

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

Construção de um vetor integrativo em múltiplas
cópias para *Saccharomyces cerevisiae*
utilizando seqüências delta

Theyssa Fernanda Barbosa Borges

Orientadora: Prof. Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes

Brasília, DF

2009

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

Construção de um vetor integrativo em múltiplas
cópias para *Saccharomyces cerevisiae*
utilizando seqüências delta

Theyssa Fernanda Barbosa Borges

Orientadora: Prof. Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes

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, DF
2009

Theyssa Fernanda Barbosa Borges

Construção de um vetor integrativo em múltiplas
cópias para *Saccharomyces cerevisiae*
utilizando seqüências delta

Dissertação apresentada à banca como exigência parcial para a obtenção do
título de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília

13 Fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes
Universidade de Brasília
Presidente da Banca

Prof. Dra. Lucília Marcelino
Embrapa Cenargen
Membro Efetivo

Prof. Dra. Beatriz Dolabela de Lima
Universidade de Brasília
Membro Efetivo

“O homem que sente o vento da mudança
não deve construir um quebra-vento,
mas um moinho de vento”

(Stephen King)

*Ao meu querido avô João,
um dos maiores incentivadores que já tive*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, por conservar minha saúde, me amparar nas horas mais difíceis e ser sempre meu melhor amigo;

Aos meus pais, porque sempre estiveram ao meu lado me apoiando e sendo parte fundamental de todas as minhas decisões. Pelo amor e carinho que sempre me dedicaram, não tenho palavras para expressar minha gratidão. Essa vitória, assim como todas as outras que ainda virão, é muito mais de vocês do que minha;

Às minhas irmãs, Larissy e Christiane, por também me apoiarem e vibrarem com as minhas conquistas, pelas brigas (que me fazem exercitar a capacidade de argumentação rs) e pelas fofocas até tarde da noite nos fins-de-semana. Vocês não fazem idéia do quanto são importantes na minha vida.

Ao meu irmão lindo Pedro Augusto, apenas por ser você! Meu orgulho! E porque eu não consigo imaginar minha vida sem a sua alegria.

Aos meus avós, por que sempre se orgulharam de mim mesmo sem entender direito o que eu fazia, por se preocuparem se eu estava me alimentando bem em Brasília e por serem sempre meu exemplo.

Ao meu namorado, Marcos, pela compreensão da distância, pela paciência com os meus telefonemas nos momentos de *stress*, por entender que “não basta ser namorado, tem que participar”, pela ajuda constante, pela torcida e principalmente pelo carinho. Te amo!

À minha família de Brasília. Meus queridos primos Márcia e Vitor, por que me acolheram com tanto carinho, por me ensinarem tantas coisas (sobre vinho, inclusive), pelos livros emprestados e filmes assistidos, por me incluírem no passeios, pelas conversas filosóficas, por agüentarem meus desabafos e devaneios e por me darem teto e proteção. E minhas primas lindas Fernanda e Thais, por terem sido minhas primeiras e melhores amigas nessa cidade maluca, por me indicarem os caminhos na UnB, pelas caronas diárias, por dividirem seu espaço comigo, pela compreensão, pelas conversas e tudo mais. Jamais poderei agradecer suficientemente tudo o que vocês quatro fizeram por mim.

Aos meus tios pela torcida; e aos meus primos por me mostrarem que meus melhores amigos são a minha família;

À minha orientadora, professora Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela ajuda sempre;

Ao professor Dr. Fernando Araripe Torres pela disponibilidade nos momentos de duvida e pelas dicas preciosas.

Aos demais professores do laboratório de Biologia Molecular: Andréa Maranhão, Elida Campos, Janice Lisboa, Marcelo Brígido, Márcio Poças, Maria Sueli e Ildinete Pereira por estarem sempre dispostos a ajudar;

À *Vivis*, pela paciência com as inúmeras e repetidas perguntas desde quando eu entrei no laboratório até a escrita desse trabalho, pelos protocolos e pela amizade;

Aos meus primeiros orientadores na bancada, Saulo e Camila Marinho, pelas palavras de apoio e incentivo, por me fazerem entender a dinâmica do laboratório, pela paciência sempre e também pela amizade;

À minha amiga xifópaga Juliana, por ter sido a primeira a conversar comigo, por ser a melhor companheira de bancada que eu poderia ter pois está sempre pronta pra me socorrer, por agüentar as broncas no meu lugar, pelas conversas nerds e as supérfluas, pelos conselhos, apoio, pela correção dos textos e principalmente pelas quartas-feiras que foram fundamentais;

Aos meus amiguinhos queridos Marciano e Túlio, também pelas quartas-feiras, pelos favores prestados sempre que eu pedi e pela amizade que já é eterna no meu coração;

Às minhas amigas Stephany e Calliandra, por me ajudarem a sobreviver em Brasília quando eu cheguei, pelas risadas e maluquices, pelos almoços, lanches e cinema. Calli, obrigada por sempre ter chocolate e pela companhia no ônibus;

Ao Hugo, por toda ajuda que me deu: no desenho dos *primers* e nas ferramentas de bioinformática; pelos protocolos e dicas na execução dos experimentos, pelos materiais emprestados, pelo companheirismo nas disciplinas e nos fins-de-semana que fiquei no laboratório.

Aos colegas do Lab 2 que estiveram comigo nesses dois anos: Andre disse, Alexsandro, Basti, Betulia, Bia, Bruno, Cristiane, Ezequiel, Loise, Karen, Carolina Brettas (companheira de bancada), Pollyanna, Tiago e Vinicius. É maravilhoso trabalhar com vocês.

Aos demais colegas da BioMol que tornam o ambiente de trabalho tão prazeroso.

À Dona Ivonildes e à Fátima, pela paciência e pelo apoio técnico fundamental para o funcionamento do laboratório;

À Ana, da secretaria, por agüentar minhas milhares e milhares de perguntas;

Aos meus eternos e verdadeiros amigos: Elisa (irmã que eu escolhi), Alcides, Marcos, Thallytta, Cecília (por me acolher no Rio), Fernando, Janaina, Dim e demais apêndices. Por tornarem as lutas suportáveis, por fazerem parte da minha vida e por me fazerem sentir orgulho em dizer que tenho bons amigos!

À Patrícia (nega), especialmente, por escutar minhas lamúrias quando estive em Brasília e por abrir as portas do laboratório em Goiânia pra eu corar minhas placas;

À CAPES pelo apoio financeiro;

À todos que participaram desse momento na minha vida e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Abreviaturas	iii
Resumo	vi
Abstract	viii
1. Introdução	1
1.1 Produção de etanol a partir de amido: visão econômica	1
1.2 Enzimas de degradação de amido: amilases	5
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na produção de etanol	7
1.4 <i>S. cerevisiae</i> : Linhagens de laboratório X Linhagens industriais	9
1.5 Transformação de uma linhagem industrial	12
1.5.1 Marca de Seleção	13
1.5.2 Vetores de Expressão	15
1.5.3 Estratégias de Integração: rDNA X Ty δ	17
1.6 A linha de pesquisa “produção de etanol a partir de amido” do grupo de Biotecnologia Molecular da UnB	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. Estratégia	22
4. Material	21
4.1 Microrganismos utilizados	21
4.1.1 Linhagens bacterianas	21
4.1.2 Linhagens de leveduras	21
4.2 Enzimas	21
4.3 Marcadores de DNA	22
4.4 Kits	22
4.5 Ferramentas de Bioinformática	23
4.6 Vetores	23
4.7 Meios de cultura e soluções	24
4.7.1 Meios e soluções para cultivo de <i>Escherichia coli</i>	24
4.7.2 Meios e soluções para cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
4.7.3 Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinantes	26

4.7.3.1	Extração de DNA plasmidial	26
4.7.3.2	Análise de ácidos nucleicos em gel de agarose	27
4.7.3.3	Extração de DNA de levedura	27
4.7.3.4	Soluções e tampões para transformação de <i>S. cerevisiae</i>	28
4.7.4	Soluções e tampões para ensaio de atividade enzimática (dosagem amilolítica).	29
5.	Métodos	30
5.1	Extração do DNA total de levedura	30
5.2	Reação de cadeia de polimerase (PCR)	30
5.3	Análise dos ácidos nucleicos em gel de agarose	31
5.4	Seqüenciamento e análise da seqüencia do DNA	31
5.5	Ligação dos fragmentos de DNA	31
5.6	Defosforilação dos vetores para ligações não direcionadas	31
5.7	Transformação de bactéria	32
5.8	Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep)	32
5.9	Preparação de DNA plasmidial em média escala (midi-prep)	33
5.10	Digestão de DNA com enzimas de restrição	33
5.11	Precipitação de DNA	34
5.12	Purificação e eluição de fragmentos de DNA em gel de agarose	34
5.13	Transformação rápida de levedura em fase estacionaria	34
5.14	Teste de tolerância ao antibiótico	35
5.15	Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por eletroporação	35
5.16	Seleção de clones recombinantes	36
5.17	Determinação da atividade amilolítica	36
5.18	Análise do crescimento celular	36
5.19	Teste de estabilidade mitótica	37
6.	Resultados	38
6.1	Desenho dos iniciadores para amplificação da seqüência Ty δ	40
6.2	Amplificação dos fragmentos TyD e TyE por PCR	41
6.3	Construção do vetor pTm	43
6.4	Construção do vetor pT	46
6.5	Inserção dos cassetes da α -amilase e glicoamilase no vetor pT	48
6.6	Transformação de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e seleção dos clones transformantes	57
6.7	Curva de crescimento das colônias transformantes e atividade enzimática	59

6.8 Teste de estabilidade mitótica	62
7. Discussão	65
8. Conclusões e Perspectivas	76
9. Referências	78
10. Anexos	
Anexo 1 Marcadores utilizados	
Anexo 2 Mapa do vetor de clonagem pGEMT [®] <i>Easy</i> (Promega)	
Anexo 3 Mapa do vetor de clonagem pBlueScript II KS+ (Promega)	
Anexo 4 Mapa do vetor YEp 351 – PGK	
Anexo 5 Mapa do vetor PYC230	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferentes enzimas envolvidas na degradação do amido	6
Figura 2	Via metabólica da fermentação alcoólica em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 3	Potenciais estresses ambientais enfrentados pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante o processo de produção de etanol	10
Figura 4	Esquema descrevendo a construção do vetor pT	41
Figura 5	Seqüências dos iniciadores para amplificação das seqüências delta TyE e TyD	42
Figura 6	Amplificação dos fragmentos TyD e TyE	44
Figura 7	Alinhamento da seqüência do TyD amplificado por PCR com a seqüência de Ty δ do banco de dados do <i>Ncbi</i>	46
Figura 8	Digestão do vetor pGEMT-TyD e pGEMT-TyE com a enzima de restrição <i>XhoI</i>	47
Figura 9	Análise de restrição de pTm com a enzima <i>XhoI</i>	48
Figura 10	Confirmação da integridade do vetor pT	50
Figura 11	Esquema descrevendo a construção do vetor pTA, contendo o cassete de expressão da α -amilase de <i>Bacillus subtilis</i>	52
Figura 12	Esquema descrevendo a construção do vetor pTGA, contendo o cassete de expressão da glicoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> .	53
Figura 13	Estratégia de construção do vetor pTAGA	54
Figura 14	Digestão do vetor pTA com a enzima <i>HindIII</i>	55
Figura 15	Digestão do vetor pTGA com a enzima <i>BamHI</i>	56
Figura 16	Tratamento do vetor pTGA com a enzima <i>MspI</i> metilase	58
Figura 17	Tratamento do vetor pTGA com a enzima <i>MspI</i> metilase	59
Figura 18	Cassetes de integração pTA, pTGA e pTAGA após digestão dos vetores com a enzima de <i>XhoI</i>	60
Figura 19	Clones positivos nas transformações da linhagem MFL e JP1	62
Figura 20	Clonagem do cassete da α -amilase no vetor PYC230	64
Figura 21	Curva de crescimento dos clones positivos para atividade amilolítica da linhagem MFL em meio complexo (YPD)	65
Figura 22	Ensaio enzimático dos clones positivos da linhagem MFL	66
Figura 23	Curva de crescimento em meio YPD dos clones positivos para atividade de glicoamilase da linhagem JP1	67
Figura 24	Ensaio enzimático dos clones positivos da linhagem MFL	68
Figura 25	Teste de estabilidade mitótica	70
Figura 26	Esquema linear do vetor pT	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais países produtores de etanol	2
Tabela 2	Marcas seletivas dominantes mais usadas na tecnologia de DNA recombinante de <i>S. cerevisiae</i>	14
Tabela 3	Tipos de vetores e seus mecanismos de ação	15
Tabela 4	Clones com atividade amilolítica	61
Tabela 5	Informações heterólogas integradas no genoma de <i>S. cerevisiae</i> usando sistemas de integração baseados na sequência Ty δ e o protocolo de eletroporação, respectivos autores e número máximo de cópias integradas	68

ABREVIATURAS

A	adenina
C	citosina
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CO ₂	gás carbônico
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxirribonucleotídeo
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
g	gravidade
G	guanina
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
G418	geneticina
g/L	grama por litro
h	hora
H ₂ O	água
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
I ₂	iodo
KCl	cloreto de potássio
kb	kilobase
L	litro
LB	Luria-Bertani
M	molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MM	meio mínimo
min	minuto
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₄ SO ₄	sulfato de amônio
OD ₆₀₀	densidade óptica a 600 nanômetros

OD ₆₆₀	densidade óptica a 660 nanômetros
pb	pares de base
PCR	reação de polimerização em cadeia
pH	potencial hidrogeniônico
PROALCOOL	Programa de incentivo à produção de etanol
p/v	peso por volume
q. s. p.	quantidade suficiente para
RbCl ₂	cloreto de rubídio
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SAP	fosfatase alcalina de camarão
SDS	dodecilsulfato de sódio
seg	segundo
T	timina
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TEB	tampão tris-borato-EDTA
U	unidade
V	volume
V	volts
v/v	volume por volume
x	vezes
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo
YCp	plasmídios centroméricos
YEp	plasmídios episomais
YIp	plasmídios integrativos
YLp	Plasmídios lineares
YNB	base nitrogenada de levedura
YPD	meio complexo para levedura
YRp	plasmídios replicativos
:	para
/	por
%	por cento
°C	graus Celsius
μF	micro-faradays
μg	micrograma

$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	micrometro
μm	micron
ng	nanogramas
Ω	ohm
pmol	picomol

RESUMO

Atualmente, o mercado tornou-se favorável para a produção de etanol a partir de biomassa. E o Brasil já tem considerável experiência na produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar, no entanto ela é uma planta sazonal e requer terra de plantio de alta qualidade para seu crescimento. Como substrato alternativo para produção de etanol no Brasil a baixo custo, temos a mandioca. O grupo de biotecnologia molecular da UnB possui uma linha de pesquisa que visa diminuir os custos da produção de etanol a partir de amido de mandioca. Em 1995, Moraes *et al.* construiu oito linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de converter amido a etanol, no entanto o vetor utilizado nas construções é episomal e por não ser estável pode ser facilmente perdido durante o processo industrial onde há o *stress* ambiental e competição entre as linhagens. Para reverter este quadro, este trabalho visou a construção de um vetor integrativo baseado na seqüência δ do transposon Ty de *Saccharomyces cerevisiae* no qual foram inseridos os cassetes de expressão de α -amilase de *Bacillus subtilis* e glicoamilase de *Aspergillus awamori*, gerando três diferentes vetores: pTA (contendo o cassete da α -amilase), pTGA (contendo o cassete da glicoamilase) e pTAGA (contendo ambos os cassetes). A linhagem semi-industrial MFL e a linhagem industrial JP1 foram transformadas com os vetores construídos. Foram encontrados cinco clones positivos para atividade amilolítica nas transformações da MFL e dois na JP1, a baixa eficiência de seleção de transformantes deve-se ao fato de a marca de seleção não estar inserida no vetor integrativo. As curvas de crescimento dos clones positivos mostraram que não houve alterações no crescimento das linhagens após integração dos vetores e os testes de atividade enzimática mostraram que os clones estão produzindo as enzimas de interesse. Além disso, os testes de estabilidade mitótica mostraram alta estabilidade do vetor nos clones positivos da linhagem JP1, o que torna este sistema de expressão atrativo para produção industrial.

ABSTRACT

At present, the market became favorable for ethanol production from biomass. And Brazil already has considerable experience in the bioethanol production from sugar-cane, however it is a seasonal plant and it requires land of planting of high quality for his growth. As alternative substrate for low cost ethanol production in Brazil, we have the cassava. The molecular biotechnology group of UnB has a line of research that aims to reduce the costs of ethanol production from cassava starch . In 1995, Moraes *et al.* built eight *Saccharomyces cerevisiae* strains able to convert starch to ethanol, however the vector used in this constructions is epissomal and because of not being stable it can be easily lost during the industrial process where there is the environmental stress and competition between strains. To revert this picture, this work aimed the construction of an integrative vector based on sequence δ of the *Saccharomyces cerevisiae* transposon Ty in which the cassettes of expression of *Bacillus subtilis* α -amilase and *Aspergillus awamori* glicoamilase were inserted, resulting three different vectors: pTA (containing the cassette of α -amilase), pTGA (containing the cassette of the glicoamilase) and pTAGA (containing both cassettes). The semi-industrial strain MFL and the industrial strain JP1 were transformed by these vectors. Five positive clones were found with amylytic activity in the MFL transformations and two in the JP1, the low selection efficiency of positive clones is due to the fact that the selection mark wasn't inserted in the integrative vector. The positive clone's growth curves showed that there were no alterations in the strain's growth after vector's integration and the tests of enzymatic activity showed that the clones are producing the enzymes of interest. Moreover, the mitotic stability's tests showed high stability of the vector in the positive clones of the strain JP1, which makes this system of expression attractive for industrial production.

1. Introdução

1.1 Produção de etanol a partir de amido: visão econômica

Devido a instabilidade geopolítica das principais regiões detentoras da produção de petróleo e seus derivados e da oscilação do preço do barril, surgiu uma grande busca mundial por novas matrizes energéticas que pudessem ser viáveis economicamente. Atualmente, o mercado tornou-se favorável para a produção de etanol, por se tratar de uma fonte de energia renovável e por possuir um apelo ecologicamente correto (EVTEC, 2005).

O Brasil já possui tradição na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, pois o combustível é produzido desde 1975, quando foi lançado um programa de incentivo à produção de bioetanol, como meio de fugir da crise no Oriente Médio que elevou o preço do petróleo a patamares extremos na década de 70. O PROALCOOL, como ficou conhecido esse programa, além de visar a redução da dependência do país do petróleo (antes do programa o Brasil chegou a importar 85 % do produto que era consumido internamente, 44,5 % de toda atividade de importação brasileira), teve como objetivo salvar os produtores de cana-de-açúcar da falência, pois nos anos 70 houve uma repentina queda nos preços do açúcar no mercado internacional que comprometia a economia agrícola local. O programa ainda possuía caráter social e propunha o desenvolvimento brasileiro por meio da geração de postos de trabalho gerados pelas novas empresas produtoras de álcool (EVTEC, 2005).

Desde então o álcool passou a ser utilizado como combustível no país tanto na sua forma hidratada como misturado à gasolina, no caso dos carros bicombustíveis (*flex*). Isso tornou o Brasil um líder na produção de etanol. Segundo dados do NIPE-UNICAMP, nos últimos anos, o Brasil passou a exportar 15 % do etanol produzido. Por causa do Protocolo de Kyoto, vários países, entre eles o Japão, já consideram adicionar álcool à gasolina como uma forma de diminuir a emissão de gases poluentes. Todavia, a atual produção brasileira não será suficiente para atender a esta futura demanda. Haveria a necessidade de aumentar a área de cultivo de cana-de-açúcar, avançando em áreas de preservação, ou substituindo outros cultivos. Ambas as alternativas trariam prejuízos à sociedade (Guandalini & Silva, 2006). Outra barreira para o aumento do cultivo da cana-de-açúcar é o fato de ela ser uma planta sazonal e requerer terra de plantio de alta qualidade para seu crescimento, assim ela não poderia ocupar todos os nichos agrícolas que o Brasil oferece (Moraes *et al.*, 1995).

Nos EUA, que hoje é o maior produtor de etanol, a produção do combustível é baseado principalmente no amido de milho como substrato. Mas a utilização desse amido para a produção de etanol encontra várias barreiras. Uma delas é o valor agregado dos produtos derivados do amido de milho, como xarope de glicose e maltose, que são maiores que o do etanol, além de serem produtos de consumo popular.

Tabela 1: Principais países produtores de etanol. Fonte: Veja abril/2008

País	Fonte utilizada para produção de bioetanol
Brasil	cana-de-açúcar
Estados Unidos	principalmente milho, mas com boa perspectiva de chegar primeiro ao etanol de celulose
Canadá	trigo e milho
China	Mandioca
Índia	cana, melaço
Colômbia	cana e óleo de palma

Devido a essas e outras limitações dos substratos que vem sendo utilizados na produção do combustível, os principais países produtores de etanol têm investido em estudos que visam promover a produção de etanol a partir fontes alternativas. Dentre as pesquisas, muitas estão focadas na utilização de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol, por serem estes uma fonte de carboidratos muito abundante na natureza e por representarem uma possibilidade de utilização dos resíduos agrícolas, o que evitaria a expansão desmedida de áreas agricultáveis para geração de energia. No entanto o uso deste tipo de substrato ainda é economicamente problemático, pois os resíduos lignocelulósicos só se tornam disponíveis para fermentação após tratamento com ácidos e uma etapa de hidrólise da celulose e a da hemicelulose (Sun & Cheng, 2002). As enzimas empregadas nas etapas iniciais de hidrólise da celulose, as celulasas, possuem atividade pouco específica e a problemática de serem inibidas pelo próprio produto, o que interrompe a reação antes do término. Além disso, elas são produzidas por empresas como *Genecor* e *Novozymes*, que por serem empresas

estrageiras, podem aumentar significativamente os custos do processo (Suto & Tomita, 2001).

Outros estudos visam a otimização de tecnologias para obtenção de etanol a partir das fontes já utilizadas (glicose e o amido), o que é favorável do ponto de vista econômico (Bai *et al.*, 2007).

A produção de álcool a partir de amido já foi cogitada no Brasil no início do PROALCOOL como uma tentativa de se obter uma fonte alternativa à cana-de-açúcar. De modo que em 1977 começou a operar a usina Curvelo, uma indústria capaz de produzir sessenta mil litros diários de álcool com base em mandioca. A mandioca (fonte de amido) possui inúmeras vantagens que a torna uma boa opção como alternativa para a produção de bioetanol a baixo custo, como por exemplo, o fato de ela ser uma planta produzida na maioria dos estados brasileiros, possuir variedades que podem ser colhidas em diferentes épocas do ano, menor nível de exigência do solo e menor sensibilidade climática quando comparada com a cana-de-açúcar, além de possuir baixos custos de produção, fácil colheita, e capacidade de estocagem sem perda de qualidade em sua forma desidratada. Porém, a produção de etanol a partir da mandioca na década de 70 mostrou-se um empreendimento inviável pois as instalações de indústrias produtoras de álcool de mandioca foram construídas em regiões não tradicionais para cultivo, ou em fim de ciclo do pólo mandioqueiro. Além disso, o modelo comercial, desenhado na época, não era adequado, pois previa que o controle da produção de mandioca ficaria sob a guarda de poucas empresas o que gerava dependência no abastecimento. E por falta de condições tecnológicas, a usina de Curvelo, junto com outras oito, fracassou. (EVTEC, 2005).

Em 2005, no entanto, um estudo de viabilidade técnica econômica e comercial (EVTEC) sobre a comparação da produção de etanol a partir de amido de mandioca e cana-de-açúcar foi realizado pelo Centro de Apoio de Desenvolvimento Tecnológico (CDT) da Universidade de Brasília, concluindo que a implementação de microdestilarias para a produção de álcool a partir de mandioca é plenamente viável e o produto é altamente competitivo, se consideradas as proporções mercadológicas globais e focado nos arranjos produtivos locais.

Além disso, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas com o fim de diminuir os custos de produção do etanol a partir de amido e para isso um grande número de estratégias podem ser adotadas. Como a *Saccharomyces cerevisiae*, que é o principal microrganismo utilizado na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, não é capaz

de utilizar diretamente o amido como fonte de energia, uma dessas estratégias é a construção de linhagens capazes de utilizar o amido como fonte energética, para isso são utilizadas fusões protoplasmáticas interespecíficas ou intergenéricas e a introdução de genes heterólogos que codificam amilases nesses microrganismos (Moraes *et al.*, 1995) a fim de desenvolver um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

O processo SSF envolve a hidrólise de polissacarídeos a glicose e sua conversão em etanol no mesmo reator. Algumas vantagens desse método com relação à hidrólise e fermentação separadas são: custos mais baixos, devido à diminuição do número de reatores na indústria, aumento na taxa de hidrólise e baixa inibição do microrganismo pelo próprio produto, além da diminuição no tempo da fermentação (Giordano *et. al.*, 2007).

1.2 Enzimas de degradação de amido (amilases)

Para a quebra completa da molécula do amido, várias enzimas que clivam o polímero em locais diferentes são necessárias (Figura 1). Para o processo de produção de etanol a partir de amido basicamente duas enzimas são utilizadas: a α -amilase, numa etapa da produção que é chamada de liquefação, e a glicoamilase, numa outra etapa que é chamada de sacarificação (Van der Maarel *et al.*, 2002).

A α -amilase, classificada como uma endoamilase é capaz de quebrar as ligações glicosídicas presentes na parte interna (endo-) da cadeia de amilose e amilopectina. Os produtos finais da ação das α -amilases são oligossacarídeos de diversos tamanhos em uma configuração anomérica α , e dextrinas limites, na qual constituem os oligossacarídeos ramificados (Van der Maarel *et al.*, 2002). Para as α -amilases, o mecanismo catalítico mais aceito é o de duplo deslocamento com manutenção da configuração anomérica original (α) do produto originado. Esse mecanismo envolve 2 resíduos catalíticos no sítio ativo; um ácido glutâmico que atua na catálise ácido/base e um aspartato que atua como nucleófilo. Todo o mecanismo pode ser agrupado em 5 etapas: (i) depois de o substrato ter se ligado ao sítio ativo, o ácido glutâmico protonado doa um próton para o oxigênio da ligação glicosídica, (ii) um estado de transição com um íon oxocarbônio é formado seguido pela formação de um intermediário covalente; (iii) uma molécula de glicose protonada deixa o sítio ativo, enquanto uma molécula de água ou uma nova molécula de glicose interage no sítio ativo a ataca a ligação covalente entre a molécula de glicose e o aspartato; (iv) um estado de transição com um íon oxocarbônio é formado novamente; (v) o glutamato que atua na catálise agora como uma base aceita um hidrogênio da água ou da nova molécula de glicose (Galdino, 2008).

Já a glicoamilase, também conhecida como amiloglicosidase ou γ -amilase, age sobre os resíduos externos de glicose da amilose e da amilopectina produzindo somente glicose, sendo classificada, portanto com uma exoamilase. Ela é capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 em amido solúvel e oligossacarídeos relacionados com inversão da configuração para produzir β -glicose. Além da atividade α -1,4, a glicoamilase fúngica hidrolisa lentamente as ligações α -1,6 do amido (Norouzián *et al.*, 2006). A eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) para a hidrólise das ligações α -1,6 é apenas 0,2% da atividade α -1,4. Este efeito adverso compromete o

rendimento da sacarificação em nível industrial. No entanto, um aumento no rendimento de glicose produzida na etapa de sacarificação pode chegar a níveis maiores que 96% por meio da atividade glicosídica α -1,6 das glicoamilases (Sauer *et al.*, 2000).

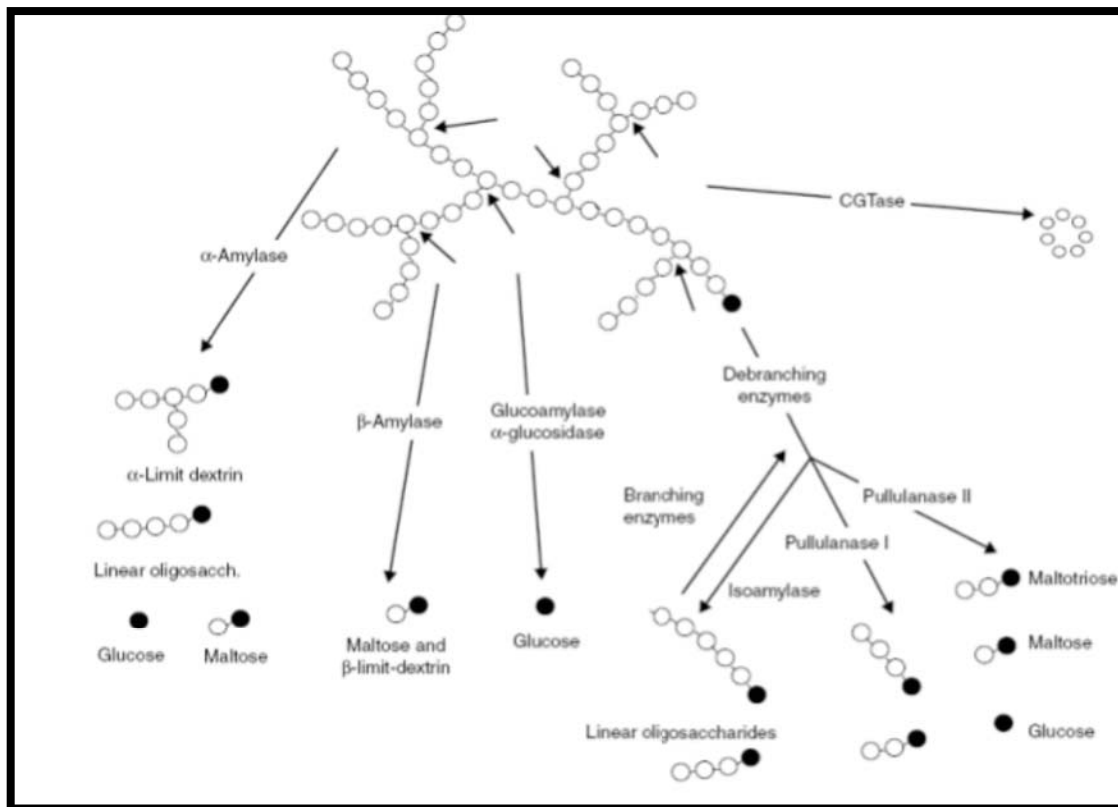


Figura 1: Diferentes enzimas envolvidas na degradação do amido. A estrutura em forma de anel fechado representa a extremidade redutora de uma cadeia oligossacarídica. Fonte: Bertoldo & Antranikian (2002).

1.3 *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol

Diversos organismos vem sendo estudados para a utilização na produção de bioetanol, mas a levedura *Saccharomyces cerevisiae* continua sendo a principal espécie utilizada para este fim (Bai, 2008). A *S. cerevisiae* é um organismo unicelular que se reproduz assexuadamente por brotamento, é anaeróbico facultativo e apresenta fenótipo *Kluyver* positivo, ou seja, é capaz de produzir etanol na presença de oxigênio em altas concentrações de glicose (Kingsman & Kingsman, 1988; Leite *et al.*, 2008). A principal via metabólica envolvida na fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* é a via da glicólise, na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de CO₂ (Bai, 2008) (Figura 2).

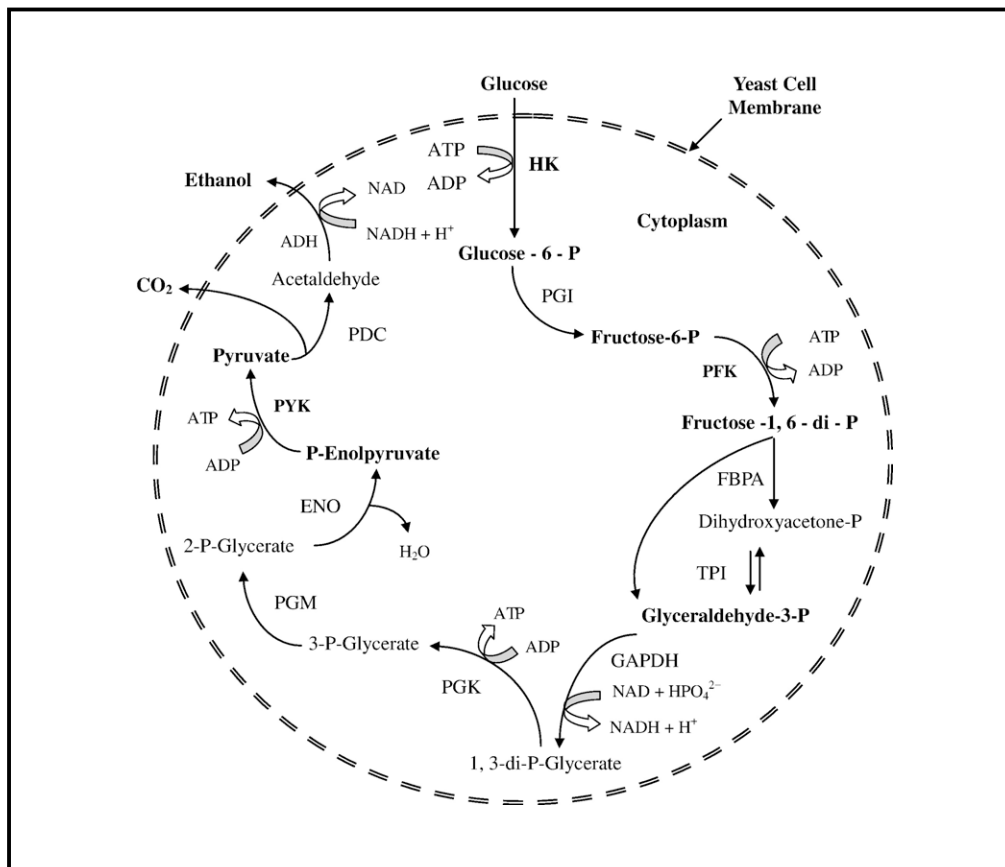


Figura 2: Via metabólica da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* – Abreviações: HK: hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: fructose bisfosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-

3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfogliceromutase, ENO: enolase, PYK: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, ADH: álcool desidrogenase. (Fonte: Bai, 2008).

Devido ao fato da *S. cerevisiae* ser utilizada na produção de vinho, cerveja, pães e álcool combustível, entre outros produtos de importância econômica, e por ser receptivo aos mais sofisticados níveis de manipulação genética, ela despertou o interesse dos pesquisadores de biotecnologia. Tal fato resultou em inúmeros estudos, sendo que a seqüência completa do genoma da levedura foi depositado nos bancos de dados públicos em 1996 (Nobrega, 2001). Todas essas informações foram disponibilizadas no sítio da *internet* (Rede Mundial de Computadores) da SGD (*Saccharomyces Genome Database*) (SGD, 2005). A publicação da seqüência do genoma de *S. cerevisiae*, assim como os avanços na compreensão de sua fisiologia tornaram esse microrganismo eucarioto modelo para aplicações em biologia molecular. Isto, associado ao crescente desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, tem viabilizado o melhoramento genético de linhagens possibilitando um melhor aproveitamento desse microrganismo no campo da biotecnologia (Shüller & Casal, 2005).

Outras vantagens deste microrganismo e que também são um atrativo para aplicações tecnológicas é o fato de ele ser geralmente reconhecida como um microrganismo seguro (GRAS), produzir etanol por fermentação acima de 20 % (v/v) a partir de fontes de carbono (Cot *et al.*, 2006), além de possuir alta resistência às condições ambientais adversas (Tavares, 2004).

1.4 *S. cerevisiae*: Linhagens de laboratório X Linhagens industriais

Apesar de todas as diferenças descritas na literatura entre linhagens industriais e de laboratório, o vasto conhecimento que se tem acerca da *S. cerevisiae* é proveniente de estudos com linhagens laboratoriais, e a problemática disso é que após anos de manipulação em laboratório essas linhagens perderam características que as linhagens utilizadas na indústria possuem (Wheals *et al.*, 1999).

Linhagens de laboratório são de mais fácil manipulação e por isso geralmente são as primeiras a serem utilizadas quando a engenharia metabólica em *S. cerevisiae* deve ser provada. Entretanto, para aplicação industrial, os mesmos conceitos devem ser testados utilizando linhagens provenientes da indústria (Zaldivar, 2002).

Visto que o processo industrial no Brasil ocorre em condições não estéreis, ele fica susceptível à contaminação por outras leveduras que não a *S. cerevisiae* e ao ganho de novas células da própria *S. cerevisiae*, o que produz uma sucessão na população de leveduras, onde aquelas que estão genética e fisiologicamente mais adaptadas tendem a dominar (Silva-Filho *et al.*, 2005).

Por esse motivo, linhagens provenientes de indústrias alcooleiras estão recebendo uma maior atenção dos pesquisadores devido à possibilidade de utilização de leveduras mais adaptadas e altamente produtivas para a otimização da produção industrial de etanol. As qualidades requeridas para o processo industrial incluem a tolerância ao estresse fermentativo, altas temperaturas, variações de pressão osmótica e ao próprio etanol, além de baixos pHs, interrupções de produção, etc. (Figura 3) (Silva-Filho *et al.*, 2005).

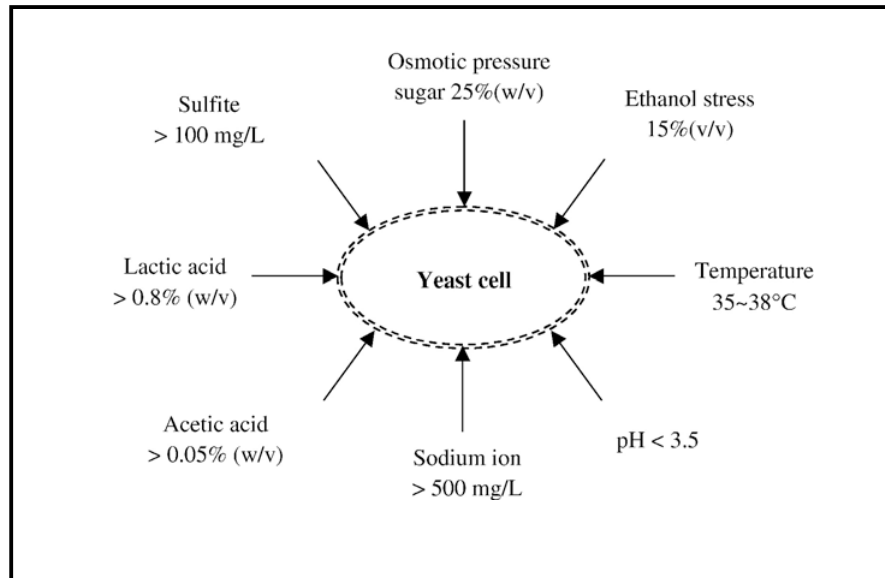


Figura 3: Potenciais estresses ambientais enfrentados pela *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo de produção de etanol. (Fonte: Bai, 2008)

Do ponto de vista molecular, linhagens industriais, quando comparadas às linhagens de laboratório, são geneticamente mais complexas e não possuem estabilidade em seu estado haplóide, sendo aneuploidias comuns em leveduras industriais. Por outro lado, estas linhagens tem evoluído para uma melhor adaptação a diferentes ambientes ou nichos ecológicos modificados, ou não, pela atividade humana. Este processo é denominado “domesticação” e pode ser responsável por certas características genéticas das linhagens industriais como, por exemplo, número variado de ploidia e polimorfismo cromossômico (Lucena *et al.*, 2007). A modificação da constituição genética das linhagens industriais para uma melhor adaptação ao ambiente industrial ocorre por meio de eventos como recombinação mitótica entre seqüências homólogas, *crossing-over* mitótico e conversões gênicas. Estas mudanças tendem a ser fixadas numa linhagem como resultado de uma pressão seletiva para as características genéticas que melhor satisfazem àquelas condições ambientais (Leite, 2008). Pretorius (2000) descreveu ainda a presença de cromossomos extras em linhagens industriais e com ela a superexpressão concomitante de genes, uma adaptação deste tipo de linhagem que poderia conferir mais uma vantagem sobre as linhagens de laboratório (Zaldivar, 2002).

Portanto, devido ao longo processo de “domesticação”, as linhagens industriais tem acumulado uma alta complexidade genômica. Esta complexidade tem

dificultado a aplicação de técnicas moleculares rotineiras para modificação genética facilmente aplicáveis a linhagens laboratoriais. Assim, algumas adaptações nos procedimentos correntes de modificação genética são necessárias quando se pretende manipular linhagens industriais (Leite, 2008).

1.5 Transformação de uma linhagem industrial

Em 2005, uma linhagem industrial foi isolada por Silva-Filho *et al.* por possuir alta dominância sobre as demais em uma população de leveduras proveniente de uma usina produtora de bioetanol (Japungu) do nordeste brasileiro, a essa linhagem foi dado o nome de JP1. Conforme descrito no trabalho, quando a JP1 dominava o processo industrial, a eficiência de conversão de açúcar para etanol era de 92 %. Foi observado que ela possui uma especificidade de substrato: é competitiva apenas em indústrias que utilizam a cana-de-açúcar para a produção do bioetanol. A JP1 demonstrou ainda ser mais resistente aos estresses ambientais encontrados na indústria alcooleira, além de ser de fácil manipulação genética, com eficiência de transformação para plasmídios, tanto epissomais quanto integrativos, maior do que qualquer outra linhagem comercial testada (Silva-Filho *et al.*, 2005).

Como a JP1 é uma linhagem industrial, diversos fatores devem ser considerados para que se tenha uma boa estratégia de transformação da mesma. Os vetores de expressão para aplicações industriais, além de demonstrar eficiência em transformação, devem se manter estáveis por muitas gerações sendo capazes de se manter na célula sob cultivo não seletivo (Takahashi *et al.*, 2003). Porém, para uso nestas linhagens, os sistemas já descritos ainda apresentam algumas desvantagens (Leite, 2008):

- a) a marca de seleção é baseada principalmente em supressão de auxotrofia ou marca de resistência a compostos químicos;
- b) nem sempre a marca de seleção é excisável o que impossibilita a reutilização do sistema para múltiplas modificações numa mesma linhagem;
- c) o alvo de integração nem sempre é multicópia, impossibilitando também a reutilização do sistema;
- d) os vetores ainda não são totalmente isentos de seqüência bacterianas.

Nas linhagens industriais de leveduras, as modificações introduzidas também não devem alterar as características essenciais da célula hospedeira no processo de fermentação, como por exemplo, desempenho fermentativo e velocidade de crescimento (Schüller & Casal, 2005).

Para a construção de um vetor eficiente para *S. cerevisiae*, algumas características devem ser consideradas. Dentre estas estão a marca de seleção e o alvo de integração cromossômica, que visam garantir uma boa expressão do gene desejado.

1.5.1 Marca de Seleção

Diversas marcas de seleção são utilizadas para expressão heteróloga em *S. cerevisiae*. Em linhagens de laboratório é comum a utilização de marcas baseadas na complementação nutricional de mutantes auxotróficos (supressão de auxotrofia) (Pronk, 2002), pois linhagens laboratoriais geralmente são haplóides, possuem uma cópia de cada gene, o que possibilita uma construção relativamente fácil de linhagens auxotróficas (Leite, 2008). Os genes marcadores utilizados para esse tipo de marca seletiva são alelos tipo selvagem que codificam enzimas essenciais nas vias metabólicas a eles relacionadas. O uso destes genes como marca de seleção é restrito a linhagens hospedeiras que são auxotróficas para o nutriente em questão devido à ausência de uma cópia cromossômica funcional do gene marcador (Pronk, 2002). Quando o vetor portando a cópia funcional do gene é introduzido na célula, a levedura torna-se capaz de propagar-se em meio de cultura sem o nutriente relacionado ao gene marcador. As marcas auxotróficas mais utilizadas são *LEU2*, *TRP1*, *URA3*, *HIS3* e *HIS4* aplicadas a linhagens auxotróficas que não são capazes de sintetizar leucina, triptofano, uracil, histidina e histidina, respectivamente (Leite, 2008).

No entanto, como dito anteriormente, linhagens de destilarias são de difícil manipulação, o que impossibilita ou inviabiliza a utilização destes tipos de seleção, devido à dificuldade de construir linhagens industriais auxotróficas. Ademais, os poucos transformantes obtidos por integração em cópia única em linhagens provenientes de indústrias, são instáveis e perdem a informação heteróloga após algumas gerações. (Shimura *et al.*, 1993). Para contornar este problema usam-se, para a transformação de linhagens industriais, marcas dominantes tais como as descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Marcas seletivas dominantes mais usadas na tecnologia de DNA recombinante de *S. cerevisiae* (adaptado de Domingues, 2001)

<i>Marca</i>	<i>Comentário</i>
CUP1	Resistência ao cobre
G418 ^R	Resistência ao antibiótico G418
TUN ^R	Resistência à Tunicamicina
KILk1	Imunidade à toxina killer
C230	Marcador cromogênico
SMR1	Resistência ao sulfometurão de metilo
SFA	Codifica para a desidrogenase de formato (as células podem crescer em 6mM de formaldeído)
ARO4	Resistência ao OFP ou PFP
Higromicina ^R	} Resistência a drogas
Metotrexato ^R	
Cloranfenicol ^R	
Duoron ^R	
Zeocina ^R	
Canavanina ^R	

Marcas de resistência a antibióticos são dominantes e não requerem linhagens com mutações auxotróficas (Gueiroz, 2006). Dentre essas marcas de seleção, os genes mais utilizados são *cyh2*, *ble*, *kan*, *natnt2* e *hphnt1* que conferem resistência às drogas cicloheximida, fleomicina, canamicina (G418), estreptomicina e higromicina B, respectivamente (Schüller & Casal, 2005). Para a seleção de células modificadas com vetores portando uma destas marcas, o antibiótico a ela relacionada é adicionado ao meio de cultura. As células modificadas utilizando marcas de resistência a antibióticos são, entretanto, indesejáveis na indústria por haver uma preocupação em torno do evento da transferência gênica entre os microrganismos do ambiente industrial, pelo efeito da presença do antibiótico sobre as funções celulares e devido ao alto custo para aplicação de antibióticos no processo industrial (Leite, 2008).

Outra questão associada a marcas de seleção, seja ela supressora de auxotrofia ou de resistência a compostos químicos, é a inviabilidade de sua reutilização numa mesma linhagem em sucessivos eventos de transformação, tendo em vista, muitas vezes, a impossibilidade de sua remoção (Walker *et. al.*, 2005; Leite, 2008).

Mas esse problema pode ser sanado ou pela inserção da marca de seleção num vetor episomal, que pode ser perdido facilmente durante a divisão mitótica das células das leveduras transformadas, ou pela excisão da marca de seleção quando seqüências repetidas flanqueiam o gene marcador, como a seqüência *loxP* por

exemplo que, segundo Sauer (1994), tem se mostrado bastante eficiente na excisão de marcas seletivas em leveduras.

1.5.2 Vetores de Expressão

Diversos vetores de transformação de leveduras foram desenvolvidos, com características que variam de acordo com o tipo de replicação sendo descritos brevemente a seguir na Tabela 3 (Nobrega, 2001).

Tabela 3: Tipos de vetores e seus mecanismos de ação (adaptado de Nobrega, 2001)

<i>Tipo de plasmídeo</i>	<i>Sigla</i>	<i>Como funcionam</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Plasmídios Replicativos	YRP	Vetores extracromossomais contendo uma seqüência de replicação autônoma (ARS), que funciona como origem de replicação.	Vetores ARS estão presentes em múltiplas cópias por célula.	São mitoticamente muito instáveis, cerca de 20 % das células perdem seus plasmídios a cada geração quando crescidas na ausência de pressão seletiva.
Plasmídios Epissômicos	YE _p	Vetores que replicam autonomamente por meio de um segmento de plasmídios natural de <i>S. cerevisiae</i> 2 μ .	São os mais comumente utilizados em Biologia Molecular, sendo normalmente bifuncionais. São mantidos em aproximadamente em 100 cópias por célula (haplóide).	Sua estabilidade é um pouco maior do que vetores ARS, atingindo cerca de 1 a 10 % de instabilidade a cada geração.
Plasmídios Integrativos	YI _p	A expressão a partir destes vetores é baseada na integração da informação genética ao cromossomo da levedura hospedeira através da recombinação homóloga.	A informação é muito estável, havendo perda de aproximadamente 0,1 % a cada geração, na ausência da pressão seletiva.	A frequência de transformação desses vetores é muito baixa, atingindo 1 a 10 transformantes / μ g de DNA.
Plasmídios Centroméricos	YC _p	Contêm uma seqüência que permite a replicação autônoma na levedura, e seqüências	Possuem segregação estável, mantendo-se na célula.	Baixo número de cópias por célula (1 a 2 cópias / célula). A perda desse plasmídeo corresponde a

		correspondentes às regiões centroméricas cromossômicas.		aproximadamente 1 % por geração.
Plasmídios Lineares	YLp	Contém seqüências teloméricas e elementos ARS para replicação autônoma, mantendo-se lineares dentro da célula. São também chamados de “cromossomos artificiais”	Apresentam boa estabilidade	Baixa eficiência de transformação.

Para assegurar altos níveis de expressão o vetor empregado para a introdução de genes heterólogos deve combinar o adequado número de cópias do gene para a expressão desejável e a estabilidade mitótica sob condições não seletivas. Geralmente, os vetores não conseguem combinar essas duas características (Leite, 2008).

Para transformação em leveduras, plasmídios epissomais (YEp) satisfazem ambos critérios em condições laboratoriais. Esse tipo de plasmídio está sendo utilizado com sucesso em escala laboratorial com altos níveis de expressão para vários tipos de genes heterólogos. No entanto, as condições específicas aplicadas na fermentação industrial, como por exemplo, altas temperaturas e alta pressão seletiva, tornam os vetores YEp pouco convenientes para a produção em larga escala (Lopes, 1988). Os problemas relatados com o uso de YEp podem ser contornados utilizando vetores integrativos (YIp) que por integrarem a informação genética ao cromossomo da levedura hospedeira através da recombinação homóloga asseguram maior estabilidade do vetor durante a divisão mitótica. Mas, o número de cópias desse tipo de vetor é menor do que aquele observado para YEp (Lopes, 1988). A fim de combinar as propriedades favoráveis dos plasmídeos YEp e YIp e chegar a vetor ideal para expressão heteróloga em células de leveduras industriais é necessário aumentar o número de cópias do YIp por meio da inserção do mesmo em seqüências de DNA presentes em múltiplas cópias no genoma da levedura (Lopes, 1988).

Existem duas seqüências presentes no genoma da *S. cerevisiae* em múltiplas cópias com potencial para utilização na transformação de linhagens industriais, são elas o rDNA e as seqüências Tyδ.

1.5.3 Estratégias de Integração: rDNA X Ty δ

Para se obter a estabilidade mitótica e um número ótimo de cópias integradas para um nível de expressão aceitável, Cho (1998) e Lopes (1989) usaram seqüências de rDNA como alvo para integração.

O rDNA existe em aproximadamente 200 cópias no genoma da levedura e é possível integrar genes heterólogos em uma ordem de mais ou menos 100 cópias (Cho, 1998). Um trabalho desenvolvido por Lopes *et al.* (1989) mostrou a construção de um vetor integrativo de múltiplas cópias (pMIRY2) que se integrava no rDNA acima de 140 cópias e era capaz de se manter estável por um longo período de tempo sob condições não seletivas. A introdução de genes homólogos e heterólogos nesse vetor teve um nível de produção de proteínas similar àqueles observados para os vetores YEp em um número comparável de cópias.

No entanto, Lopes observou que o rDNA varia de tamanho dependendo da fase de crescimento da cultura e o número de cópias integradas do vetor pMIRY2 era maior durante a fase exponencial de crescimento que durante as fases lag e estacionária. Segundo a observação de Lopes, o tamanho estável para rDNA varia de 9 a 9,1 kb, caso a seqüência fosse maior ou menor do que isto ela se torna instável. Além disso, as integrações no rDNA ocorrem primariamente em um arranjo em *tandem* (Lee e Da-Silva, 1997), e repetições em *tandem* possuem uma alta probabilidade de serem removidas pelo processo de recombinação. Assim, quando o rDNA é submetido a uma pressão seletiva, como a encontrada no processo industrial, ele se torna instável e as cópias são perdidas rapidamente a cada geração.

De acordo com Lee e Da-Silva (1997), o trabalho com esse tipo de inserção se mostrou instável. Os métodos de recombinação homóloga não podiam ser regulados, os marcadores auxotróficos eram rapidamente esgotados, e quando uma seleção por antibiótico era empregada, apenas um *round* de transformação era possível.

A outra opção para a integração do vetor em múltiplas cópias é a utilização das seqüências Ty δ . Os elementos Ty são uma família de retrotransposons que representam aproximadamente 1-2 % do genoma da levedura (Parket & Kupiec, 1992). Dentro desta família encontra-se o retrotransposon Ty1 que têm repetições de aproximadamente 30 cópias dentro do genoma da *Saccharomyces cerevisiae* e constitui cerca de 0,04 % de seu DNA total. Esses elementos de 6 kb possuem uma

grande região central, épsilon, flanqueadas por repetições diretas de 334 pb chamados elementos delta (δ) (Fink *et al.*, 1985).

As sequências δ , por sua vez, por serem cicatrizes de locais onde o Ty1 se integrou e depois se excisou, apresentam 425 cópias dentro do genoma da *S. cerevisiae*, o que torna o método de integração em múltiplas cópias com a utilização de sequências Ty δ uma boa opção, pois ele permite que mais cópias de genes heterólogos sejam integradas no cromossomo da levedura do que qualquer outro sistema de integração convencional (Cho *et al.*, 1999). Além disso, as integrações utilizando o Ty δ provaram ser estáveis. De acordo com Lee e Da-Silva (1997), depois da transformação e passadas 50 gerações não houve mudanças significantes na estabilidade estrutural do vetor.

1.6 A linha de pesquisa “produção de etanol a partir de amido” do grupo de Biotecnologia Molecular da UnB

Em 1986, Astolfi-Filho *et al.* introduziram o gene da α -amilase pancreática de camundongo em uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta linhagem apresentou altos níveis de atividade amilolítica, no entanto não era capaz de usar os produtos de hidrólise. A seguir, essa linhagem foi cruzada com uma linhagem produtora de maltase constitutivamente e com uma linhagem produtora de glicoamilase de *Saccharomyces diastaticus* (Ribeiro-dos-Santos, 1988). A linhagem resultante, chamada de 4D, foi capaz de produzir álcool a partir de amido com 94% de eficiência. No entanto, foi incapaz de usar 22 % do amido total, devido à falta de atividade desramificadora. Com o objetivo de melhorar esta linhagem, foi adicionado o gene da pululanase de *Klebsiella pneumoniae*, mas nenhuma atividade foi detectada.

Uma nova estratégia foi montada por Moraes *et al.* (1995), onde oito linhagens expressando o gene da α -amilase de *Bacillus subtilis*, ou o gene da α -amilase pancreática de camundongo e o cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori*, isolados ou na forma de uma proteína de fusão, foram construídas. Os melhores resultados foram obtidos com a combinação do gene da α -amilase de *B. subtilis* e o cDNA da glicoamilase fúngica, tanto isoladas quanto na forma de fusão. A linhagem expressando as duas enzimas separadamente foi capaz de degradar amilose e amido de milho, esgotando totalmente o meio, e produzir etanol. Já a linhagem produtora da proteína de fusão, foi capaz de crescer em amilose, mas não em amido de milho, indicando uma deficiência. Análises feitas com a proteína de fusão (Moraes *et al.*, 1999) indicaram que todas as atividades amilolíticas, endo α 1-4, exo α 1-4 e exo α 1-6, estavam presentes na proteína de fusão, sugerindo que a deficiência da linhagem produtora da fusão não estava na perda de uma das atividades, e sim, talvez na relação da atividade de α -amilase e glicoamilase. Estudos de comparação entre as atividades produzidas entre as duas linhagens indicaram um excesso de três vezes na atividade de glicoamilase em relação à de α -amilase, na linhagem que produzia as enzimas separadamente, quando comparadas com a linhagem que expressava a proteína de fusão. Análises em fermentador da linhagem que produz as duas enzimas separadas demonstram a sua capacidade de converter amido a etanol, com um aproveitamento de 85,4 % do amido contido no meio de cultura (Fitzsimon *et al.*, 2004).

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada na construção das linhagens descritas acima não é a ideal para a produção de etanol em larga escala. Por isso, fez-se necessário a construção de uma linhagem de *S. cerevisiae* que além de ser capaz de degradar amido e produzir etanol com eficiência satisfatória, esteja preparada para enfrentar o estresse ambiental encontrado em uma usina de etanol. Para a introdução dos cassetes de expressão de genes amilolíticos desenvolvidos por Moraes *et al.* (1995), este trabalho objetivou a construção de um vetor integrativo em múltiplas cópias baseado na seqüência δ to retrotransposon Ty de *S. cerevisiae* a fim de utilizá-lo na linhagem industrial JP1, de modo que fosse construída uma linhagem eficiente na produção de etanol em escala industrial.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal a construção de um vetor de integração em múltiplas cópias para a transformação de leveduras industriais e introdução dos cassetes de expressão dos genes amilolíticos para a produção de álcool a partir de amido.

2.2 Objetivos Específicos

- Construção de um vetor de integração em múltiplas cópias baseados na seqüência δ do transposon Ty1 de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Inserção dos cassetes de expressão da α -amilase e glicoamilase no vetor de integração em múltiplas cópias;
- Construção de linhagens industriais com atividade amilolítica e com a informação heteróloga estável.

3. Estratégia

Construção de um vetor integrativo em múltiplas cópias para *Saccharomyces cerevisiae* utilizando seqüências delta

Amplificação do elemento Ty δ de *S. cerevisiae* e clonagem dos mesmos no vetor de clonagem pGEMT *Easy*

Construção do vetor integrativo pT pela subclonagem dos fragmentos Ty δ no vetor pBlueScript KS+

Clonagem dos cassetes de expressão de α -amilase e glicoamilase no vetor pT gerando os vetores PTA (contendo o cassete da α -amilase), pTGA (contendo o cassete da glicoamilase) e pTAGA (contendo ambos os cassetes)

Liberação dos cassetes de integração com o uso da digestão dos vetores pTA, pTGA e pTAGA com a enzima de restrição *Xho*I

Transformação da linhagem semi-industrial MFL com os cassetes de integração

Transformação da linhagem industrial JP1 com os cassetes de integração

Screening dos clones através de teste em placa contendo amido e coloração com vapor de iodo

Avaliação da curva de crescimento dos clones com atividade amilolítica

Teste de estabilidade mitótica dos clones com atividade amilolítica

4. Material

4.1 Microrganismos utilizados

4.1.1 Linhagens bacterianas

Escherichia coli linhagem DH5- α (GIBCO BRL) – *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) IU169 dcoR phoA.*

Escherichia coli linhagem XL10 Gold (Stratagene) - Tetr Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacIqZ Δ M15 Tn10* (Tetr) Amy Camr a

Escherichia coli linhagem TOP10 (Invitrogen) – F- *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.*

4.1.2 Linhagens de leveduras

Saccharomyces cerevisiae linhagem MFL (semi-industrial)

É uma mutante auxotrófica para leucina obtida da ruptura do gene *LEU2* da linhagem industrial FTPT472 isolada de um fermentador industrial da Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello (Campinas – São Paulo) (Fitzsimon *et al.*, 2004)

Saccharomyces cerevisiae linhagem JP1 (industrial)

É uma linhagem industrial que foi isolada em 2005 em uma usina produtora de bioetanol no nordeste brasileiro (Silva-Filho *et al.*, 2005).

4.2 Enzimas

Enzimas de restrição

As enzimas *XhoI*, *SacI*, *KpnI*, *BglII*, *Sall*, *BamHI*, *XbaI* e *HindIII* foram fornecidas pela *New England Biolabs*, *Promega*, *QBiogene* e *Fermentas Life Sciences* e utilizadas como indicado pelo fabricante.

Ligases

T4 DNA ligase – *New England Biolabs Inc.*

T4 DNA ligase – *USB Corporation*

T4 DNA ligase – kit pGEM[®]-T *System I* (Promega)

Fosfatases

Para as reações de defosforilação de vetores linearizados com apenas uma enzima foram utilizadas as fosfatases alcalina de camarão (SAP – *Boehringer Mannheim*) e *Antartic* da *New England Biolabs*. Ambas utilizadas conforme especificações do fabricante.

RNase A

RNase A (“DNase-free”) 10 mg/mL

Acetato de sódio 50 mM, pH 4,8

Fervida em banho-maria por 10 minutos

4.3 Marcadores de DNA (anexo 1)

100 pb DNA ladder (Promega)

DNA de fago λ digerido com *EcoRI* e *HindIII*

DNA de fago λ digerido com *BstEII*

4.4 Kits

QIAquick PCR purification kit (Qiagen) – utilizado para purificação dos produtos de PCR.

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) – utilizado para purificação dos produtos de PCR.

DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing – utilizado no seqüenciamento.

4.5 Ferramentas de Bioinformática

Busca das seqüências: GenBank (*Ncbi – National Center of Biotechnology Information*) - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Cálculo do conteúdo de G+C: “Genomics %G~C Content Calculator” - http://www.sciencebuddies.org/mentoring/project_ideas/Genom_GC_Calculator.shtml

Análises de restrição: NEBcutter V2.0 - (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Alinhamento: ClustalW - (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

4.6 Vetores

Os mapas de todos os vetores utilizados encontram-se nos anexos (anexo 2-4)

pGEM[®]-T Easy (Promega) - Para a clonagem dos produtos de PCR foi utilizado pGEM[®]-T Easy. Esse vetor de 3,0 kb possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, a origem de replicação do fago f1, parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino-terminal da enzima β -galactosidase, diversos sítios de clonagem na região codante do *lacZ* e as seqüências T7 e SP6 (para o anelamento dos oligonucleotídeos universal e reverso) flanqueando a região de clonagem. A seleção dos recombinantes é feita pela ausência da atividade da β -galactosidase na presença de X-gal.

pBluescript II KS+ (Promega) - A construção dos vetores integrativos (pT) foi feita utilizando o vetor comercial pBluescript II KS+ da *Promega* como base. O vetor pBluescript II KS + tem aproximadamente 3,0 kb e possui o gene de resistência a ampicilina (marca de seleção), a origem de replicação do fago f1 e parte do gene *lacZ* da enzima β -galactosidase; ele possui ainda um sitio de múltiplas clonagens que foi utilizado para a clonagem dos diversos fragmentos durante a construção do vetor pT.

YEP351-PGK (Moraes *et al.*, 1995) - Para a seleção dos clones transformantes na linhagem MFL de *S. cerevisiae* foi feita uma co-transformação dos vetores derivados de pT (construídos nesse trabalho) com o vetor YEP351-PGK (Moraes *et al.*, 1995), que promove a produção de leucina (*LEU2*). O vetor possui a origem de replicação do círculo 2 µm de *S. cerevisiae*, parte da seqüência do vetor PUC18, o gene funcional de resistência à ampicilina (*Amp^r*) como marca de seleção para transformações bacterianas, o promotor PGK e um sítio de múltiplas clonagens.

PYC230 – Utilizado na co-transformação da linhagem JP1 a fim de promover a seleção dos clones pois ele confere a resistência ao antibiótico G418 (Hansen *et al.*, 2003). O vetor PYC230 possui aproximadamente 6,2 kb, e além do gene de resistência ao G418, possui o gene de resistência à ampicilina para transformações bacterianas, um sítio de múltiplas clonagens e a origem de replicação 2 µm.

4.7 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo de microrganismos foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos ou, quando indicado, em filtros 0,22 µm 25 mm estéril (*Millipore*).

4.7.1 Meios e soluções para cultivo de *Escherichia coli*

Meio Luria-Bertani (LB)

Peptona caseína	1,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2.

Para o meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico.

Meio SOB

Bacto triptona	2,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	0,0584 % (p/v)
KCl	0,0186 % (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2.

4.7.2 Meios e soluções para cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Meio YPD

Extrato de levedura	2,0 % (p/v)
Peptona de caseína	4,0 % (p/v)
Glicose	4,0 % (p/v)

O extrato de levedura e a peptona (meio 2YP) foram autoclavados separadamente da glicose. Depois misturados numa proporção de 1:1.

Para o meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico.

Meio YNB 1,34% (sem aminoácidos)

<i>Yeast Nitrogen Base Without Amin acids (Difco)</i>	3,4 % (p/v)
NH ₄ SO ₄	10 % (p/v)

* Esterilização por filtração (membrana 0,22 μ m).

Meio mínimo para *S. cerevisiae* (MM)

Tampão fosfato	100 mM, pH 5,0
YNB	0,67 % (p/v)
Glicose	2,0 % (p/v)

Para o meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar bacteriológico.

Meio mínimo amido

No meio mínimo líquido e sólido foi adicionado amido solúvel a uma concentração final de 0,5% (p/v). O amido foi solubilizado por aquecimento a 70 °C.

4.7.3 Soluções e tampões para técnicas de DNA recombinante

4.7.3.1 Extração de DNA plasmidial

Tampão TE

Trizma base (pH 8,0)	25 mM
EDTA	10 mM

Solução 2

NaOH	0,4 M
SDS	2,0 % (p/v)

Misturados antes do uso numa proporção de 1:1.

Solução 3

Acetato de potássio 5M	60 mL
Ácido acético glacial	11,5 mL
Água destilada	28,5 mL

Clorofane

Fenol hidratado (<i>USB</i>)	pH 8,0
Clorofórmio	

Misturados numa proporção de 1:1.

Solução estoque de ampicilina

Ampicilina	10 mg
Água destilada (q. s. p.)	100 mL

*Esterilização por filtração (membrana 0,22 μ m).

4.7.3.2 Análise de ácidos nucleicos em gel de agarose

Tampão Tris-Borato EDTA (TEB) 20X

Trizma base	1,78 M
Ácido bórico	1,78 M
EDTA	0,16 M

O pH foi ajustado para 8,4.

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 1X

Trizma base	40 mM
EDTA	1 mM

O pH foi ajustado para 8,5 com ácido acético.

Tampão de amostra para DNA 5X

TEB 20X	50,00% (v/v)
Glicerol	30,00% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
Xilenocianol	0,25% (p/v)

Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio	1,0 % (p/v)
-------------------	-------------

4.7.3.3 Extração de DNA de levedura

Tampão SE

Sorbitol	0,9 M
EDTA	100 mM

O pH foi ajustado para 7,5

Solução de liticase

Liticase (*Sigma*) 100 mg/mL em água.

Solução de Equilíbrio

Trizma base	100 mM
NaCl	100 mM

O pH foi ajustado para 8,5 com ácido clorídrico 2 M.

Solução TE₂₀

Trizma base	10 mM
EDTA	20 mM

O pH foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico 2 M.

4.7.3.4 Soluções e tampões para transformação de *S. cerevisiae*

a) Transformação rápida

Tampão TE 10X

Trizma base	100 mM
EDTA	10 mM

O pH foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico 2 M.

Tampão de transformação

PEG 4000	50,0% (p/v)
Acetato de lítio	2 M
DTT	1 M

Misturados no momento do uso numa proporção de 8:1:1 respectivamente

b) Transformação por eletroporação

Sorbitol 1M

Sorbitol	1 M
----------	-----

Mantido gelado a 4 °C

4.7.4 Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática (dosagem amilolítica)

Tampão acetato de sódio 0,5M (pH 5,5)

Acetato de Sódio	41 g
Água destilada (q. s. p.)	1 L

O pH foi ajustado para 5,5 com ácido acético glacial.

Ácido acético 1M

Ácido acético glacial	2,9 mL
Água destilada (q. s. p.)	50 mL

Reagente Fuwa

I ₂	1% (p/v) diluído em etanol 100%
KI	10% (p/v)
A solução de uso é I ₂ /KI/H ₂ O	1:1:3

Amido solúvel 0,5%

Cerca de 0,5 g de amido foi pesado e dissolvido em 80 mL de água destilada com aquecimento em bico de Bunsen e agitação contínua até a solução ficar transparente. O volume então foi completado para 100 mL e a solução foi armazenada a temperatura ambiente.

5. Métodos

5.1 Extração do DNA total de levedura (adaptado de Burke *et al.*, 2000)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem JP1 foi crescida até a saturação em 40 mL de meio YPD em um frasco de 250 mL. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente e ressuspensas em 3 mL de tampão SE. Em seguida foi adicionado 100 µL da solução de liticase (100 mg/mL), sendo essa suspensão de células incubada a 37 °C. Após 60 min de incubação, a suspensão foi centrifugada a 3.000 x g durante 5 min e as células ressuspensas em 3 mL de TE₂₀. A seguir foi adicionado 0,5 mL de SDS 10 % sendo agitado por inversão do tubo e incubado a 65 °C durante 30 min. Ao final do período de incubação foi adicionado 1,5 mL de acetato de potássio 5 M, e a suspensão incubada no gelo por 30 min. A seguir a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g a 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 5 mL de etanol 70 % e centrifugado a 10.000 x g por 5 min. Após secar foi ressuspensado em 200 µL de TE acrescido de 4 µL de RNase A a 10 mg/mL. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8 % e estocado a -4 °C.

5.2 Reação de cadeia de polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos TyEF (5' GCGAGCTCTGAGATATATGTGAGTAAT TAGATAATTG 3'), TyER (5' GCGGATCCGAATTCGATATCCTGCAGACTAGT TGTTGGAATAAAATCCACTATCGTCTATC 3'), TyDF (5' GCGTCGACAAGTG AGATATATGTGAGTAATTAGATAATTG 3'), TyDR (5' GCGGTACCTGTTGG AATAAAATCCACTATCG 3') foram utilizados para amplificação dos fragmentos TyD (assim convencionado por ocupar a porção direita do vetor pT - ver esquema na Figura 6.7A) e TyE (que por sua vez ocupa a porção esquerda de pT - Figura 6.7A). Os iniciadores foram ressuspensados em água MiliQ. As reações de PCR contendo 20 ng de DNA genômico de *S. cerevisiae* (JP1), 0,2 mM de dNTP, tampão da *Taq* DNA polimerase, MgCl₂ (testado em três diferentes concentrações - 1mM, 2 mM e 3 mM), 1U de *Taq* DNA polimerase (CENBIOT), 10 pmol de cada um dos iniciadores em um volume final de 50 µL, foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial (94 °C / 5 min), desnaturação (94 °C / 1 min), anelamento (testada em três diferentes

temperaturas – 50 °C, 55 °C e 60 °C / 1 min), extensão (72 °C / 30 seg), extensão final (72 °C / 5 min), por 30 ciclos de desnaturação / anelamento / extensão.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o uso dos *kits* descritos no item 4.4.

5.3 Análise dos ácidos nucléicos em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação do tamanho dos fragmentos de DNA, conforme descrito por Azevedo *et al.* (2003). A agarose foi preparada em tampão TAE 1X em concentração final de 0,8 ou 1 %.

5.4 Seqüenciamento e análise da seqüência do DNA

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (*Molecular Dynamics*). Era utilizado cerca de 100 ng de DNA, 5 pmoles dos primers apropriados e o kit “*DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing*”. Os DNAs utilizados no seqüenciamento eram quantificados por espectrofotometria utilizando o *GeneQuant RNA/DNA Calculator pro* (Biochrom). A qualidade das seqüências obtidas através do seqüenciamento automático era analisada, utilizando as ferramentas de bioinformática: Phred, Phrap, CAP3 disponíveis na página: www.unb.br/ib/cel/biomol. Depois da análise de qualidade, as seqüências eram submetidas ao programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para análise de identidade com seqüências já depositadas no GenBank do *Ncbi*.

5.5 Ligação dos fragmentos de DNA

Nos sistemas de ligação, as concentrações de DNA (razão molar vetor : inserto) variaram entre 1:3 e 1:5. O sistema foi incubado por pelo menos 14 h de acordo com a ligase utilizada, a uma temperatura de 4 °C. A quantidade de T4 DNA ligase para cada sistema de ligação foi feita de acordo com as recomendações de cada fabricante.

5.6 Defosforilação dos vetores para ligações não direcionadas

Para sistemas de ligação de fragmentos de DNA não direcionados (apenas um

sítio de restrição) foi necessário defosforilar as extremidades do vetor linearizado. A defosforilação foi realizada com até 150 η g de vetor linearizado tratados com 1 U da enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP – *Boehringer Mannheim*) a 37 °C por 10 minutos, seguidos de incubação a 65 °C por 15 min para inativar sua atividade; ou com 1 U da enzima fosfatase Antártica (*New England – Biolabs*).

5.7 Transformação de bactéria

O preparo de células de *E. coli* competentes pelo método de choque térmico foi realizado como descrito por Sambrook *et al.*, 2001 (com modificações). As células da linhagem de *E. coli* foram inoculadas em 10 mL de meio SOB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida 1mL do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio SOB pré-aquecido a uma temperatura de 37 °C, sendo a cultura de células novamente incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 0.45 a 0.55. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.000 x g durante 10 min a 4° C. As células foram ressuspensas em 10 mL de RbCl₂ a 100 mM e submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores e novamente ressuspensas em 10 mL de RbCl₂ a 10 mM e 15 % de glicerol. Alíquotas de 50 ou 100 μ L foram preparadas e estocadas a –80 °C.

Para transformação, o sistema de ligação foi adicionado a uma alíquota de células competentes (até 10% do volume de células) adicionado e incubados no gelo por 30 minutos. O sistema de transformação foi submetido ao choque térmico de 42 °C durante 90 seg. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio LB e as células foram incubadas por 1 hora a 37°C. Um volume de 50 a 200 μ L de células foi semeado em placas de Petri com meio LB-Ágar mais ampicilina (100 μ g/mL), e 2 % de X-gal e 10 mM de IPTG quando necessário.

5.8 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep) (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

Uma colônia de bactéria foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado (100 μ g/mL de ampicilina) e cultivada a 37 °C por 16 horas. Estas células foram coletadas através de centrifugação a 12000 x g por 2 min a 4 °C,

descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de solução I, e em seguida adicionou-se 360 μ L de solução II recém preparada. A amostra foi homogeneizada, com cuidado, por inversão rápida do tubo. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 300 μ L de solução III gelada ao lisado, procedendo-se nova homogeneização por inversão do tubo. A amostra foi então incubada no gelo por 5 min e centrifugada a 12000 \times g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 750 μ L de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova centrifugação a 12000 \times g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 200 μ L de solução TE. Foi adicionado 100 μ L de clorofane. Após forte agitação por 1 min, o sistema foi centrifugado a 6000 g por 3 min. A fase aquosa foi recuperada em um tubo limpo, onde foi adicionado 750 μ L de etanol 100 % gelado e 0,3 M de acetato de sódio e incubado no gelo por 30 min. A mistura foi centrifugada a 12000 \times g por 5 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado (sem ressuspender) com 1 mL de etanol 70 % gelado. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuspenso em 50 μ L de TE com RNase A a uma concentração de 0,1 μ g/mL. O DNA plasmidial foi estocado a -20 °C até o uso.

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

O procedimento foi o mesmo do descrito para a preparação de plasmídios em pequena escala. Apenas os volumes das soluções utilizadas foram ajustadas ao volume de cultura de 50 mL. A análise e a estocagem do material, também seguiram os procedimentos da mini-preparação.

5.10 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas conforme instruções dos fabricantes das enzimas de restrição. O tempo de incubação, os tampões, as temperaturas de reação, as concentrações de DNA e enzima variavam de acordo com o material a ser digerido e a eficácia da enzima. Geralmente foram utilizadas 10 U de enzima para cada 5 μ g de DNA, incubados a 37 °C por 3 h. Teve-se o cuidado de se observar se o volume da

enzima não ultrapassava 10 % do volume final da reação, com a finalidade de evitar a degradação inespecífica do DNA pela enzima, causada pelo excesso de glicerol.

5.11 Precipitação de DNA

Para precipitação do DNA foi adicionado 0,3 M de NaCl no sistema. Após homogeneização, foi adicionado o equivalente a 2,5 x o volume do sistema de etanol 100 %. A mistura foi incubada a 4 °C durante a noite. Realizou-se então uma centrifugação a 12000 x g por 30 min a 4 °C. O precipitado foi lavado (sem ressuspender) com 1 mL de etanol a uma concentração de 70 % gelado e novamente centrifugado a 4 °C por 30 min. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuspensão em 20 µL de H₂O.

5.12 Purificação e eluição de fragmentos de DNA em gel de agarose

Após digestão dos plasmídios com as enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos de DNA contendo as seqüências de interesse foram aplicados em gel de agarose e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA de interesse foram recortados do gel, pesados e purificados utilizando-se o *kit QIAquick Gel Extraction*, conforme as especificações do fabricante.

5.13 Transformação rápida de levedura em fase estacionária

A introdução de plasmídios em leveduras foi realizada utilizando o protocolo descrito por Chen *et al.* (1992). As células da levedura *S. cerevisiae* foram crescidas a 30 °C sob a agitação de 240 rpm. Após atingir a fase estacionária, aproximadamente 18 horas de crescimento, 200 µL da cultura de células foram coletadas e centrifugados a 10.000 x g durante 10 segundos. O sedimento foi ressuspensionado em tampão de transformação ao qual foram adicionados de 50 a 100 ng de DNA plasmidial para um volume final de 100 µL. As células foram incubadas a 45 °C durante 1 h e lavadas com 1 mL de sorbitol a 1 M. A suspensão de células foi centrifugada a 10.000 x g por 1 min, retirou-se 700 µL da fase líquida e o restante das células foi homogeneizado e semeado em MM (100 µL da suspensão de células por placa de Petri pequena). As

placas foram incubadas na estufa a 30 °C durante no mínimo 48 h.

5.14 Teste de tolerância ao antibiótico

A concentração do antibiótico G418 nas placas contendo meio YPD para seleção dos clones recombinantes foi determinada por um teste de tolerância ao antibiótico, neste teste a linhagem JP1 em diferentes concentrações celulares (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8) foi submetida a diferentes concentrações do antibiótico (50 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL). A determinação das concentrações celulares foi feita por meio de contagem das células em microscópio óptico.

5.15 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* por eletroporação

Uma colônia de *S. cerevisiae* (JP1 ou MFL) foi pré-inoculada em 5 mL de YPD e crescida durante a noite. Retirou-se 1 mL do pré-inóculo para inocular 100 mL de meio YPD, que foi crescido durante aproximadamente 16 h até que atingisse uma OD_{600} de 1,3 a 1,5. as células foram então centrifugadas a 1500 x g durante 5 min a uma temperatura de 4 °C e ressuspensas em 100 mL de água estéril gelada. Foram feitas mais uma lavagem com 100 mL de água gelada estéril e outra com 50 mL para retirar todos os resíduos de meio. Após uma nova centrifugação, a células foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1 M estéril gelado. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas dessa vez em 250-500 µL de sorbitol 1 M para um volume final de aproximadamente 800 µL de células competentes. Retirou-se então 200 µL de suspensão de células para cada sistema de transformação que foram misturadas com 1 a 5 ng do DNA linearizado (este, por sua vez, dissolvido em 5 a 10 µL de água acrescido do RNA carreador) e transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm. O sistema foi incubado no gelo por 5 min. A seguir adicionou-se 320 µL de sorbitol 1 M gelado e realizou-se a eletroporação com os seguintes parâmetros: 1500 V, 25 µF e 400 Ω. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 680 µL de sorbitol gelado estéril à cubeta e o seu conteúdo foi recuperado e transferido para um tubo estéril. O tubo foi então centrifugado a 10.000 x g a temperatura ambiente durante 10 segundos, retirou-se 700 µL da solução e foi feita a ressuspensão das células na solução restante. Essa suspensão foi plaqueada em 3 placas de meio seletivo com 100 µL de suspensão de células por placa . As placas

foram incubadas em estufa a 30 °C até que as colônias aparecessem (aproximadamente 48 h).

5.16 Seleção de clones recombinantes

A seleção de colônias transformantes em MFL foi feita em meio mínimo (YNB) contendo glicose e tamponado com solução de fosfato (pH 6,0). Para a linhagem JP1, a seleção dos transformantes foi realizada em meio YPD acrescido com o antibiótico G418 numa concentração de 100 µg/mL.

As colônias que cresciam nos meios seletivos eram transferidas para placas contendo amido 0,5 % para detecção de atividade amilolítica em placa. As placas foram incubadas na estufa a 30 °C durante no mínimo 48 horas. As placas foram invertidas e coradas com vapor de iodo e os possíveis clones positivos foram selecionados de acordo com a formação do halo de hidrólise não corado. Como controle negativo da expressão enzimática, células de *S. cerevisiae* foram transformadas com o vetor pT (vetor integrativo sem os cassetes de expressão de amilases).

5.17 Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada por meio de um método que utiliza amido como substrato. Este método é denominado de atividade dextrinizante e baseia-se na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (Fuwa, 1954). Nele, as células de *S. cerevisiae* crescidas em YPD eram centrifugadas e o sobrenadante era separado. Aproximadamente 60 µL desse sobrenadante era adicionado a 40 µL de tampão acetato 0,5 M, pH 6,0 e 100 µL de amido solúvel 0,5 % em tubo de ensaio que era, em seguida, incubados a 42 °C durante 30 min. Ao final dos 30 min, adicionou-se 200 µL de ácido acético 1 M, 9,4 mL (ou 5,4 mL) de água e 200 µL de solução de “iodo Fuwa”. O tubo de ensaio foi agitado vigorosamente e a absorbância foi lida a 660 nm.

5.18 Análise de crescimento celular

Clones transformantes de *S. cerevisiae* foram pré-inoculados em 10 mL de meio YPD e incubado a 30°C em incubadora sob agitação constante de 240 rpm durante 24 h. Desse pré-inóculo foi feito um inóculo em 50 mL de meio YPD ou MM em *erlemeyers* de 300 mL de modo que a OD₆₀₀ inicial fosse de 0,3 (fase lag).

Essa cultura foi incubada a 30 °C em incubadora sob agitação constante de 240 rpm até que atingissem a fase estacionária. Em intervalos de 2 horas a partir do momento do inóculo (cultura em fase lag), 2 mL de cada cultura foram retirados para análise do perfil de degradação do amido com o uso do método de Fuwa (1954) e crescimento celular pela leitura através da OD₆₀₀.

5.19 Teste de estabilidade mitótica

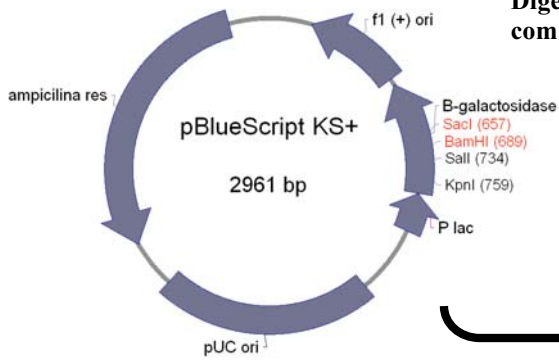
Para o teste de estabilidade mitótica, 1 colônia de cada clone positivo foi inoculada em 5 mL de meio YPD e deixada sob agitação de 240 rpm a uma temperatura de 30 °C durante a noite. Foi retirado 1 mL da cultura para inocular 10 mL de meio YPD que foi deixado nas mesmas condições do inóculo anterior durante a noite. Mais uma vez, retirou-se 1 mL da nova cultura que foi inoculado em mais 10 mL de meio YPD que foi deixada durante a noite a 30 °C sob agitação de 240 rpm. As células resultantes desse último inóculo foram inoculadas em meio YPD agar numa concentração de aproximadamente 10⁸ células, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 48 h. As colônias crescidas foram transferidas para placas com MM com amido 0,5 % acrescido de leucina a uma concentração de 100 µg/mL e para um espelho de MM com amido para a linhagem MFL; e em YPD acrescido de G418 a uma concentração de 100 µg/mL e um espelho em MM com amido para a linhagem JP1.

6. Resultados

A maioria dos vetores de expressão heteróloga utilizados para leveduras contém seqüências bacterianas que causam problemas quando da utilização comercial das linhagens transformantes. Uma estratégia para evitar a disseminação dessas seqüências contendo genes de resistência a antibióticos é a eliminação das mesmas dos vetores, flanqueando os cassetes de expressão com fragmentos de DNA de levedura. O vetor bacteriano seria usado somente para amplificação.

As seqüências Ty δ estão presentes no genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em alto número de cópias, cerca de 400 cópias por genoma haplóide. Neste trabalho decidiu-se usar estas seqüências como alvo de integração em múltiplas cópias. Para tanto foi construído um vetor base, denominado de pT (Figura 4), onde os cassetes de expressão clonados, tanto para α -amilase de *Bacillus subtilis* quanto para a glicoamilase de *Aspergillus awamori*, estariam flanqueados pelas seqüências Ty δ . Os plasmídios então seriam linearizados com uma enzima interna das seqüências delta e estes fragmentos, que não conteriam nenhuma seqüência bacteriana, seriam usados para a transformação de linhagens de *S. cerevisiae*.

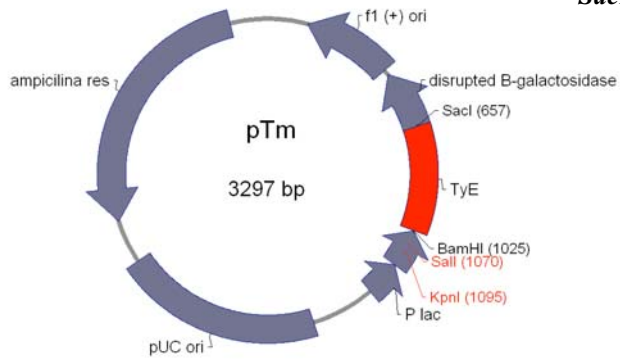
Digestão do vetor pBlueScript KS+ com *SacI* e *BamHI*



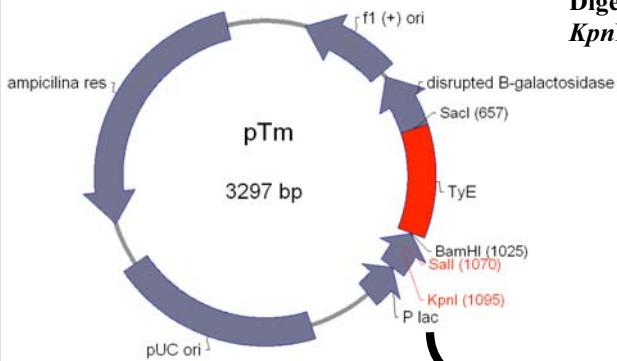
+



Ligação do fragmento TyE no vetor pBlueScript KS+ nos sítios de *SacI* e *BamHI*



Digestão do vetor pTm com *Sall* e *KpnI*



+



Ligação do fragmento TyD no vetor pTm nos sítios de *Sall* e *KpnI*

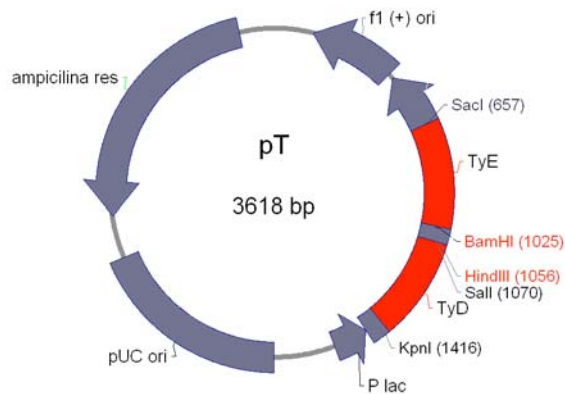


Figura 4: Esquema descrevendo a construção do vetor pT.

6.1 Desenho dos iniciadores para amplificação das seqüências Ty δ

Para o desenho dos iniciadores que seriam utilizados na amplificação das seqüências Ty δ de *Saccharomyces cerevisiae*, foi feita previamente uma análise detalhada das seqüências de todos os elementos que iriam compor os vetores finais (Ty δ , promotores PGK e ADHI, gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* e cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori*. Essa análise fez-se necessária para que a estratégia de montagem dos vetores fosse traçada.

O resultado dessa estratégia foi o desenho de iniciadores que continham não somente a seqüência para amplificação do Ty δ , mas as seqüências dos sítios de clivagem de diversas enzimas de restrição (múltiplo sítio de clonagem), que facilitariam as clonagens posteriores. Dois pares de iniciadores foram desenhados e estão representadas na Figura 5.

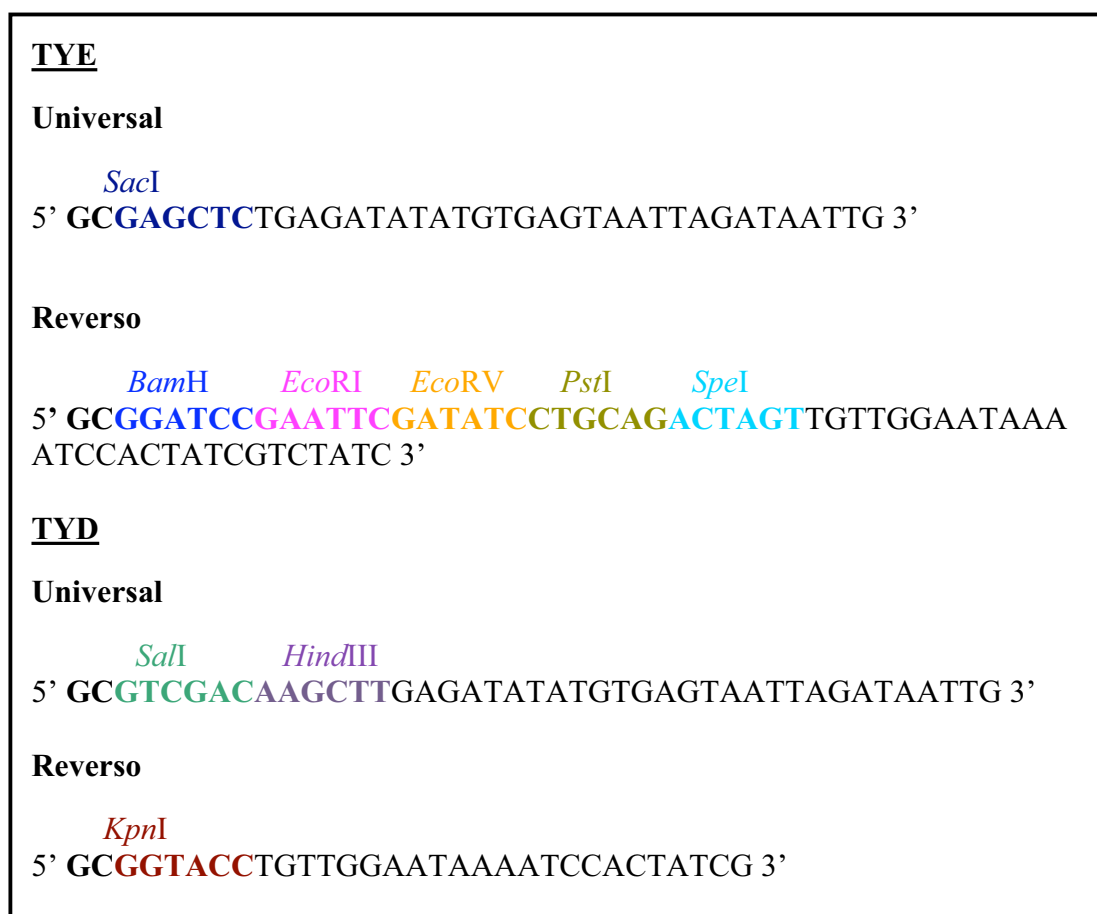


Figura 5: Seqüências dos iniciadores para amplificação das seqüências delta TyE e TyD.

6.2 Amplificação dos fragmentos TyD e TyE por PCR

Os pares de iniciadores (universal e reverso) e o DNA cromossomal da linhagem JP1 de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizados para a amplificação por PCR dos fragmentos TyD e TyE que iriam flanquear o vetor pT. A análise em gel de agarose, mostrou uma banda de aproximadamente 300 pb tanto para TyD (Figura 6A) quanto para TyE (Figura 6B), correspondente ao tamanho da porção δ do transposon Ty1 de *S. cerevisiae* (Figura 6C). A figura 6, mostra as melhores condições de amplificação dos fragmentos TyD e TyE com a utilização dos iniciadores desenhados, para ambos os pares de iniciadores, a melhor amplificação foi obtida utilizando concentrações de 3 mM de MgCl₂ a 50°C.

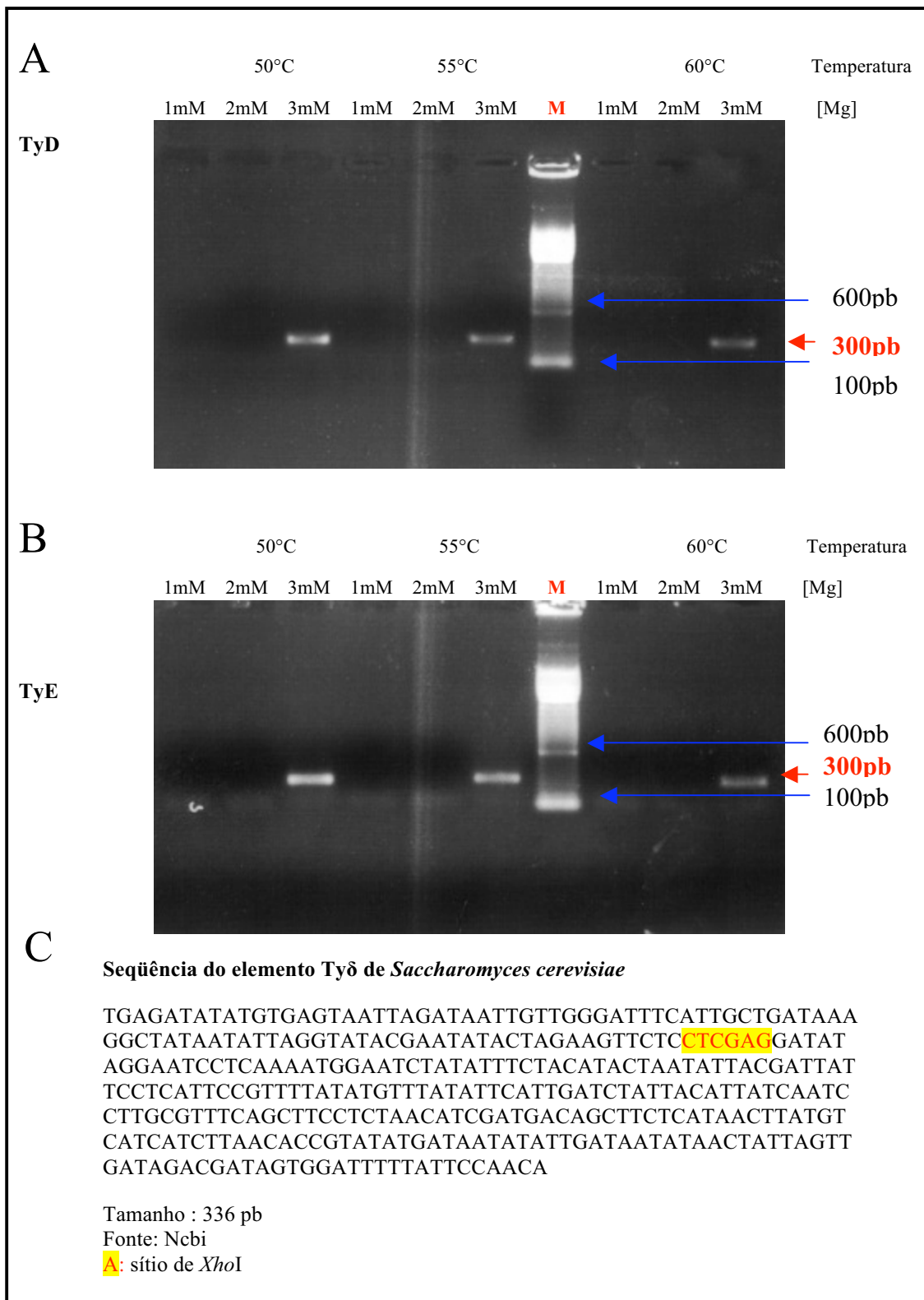
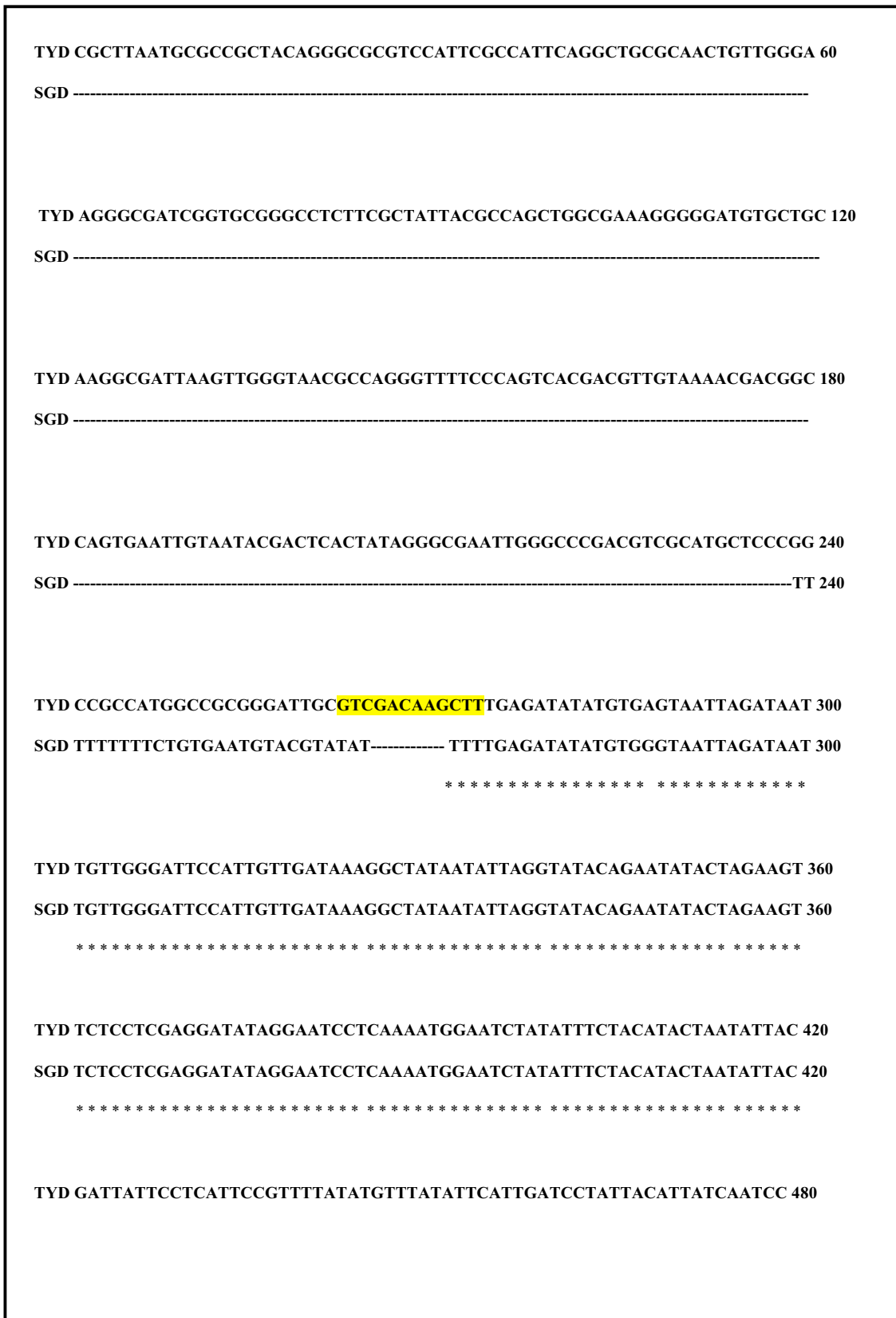


Figura 6: Amplificação dos fragmentos TyD e TyE - análise eletroforética em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando os pares de iniciadores TYDF, TYDR (A) e TYEF e TYER(B). M – marcador 100 pb ladder da Invitrogen (Anexo 1). Em

C, a seqüência da região δ do transposon Ty de *S. cerevisiae* de acordo com os dados do Ncbi (*National Center for Biotechnology Information*).

Foi feito o seqüenciamento dos fragmentos TyD e TyE e o alinhamento com a seqüência do Ty δ contida nos bancos de dados do Ncbi (*National Center for Biotechnology Information*). A identidade das seqüências foi de 100% (Figura 7).



SGD GATTATTCCTCATTCCGTTTTATATGTTTATATTCATTGATCCTATTACATTATCAATCC 480

TYD TTGCGTTTCAGCTTCCTCTAACATCGATGACAGCTTCTCATAACTTATGTCATCATCTTA 540

SGD TTGCGTTTCAGCTTCCTCTAACATCGATGACAGCTTCTCATAACTTATGTCATCATCTTA 540

TYD ACACCGTATATGATAATATATTGATAATATAACTATTAGTTGATAGACGATAGTGGATT 600

SGD ACACCGTATATGATAATATATTGATAATATAACTATTAGTTGATAGACGATAGTGGATT 600

TYD TTATTCCAACA**GGTACC**GCAATCACTAGTGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGA 660

SGD TTATTCCAACA----TACC-----ACCCATAATGTAATAG -----

***** ****

TYD GCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAG -----720

SGD -----720

Figura 7: Alinhamento da seqüência do TyD amplificado por PCR com a seqüência de Tyδ do banco de dados do *Ncbi* – a identidade das bases entre as duas seqüências foi de 100%; as regiões destacadas em amarelo são os sítios de clivagem inseridos nos desenhos dos iniciadores, os asteriscos representam as bases idênticas entre as duas seqüências.

6.3 Construção do vetor pTm

O produto de ambas as amplificações por PCR (TyD e TyE) foi ligado no vetor de clonagem pGEM-T[®] *Easy* da Promega (separadamente). Após transformação bacteriana, os clones transformantes foram submetidos a procedimentos para extração de DNA plasmidial que foi caracterizado através de digestão com enzimas de restrição apropriadas (Figura 8).

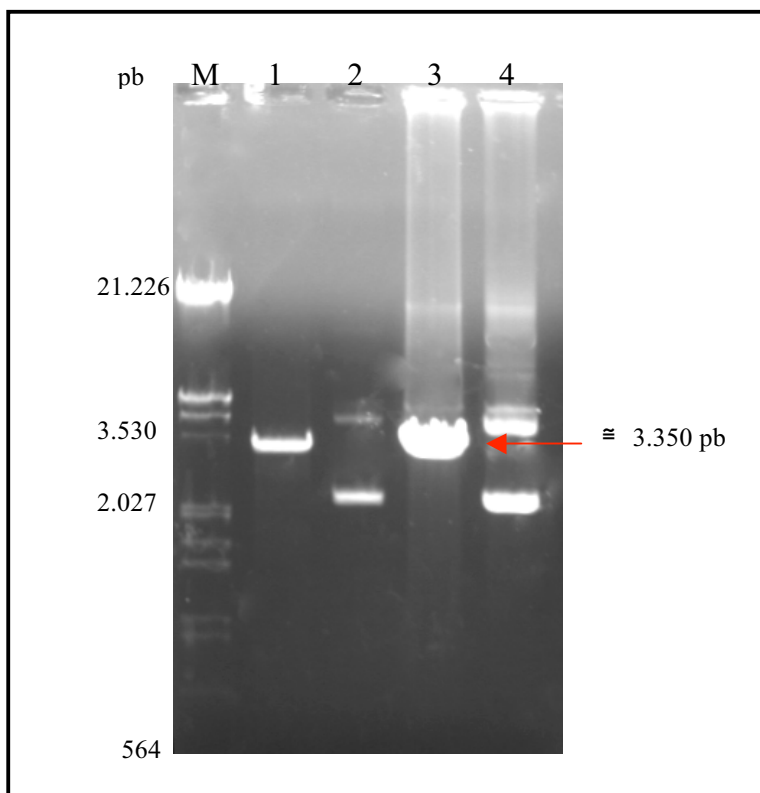


Figura 8: Digestão do vetor pGEMT-TyD e pGEMT-TyE com a enzima de restrição *XhoI* - Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % - no poço 1 a digestão do vetor pGEMT-TyD, em 2 o vetor intacto, no poço 3 a digestão do vetor pGEMT-TyE e em 4 o vetor intacto. M - marcador DNA do fago λ digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*

O vetor pBlueScript II KS+ foi escolhido como base para as construções para montagem do vetor pT. Este vetor apresenta um amplo repertório de sítios de clonagem que facilitaram as etapas a seguir.

Para obtenção dos fragmentos que seriam subclonados no vetor pBlueScript KS+, o vetor resultante da ligação pGEMT-TyD foi digerido com a enzima de restrição *KpnI*; o produto da digestão foi precipitado e digerido com a enzima *SalI*. O vetor pGEMT-TyE foi duplamente digerido com as enzimas *SacI* e *BamHI*. Os fragmentos de mais ou menos 300 pb resultantes das digestões foram extraídos do gel e purificados.

O vetor pBlueScript II KS+ foi linearizado com as enzimas *SacI* e *BamHI*, e após purificação foi ligado ao fragmento TyE, gerando o vetor que foi denominado

pTm. Posteriormente aos procedimentos de transformação em *E. coli* e extração de DNA plasmidial foram realizadas análises de restrição que comprovaram a presença do inserto no vetor e a integridade do mesmo (Figura 9).

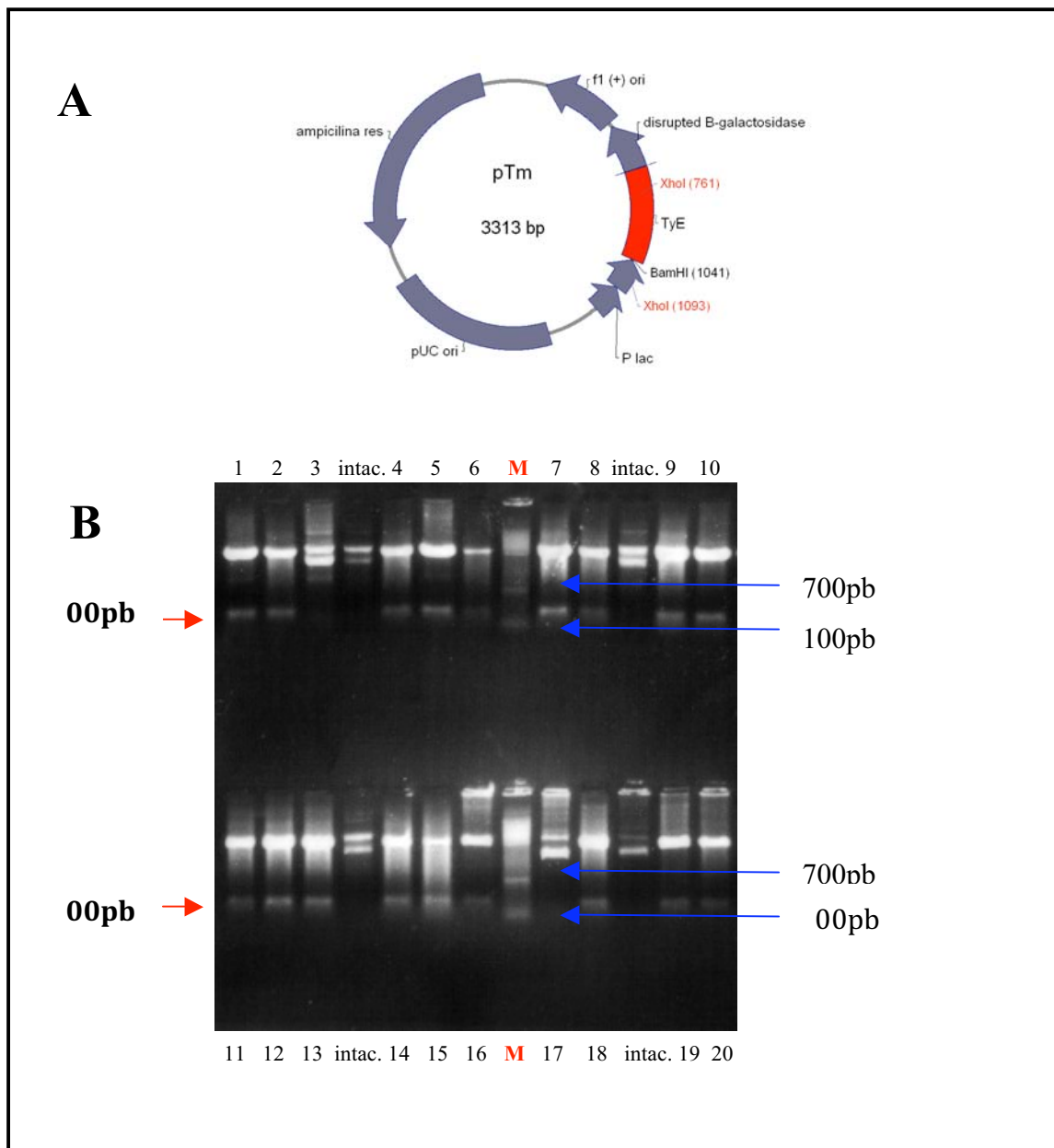


Figura 9: Análise de restrição de pTm com a enzima XhoI. (A) Mapa esquemático do vetor pTm; (B) Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos clones 1 a 20 digeridos com a enzima XhoI, M - Marcador 100 pb ladder da Invitrogen.

Os clones que apresentassem o inserto deveriam liberar uma banda de aproximadamente 300 pb na digestão com a enzima XhoI, pois havia um sítio de

restrição da enzima dentro da seqüência do TyD e outro no próprio pBlueScript II KS+ (Figura 9A). Vários clones foram obtidos com esse perfil, um deles foi escolhido aleatoriamente para os próximos passos da construção do vetor pT.

6.4 Construção do vetor pT

O vetor pTm foi linearizado com as enzimas de restrição *KpnI* e *SaII* e ligado ao fragmento TyD (resultante da digestão do pGEMT-TyD com as mesmas enzimas). O vetor resultante dessa ligação foi denominado pT, células bacterianas foram transformadas com o sistema de ligação e foi realizada a extração plasmidial de alguns clones. A confirmação da integridade do vetor foi realizada com o uso da técnica de PCR na qual foi utilizado os iniciadores universal e reverso do vetor pBlueScript II KS+ e o DNA plasmidial dos clones transformantes (Figura 10). Esta técnica foi utilizada porque a análise de restrição foi dificultada devido ao fato de que o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão por diversas enzimas não seriam confirmatórios quanto à presença ou não da segunda cópia da seqüência delta (fragmento TyD).

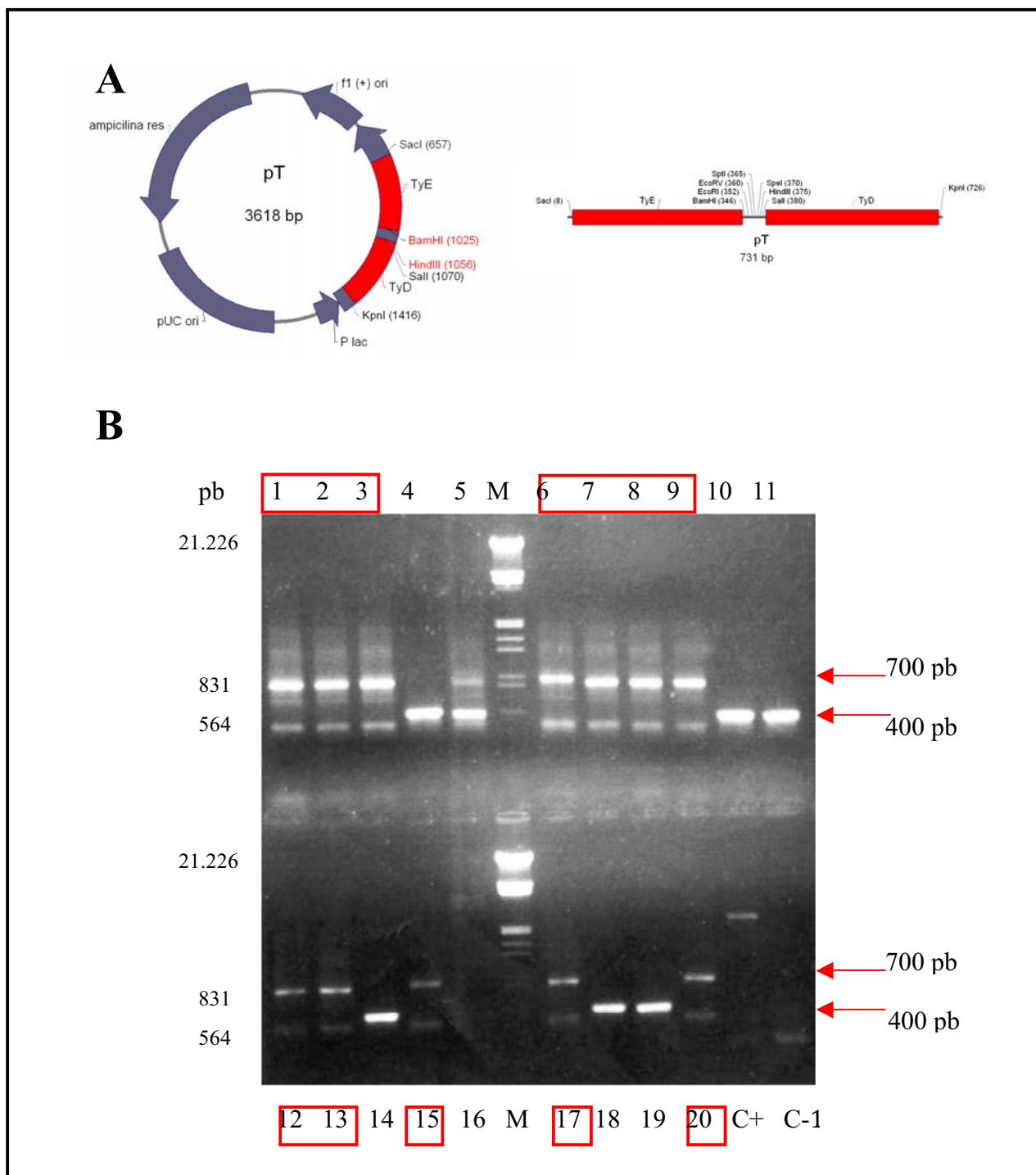


Figura 10: Confirmação da integridade do vetor pT – (A) Desenho esquemático do vetor pT. (B) Análise em gel de agarose 0,8 % dos produtos do PCR utilizando os iniciadores universal e reverso do vetor pBlueScript II KS + e o DNA plasmidial dos clones transformantes. M - marcador DNA do fago λ digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Em destaque os clones positivos que apresentavam uma banda de

1
1

aproximadamente 700 pb, indicando a presença das duas cópias da seqüência delta (aproximadamente 400 pb do vetor mais TyE + aproximadamente 300 pb do TyD).

6.5 Inserção dos cassetes da α -amilase e glicoamilase no vetor pT

A estratégia de construção dos vetores contendo os cassetes de expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis* e da glicoamilase de *Aspergillus awamori* estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13.

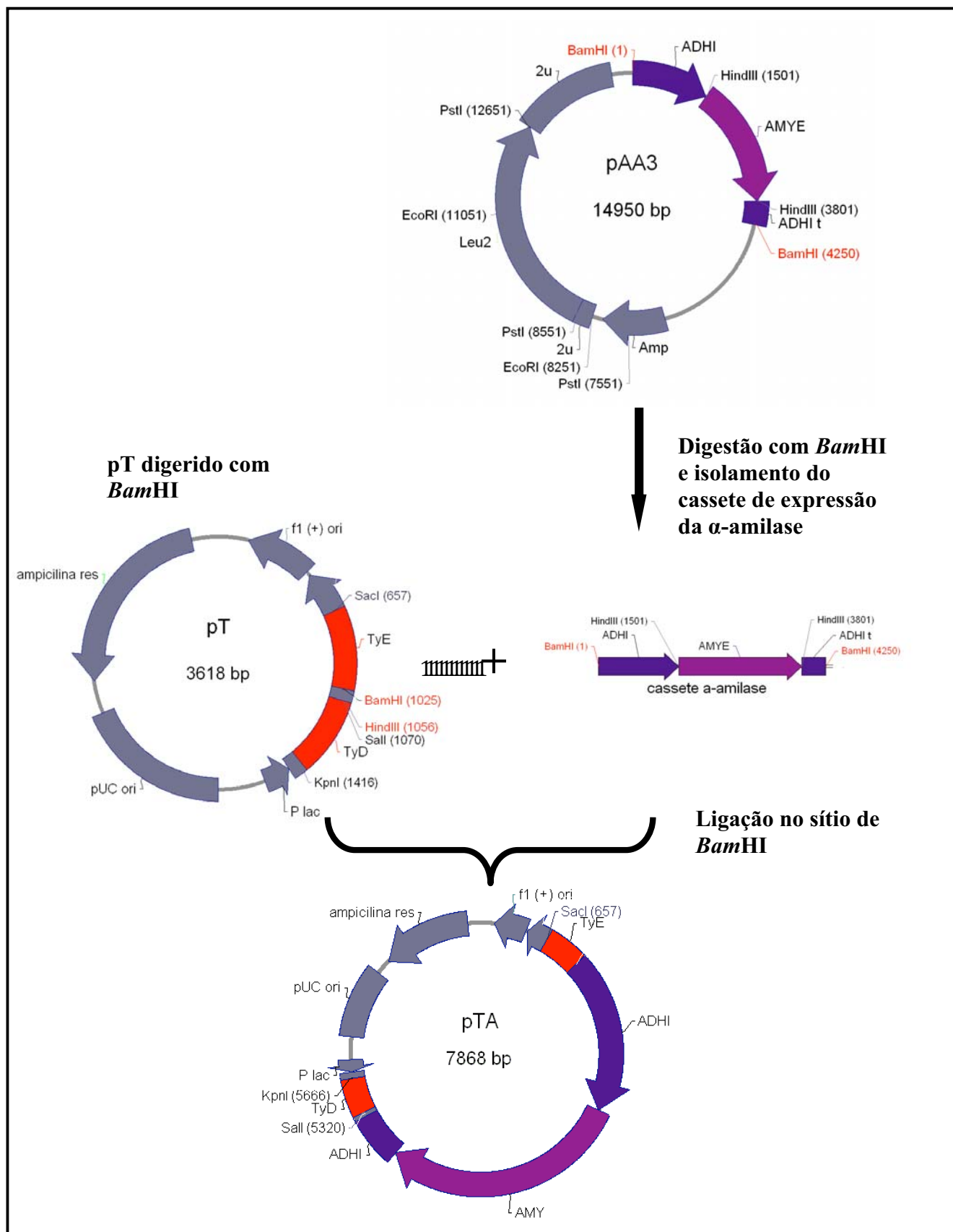


Figura 11: Esquema descrevendo a construção do vetor pTA, contendo o cassete de expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis*.

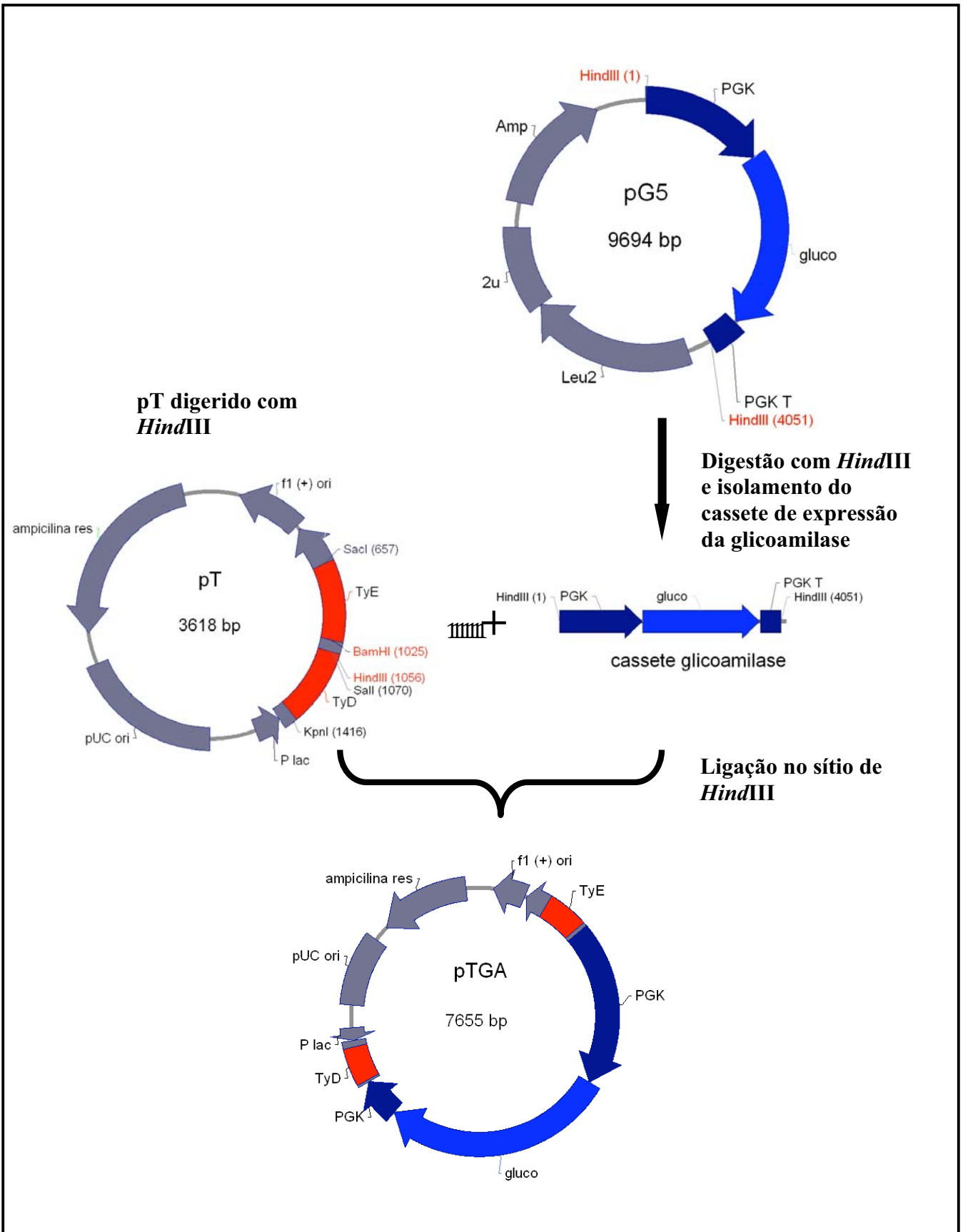


Figura 12: Esquema descrevendo a construção do vetor pTGA, contendo o cassete de expressão da glicocamilase de *Aspergillus awamori*.

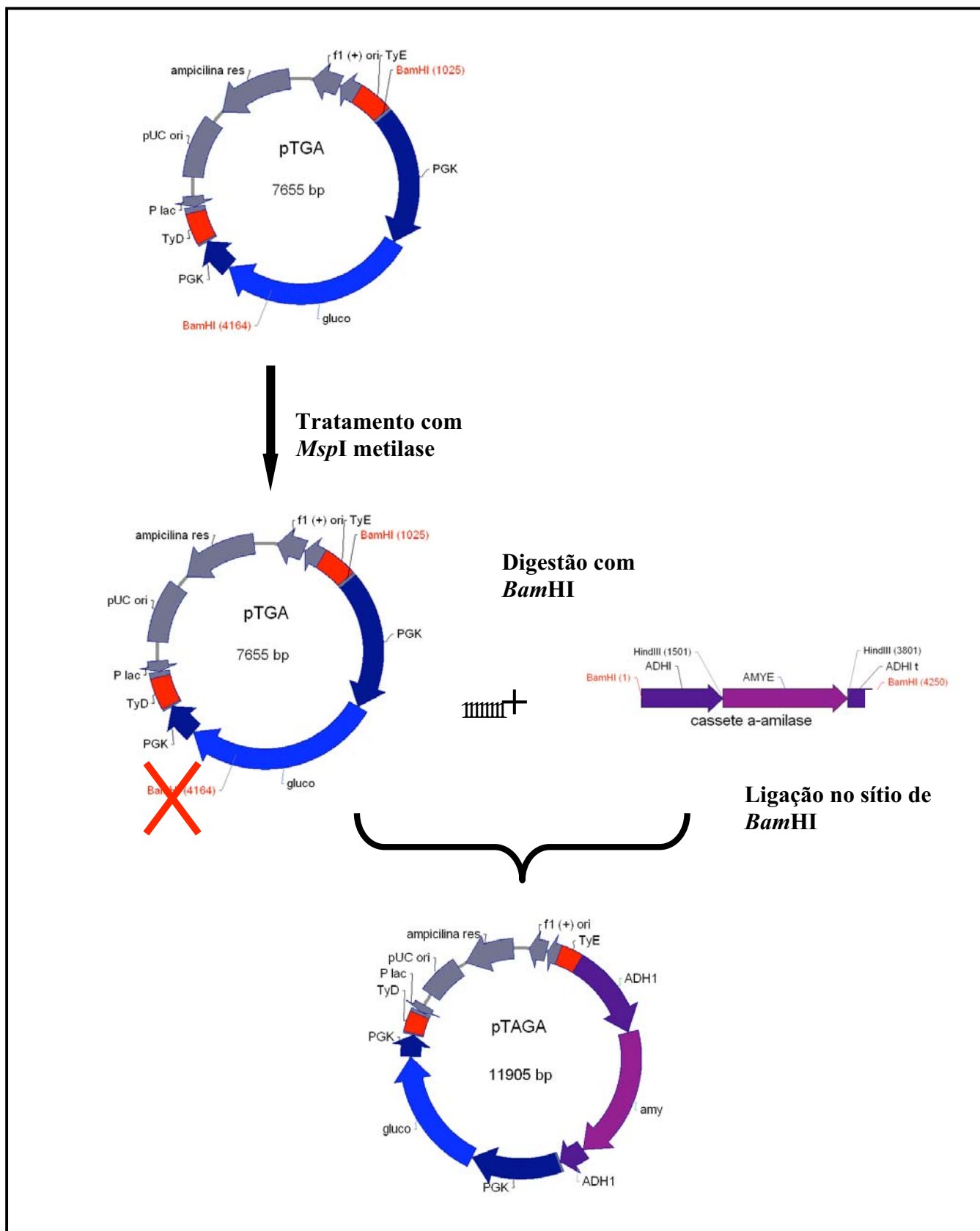


Figura 13: Estratégia de construção do vetor pTAGA.

O cassete de expressão de α -amilase de *Bacillus subtilis* contendo o promotor ADH1 foi clivado do vetor pAA3 (Moraes *et al.*, 1995) utilizando a enzima de restrição *Bam*HI, e ligado ao vetor pT linearizado com o a mesma enzima e defosforilado. A seguir foi feita a transformação de células de *E. coli*, extração de DNA plasmidial e análise de restrição. A digestão com a enzima *Hind*III, confirmou não só a presença do inserto quanto a orientação do mesmo dentro do vetor pT (Figura 14). O vetor pT ligado ao cassete de α -amilase recebeu o nome de pTA.

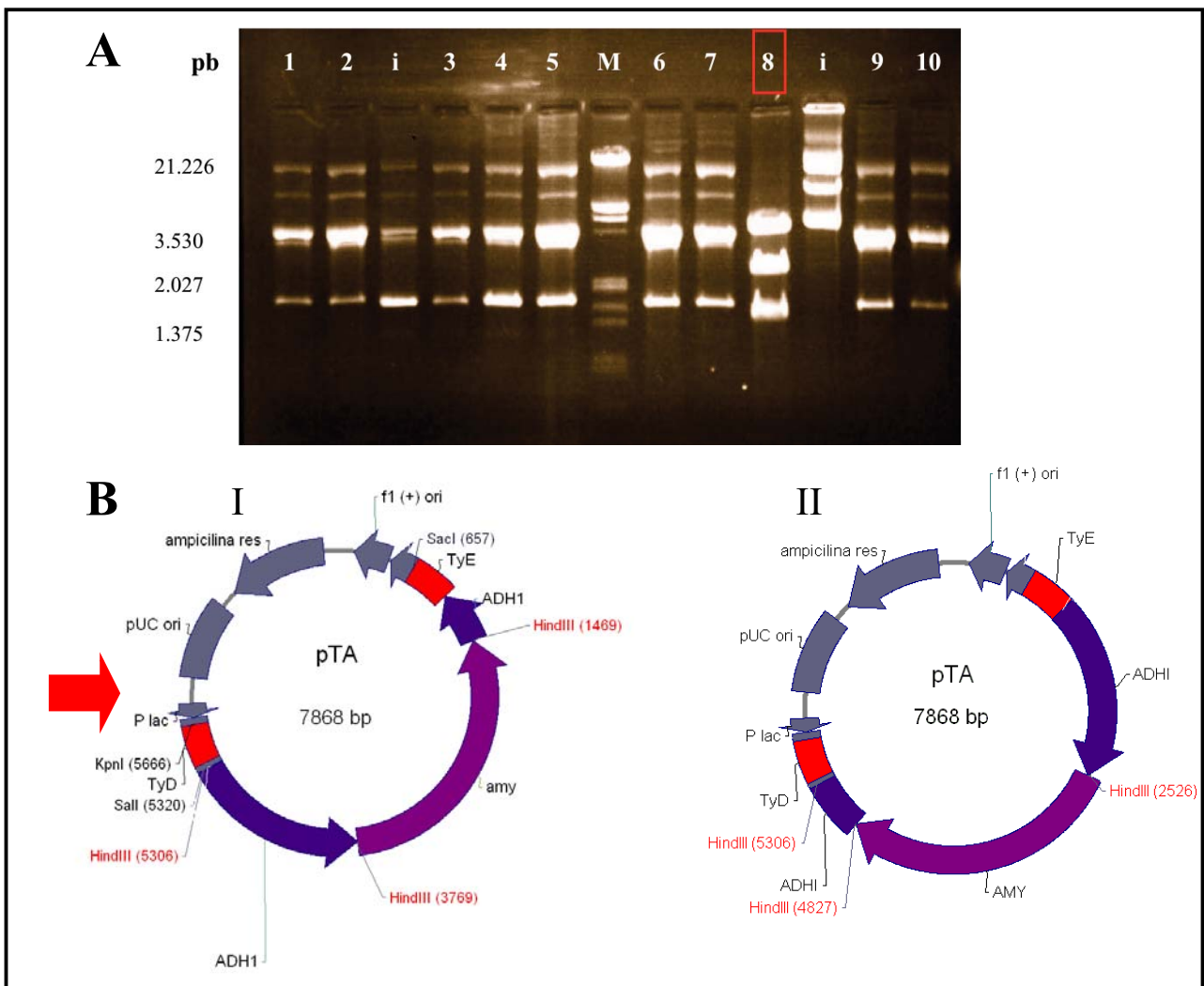


Figura 14: Digestão do vetor pTA com a enzima *Hind*III – (A) Os clones 1 a 10 foram digeridos com a enzima *Hind*III. M – marcador DNA do fago λ digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III. i – intacto (B) As duas orientações possíveis para a ligação não direcionada do cassete de expressão da α -amilase no vetor pT. O clone 8 apresentou as três bandas correspondentes à orientação representada em BI (\approx 2.300 pb; \approx 1.530 pb; \approx 4.000 pb).

Para a ligação do cassete de expressão da glicoamilase de *Aspergillus awamori* sob o controle do promotor PGK1 foi utilizado o vetor pG5 (Moraes *et al.*, 1995). O vetor pG5 foi digerido com a enzima *Hind*III e o fragmento de 3,5 kb resultante foi clonado no vetor pT digerido com a mesma enzima e defosforilado para evitar a religação do vetor. Foram realizados os procedimentos de ligação, transformação bacteriana e extração de plasmídios. A confirmação da clonagem e a determinação da orientação foi realizada em uma única etapa com a utilização da enzima de restrição *Bam*HI (Figura 15). O vetor pT com o cassete da glicoamilase foi denominado pTGA.

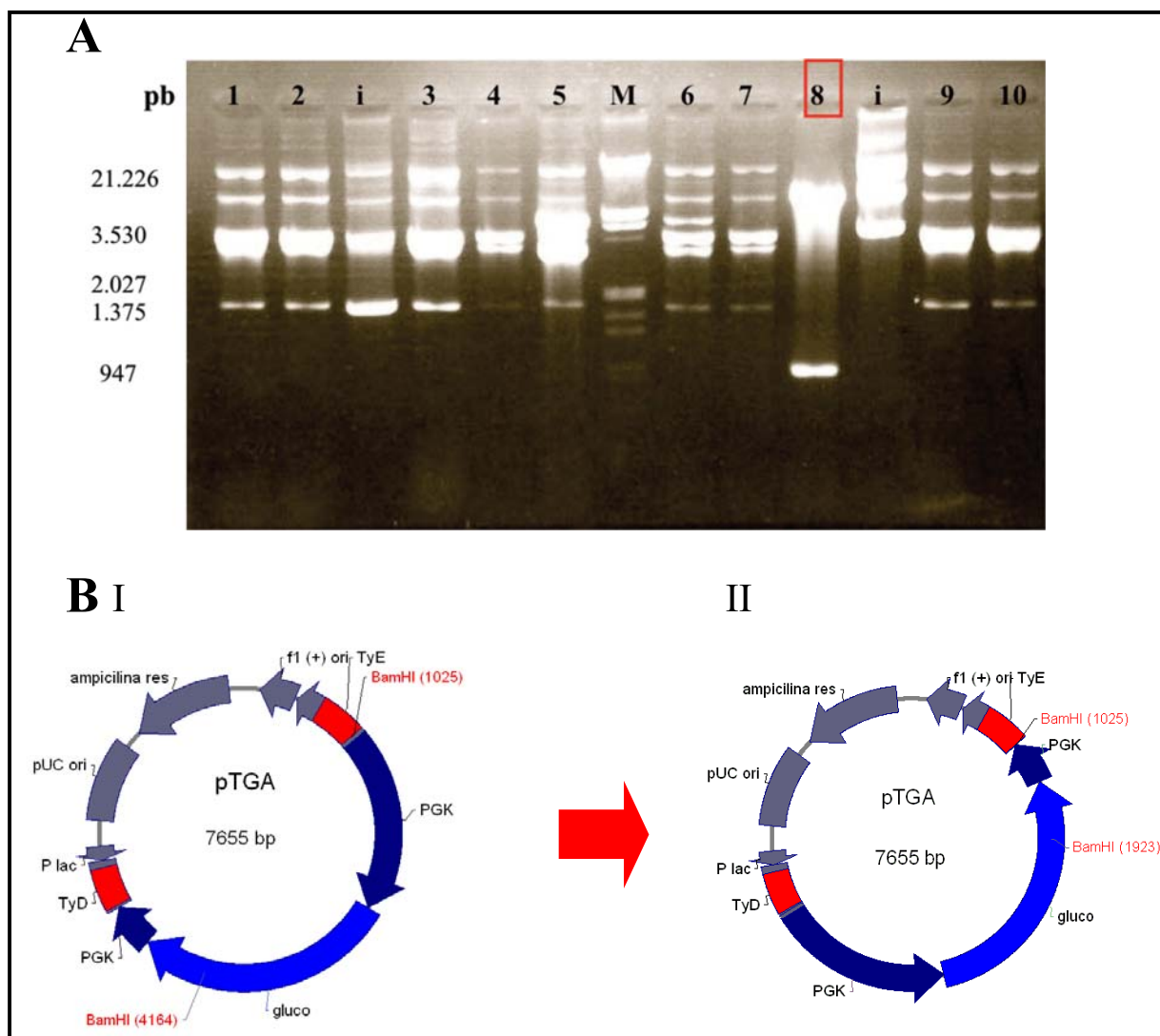


Figura 15: Digestão do vetor pTGA com a enzima *Bam*HI – (A) Os clones 1 a 10 foram digeridos com a enzima *Bam*HI. M – marcador DNA do fago λ digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III. i - intacto (B) As duas orientações possíveis para a ligação não direcionada do cassete de expressão da glicoamilase no vetor pT. O clone 8 apresentou as duas bandas correspondentes à direção representada em BII (\approx 900 pb e \approx 6.750 pb).

Uma terceira construção foi realizada para que fosse obtido um vetor que contivesse ambos os cassetes de expressão da α -amilase e glicoamilase (Figura 6.10). Para tanto foi decidido clonar o cassete de expressão da α -amilase no sítio de restrição para a enzima *Bam*HI, no vetor pTGA, que já continha o cassete da glicoamilase. No entanto, o cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* contém um sítio de *Bam*HI próximo a extremidade 3', dentro da região codante. Para permitir a clonagem do fragmento contendo o cassete de expressão da α -amilase, o vetor pTGA foi previamente tratado com a enzima *Msp*I metilase, que bloquearia o sítio de *Bam*HI do cDNA da glicoamilase com a inserção de um grupo metil sobre a seqüência reconhecida pela enzima *Msp*I que se sobrepunha a seqüência reconhecida pela enzima *Bam*HI. Assim, o vetor pôde ser linearizado com *Bam*HI (Figura 16).

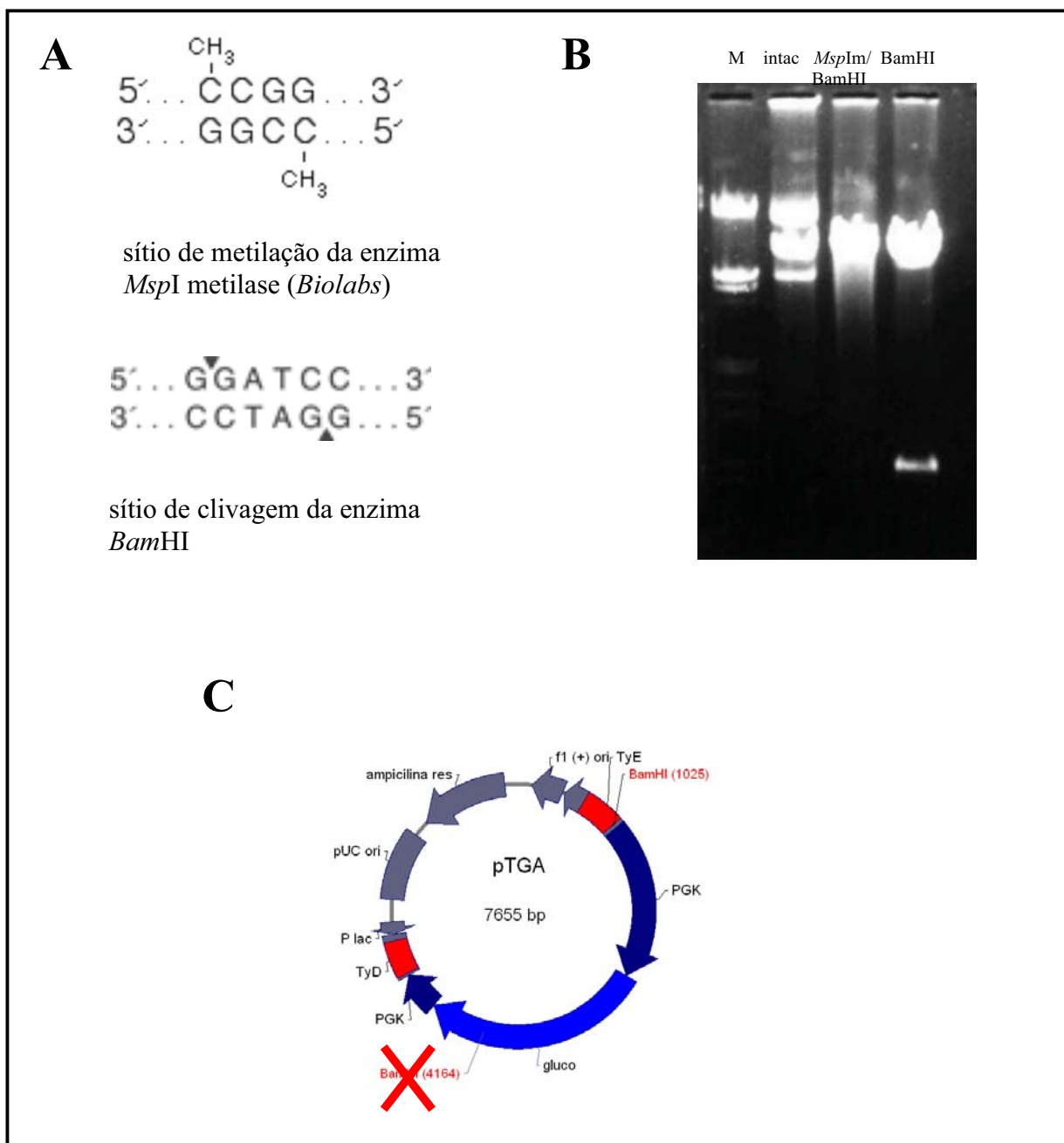


Figura 16: Tratamento do vetor pTGA com a enzima *MspI* metilase – (A) A enzima *MspI* metilase possui sítio que se sobrepõe ao sítio de clivagem de *BamHI*. Em B, análise em gel de agarose 0,8 % da digestão do vetor pTGA com a enzima *BamHI* após tratamento com *MspI* metilase e sem o tratamento com a enzima. M - marcador DNA do fago λ digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Em C, o sítio de *BamHI* no vetor pTGA que foi eliminado com a metilação pela enzima *MspI*.

1
1

O vetor pTGA foi defosforilado para que o cassete de expressão da α -amilase fosse ligado ao vetor pTGA, gerando o vetor que foi denominado pTAGA. Após procedimentos de transformação de células de *E. coli* e extração de plasmídios, a construção e a orientação do segundo cassete foi verificada com a análise de restrição com a enzima *Hind*III (Figura 17).

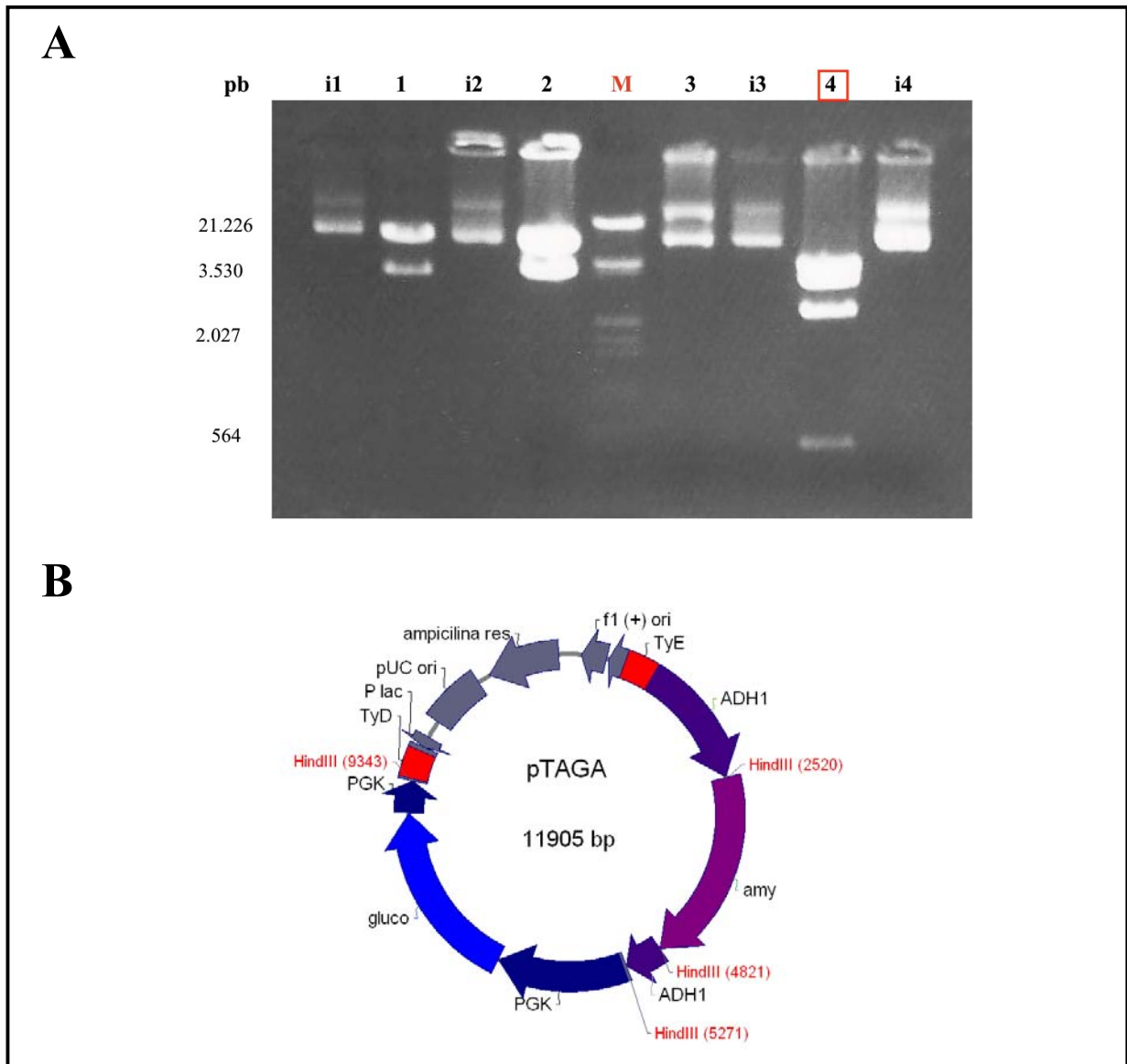


Figura 17: Digestão do vetor pTAGA com a enzima *Hind*III (A) Os clones 1 a 4 foram digeridos com a enzima *Hind*III. M – marcador DNA do fago λ digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III. i – vetores intactos. (B) Esquema da orientação que o cassete de α -amilase foi inserido no vetor pTGA gerando o vetor pTAGA. O clone 4 apresentou o padrão de bandas correspondentes a essa orientação (\approx 450 pb; \approx 4.000 pb; \approx 2.300 pb; \approx 5.150 pb).

6.6 Transformação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e seleção dos clones transformantes

Os três vetores finais contendo os cassetes de expressão das amilases (pTA, pTGA e pTAGA) foram, por fim, digeridos com a enzima de restrição *XhoI*, de modo que toda a porção bacteriana dos vetores fosse excisada e os cassetes de integração fossem liberados. O produto da digestão foi utilizado para transformação das linhagens de levedura (Figura 18).

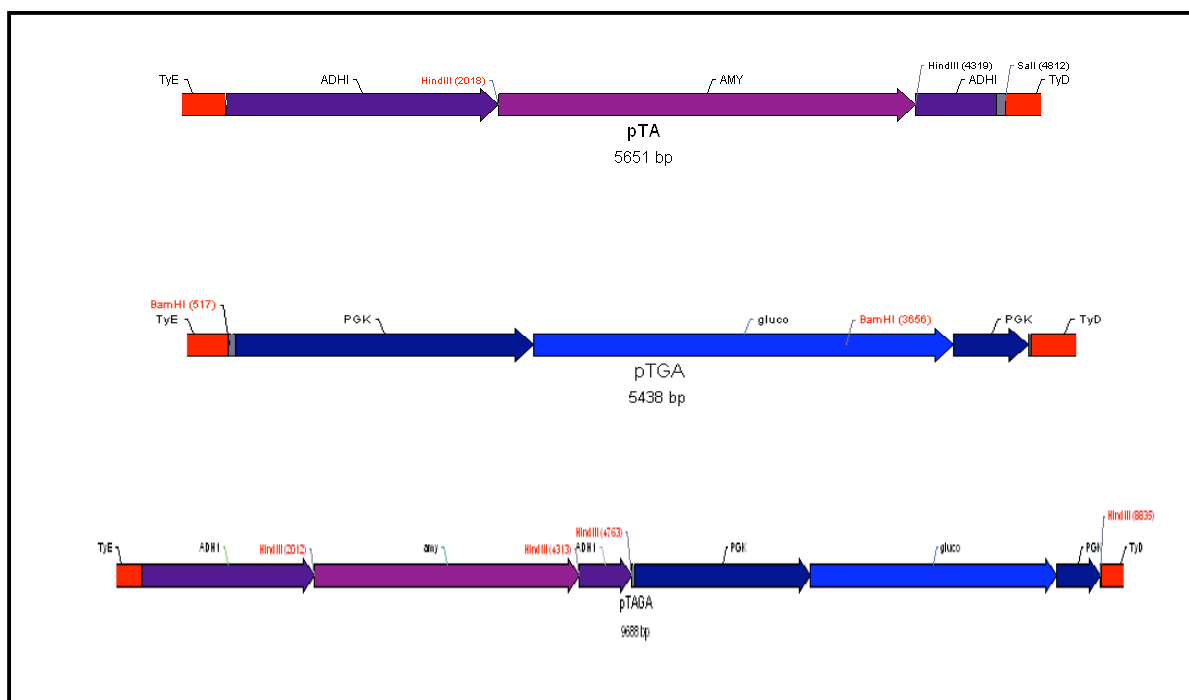


Figura 18: Cassetes de integração pTA, pTGA e pTAGA após digestão dos vetores com a enzima de *XhoI*

Para validar as construções acima foram selecionadas duas linhagens de *S. cerevisiae*, uma de laboratório, linhagem MFL, onde todas as construções episomais foram testadas, e a linhagem industrial JP1. Com o uso do protocolo de eletroporação, células da linhagem MFL foram co-transformadas com cerca de 5 μ g de cada uma das construções vetoriais finais (pTA, pTGA e pTAGA) separadamente e com 1 μ g do vetor de expressão episomal YEP351-PGK (*LEU2*) que proveria a marca de seleção dos transformantes em culturas em meio mínimo sem leucina.

Na linhagem JP1, a co-transformação foi realizada com o uso do vetor episomal PYC230 que possui a marca de seleção G418r, os transformantes, portanto, seriam capazes de crescer em meio complexo (YPD) na presença do antibiótico G418.

A eficiência de transformação em ambos os casos foi alta, com uma média de 1500 colônias a cada transformação para a linhagem MFL e 800 colônias para JP1. No entanto, por se tratar de uma co-transformação de vetores separados sendo que um é episomal enquanto o outro é integrativo, para testar a eficiência de integração, as colônias transformadas foram transferidas para meio seletivo contendo 0,5 % de amido.

Após 48 h de crescimento, as placas contendo as colônias transformantes foram coradas com vapor de iodo para a verificação de formação de halo de hidrólise. Na linhagem MFL foram encontrados 2 clones com atividade de α -amilase e 3 com atividade de glicoamilase dos 648 clones analisados (Figura 18A), não foi encontrada nenhuma colônia transformada com o vetor pTAGA que apresentasse atividade aparente. Na linhagem JP1 foram encontrados 2 clones com atividade de glicoamilase dos 1944 analisados (resultantes de 3 diferentes transformações), não foram encontrados clones com atividade amilolítica nas transformações com pTA e pTAGA (Figura 18B).

Todos os clones que apresentaram halo de hidrólise foram selecionados para os testes posteriores.

Tabela 4: Clones com atividade amilolítica

<i>Linhagem</i>	<i>Vetor</i>	<i>Clones</i>
MFL	pTA	M1 e M3
MFL	pTGA	M4, M5 e M6
JP1	pTGA	JI e JII

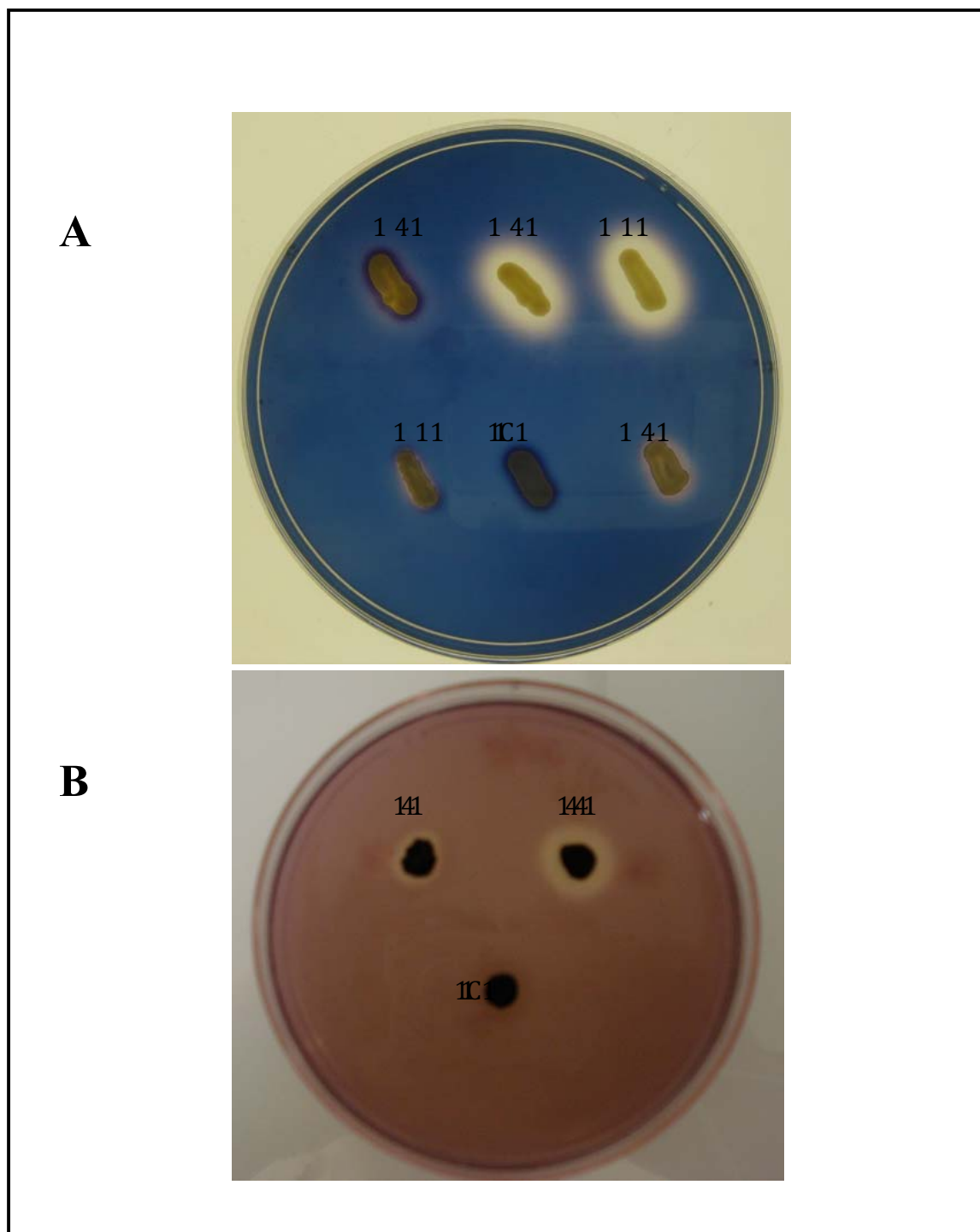


Figura 19: Teste de atividade em placa contendo amido 0,5 % e corado com vapor de iodo. Clones com atividade das linhagens MFL (A) e JP1 (B) – Os clones M1 e M3 foram transformados com o vetor pTA enquanto os restantes (M4, M5, M6, JI e JII) foram transformados com o vetor pTGA. C – controles: linhagens selvagens.

Devido à baixa frequência de clones com atividade amilolítica na linhagem JP1, levantou-se a hipótese de que havia uma incompatibilidade dos promotores utilizados no vetor e a linhagem industrial, para testar essa hipótese, o cassete da α -amilase foi ligado ao vetor PYC230 (que continha a marca de seleção *G418^r*) gerando o vetor PUC230-AMY, um vetor episomal que teria uma maior frequência de transformação que um vetor integrativo; células da linhagem JP1 foram transformadas com a construção, a frequência de halos de hidrólise nos clones selecionados aleatoriamente nas placas contendo meio seletivo (YPD + G418) foi de 100 % (Figura 20), enquanto a frequência de halos de hidrólise, na transformação com os vetores integrativos, dos clones que cresceram no meio seletivo para a linhagem MFL foi de 0,77 % e na linhagem JP1 foi de apenas 0,1 %.

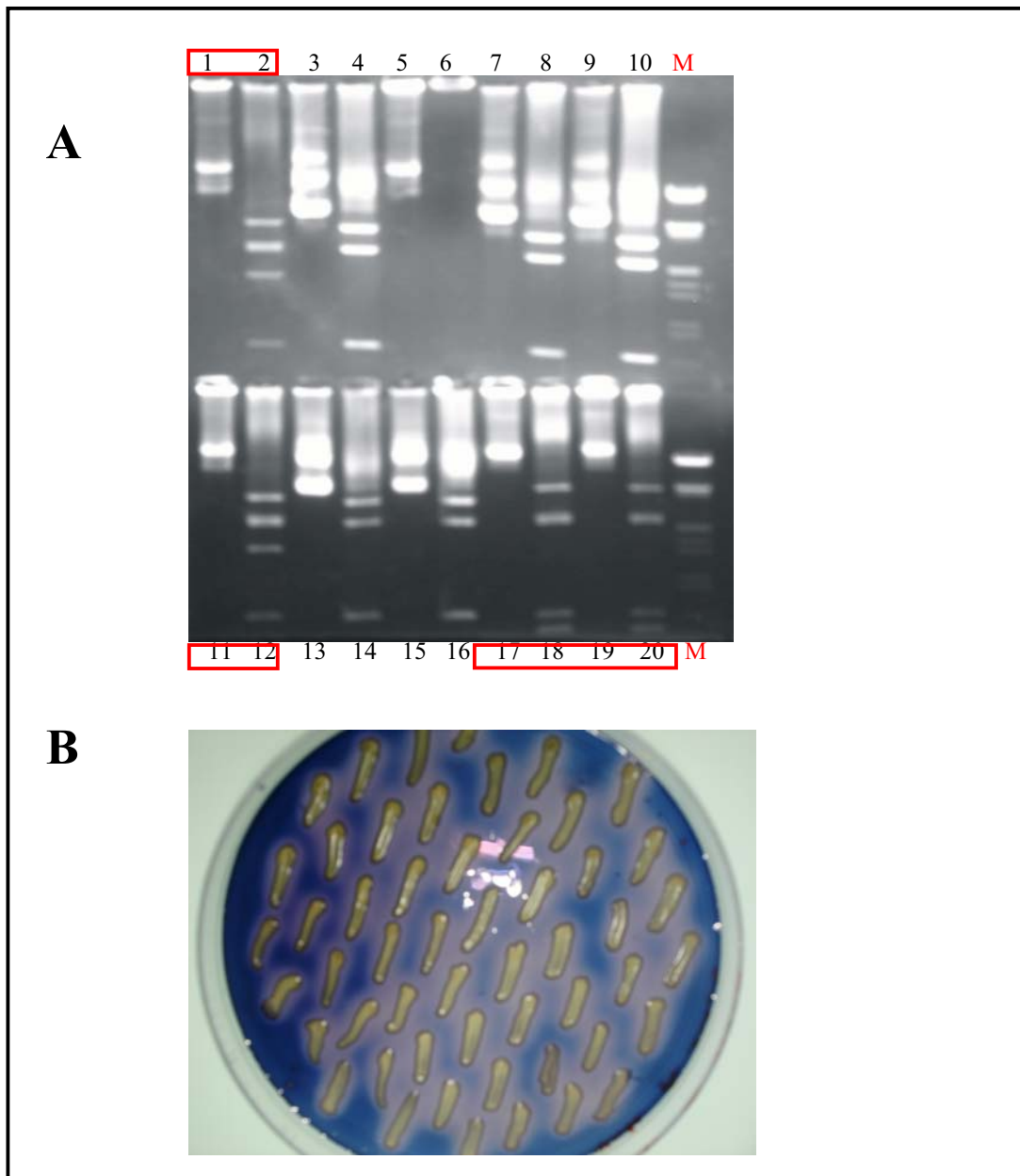


Figura 20: Clonagem do cassete da α -amilase no vetor PYC230 – (A) Digestão do vetor PYC230-AMY com a enzima de restrição *Bam*HI para análise da integridade do vetor, os vetores intactos dos clones de 1 a 10 estão nos poços 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, e 19 respectivamente, e as digestões estão nos poços 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20. os clones 1, 6, 9 e 10 apresentaram as quatro bandas confirmado a clonagem do cassete de α -amilase, sendo que o cassete está clonado em uma direção nos clones 1 e 6 e na direção contrária nos clones 9 e 10. M - marcador DNA do fago λ digerido com

as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. (B) Células da linhagem JP1 transformadas com o vetor PYC-AMY, o clone 1 foi utilizado na transformação.

6.7 Curva de crescimento das colônias transformantes e atividade enzimática.

Foi traçado o perfil de crescimento para todas as colônias selecionadas no teste em placa contendo amido. A observação foi realizada até que a curva de crescimento atingisse a fase estacionária. Em meio YPD sob agitação a 30 °C, os clones da linhagem MFL tiveram suas curvas de crescimento bastante semelhantes entre si e demoraram cerca de 22 h para entrarem na fase estacionária de crescimento (Figura 21).

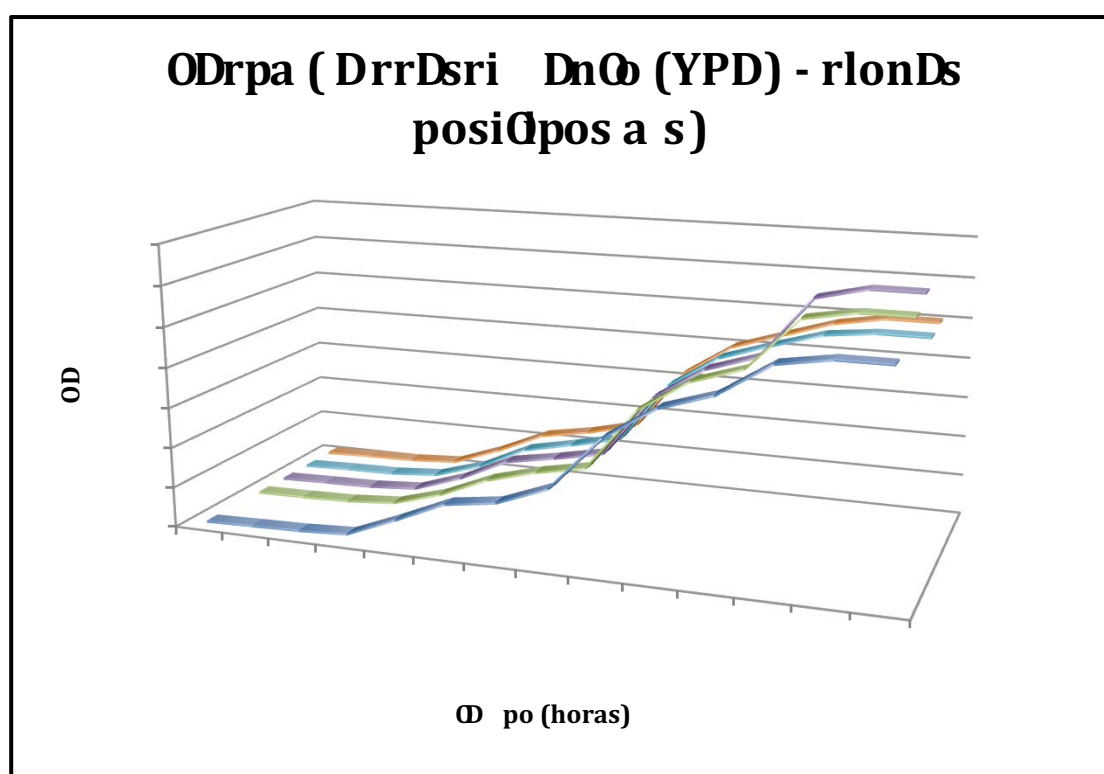


Figura 21: Curva de crescimento dos clones positivos para atividade amilolítica da linhagem MFL em meio complexo (YPD) – Os clones M1 e M3 são resultantes da transformação com o vetor pTA enquanto os clones M4, M5 e M6 são clones transformantes de pTGA.

No ensaio enzimático, feito pelo método de Fuwa e medido por meio da absorbância (OD_{660}), houve degradação do amido dissolvido em praticamente todos os pontos analisados. Sendo que os clones da transformação com pTA (M1 e M3)

apresentaram maior degradação do amido, o que é esperado já que a α -amilase é uma enzima dextrinizante enquanto que a glicoamilase é uma enzima sacarificante (Figura 22).

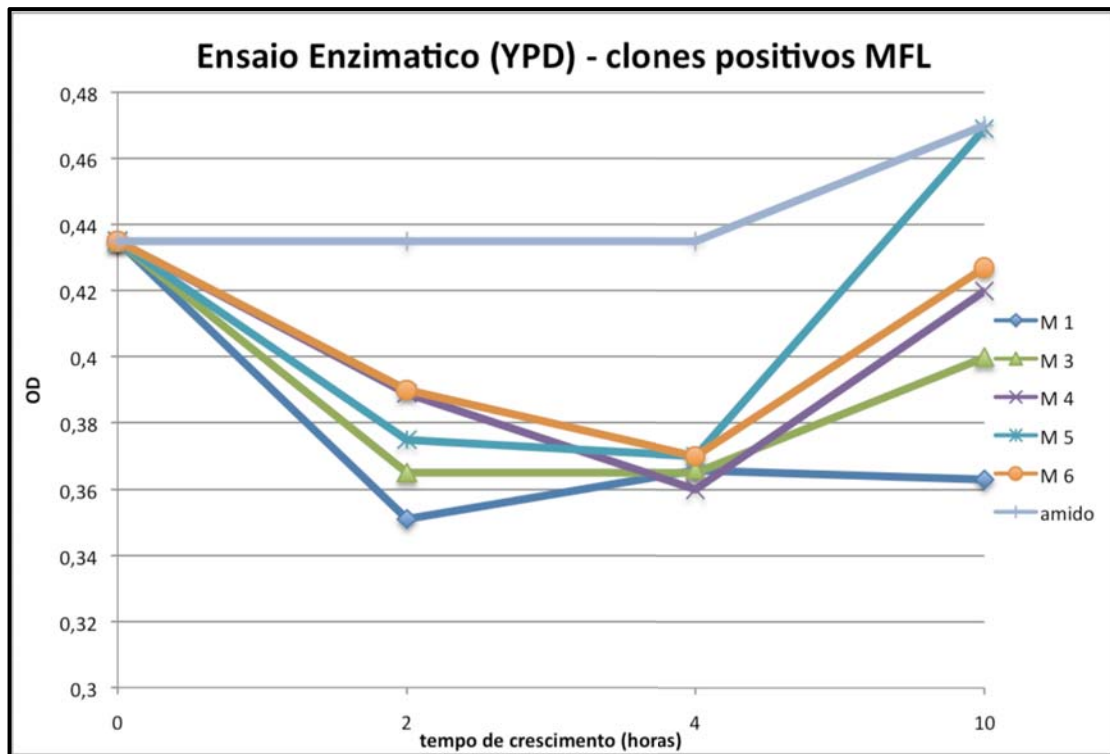


Figura 22: Ensaio enzimático dos clones positivos da linhagem MFL - Os clones M1 e M3 são resultantes da transformação com o vetor pTA enquanto os clones M4, M5 e M6 são clones transformantes de pTGA.

Nos clones II e III, da transformação da linhagem industrial JP1 com o vetor pTGA (cassete da glicoamilase), a curva de crescimento atingiu a fase estacionária com aproximadamente 18 horas de cultura em meio YPD sob agitação de 240 rpm a 30 °C (Figura 23). O clone III apresentou um crescimento acentuado e atingiu a fase estacionária antes do clone II.

M
M

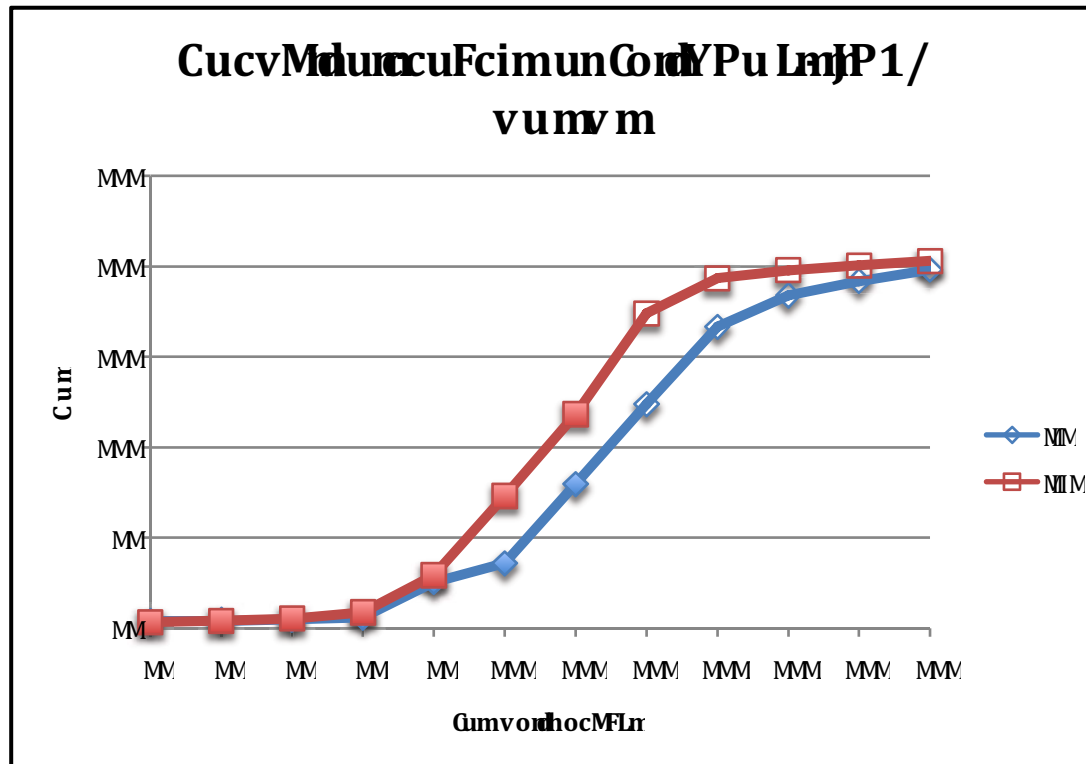


Figura 23: Curva de crescimento em meio YPD dos clones positivos para atividade de glicoamilase da linhagem JP1.

O gráfico do ensaio enzimático para os clones II e III mostrou uma maior degradação do amido dissolvido pelo clone III (Figura 24) em relação ao clone II.

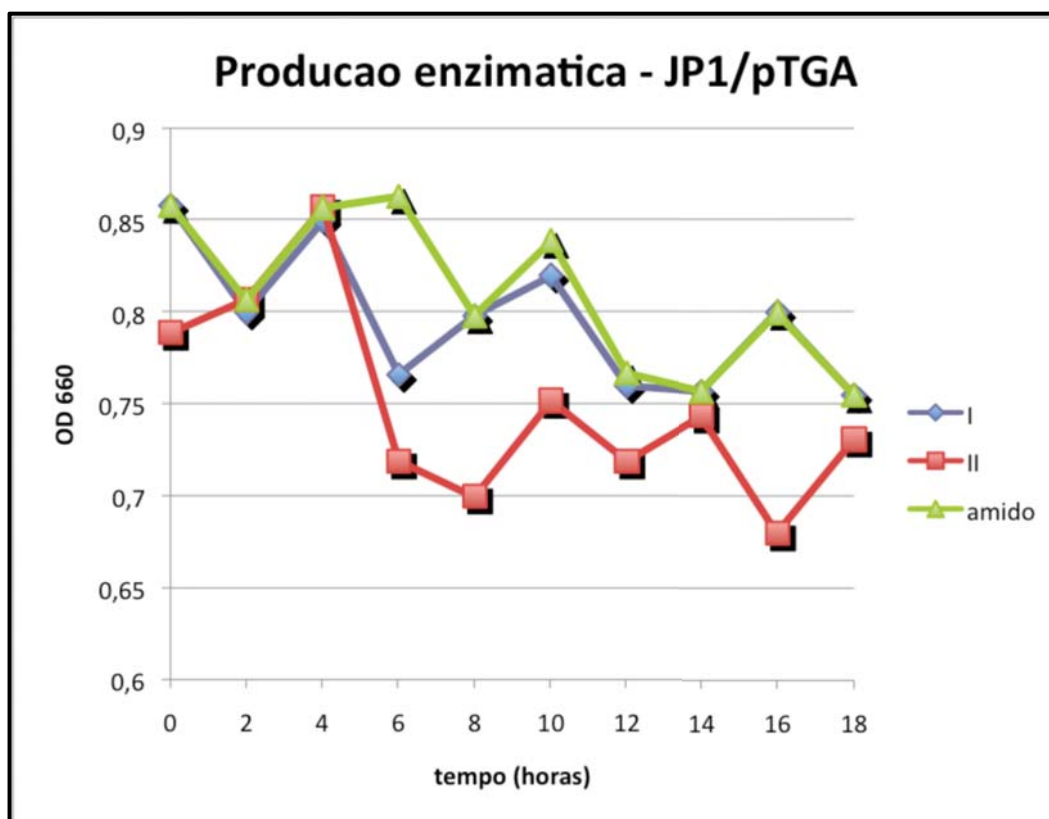


Figura 24: Ensaio enzimático dos clones positivos da linhagem MFL

6.8 Teste de estabilidade mitótica

Para verificar a estabilidade da informação integrada foi realizado o teste de estabilidade mitótica com todos os clones com atividade amilolítica. Todos os clones transformantes foram crescidos em meio não seletivo durante 48 horas e depois plaqueados em meio não seletivo contendo amido. A seguir todas as colônias foram plaqueadas em meio seletivo. O teste mostrou que o vetor integrativo é mais estável que o vetor episossomal que garantia o crescimento da linhagem MFL em meio sem leucina, ou o crescimento da linhagem JP1 em meio YPD na presença do antibiótico G418.

A linhagem JP1 representada pelo clone JII (Figura 6.20 A e B) apresentou crescimento de 23 colônias das 52 plaqueadas, mostrando que 44 % dos clones perderam o vetor episossomal que conferia resistência ao antibiótico G418 presente na placa com meio YPD. No entanto, 100 % dos clones apresentaram halo de hidrólise nas placas com MM mais 0,5 % de amido, mostrando que a integração permaneceu

J
J

estável durante o teste. A linhagem MFL representada pelo clone M4 (Figura 25C e D) apresentou crescimento em apenas 7 colônias das 52 plaqueadas, de modo que 86,5 % dos clones perderam o vetor episossomal que garantia que as células crescessem em meio MM sem leucina (C), mas somente 5 colônias apresentaram halo de hidrólise no MM contendo 0,5 % de amido (D).

A integração foi mais estável na linhagem JP1, em ambos os clones II e III, todas as colônias plaqueadas apresentaram halo de hidrólise após 4 passagens, o mesmo não aconteceu nas linhagens da MFL que variaram o número de colônias que apresentavam halo de hidrólise na placa contendo 0,5 % de amido (Figura 25).

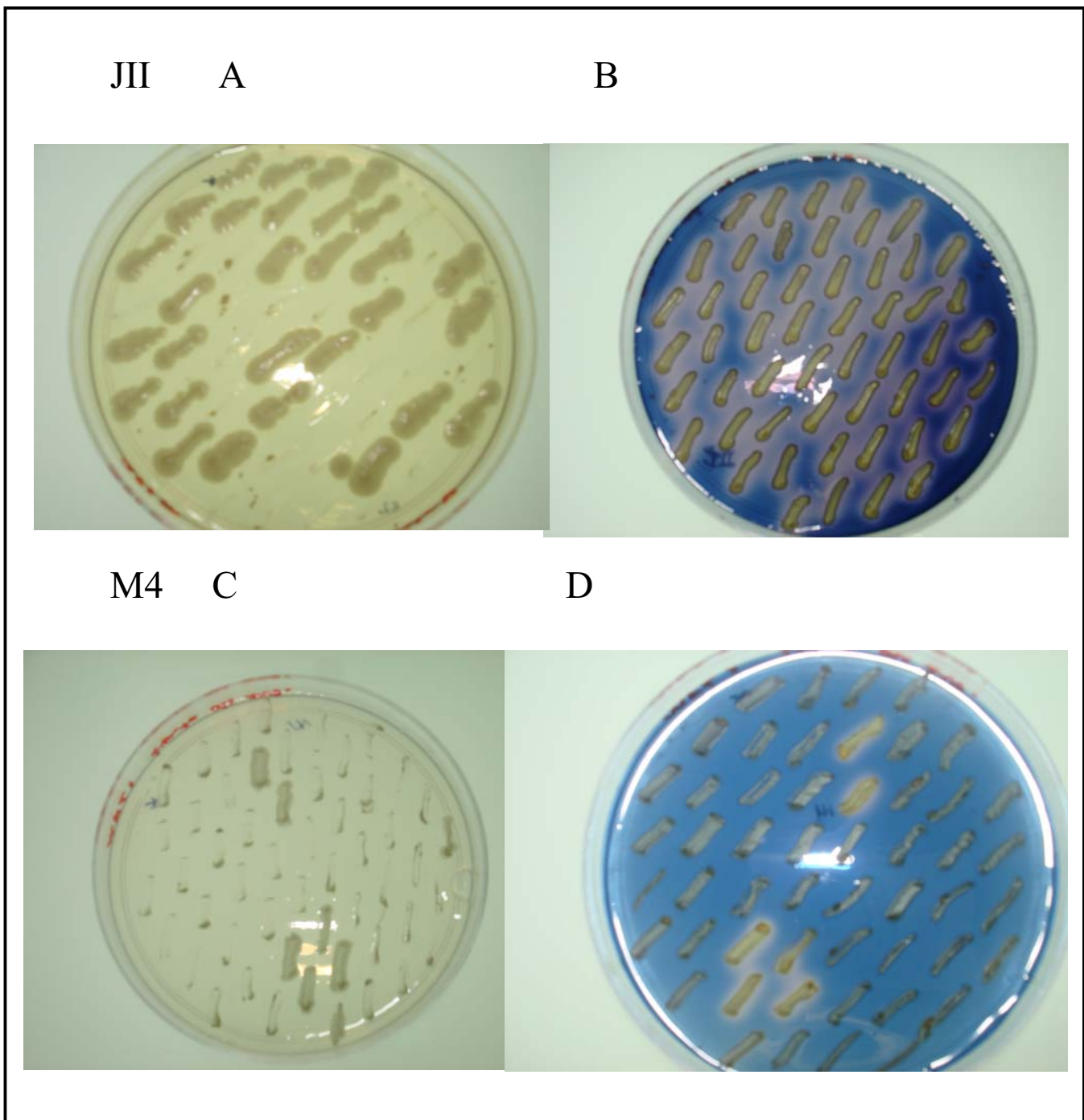


Figura 25: Teste de estabilidade mitótica – (A) Colônias do clone JII plaqueado em meio seletivo com G418. (B) Colônias do clone JII plaqueados em meio contendo 0,5% de amido, e corada com vapor de iodo. (C) Colônias do clone M4 em meio seletivo sem leucina. (D) Colônias do clone M4 plaqueados em meio contendo 0,5 % de amido, e corada com vapor de iodo.

7. Discussão

Nos dias de hoje as leveduras do gênero *Saccharomyces* ainda são as mais utilizadas para a produção de etanol devido à grande tolerância deste microrganismo a elevadas concentrações desse composto (Bai *et al.*, 2008), mas elas são incapazes de usar substratos mais complexos como amido e celulose como única fonte de carbono. Por isso, vários pesquisadores têm desenvolvido cepas de *S. cerevisiae* contendo genes de amilases e glicoamilases de outros organismos, possibilitando, desta forma, que essas novas linhagens sejam capazes de degradar amido para a produção de etanol (Galdino *et al.*, 2008).

Em 2004, Fitzsimon *et al.* obtiveram bons resultados com a transformação da linhagem semi-industrial de *S. cerevisiae* MFL com vetores episomais contendo os cassetes de expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis* e da glicoamilase de *Aspergillus awamori*. No entanto, essa linhagem não é ideal para o estressante ambiente industrial, pois as células de *Saccharomyces cerevisiae* são constantemente submetidas a oscilações na concentração de substrato e do produto (etanol), a flutuações de temperatura e a variações de pH. Além disso, por que o processo industrial não ocorre em condições estéreis, as células são constantemente recicladas durante o ciclo de fermentação que dura em torno de seis meses (Lucena, 2007). Ou seja, a informação heteróloga (cassetes de α -amilase e glicoamilase), por estar na forma plasmidial, é perdida facilmente quando essas células entram em competição com as outras leveduras do processo industrial.

De modo que fez-se necessária a construção de um vetor integrativo para a integração dos cassetes de expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis* e da glicoamilase de *Aspergillus awamori* no cromossomo da levedura a fim de manter os altos níveis de expressão observados por Moraes *et al.* (1995) e Fitzsimon *et al.* (2004), mas, acima de tudo, manter a informação heteróloga o mais estável possível na levedura, visto que vetores integrativos possuem um índice de perda da informação heteróloga muito pequeno (aproximadamente 0,1 % a cada geração) (Nobrega, 2001).

Os vetores episomais como os utilizados por Moraes *et al.* (1995) e Fitzsimon *et al.* (2004) são caracterizados por manter-se em um alto número de cópias dentro da célula (cerca de 100 cópias), uma vantagem que para ser alcançada por um vetor integrativo é preciso que se busque um alvo de integração que esteja presente nos cromossomos da levedura em múltiplas cópias (Nobrega, 2001). Por esse motivo, para a construção do vetor integrativo para *S. cerevisiae* foi escolhida a seqüência δ do transposon Ty que possui um número de repetições de 425 cópias dentro do

J
J

genoma da levedura, além de ser um sistema de integração bastante estável, segundo dados da literatura (Lee & Da-Silva, 1997). Vários trabalhos já utilizaram com sucesso essa região-alvo (Sakai *et al.*, 1990; Mochizuki *et al.*, 1994; Parekh *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Lee e Da-Silva, 1997; Cho *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002). Assim, decidiu-se que a seqüência Ty δ iria flanquear a informação heteróloga a ser integrada no cromossomo da levedura.

O início da estratégia de construção do vetor integrativo baseado na seqüência de Ty δ de *S. cerevisiae* deu-se no desenho dos iniciadores para PCR, que deveriam amplificar não somente a seqüência do próprio Ty δ , mas os sítios de restrição para possibilitar as futuras clonagens para as quais o vetor integrativo fosse utilizado. Optou-se, após análise das seqüências de todos os elementos que fariam parte dos vetores finais para transformação das linhagens de *S. cerevisiae* (Ty δ , promotores PGK e ADH1, gene da α -amilase *Bacillus subtilis* e o cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori*), por inserir uma região de múltiplos sítios de clonagem que seria utilizado tanto para essas clonagens quanto para a clonagem de outras seqüências em trabalhos futuros. Por isso, além dos sítios de *Bam*HI (onde seria inserido o cassete de expressão da α -amilase) e *Hind*III (onde seria inserido o cassete de expressão da glicoamilase), a região de múltiplos sítios de clonagem inserido nos iniciadores continha os sítios de restrição para as enzimas *Sac*I, *Spe*I, *Pst*I, *Eco*RV, *Eco*RI, *Sal*I e *Kpn*I (Figura 26).

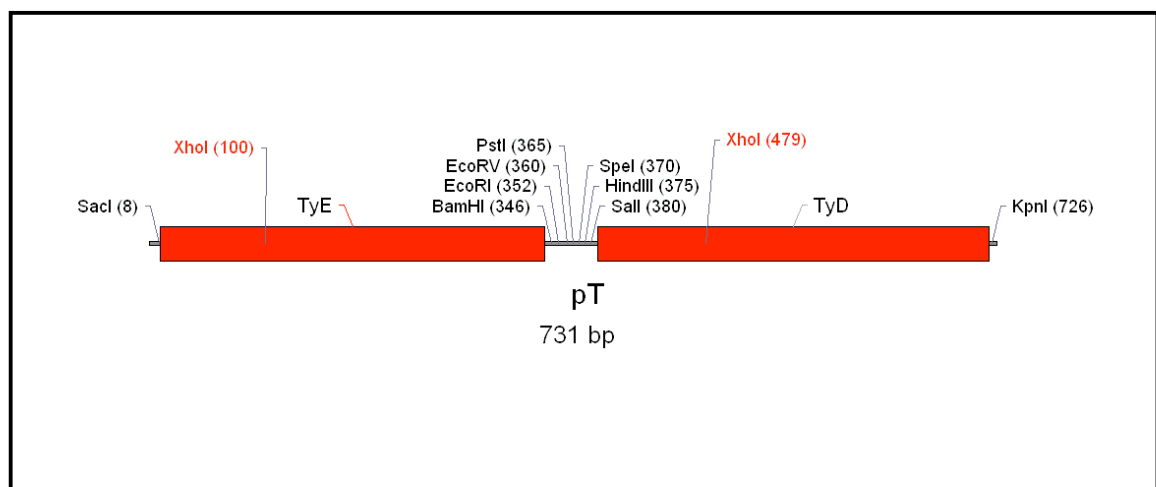


Figura 26: Esquema linear do vetor pT.

Para a amplificação por PCR dos fragmentos Ty δ foi utilizado o DNA cromossomal da linhagem industrial JP1. Optou-se por utilizar o DNA de uma levedura industrial, pois existem dados na literatura que mostram que leveduras industriais possuem algumas diferenças em seu genoma quando comparadas com linhagens de laboratório, tais como diferenças de bases, rearranjos cromossomais, aumento ou diminuição do número de cromossomos, dentre outras, uma vez que as linhagens industriais estão sob constante pressão seletiva, estresse, interação e competição com outras leveduras o que promove essas adaptações (Nobrega, 2001; Lucena *et al.*, 2007).

Como a construção desse vetor tem como objetivo principal a transformação de linhagens industriais tais como a JP1, que foi selecionada por dominar o processo industrial de uma usina no nordeste brasileiro e portanto, possuir a possibilidade de continuar a ser altamente competitiva após a inserção da informação heteróloga (Silva-Filho *et al.*, 2005), a amplificação dos fragmentos Ty δ foi realizada utilizando o DNA cromossomal da própria JP1 como molde.

No entanto, após amplificação da seqüência Ty, utilizando os iniciadores desenhados, os fragmentos resultantes de aproximadamente 300 pb (TyD e TyE) foram seqüenciados e alinhados com a seqüência contida nos bancos de dados genômicos da *S. cerevisiae* (Ncbi - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e não foram observadas diferenças entre as duas seqüências (houve 100 % de correspondência).

A construção do vetor pT foi realizada tendo como base o vetor comercial pBlueScript II KS+. Uma vez confirmada a construção, os cassetes de expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis*, excisado do vetor pAA3 (Moraes *et al.*, 1995), e da glicoamilase de *Aspergillus awamori* excisado do vetor pG5 (Moraes *et al.*, 1995) foram ligados ao vetor pT, dando origem aos vetores que foram denominados de pTA (contendo o cassete da α -amilase), pTGA (contendo o cassete da glicoamilase) e pTAGA (contendo ambos os cassetes).

Os três vetores de expressão foram então digeridos com a enzima *Xho*I que, segundo a análise da seqüência feita durante o planejamento da estratégia de construção dos vetores, clivaria os vetores somente nos fragmentos Ty δ a uma altura de aproximadamente 100 pb do início da seqüência, eliminando assim toda a porção bacteriana do vetor-base e obtendo-se um fragmento de DNA com seqüências delta nas extremidades, dirigindo desta forma a integração para estes *loci*. Em levedura o principal mecanismo de integração é por recombinação homóloga, sendo necessário

J
J

apenas uma seqüência mínima de 30 pb com deleções nas extremidades 5' e 3' para dirigir a integração ao sítio-alvo (Malissard *et al.*, 1999).

Como as marcas de seleção não estavam inseridas no vetor integrativo, em ambas as linhagens (MFL e JP1) foram realizadas co-transformações do vetor integrativo junto com os vetores episomais contendo a marca de seleção correspondente a cada linhagem (*LEU2* para MFL e *G418^r* para JP1). O método da co-transformação foi escolhido porque estando a marca seletiva em um vetor episomal ele poderia ser retirado do clone transformante apenas com as passagens de gerações (Figura 6.20), visto que a perda de vetores YEps é mais alto do que vetores YIp (Nobrega, 2001); de modo que o clone poderia ser novamente utilizado para integração em múltiplas cópias de outras informações heterólogas.

As linhagens MFL e JP1 foram transformadas utilizando-se o protocolo de eletroporação que foi a metodologia usada para integração em seqüências δ de transposons de *S. cerevisiae* com sucesso em diversos trabalhos, com a obtenção de um alto número de cópias de um só vez (Oliveira, 2005) (Tabela 5).

Tabela 5: Informações heterólogas integradas no genoma de *S. cerevisiae* usando sistemas de integração baseados na seqüência Ty δ e o protocolo de eletroporação, respectivos autores e número máximo de cópias integradas.

Autores	Proteínas	Número máximo de cópias integradas no genoma da levedura
Wang <i>et al.</i> (2006)	Invertase	20
Lee & Da Silva (1997)	β -galactosidase <i>E. coli</i>	9
Cho <i>et al.</i> (1999)	endo/exo - glucanases e β -glucosidase	44
Kim <i>et al.</i> (2001)	Hirudina	10
Chung <i>et al.</i> (2002)	Xilose redutase	Não determinado

Apesar da boa eficiência de transformação, o resultado das transformações foi uma baixa freqüência de clones com atividade amilolítica dentre os transformantes. Isso se deve ao fato de a marca de seleção não estar inserida no vetor de integração. Vetores episomais possuem uma freqüência de transformação maior que os vetores integrativos (Nobrega, 2001), de modo que se a marca de seleção estivesse inserida no

próprio vetor integrativo, os clones que crescessem no meio seletivo provavelmente teriam os cassetes de expressão de α -amilase e glicoamilase, e, portanto, apresentariam o halo de hidrólise nas placas com 0,5 % de amido coradas com vapor de iodo. A inserção do cassetes de expressão da α -amilase no vetor episomal contendo a marca de seleção para o antibiótico G418 (PYC230) provou realmente que se a marca de seleção estivesse inserida no vetor integrativo a eficiência de seleção do sistema seria aumentada, pois todos os clones resistentes ao antibiótico que foram testados apresentaram o halo de hidrólise em placa contendo amido; a hipótese levantada de que os promotores utilizados poderiam não ser compatíveis com a linhagem industrial JP1 foi excluída com este experimento, que mostrou que a levedura foi capaz de expressar o gene da α -amilase com o mesmo promotor utilizado na construção do vetor integrativo. Além disso, esse teste também confirmou que a linhagem JP1 é um bom modelo de estudo e, conforme Silva-Filho *et al.* (2005) havia descrito, é receptivo às ferramentas usuais de biologia molecular, é de fácil manipulação e eficiente na transformação de vetores episomais.

Apesar da baixa eficiência de integração, foram encontrados clones positivos para atividade amilolítica nos testes com placas contendo amido para as construções pTA e pTGA. Não foi obtido nenhum transformante amilolítico nas transformações com o vetor contendo os dois cassetes de expressão (pTAGA), o que pode ser explicado pela própria baixa eficiência de seleção ou pelo tamanho do fragmento, que pode estar tornando instável a integração. De acordo com Lopes (1989) a estabilidade da integração depende do tamanho do fragmento a ser integrado, não devendo ser superior a 9,1 kb no caso da integração em rDNA, o mesmo pode estar acontecendo com a integração nas seqüências Ty δ .

Os clones amilolíticos obtidos da transformação das linhagens MFL e JP1 foram testados quanto ao crescimento celular em meio YPD. Não houve alterações significantes na velocidade de crescimento da célula hospedeira, um dos itens listados por Schüller & Casal (2005) como essencial para um bom sistema de expressão heteróloga para aplicação industrial.

Os clones positivos da linhagem MFL tiveram as curvas de crescimento muito semelhantes, já os dois clones da linhagem JP1 tiveram uma pequena diferença na velocidade de crescimento, com destaque para o clone JII que apresentou uma taxa de crescimento maior que o clone JI. O clone JII também exibiu um halo de hidrólise da amido maior que o clone JI, provavelmente indicando um maior número de cópias

J
J

integradas ou integração em *loci* mais favoráveis a transcrição (Wang *et al.*, 1996).

Nos testes de atividade enzimática em meio líquido (Fuwa, 1954), nos clones da linhagem MFL que foram transformados com o vetor pTA (α -amilase) foi observada uma maior degradação do amido, refletido pela diminuição da incorporação do iodo, do que nos clones que foram transformados com o vetor pTGA (glicoamilase). Esse fato explica-se pelo mecanismo de ação diferenciado de cada tipo de enzima já que a α -amilase reduz a estrutura de hélice das regiões lineares do amido (ausência de coloração), onde o iodo se incorpora, mais rapidamente que a glicoamilase, que ataca a estrutura pelas extremidades, apresentando uma coloração roxo-clara quando corada com iodo (Van der Maarel *et al.*, 2002).

Os clones transformantes da linhagem JP1 com o vetor pTGA também mostraram atividade enzimática no ensaio em meio líquido utilizando o método Fuwa, sendo que o clone JII apresentou aparentemente uma maior degradação do amido no meio que o clone JI, no entanto, mais testes necessitam ser realizados para a determinação das unidades de degradação de amido para os clones transformados com o vetor pTGA, já que o método Fuwa é utilizado principalmente para determinação da atividade de endoamilases tais como a α -amilase.

Por fim, foram realizados testes de estabilidade mitótica com os sete clones positivos para atividade amilolítica. Os clones positivos da linhagem JP1 apresentaram uma boa estabilidade mitótica, já que 100 % das colônias testadas apresentaram o halo de hidrólise em placa contendo MM e amido 0,5 %. Mas o mesmo resultado não se repetiu nos clones transformantes para MFL, a baixa estabilidade mitótica nessa linhagem pode ser explicada pela amplificação da seqüência Ty δ que foi feita com a utilização do DNA cromossomal de JP1. Como a linhagem MFL é uma mutante da linhagem industrial FTPT472 isolada de um fermentador industrial em Campinas – São Paulo (Fitzsimon *et al.*, 2004), ela pode ter modificações na seqüência Ty δ .

Outros autores também observaram instabilidade em algumas transformações utilizando seqüências δ , Romanos *et al.* (1992), por exemplo, observou que algumas integrações em seu trabalho ocorreram, sob a forma de longos arranjos em *tandem* (inserções de várias cópias seqüenciais do gene de interesse num único sítio), assim a probabilidade de serem eliminadas por recombinação excisional é maior.

Já com Lee e Da Silva (1997) e Wang *et al.* (1996), a instabilidade da

integração foi observada quando eles utilizaram o vetor p δ -neo, que continha o gene de resistência ao antibiótico G418, e obtiveram instabilidades estruturais significativas quando da expressão dos cassetes integrados. Os transformantes contendo 5 ou mais cópias do cassete, foram muito instáveis durante cultura não seletiva, 20% a 75% perderam todos os genes integrados e o número de cópias diminuiu significativamente nas restantes. Segundo esses autores, a linhagem de *S. cerevisiae* utilizada para a transformação era aneuploide, e a ploidia influencia a estabilidade, pois a inserção dos cassetes deve ocorrer no mesmo local em todos os cromossomos para ser estável durante a replicação do DNA e subsequente divisão celular; caso não haja esta integração ocorrerá um rearranjo durante o pareamento que poderá ou duplicar a informação nas outras cópias do cromossomo ou removê-la. A linhagem MFL também é aneuploide, o que poderia explicar a instabilidade do vetor, enquanto a linhagem JP1 é haplóide (Oliveira, 2005).

No entanto, diversos autores conseguiram boa estabilidade mitótica de seus transformantes e produções de proteína melhoradas quando comparadas com linhagens contendo plasmídios baseados no 2 μ m, como por exemplo, produção de β -glucosidase e endo/exo-glucanases (Cho *et al.* 1999) e hirudina (Kim *et al.* 2001).

Os resultados apresentados aqui mostram que a utilização da seqüência δ do transposon Ty1 de *Saccharomyces cerevisiae* é plenamente viável para expressão heteróloga em leveduras industriais, e abrem diversas perspectivas.

Objetiva-se, por exemplo, a realização de mais transformações em leveduras utilizando o vetor construído, a fim de encontrar um clone com alta expressão de glicoamilase e que seja capaz de crescer em amido como única fonte de energia. Este clone seria transformado com o cassete da α -amilase, a fim de mimetizar o que ocorre com o vetor episomal que produz as duas enzimas, antes de ser testado para a produção de etanol.

O desenvolvimento de um processo SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) para conversão de amido de mandioca a etanol para utilização em destilarias, inclusive, pode ser realizado com a utilização de linhagens recombinantes transformadas com as construções do presente trabalho. Para o desenvolvimento desse processo será ainda determinado número de cópias integradas no clones positivos e a atividade enzimática dos mesmos. Serão realizadas também fermentações em pequena escala onde será observada a estabilidade da informação no fermentador comparada com as linhagens transformadas com os vetores episomais (Filtzmon, 2004). As

J
J

linhagens que se mostrarem com alta atividade enzimática e boa estabilidade nesses testes serão testadas em ensaios fermentativos em média e larga escala.

Uma solução para melhorar a eficiência de seleção do vetor pT, é a adição da marca de seleção *ARO4*-OFP, que é um alelo mutante do gene *ARO4* da própria *S. cerevisiae* e que codifica uma DAHP sintase resistente à inibição pela tirosina, e, portanto à droga OFP (Cebollero, 2004). Essa marca de seleção, além de ser uma marca dominante, possui a seqüência da própria levedura, uma vantagem, já que não haverá adição de genes bacterianos de resistência a antibiótico que são um risco de biossegurança e que a indústria evita (Leite, 2008). Além disso a JP1 é sensível a droga da *ARO4*^{OFP} (Reis, 2008), o que indica que esta marca pode ser usada nesta linhagem para o desenvolvimento do processo SSF.

8. Conclusões e Perspectivas

Os dados obtidos nesse trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

1. O fragmento de DNA obtido por PCR com o uso dos iniciadores desenhados é o DNA correspondente às seqüências δ do transposon Ty de *Saccharomyces cerevisiae*;
2. Foi possível construir o vetor integrativo pT utilizando como base o vetor comercial pBlueScript II KS+ e nas seqüências δ do retrotransposon Ty1 de *Saccharomyces cerevisiae*;
3. Os cassetes de α -amilase e glicoamilase foram inseridos com sucesso no vetor integrativo gerando os vetores que foram denominados pTA, pTGA e pTAGA;
4. A transformação das linhagens MFL e JP1 de *Saccharomyces cerevisiae* com os vetores pTA e pTGA ocorreu com sucesso pois gerou linhagens capazes de secretar as enzimas de interesse de forma funcional, no entanto com um baixo numero de transformantes com atividade amilolítica, o que deve-se ao fato de a marca de seleção não estar inserida no vetor integrativo e por isso há uma baixa eficiência na seleção dos clones;
5. Não foi encontrado nenhum clone positivo para atividade amilolítica nos transformantes com o vetor pTAGA, ou devido à baixa eficiência na seleção dos clones ou porque o vetor (por possuir os dois cassetes) é muito grande e isso pode dificultar a integração;
6. As linhagens transformadas não apresentaram alterações significantes na curvas de crescimento quando comparadas com a linhagem selvagem;
7. As linhagens transformadas de MFL tiveram atividades enzimáticas semelhantes segundo o método de Fuwa, sendo que os clones transformados com o vetor pTA tiveram maior diminuição da OD₆₆₀ devido à atividade da própria α -amilase;

8. A linhagem JII teve melhor crescimento que a JI e melhor atividade enzimática;
9. O vetor permaneceu estável após algumas gerações na linhagem JP1, mas não nas transformantes da linhagem MFL, isso pode ser explicado pelo fato do DNA cromossomal que foi utilizado para amplificação das seqüências Ty δ foi o da JP1 e não o da MFL, podendo haver alguma diferença entre as seqüências;
10. O vetor integrativo baseado na seqüência Ty δ pode ser utilizado como meio de manter a informação heteróloga estável no cromossomo da linhagem industrial JP1.

Os resultados desse trabalho abre ainda as seguintes perspectivas:

1. Inserção de uma marca de seleção dominante no vetor integrativo pT;
2. Inserção de outros cassetes de expressão de enzimas de interesse na linhagem industrial JPI com a utilização do vetor construído;
3. Realização de ensaios de fermentação em pequena, média e larga escala para seleção de linhagens eficientes na conversão de amido a etanol;
4. Desenvolvimento de um processo SSF para a produção de etanol a partir de amido.

9. Referências

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215** (3): 403-410.
- ASTOLFI-FILHO, S.; GALEMBECK, E. V.; FARIA, J. B.; SCHENBERG FRASCINO, A. C. (1986). Stable yeast transformants that secrete functional amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Nat. Biotech.* **4**: 311-315.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. (2003). *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. Bras.: Edit. Univ. de Brasília. 211 p.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechn. Adv.* **26**: 89-105.
- BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. (2002) Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic Archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6** (2): 151-160.
- BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. (2000). *Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory course manual*. Cold Spr. Harb. Laborat. Press. 113-114.
- CARVALHO, E. P. (2002). Na contramão de Kyoto. *Folha de São Paulo, Opinião*, Caderno A, p. A3.
- CHEN, D. C.; YANG, B. C.; KUO, T. T. (1992). One-Step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* **21**(1): 83-84.
- CHO, K. M.; YOO, Y. J.; KANG, H. S. (1999). Delta integration of endo-exoglucanase e beta-glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 23-30.
- CHUNG, Y. S.; KIM, M. D.; LEE, W. J.; RYU, Y. W.; KIM, J. H.; SEO, J. H. (2002). Stable expression of xylose reductase gene enhances xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Microb. Tech.* **30**: 809–816.

J
J

COT, M.; LORET, M. O.; FRANÇOIS, J.; BENBADIS, L. (2006). Physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *Yeast. Res.* **7**: 22-32.

DOMINGUES, M. A. R. (2001). Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica. Tese apresentada na Universidade Federal de Pernambuco. 305 p.

EVTEC. (2005). Produção de etanol a partir de amido de mandioca e cana-de-açúcar / sacarose. Análise de Mercado e Competitividade. 111 p.

FINK, G. R.; BOEKE, J. D.; GARFINKEL, D. J.; STYLES, C. A. (1985). Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell.* **40** (3): 491-500.J

FITZSIMON, R. ; MORAES, L. M. P. ; SIÑERIZ, F.; LUCCA, M. E. (2004). Evaluation of starch fermentation products by amylolytic recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Braz. Arch. Biol. Techn.* **47** (5): 155-159.

FUWA, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.* **4**: 583-603.

GALDINO, S. G. (2008). Clonagem e expressão de uma α -amilase de *Criptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido. Tese apresentada na Universidade de Brasília. 123 p.

GUANDALINI, G.; SILVA, C. (2006). A dupla conquista. *In Veja*, edição 1941 nº 4, pp. 90-94

KINGSMAN, S.M.; KINGSMAN, A. J. (1988). Genetic Engineering: an Introduction to Gene Analysis and Exploitation in Eukaryotes. Blackw. Scie. Public.

KIM, M. D.; RHEE, S. K.; SEO, J. H. (2001). Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal δ -integration. *J.*

- Biotech., **85**: 41-48.
- LEE, F. W.; DA-SILVA, N. A. (1997). Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the δ -sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microb. Biotech. **48**: 339-345.
- LEITE, F. C. B. (2008). Construção de vetores para modificação genética de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese apresentada na Universidade Federal de Pernambuco. 80 p.
- LOPES, T. S.; KLOOTWIJK, J.; VEENSTRA, A. E.; VAN DER AAR, P. C.; RAUE, H. A.; PLANTA, R. J. (1989). High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. Gene. **79**: 199-228.
- LOPES, T. S.; WIJS, S. I.; STEENHAUER, J.; VERBAKEL; PLANTA, R. J. (1988). Factors affecting the mitotic stability of high copy number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **12** (5):467-77.
- LUCENA, B. T. L.; SILVA-FILHO, E. A.; COIMBRA, M. R. M.; MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; MORAIS-JR, M. A. (2007). Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. Genet. Mol. Res. **6** (4): 1072-1084.
- MALISSARD, M.; ZENG, S.; BERGER, E. G. (1999). The yeast expression system for recombinant glycosyltransferases. Glycocon. J. **16**: 125-139.
- MOCHIZUKI, D.; MIYAHARA, K.; HIRATA, D.; MATSUZAKI, H.; HATANA, T.; FUKUI, S.; MIYAKAWA, T. (1994). Overexpression and secretion of cellulolytic enzymes by δ -sequence-mediated multicopy integration of heterologous DNA sequences into the chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. **77**: 468-473.
- MORAES, L. M. P.; ASTOLFI-FILHO, S.; OLIVER, S. G. (1995). Development of

J
J

- yeast strains for the efficient utilization of starch: evolution of constructs that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Appl. Microb. Biotech.* **43** (6): 1067-1076.
- MORAES, L. M. P; ASTOLFI-FILHO, S.; ULHOA, C. J. (1999). Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microb. Biotech.* **15**: 561-564.
- NOBREGA, G. M. A. (2001). Construção de um novo vetor para caracterização de promotores de leveduras industriais e de laboratório. Tese apresentada na Universidade Federal de Pernambuco. 97 p.
- NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotech. Adv.* **24** (1): 80-85.
- OLIVEIRA, C. C. M. (2005). Produção de β -galactosidase por Levedura Recombinante – Desenvolvimento de um Sistema de Produção Estável. Tese apresentada na Universidade de Minho. 100 p.
- PAREKH, R. N.; WITTRUP, K. D. (1996). Expression level tuning for optimal heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Prog.* **13**: 117-122.
- PARKET, A.; KUPIEC, M. (1992). Ectopic recombination between Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae* is not induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4441-4448.
- PRETORIUS, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* **16** (8): 675-729.
- PRONK, J. T. (2002). Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Env. Microb.* **68** (5): 2095-2100.

- RIBEIRO-DOS-SANTOS, M. G. G. (1988). Melhoramento genético e caracterização de novas cepas amilolíticas de leveduras obtidas por engenharia genética. Tese apresentada na Universidade de Brasília. 93 p.
- ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- SAKAI, A.; SHIMIZU, Y.; HISHINUMA, F. (1990). Integration of heterologous genes into the chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty. *Appl. Microb. Biotech.* **33** (3): 302-306.
- SALVI, J.V. (2002). Panorama para o setor sucroalcooleiro. In: *Energia*. Disponível em: [http:// www.cepea.esalq.usp.br/energ](http://www.cepea.esalq.usp.br/energ). Acesso em: 12 mar. 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Second edition. Cold Spr. Harb. Lab. Press.
- SAUER, B. (1994). Recycling selectable markers in yeast. *Biotechniq.* **16** (6): 1086-1088.
- SAUER, J.; SIGURSKJOLD, B. W.; CHRISTENSEN, U.; FRANDBSEN, T. P.; MIRGORODSKAYA, E.; HARRISON, M.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B. (2000). Glucoamylase: structure/function relationship and protein engineering. *Bioch. Biophys. Acta.* **1543** (2): 275-293.
- SILVA-FILHO, E. A.; MELO, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; SIMÕES, D. A.; MORAIS-JR, M. A. (2005). Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Microb. Biotech.* **32**: 481-486.
- SCHÜLLER, D.; CASAL, M. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in wine industry. *Appl. Microb. Biotech.* **68**: 292-304.

J
J

SHIMURA, K.; FUKUDA, K.; OUCHI, K. (1993). Genetic transformation of industrial yeasts using an amino acid analog resistance gene as a directly selectable marker. *Enz. Microb. Technol.* **15**: 874-876.

SUN, Y.; CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Technol.* **83**: 1-11.

SUTO, M.; TOMITA, F. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J. Biosc. Bioeng.* **4**: 305-311.

TAKAHASHI, T.; NOZAWA, M.; HARA, S.; MIZOGUCHI, H. (2003). High fidelity segregation of YEp vector in [cir0] strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **152** (2): 317-334.

TAVARES, L. Z. (2004). Estudo e Modelagem do processo de produção de etanol por levedura amilolítica recombinante. Tese apresentada na Universidade Federal de Pernambuco. 30 p.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amilase family. *J. Biotech.* **94** (2): 137-155.

WALKER, M.; VYSTAVELOVAA, A.; PEDLERA, S.; EGLINTON, J.; JIRANEKA, V. (2005). PCR-based gene disruption and recombinatory marker excision to produce modified industrial *Saccharomyces cerevisiae* without added sequences. *J. Microb. Meth.* **63**: 193-204.

WANG, X.; WANG, S.; DA-SILVA, N. A. (1996). G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **49** (1): 45-51.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. (1999). Fuel

ethanol after 25 years. Trends. Biotech. **17**: 482-487.

ZALDIVAR, J.; BORGES, A.; JOHANSSON, B.; SMITS H. P.; VILLAS-BÔAS, S. G.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. (2002). Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microb. Biotech. **59**: 436-442.

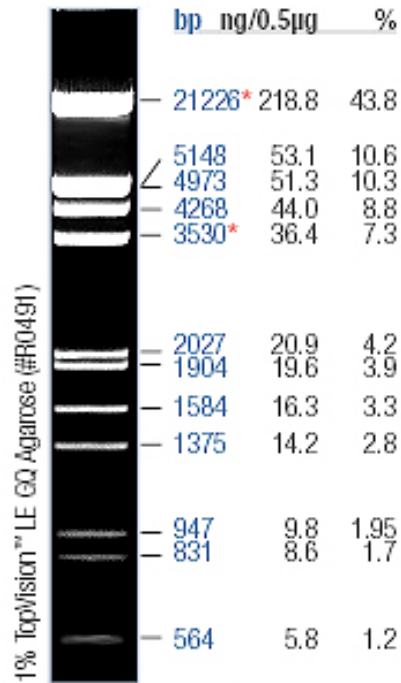
J
J

10. Anexos

J

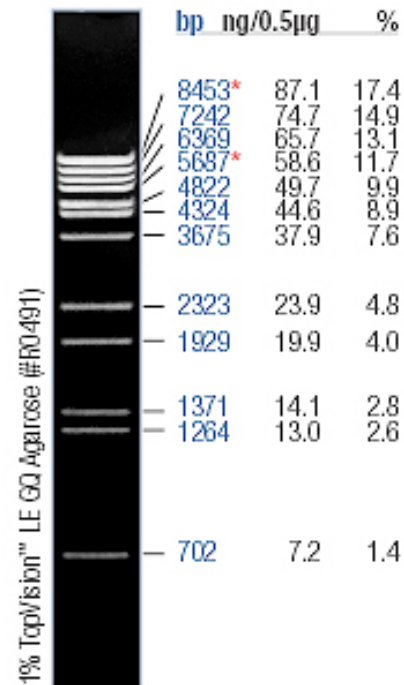
Anexo 1: Marcadores utilizados

DNA do fago λ digerido com *EcoRI* e *HindIII*



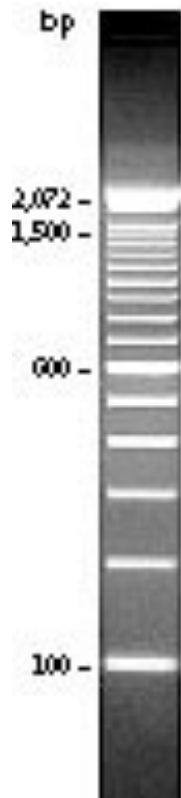
0.5µg/lane, 8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min

DNA do fago λ digerido com *BstEII*



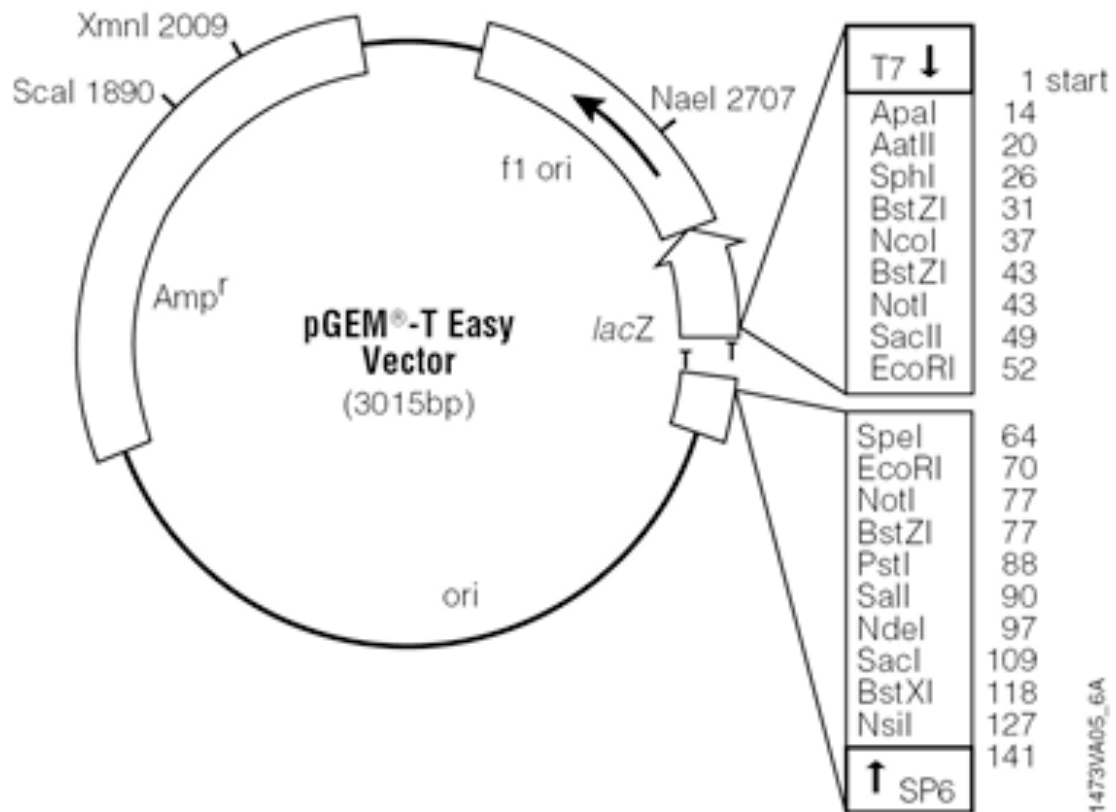
0.5µg/lane, 8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min

100 pb ladder Invitrogen

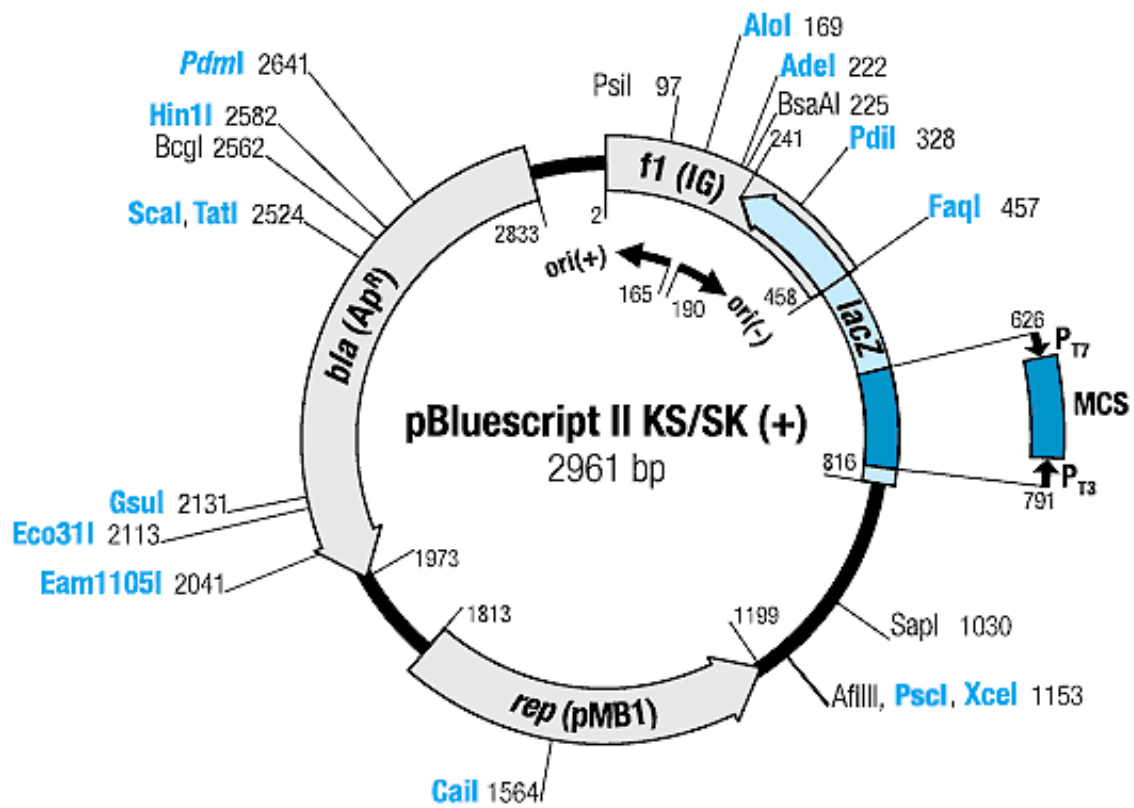


J
J

Anexo 2: Mapa do vetor de clonagem pGEMT[®] Easy (Promega)

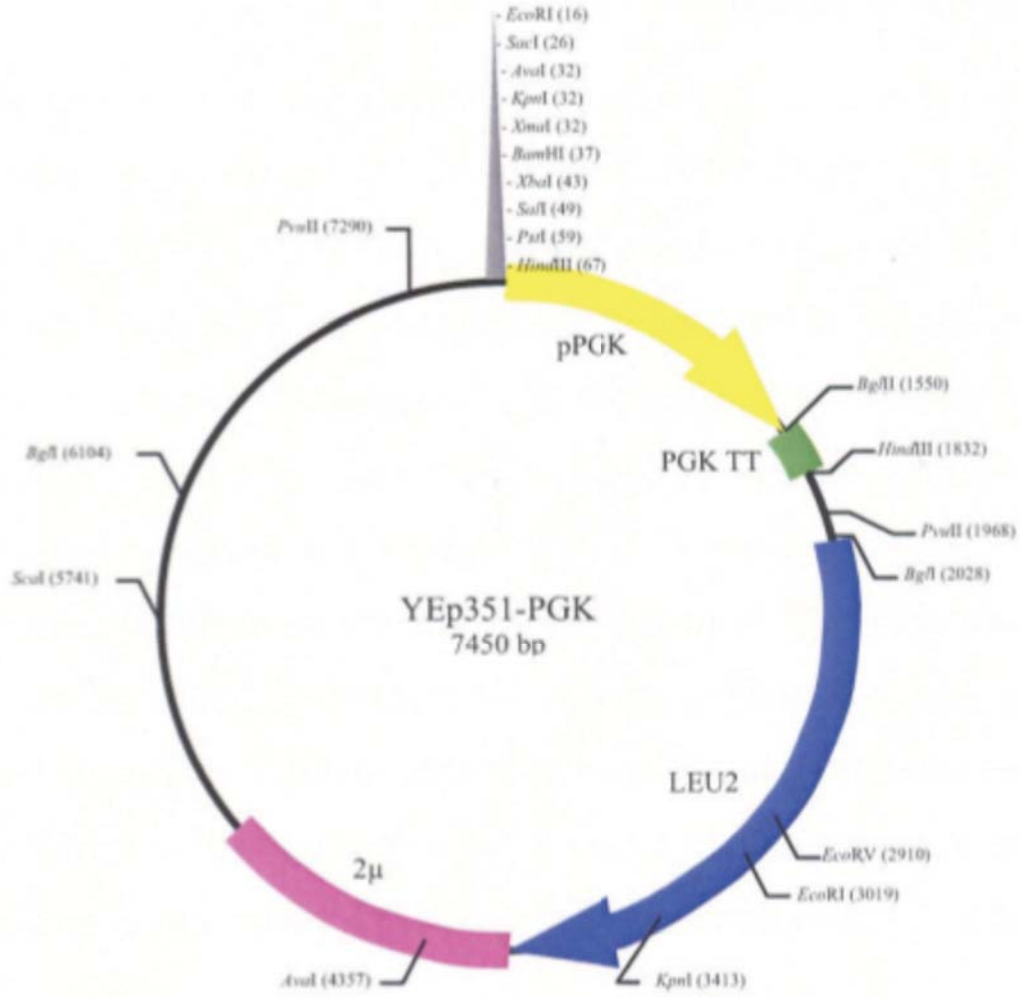


Anexo 3: Mapa do vetor de clonagem pBlueScript II KS+ (Promega)



J
J

Anexo 4: Mapa do vetor YEp 351 – PGK



Anexo 5: Mapa do vetor pYC230

