultura em 15, 21, 38, 41, 44, 64 e 71 horas para teste de coagulação e análise em SDS-PAGE (figuras 20, 21 e 22)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento em meio UAB foi equiparável ao crescimento obtido em meio YPD, contudo, a produção enzimática foi inferior (figura 20). Por ser um meio composto basicamente de sais, a levedura precisa sintetizar todos os metabólitos intermediários, o que pode levar a um crescimento menor e/ou a uma menor produtividade. Sendo, portanto, necessário um ajuste do meio para suprir a carência nutricional da linhagem. (MATTHEWS et al., 2017). A fonte de nitrogênio pode ser aumentada para otimizar a produção proteica e o glicerol pode ser substituído por glicose, com objetivo de aumentar a transcrição de CHYM e por consequência aumentar a proporção de quimosina secretada no meio em relação as proteínas endógenas. Ademais, este meio foi elaborado originalmente para cultivos em fermentadores onde parâmetros como o pH, a aeração e a taxa alimentação podem ser controlados, resultando na maioria das vezes em um maior nível de expressão em comparação aos cultivos em frasco (CEREGHINO et al., 2002)

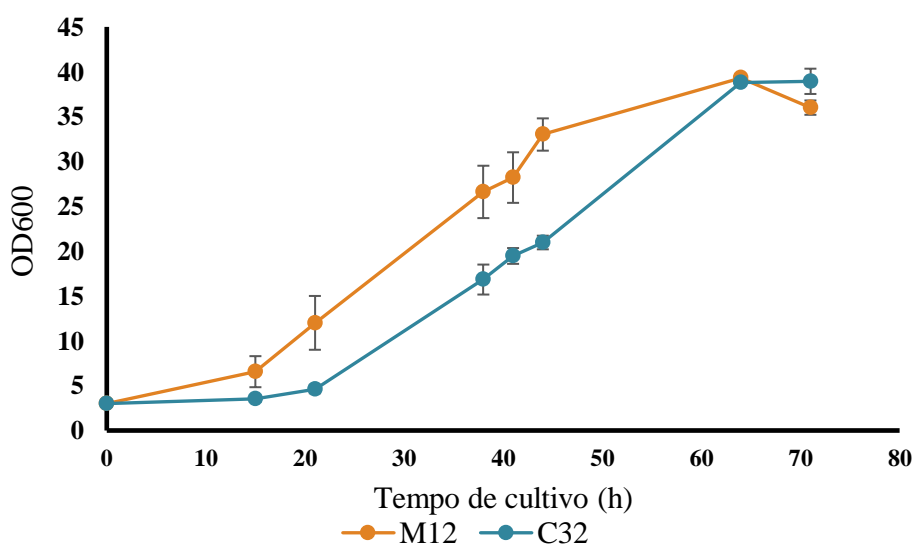


Figura 20. Curva de crescimento celular do cultivo em meio UAB das linhagens C32 e M12. Cultivo em frasco utilizando meio UAB para produção de quimosina das linhagens C32 e do controle negativo M12 por 71 horas. O crescimento é mensurado a partir da absorbância no comprimento de onda de 600nm. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

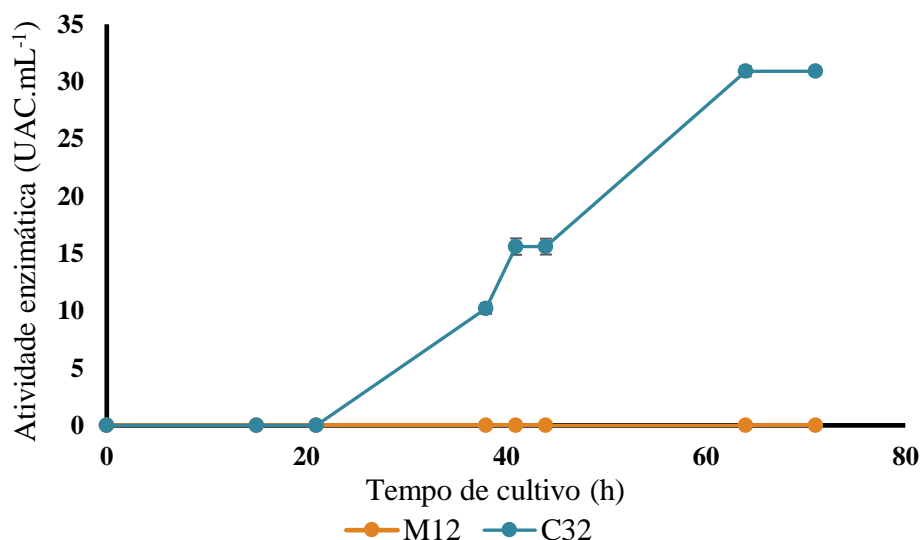


Figura 21. Teste de coagulação do cultivo em frasco utilizando o meio UAB das linhagens selecionadas. Atividade enzimática em UAC.mL⁻¹ do sobrenadante do cultivo em meio UAB da linhagem C32 e do controle negativo M12. O experimento foi feito em triplicata e o erro padrão é apresentado no gráfico.

A análise em SDS-PAGE do perfil de proteínas secretada não permitiu a identificação de uma banda isolada com tamanho correspondente ao da quimosina, pois há um alto número de proteínas endógenas sendo secretadas (figura 22).

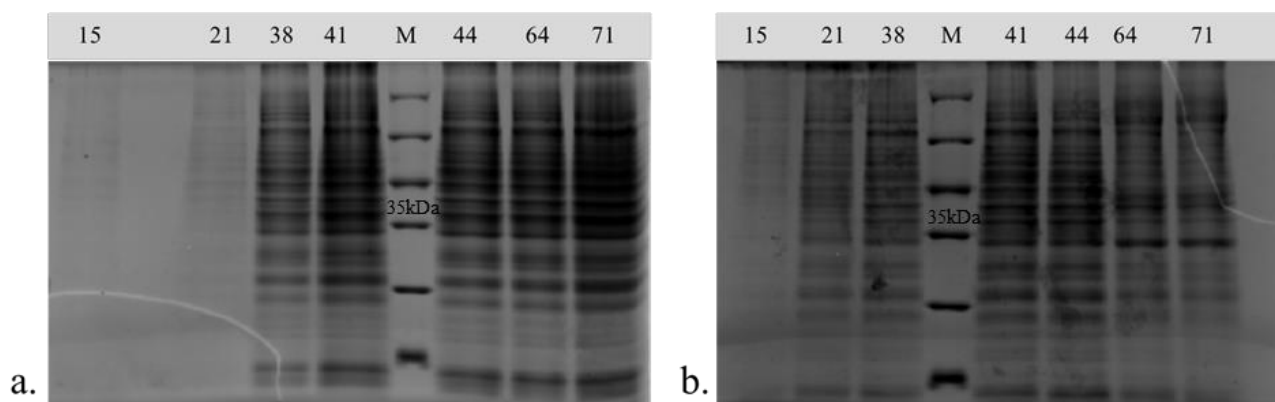


Figura 22. Perfil de proteínas secretadas em meio UAB das linhagens C32 e M12. Foram analisados por SDS-PAGE 1mL da sobrenadante do cultivo das linhagens C32 e M12 crescidos em meio UAB nos tempos de 15 horas, 21 horas, 38 horas, 41 horas, 44 horas, 64 horas e 71 horas. a) Linhagem C32. b) Linhagem M12. A quimosina tem 36 kDa. Marcador molecular utilizado: Pierce™ Unstained Protein MW Marker.

A tabela 4 sintetiza os resultados obtidos nos cultivos. A melhor condição testada foi utilizando o meio YPD, pela linhagem C32 em 44 horas de cultivo. Quando a atividade enzimática foi normalizada pela densidade ótica foi possível observar que os meios YPD

RESULTADOS E DISCUSSÃO

e BMD apresentaram atividade enzimática semelhante, portanto é necessário ajustar as condições de cultivo em BMD para aumentar o crescimento celular e diminuir o tempo de cultivo.

Tabela 9. Atividade enzimática do sobrenadante dos cultivos dos clones transformantes em frasco.

Linhagem	Meio	Tempo de cultivo (h)	Atividade enzimática (UAC.mL⁻¹)⁺	OD600	(UAC.mL⁻¹). OD600⁻¹
C32	YPD	44	181,8 ± 11,7	33,6 ± 2,4	5,41
	BMGY	48	57,1 ± 0	52,8 ± 2,3	1
	BMD	91	38 ± 0,19	19 ± 0,35	2
	UAB	71	30,9 ± 0,32	38,93 ± 1,41	0,79
P33	YPD	44	57,6 ± 2,3	26 ± 0,83	2,2
	BMGY	48	54,7 ± 0	42,4 ± 0,46	1,29
	BMD	91	38 ± 0,12	15,7 ± 0,13	2,4
R5	YPD	44	45,4 ± 21,3	19,6 ± 3,44	2,31
	BMGY	48	57,1 ± 0	52 ± 0,46	1
	BMD	91	50 ± 0	17,7 ± 0,48	2,8

⁺Atividade enzimática no tempo final de cultivo

± Erro padrão da triplicata biológica

Em 2008, Araújo, construiu duas linhagens produtoras de quimosina bovina B. Na linhagem P1 o gene CHYM estava sob o controle do promotor P_{PGKI} e uma cópia única foi integrada ao genoma. Na linhagem A3 o gene CHYM estava sob o controle do promotor P_{AOXI} e duas cópias foram integradas ao genoma. Em cultivo em frasco contendo meio BMGY, sem alimentação, ela obteve atividade enzimática de 70 UAC.mL⁻¹ e 35 UAC.mL⁻¹ para a linhagem P1 e A3, respectivamente. Já no cultivo em frasco contendo meio BMGY, com alimentação, ela obteve atividade enzimática de 100 UAC.mL⁻¹ e 50 UAC.mL⁻¹ para a linhagem P1 e A3, respectivamente.

5.5.Purificação da quimosina

Para obtenção da quimosina bovina recombinante pura, foi aplicado 1 mL do sobrenadante concentrado (60X) de uma cultura da linhagem C32 crescida em meio YPD por 39 horas na coluna de gel filtração *Hiloalad 16/600 superdex 200 pg* e eluído de forma isocrática com tampão fosfato de potássio 50 mM resultando no cromatograma apresentado na figura 23. É possível observar a presença de 3 picos sobrepostos (entre as

RESULTADOS E DISCUSSÃO

frações 2 e 16), contudo a quimosina foi eluída apenas no primeiro tendo sido detectado atividade enzimática entre as frações 2 e 9 (figura 24).

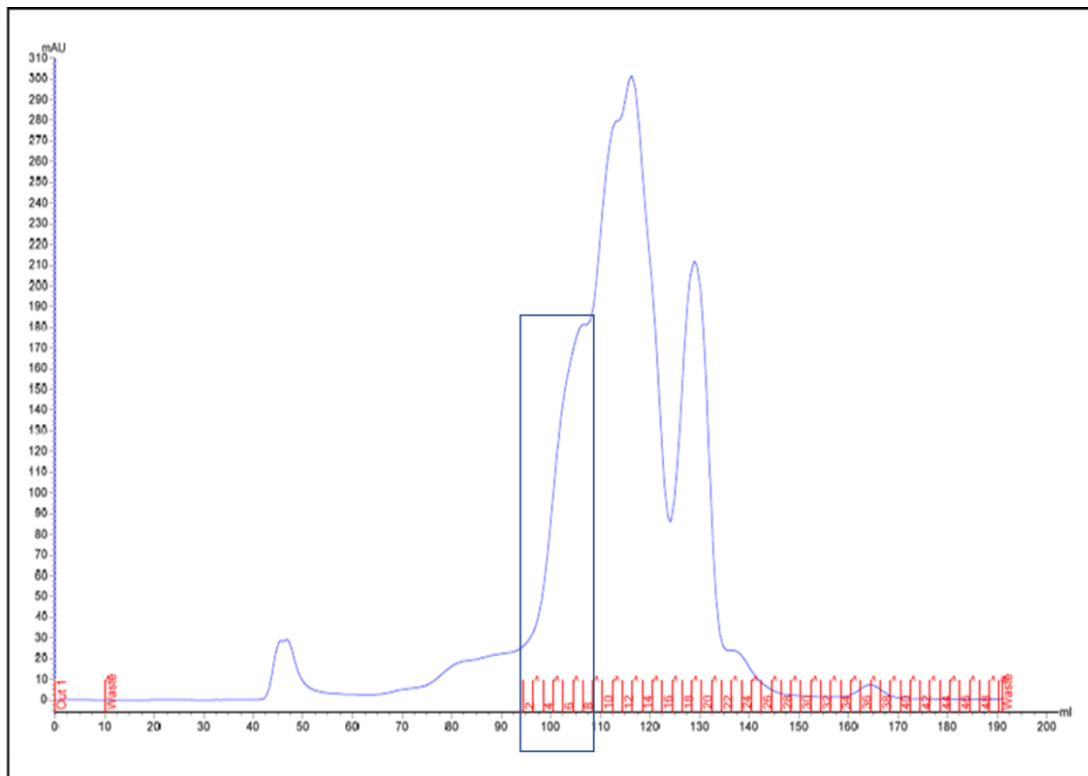


Figura 23. Cromatograma da cromatografia de gel filtração para purificação da quimosina bovina. Cromatografia realizada na coluna Hiloal 16/600 superdex 200 pg (GE Healthcare). Em azul está representado a absorbância em 280nm. Em vermelho está representado as frações cromatográficas. A quimosina recombinante foi eluída nas frações de 2 a 9 mostrado na caixa azul.

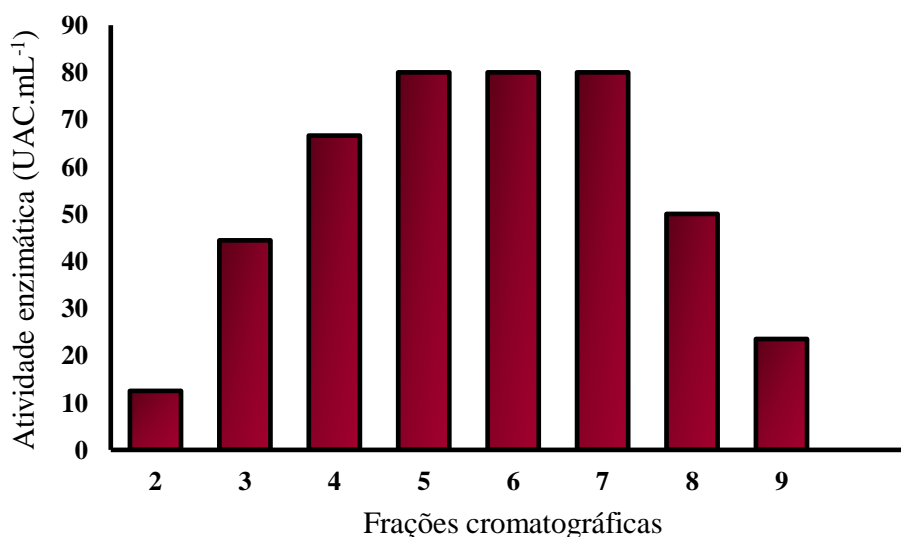


Figura 24. Atividade enzimática das frações cromatográficas contendo quimosina bovina. As frações contendo a quimosina bovina foram eluídas no primeiro pico do cromatograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por eletroforese dessas frações mostra a presença de duas bandas nas frações 7, 8 e 9, uma na altura de ~36 kDa que corresponde ao tamanho esperado da quimosina bovina e uma outra banda um pouco acima da primeira que provavelmente corresponde a quimosina glicosilada, visto que a quimosina possui três sítios de N-glicosilação nos resíduos de asparagina 172, 252 e 291 (figura 25a). Este padrão de migração sugere que a glicosilação ocorreu de forma homogênea.

Para verificar se a banda com peso molecular superior encontrado no gel de purificação correspondia a quimosina glicosilada ou a uma proteína endógena de *K. phaffii*, foi realizado o teste de deglicosilação em condições desnaturantes utilizando a enzima PNGase F e posteriormente análise em SDS-PAGE (figura 25b). O desaparecimento desta banda após 3 horas de reação, confirma que a quimosina recombinante está sendo glicosilada. Com isso é possível afirmar que a quimosina recombinante foi purificada a homogeneidade nas frações 7, 8 e 9.

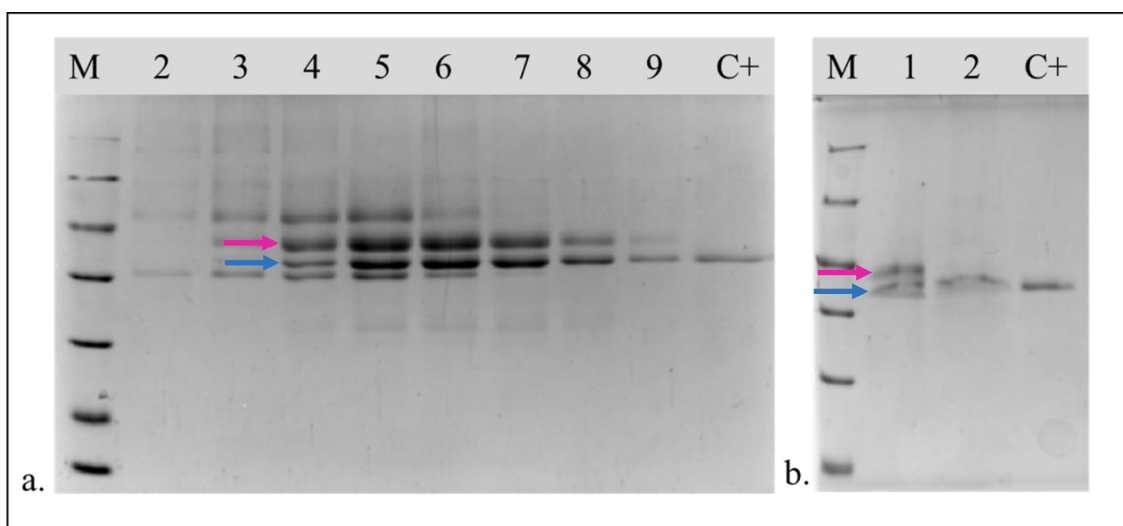


Figura 25. Purificação e estado de glicosilação da quimosina recombinante. Amostras de quimosina purificada foram analisadas em SDS-PAGE 12%. **a)** Análise de frações cromatográficas que possuem atividade enzimática (frações de 2 a 9). Foram precipitados 400 μ L de cada fração com TCA. **b)** Análise do teste de deglicosilação da quimosina recombinante purificada. M) marcador molecular, 1) quimosina recombinante purificada, 2) quimosina recombinante tratada com PNGase F e C+ quimosina comercial. A seta rosa indica a posição da quimosina glicosilada e a seta azul a quimosina deglicosilada. Marcador molecular utilizado: Pierce™ Unstained Protein MW Marker.

Neste trabalho a quimosina foi purificada em apenas uma etapa cromatográfica e foram recuperados 5,8 mg.L^{-1} da enzima purificada a homogeneidade (frações 7, 8 e 9). Na literatura foram reportadas outras estratégias de purificação da quimosina bovina. Jiang *et al.* (2012), expressou a pró-quimosina bovina extracelularmente na linhagem de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

K. phaffii GS115 e a purificou utilizando 3 etapas, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica com a coluna 5-ml HiTrap™ Q XL column (1.6 9 2.5 cm, GE Healthcare) e cromatografia de troca iônica utilizando a coluna 6-ml RESOURCE™ S column (16 9 30 mm, GE Healthcare), obtendo rendimento final de 24,2%. Em outro trabalho, a quimosina bovina foi expressa também intracelularmente na linhagem de *E. coli* K12. Como estratégia de purificação foi utilizada a marcação His-tag e a cromatografia por afinidade com a coluna QIAGEN Ni-NTA affinity column com o rendimento final de 80 mg.L⁻¹ (ULUSU et al., 2016). Apesar da utilização de His-tag ser uma estratégia comum de purificação adotada em trabalhos de expressão heteróloga, seu uso não é recomendado na indústria alimentícia e farmacêutica por ser alergênico (MALHOTRA, 2009; PEDERSEN et al., 1999).

5.6.Efeitos da temperatura na atividade enzimática

Para avaliar a influência da temperatura na atividade enzimática da quimosina recombinante foram realizados os testes de temperatura ótima e estabilidade térmica (figura 26).

Para avaliação da temperatura ótima foi realizado o teste de coagulação variando a temperatura de incubação de 10 °C a 60 °C. Foi detectada a maior atividade enzimática entre as temperaturas de 37 °C e 40 °C e diminuição da atividade nas demais temperaturas testadas

Para o teste de estabilidade térmica a quimosina recombinante purificada foi pré-incubada nas temperaturas de 10 °C a 60 °C por. Foi possível observar a manutenção da atividade enzimática total nas temperaturas de 10 °C e 20 °C e a progressiva diminuição da atividade residual com o aumento da temperatura. A enzima foi inativada a 60 °C. Estes dados são consistentes com outros trabalhos encontrados na literatura (JIANG et al., 2012; NOSEDA et al., 2014). Também foi reportado que quimosina bovina possui alta estabilidade quando armazena por 120 dias a 5 °C e perde completamente a atividade quando estocada a 37 °C por 70 dias (NOSEDA et al., 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

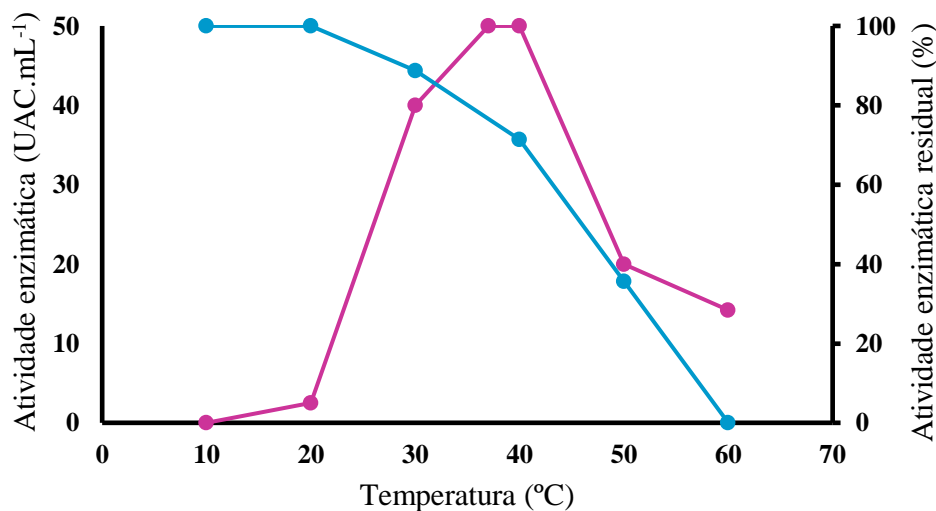


Figura 26. Efeito da temperatura na atividade enzimática e termoestabilidade da quimosina recombinante. Em rosa, teste de coagulação para determinar a temperatura ótima. Em azul, atividade enzimática residual, que indica estabilidade térmica da quimosina recombinante.

5.7. Considerações Gerais

Em suma, linhagens contendo múltiplas cópias do gene de interesse são utilizadas desde os anos de 1990, pois em muitos casos o aumento no número de cópias resulta no acréscimo do produto. Entretanto essa correlação não é sempre linear (ROMANOS et al., 1998; ZAHRL et al., 2017). A produção de interleucina 3 humana (hIL-3) foi avaliada em clones de *K. phaffii* contendo 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 cópias do gene hIL-3. Foi observado um progressivo acréscimo da produção proteica para até 8 cópias e drástico decréscimo após este valor. (DAGAR; KHASA, 2018).

A superexpressão de proteínas secretadas pode levar à saturação da via de secreção. Esta saturação ocorre com número de cópias diferente para cada proteína e normalmente possui relação com a estabilidade e dobramento de cada uma individualmente. Há evidências de que o acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (RE) gere estresse no sistema de secreção, ativando a via de resposta a proteínas não dobradas (UPR, *unfolded protein response*) que resulta na suprarregulação de genes relacionados ao dobramento proteico, como a chaperona *Kar2p* e a proteína dissulfeto-isomerase (PDI). Contudo, quando UPR se prolonga, a via de degradação associada ao ER (ERAD, *ED-associated degradation*) é ativada. Esta via é responsável pela translocação de proteínas mal dobradas para o citosol para degradação pelo proteossoma (AW; POLIZZI, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coexpressão de chaperonas e de fatores de regulação das vias UPR e ERAD são estratégias adotadas para minimizar a sobrecarga da via secretória em trabalhos de expressão heteróloga. Linhagens de *K. phaffii* produtoras de uma lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) foram construídas por integração múltipla do gene de interesse e coexpressão de *Ubc1* e *Hrd1*, enzimas relacionadas a via ERAD. A linhagem contendo uma cópia de ROL apresentou atividade enzimática de 300 U.mL⁻¹ enquanto a linhagem contendo 5 cópias de ROL apresentou atividade enzimática de 3.080 U.mL⁻¹ e as linhagens contendo 5 cópias de ROL e coexpressando *Ubc1*, *Hrd1* ou ambas apresentaram atividade enzimática de 4.000 U.mL⁻¹, 4.200 U.mL⁻¹ e 4.750 U.mL⁻¹, respectivamente (JIAO et al., 2018).

Outro trabalho reportou a diminuição da expressão da proteína Na-ASP1 em linhagens de *K. phaffii* contendo duas, três e quatro cópias do gene de interesse em relação a linhagem com cópia única, a redução foi de 18%, 50% e 75%, respectivamente. Com objetivo de aumentar a secreção da proteína heteróloga foi realizada a coexpressão da proteína PDI nas linhagens multicópia. O melhor resultado encontrado foi o aumento de 3,64 vezes na produção em clones contendo 2 cópias de Na-ASP1 e 8 cópias de PDI (INAN et al., 2006). Estratégias como essas poderiam ser utilizadas para aumentar a produção de quimosina bovina em *K. phaffii*.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi demonstrado que a expressão constitutiva de quimosina bovina utilizando o promotor P_{PGKI} é eficiente, entretanto, a integração múltipla dos cassetes de expressão nos loci $PGKI$, 5S rDNA e sequência repetitiva do cromossomo 3 se mostrou instável em meio não seletivo, além disso, o aumento no número de cópias do gene $CHYM$ não foi determinante para o aumento da produção de quimosina.

A padronização da purificação da quimosina bovina do sobrenadante de *K. phaffii* em uma única etapa, utilizando cromatografia de gel filtração é um resultado muito positivo para a aplicabilidade comercial desse sistema, pois reduz os custos de produção. Outro resultado bem sucedido foi a caracterização da quimosina purificada, com a identificação das frações glicosilada e não glicosilada e a análise do efeito da temperatura.

Para otimizar a produção de quimosina em *K. phaffii* outras estratégias podem ser adotadas, como o aprimoramento do sistema de secreção da linhagem utilizada, por exemplo pela coexpressão de chaperonas, ou a otimização dos processos de cultivo, com meios de cultura seletivos e de baixo custo para a produção em escalas maiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITOS, J. M. et al. Fluorescein Thiocarbamoyl-Kappa-Casein Assay for the Specific Testing of Milk-Clotting Proteases. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3770–3777, 2006.

AHN, J. et al. Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 601–608, 2007.

ANASTÁCIO, G. S. **Produção de quimosina bovina e de camelo recombinante por *Pichia pastoris*** [s.l.] Universidade de Brasília, 2014.

ARAÚJO, J. D. A. **Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris***. [s.l.] Universidade de Brasília, 2008.

ASSUNÇÃO, E. **Produção de proinsulina recombinante em *Pichia pastoris* utilizando o promotor do gene PGK**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2015.

ATTALLAH, A. G. Characters of Chymosin Gene Isolated from Different Animal Sources at Molecular Level. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 9, p. 904–907, 2007.

AW, R.; POLIZZI, K. M. Can too many copies spoil the broth? **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 1–9, 2013.

BARKHOLT PEDERSEN, V.; ASBAEK CHRISTENSEN, K.; FOLTMANN, B. Investigations on the activation of bovine prochymosin. **European Journal of Biochemistry**, v. 94, n. 2, p. 573–580, mar. 1979.

BETANCUR, M. **Estratégias para integração múltipla de cassetes de expressão no genoma de *Komagataella phaffii***. [s.l.] Universidade de Brasília, 2017.

BRASIL. **Portaria MAPA - 146, de 07/03/1996**, 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>

BRUNO, M. A. et al. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

695–701, 1 maio 2010.

CARDOZA, R. E. et al. Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 249–259, 5 ago. 2003.

CEREGHINO, G. P. L. et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 329–332, ago. 2002.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, jan. 2000.

CORDEIRO, M. C.; PAIS, M. S.; BRODELIUS, P. E. *Cynara cardunculus* subsp. *flavescens* (Cardoon): In vitro culture, and the production of cyprosin — milk-clotting enzymes. **Medicinal and Aromatic Plants**, p. 132–153, 1998.

CREGG, J. M.; HIGGINS, D. R. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 891–897, 31 dez. 1995.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Bio/Technology (Nature Publishing Company)**, v. 11, n. 8, p. 905–10, ago. 1993.

DA SILVA, R. R. et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Food Chemistry**, v. 225, p. 45–54, 15 jun. 2017.

DAGAR, V. K. et al. Bioprocess development for extracellular production of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 10, p. 1373–1386, 11 out. 2016.

DAGAR, V. K.; KHASA, Y. P. Combined effect of gene dosage and process optimization strategies on high-level production of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris* fed-batch culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 999–1009, mar. 2018.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAMASCENO, L. M.; HUANG, C.-J.; BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 31–39, 6 jan. 2012.

DE ALMEIDA, J. R. M.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGKI*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, n. 9, p. 725–737, 15 jul. 2005.

DINIZ, M. F. S. **Queijo Canastra: um estudo envolvendo aspectos culturais e parâmetros de inocuidade do alimento**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

FLAMM, E. L. How FDA Approved Chymosin: A Case History. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 349–351, 1 abr. 1991.

FOLTMANN, B. Chymosin: A short review on foetal and neonatal gastric proteases. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 52, n. s210, p. 65–79, 1992.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: **Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk**. Boston, MA: Springer US, 1997. p. 1–49.

FREITAS, D. R. et al. Factor analysis as a tool to estimate association among individual proteins and other milk components with casein micelle size and cheese yield. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2017.

GUILLIERMOND, A. *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espèce de levures à copulation hétérogamique. **Bulletin de la Société Mycologique de France**, v. 36, p. 203–211, 1920.

HOHENBLUM, H. et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 4, p. 367–375, 20 fev. 2004.

INAN, M. et al. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 4, p. 771–778, 5 mar. 2006.

JIANG, X. P. et al. Constitutive expression, purification and characterization of bovine

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2087–2093, 10 maio 2012.

JIAO, L. et al. High-level extracellular production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* via a strategy combining optimization of gene-copy number with co-expression of ERAD-related proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 147, p. 1–12, jul. 2018.

JOANA FERNANDES. Produção de queijo origem dos coalhos. **Agrotec**, v. 8, p. 101–102, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 4 jan. 2017.

KATO, S. et al. Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary alpha-amylase secreted from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 18, n. 7, p. 643–655, maio 2001.

KATSUHIKO, N. et al. Expression of cloned calf prochymosin gene sequence in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 19, n. 3, p. 337–344, out. 1982.

KAZEMI SERESHT, A. et al. Modulating heterologous protein production in yeast: the applicability of truncated auxotrophic markers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 3939–3948, 11 maio 2013.

KUMAR, A. et al. Chymosin and other milk coagulants: Sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 243–258, 2010.

KURTZMAN, C. P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 973–976, 2005.

LANGHOLM JENSEN, J. et al. Camel and bovine chymosin: The relationship between their structures and cheese-making properties. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 5, p. 901–913, 2013.

LUFRANO, D. et al. Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 81, p. 7–18, set. 2012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LUO, F. et al. Cloning and expression of yak active chymosin in *Pichia pastoris*. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 9, p. 1363–70, set. 2016.
- MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249–270, 2005.
- MALHOTRA, A. Chapter 16 Tagging for protein expression. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 239–258, 1 jan. 2009.
- MATTHEWS, C. B. et al. Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, n. July, p. 103–113, 2017.
- MCCAMAN, M. T.; CUMMINGS, D. B. A mutated bovine prochymosin zymogen can be activated without proteolytic processing at low pH. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 33, p. 15345–8, 25 nov. 1986.
- MELLANBY, J. The coagulation of milk by rennin. **The Journal of Physiology**, v. 45, n. 5, p. 345–62, 9 dez. 1912.
- MENG, F. et al. Newly effective milk-clotting enzyme from *Bacillus subtilis* and its application in cheese making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 24, p. 6162–6169, 20 jun. 2018.
- MIGUEL JÚNIOR. Sistema de Apropriação de Custos Industriais e Formação de Preço de Venda com Ênfase À Produtividade. **XXV Congresso Brasileiro de Custos**, 2018.
- NOSEDA, D. G. et al. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under methanol-inducible AOXI promoter. **Protein Expression and Purification**, v. 104, p. 85–91, dez. 2014.
- NOSEDA, D. G. et al. Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by a high-level expression transformant clone of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 2016.
- O’SULLIVAN, M.; FOX, P. F. Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. **Food Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 19–32, jan. 1991.
- PARENTE, D. et al. Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 243–250, 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PAULA, J. DE; CARVALHO, A.; FURTADO, M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 367/368, p. 19–25, 2009.
- PAYENS, T. A. J. Stable and unstable casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 10, p. 1863–1873, out. 1982.
- PEDERSEN, J. et al. Removal of N-Terminal Polyhistidine Tags from Recombinant Proteins Using Engineered Aminopeptidases. **Protein Expression and Purification**, v. 15, n. 3, p. 389–400, abr. 1999.
- PHAFF, H. J.; KNAPP, E. P. The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 22, n. 1, p. 117–130, dez. 1956.
- PIVA, L. C. et al. Molecular strategies to increase the levels of heterologous transcripts in *Komagataella phaffii* for protein production. **Bioengineered**, v. 5979, n. February, 2017.
- PONTUAL, E. V. et al. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1848–1854, 1 dez. 2012.
- ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 527–533, 1995.
- ROMANOS, M. et al. The generation of multicopy recombinant strains. **Methods in Molecular Biology**, v. 103, n. 8, p. 55–72, 1998.
- SANTIAGO, V. G. **Imobilização de amilases na parede celular de *Pichia pastoris***. [s.l.] Universidade de Brasília, 2016.
- SHATA, H. M. A. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 241–7, 2005.
- THERON, L. W. **Expression and purification of recombinant extracellular proteases originating from non-*Saccharomyces* yeasts**. [s.l.] Stellenbosch University, 2013.
- TSCHOPP, J. F. et al. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 9, p. 3859–76, 11 maio 1987.

TYAGI, A. et al. Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: A commercially viable alternate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 217–224, 1 jun. 2016.

ULUSU, Y. et al. Expression, purification, and characterization of bovine chymosin enzyme using an inducible pTOLT system. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 596–601, 17 ago. 2016.

VALLEJO, J. A. et al. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10606–10610, 26 nov. 2008.

VIEIRA GOMES, A. et al. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. **Microorganisms**, v. 6, n. 2, p. 38, 29 abr. 2018.

VREEMAN, H. J. et al. Characterization of bovine kappa-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. **The Biochemical Journal**, v. 240, n. 1, p. 87–97, 15 nov. 1986.

WANG, N. et al. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 111, p. 75–81, jul. 2015.

WATERHAM, H. R. et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphato dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, p. 37–44, 1997.

WEI, Z.-Y. et al. Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 624, 28 abr. 2016.

YAMADA, Y. et al. The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 439–444, 12 jan. 1995.

YEGIN, S. et al. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949–960, 3 fev. 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YEGIN, S.; DEKKER, P. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering.

Dairy Science & Technology, v. 93, n. 6, p. 565–594, 27 nov. 2013.

YOON, J. et al. Enhanced Production of Bovine Chymosin by Autophagy Deficiency in the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62512, 29 abr. 2013.

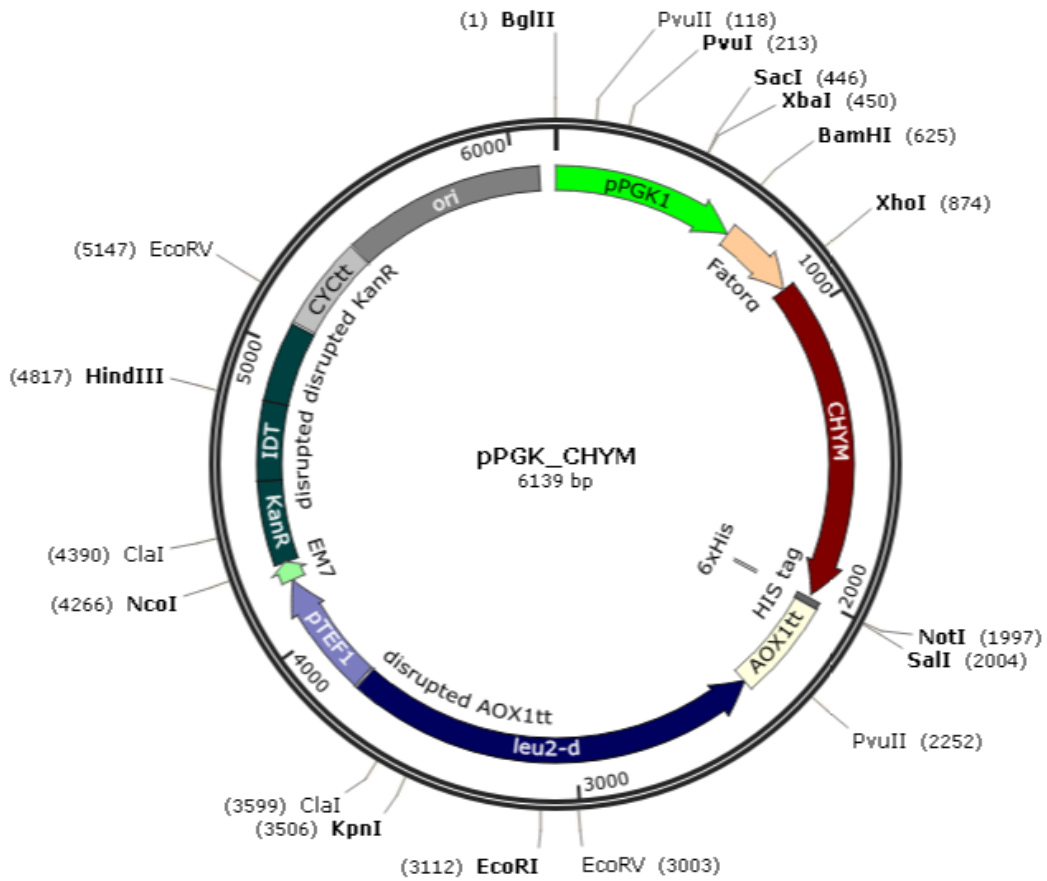
YU, M. et al. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 53, n. 2, p. 255–263, jun. 2007.

ZAHRL, R. J. et al. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 7, p. 1–31, 1 nov. 2017.

ZINOVIEVA, N.; MU, M. Short Communication : Identification and characterization of multiple splicing forms of bovine prochymosin mRNA. **American Dairy Science Association**, p. 3476–3479, 2002.

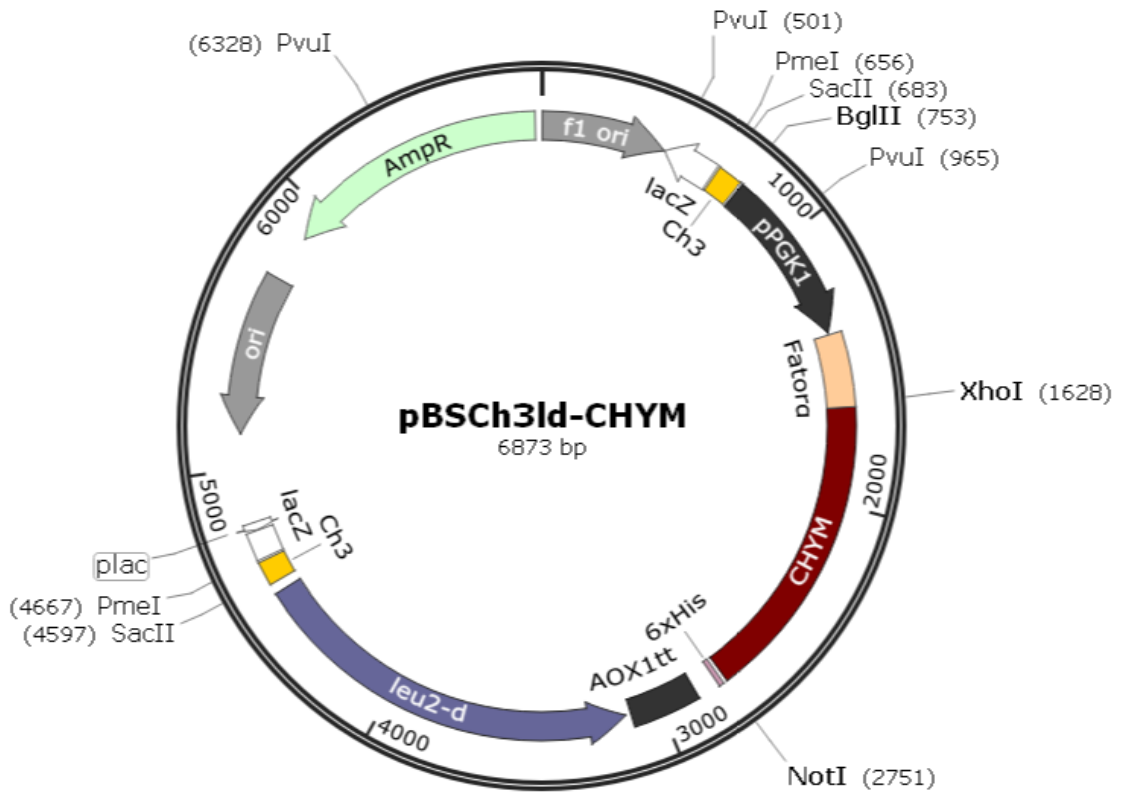
ANEXOS

8. ANEXOS



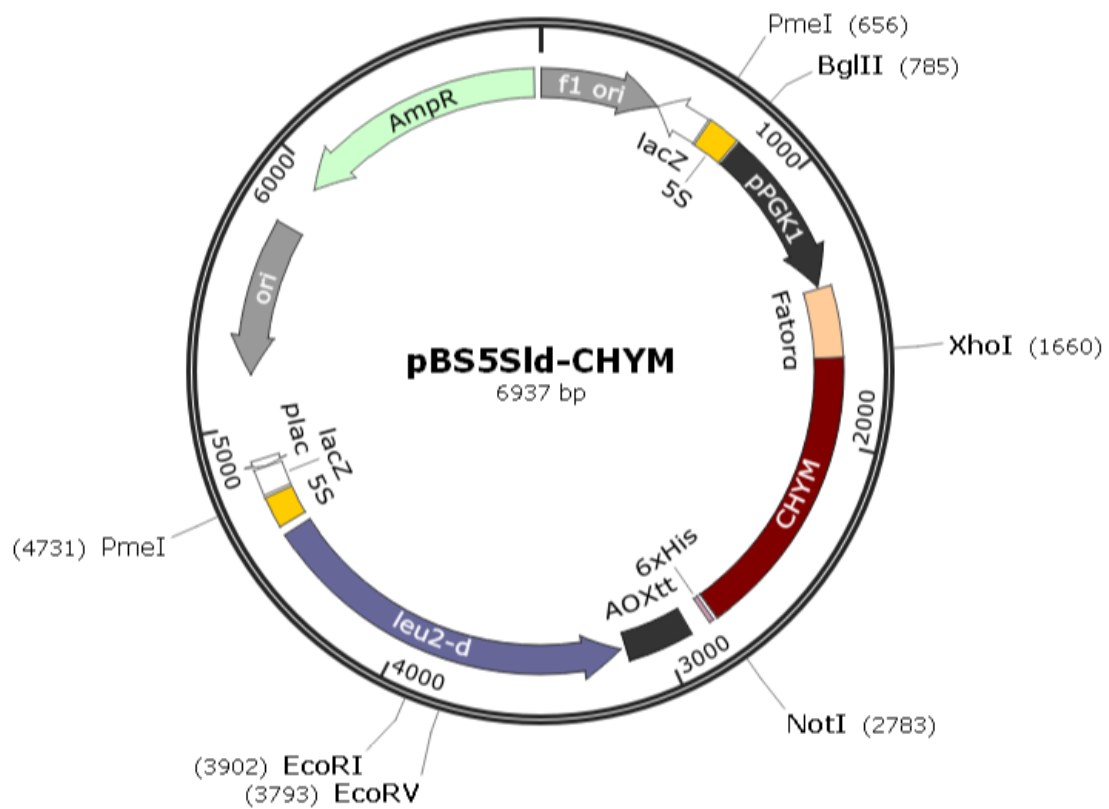
Anexo 1. Mapa físico do vetor de expressão pPGK_CHYM. O vetor possui a sequência do gene codificador para quimosina, marca de seleção auxotrófica defeitiva *leu2-d*, promotor *P_{PGK1}* e elementos para replicação em bactéria.

ANEXOS



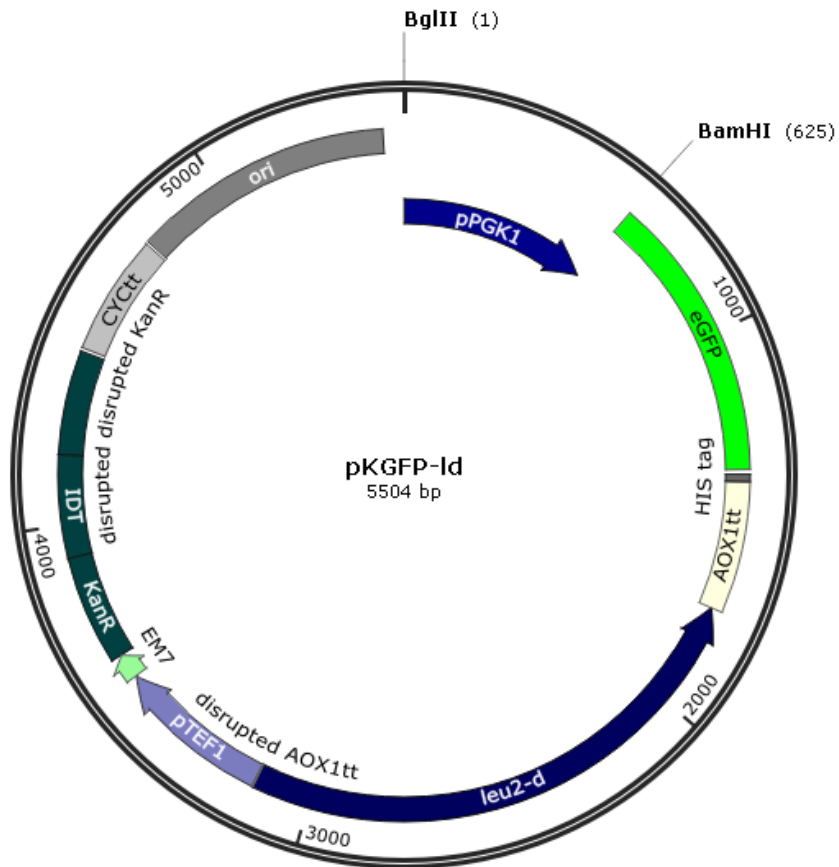
Anexo 2. Mapa físico do vetor de expressão pBSch3ld-CHYM. O vetor possui a sequência do gene codificador para quimosina, marca de seleção auxotrófica defectiva *leu2-d*, promotor P_{PGK1} e elementos para replicação em bactéria. A sequência marcada em amarelo corresponde a sequência de integração ao cromossomo 3.

ANEXOS



Anexo 3. Mapa físico do vetor de expressão pBS5SId-CHYM. O vetor possui a sequência do gene codificador para quimosina, marca de seleção auxotrófica defeitiva *leu2-d*, promotor P_{PGK1} e elementos para replicação em bactéria. A sequência marcada em amarelo corresponde o locus de integração na sequência repetitiva do ribossomo 5S.

ANEXOS



Anexo 4. Mapa físico do vetor de expressão PKGFP-ld. O vetor possui a sequência do gene codificador para eGFP, marca de seleção auxotrófica defectiva *leu2-d*, promotor P_{PGK1} e elementos para replicação em bactéria.