

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

Produção de quimosina B de *Bos taurus*
em *Pichia pastoris*

Juliana de Amorim Araújo

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Torres

Brasília, DF

2008

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

Produção de quimosina B de *Bos taurus*
em *Pichia pastoris*

Juliana de Amorim Araújo

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Torres

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

2008

Juliana de Amorim Araújo

Produção de quimosina B de *Bos taurus*
em *Pichia pastoris*

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

15 Fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Araripe Torres

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

Jamais a bandeira abaixada, jamais a última tentativa.

- Sir Ernest Shackleton

*Dedico esta conquista aos meus pais pelo
imenso amor, constante estímulo, enorme
compreensão e orações.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, pela oportunidade, pelos primeiros ensinamentos de Biologia Molecular, pelo constante apoio e pela confiança depositada na realização desse projeto.

À professora Dra. Lídia Pepe Moraes, por todos os conselhos, ensinamentos, paciência e, principalmente, pelas ajudas na bancada.

Aos meus pais (Edwin e Solange) pelo amor incondicional, carinho e incentivo.

Ao Isnard (Vi)... pela presença em minha vida. Pelo amor, pelos momentos de distração, pela ajuda, pelo carinho, por tudo.

Ao meu irmão e familiares, que sempre me apoiaram durante toda a vida.

A família Queiroz: Isnard, Ângela e Catherine pelo acolhimento e carinho durante a estada em Brasília.

Aos amigos de Recife por todas as férias!!!

Aos amigos do coração Marciano e Theyssa pela grande amizade, carinho, ajuda, conversas, palhaçadas e principalmente pelas saídas de quarta-feira. “Existem pessoas em nossas vidas que nos fazem bem pelo simples fato de terem cruzados nossos caminhos”.

Aos amigos Luane, Nádia e Saulo que me receberam no laboratório, por toda a ajuda, paciência, força e ensinamentos.

A Viviane Reis, pela amizade e pela ajuda do primeiro ao último dia de realização desse trabalho.

A Camila Marinho Silva pela convivência (quase) diária.

Aos amigos do Lab 2, que tornaram a estada no laboratório mais prazerosa: Andreilisse, Alexsandro, Basti, Loise, Karen, Carolina, Janice, Patrícia, Tatiana, Pollyanna e Hugo.

As amigas Mariana, Cristiane, Verônica e Adriana, que mesmo pelo curto tempo de convivência, foram muito importantes.

Ao Bruno Benoliel pelas ajudas nas horas mais desesperadoras no laboratório e pelos lanches do final da tarde.

Ao Roberto, Érico, e Bárbara pela ajuda neste trabalho durante o curso de Biotecnologia de Leveduras.

Ao Túlio (Gabiru), por todas as chatices... e pelo Bradford.

Ao Félix da enzimologia pela ajuda na purificação da enzima.

Ao Guilherme pela enorme ajuda de última hora com as análises estatísticas.

Aos funcionários da Biomol, Ivonildes e Fátima pelo apoio técnico, sem o qual seria difícil a realização deste trabalho.

Aos amigos, Diogo, Débora, Ivo, Ed, Pedro, Paty, Sabão, Angélica, Aníbal, Su, Raul, Jana, pelas sextas no Fausto.

Aos demais Professores do laboratório de Biologia Molecular: Marcelo Brígido, Andréa Maranhão, Élica Campos, Márcio Poças, Ildinete Pereira e Maria Sueli S. Felipe pela amizade e por todo o apoio durante o tempo no laboratório.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Abreviaturas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. Introdução	
1.1 Quimosina	1
1.2 <i>Pichia pastoris</i>	8
2. Objetivos	
2.1 Geral	14
2.2. Específicos	14
3. Estratégia	15
4. Material	
4.1 Microrganismos utilizados	16
4.1.1 Bactérias	16
4.1.2 Leveduras	16
4.2 Enzimas	16
4.3 Marcadores	17
4.4 <i>Kits</i>	17
4.5 Ferramentas de bioinformática	18
4.6 Vetores	18
4.7 Meios de cultura e soluções	19
4.7.1 Meios para bactérias	19
4.7.2 Meios para leveduras	19
4.8 Extração de DNA plasmidial	22
4.9 Análise de DNA em gel de agarose	22
4.10 Análise de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	23
4.11 Revelação de proteínas com <i>Coomassie blue</i>	24
4.12 Revelação de proteínas com nitrato de prata	24
4.13 Extração de DNA genômico de levedura	25
4.14 Soluções para <i>Southern blotting</i>	26

4.15 Soluções para ensaio de atividade enzimática	27
4.16 Solução para quantificação de proteína	27
5. Métodos	
5.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição	28
5.2 Análise em gel de agarose	28
5.3 Purificação e eluição de fragmentos de DNA	28
5.4 Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)	28
5.5 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico	29
5.6 Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	29
5.7 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep)	29
5.8 Preparação de DNA plasmidial em media escala (midi-prep)	30
5.9 Transformação de <i>P. pastoris</i> por eletroporação	30
5.10 <i>Screening</i> em placas de <i>deep well</i>	31
5.11 Indução e expressão de recombinantes em frasco	32
5.12 Ativação da pró-quimosina	32
5.13 Ensaio de coagulação do leite	32
5.14 Força ativa da enzima	33
5.15 Teste de atividade proteolítica	33
5.16 Quantificação de proteínas totais por Bradford	33
5.17 Precipitação de proteínas por TCA e acetona	33
5.18 Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	34
5.19 Coloração com <i>Coomassie blue</i>	34
5.20 Coloração com prata	34
5.21 Extração de DNA total da levedura <i>P. pastoris</i>	35
5.22 <i>Southern blotting</i>	35
5.22.1 Digestão do DNA total de <i>P. pastoris</i>	35
5.22.2 Sistema de transferência para membrana	35
5.22.3 Marcação da sonda, pré-hibridação e hibridação	36
5.22.4 Geração e detecção do sinal	36
5.22.5 Remoção da sonda para reutilização da membrana	36
5.22.6 Sondas utilizadas	37
5.23 Análise de resistência a zeocina	37
5.24 Otimização das condições de cultivo em frasco (clone transformado com	37

o vetor pPIC9)	
5.25 Otimização das condições de cultivo em frasco (clone transformado com o vetor pPZ α)	39
5.26 Cultivo em fermentador (clone transformado com o vetor pPIC9)	40
5.27 Cultivo em fermentador (clone transformado com o vetor pPZ α)	41
5.28 Medida do peso seco	41
5.29 Purificação da enzima	41
5.29.1 Cultura para purificação da enzima	41
5.29.1 Concentração do sobrenadante	42
5.29.2 Cromatografia de exclusão molecular	42
5.29.3 Concentração da amostra	42
5.30 Caracterização da proteína	42
5.30.1 Ativação	42
5.30.2 Deglicosilação	43
5.30.3 Ensaio de especificidade sobre caseínas	43
6. Resultados	
6.1 Síntese do gene da pró-quimosina B de <i>Bos taurus</i>	44
6.2 Construção do vetor pPIC9-CHYM	47
6.3 Construção do vetor pPZ α -CHYM e pPGKZ α	50
6.4 Transformação de <i>P. pastoris</i> e detecção da atividade enzimática	53
6.5 <i>Southern blotting</i> do clone A3	60
6.6 <i>Southern blotting</i> do clone P1	62
6.7 Estimativa do número de cópias integradas do cassete de expressão no DNA genômico do clone P1	63
6.8 Otimização da produção de pró-quimosina pelo clone A3	63
6.9 Otimização da produção de pró-quimosina pelo clone P1	65
6.10 Cultivo do clone A3 em fermentador	67
6.11 Cultivo do clone P1 em fermentador	69
6.12 Purificação e caracterização enzimática	70
7. Discussão	76
8. Conclusões e perspectivas	87
9. Referências bibliográficas	88
10. Anexos	

- Anexo 1. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9
- Anexo 2. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPICZ α
- Anexo 3. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPZ α -Amy
- Anexo 4. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9-Amy
- Anexo 5. Representação esquemática do mapa físico do vetor pBSSK-CHYM
- Anexo 6. Tabela dos códons preferenciais de *P. pastoris*

Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da pré-pró-quimosina.	3
Figura 2. Estrutura tridimensional da quimosina bovina.	4
Figura 3. A) Seqüência primária do gene CHYMb. B) Alinhamento e tradução predita das seqüências de nucleotídeos do gene nativo e sintético da pré-quimosina.	45-46
Figura 4. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pPIC9-CHYM.	48
Figura 5. Análise de restrição para confirmação do vetor pPIC9-CHYM em gel de agarose 0,8 %.	49
Figura 6. Análise da digestão do vetor pPIC9-CHYM para liberação do cassete de integração em gel de agarose 0,8 %.	50
Figura 7. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pPZ α -CHYM.	51
Figura 8. Análise de restrição para confirmação do vetor pPZ α -CHYM em gel de agarose 0,8 %.	52
Figura 9. Análise de restrição para confirmar a ligação do promotor <i>PGK1</i> ao vetor pPICZ α em gel de agarose 0,8 %.	53
Figura 10. Cultura em frasco dos clones A3, P1 e controles negativos.	57
Figura 11. Cultura em frasco dos clones A3, P1 e controles negativos com adição de glicose, durante o experimento, à cultura do clone P1.	58
Figura 12. Ensaio de atividade em placa de agarose e leite.	59
Figura 13. Análise do perfil protéico do sobrenadante das culturas dos clones A3 e P1 em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com <i>Coomassie blue</i> .	60
Figura 14. <i>Southern blotting</i> com DNA genômico de <i>P. pastoris</i> clone A3.	61
Figura 15. <i>Southern blotting</i> com DNA genômico de <i>P. pastoris</i> clone P1.	62
Figura 16. Teste de resistência a zeocina.	63
Figura 17. Perfil do cultivo do clone A3 em fermentador	68
Figura 18. Análise dos sobrenadantes da fermentação em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com prata.	69
Figura 19. Curva de atividade de quimosina durante o cultivo do clone P1 em	70

fermentador.

Figura 20. Perfil cromatográfico da amostra de quimosina em uma coluna Sephacryl S-100.	71
Figura 21. Análise das frações de proteínas do processo de purificação em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com prata.	72
Figura 22. Caracterização da enzima recombinante produzida por <i>P. pastoris</i> em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com prata.	73
Figura 23. Análise da digestão de caseínas com quimosina em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com <i>Coomassie blue</i>	74
Figura 24. Análise diferentes fontes de quimosinas de em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com prata.	75
Figura 25. Representação esquemática da inserção do vetor no genoma de <i>P. pastoris</i> por um simples evento de <i>crossover</i> no <i>locus GAP</i> .	79
Figura 26. Representação esquemática da inserção dos vetores pPZ α -CHYM e pPGK α no genoma de <i>P. pastoris</i> .	80

Tabela 1. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2^3).	38
Tabela 2. Combinação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio.	39
Tabela 3. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2^2).	40
Tabela 4. <i>Screening</i> dos clones A3, A6, A4 e A56.	55
Tabela 5. <i>Screening</i> dos clones P1, P3 e P28.	55
Tabela 6. Resultados do planejamento fatorial completo (2^3).	64
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática (U.mL^{-1}).	65
Tabela 8. Resultados da combinação das fontes de nitrogênio e carbono.	66
Tabela 9. Resultados do planejamento fatorial completo (2^2).	66
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para a força ativa da enzima.	67

A	adenina
ADP	adenosina difosfato
Ala	alanina
Amy	α -amilase
AOX	proteína álcool oxidase
<i>AOX1</i>	gene que codifica para a álcool oxidase 1
<i>AOX2</i>	gene que codifica para a álcool oxidase 2
APS	persulfato de amônio
Asn	asparagina
Asp	aspartato
ATP	adenosina trifosfato
C	citossina
CaCl₂	cloreto de cálcio
cm	centímetro
Da	Daltons
DNA	ácido desoxiribonucléico
DO	oxigênio dissolvido
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
G	guanina
g	grama
<i>GAP</i>	gene que codifica para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Glu	glutamato
Gly	glicina
h	hora
HCl	ácido clorídrico
His	histidina
<i>HIS4</i>	gene que codifica para a histidinol desidrogenase
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilo base
kDa	quilo Daltons
KOH	hidróxido de potássio

KV	quilo Volts
L	litro
Lys	lisina
M	molar
mA	miliampères
min	minutos
Met	metionina
mg	miligrama
MgCl₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ms	milisegundos
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD₆₀₀	densidade óptica a 600 nm
pb	pares de base
<i>PGKI</i>	gene que codifica a 3-fosfoglicerato quinase
pH	potencial hidrogeniônico
Phe	fenilalanina
PNGase	N-Glicosidase F
p/v	peso/volume
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
Ser	serina
T	timina
TAE	tampão Tris-acetato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletlenodiamina
Thr	tirosina

U	unidade
v	volume
V	Volts
v/v	volume/volume
YNB	<i>yeast nitrogen base</i> (Base nitrogenada de levedura)
<i>x g</i>	força gravitacional
°C	graus Celsius
μF	microFaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro

A coagulação enzimática do leite para fabricação de queijo envolve a quebra de uma ligação peptídica da caseína κ por uma protease aspártica. Tradicionalmente, esta clivagem é feita em escala industrial pela ação da quimosina bovina que combina uma forte atividade de coagulação do leite com uma baixa atividade proteolítica. No presente estudo, é relatada a expressão, purificação e caracterização de quimosina recombinante bovina na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Para alcançar altos níveis de produção, o cDNA do fragmento codante da pró-quimosina B bovina foi desenhado e sintetizado *in vitro* otimizando o *codon usage* para a expressão em *P. pastoris*. O gene sintético (CHYMb) foi clonado em vetores de expressão contendo os promotores *PGK1* (expressão constitutiva) e *AOX1* (expressão induzida) seguindo-se integração no genoma da levedura. Os clones transformantes com maior produção enzimática de cada sistema (P1 e A3, respectivamente) foram analisados em culturas simultâneas para comparação da produção enzimática. Maiores níveis de atividade de quimosina foram observados no clone sob o comando do promotor *PGK1*, que apresentou alta produção durante toda a cultura. Uma otimização na produção enzimática foi desenvolvida através de planejamentos fatoriais. A influência da densidade celular inicial, metanol e concentração da fonte de nitrogênio foram avaliados para aumentar a produção do clone A3. A interação dos fatores densidade celular inicial e concentração de metanol foi determinada como sendo o parâmetro mais importante, dobrando a produção. A influência de diferentes concentrações da fonte de nitrogênio e carbono, previamente selecionados (farelo de soja e açúcar invertido), foi também analisada para aumentar a produção enzimática no clone P1. Foi demonstrado por análise estatística que maiores concentrações de cada fator aumentam a produção. O perfil de atividade enzimática foi avaliada em fermentador com as condições determinadas nas otimizações. A atividade encontrada nos dois casos (A3 e P1) foi superior àquelas encontradas na fermentação em frascos. A quimosina recombinante foi posteriormente purificada apenas por uma etapa de cromatografia de exclusão molecular. Foi demonstrada a presença de enzima já processada no sobrenadante da cultura e uma fração de proteínas glicosiladas. A especificidade pela caseína κ foi demonstrada ser semelhante à quimosina comercial recombinante produzida por *Aspergillus niger* (Chr. Hansen). A alta produção de quimosina recombinante com alta especificidade em *P. pastoris* faz esse sistema de expressão atrativo para produção industrial desta enzima.

Enzymatic milk coagulation for cheese manufacturing involves the cleavage of the scissile bond in κ casein by an aspartic protease. Bovine chymosin B is commonly used at the industrial level for milk coagulation because it combines a strong clotting activity with a low general proteolytic activity. In the present study, we report the expression, purification and characterization of recombinant chymosin B expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. To achieve high levels of production, the cDNA fragment coding for prochymosin was designed and synthesized based on codon usage optimization for expression in *P. pastoris*. The synthetic gene (CHYMb) was cloned into expression vectors based on the *PGK1* promoter (constitutive expression) and *AOX1* promoter (inducible expression). The resulted constructs were integrated in the yeast genome. Transformant clones producing high levels of enzyme activity from each system (P1 and A3, respectively) were analyzed in a simultaneous culture for comparison of enzymatic production. High levels of chymosin activity were observed in the clone controlled by the *PGK1* promoter which showed high production levels throughout the culture. Optimization for enzymatic production was developed through factorial design. The influence of the initial cellular density, methanol and nitrogen source concentration were accessed for enzymatic production from clone A3. The interaction of the initial cellular density and methanol concentration was responsible for doubling enzyme production. The influence of different concentrations of nitrogen and carbon sources (soy extract and inverted sugar, respectively) was also observed to increase enzymatic production in clone P1. Statistic analysis demonstrated that higher concentrations of each factor increased enzyme production. The profile of enzymatic activity was evaluated in fermentors under the conditions determined during optimizations. In this case, the activities observed in clones A3 and P1 were superior to those found when these clones were grown in shake flasks. The recombinant chymosin was purified by a single molecular exclusion chromatographic step. Purified enzyme derived from supernatant fraction was shown to be present in its processed form and a fraction of glycosylated protein was also detected. The specificity for casein κ was shown to be similar to that from commercial recombinant chymosin produced by *Aspergillus niger* (Chr. Hansen). The high production and high specificity of recombinant chymosin derived from *P. pastoris* renders this expression system as an attractive alternative for large scale industrial production of this enzyme.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quimosina

A quimosina (EC 3.4.23.4), também conhecida como renina, é uma aspartil protease encontrada no abomaso (quarto estômago dos ruminantes) de bezerros lactantes e de outros ruminantes jovens. O papel desta enzima na digestão é o de coagular o leite ingerido e produzir uma massa semilíquida, aumentando o tempo de permanência do leite no organismo e permitindo a ação das enzimas proteolíticas (Fox & McSweeney, 1999).

O comportamento funcional da quimosina é marcadamente diferente das outras proteínas gástricas aspárticas. Enquanto estas apresentam ampla especificidade e processam com eficiência todas as proteínas no lúmen gástrico, a quimosina é específica para uma das caseínas do leite, apresentando baixa atividade proteolítica sobre as outras proteínas. Devido a essa baixa atividade proteolítica extremamente específica por seu substrato, e por possuir uma alta atividade de coagulação do leite, esta enzima tornou-se atraente para a indústria de queijo (Foltmann, 1970; Beppu, 1993).

O leite bovino contém dois grupos diferentes de proteínas, as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas representam aproximadamente 83 % do nitrogênio total do leite bovino e consistem de quatro proteínas principais: α -S1, α -S2, β e κ , na proporção de 40:10:35:12. Todas as caseínas são fosforiladas, mas devido ao alto conteúdo de fosfato, as caseínas α -S1, α -S2 e β ligam-se fortemente ao cálcio e precipitam. Já a caseína κ , que tem apenas um resíduo fosfato, não apresenta essa propriedade e é solúvel em altas concentrações deste íon. Quando secretadas, as caseínas se auto-associam em agregados - as regiões hidrofóbicas se localizam no interior e as regiões hidrofílicas ficam expostas à água (Chitpinyol & Crabbe, 1998). A caseína κ também reage hidrofobicamente com as outras caseínas, deixando o segmento carboxi-terminal, que é altamente polar, exposto ao solvente causando repulsão eletrostática entre as micelas e impedindo a coagulação. Assim, mais de 95 % das caseínas existem naturalmente como grandes partículas coloidais ou micelas de 90 a 150 nm de diâmetro sendo a caseína κ a principal estabilizadora e solubilizadora destes agregados (Mohanty *et al.*, 1999).

A coagulação do leite pela quimosina é um processo de duas etapas: a primeira fase (catalítica) começa com o reconhecimento específico da seqüência His98-Lys111 da caseína κ (Beppu, 1993; Mohanty *et al.*, 1999) e posterior clivagem proteolítica específica da ligação Phe105-Met106. Essa quebra resulta na liberação de um fragmento solúvel chamado macropeptídeo que passa para o soro, e outro, chamado p - κ -caseína insolúvel que permanece na micela. A p - κ -caseína não tem a propriedade de estabilizar a estrutura micelar, causando diminuição na repulsão eletrostática entre as micelas (Reid *et al.*, 1997). A fase seguinte, não enzimática, consiste na agregação da p - κ -caseína com as outras caseínas sob a associação de íons cálcio, o que, eventualmente, resulta na formação do coágulo micelar. Este fenômeno é, portanto, produzido pela desestabilização da solução coloidal da caseína que origina a aglomeração de micelas livres concentrando a proteína do leite e retendo gordura. A fase aquosa contendo os elementos hidrossolúveis constitui o soro (Lawrence *et al.*, 1998).

A quimosina é produzida intracelularmente na forma pré-pró-quimosina, caracterizada como uma proteína de 381 resíduos de aminoácidos (Figura 1). Os 16 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos iniciais consistem em uma seqüência sinal, importante na secreção da enzima pela membrana celular. Esta seqüência sinal é removida durante a via de secreção e, no estômago, a enzima se apresenta na sua forma inativa, a pró-quimosina, de massa molecular 40777 Da. Sob as condições ácidas do estômago (pH <5) a pró-quimosina torna-se quimosina por ativação autocatalítica e perda de 42 resíduos de aminoácidos N-terminais (Pedersen *et al.*, 1978). É proposto que esta dependência do pH para a ativação exista devido a interações eletrostáticas entre os resíduos básicos no segmento “pró” e os resíduos ácidos na porção ativa da enzima. Em pH neutro, as interações eletrostáticas mantêm o zimogênio na forma inativa estabilizando a posição do segmento “pró” no sítio ativo. Em pH <5, os resíduos ácidos na porção ativa da enzima se tornam protonados, rompendo as interações eletrostáticas e promovendo mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da proteína (Richter *et al.*, 1998).

Bioquimicamente, a quimosina é uma proteína com cadeia polipeptídica única de 323 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 35600 Da (Gilliland *et al.*, 1990; Newman *et al.*, 1991). Existem duas formas alélicas da quimosina de bezerros naturalmente produzidas: quimosinas A e B, que diferem em apenas um resíduo de

aminoácido na posição 244: um aspartato na quimosina A e uma glicina na quimosina B. A presença desses aminoácidos promove uma maior afinidade da quimosina A pela caseína κ devido a uma estabilização eletrostática adicional do complexo caseína- κ -quimosina, e uma maior estabilidade da quimosina B em pH baixos (Chitpinyol & Crabbe, 1998).

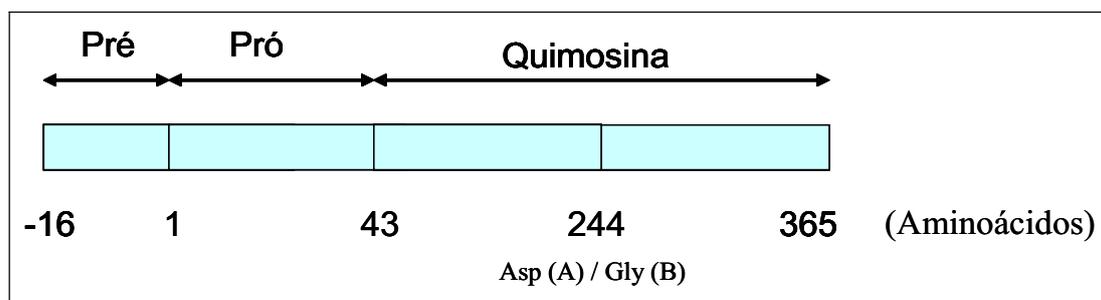


Figura 1. **Representação esquemática da estrutura primária da pré-pró-quimosina.**

A estrutura secundária da quimosina é constituída principalmente por folhas β e alguns poucos segmentos de α hélice (Mohanty *et al.*, 1999) (Figura 2). Em sua estrutura terciária, a proteína adota uma forma bilobular, que consiste nos domínios N-terminal e C-terminal, divididos por um profundo sulco, onde está presente o sítio ativo. A estrutura bilobular da quimosina é estabilizada por uma rede de pontes de hidrogênio envolvendo os resíduos de aminoácidos Thr33, Ser35, Thr216, Thr218, Gly217, Gly34, e por três pontes dissulfeto. Cada lóbulo da enzima contribui com um resíduo de ácido aspártico (Asp32 e Asp215) para o aparato catalítico. Existem três sítios potenciais de N-glicosilações (Asn-X-Ser/Thr), porém, apenas dois são efetivamente glicosilados. Não existem sítios para O-glicosilações (Foltmann, 1992; Szecsi, 1992).

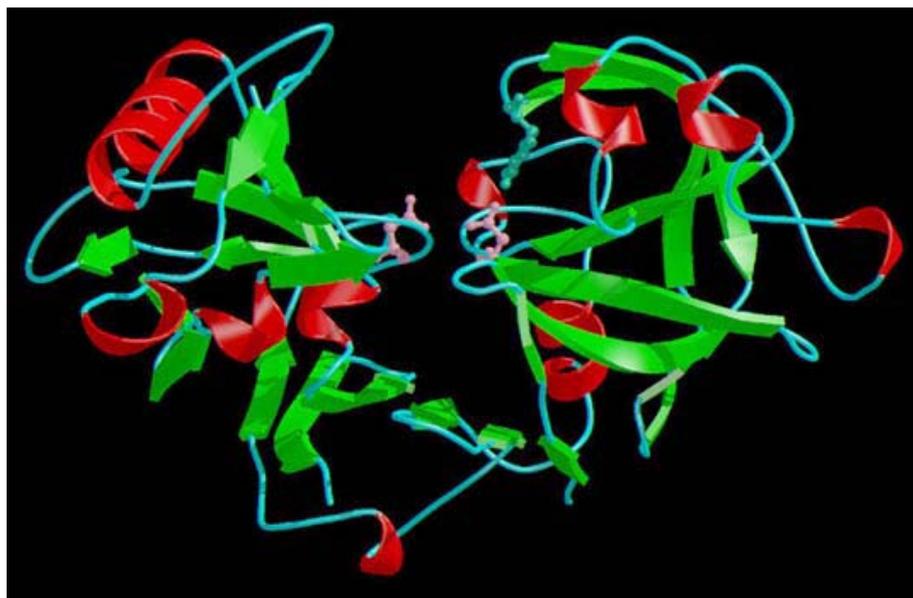


Figura 2. **Estrutura tridimensional da quimosina bovina.** Em vermelho, as α -hélices, em verde, as folhas β pregueadas e em rosa, os resíduos de ácido aspártico catalíticos (Asp32 e Asp 215). Figura extraída do *site* MEROPS (<http://www.merops.sanger.ac.uk/>).

Extratos enzimáticos obtidos do abomasso de bezerros lactantes, que contém 84 % de quimosina, são tradicionalmente utilizados como agentes coagulantes do leite na fabricação de queijo. Esses extratos são extraídos pela lavagem e secagem do estômago, que é cortado em pequenos pedaços e macerado em uma salmoura contendo aditivos necessários à preparação e à conservação, durante 4-5 dias. Esta solução, que na verdade é uma mistura de quimosina com outras enzimas gástricas, é adicionada na etapa inicial do processo de produção de queijo, em quantidades determinadas segundo a receita de cada queijo (Mohanty *et al.*, 1999).

O exato processo de fabricação do queijo varia entre os diferentes tipos, porém, todos são feitos essencialmente pelo mesmo método. O leite é inicialmente pasteurizado para eliminar bactérias patogênicas e uma cultura inicial de bactérias lácteas é adicionada. Essa cultura converte lactose em ácido lácteo, o que ajuda no processo de coagulação. Alguns queijos são inteiramente coagulados por essas bactérias e são conhecidos como queijos coalho-lácteos ou coalho-ácidos. Essa coagulação por acidificação acontece como consequência da perda da carga elétrica da caseína ao alcançar o ponto isoelétrico. A queda do pH produzida pelo ácido reduz a ionização negativa das micelas até sua neutralização promovendo a aglomeração das micelas e a

conseqüente coagulação. No entanto, a coagulação enzimática é o método mais utilizado, pois apresenta maior rendimento em relação à coagulação ácida. A adição da enzima quimosina, promove a coagulação do leite que se separa em duas fases, coalho e soro, processo este chamado “coalhagem”. O coalho é, então, drenado, colocado em formas e prensado. Depois de prensados, os blocos podem ser tratados de inúmeras maneiras ou moldados em diferentes formas dependendo do tipo de queijo. A etapa final é a maturação, que pode variar de quatro semanas a três anos, e é muito importante na definição da aparência, textura e sabor do queijo (Johnson & Lucey, 2006).

Nos anos 1960, a FAO (*Food and Agriculture Organization*) previu uma severa queda no uso da quimosina de bezerro. Foi antecipado que uma demanda de carne poderia levar à necessidade de abater os bezerros em uma idade mais madura, o que reduziria a produção de quimosina (quanto mais jovem o animal, mais enzima é secretada) (Moschopoulou *et al.*, 2006). A necessidade de carne, a desaprovação do uso de enzima animal por alguns grupos religiosos, e o custo elevado devido ao sacrifício de bezerros, fez com que os fabricantes de queijo buscassem por fontes alternativas de menor custo, que não afetassem a qualidade dos queijos (Chitpinityol & Crabbe, 1997).

A pepsina de porco surgiu como primeira alternativa à quimosina bovina, mas o alto grau de atividade proteolítica apresentado por esta enzima mostrou-se indesejável pelo gosto incomum que confere ao queijo. Enzimas com uma atividade proteolítica alta podem ser eficientes em coagular o leite rapidamente, mas, devido à indesejável ação proteolítica sobre as caseínas α e β durante a coagulação, levam a perdas no rendimento da produção. Essa alta atividade pode também promover uma desestruturação da matriz de caseína e alterar a consistência característica dos queijos (Kappeler *et al.*, 2006).

Alguns microrganismos foram identificados como produtores de quimosinas. Essas quimosinas microbianas foram caracterizadas como menos proteolíticas que a pepsina de porco e um pouco mais ativas que as de bezerro. Um número de fungos e bactérias foi identificado como potenciais fontes de quimosina, especialmente, *Mucor pusillus*, *Mucor meihei*, *Entothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactis* (Beldarraín *et al.*, 2000; Sardinias, 1967; Aikawa *et al.*, 1990). Atualmente, algumas indústrias utilizam quimosinas microbianas produzidas por algumas destas fontes já que os custos são reduzidos e podem ser produzidas em quantidades satisfatórias em

fermentações industriais. Entretanto, a demanda por quimosina animal, a enzima de preferência, que produz um gosto característico aos queijos ainda é preferível já que existem problemas associados com os queijos produzidos por fontes microbianas. A atividade proteolítica destas enzimas causa problemas secundários (ex: dificuldades com o endurecimento do coalho e perda significativa de gordura e proteínas no soro), conseqüentemente, o rendimento do queijo é menor e podem desenvolver um gosto diferente e um sabor amargo (Rao, 1984).

Como uma possível solução para se obter uma molécula similar a quimosina animal, foi proposta a clonagem do gene que codifica a quimosina mediante técnicas de DNA recombinante. Em anos recentes essa tecnologia permitiu que o gene da quimosina animal fosse clonado e expresso com sucesso, como um produto da fermentação de linhagens não-patogênicas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Wang (1995) construiu um plasmídeo que permitiu a hiperexpressão da pró-quimosina (39 % do total de proteína celular) na bactéria *Escherichia coli* K-12. No entanto, a quimosina produzida nesta bactéria acumula em corpos de inclusão aumentando consideravelmente o custo do processo de purificação (Nishimori *et al.*, 1982; Emtage *et al.*, 1983; Marston *et al.*, 1985). Outros sistemas de bactérias foram usados para expressar a pró-quimosina. Parente *et al.* (1991) clonaram a seqüência do gene da pró-quimosina em *Bacillus subtilis*, no entanto, também obtiveram a expressão da enzima como um agregado insolúvel. A produção extracelular da pró-quimosina foi conseguida fusionando o gene da enzima com uma seqüência sinal da proteína subtilisina de *B. subtilis*. No entanto foram obtidos apenas baixos níveis de expressão (100 µg.l⁻¹). A clonagem em *Lactococcus lactis* também apresentou níveis de produção muito baixos (Simon *et al.*, 1991) assim como em *Proteus mirabilis* (Kaprálek *et al.*, 1991).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os genes codificando para pré-pró-quimosina, pró-quimosina e quimosina madura foram expressos, mas as proteínas foram sintetizadas principalmente na forma insolúvel, acumulando nas células e dificultando a ativação e purificação. Já a levedura *Kluyveromyces lactis* foi usada com sucesso na secreção da pró-quimosina. Os fungos filamentosos *Aspergillus niger* var. *awamori* e

Trichoderma reesei também apresentaram altos níveis de expressão de quimosina bovina recombinante. A produção em *A. niger* chegou a 1,3 g.L⁻¹ combinando mutagênese e um eficiente programa de *screening* (Goff *et al.*, 1984; van den Berg *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990; Dunn-Coleman *et al.*, 1991; Harkki *et al.*, 1989; Cardoza *et al.*, 2003). Atualmente, apenas três empresas internacionais (Pfizer, Chr-Hansen e Girst Brocades) produzem e comercializam quimosinas recombinantes (Mohanty *et al.*, 1999).

Recentemente, alguns grupos vêm trabalhando na caracterização de quimosinas de outros animais como carneiro, búfalo e camelo (Kumar *et al.*, 2006; Rogel *et al.*, 2001; Mohanty *et al.*, 2003; Houen *et al.*, 1996; Vega-Hernandez *et al.*, 2004; Kappeler *et al.*, 2006). Algumas modificações na estrutura do gene, como a adição de sítio de glicosilação, também têm sido testadas com o objetivo de melhorar a produção enzimática (van den Brink *et al.*, 2006; Berka *et al.*, 1991; Chipinityol *et al.*, 1998).

A quimosina recombinante teve sua aprovação em 1980 reduzindo o abate de animais ainda jovens e trazendo grande economia à indústria de laticínios. Trata-se da primeira enzima recombinante a ser registrada e permitida pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso alimentar. Hoje, aproximadamente 80 % dos queijos fabricados no mundo são feitos com essas fontes de quimosina. Este tipo de produção é de grande importância já que diminui o custo em 40-50 % e se obtém proteínas mais puras e mais previsíveis em termos de atividade, quando comparadas com aquelas extraídas do estômago de bezerros (Green *et al.*, 1985; Kawaguchi *et al.*, 1987; Hicks *et al.*, 1988; Bines *et al.*, 1989; Flamm, 1991; Ward & Kodama, 1991; Brusgard, 1993). As quimosinas recombinantes são submetidas a rigorosos testes bioquímicos, toxicológicos e microbiológicos para garantir a sua pureza. Foi concluído pelo FDA que as enzimas recombinantes são idênticas e mais puras que os extratos enzimáticos extraídos de bezerro, o que conferiu o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para estas preparações. O rendimento, a textura e a qualidade dos queijos utilizando-se essas enzimas são comparáveis à quando são usadas enzimas naturais (Johnson & Lucey, 2006).

No Brasil é fabricada uma grande variedade de queijos. A ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo) calcula que existam cerca de 2.500 laticínios produzindo queijos no País. De um modo geral, o consumo de todos os tipos de queijo

está crescendo, seja de forma direta ou indireta e a quimosina utilizada pela maioria das indústrias brasileiras é a enzima recombinante, que é importada. Não existe no Brasil produção de quimosina recombinante, apenas são produzidos coalhos naturais através da extração do estômago de bezerro. Embora o custo da quimosina recombinante seja superior ao da quimosina natural produzida por indústrias brasileiras, a preferência pela recombinante se deve principalmente à pureza das preparações quando comparadas às naturais que vêm contaminadas com outras proteases.

A expressão de quimosina por microrganismos é, portanto, de grande interesse industrial devido à limitada disponibilidade do produto no mercado nacional. A quimosina recombinante é potencialmente útil na fabricação de queijo e pode substituir por completo as enzimas de origem animal sem nenhuma alteração na qualidade do queijo. Além deste benefício, a enzima recombinante é de alta pureza e especificidade, com baixa atividade proteolítica, e conta com a aprovação de consumidores vegetarianos. Os queijos que utilizam essa forma de quimosina não são considerados produzidos por um GMO (*Genetically Modify Organism – Organismo Geneticamente Modificado*), mas sim, por um produto deste. Conseqüentemente, todos os queijos vendidos são *GMO free*. O aumento dos esforços para a expressão de quimosina em microrganismos no Brasil é, pois, de grande interesse comercial por diminuir os custos da produção e conseqüentemente, do produto final.

1.2 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica muito utilizada atualmente na expressão de proteínas heterólogas para pesquisa básica e uso industrial. Usando este sistema, mais de 400 proteínas já foram expressas nesta levedura com graus variados de sucesso (Cregg *et al.*, 2001). Dentre as características vantajosas de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga, destacam-se as seguintes: a levedura desfruta do status GRAS, é de fácil manipulação genética, expressa proteínas em altos níveis, e possui uma via eucariótica de secreção capaz de promover modificações pós-traducionais como formação de pontes dissulfeto, O- e N- glicosilação e processamento de seqüências sinais (Hohenblum *et al.*, 2004). Esse sistema é também considerado de uso rápido, fácil, e mais econômico que os sistemas de expressão derivados de eucariotos

superiores, como os sistemas baseados em cultura de células de mamíferos (Gellissen, 2000).

As leveduras metilotróficas têm a habilidade de utilizar metanol como única fonte de carbono. O primeiro passo no metabolismo do metanol é sua oxidação a formaldeído, usando oxigênio molecular e gerando peróxido de hidrogênio, pela enzima álcool oxidase (AOX). As reações iniciais ocorrem nos peroxissomas, seguido por uma etapa metabólica subsequente no citoplasma. Existem dois genes em *P. pastoris* que codificam para AOX – *AOX1* e *AOX2* – sendo o primeiro responsável por 85 % da atividade de álcool oxidase na célula. A AOX tem baixa afinidade por O₂ e as leveduras metilotróficas compensam esta deficiência sintetizando grandes quantidades desta enzima (Cregg & Cereguino, 2000; Jahic, 2003; Gellissen, 2000).

A Companhia Philips Petroleum foi a primeira a desenvolver meios e protocolos para o crescimento de *P. pastoris* em cultura contínua com metanol a altas densidades visando à exploração desta levedura para geração de biomassa, ou *single cell protein* (SCP), e utilização como ração animal devido ao baixo custo do metanol originado do gás natural metano. Porém, com a crise do petróleo e o conseqüente aumento do custo do metano, o processo de produção de SCP tornou-se economicamente inviável na época. Então, no início da década de 80, a Phillips Petroleum contratou a companhia de biotecnologia Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates (SIBIA) para desenvolver *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga. Pesquisadores do SIBIA desenvolveram vetores, linhagens e métodos para a manipulação genética de *P. pastoris* (Ellis *et al.*, 1985; Tschopp *et al.*, 1987; Cregg *et al.*, 1989; Koutz *et al.*, 1989).

O eficiente e altamente regulável promotor do gene da álcool oxidase 1 (*AOX1*) é o mais usado em vetores de expressão para dirigir a expressão de genes heterólogos. A expressão da álcool oxidase 1 é controlada em nível transcricional: em células crescidas em metanol ~5 % do RNA poliA⁺ provém do gene *AOX1* enquanto que em células crescidas em outras fontes de carbono, o mensageiro *AOX1* é indetectável (Cregg *et al.*, 2002). A regulação do gene é controlada por dois mecanismos: um envolvendo repressão/desrepressão e outro, indução. O promotor *AOX1* é fortemente reprimido quando as células crescem em glicose e na maioria das outras fontes de carbono. Contudo, a ausência de uma fonte de carbono repressora, como glicose, no meio não

resulta em uma transcrição substancial do *AOX1*, sendo, a presença de metanol como única fonte de carbono essencial, para a indução de altos níveis (Tschopp *et al.*, 1987). O crescimento celular em níveis limitantes de metanol induz dramaticamente a concentração de AOX, constituindo mais de 30 % do total de proteínas solúveis (Coudec & Baratti, 1980; Roggenkamp *et al.*, 1984). Embora o promotor *AOX1* seja utilizado com sucesso para expressar numerosos genes heterólogos, existem circunstâncias em que o promotor não é adequado. O uso de metanol para a produção de produtos alimentícios não é apropriada, por exemplo, também, o metanol é inflamável especialmente em quantidades requeridas para fermentações em larga escala (Cregg *et al.*, 2000). Portanto, promotores que não são induzidos por metanol são interessantes para expressão de certos genes em *P. pastoris*.

Devido aos altos níveis de expressão do gene *PGK1* que codifica 3-fosfoglicerato quinase (Baker, 1991), vetores carregando o promotor *PGK1*, que pode ser induzido por qualquer fonte de carbono, estão entre os mais eficientes sistemas usados para expressão constitutiva de proteínas heterólogas em diferentes leveduras e fungos filamentosos (Burke *et al.*, 2000), podendo servir como alternativa ao promotor *AOX1*. A 3-fosfoglicerato quinase é uma enzima glicolítica, que transfere o grupo fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, formando ATP e 3-fosfoglicerato. Esta enzima também atua na via gliconeogênica e pode constituir cerca de 5 % do total de proteínas celulares (Stanway *et al.*, 1989). Quando presente em um plasmídio, o promotor pode dirigir a produção da proteína para níveis de 30-40 % da proteína celular total, embora níveis menores sejam obtidos quando proteínas heterólogas são expressas. Este promotor é usado quando altas quantidades de expressão gênica são requeridas o que é particularmente atraente para a produção de proteínas em larga escala. Em nosso laboratório, o promotor do gene *PGK1* de *P. pastoris* foi isolado por Almeida *et al.* (2005) e, no momento, novos vetores de expressão estão sendo desenvolvidos baseados nesse sistema.

As técnicas requeridas para a manipulação molecular de *P. pastoris*, tais como transformação, substituição gênica e clonagem por complementação funcional, são semelhantes às descritas para *S. cerevisiae*, um dos mais bem caracterizados sistemas genéticos (Cregg & Cereguino, 2000). A forma preferencial de transformação em *P. pastoris* é pela integração cromossomal. Há várias vantagens em se usar esse tipo de

transformação: estabilidade do cassete de expressão, geração de transformantes com múltiplas cópias, controle do sítio de integração e a capacidade de construir diferentes modos de integração (Screekrishna *et al.*, 1997). Como em *S. cerevisiae* vetores lineares podem gerar transformantes em *P. pastoris* por recombinação homóloga entre seqüências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma da levedura. A integração no genoma pode ocorrer via inserção por um simples evento de *crossover*, ou por substituição gênica, através de duplo *crossover*. A integração por inserção ocorre mais frequentemente e, pode resultar em múltiplas integrações *in tandem* do cassete de expressão a uma taxa de 1-10 %, podendo aumentar a quantidade de proteína expressa. Transformações por substituição gênica geralmente resultam em transformantes de cópia única, porém são geneticamente mais estáveis.

Fisiologicamente, *P. pastoris* é um fraco fermentador, a maior vantagem em relação à *S. cerevisiae*. Em culturas de alta densidade celular, o etanol (o produto da fermentação de *S. cerevisiae*) rapidamente chega a níveis tóxicos limitando o crescimento e a produção da proteína heteróloga. Com sua preferência por crescimento respiratório, *P. pastoris* pode crescer até uma alta densidade celular (500 OD₆₀₀) e, desta forma, permitir a obtenção de níveis superiores de proteínas expressas (Cregg & Cereguino, 2000). Além disso, essa levedura glicosila as proteínas de forma mais próxima aos metazoários (em média, 8-14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos), ao contrário de *S. cerevisiae* que hiperglicosila (mais de 40 resíduos de manose) muitas proteínas heterólogas secretadas (Bretthauer & Castellino, 1999).

A expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser intracelular ou secretada. A vantagem dessa última é que *P. pastoris* secreta baixas quantidades de proteínas endógenas e seu meio de crescimento não contém proteínas adicionais, o que facilita as etapas seguintes de purificação (Tschopp *et al.*, 1987; Barr *et al.*, 1992; Cregg & Cereguino, 2000). A secreção requer a presença da seqüência sinal que direciona a proteína para esta via. Uma variedade de seqüências sinais é utilizada com sucesso (incluindo sinais nativos das proteínas de interesse). Mas o sinal de secreção de 85 resíduos de aminoácidos do fator α de *S. cerevisiae* encontrou maior sucesso e é o mais utilizado nos vetores de expressão de *P. pastoris* (Cregg & Cereguino, 2001). Durante a via de secreção, o peptídeo sinal do fator α é clivado por uma peptidase-sinal presente na membrana do retículo endoplasmático. Após a proteína ganhar o lúmen do retículo

endoplasmático, a protease Kex2p da levedura reconhece o sítio de clivagem Lys-Arg↓ e libera a porção “pró” do fator α . A repetição Glu-Ala quando presente próximo ao sítio de clivagem de Kex2p pode aumentar a atividade desta enzima, e ser posteriormente removida da proteína madura pela ação de uma diaminopeptidase, produto do gene *STE13* (Daly & Hearn, 2005).

Embora a expressão de proteínas heterólogas possa ser realizada em culturas de frascos, níveis protéicos são tipicamente maiores em culturas de fermentadores. Uma vez que o meio definido de sais para *P. pastoris* (contendo apenas glicerol ou metanol, biotina, sais, elementos traços e água) é econômico e bem definido, esta levedura é ideal para produção em larga escala de proteínas heterólogas. Apenas em fermentadores, onde parâmetros como pH, aeração e a taxa de alimentação da fonte de carbono podem ser controlados, é possível alcançar altíssimas densidades celulares (>100 g/L de peso seco; 400 g/L peso molhado; >500 OD₆₀₀) (Cregg *et al.*, 2001). A mudança de fermentações de baixas densidades conseguidas em frasco, a altas densidades em fermentadores de pequeno volume, inevitavelmente precisam de uma re-otimização das condições de cultura. Porém, condições estabelecidas em pequenos fermentadores precisam de poucos ajustes durante escalonamento para volumes maiores (Cereghino *et al.*, 2002).

Por tudo isso, o sistema de expressão de *P. pastoris* tem sido cada vez mais utilizado e tem-se mostrado como uma atraente alternativa para a hiperexpressão de genes humanos e de animais para fins biotecnológicos. Nos últimos anos, o número de publicações detalhando o uso desse sistema de expressão para pesquisa tem crescido rapidamente. Isto vem refletindo no aumento de seu uso para produção industrial de proteínas heterólogas, substituindo métodos mais convencionais, como a produção em *E. coli* e *S. cerevisiae*. Apesar de existirem poucos exemplos de expressão de ≥ 10 g/L, existem muitos exemplos de expressão de ≥ 1 g/L, elevando *P. pastoris* para um dos mais produtivos sistemas de expressão eucariótica disponíveis. De acordo com os dados disponíveis, há uma probabilidade de aproximadamente 50-75 % de se expressar qualquer proteína de interesse em *P. pastoris* em um nível considerável (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Embora o rendimento final de uma proteína seja influenciado principalmente por suas propriedades inerentes, pode significativamente ser realçado pela manipulação de fatores que influenciam a expressão do gene e a estabilidade do

produto. Entre estes fatores está a utilização de códons preferenciais para *P. pastoris* no gene de interesse, a otimização da composição dos meios de cultivo, o ajuste de alguns parâmetros físicos da cultura (pH, temperatura, disponibilidade de O₂), assim como também, o uso de promotores, seqüências sinais e sítios de integração que induzam a maior produção da proteína (Inan *et al.*, 2006).

O sistema de expressão de *P. pastoris* por oferecer economia, fácil manipulação e altos níveis de expressão é, portanto, um hospedeiro adequado para a síntese de quimosina recombinante, hoje preferência dos laticínios brasileiros para a fabricação de queijo por ser mais pura e ter a mesma atividade da enzima bovina. Como toda enzima recombinante comercializada no Brasil é importada, a produção a nível nacional diminuirá os custos do processo de fabricação e conseqüentemente, do produto final.

O presente projeto é uma iniciativa induzida pela empresa ENZITEC, sediada em Guaporé (RS), que produz quimosina extraída a partir de bezerros e que se volta agora para a produção da versão recombinante da enzima. A empresa busca a produção de quimosina recombinante para redução dos custos de produção utilizando o sistema *P. pastoris* pelas várias vantagens apresentadas acima.

2. OBJETIVOS

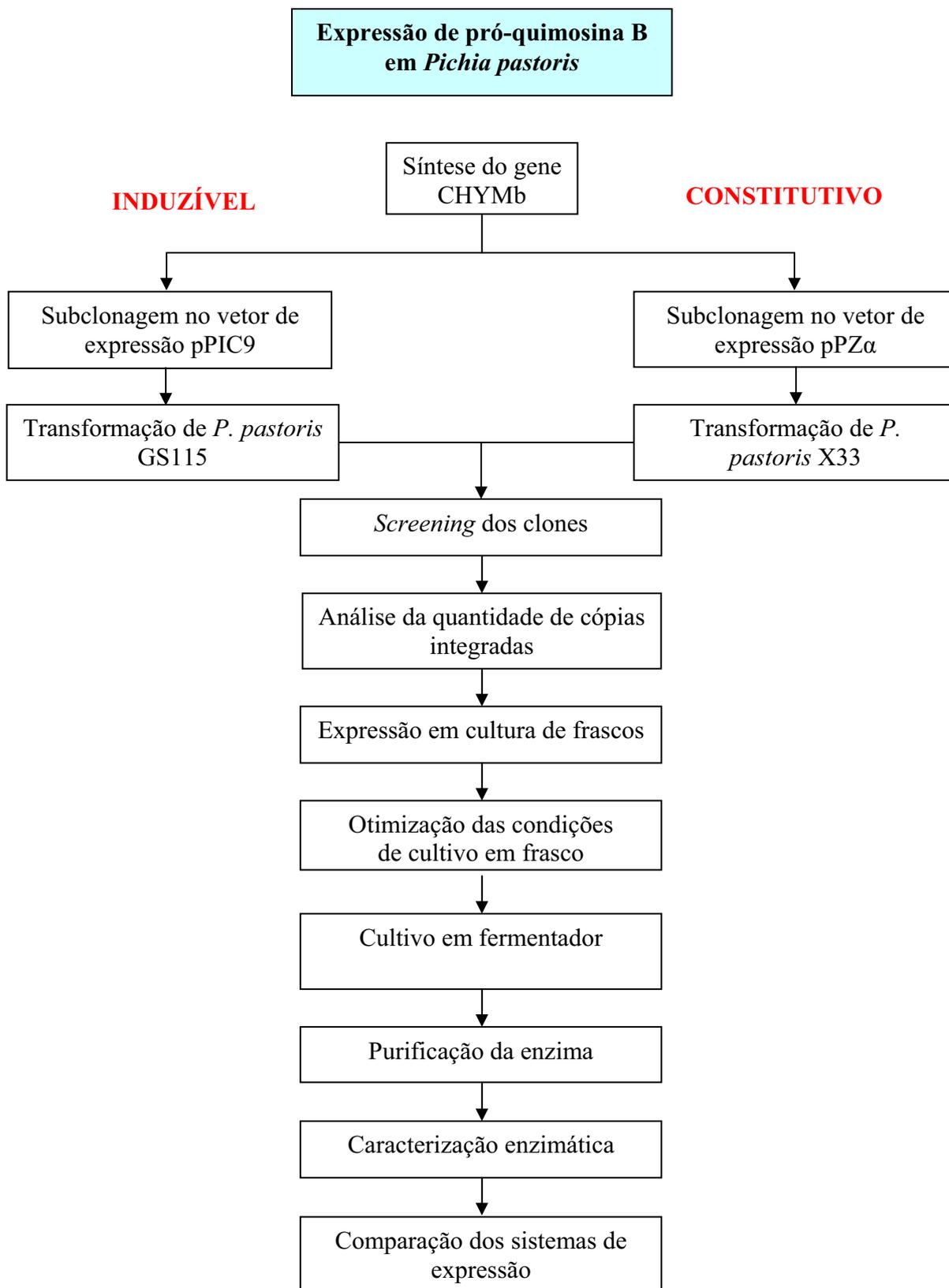
2.1 Geral

Desenvolver sistema para a produção de pró-quimosina B bovina (*Bos taurus*) na levedura *P. pastoris*.

2.2 Específicos

- Desenho de uma versão sintética do gene que codifica para a pró-quimosina B de *Bos taurus* com códons otimizados para *P. pastoris*;
- Subclonagem do gene sintético em vetores para expressão induzida (promotor *AOXI*) e constitutiva (promotor *PGK1*) em *P. pastoris*;
- Avaliação da expressão enzimática em frasco;
- Otimização das condições de cultivo em frasco visando o aumento da produção;
- Avaliação do cultivo em larga escala;
- Purificação e caracterização da enzima recombinante.

3. ESTRATÉZIA



4. MATERIAL

4.1 Microrganismos utilizados

4.1.1 Bactérias

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) - Tet^r Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 *Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]^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. Leveduras

Pichia pastoris linhagem GS115 (Invitrogen) – *his4*.

As linhagens *his4* possuem uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) para permitir a seleção do vetor de expressão contendo o gene *HIS4* após transformação.

Pichia pastoris linhagem X33 (Invitrogen).

É uma linhagem isogênica a GS115 sendo prototrófica para o fenótipo His⁺. Utilizada para transformação com vetores que não possuem o gene *HIS4* como marca de seleção para evitar a necessidade de suplementação do meio com histidina.

4.2 Enzimas

Enzimas de restrição

As enzimas *Xho* I, *Not* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Bgl* II, *Bst*B I, *Bam*H I, *Xba* I e *Hind* III foram fornecidas pela New England Biolabs, Promega, QBiogene e Fermentas Life Sciences e utilizadas como indicado pelo fabricante.

4. MATERIAL

Enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) – utilizada na concentração de 40 U/ μ L nas reações de ligação.

RNase A

RNase A (“DNase-free”)	10 mg/mL
Acetato de sódio pH 4,8	50 mM
Fervida em banho-maria por 10 minutos	

PNGase F (New England Biolabs) - utilizada segundo recomendações do fabricante.

Hannilase (Chr. Hansen) – quimosina recombinante produzida por uma cepa do fungo *Aspergillus niger* var *awamori* e comercializada pela empresa Chr. Hansen, utilizada como controle nos testes de atividade.

Enzimax (ENZITEC) – quimosina natural bovina extraída do estômago de bezerros comercializada pela empresa ENZITEC, utilizada para comparação com a enzima recombinante.

4.3 Marcadores

Marcadores de DNA

1 kb *Ladder* Promega;

DNA de fago λ digerido com *EcoR* I e *Hind* III (λ *Eco/Hind*) ou *BstE* II (λ *BstE* II).

Marcadores de proteínas

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences);

Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs);

Bench Marker (Invitrogen).

4.4 Kits

***AlkPhos Direct* (Amersham Biosciences)** – utilizado nos experimentos de *Southern blotting*.

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) – utilizado para extração e purificação de DNA de gel de agarose.

4.5 Ferramentas de bioinformática

Busca das seqüências: GenBank (NCBI) - (<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)

Tradução conceptual: “Molecular Toolkit” -
(<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/index.html>)

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 (Anexos 1-4).

Vetores de expressão para *P. pastoris*

pPIC9 (Invitrogen) – utilizado para construção do vetor controle negativo. Possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção em bactéria e o gene *HIS4* como marca de seleção para levedura. O promotor e a região terminadora da transcrição são do gene *AOX1*.

pPIC9-Amy - utilizado para expressão da pró-quimosina em *P. pastoris*. Construído em nosso laboratório, é o vetor pPIC9 com o gene da α -amilase (Amy) de *B. subtilis* clonado, que serve como DNA *stuffer* para assegurar a recuperação do pPIC9 duplamente linearizado.

pPICZ α A (Invitrogen) – utilizado para construção do vetor controle negativo através da substituição do promotor *AOX1* pelo promotor *PGK1* de *P. pastoris*. Possui promotor e região terminadora do gene *AOX1* de *P. pastoris* e o gene *Sh ble* de resistência a zeocina como marca de seleção para bactérias e leveduras.

pPZ α -Amy - utilizado para expressão da pró-quimosina em *P. pastoris*. Construído em nosso laboratório por João Ricardo Moreira de Almeida. Vetor baseado no pPICZ α A, possui o promotor *PGK1*, região terminadora do gene *AOX1* de *P. pastoris*, o gene da α -amilase (Amy) de *B. subtilis* clonado e o gene *Sh ble* de resistência a zeocina como marca de seleção para bactérias e leveduras.

4.7 Meios de cultura e soluções

Os meios e soluções foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave por 20 min a 120 °C. Algumas soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração usando-se membranas de 0,2 μ m. Quando necessário foram adicionados os devidos antibióticos nas seguintes concentrações: ampicilina 100 μ g/mL, zeocina 25 μ g/mL para bactérias e 100 μ g/mL para levedura. As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia a qual foram empregadas.

4.7.1 Meios para bactérias

Meio LB (Luria – Bertani)

Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
Peptona de caseína	1 % (p/v)
NaCl	1 % (p/v)
pH ajustado para 7,2.	

Meio LB-Ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,5 % (p/v).

4.7.2 Meios para leveduras

4. MATERIAL

Meio YPD (Meio extrato de levedura peptona glicose)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)

Meio YPD-Ágar

Meio YPD adicionado de ágar bacteriológico a 2 % (p/v).

Meio YPDS-Ágar (Meio extrato de levedura peptona glicose com sorbitol)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Sorbitol	1 M
Ágar bacteriológico	2 % (p/v)

MD (Meio mínimo com glicose)

Biotina	4×10^{-5} %
YNB	1,34 %
Glicose	2 % (p/v)

MD-Ágar

Meio MD adicionado de ágar bacteriológico a 2 % (p/v).

MM (Meio mínimo)

YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} %
Metanol	0,5 %

Meio BMGY (Meio complexo tamponado com glicerol)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Tampão fosfato pH 6.0	100 mM

4. MATERIAL

YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} %
Glicerol	1 %

Meio BMMY (Meio complexo tamponado com metanol)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Tampão fosfato pH 6.0	100 mM
YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} %
Metanol	0,5 %

Meio BMGluY (Meio complexo tamponado com glicose)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Tampão fosfato pH 6.0	100 mM
YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} %
Glicose	2 %

Meio MGY (Meio mínimo com glicerol)

Tampão fosfato pH 6.0	100 mM
YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} %
Glicerol	1 %

Meio FM22 (1L) (Meio de fermentação com sais)

KH ₂ PO ₄	42,9 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
CaSO ₄ ·2 H ₂ O	1 g
K ₂ SO ₄	14,3 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	11,7 g
Glicerol	40 g
pH ajustado para 4,5 com KOH.	

Solução de sais PMT₄ (1L)

CuSO ₄ ·H ₂ O	2 g
NaI	0,8 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	3 g
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,2 g
H ₃ BO ₃	0,2 g
CaSO ₄ ·2 H ₂ O	0,5 g
CoCl ₂	0,5 g
ZnCl ₂	7 g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	22 g
Biotina	0,2 g
H ₂ SO ₄ concentrado	1 ml/L

4.8 Extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM
Glicose	50 mM

Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (p/v)

Preparada no momento do uso.

Solução III

Acetato de sódio	3 M
Ácido acético	2 M
pH ajustado para 4,8-5,0	

4.9 Análise de DNA em gel de agarose

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 10X

Tris-Acetato	40 mM
EDTA	1 mM
pH ajustado para 8,5	

Tampão de amostra para gel de agarose (10X)

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

4.10 Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Tampão de amostra 2X

Tris-HCl 1 M pH 6,8	200 mM
SDS	4 % (p/v)
β -Mercaptoetanol	4 % (v/v)
Glicerol	20 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)

Tampão de corrida – Tris-glicina 5X (Estoque)

Trizma base	125 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,5 % (p/v)

Ácido tricloroacético (TCA)

A um frasco fechado contendo 100 g de TCA foi adicionado 45,4 mL de água. A solução resultante corresponde a TCA 100 % (p/v), estocado a 4°C.

Gel concentrador 5%

Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0,8)	2,5 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	5 mL

4. MATERIAL

Água destilada	12,15 mL
SDS 10 % (p/v)	0,2 mL
APS 10 % (p/v)	0,150 mL
TEMED (Gibco BRL)	0,015 mL

Gel separador 12,5%

Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0,8)	12,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3,75 mL
Água destilada	13,21 mL
SDS 10 % (p/v)	0,3 mL
APS 10 % (p/v)	0,225 mL
TEMED (Gibco BRL)	0,015 mL

4.11 Revelação de proteínas com *Coomassie blue*

Solução corante

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

Solução descorante

Metanol	30 % (v/v)
Ácido acético glacial	7 % (v/v)

4.12 Revelação das proteínas com nitrato de prata

Solução de fixação

Metanol	50 % (v/v)
Ácido acético glacial	12 % (v/v)
Formaldeído	0,1 % (v/v)

Solução de lavagem

Etanol	50 % (v/v)
--------	------------

4. MATERIAL

Solução de tratamento

Tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v)

Solução de equilíbrio

Nitrato de prata 0,2 % (p/v)
Formaldeído 0,075 % (v/v)

Solução de revelação

Carbonato de sódio 6 % (p/v)
Solução de tratamento 2 % (v/v)
Formaldeído 0,05 % (v/v)

Solução de parada

Metanol 50 % (v/v)
Ácido acético glacial 12 % (v/v)

4.13 Extração de DNA genômico de levedura

Tampão SE

Sorbitol 0,9 M
EDTA 100 mM
pH ajustado para 7,5.

TE₂₀

Tris-HCl pH 7,5 10 mM
EDTA 20 mM

Clorofane

Fenol 1 v
Clorofórmio 1 v
8-Hidroxiquinolina 0,05 %
β-Mercaptoetanol 0,50 %
Homogeneizado com solução de equilíbrio.

4. MATERIAL

Solução de equilíbrio

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	100 mM

TE

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

4.14 Soluções para *Southern blotting*

SSC 20 X

NaCl	3 M
Citrato trissódico	0,3 M
Ajustar o pH para 7,0	

Solução de depurinação

HCl	0,2 M
-----	-------

Solução desnaturante

NaCl	1,5 mM
NaOH	0,5 mM

Solução neutralizante

Tris-HCl pH 7,4	1 M
NaCl	1,5 M

Tampão de lavagem primário

Uréia	2 M
SDS	0,1 % (p/v)
Fosfato de sódio pH 7,0	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1 mM
Reagente de bloqueio	0,2 % (p/v)

4. MATERIAL

(Kit AlkPhos)

Tampão de lavagem secundário 20X

Trizma base	1 M
NaCl	2 M
pH ajustado para 10	
Solução de trabalho – diluído 1:20 e adicionado 2 mM de MgCl ₂ .	

4.15 Soluções e meios para ensaios de atividade enzimática

Solução de leite desnatado

Leite em pó desnatado	12 % (p/v)
CaCl ₂	20 mM
Tampão fosfato pH 6,0	25 mM

Placa para atividade proteolítica

Leite em pó desnatado	2,5 % (p/v)
Agarose	1,5 % (p/v)
Tampão fosfato pH 6,0	1 mM

4.16 Solução para quantificação de proteína

Solução de Bradford

<i>Coomassie brilliant blue G-250</i>	0,05 % (p/v)
Etanol	25 % (v/v)
Ácido fosfórico 17 M	50 % (v/v)

5. MÉTODOS

5.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas conforme instruções dos fabricantes das enzimas. 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 µg de DNA, incubados a 37 °C por 3 h. Teve-se o cuidado de se observar se o volume da enzima não tinha ultrapassado 10 % do volume final da reação, com a finalidade de evitar a degradação inespecífica do DNA pela enzima.

5.2 Análise em gel de agarose (Sambrook *et al.*, 2001)

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise dos fragmentos de DNA. A agarose foi preparada na concentração de 0,8 % (p/v) em tampão de corrida TAE 1X e foi adicionado brometo de etídeo (análogo de base que se intercala na molécula de DNA e emite fluorescência violeta quando excitado com luz ultravioleta) para concentração final de 0,5 µg/mL. O tampão de amostra foi diluído para a concentração final de 1X nas amostras de DNA a serem analisadas. As amostras e os marcadores moleculares foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese com a corrente e voltagem adequadas (1-5 V/cm). Para visualização da amostra de DNA o gel foi exposto à luz ultravioleta

5.3 Purificação e eluição de fragmentos de DNA

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 e purificados utilizando-se o *kit QIAquick Gel Extraction*, conforme as especificações do fabricante.

5.4 Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)

Os sistemas de ligação foram feitos de modo que a razão molar entre vetor e inserto ficasse entre 1:3 e 1:10. A enzima T4 DNA Ligase foi utilizada com os tampões

de reação fornecidos pelos fabricantes. Os sistemas foram incubados a 4°C por pelo menos 14 h antes de serem utilizados para transformação de bactérias.

5.5 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por Cohen (1972) com algumas modificações. As células da linhagem de *E. coli* desejada foram crescidas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e essa cultura incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 10 mL de CaCl₂ 100 mM estéril e gelado. Em seguida as células foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Finalmente, as células foram aliqüotadas em tubos *Eppendorff* (50 ou 100 µL/tubo) e estocadas a -80 °C.

5.6 Transformação de *E. coli* por choque térmico

Uma alíquota de célula competente previamente preparada foi utilizada para cada sistema de ligação. As células foram retiradas do *freezer* a -80 °C e deixadas no gelo até que descongelassem. Em seguida, foram adicionados 5 µL do sistema de ligação às células, e as mesmas foram novamente incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a 37 °C, por 5 minutos e, o sistema foi incubado no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 900 µL de meio LB ao sistema que foi incubado a 37 °C por 1 hora. O plaqueamento foi feito em três placas contendo LB-ágar e o antibiótico adequado. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

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

Uma colônia de bactéria foi inoculada em 3 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado (100 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de zeocina) e cultivada a 37 °C por 16 horas. Estas células foram coletadas através de centrifugação a 12000 x g

por 2 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspense em 200 µL de solução I, e em seguida adicionou-se 360 µL 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 µL de solução III gelada ao lisado, procedendo-se nova homogeneização por inversão do tubo, gentilmente. A amostra foi então incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 12000 \times g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 750 µL 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 ressuspense em 200 µL de solução TE. Foi adicionado 110 µL de acetato de amônio 7,5 M. Após forte agitação, o sistema foi centrifugado a 12000 \times g por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado em um tubo limpo, onde foi adicionado 750 µL de etanol 100 % gelado. 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 ressuspense em 50 µL de TE com RNase A (1 µL de RNase 10 mg/mL para 100 µL de TE). O DNA plasmidial foi estocado a -20 °C até o uso.

5.8 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.

5.9 Transformação de *P. pastoris* por eletroporação

Uma colônia da levedura *P. pastoris*, foram crescidas em 5 mL de meio YPD em um *Erlenmeyer* de 125 mL por 24 horas a 30 °C sob agitação (200 rpm). Cerca de 0,2-0,5 mL do pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio YPD. As células cresceram durante a noite, até uma OD₆₀₀ ~1,3-1,5. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 \times g por 5 min a 4 °C e ressuspensas em 100 mL de água estéril gelada (4 °C). As

células foram centrifugadas como anteriormente, e ressuspensas em 50 mL de água estéril gelada. Após a repetição deste último procedimento, as células foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1M gelado. Após centrifugação nas mesmas condições anteriores, as células foram ressuspensas em 0,8 mL de sorbitol 1M gelado, e mantidas no gelo até o momento do uso. Para a eletroporação, 80 μ L das células foram misturadas com 5-10 μ g do DNA plasmidial (previamente linearizado) e 320 μ L de sorbitol 1M gelado, e então transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada. As células foram eletroporadas nas seguintes condições para o eletroporador da BioRad: 7,5 KV/cm, 25 μ F e 400 Ω . O tempo de eletroporação foi de aproximadamente 10 ms. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo de *Eppendorff* de 1,5 mL estéril. No caso da transformação da linhagem X33 de *P. pastoris*, o conteúdo foi transferido para um *Falcon* de 15 mL e incubado em *shaker* a 30 °C por uma hora e meia. As células foram espalhadas em placa de Petri previamente preparadas com meio de cultura MD sem histidina para seleção dos transformantes com o vetor contendo a marca auxotrófica *HIS4* e YPDS + zeocina para os transformantes com plasmídeo contendo o gene de resistência a zeocina (*Sh ble*). Finalmente, as placas foram incubadas a 30 °C até o aparecimento de colônias recombinantes, em geral em torno de 48 horas.

5.10 *Screening* em placas de *deep well* (Boettner *et al.*, 2002)

Em uma placa de *deep well* foram adicionados 800 μ L de meio BMGY aos poços e em cada um deles foi inoculada uma colônia escolhida aleatoriamente das placas de transformação. A placa foi vedada com filme plástico e incubada em um *shaker* a 30 °C e 200 rpm para crescimento das células. Após três dias a placa foi centrifugada a 1280 \times g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados a cada poço 800 μ L de meio BMMY (*screening* dos transformantes com o vetor contendo o promotor *AOX1* - vetor pPIC9) ou 800 μ L de meio BMGluY (*screening* dos transformantes com o vetor contendo o promotor *PGK1* – vetor pPZ α). A placa foi novamente fechada com o filme plástico e incubada em um *shaker* nas mesmas condições descritas anteriormente. Foi adicionado metanol para uma concentração final de 0,5 %, a cada 24 horas aos poços dos transformantes crescendo em meio BMMY. Após centrifugação a 1280 \times g por 10 minutos, uma alíquota de 50

μL do sobrenadante de cada transformante foi retirada a cada 24 horas, para análise da atividade.

5.11 Indução e expressão de recombinantes em frasco

Usando uma colônia isolada, fez-se um pré-inóculo em 25 ml de meio BMGY em um *Erlenmeyer* de 250 mL. Crescidas a 28 °C sob agitação até a cultura atingir uma OD_{600} de 2-6 (aproximadamente 16-18 horas) as células foram coletadas por centrifugação a 1500 $\times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspensas em *Erlenmeyer* aletado de 1 L com 100 mL de meio de indução BMMY para os clones transformados com o pPIC9 e 100 mL de meio BMGluY para os clones transformados com o plasmídio pPZ α , e retornadas a agitação para continuar o crescimento. Adicionou-se metanol 100 % para uma concentração final no meio de cultura de 0,5 %, a cada 24 horas de crescimento para manter a indução dos transformantes com o plasmídio contendo o promotor *AOXI*. A cada tempo de indução foram retirados 5 mL de cada cultura. Após centrifugação e descarte das células, o sobrenadante foi utilizado para medição da OD_{600} , da atividade enzimática, e análise do perfil protéico em gel SDS-PAGE.

5.12 Ativação da pró-quimosina

A ativação da pró-quimosina recombinante foi realizada com uma alíquota do sobrenadante da cultura. Os sobrenadantes foram acidificados pela adição de 1 volume de tampão glicina 0,4 M (pH 2,3) e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida o pH foi ajustado para 6,0 pela adição de KOH 1M seguindo-se incubação por 60 min a 37 °C (Nishimori *et al*, 1984).

5.13 Ensaio de coagulação do leite

O teste de coagulação do leite foi realizado, em triplicada, com base no método de Emtage *et al*. (1983), com algumas modificações. Cem microlitros do sobrenadante ativado e não ativado foram adicionados a 400 μL de leite desnatado 12 % (p/v) preparado na hora do ensaio, seguindo-se incubação a 37 °C. Uma unidade (U) de

atividade foi definida como a quantidade mínima de quimosina necessária para formar um coalho em 5 minutos nas condições determinadas. Nos experimentos de *screening*, tanto em *deep well* como em frasco, analisou-se apenas o tempo necessário para coagular 400 μ L da solução de leite.

5.14 Força ativa da enzima

Para a medição da força ativa da enzima, 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados a 5 mL de leite em *Erlenmeyers* de 25 mL. Mediu-se então o tempo necessário para o aparecimento de floculação do leite quando incubado a 37 °C. O coagulante comercial (Hannilase) foi diluído para coagular a preparação de leite no mesmo tempo em que ocorreu a coagulação com o sobrenadante testado. Fez-se cálculo comparativo com a força ativa pré-determinada no coagulante comercial.

5.15 Teste de atividade proteolítica

A atividade proteolítica do extrato extracelular foi detectada em placas de Petri contendo leite desnatado e agarose (Valkonen *et al.*, 2003). Aplicou-se pequenas alíquotas de 2 μ L do sobrenadante ativado à placa, após a penetração do líquido no gel, foi incubada a 37 °C. A atividade proteolítica foi detectada pela presença de halos escuros de hidrólise na placa no local da aplicação da amostra.

5.16 Quantificação de proteínas totais por Bradford

As concentrações de proteínas nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

5.17 Precipitação de proteínas com TCA e acetona

Um mililitro do sobrenadante das fermentações foi precipitado com 250 μ L de TCA 100 %. Após ser incubado no *freezer* por 3 horas, foi centrifugado a 8000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 1 mL de acetona gelada e novamente centrifugado a 8000 x g por 30 minutos. O

precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e ressuspensão em 50 μL de tampão de amostra 2X. No caso das amostras com o pH ácido (amostra com coloração amarela) acrescentou-se 2 μL de tampão fosfato pH 6,0. As amostras foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise em gel SDS-PAGE.

5.18 Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel de poliacrilamida desnaturante segundo a descrição de Laemmli (1970) em um sistema de eletroforese da Amersham Biosciences. Antes da aplicação no gel as amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X com uma voltagem constante de 100 V.

5.19 Coloração com *Coomassie blue*

As bandas protéicas presentes em alguns géis foram visualizadas após a incubação destes durante 1 hora, sob agitação, na solução corante preparada com *Coomassie blue*, seguida pela descoloração, após incubação na solução descolorante, sob agitação, até o aparecimento das bandas.

5.20 Coloração com prata (Blum *et al.*, 1987)

Alguns géis foram submetidos à coloração com prata. Após a corrida foram incubados sob agitação durante 1 hora na solução fixadora. Em seguida, foram incubados na solução de lavagem por 10 minutos. Após repetir o procedimento de lavagem com água destilada duas vezes, os géis foram incubados na solução de tratamento por 1 minuto, seguindo-se 3 lavagens com água destilada durante 30 segundos cada uma. Ao término das lavagens, foram incubados durante 15 minutos na solução de equilíbrio e novamente, lavados com água destilada duas vezes, por 20 segundos cada, e revelados com a solução de revelação. A reação foi interrompida, após o aparecimento das bandas, com a solução de parada.

5.21 Extração de DNA total da levedura *P. pastoris* (modificado de Burke *et al.*, 2000)

As células crescidas até a saturação em 40 mL de meio YPD a 30 °C foram coletadas por centrifugação a 3000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 3 mL de tampão SE. E, após a adição de 100 µL de uma solução de Novozima 100 mg/mL (Novo Biolabs), o sistema foi misturado e incubado a 37 °C por 60 minutos. A suspensão foi centrifugada a 3000 x g por 5 minutos, e em seguida, as células foram ressuspensas em 3 mL de TE₂₀. Após adição de 0,5 mL de SDS 10 %, incubou-se a suspensão a 65 °C por 30 minutos. Foi adicionado 1,5 mL de acetato de potássio 5M pH 8,9 ao sistema, que foi então misturado gentilmente e incubado no gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 10000 x g por 5-10 minutos a 4 °C, foi adicionado 1 volume de clorofane ao sobrenadante, previamente transferido para um tubo limpo, para a extração por inversão dos tubos. Depois de centrifugar a 3000 x g por 10 minutos, a fase aquosa foi transferida para um tubo novo e o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, centrifugado a 10000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado uma vez com etanol 70 %, seco e ressuspenso com 200 a 500 µL de TE + RNase (1 µg de RNase A a 10 mg/mL para cada 100 µL de TE). A concentração de DNA foi determinada em gel de agarose, e o mesmo guardado a 4 °C até o uso.

5.22 Southern blotting

5.22.1 Digestão do DNA total de *P. pastoris*

Aproximadamente 10 µg de DNA total das leveduras foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl* II. O resultado foi analisado em gel de agarose 0,8 %.

5.22.2 Sistema de transferência para membrana (Sambrook *et al.*, 2001)

Cada gel contendo as amostras de DNA digerido foi primeiro tratado com solução de depurinação por 10 minutos sob agitação. Depois de lavado com água

destilada foi imerso em solução desnaturante, e incubado por 30 minutos, sob agitação leve, a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi lavado rapidamente em água destilada e incubado em solução neutralizante, sob agitação suave, por 30 minutos. Após as etapas de tratamento, foi montado o sistema de transferência por capilaridade. A solução de transferência SSC 10X permitiu a transferência dos fragmentos de DNA do gel para a membrana de nylon (Hybond-N). O DNA foi fixado à membrana por meio de exposição à luz ultravioleta.

5.22.3 Marcação da sonda, pré-hibridação e hibridação

Tanto a marcação da sonda como a pré-hibridação, lavagem e detecção foram feitas segundo o protocolo do *kit AlkPhos Direct*. Foram utilizados 100 ng de cada fragmento de sonda para a marcação com fosfatase alcalina. A pré-hibridação foi realizada a 55 °C, por 30 minutos em forno rotatório, em 10 mL de tampão de hibridação, preparado conforme recomendações do fabricante. Para a hibridação, os 100 ng de DNA previamente marcados foram adicionados ao tampão de hibridação. O sistema foi incubado a 55 °C por 16 horas. Após a hibridação foram realizadas 4 lavagens da membrana, as duas primeiras foram realizadas com excesso de tampão de lavagem primário (200 mL), por 10 minutos, a 55 °C. As duas seguintes, com tampão de lavagem secundário em excesso, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Finalmente, o excesso de tampão foi retirado e procedeu-se com a detecção do sinal.

5.22.4 Geração e detecção do sinal

Para a geração do sinal quimioluminescente, o reagente CDP-*Star* (Amersham Biosciences) foi posto sobre a membrana por aproximadamente 5 minutos. Após a reação, a membrana foi envolta em plástico (*Saran Wrap*), e exposta a filme autoradiográfico (*Hyperfilm ECL*-Amersham) à temperatura ambiente, por 1 hora. O filme foi revelado em câmara escura, seguindo o protocolo: imersão do filme em solução reveladora (Dektol-76 da Kodak) por 1 a 3 minutos, interrupção em água destilada por 30 segundos, fixação por imersão em solução fixadora (Kodak) por 5 minutos e, lavagem exaustiva em água corrente.

5.22.5 Remoção da sonda para reutilização da membrana

Para remoção da sonda, incubou-se a membrana a 60 °C em uma solução de SDS 0,5 % por 60 minutos e depois em uma solução de Tris 100 mM pH 8,0 por 5 minutos à temperatura ambiente.

5.22.6 Sondas utilizadas

Sonda AOX - região do vetor pPIC9-CHYM correspondente ao cassete de integração com o 5' *AOX1*, *HIS4*, o gene da pró-quimosina e o 3' *AOX1*. Para obtenção desse fragmento fez-se uma digestão do vetor com a enzima de restrição *Bgl* II e posterior purificação do fragmento em gel de agarose.

Sonda PGK – fragmento de 2 kb correspondente a região promotora do gene *PGK1*, obtida da digestão do vetor pPZ α -Amy com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bst*B I e posterior purificação do fragmento.

Sonda CHYM – fragmento de 1130 pb corresponde ao gene sintético da pró-quimosina obtido a partir da digestão do vetor pBSSK-CHYM com as enzimas *Xho* I e *Not* I e posterior purificação do fragmento.

5.23 Análise de resistência a zeocina

A análise de resistência a altas concentrações de zeocina permitiu estimar o número de cópias integradas em clones transformantes com vetores contendo o gene *Sh ble*. Em uma placa de meio YPD com diferentes concentrações de zeocina (100 mg/mL e 500 mg/mL) foi inoculado o transformante e deixado crescer por 4 dias. Estimou-se o número de cópias do vetor integradas no genoma de *P. pastoris* analisando o crescimento nas diferentes concentrações de zeocina.

5.24 Otimização das condições de cultivo de *P. pastoris* em frasco (clone transformado com o vetor pPIC9).

Primeiramente foram realizadas fermentações em frasco para se escolher a melhor fonte de nitrogênio entre YNB e uréia. Foram usadas as mesmas condições de

indução em frasco descritas anteriormente, trocando-se apenas o YNB por uréia (na mesma concentração).

Um planejamento experimental (experimentos que utilizam combinações matemáticas para o melhoramento de meios de cultura) de três fatores limitantes no crescimento e na produção da proteína heteróloga – densidade celular inicial (OD_{600}), concentração de fonte de nitrogênio e concentração do indutor metanol – com três níveis cada um, e três repetições do ponto central, foi realizado visando o aumento da produção enzimática. As condições foram variadas nas faixas especificadas na Tabela 1. Foi escolhido para cada variável dois valores extremos (um máximo e um mínimo) e determinou-se o ponto central de cada fator. A variável escolhida como resposta da produção enzimática foi a coagulação do leite após 72 horas de indução. A ordem de realização dos experimentos foi determinada aleatoriamente. Os experimentos foram conduzidos em 100 mL de meio em *Erlenmeyers* aletados de 1 L. Após pré-inóculo em BMGY por 24 horas, as células foram centrifugadas e resuspensa em BMMY com as devidas modificações propostas pela otimização. O cultivo foi realizado em agitador rotacional a 200 rpm e temperatura de 30 °C.

Tabela 1. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2³) para otimização da produção enzimática.

Fatores	Nível Inferior (-1)	Nível Intermediário (0)	Nível Superior (+1)
% Metanol	0,5	0,75	1
OD₆₀₀ inicial	1	5,5	10
% Fonte de Nitrogênio	1,34	2,85	4,02

5.25 Otimização das condições de cultivo de *P. pastoris* em frasco (clone transformado com pPZ α).

Inicialmente, para analisar a influência de diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio na produção de quimosina recombinante produzida por *P. pastoris* e se chegar a que promove maior expressão, foi realizado um planejamento de experimentos considerando três diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol e açúcar invertido) e três diferentes fontes nitrogênio (farelo de soja, uréia e sulfato de amônio) formando uma matriz 3 x 3 (Tabela 2). Todas as fontes de carbono foram analisadas na concentração 2 % (p/v) e as fontes de nitrogênio na concentração 2,8 % (p/v). Os experimentos foram realizados em *Erlenmeyers* de 250 mL com 25 mL de meio com 100 mM de tampão fosfato pH 6,0, biotina 4×10^{-5} % e 25 μ L de PMT₄. As células foram pré-cultivada em meio complexo contendo glicose como fonte de carbono. A OD₆₀₀ inicial dos inóculos foi de 5. A variável escolhida como resposta da produção enzimática foi a força ativa de quimosina após 48 horas de crescimento.

Tabela 2. Combinação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio

C/N	(1) Farelo de soja	(2) Sulfato de Amônio	(3) Uréia
Glicose (1)	1-1	1-2	1-3
Glicerol (2)	2-1	2-2	2-3
Açúcar invertido (3)	3-1	3-2	3-3

Após os resultados da primeira análise, um segundo experimento foi realizado variando as concentrações das fontes de nitrogênio e carbono que produziram maior atividade enzimática através de um planejamento fatorial 2², com três níveis cada um, e três repetições do ponto central (Tabela 3). Os experimentos foram realizados nas mesmas condições anteriores, variando apenas a concentração das fontes de carbono e nitrogênio. A variável escolhida como resposta da produção enzimática foi a força ativa de quimosina após 24 horas de crescimento.

Tabela 3. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2²) para otimização da produção enzimática.

Fatores	Nível Inferior (-1)	Nível Intermediário (0)	Nível Superior (+1)
Fonte de carbono %	1	2	3
Fonte de nitrogênio %	1,4	2,8	5,6

5.26 Cultivo em fermentador (clone transformado com o vetor pPIC9)

O pré-inóculo foi iniciado com células novas em placa, que foram transferidas para um *Erlenmeyer* de 1 L com aletas, contendo 200 mL de meio MGY. O frasco foi incubado sob agitação a 30 °C por 20-24 horas até atingir uma OD₆₀₀ de 10. Antes do inóculo acrescentou-se 1 mL/L de PMT₄ ao meio FM22 que já estava no fermentador. Ligou-se o fermentador a baixa rpm (~300 rpm) por 30 minutos antes do inóculo para promover aeração e calibrar o aerador para 100 %. Então, o inóculo estéril foi adicionado ao fermentador e começou-se a fermentação com agitação de aproximadamente 400 rpm.

Temperatura, pH e entrada de ar foram mantidos constantes: 30 °C, 5,0 e 3 vvm, respectivamente, por todo o experimento. A concentração inicial de glicerol foi 2,5 % (p/v). Após a inoculação das células iniciou-se a fase de crescimento em batelada que durou 22 horas. Quando o glicerol do meio inicial foi completamente exaurido (detectado pelo rápido aumento da DO para 60-70 %), iniciou-se então a fase alimentada com glicerol (1,5 mL/L.h) em condições limitantes, para aumentar ainda mais a biomassa celular. Durante esta fase a DO foi controlada manualmente ajustando a agitação para manter-la estável entre 25-35 %. Durante esta fase fez-se a cada hora “DO spikes”, que consiste em desligar a bomba alimentadora de glicerol e cronometrar o tempo necessário para aumentar a DO em 10 %. Uma vez que houve aumento de 10 %, bomba alimentadora foi religada. Caso contrário, diminuiu-se a alimentação, para

garantir que o glicerol não acumulasse no meio. Quando a OD₆₀₀ atingiu altos níveis a bomba de glicerol foi desligada e a alimentação de metanol foi ajustada para 1 mL/L.h. A taxa inicial baixa permite a cultura se adaptar a nova fonte de carbono. “DO spikes” foram feitos antes de mudar a taxa de metanol. Uma vez que houve aumento de 10 % na DO, a bomba alimentadora foi religada e a alimentação com metanol foi aumentada. Amostras foram retiradas durante a fermentação para se determinar a atividade enzimática, peso seco, OD₆₀₀ e precipitar proteínas. Anti-espumante (silicone) foi adicionado a cada 24 horas, para controlar o excesso de espuma.

5.27 Cultivo em fermentador (clone transformado com o vetor pPZα)

O pré-inóculo foi realizado como descrito para a fermentação com o clone transformado com o vetor pPIC9. A fermentação foi conduzida em fermentador BIOFLO 110 com 1 litro de meio de cultivo, dotado de controle de temperatura, controle de pH, controle de concentração de oxigênio dissolvido, controle de espuma e sistema de agitação mecânica. O meio da fermentação foi elaborado com açúcar invertido a 3 % (p/v) e farelo de soja a 5 % (p/v), e inoculado com as células previamente crescidas em meio MGY. Foram adicionados também sais de íons metálicos (PMT₄), biotina e tampão fosfato pH 6,0 100 mM ao meio de fermentação. Amostras de meio fermentado foram coletadas em 20, 24, 40, 43, 48 e 64 horas de cultura para medição da força ativa da enzima e OD₆₀₀. A temperatura foi mantida em 28 °C, o pH da cultura 6,0 e o DO a 35 %.

5.28. Medida do peso seco

A medida do peso seco foi realizada com 2 mL da cultura do fermentador. Após centrifugação a 10000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o centrifugado foi seco em estufa a 60 °C por aproximadamente 3 horas. O tubo com o centrifugado seco foi pesado e descontou-se o peso do mesmo tubo vazio.

5.29 Purificação da enzima

5.29.1 Cultura para purificação da enzima

Foi realizada uma cultura de 72 horas do clone selecionado em 2 *Erlenmeyers* aletados de 1 L com 100 mL de meio BMGluY.

5.29.2 Concentração do sobrenadante

Após centrifugação da cultura de 72 horas realizada, o sobrenadante foi submetido a diálise, para a remoção de sais e açúcares presentes no meio, em sacos de celulose (*Dialysis tubing* – Sigma), que retém proteínas maiores que 12000 Da. A diálise foi feita contra água destilada a 4 °C. A água foi trocada a cada 4 horas durante 12 horas. O sobrenadante dialisado foi concentrado por liofilização. O material liofilizado foi ressuspenso em 2 mL de água destilada (1/100 do volume inicial).

5.29.3 Cromatografia de exclusão molecular

As amostras do sobrenadante de cultura concentradas foram aplicadas em uma coluna 70 x 1,28 cm, previamente equilibrada a 4 °C com tampão fosfato 50 mM pH 6,0. A eluição foi realizada com um fluxo contínuo de 20 mL por hora. Frações de 5 mL foram coletadas e a concentração de proteínas estimada medindo-se a absorbância das amostras a 280 nm. A atividade de coagulação do leite nas frações foi determinada conforme descrito anteriormente (Ver item 5.16), e aquelas apresentando atividade de coagulação do leite foram reunidas e concentradas.

5.29.4 Concentração da amostra

As amostras foram concentradas por ultracentrifugação, utilizando-se uma membrana com retenção de 10 kDa (Centriplus – YM 10). O sistema foi mantido a 4 °C durante o processo de filtração. O perfil eletroforético foi analisado em gel SDS-PAGE.

5.30 Caracterização da proteína

5.30.1 Ativação

A enzima purificada foi ativada (ver item 5.15) e aplicada em gel SDS-PAGE.

5.30.2 Deglicosilação

Para analisar a presença de carboidratos na enzima recombinante foi realizada uma digestão com a enzima PNGase F capaz de remover N-glicosilações. As digestões foram realizadas segundo as instruções do fabricante (New England Biolabs) e analisadas em gel SDS-PAGE.

5.30.3 Ensaio de especificidade sobre caseínas

Para avaliar a especificidade da enzima recombinante foram feitos ensaios com as caseínas α , β e κ (Sigma) que foram dissolvidas em 67 mM NaH_2PO_4 (pH 6.8) para uma concentração final de $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. O ensaio de digestão era composto de 40 μL da solução de cada caseína, separadamente, e 10 μL da amostra de quimosina recombinante purificada ($\sim 0,014 \mu\text{g}$). As reações foram realizadas a 37 °C por 1 hora. Para efeito de comparação foi realizada uma digestão sob as mesmas condições citadas utilizando-se uma quimosina recombinante comercial (Hannilase). Como controle negativo da digestão submeteu-se as caseínas as mesmas condições de digestão utilizando água no lugar da enzima. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE.

6. RESULTADOS

6.1 Síntese do gene da pró-quimosina B de *Bos taurus*

Com base na seqüência do cDNA obtida do GenBank (nº. de acesso NM_180994), a seqüência sintética da pró-quimosina B de *Bos taurus* (365 resíduos de aminoácidos) foi desenhada substituindo-se sistematicamente os códons nativos pelos códons mais freqüentes encontrados nos genes de *P. pastoris* (Anexo 6), no entanto, em alguns casos o segundo códon preferencial foi selecionado para garantir que o conteúdo G+C na seqüência de DNA resultante ficasse próximo ao conteúdo geralmente encontrado nos genes da levedura. Também foi verificado que o gene sintético não conteria sítios para enzimas de restrição utilizadas nas estratégias de clonagem. O gene sintético foi denominado CHYMb (Figura 3A).

O gene desenhado corresponde à pró-região, requerida para o correto dobramento da proteína e estabilização do mRNA, além de seqüências codantes para a proteína madura (Figura 3B). O gene desenhado, de 1098 pb, apresenta 76,14 % de identidade com o gene nativo de *Bos taurus*. De um total de 365 códons, 225 foram substituídos por códons preferenciais para *P. pastoris*, no entanto, todas as mudanças caracterizaram mutações silenciosas no gene nativo, codificando proteína semelhante à original. O conteúdo de G+C (43,2 %) foi mantido próximo ao presente nos genes da levedura (42,73 %). Os sítios de restrição para as enzimas *Xho* I e *Not* I foram adicionados às extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente, para facilitar a clonagem nos vetores de expressão. Os sítios para as proteases Kex2p e Ste13p foram adicionados logo após o sítio de *Xho* I para permitir a perfeita remoção dos sinais de secreção de levedura e liberação da pró-quimosina B. O gene CHYMb foi sintetizado quimicamente pela empresa Epoch Biolabs (EUA) que o enviou clonado no sítio de *EcoR* V do vetor vetor pBluescriptII SK (Stratagene) gerando o vetor pBSSK-CHYM (Anexo 5).

6. RESULTADOS

sintetica	TTCGACGGTATCTTGGGTATGGCTTACCCATCTTTGGCTTCTGAGTACTCTATCCCAGTT 540 ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	F D N M M N R H L V A Q D L F S V Y M D
sintetica	TTGACAACATGATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGTTTACATGGAC 600 TTCGACAACATGATGAACAGACACTTGGTTGCTCAAGACTTGTTCTCTGTTTACATGGAC 600 ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	R N G Q E S M L T L G A I N P S Y Y T G
sintetica	AGGAATGGCCAGGAGAGCATGCTCAGCTGGGGCCATCAACCCGTCTACTACACAGGG 660 AGAAACGGTCAAGAGTCTATGTTGACTTTGGGTGCTATCAACCCATCTTACTACACTGGT 660 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	S L H W V P V T V Q Q Y W Q F T V D S V
sintetica	TCCCTGCACTGGGTGCCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGT 720 TCTTGCACCTGGGTTCAGTTACTGTTCACAATACTGGCAATCACTGTGACTCTGTT 720 ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	T I S G V V V A C E G G C Q A I L D T G
sintetica	ACCATCAGCGGTGTGGTTGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTGAGGCATCTTGGACACGGGC 780 ACTATCTCTGGTGTGTTGTGCTTGTGAGGGTGGTTGTCAAGCTATCTTGGACACTGGT 780 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	T S K L V G P S S D I L N I Q Q A I G A
sintetica	ACCTCCAAGCTGGTCGGGCCAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCC 840 ACTTCTAAGTTGGTTGGTCCATCTCTGACATCTGAACATCCAACAAGCTATCGGTGCT 840 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	T Q N Q Y G E F D I D C D N L S Y M P T
sintetica	ACACAGAACCAGTACGGGTGAGTTTGACATCGACTGCGACAACCTGAGCTACATGCCCACT 900 ACTCAAACAACATACGGGTGAGTTTCGACATCGACTGTGACAACCTTGTCTTACATGCCA 900 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	V V F E I N G K M Y P L T P S A Y T S Q
sintetica	GTGGTCTTTGAGATCAATGGCAAATGTACCCACTGACCCCTCCGCTATACCAGCCAA 960 GTTGTTCGAGATCAACGGTAAAGATGTACCCAATGACTCCATCTGCTTACACTTCTCAA 960 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	D Q G F C T S G F Q S E N H S Q K W I L
sintetica	GACCAGGGCTTCTGTACCAAGTGGCTTCCAGAGTAAAATCATTCCAGAAATGGATCCTG 1020 GACCAAGGTTTCTGTACTTCTGGTTTCCAATCTGAGAACCCTCTCAAAGTGGATCTTG 1020 ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	G D V F I R E Y Y S V F D R A N N L V G
sintetica	GGGGATGTTTTCATCCGAGAGTATTACAGCGTCTTTGACAGGGCCAACAACCTCGTGGGG 1080 GGTGACGTTTTCATCAGAGAGTACTACTCTGTTTCGACAGAGCTAACAACTTGGTTGGT 1080 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
original	L A K A I -
sintetica	CTGGCCAAAGCCATCTAA 1098 TTGGCTAAGGCTATCTAA 1098 **** * ** * ** * ** *

Figura 3. A) Seqüência primária do gene sintético CHYMb. Em preto, as seqüências codificadoras para a pró-quimosina bovina (gene otimizado CHYMb), sombreado em amarelo a seqüência correspondente a pró-região. Sombreado em vermelho, os sítios para as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I presentes nas regiões 5' e 3' do gene, respectivamente. As seqüências codificadoras para aos sítios de clivagem para as proteases Kex2p e Ste13p estão sombreados em azul. **B) Alinhamento e tradução predita das seqüências de nucleotídeos do gene nativo e sintético da pró-quimosina.** As bases em vermelho correspondem às modificações introduzidas para otimização de códons para expressão em *P. pastoris*. Sombreado em amarelo a seqüência de aminoácidos da pró-região.

6.2 Construção do vetor de expressão induzida

Para analisar a expressão do gene sintético da CHYMb em *P. pastoris* sob controle do promotor induzível *AOX1*, foi construído o vetor de expressão pPIC9-CHYM. A estratégia geral para a construção deste vetor é mostrada na Figura 4. Inicialmente, o fragmento correspondente ao gene CHYMb (1130 pb) foi liberado do vetor pBSSK-CHYM por digestão com as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I. Em seguida, o vetor pPIC9-Amy foi linearizado com as mesmas enzimas de restrição (*Xho* I e *Not* I) liberando o gene Amy (~3,5 kb) além do sítio para a protease Kex2p do vetor que é restaurado quando o gene CHYMb é sub-clonado. Após a purificação do vetor linearizado, o mesmo foi ligado ao gene CHYMb purificado utilizando a enzima T4 DNA ligase. A ligação do gene foi direcionada para entrar em fase com o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* presente no vetor. Todas as digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

Após transformação bacteriana, os clones transformantes foram submetidos a procedimentos para extração de DNA plasmidial e um clone foi selecionado para confirmar a clonagem do gene CHYMb. O vetor resultante da ligação foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III. Com essa digestão, na presença do inserto, era esperado um fragmento de ~7,5 kb e outro de 1500-1800 pb. Foi realizada também, dupla digestão com as enzimas utilizadas na clonagem, *Xho* I e *Not* I, para liberação do fragmento correspondente ao gene sintético. Após a confirmação da clonagem, esse vetor foi denominado pPIC9-CHYM. As análises de restrição comprovaram a presença do inserto no vetor de expressão e a integridade do mesmo (Figura 5).

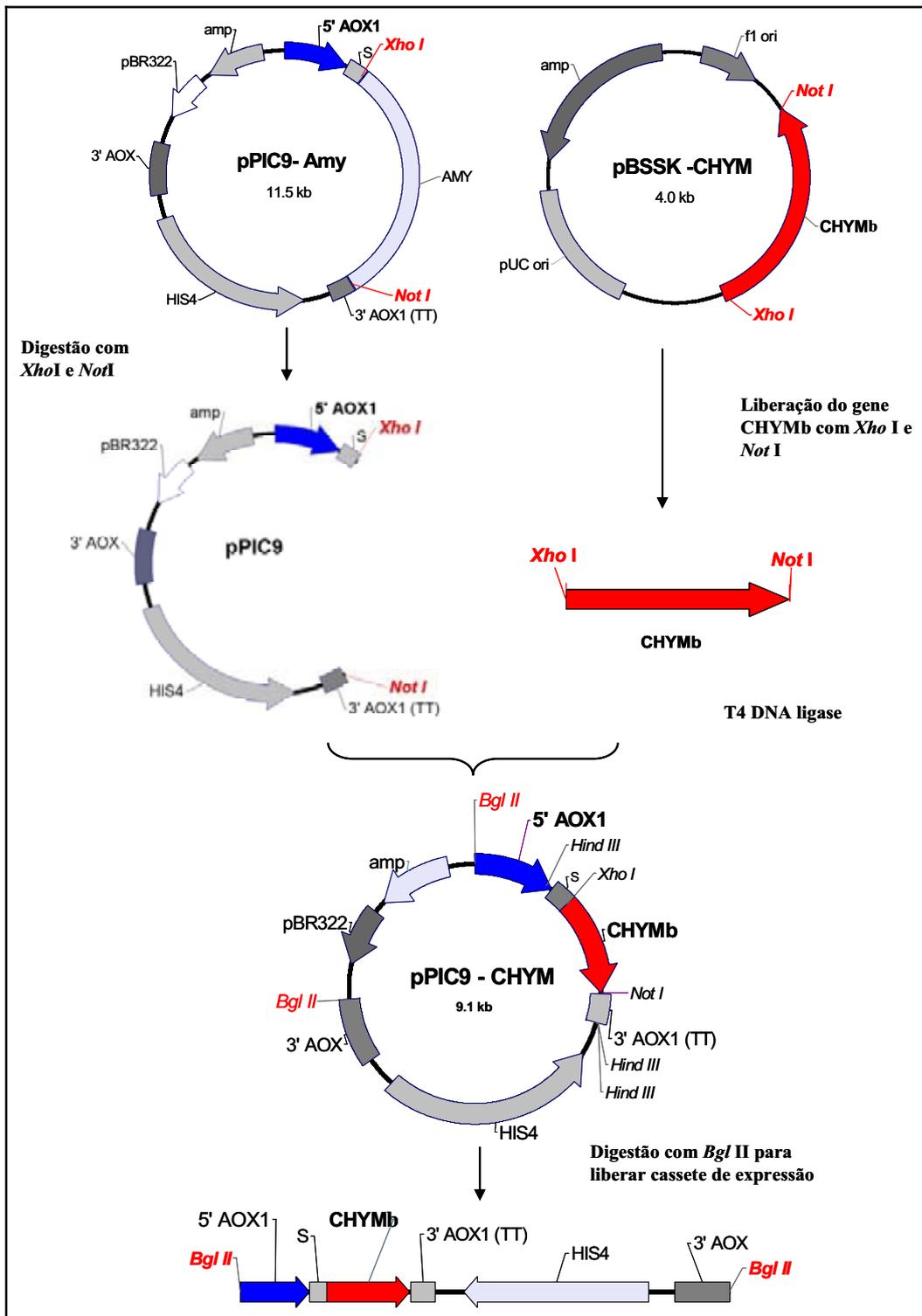


Figura 4. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pPIC9-CHYM. O vetor pPIC9-Amy foi digerido com as enzimas *Xho I* e *Not I* e o gene da pró-quimosina B previamente purificado, e contendo os mesmos sítios de restrição nas extremidades 5' e 3', foi ligado ao vetor. O vetor construído, pPIC9-CHYM, foi digerido com a enzima *Bgl II* para liberar as seqüências de integração no genoma de *P. pastoris*.

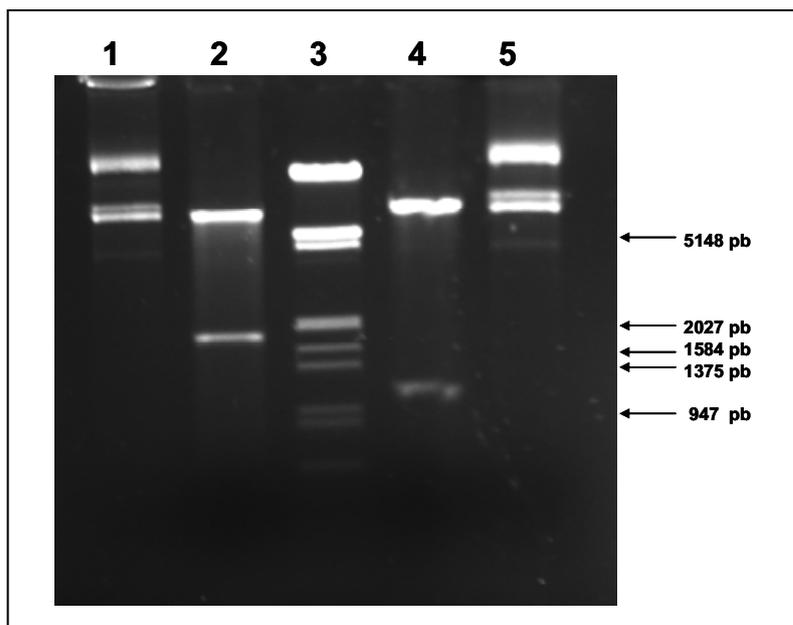


Figura 5. Análise de restrição para confirmação do vetor pPIC9-CHYM em gel de agarose 0,8 %. 1) pPIC9-CHYM intacto; 2) pPIC9-CHYM/*Hind* III; 3) Marcador λ *Eco/Hind*; 4) pPIC9-CHYM/*Xho* I/*Not* I; 5) pPIC9-CHYM intacto.

Para integração no genoma de *P. pastoris*, o vetor pPIC9-CHYM foi digerido com a enzima de restrição *Bgl* II para liberação do cassete de integração (~6,7 kb) (Figura 6). Após a digestão, esse fragmento, que contém o cassete de expressão e a marca *HIS4*, expõe nas extremidades seqüências do *locus AOX1* para direcionar a integração, que pode ocorrer no *locus HIS4* assim como no *locus AOX1* por substituição ou inserção. Para controle negativo da expressão o vetor pPIC9 original foi também digerido com a enzima *Bgl* II e usado para transformação de *P. pastoris*.

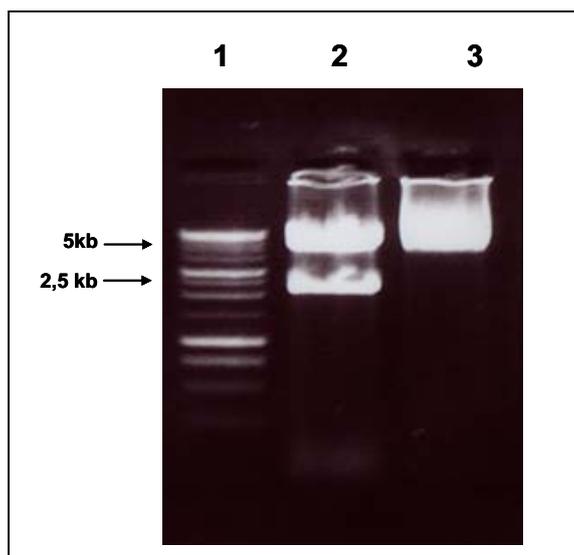


Figura 6. Análise da digestão do vetor pPIC9-CHYM para liberação do cassete de integração em gel de agarose 0,8 %. 1) Marcador 1 kb *Ladder* Promega; 2) pPIC9-CHYM/*Bgl* II; 3) pPIC9-CHYM intacto.

6.3 Construção do vetor de expressão constitutiva

Para a expressão do gene sintético da pró-quimosina B em *P. pastoris* sob o controle do promotor constitutivo *PGK1* o vetor de expressão pPZ α -CHYM foi construído. A estratégia geral para a construção do vetor de expressão constitutiva é mostrada na Figura 7. O vetor pPZ α -Amy foi digerido com as enzimas de restrição *Bst*B I e *Not* I para liberação do fragmento de 1660 pb correspondente ao peptídeo sinal assim como o gene clonado da α -amilase de *B. subtilis*. O vetor purificado (pPZ α /*Bst*B I/*Xho* I) foi ligado ao fragmento da digestão do vetor pPIC9-CHYM com as mesmas enzimas de restrição, que corresponde ao gene da pró-quimosina em fase com os sinais de secreção do fator α de *S. cerevisiae*, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (fragmento de 1399 pb).

Após transformação de bactéria e extração de plasmídios, a presença do inserto foi confirmada pela análise de restrição com as enzimas *Xba* I, *Bam*H I e *Xho* I. Para o vetor com o inserto esperava-se a liberação de fragmentos de 434 pb, 993 pb e 4264 pb quando digerido com *Xho* I; para a digestão com a enzima *Bam*H I, esperavam-se fragmentos de 1770 pb e 3921 pb; e, para a digestão com *Xba* I, era esperado um fragmento de 1545 pb e outro de 4146 pb (Figura 8A). Fez-se também digestão com as

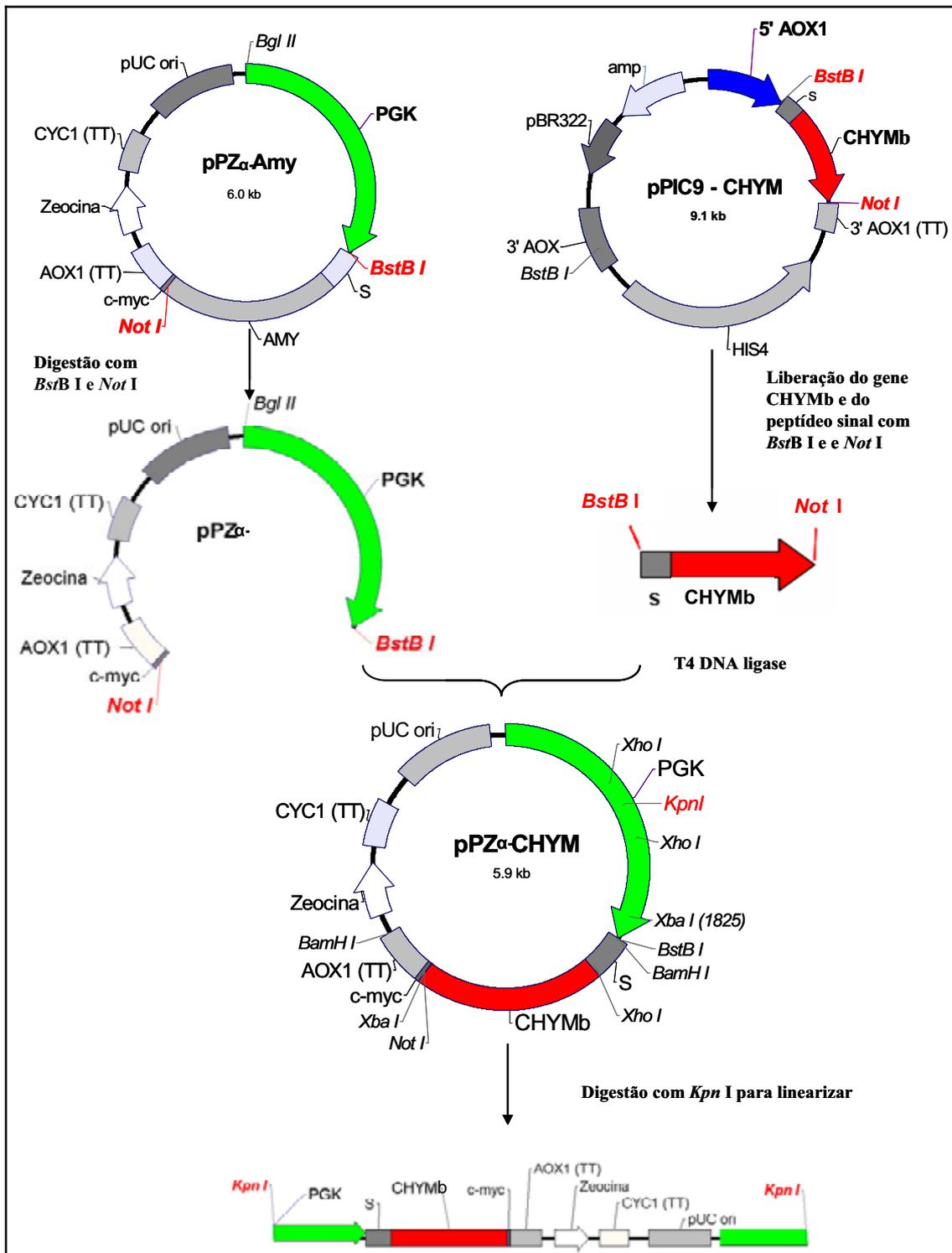


Figura 7. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do vetor pPZα-CHYM. O vetor pPZα-Amy foi digerido com as enzimas *BstB I* e *Not I* e o fragmento correspondente às seqüências de secreção de levedura (S) e ao gene da pró-quimosina B previamente purificado, e contendo os mesmos sítios de restrição nas extremidades 5' e 3' foi ligado ao vetor. O vetor construído, denominado pPZα-CHYM, foi linearizado com a enzima *Kpn I* para integração ao genoma de *P. pastoris*.

6. RESULTADOS

enzimas que foram usadas para clonagem do gene, *BstB* I e *Not* I (Figura 8B). Todas as análises confirmaram a presença do inserto assim como a integridade do vetor.

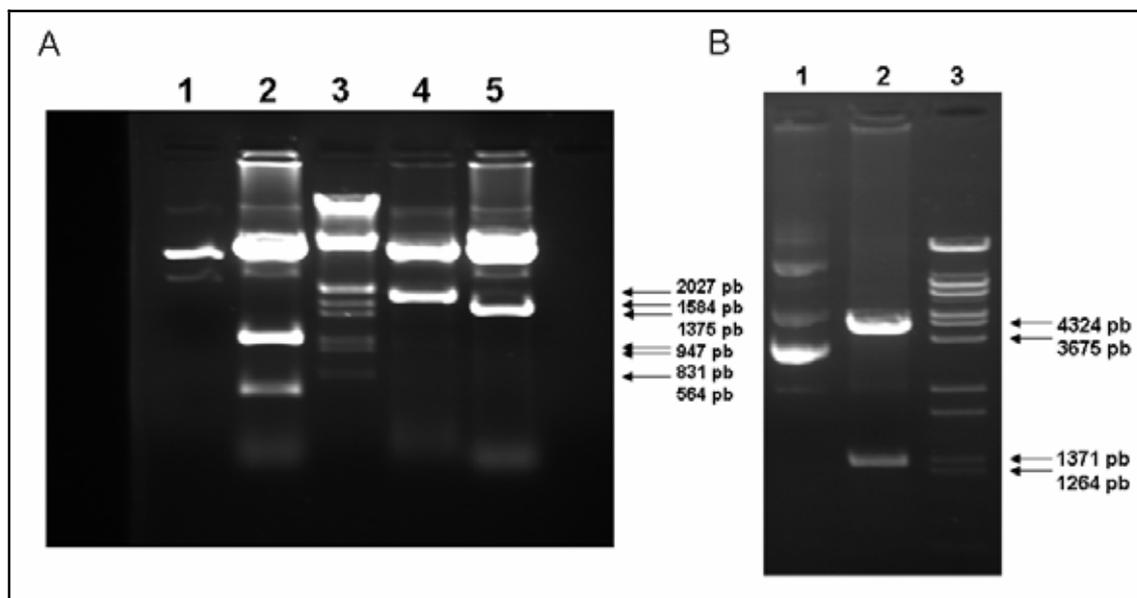


Figura 8. Análise de restrição para confirmação do vetor pPZ α -CHYM em gel de agarose 0,8 %. A. Análise das digestões com as enzimas de restrição: *Xho* I, *Bam*H I e *Xba* I. 1) pPZ α -CHYM intacto; 2) pPZ α -CHYM/*Xho* I; 3) Marcador λ *Eco*/*Hind*; 4) pPZ α -CHYM/*Bam*H I e 5) pPZ α -CHYM/*Xba* I. B. Análise da digestão com as enzimas de restrição: *BstB* I e *Not* I. 1) pPZ α -CHYM intacto; 2) pPZ α -CHYM/*BstB* I e *Not* I; 3) Marcador λ *BstE* II).

Para integração no genoma de *P. pastoris*, o vetor pPZ α -CHYM foi linearizado com a enzima *Kpn* I para expor nas extremidades seqüências do *locus PGK1* e favorecer inserção específica neste por adição. Uma característica desse vetor é justamente o direcionamento de sua integração na região promotora do *locus PGK1* do genoma de *P. pastoris* uma vez que ele não contém as seqüências para integração para os *loci HIS4* ou *AOX1*.

Como controle negativo da expressão constitutiva da proteína heteróloga, foi construído o vetor pPGKZ α . Inicialmente, o vetor pPICZ α foi digerido com as enzimas *BstB* I e *Bgl* II para retirar o promotor *AOX1* e substituí-lo pelo promotor *PGK1*. O fragmento correspondente ao promotor *PGK1* foi liberado do vetor pPZ α -Amy após digestão dupla com as mesmas enzimas de restrição e ligado ao vetor previamente

purificado. Para confirmar a ligação do promotor, o vetor foi digerido com as enzimas utilizadas para a clonagem, *Bst*B I e *Bgl* II, e com *Kpn* I. Os fragmentos esperados eram, de 2,0 e 2,6 kb, na primeira digestão, e 3357 pb e 1303 pb, na segunda (Figura 9). As análises de restrição comprovaram a presença do promotor *PGK1* no vetor e a integridade do mesmo. Para a transformação, o vetor foi linearizado com a enzima *Sac* I que cliva dentro do promotor *PGK1*.

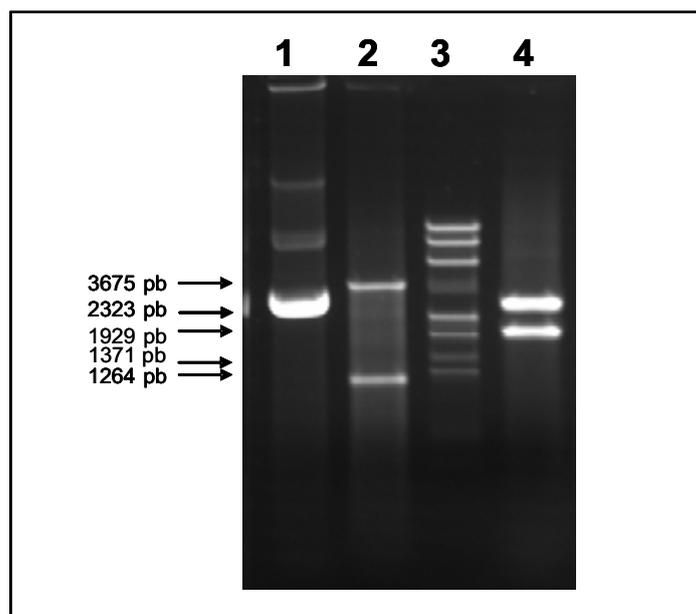


Figura 9. Análise de restrição para confirmar ligação do promotor *PGK1* ao vetor pPICZ α em gel de agarose 0,8 %. 1) pPGKZ α intacto; 2) pPGKZ α /*Kpn* I; 3) Marcador λ *Bst*E II; 4) pPGKZ α /*Bst*B I/*Bgl* II.

6.4 Transformação de *P. pastoris* e detecção da atividade enzimática

As linhagens GS115 e X33 de *P. pastoris* foram transformadas com os vetores de expressão construídos na etapa anterior pPIC9-CHYM e pPZ α -CHYM devidamente linearizados como descrito anteriormente. Devido à presença do gene histinol desidrogenase (*HIS4*) nos vetores pPIC9 que complementam a mutação auxotrófica *his4* da linhagens GS115, os transformantes com o vetor pPIC9-CHYM foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio mínimo-ágar (MD-ágar) sem histidina. Já os vetores derivados da série pPICZ α , diferente dos vetores pPIC9, não complementam a mutação do gene *HIS4* sendo preferível a utilização de linhagens de *P. pastoris his4*⁺

(X33), evitando assim, a necessidade de adição de histidina ao meio de cultura para crescimento da célula. Devido à presença do gene *Sh ble* que confere resistência a zeocina, a seleção dos transformantes com o vetor pPZ α -CHYM foi feita pela capacidade de crescimento em meio mínimo contendo zeocina. Os controles negativos (vetores sem o gene CHYMb) também foram utilizados para transformar as mesmas linhagens de *P. pastoris*.

Cada transformação resultou em ~500 transformantes. Para *screening* dos clones expressando a pró-quimosina recombinante, 94 clones de cada sistema (designados A1-94 e P1-94) e dois clones controle negativo foram selecionados aleatoriamente e submetidos a crescimento em meio líquido em placas tipo *deep well* (Ver métodos, item 5.10). Devido à utilização de diferentes promotores para a expressão de quimosina, meios de cultura distintos foram usados para a avaliação dos diferentes transformantes nas fermentações. Os transformantes A1 a A94 foram inoculados em meio contendo metanol (BMMY) onde o promotor *AOXI* é eficientemente induzido e os transformantes P1 a P94, foram crescidos em meio com glicose (BMGluY), indicado como melhor fonte de carbono para expressão do *PGK1* de acordo com Almeida *et al.*, (2002). Os transformantes expressando a enzima recombinante foram detectados pela análise do sobrenadante da cultura após o processo de ativação. Cada sobrenadante foi analisado pela capacidade de coagulação do leite e formação halos de hidrólise em placa com leite.

Dos transformantes com o vetor pPIC9-CHYM aproximadamente 74% expressaram a enzima, porém, em níveis variados. Por outro lado, todos os transformantes com o vetor pPZ α -CHYM apresentaram atividade de coagulação do leite em níveis semelhantes. Não foi detectada atividade enzimática nos sobrenadantes das culturas dos controles negativos. Quatro transformantes do sistema de transformação com o vetor pPIC9-CHYM e três transformantes com o vetor pPZ α -CHYM que exibiram as maiores atividades de coagulação foram analisados em frascos quanto ao tempo necessário para 100 μ L do sobrenadante ativado coagular 400 μ L de leite durante 96 horas de cultivo (Tabelas 4 e 5). Como pode ser observado, os clones A3 e P1 foram identificados como os maiores produtores de atividade enzimática dentre os clones de cada sistema, separadamente.

Tabela 4. Resultado do *screening* em frasco dos clones A3, A6, A14 e A56.

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
C-	-	-	-	-	-
A3	-	5 min	5 min	2 min	2 min
A6	-	-	30 min	10 min	10 min
A14	-	10 min	5 min	5 min	2 min
A56	-	-	50 min	20 min	10 min

Tabela 5. Resultado do *screening* em frasco dos clones P1, P3, e P28.

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
C-	-	-	-	-	-
P1	-	5 min	2 min	2 min	2 min
P3	-	7 min	4 min	2 min	2 min
P28	-	7 min	4 min	2 min	2 min

Para efeito de comparação, culturas paralelas foram realizadas com os dois clones que apresentaram maior atividade enzimática (A3 e P1) e os controles negativos de cada sistema, durante 96 horas (Figura 10 A e B). Alíquotas foram retiradas diariamente dessas culturas para a determinação da atividade em termos de U.mL⁻¹. A cultura controle e o clone selecionado A3 apresentaram o mesmo perfil de crescimento e densidade celular. O crescimento em metanol foi menor, se comparado a cultura do clone P1 em glicose e a produção da enzima heteróloga cresceu proporcionalmente. Como esperado, não foi detectada expressão de pró-quimosina nas culturas não induzidas (pré-inóculo e tempo 0). No entanto, com a troca do meio com glicerol pelo meio com metanol (como única fonte de carbono), o promotor *AOXI* foi induzido, sendo detectada atividade nas primeiras 24 horas de crescimento. Depois disso, com o progresso da fase de indução houve um aumento gradual nos níveis de atividade. A maior produção (50 U.mL⁻¹) foi encontrada no último ponto analisado, após 96 horas de indução. Não foi detectada atividade no sobrenadante do controle negativo.

Em contraste, mas como esperado, o crescimento do clone P1 em glicose foi rápido, e foi detectada alta atividade de coagulação do leite no sobrenadante da cultura do clone P1 logo nas primeiras 24 horas (25 U.mL^{-1}). A atividade se manteve alta durante todo o experimento, atingindo o máximo após 72 horas de crescimento ($66,66 \text{ U.mL}^{-1}$) e conservando essa atividade até 96 horas. Foi observado também que, a partir de 72 horas de cultura, a quimosina presente no sobrenadante provavelmente já se apresentava em sua forma processada uma vez que não foi necessário o processo de ativação em baixo pH para se observar atividade enzimática. O crescimento do clone P1 e do controle negativo foi similar, no entanto não foi detectada atividade de coagulação do leite no sobrenadante do controle negativo.

Em um segundo experimento de comparação entre os clones A3 e P1, adicionou-se glicose à cultura do clone P1 para uma concentração final de 2 %, a cada 24 horas de cultura, assim como metanol à cultura do clone A3 (Figura 11 A e B). Nesse experimento foi observado que o crescimento celular e a produção da proteína heteróloga, nos dois casos, permaneceram com o mesmo perfil, no entanto, a atividade encontrada no sobrenadante do clone P1 foi ainda mais alta (após 72 e 96 horas) do que a encontrada na cultura do clone A3. Após 72 horas de cultura, a atividade encontrada foi de 100 U.mL^{-1} .

Na placa de hidrólise (Figura 12), também ficou evidente a detecção de atividade de coagulação do leite nos sobrenadantes das culturas. No perfil do clone A3, a partir de 48 horas, podem ser observados halos de hidrólise de tamanhos crescentes com o decorrer da cultura. Os baixos níveis de secreção após 24 horas propiciaram sobrenadante que não foi capaz de formar halo. Já no perfil do clone P1 (cultura com adição de glicose) fica evidente a detecção de halos de hidrólise a partir de 24 horas até 96 horas de cultura. Ao contrário do ocorrido com o perfil do clone A3, não foram observadas diferenças marcantes no tamanho dos halos. Os sobrenadantes dos controles negativos sob condições de indução não formaram halos.

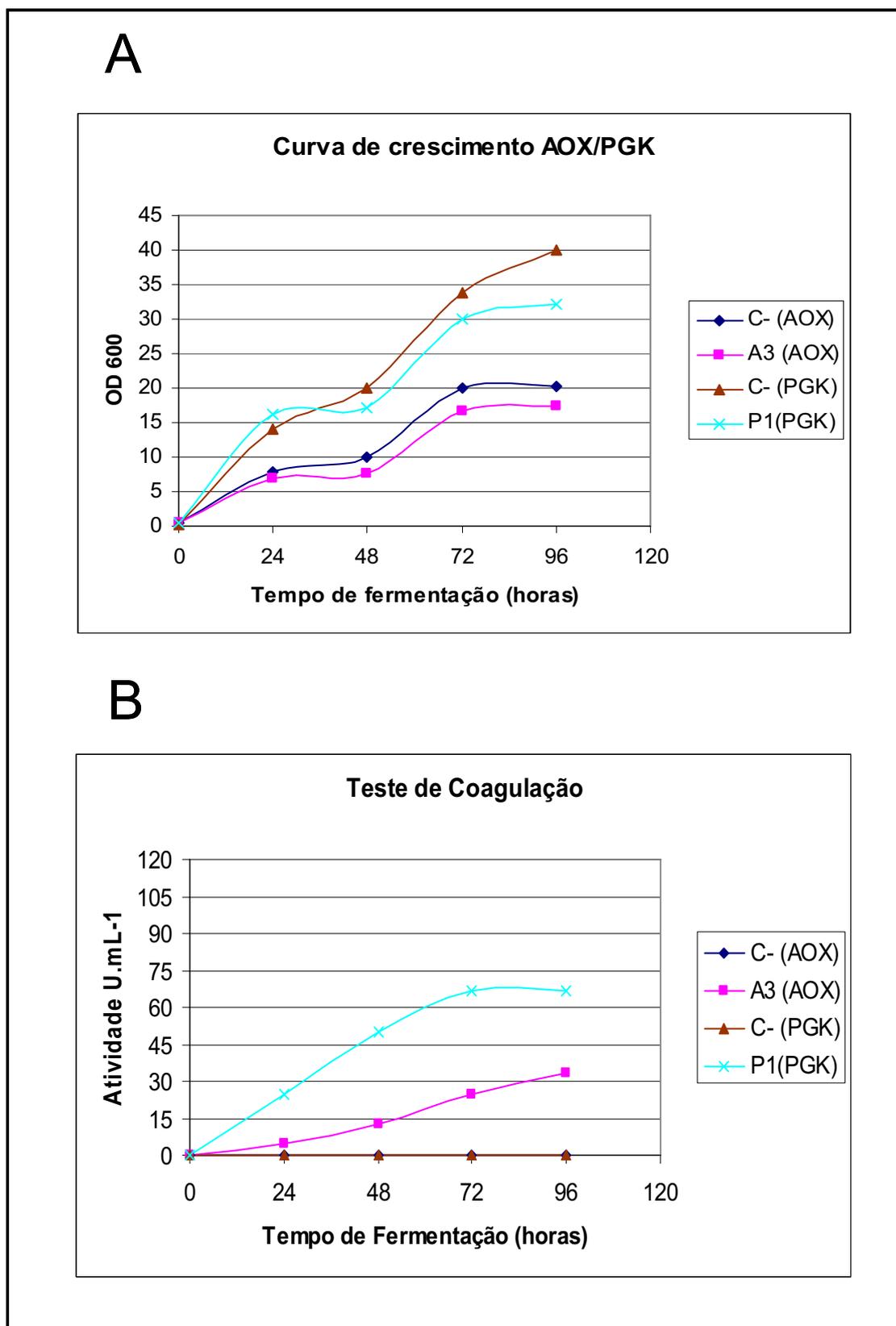


Figura 10. Cultura em frasco dos clones A3, P1 e controles negativos (C-). A) Curva de crescimento. B) Curva de atividade (U.mL^{-1}) do sobrenadante das culturas até 96 horas de crescimento.

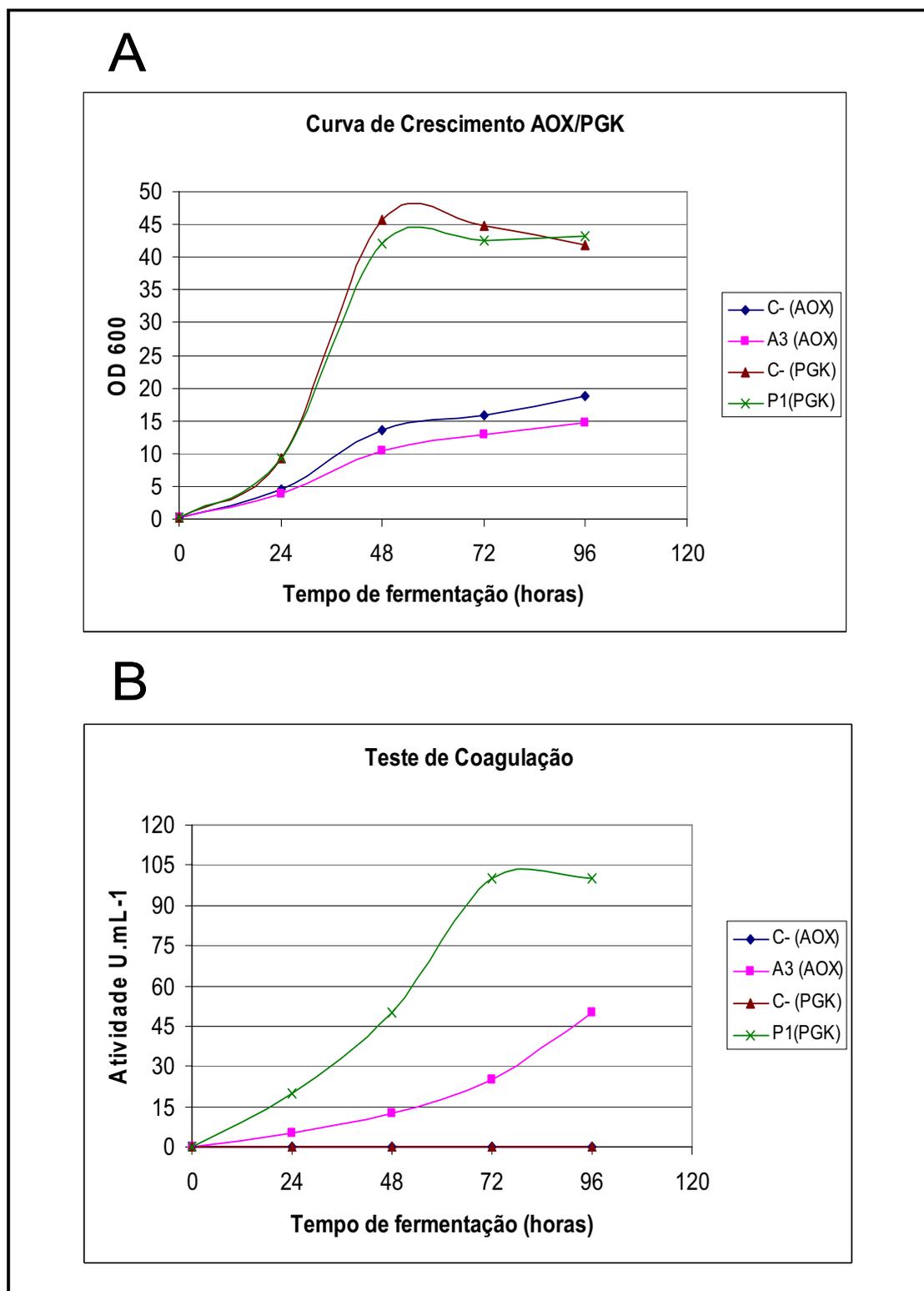


Figura 11. Cultura em frasco dos clones A3, P1 e controles negativos (C-) com adição de glicose, durante o experimento, à cultura do clone P1. A) Curva de crescimento. B) Curva de atividade (U.mL^{-1}) do sobrenadante das culturas até 96 horas de crescimento.

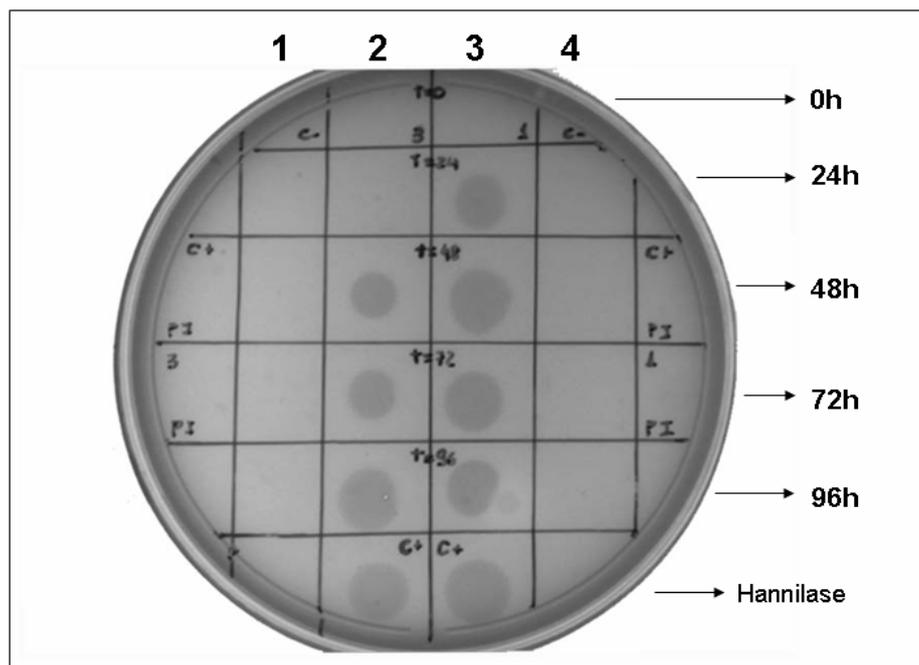


Figura 12. Ensaio de atividade em placa de agarose e leite. Sobrenadante ativado das culturas dos clones A3 e P1 (2 e 3, respectivamente) e seus controles negativos (1 e 4). Os halos de hidrólise compreendem as regiões escuras. Os dois últimos halos correspondem aos controles positivos utilizando a enzima recombinante comercial Hannilase.

A fim de detectar a enzima recombinante e determinar sua massa molecular, as proteínas presentes no sobrenadante das culturas, nos tempos que apresentaram maior produção enzimática (72 e 96 horas), foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE. Como controles foram usados os sobrenadantes (96 horas) das linhagens controle, e a enzima recombinante comercial Hannilase. A partir do perfil de migração das proteínas no gel foi possível identificar uma banda correspondente à enzima recombinante de *P. pastoris* no sobrenadante dos dois clones (A3 e P1) e que não está presente no perfil dos controles negativos (Figura 13). A massa molecular desta proteína foi estimada em ~36 kDa que correspondente à massa molecular predita da quimosina processada, como descrito por Foltmann *et al.*, (1977). Pode-se observar também que a quantidade de quimosina produzida pelo clone P1 é maior que o produzido pelo clone A3, o que corrobora os resultados encontrados nos testes de atividade enzimática. Ainda, analisando-se os perfis protéicos, é possível observar que o sobrenadante da cultura do transformante com o vetor pPZ α -CHYM é menos contaminado com proteínas endógenas da levedura (Figura 13).

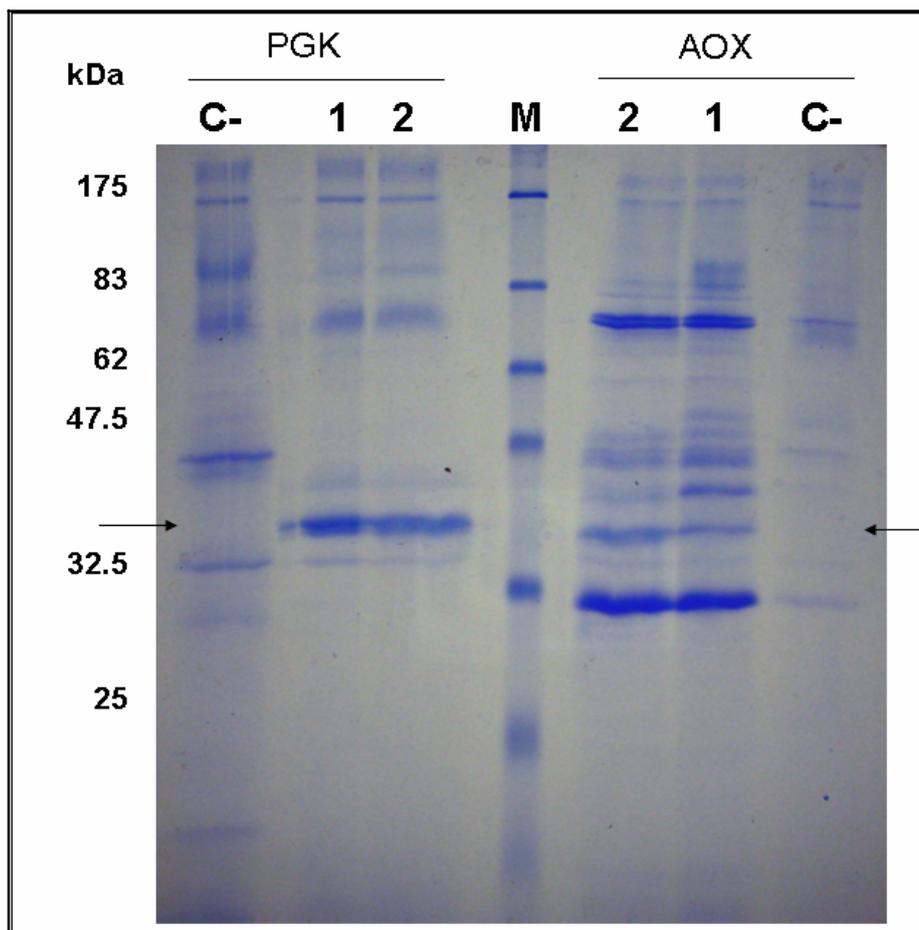


Figura 13. Análise do perfil proteico do sobrenadante das culturas dos clones A3 e P1 em gel SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie blue*. C-) Sobrenadantes dos controles negativos após 96 horas de cultura; 1-2) Sobrenadantes das culturas após 72 e 96 horas de cultura, respectivamente; M) Marcador *Prestained Protein Marker, Broad Range*. As setas indicam a posição da banda de ~36 kDa.

6.5 Southern blotting do clone A3

Para determinar o número de cópias do gene integradas, o tipo de integração (substituição ou inserção) e o *locus* de integração no genoma de *P. pastoris*, foi realizado um experimento de *Southern blotting* (Figura 14 A e B). A sonda homóloga utilizada corresponde a toda a região do cassete de integração do vetor pPIC9-CHYM. A própria sonda foi utilizada como controle positivo do experimento, sendo responsável por um sinal de ~6,7 kb no filme. Analisando os dados apresentados, ficou comprovada a integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* do clone A3, devido à

6. RESULTADOS

presença de sinal de tamanho correspondente ao cassete de expressão no poço com seu DNA genômico. Foi observado também que o clone controle, assim como o A3, mantiveram o gene *AOX1* selvagem (bandas de 2,4 kb e 1,7 kb), provavelmente devido a ocorrência de evento de *crossover* simples (integração por inserção) na região 5' *AOX1* ou 3' *AOX1*. Ainda, a hibridização com a sonda permitiu identificar que houve dupla integração do cassete de expressão no genoma do clone A3. Para estimar o número de cópias integradas, foi comparada a intensidade das bandas correspondentes ao cassete de integração (banda de ~6,7 kb) com a banda correspondente ao *locus HIS4* (banda de 2,7 kb), que apresenta apenas uma cópia no genoma de *P. pastoris* através do programa *Scion Image*. A análise do mapa de restrição do DNA genômico descrito na literatura reforça a veracidade dos resultados obtidos, tanto no que se refere ao tamanho dos fragmentos de hibridação quanto ao número deles.

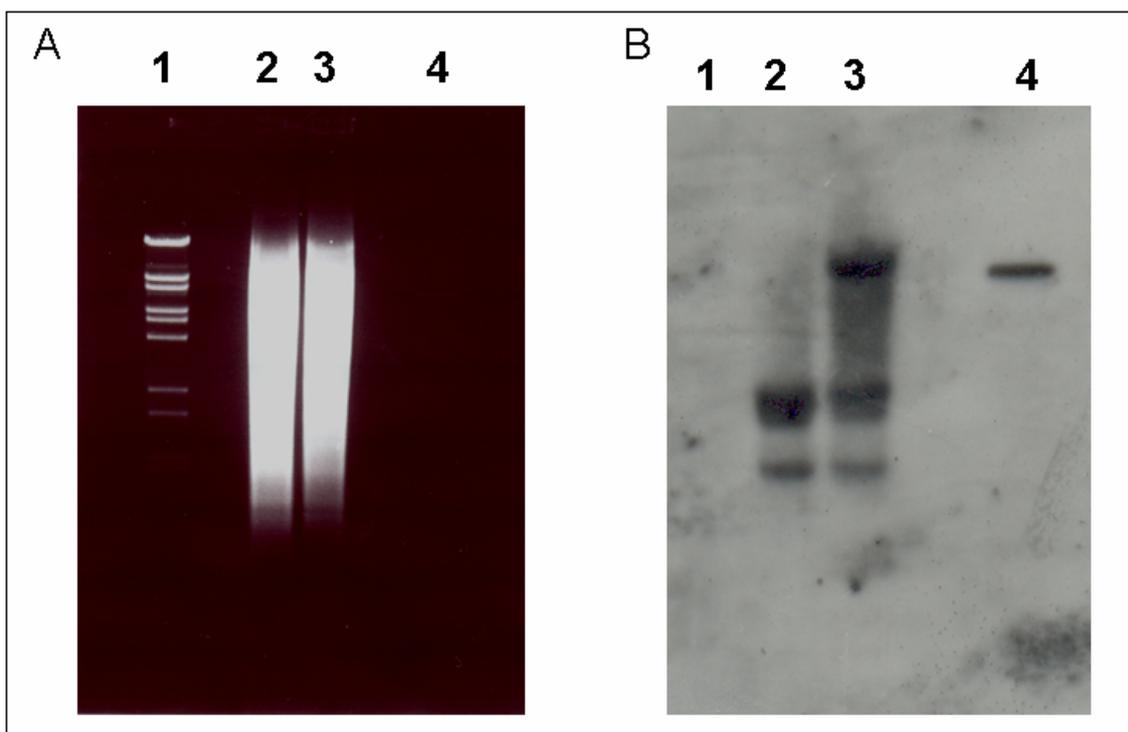


Figura 14. Southern blotting com DNA genômico de *P. pastoris* clone A3. A: Gel de agarose 0,8 % com o DNA total digerido com *Bgl* II. 1) Marcador λ *Eco/Hind*, 2) DNA do clone negativo, 3) DNA do clone A3, 4) sonda purificada (cassete de integração contendo o gene CHYMb clonado no vetor pPIC9) (controle positivo). B: Southern blotting do gel mostrado em “A”.

6.6 Southern blotting do clone P1

Para confirmar a integração do gene CHYMb no genoma de *P. pastoris* foi realizado um experimento de *Southern blotting*. A sonda homóloga utilizada corresponde a toda a região sintetizada do gene CHYMb (sonda CHYM). A própria sonda foi utilizada como controle positivo do experimento. Nas condições estabelecidas pelo *kit*, a sonda hibridou apenas com o DNA genômico do clone P1 de *P. pastoris* digerido com *Bgl* II, confirmando a presença da integração ao genoma (Figura 15 A e B). Como esperado, nos poços contendo o DNA genômico nativo da linhagem X33 e do controle negativo não houve hibridação. Após lavagem da membrana para retirar a sonda correspondente ao gene CHYMb a membrana foi novamente hibridizada com a sonda correspondente ao promotor *PGK1* de 2 kb (sonda PGK). Como pode ser observado na Figura 15C a sonda hibridou com o DNA genômico das três amostras de DNA, no entanto, foram observados perfis diferentes. Devido a essa alteração no perfil, é provável que a integração do cassete de expressão tenha ocorrido no *locus PGK1*.

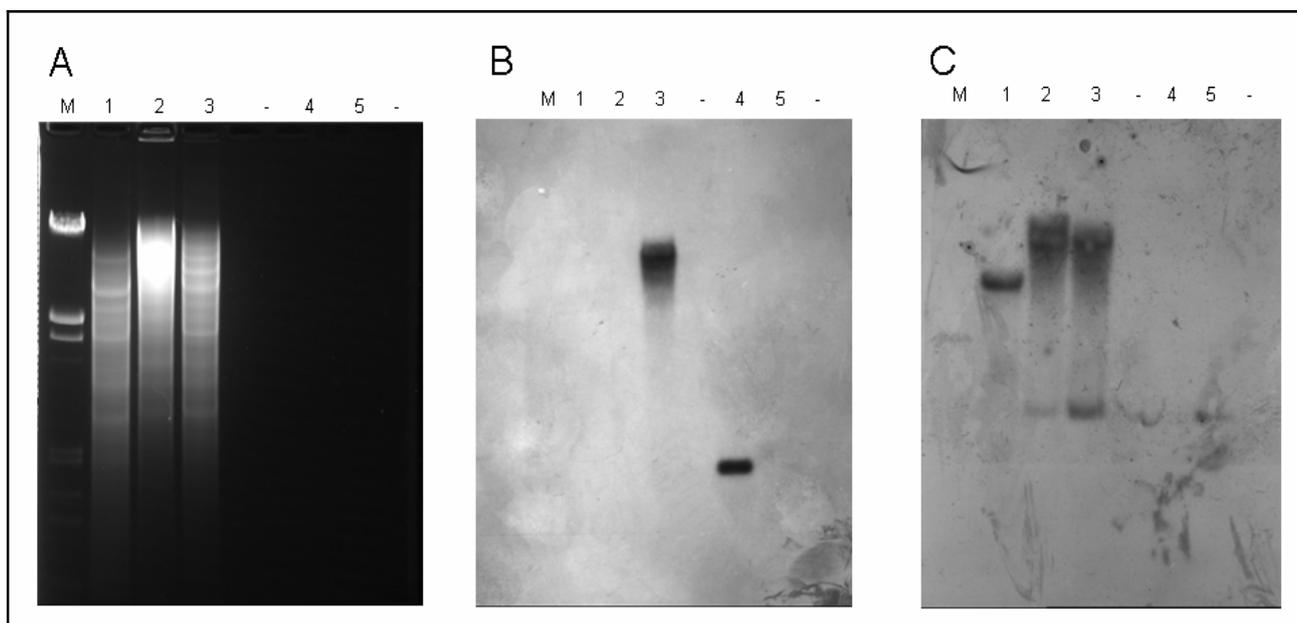


Figura 15. Southern blotting com DNA genômico de *P. pastoris* clone P1. A: Gel de agarose 0,8 % com o DNA total digerido com *Bgl* II da linhagem de *P. pastoris* X33 nativa (1), do controle negativo (2) e do clone P3 (3). No poço 1 o Marcador λ *Eco/Hind* e, no 4 e 5 as sondas utilizadas como controle positivo. B e C: Membrana do *Southern blotting* marcada com as sondas CHYM e PGK, respectivamente.

6.7 Estimativa do número de cópias integradas do cassete de expressão no DNA genômico do clone P1

Para determinar o número de cópias integradas no genoma do clone P1 foi realizado um teste de resistência a zeocina. A hiper-resistência a zeocina está associada ao número de cópias do gene *Sh ble* integradas, o que reflete no número de cópias do cassete de expressão e consequentemente do número de cópias do gene CHYMB integradas. Em um estudo feito por Vassileva *et al.* (2001), foi determinado que os transformantes resistentes a 100 µg/mL de zeocina geralmente contém uma única cópia do gene *Sh ble* integrada, aqueles resistentes a 500 µg/mL tem duas cópias, os resistentes a 1000 µg/mL três cópias e os transformantes resistentes a 2000 µg/mL quatro cópias. O clone P1 foi capaz de crescer apenas na placa de YPD com 100 µg/mL de zeocina (Figura 16), deduzindo-se então a ocorrência de apenas um evento de integração do cassete de expressão e, portanto uma única cópia do gene da pró-quimosina.

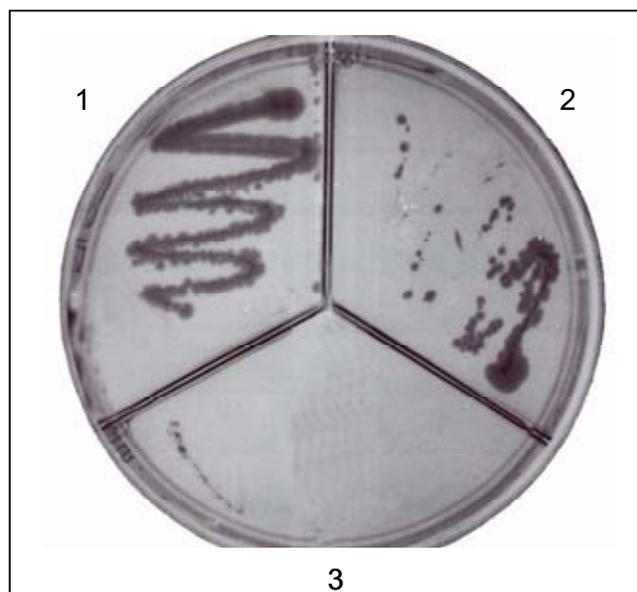


Figura 16. Teste de resistência a zeocina. Placa de YPD-ágar com concentrações variadas de zeocina: 1) Sem zeocina; 2) 100 µg/mL; 3) 500 µg/mL, inoculadas com células do clone P1.

6.8 Otimização da produção de pró-quimosina pelo clone A3

6. RESULTADOS

Foi realizado um planejamento experimental para a otimização do meio de cultivo do clone A3 para aumentar a produção enzimática. Após a realização de uma etapa inicial para escolha da melhor fonte de nitrogênio entre uréia e YNB (fonte de nitrogênio padrão nos experimentos de fermentação de *P. pastoris*), em que não foi observado diferenças significativas na densidade celular nem na atividade enzimática, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 variando a densidade celular inicial (OD_{600}), concentração de metanol e concentração da fonte de nitrogênio, para analisar a influência de cada fator, e a interação entre eles, na produção da enzima. A variável resposta foi a atividade enzimática em 72 horas de indução. Nesses experimentos o YNB foi substituído pela uréia como fonte de nitrogênio por esta última ter menor custo. A Tabela 6 apresenta os resultados das atividades enzimáticas obtidas em cada experimento.

Tabela 6. Resultado do planejamento fatorial completo (2^3).

Experimento	% Fonte de Nitrogênio	% Metanol	OD₆₀₀ inicial	Atividade enzimática (U.mL⁻¹)
1	4,02	1	10	100
2	1.34	1	10	100
3	4,02	0,5	10	0
4	1.34	0,5	10	10
5	4,02	1	1	13,3
6	1.34	1	1	0
7	4,02	0,5	1	40
8	1.34	0,5	1	100
9	2.85	0,75	5,5	40
10	2.85	0,75	5,5	40
11	2.85	0,75	5,5	50

A partir dos resultados do planejamento experimental foi possível realizar a análise de variância (ANOVA), a qual é apresentada na Tabela 7. Na análise de variância para a atividade enzimática, como variável resposta, os fatores nos níveis avaliados não apresentaram significância individualmente, apenas a interação da

6. RESULTADOS

densidade celular inicial vs % metanol apresentou significância estatística (p -level < 0,05), mostrando que só com o aumento de ambos fatores, a atividade enzimática pode ser aumentada. O modelo estatístico apresentou um ajuste adequado aos resultados experimentais, já que o modelo explica 96,26 % (R^2) da variação dos dados.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática (U.ml⁻¹).

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F₀	p
% Nitrogênio (1)	401.8613	1	401.8613	2.786061	0.170411
% Metanol (2)	500.8613	1	500.8613	3.472417	0.135858
OD₆₀₀ inicial (3)	401.8613	1	401.8613	2.786061	0.170411
1 e 2	867.3613	1	867.3613	6.013322	0.070278
1 e 3	168.3613	1	168.3613	1.16723	0.340761
2 e 3	12537.36	1	12537.36	86.92018	0.000737
Erro	576.9598	4	144.2399		
Total	15454.63	10			

6.9 Otimização da produção de pró-quimosina pelo clone P1

Inicialmente para analisar diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio na força ativa da quimosina recombinante produzida por *P. pastoris* foi realizado um planejamento de experimentos considerando três diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol e açúcar invertido) e três diferentes fontes nitrogênio (farelo de soja, uréia e sulfato de amônio) formando uma matriz 3 x 3 (Tabela 1) para se chegar a que promove maior produção enzimática. Os resultados mais significativos de atividade de quimosina foram obtidos com os meios contendo farelo de soja como fonte de nitrogênio e açúcar invertido como fonte de carbono.

Tabela 8. Resultados da combinação das fontes de nitrogênio e carbono.

Experimentos	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio	Força ativa (48 horas)
A	Glicose	Farelo de soja	18,0
B	Glicose	(NH ₄) ₂ SO ₄	<3
C	Glicose	Uréia	<3
D	Glicerol	Farelo de soja	71,0
E	Glicerol	(NH ₄) ₂ SO ₄	<3
F	Glicerol	Uréia	<3
G	Açúcar invertido	Farelo de soja	115,0
H	Açúcar invertido	(NH ₄) ₂ SO ₄	<3
I	Açúcar invertido	Uréia	<3

Com os resultados deste primeiro experimento foi decidido utilizar açúcar invertido e farelo de soja em um segundo experimento usando planejamento fatorial 2² com três repetições do ponto central, variando as concentrações de farelo de soja e açúcar invertido. A Tabela 9 apresenta os resultados da força ativa da enzima, após 24 horas de crescimento, determinada em cada experimento.

Tabela 9. Resultado do planejamento fatorial completo (2²).

Experimentos	Açúcar invertido (% p/v)	Farelo de soja (% p/v)	Força ativa (24 horas)
1	1	1,4	37,1
2	3	1,4	46,0
3	1	5,6	47,2
4	3	5,6	76,4
5	2	2,8	56,0
6	2	2,8	54,4
7	2	2,8	47,7

Foi determinado pela análise de variância, para a força ativa da enzima como variável resposta (Tabela 10), que os dois fatores (concentração da fonte de nitrogênio e

6. RESULTADOS

concentração da fonte de carbono) apresentaram significância estatística ($p\text{-level} < 0,05$), mostrando que com o aumento destes, a variável resposta é também aumentada. Na análise de variância, o modelo estatístico apresentou um ajuste adequado aos resultados experimentais, já que o modelo explica 95,57 % (R^2) da variação dos dados.

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para a força ativa da enzima.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F₀	p
Açúcar (1)	362.9025	1	362.9025	26.82796	0.013969
Farelo (2)	410.0625	1	410.0625	30.31432	0.011795
1 e 2	103.0225	1	103.0225	7.61605	0.070169
Erro	40.5811	3	13.5270		
Total	916.5686	6			

6.10 Cultivo do clone A3 em fermentador

Para avaliar a produção enzimática utilizando como base os resultados da otimização foi realizada uma cultura em fermentador de 1 L. Foram utilizadas as condições padrão segundo protocolo estabelecido pelo *Pichia Expression Kit*, sendo o processo fermentativo utilizado, descontínuo e alimentado.

Após o inóculo no fermentador (200 mL previamente crescido em MGY), foi retirada uma amostra para as medidas do tempo inicial (0 h). A partir de então foram realizadas leituras de OD₆₀₀, peso seco e atividade enzimática de tempos em tempos. O metanol foi adicionado após 26 horas de crescimento em glicerol, quando a OD₆₀₀ da cultura já estava em 64 e em crescimento; a partir de então a vazão de metanol foi controlada durante todo o experimento. Os dados da fermentação em fermentador foram plotados em um gráfico (Figura 17) para melhor visualização do andamento da fermentação, assim como para facilitar o estudo das variáveis e observar as melhores condições de produção enzimática.

6. RESULTADOS

Como pode ser observado, a atividade enzimática teve seu pico entre 34 e 37 horas de indução, com atividade de 250 U.mL^{-1} , 2,5 maior do que o máximo encontrado na cultura em frasco em 96 horas de indução em condições otimizadas. Após esse pico ocorreu uma queda na atividade enzimática, sem no entanto diminuição na densidade celular. Ao final do cultivo a fim de tentar recuperar a atividade, o pH foi elevado para 6,0 e o fluxo de metanol foi novamente aumentado. Conseguiu-se um aumento da atividade durante certo período, mas que não se manteve por muito tempo.

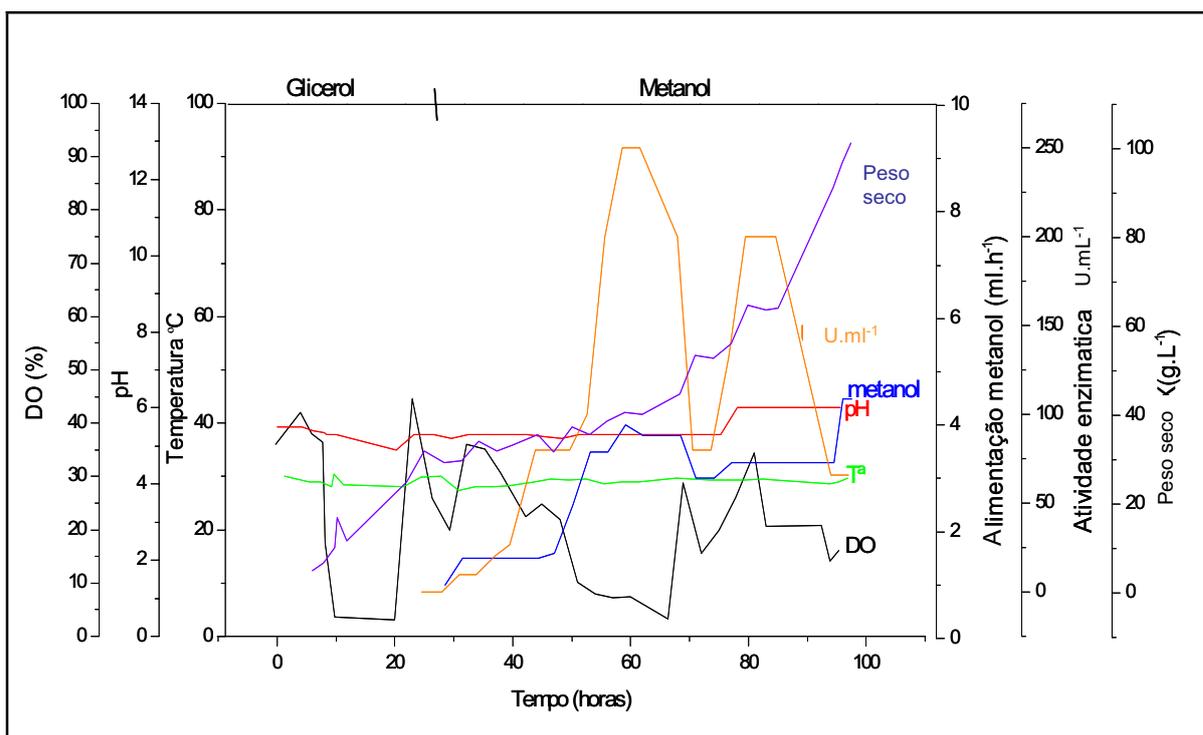


Figura 17. Perfil do cultivo do clone A3 em fermentador.

Algumas amostras de proteínas do sobrenadante foram selecionadas aleatoriamente para análise em gel SDS-PAGE: 0, 6, 12, 15, 22, 28, 31, 34, 37, 43, 46, 52, 55, 69 e 73 horas de indução (Figura 18). Pode-se visualizar no gel uma banda com peso molecular aparente um pouco maior que 40 kDa entre 6 e 28 horas e que provavelmente corresponde a pró-quimosina pois, tem o tamanho esperado segundo a literatura. Foi observado com os testes de coagulação que, mesmo sem a etapa de ativação, havia atividade enzimática no sobrenadante da cultura. Este fato foi confirmado em gel pelo aparecimento de uma banda com um tamanho menor que 40 kDa logo no início da fermentação e que foi aumentando de intensidade com o decorrer da indução, provavelmente correspondendo a quimosina processada. O processamento se deu,

6. RESULTADOS

provavelmente, em função do baixo pH do meio (entre 5 e 5,5) em que foi realizado o cultivo. A partir de 34 horas de indução, foi observado no sobrenadante da cultura bandas menores que 30 kDa, e que podem corresponder a produtos de degradação das proteases produzidas por *P. pastoris*.

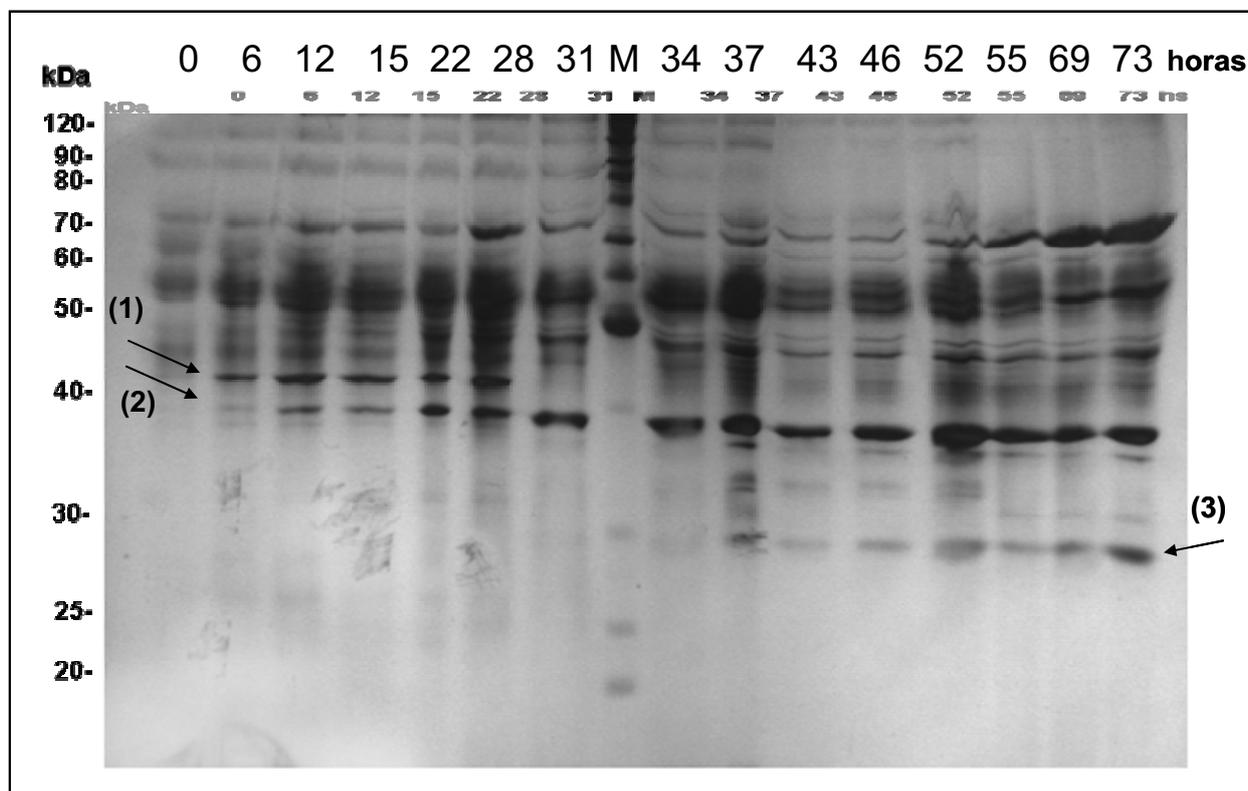


Figura 18. Análise dos sobrenadantes da fermentação em gel SDS-PAGE 12,5% corado com prata. 0-73) Amostras de proteínas presente no sobrenadante em diferentes tempos de indução; M) Marcador *Bench Marker*. As setas indicam as posições da pró-quimosina (1), quimosina madura (2) e possíveis bandas de degradação (3).

6.11 Cultivo do clone P1 em fermentador

Também para avaliar a produção enzimática utilizando como base os resultados da otimização foi realizada uma cultura em fermentador de 2 L. Esse cultivo foi realizada em fermentador BIOFLO 110 por até 64 horas. A fermentação foi conduzida com 1 litro de meio de cultivo elaborado com as concentrações que apresentaram melhores resultados nos experimentos de otimização, açúcar invertido 3 % e farelo de soja 5 %. Amostras de meio fermentado foram coletadas em 16, 20, 24, 40, 43, 48 e 64 horas e analisadas quanto a força ativa da enzima (Figura 19). Como pode ser observado

no gráfico de atividade enzimática, entre 24 e 48 horas de fermentação, a produção enzimática se manteve alta e em níveis quase constantes. Após 43 horas de cultura, no entanto, foi observada queda na atividade.

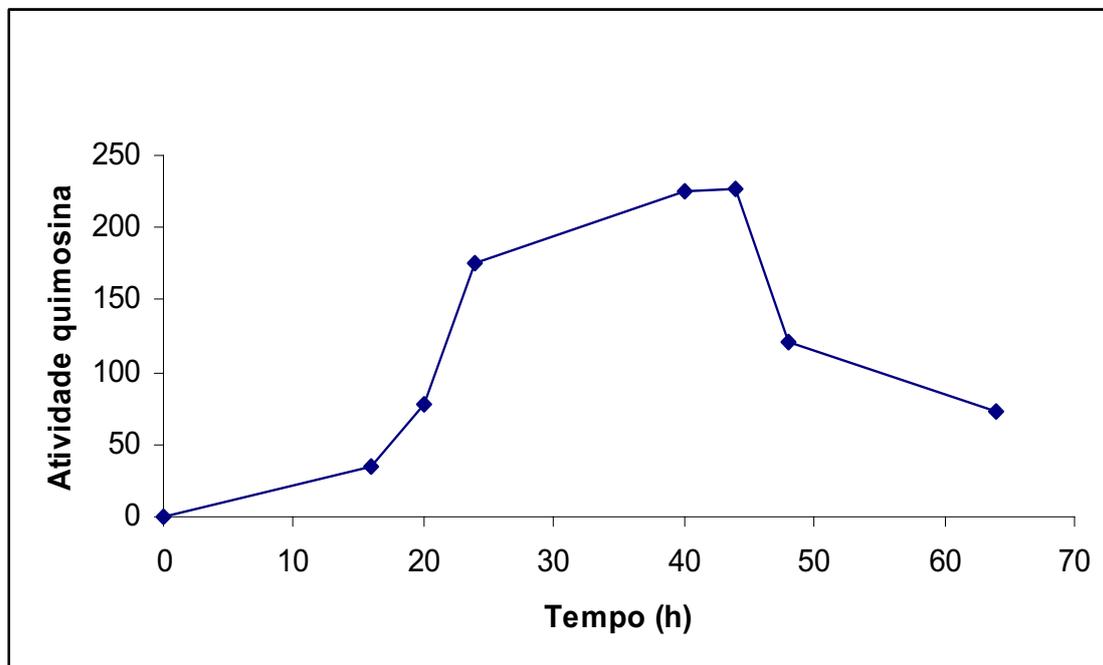


Figura 19. Curva de atividade de quimosina durante o cultivo do clone P1 em fermentador.

6.12 Purificação e caracterização enzimática

A amostra do sobrenadante de 72 horas de crescimento do clone P1 em meio com glicose (BMGluY) após concentrada por liofilização (extrato bruto), foi submetida a uma cromatografia em coluna de gel filtração (Sephacryl S-100) previamente equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 6,0. Frações de 5 mL de eluato foram coletadas por tubo, totalizando 95 frações. O perfil de atividade enzimática e do conteúdo de proteínas de cada fração, após a cromatografia, é apresentado na Figura 20. Embora a eluição com tampão fosfato tenha resultado em um grande pico de proteína ladeado por dois outros menores, apenas as proteínas eluídas nas frações 14 a 29 apresentaram atividade de coagulação do leite.

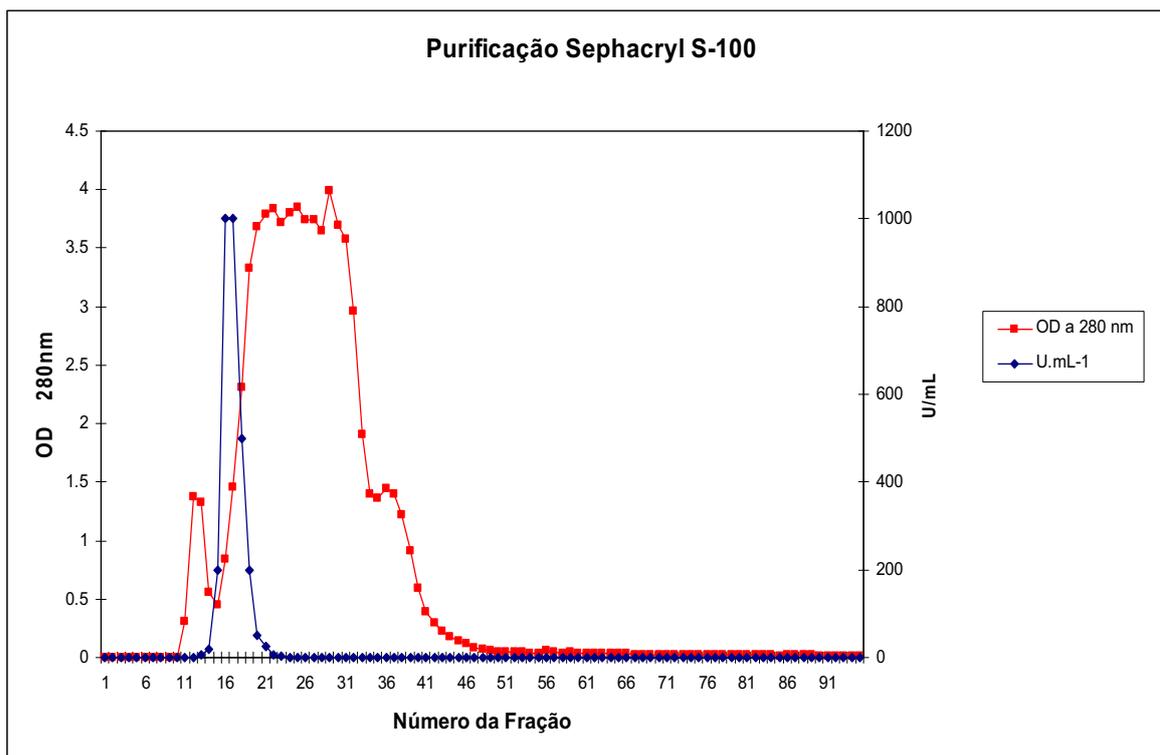


Figura 20. Perfil cromatográfico da amostra de quimosina em uma coluna Sephacryl S-100. Em vermelho o perfil de proteínas totais de cada fração e em azul a atividade de coagulação do leite em U.mL⁻¹.

As frações correspondentes ao pico de atividade foram reunidas em 4 diferentes amostras: Amostra 1, as duas primeiras frações que apresentaram atividade enzimática (14 e 15); Amostra 2, frações que apresentaram maior atividade (16,17 e 18); Amostra 3, frações no final do pico (19-22) e Amostra 4, frações que apresentaram apenas atividade residual (23-29). As quatro amostras, após concentração por ultrafiltração, foram analisadas em gel SDS-PAGE (Figura 21). Foi revelado a presença de bandas em todas as amostras com exceção da Amostra 4, no entanto apenas nas Amostras 2 e 3 aparentemente, a enzima foi purificada. No caso da Amostra 2, uma segunda banda, com peso aparente próximo ao da quimosina, também foi revelada, indicando possível presença da enzima recombinante não processada ou glicosilada.

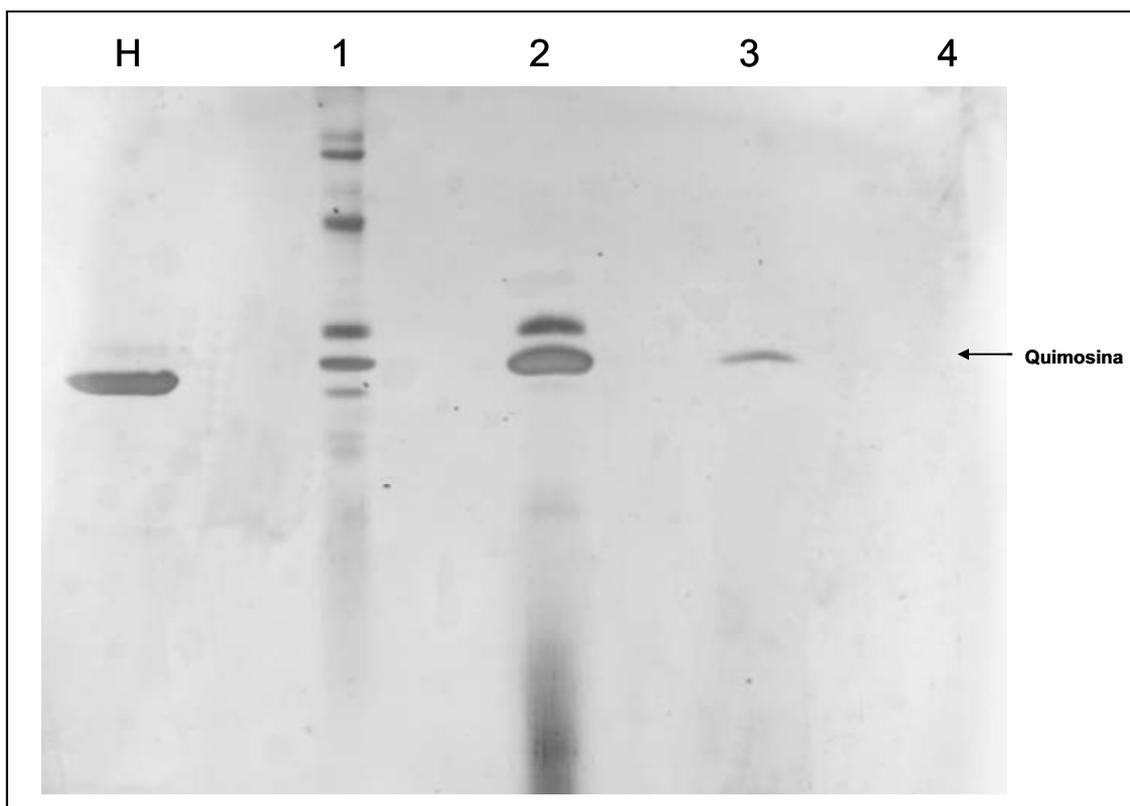


Figura 21. Análise das amostras de proteínas do processo de purificação em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com prata. H) Quimosina recombinante comercial (Hannilase); 1-4) Amostra 1 (frações 14 e 15), 2 (frações 16-18), 3 (frações 19-22) e 4 (frações 23-29). A seta indica a posição da quimosina.

Para verificação, analisou-se em gel SDS-PAGE a Amostra 2 após passar pelo processo de ativação e pela digestão com a enzima de deglicosilação, PNGase F. Como pode ser observado na Figura 22, não houve alteração no perfil eletroforético após o processo de ativação, no entanto, o tratamento com a PNGase F por 2 h resultou no desaparecimento da banda superior, indicando a presença de N-glicosilações na enzima recombinante. Pela comparação das bandas encontradas no gel de purificação da Amostra 2, realizada pelo programa *Scion Image*, foi estimado que aproximadamente 23 % de quimosina recombinante secretada por *P. pastoris* é glicosilada.

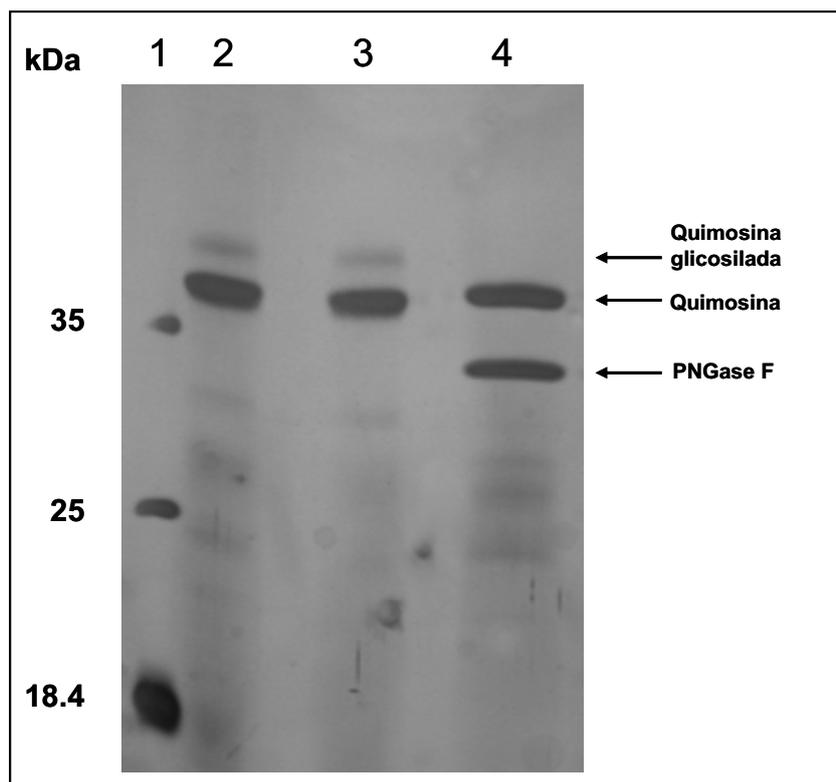


Figura 22. Caracterização da enzima recombinante produzida por *P. pastoris* em gel SDS-PAGE 12,5 % corado com prata. 1) Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; 2) Amostra 2 não tratada; 3) Amostra 2 ativada; 4) Amostra 2 tratada com PNGase F.

Para análise de especificidade, a enzima purificada (Amostra 2) foi incubada com as caseínas α , β , e κ , separadamente, e os produtos da digestão analisados em gel SDS-PAGE (Figura 23). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com a quimosina recombinante comercial. A hidrólise da caseína κ com a quimosina recombinante de *P. pastoris* produziu uma banda com massa molecular aparente de aproximadamente 14-15 kDa, que não foi observada na preparação não tratada, e que corresponde ao perfil esperado após a hidrólise desta caseína com a enzima quimosina. A hidrólise da caseína κ com a quimosina comercial gerou o mesmo produto. Já o tratamento das caseínas α e β não produziu bandas adicionais. Os resultados indicam claramente que a quimosina recombinante purificada testada para frações da caseína, atua especificamente sobre a caseína κ .

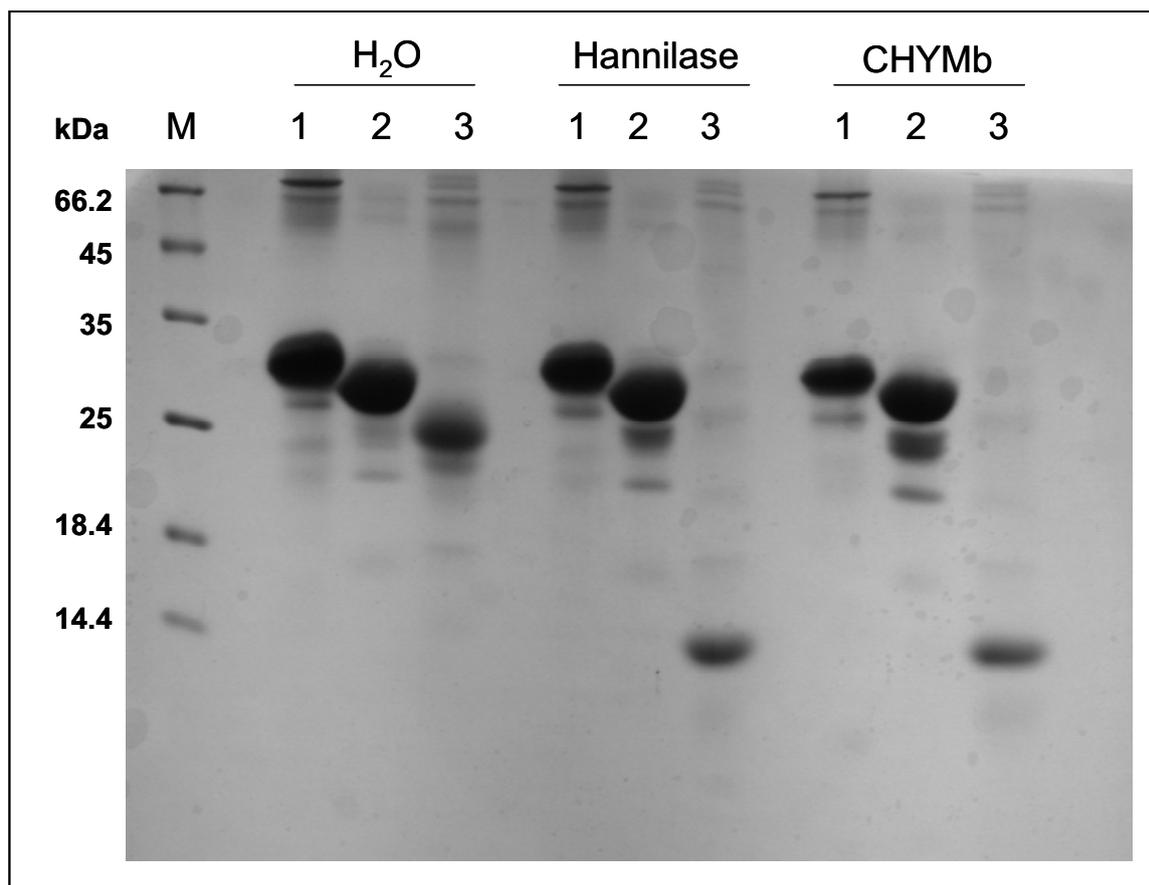


Figura 23. Análise da digestão de caseínas com quimosina em gel SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie blue*. Digestão das caseínas α , β e κ com a quimosina purificada de *P. pastoris* (CHYMb) e com enzima recombinante comercial (Hannilase). Como controle foi montado sistema de digestão com água e na ausência de qualquer enzima. M) Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* 1-2-3) Caseínas α , β e κ , respectivamente.

Para efeito de comparação, foi analisado em gel SDS-PAGE amostras de quimosina bovina comercial extraída de bezerros (ENZIMAX), quimosina bovina comercial recombinante produzida pelo fungo *A. awamori* (Hannilase) e a quimosina bovina recombinante purificada produzida por *P. pastoris* neste trabalho. Como pode ser observado na Figura 24, o preparado extraído do estômago de bezerro é contaminado com diversas outras proteínas do lúmen gástrico, enquanto que as duas enzimas recombinantes purificadas apresentam uma única espécie protéica correspondente a enzima quimosina.

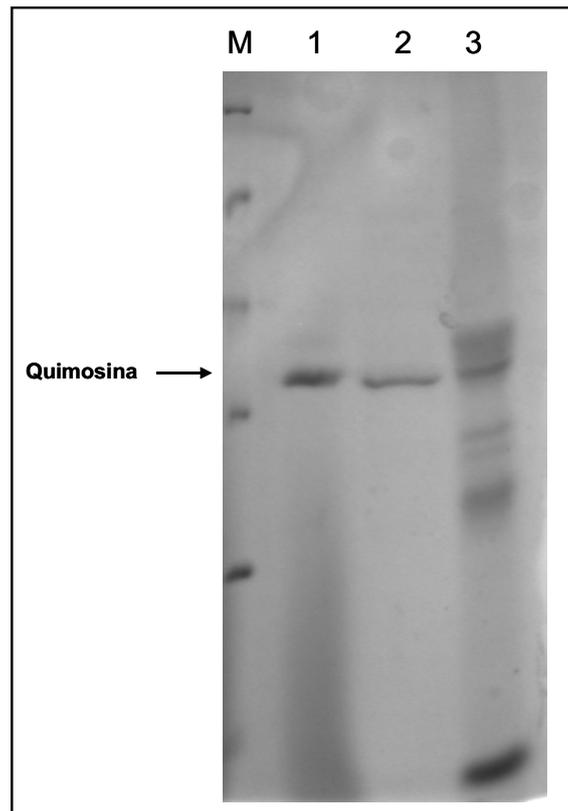


Figura 24. Análise de diferentes fontes de quimosina em gel SDS-PAGE corado com *Coomassie blue*. M) Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; 1) Quimosina purificada produzida por *P. pastoris*; 2) Hannilase; 3) ENZIMAX. A seta indica a posição da quimosina.

7. DISCUSSÃO

Para promover a coagulação do leite no processo de fabricação do queijo, a quimosina de *Bos taurus* é a enzima de preferência devido à sua baixa atividade proteolítica e especificidade sobre a caseína κ . Por causa dos problemas encontrados para a extração da quimosina de bezerros, como o alto custo e a contaminação das preparações com outras enzimas que diminuem o rendimento da produção, diversos microrganismos modificados geneticamente contendo o gene que codifica para a quimosina bovina vêm sendo desenvolvidos. Atualmente, apenas três empresas internacionais comercializam essas enzimas recombinantes. No Brasil, existe somente a produção de quimosina extraída de bezerros, a enzima recombinante é importada. Para satisfazer à demanda nacional, o principal objetivo deste estudo foi desenvolver, por meio de técnicas de Engenharia Genética, uma linhagem de levedura capaz de expressar quimosina e que possa ter aplicação comercial em laticínios para a fabricação de queijo.

A primeira etapa realizada para a obtenção de quimosina nesta pesquisa foi o desenho do gene sintético da pró-quimosina B de *Bos taurus* (CHYMb) com os códons otimizados para expressão em *Pichia pastoris*, já que diversos trabalhos já assinalavam que a otimização do *codon usage* e do conteúdo de G+C geralmente resultam em maiores níveis de expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* (Fang *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2006; Surribas *et al.*, 2007). O *codon usage* é considerado um dos fatores limitantes para a expressão de proteínas heterólogas, pois códons que são comuns a algumas espécies podem ser raros em *P. pastoris*. Isto pode resultar em um retardo temporário da tradução e/ou uma terminação prematura da proteína (Daly & Hearn, 2005; Gustafsson *et al.*, 2004). No entanto, devido à redundância do código genético, é possível variar a seqüência de ácido nucléico racionalizando o *codon usage* e evitando os códons raros sem alterar a seqüência de aminoácidos da proteína, o que para a indústria é mais desejável (van den Brink *et al.*, 2006). Além do mais, é também possível otimizar o conteúdo de G+C. O desenho do gene CHYMb foi realizado pela empresa Epoch Biolabs que utilizou um *software* próprio para otimização de códons e que também elimina possíveis estruturas secundárias estáveis. A correção do conteúdo de G+C e eliminação de sítios de restrição foram feitos por inspeção manual da seqüência. Cardoza *et al.* (2003) promoveram a expressão de quimosina bovina imunologicamente e enzimaticamente indistinguíveis da quimosina natural bovina em *A. awamori*, após otimização do gene para a expressão neste microrganismo. Outro exemplo desta abordagem pode ser encontrado na

expressão do gene da fitase ácida de *Aspergillus niger*, em que o gene foi sintetizado com códon preferencial de *P. pastoris* e foi observado um aumento de 14,5 vezes na expressão da enzima comparado com a expressão do gene nativo (Xiong *et al.*, 2005).

Além da otimização de códons, este trabalho avaliou dois sistemas de expressão para *P. pastoris*. Vetores integrativos carregando dois diferentes promotores *AOX1* (Invitrogen) e *PGK1* (desenvolvido por nosso grupo) foram utilizados para a clonagem do gene sintético CHYMb e testados para a expressão da enzima de forma induzida e constitutiva, respectivamente. A integração cromossomal é mais desejável do que o uso de sistemas episomais de expressão, pois estes tendem a ter baixo número de cópias em *P. pastoris* além de serem pouco estáveis (Daly & Hearn, 2005). O desenvolvimento de microrganismos geneticamente estáveis (taxa de perda de menos de 1 % do vetor por geração) é de suma importância na indústria para a manutenção de taxas de produção constantes. O promotor induzível *AOX1* é bastante utilizado para dirigir a expressão de diversas proteínas de interesse que podem atingir 30 % do total de proteínas expressas (Macaulay-Patrick *et al.*, 2005). Já o promotor constitutivo *PGK1* de *P. pastoris* foi recentemente isolado por Almeida *et al.* (2005), e demonstrou apresentar atividade superior ao *AOX1* em testes preliminares. O promotor *PGK1* de diversos microrganismos (*S. cerevisiae*, *K. lactis*, *T. reesei*) foi utilizado com sucesso na construção de vetores de expressão para leveduras e fungos filamentosos e tem-se mostrado como uma atraente opção para a produção de proteínas heterólogas nestes sistemas (Iwata *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2000; Johansson & Hahn-Hagerdal, 2002). A pró-quimosina bovina já foi secretada em altos níveis (pelo menos 5 % do total de proteínas celulares) por *S. cerevisiae* sob o comando do promotor *PGK1* desta levedura (Mellor *et al.*, 1983).

Os vetores de expressão construídos neste trabalho (pPIC9-CHYM e pZα-CHYM) foram utilizados para a transformação de *P. pastoris*. Os dois sistemas de transformação mostraram-se muito eficientes gerando vários transformantes. Os clones resultantes da transformação com o vetor pPIC9-CHYM variaram quanto à produção da enzima, havendo transformantes (26 %) em que não foi possível se detectar qualquer atividade de coagulação do leite. Isto provavelmente se deve à ausência do vetor de expressão em alguns transformantes His⁺ e parece ser decorrente de eventos de recombinação gênica do gene *HIS4* presente no vetor e o alelo *his4* no genoma de *P.*

pastoris (Cregg *et al.*, 2000). Este fato foi comprovado no presente trabalho após um experimento de *Southern blotting* que revelou a ausência do cassete de expressão em um dos clones His⁺ que não tinham atividade de quimosina (dado não mostrado). Estes eventos podem esclarecer o fenótipo de 10-50 % de colônias transformantes His⁺ que não apresentam atividade enzimática (Cregg *et al.*, 2001). Já a produção de níveis variados da enzima nos clones transformantes com o mesmo cassete de expressão é consistente com o uso de vetores integrativos e ao fato de que os diversos eventos de recombinação que governam a integração genômica das construções recombinantes podem também afetar os níveis de expressão heteróloga e levar a variação clonal (Gerasimova & Crces, 2001). Neste caso, a integração de DNA exógeno pode ocorrer em múltiplas inserções e em diferentes *loci* (*AOX1* ou *HIS4*), devido à organização da cromatina nos sítios de integração (Gerasimova & Corces, 2001).

Embora tenha havido estas variações na transformação com o vetor pPIC9-CHYM, o mesmo não foi observado com os transformantes com o vetor pPZα-CHYM. Todos os clones analisados selecionados em placa com zeocina apresentaram atividade, com baixa variação nos níveis de expressão. Este fenótipo pode indicar que haja uma limitação com relação aos eventos de integração no *locus PGK1*. A ausência de seqüências que possam promover conversões com alelos endógenos também contribui para a ausência de falsos positivos. Podemos presumir, pois, que não houve múltiplas integrações do cassete de expressão, ou que o número de integrações, neste caso, não afeta a quantidade de proteína expressa. Não foi observado qualquer atividade enzimática no sobrenadante dos controles negativos mostrando que a atividade de coagulação do leite produzida pelos transformantes é devido unicamente à expressão do gene CHYMb. Além disto, estes resultados mostram que a enzima secretada no meio é funcionalmente ativa.

Quando o padrão de expressão mediado pelo promotor induzível *AOX1* foi comparado com o promotor constitutivo *PGK1*, foram observadas diferenças importantes na expressão do gene CHYMb. De todos os clones utilizados para o ensaio de produção enzimática, destacaram-se os clones A3 e P1 (Tabelas 4 e 5) que foram analisados quanto ao número de cópias e o modo de integração do gene CHYMb no genoma da levedura. As integrações foram comprovadas a partir de experimentos de *Southern blotting*. Foi demonstrado que a integração do vetor de expressão no genoma

do clone A3 ocorreu por inserção no *locus AOX1*, pois as bandas correspondentes a este *locus* foram reveladas na membrana do *Southern blotting* indicando que não houve substituição do gene *AOX1* (Figura 14). No caso do clone P1, a comparação do perfil de bandas observado no experimento de *Southern blotting* entre o clone transformado e a linhagem X33 de *P. pastoris* (Figura 15), é consistente com a integração por inserção do cassete de expressão no *locus PGK1* como já observado para os vetores de *P. pastoris* baseados no promotor *GAP* (Sears *et al.*, 1998). A Figura 25 mostra um modelo para a integração no *locus GAP* que poderia se aplicar no caso de integração por inserção no *locus PGK1*. A integração por substituição no *locus PGK1* possivelmente evitaria o crescimento da levedura uma vez que o gene *PGK1* é essencial e está presente em apenas uma cópia no genoma de *P. pastoris* (Almeida *et al.*, 2005). A Figura 26 mostra esquematicamente o provável perfil de integração dos vetores pPZ α -CHYM (clone P1) e pPGKZ α (C-) e que pôde ser confirmado pelo *Southern blotting* (Figura 15).

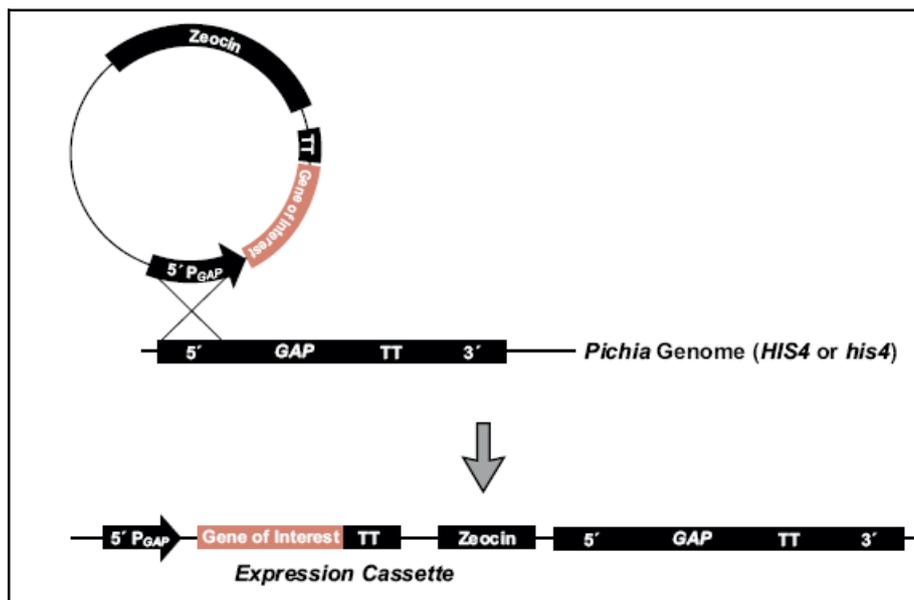


Figura 25. Representação esquemática da inserção do vetor no genoma de *P. pastoris* por um simples evento de *crossover* no *locus GAP*. Figura extraída do Catálogo V200-20 - *Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins* (Invitrogen).

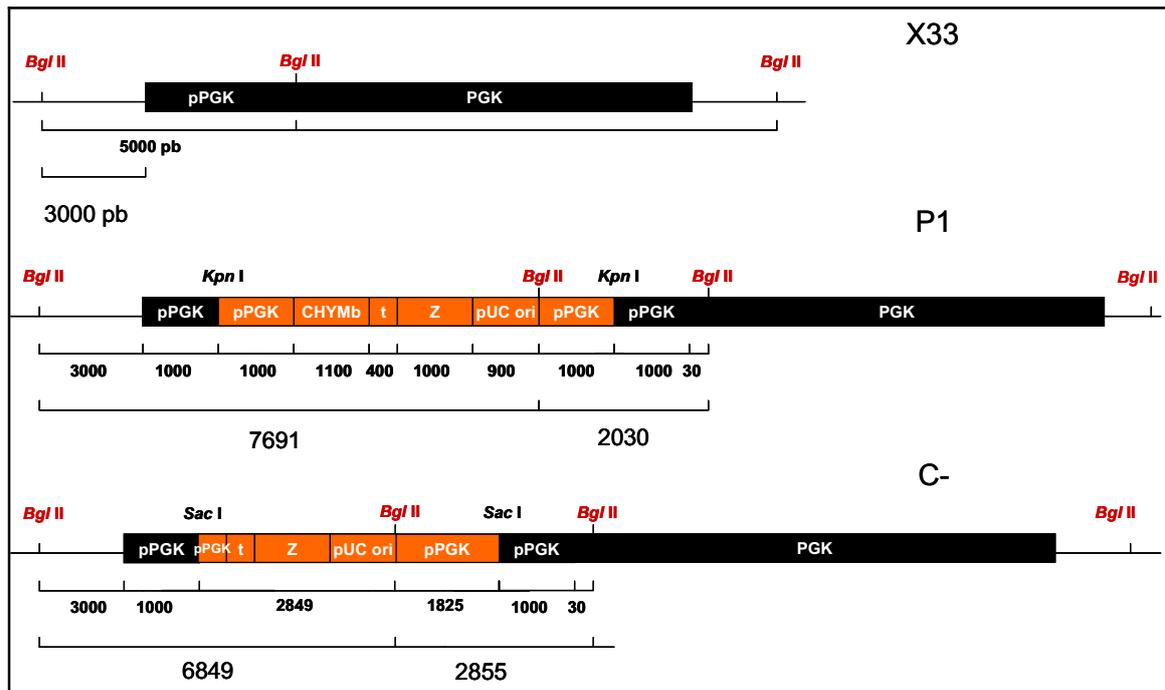


Figura 26. Representação esquemática dos possíveis modos de integração dos vetores pPZ α -CHYM e pPGKZ α no genoma de *P. pastoris*. Em vermelho, o vetor de expressão. Em preto, o locus *PGK1*.

A expressão de quimosina pelos clones A3 e P1 foi comparada por meio de ensaios realizados em culturas simultâneas em meio sem otimização. O clone A3 foi crescido em meio de indução com metanol enquanto que o clone P1 foi crescido em glicose (melhor fonte de carbono selecionada para expressão do promotor *PGK1* descrito por Almeida *et al.* [2005]). Em ambos os clones foi detectada atividade enzimática a partir de 24 horas de cultura, atingindo o pico entre 72 e 96 horas, sendo, no entanto, os níveis de produção bem diferentes. A cultura do clone P1, embora com apenas uma única cópia do gene CHYMb integrada, apresentou maiores densidades celulares e maior atividade enzimática no sobrenadante, tanto nas culturas sem a adição de glicose como naquelas em que foi adicionada glicose durante o experimento (Figuras 10 e 11). O acúmulo de atividade ao longo da cultura indica a expressão constitutiva do gene CHYMb sob o controle do promotor *PGK1*. A adição de glicose durante o cultivo permitiu um maior crescimento celular com um concomitante aumento da produção enzimática (Figura 11). O crescimento lento do clone A3 em metanol se deve provavelmente a metabólitos tóxicos produzidos durante a assimilação deste álcool (Rollini *et al.*, 2005). A atividade de quimosina encontrada no sobrenadante da linhagem P1 foi quatro vezes superior à linhagem A3 nas primeiras 24 horas, e duas

vezes superior nas últimas horas de cultivos analisadas. A melhor produção do clone A3 (96 horas de indução) foi atingida pelo clone P1 em apenas 48 horas de crescimento. Em trabalho semelhante realizado por Vassileva *et al.* (2001), comparando o promotor *AOX1* com o promotor constitutivo *GAP*, também foi observado a produção de altos níveis de expressão do clone com o promotor constitutivo logo no início, permanecendo em níveis constantes durante todo o experimento. O clone AOX, neste caso, atingiu níveis similares apenas após 3-4 dias de indução com metanol. Em outro trabalho, no entanto, analisando os mesmos promotores para expressão do gene da lipase B de *Candida antarctica* em *P. pastoris*, observou-se que a expressão desta proteína em frascos foi maior quando utilizado o promotor *GAP*, no entanto na fermentação em biorreator, o promotor *AOX1* promoveu maior expressão da proteína (Wittrup *et al.*, 2007). É provável que, se a cultura do clone A3 tivesse sido estendida por mais horas, os níveis protéicos do clone A3 atingissem os mesmos níveis de produção do clone P1, já que a cultura ainda estava em crescimento e é reportado em diversos trabalhos que, para a produção de proteínas recombinantes usando o promotor *AOX1*, o tempo requerido para atingir o pico de produção enzimática é geralmente muito longo (120-240 horas) (Kuwae *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007).

Foi observado no decorrer da cultura do clone P1 que a pró-quimosina era auto-processada, não sendo necessária a etapa de ativação antes do ensaio de coagulação do leite. A partir de 72 horas praticamente toda a enzima encontrada no sobrenadante estava na sua forma ativa (~36 kDa). Isso já fora observado quando a pró-quimosina foi expressa em *P. pastoris* (Espinosa *et al.*, 1999) assim como em outros microrganismos (Ward *et al.*, 1990; Cullen *et al.*, 1987). Esta auto-ativação está provavelmente relacionada à queda do pH (4) observada durante o cultivo em frasco. Todavia, não podemos excluir a possibilidade da clivagem da pró-quimosina por uma protease secretada de *P. pastoris*. Além disso, o sobrenadante da cultura do clone P1 apresentou-se menos contaminado com as proteínas endógenas de *P. pastoris* que o sobrenadante do clone A3, sendo a quimosina a principal proteína secretada para o meio (Figura 13). O crescimento em metanol foi acompanhado pela secreção de diversas outras proteínas além da pró-quimosina, o que poderia dificultar o processo de purificação.

Foram realizadas otimizações dos meios de cultura para a expressão do clone A3 e P1. A redução no custo da produção da enzima através do melhoramento do meio de

fermentação é uma etapa fundamental para aplicação industrial. A otimização é feita, tradicionalmente, variando-se um fator e mantendo os outros constantes. No entanto, esta abordagem consome mais tempo e é incapaz de detectar o melhor meio devido, principalmente, à ausência da análise de interações entre os fatores (Damaso *et al.*, 2004). Uma das estratégias mais utilizadas para identificar a significância relativa dos fatores e encontrar as condições ótimas é baseada em experimentos estatísticos, como os planejamentos fatoriais. Na otimização da cultura do clone A3 foram variados a concentração de metanol, a densidade celular inicial e a fonte de nitrogênio, descritos como fatores importantes na expressão protéica em *P. pastoris* (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Como pode ser observado pelas análises estatísticas (Tabela 7), o único fator realmente importante para o aumento da atividade enzimática, dentro da faixa analisada, foi a interação entre os fatores densidade celular inicial e concentração de metanol. Só com o aumento de ambos os fatores é que a atividade pode ser aumentada. Enquanto que em outros microrganismos o principal impacto no crescimento e custo das culturas é geralmente a fonte de nitrogênio (Damaso *et al.*, 2004), neste caso podemos reduzir este fator sem ter queda na produção da proteína. É possível que a utilização de altas concentrações de metanol em culturas com baixa densidade celular pode levar a um efeito tóxico para o desenvolvimento da levedura ou afetar a estabilidade da proteína. Por outro lado, o emprego de altas densidades celulares com baixa concentração de metanol pode não ser suficiente para promover uma expressão significativa do gene da pró-quimosina. Damaso *et al.* (2004), analisando a expressão de β -1,4-xilanase em *P. pastoris* e otimizando a expressão através de um planejamento fatorial 2^3 com as mesmas variáveis, concluíram que a densidade celular inicial era o fator mais importante para aumentar a produção da enzima. Neste caso, não houve influência do metanol ou da fonte de nitrogênio na produção. Hong *et al.* (2004) observaram que concentrações elevadas de metanol foram danosas para a expressão heteróloga de lacase, enquanto que concentrações elevadas de metanol aumentaram os níveis de expressão de β -2-glicoproteína-I humana (Daly & Hearn, 2005). A acumulação do metanol pode ter efeitos negativos no crescimento celular, e conduzir a menores níveis de expressão da proteína. Conseqüentemente, o nível ótimo de metanol necessita ser avaliado para cada proteína específica. Os experimentos realizados no presente trabalho são apenas estudos preliminares, havendo a necessidade de se estender os níveis dos parâmetros analisados e alterar as variáveis para se chegar a um meio ótimo de indução que promova maiores níveis protéicos.

Na otimização da cultura do clone P1 foram testados diferentes fontes de carbono e nitrogênio buscando àquelas que promovessem maior produção enzimática. As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas podem afetar consideravelmente a produção da proteína heteróloga (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Ya-kun & Shi-ping, 2004). Nestes testes foi utilizada como resposta a medida da força ativa da enzima, que é a medida normalmente utilizada na indústria de quimosina. O farelo de soja e o açúcar invertido (mistura de glicose e frutose) foram as fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, que propiciaram os melhores resultados (Tabela 8). A análise estatística realizada com os resultados do planejamento fatorial 2^2 variando a quantidade destas substâncias no meio de cultura mostra a influência destes dois fatores sobre a produção enzimática, sendo que o aumento nas concentrações de farelo de soja e/ou açúcar invertido elevam a produção enzimática (Tabela 10). Testes adicionais com quantidades superiores às utilizadas devem ser realizados para se chegar as condições ótimas para produção de quimosina. Todavia, estes resultados preliminares são animadores, pois tanto o farelo de soja quanto o açúcar invertido são fontes baratas de substratos para a fermentação. O açúcar invertido, por exemplo, é um sub-produto da indústria do açúcar com baixo valor agregado e o farelo de soja é bem mais barato que o extrato de levedura, um dos substratos mais usados para a composição dos meios de levedura.

Embora a expressão de proteínas heterólogas possa ser feita em cultura de frascos, os níveis de proteína são tipicamente mais elevados em biorreatores (fermentador). Uma cultura do clone A3 foi realizada em fermentador de 1 L levando-se em consideração os resultados da otimização. O início da indução foi realizado quando a densidade celular estava bastante elevada (64 OD_{600}). A atividade enzimática atingiu o pico quando a alimentação com metanol também estava elevada ($3,53 \text{ mL.h}^{-1}$). A atividade máxima atingida no fermentador corresponde a 2,5 vezes o valor encontrado na cultura em frasco com as melhores condições de produção. No entanto, após certo tempo de alimentação com altos níveis de metanol, observou-se uma queda na produção enzimática, provavelmente devido aos efeitos tóxicos do acúmulo de metanol sobre as células da cultura. Foi observado no gel SDS-PAGE a presença de bandas com mobilidade aparente de $\sim 42 \text{ kDa}$ e $\sim 36 \text{ kDa}$ no decorrer da cultura. Atribuímos este fato ao baixo pH (5) em que foi realizado o experimento, além disso, foi observada a

presença de bandas menores que 30 kDa a partir de 34 horas de indução e que, provavelmente, correspondem a bandas de degradação pela ação de proteases produzidas pela *P. pastoris* (Moralejo *et al.*, 2000). Alguns ajustes podem ser feitos para tentar evitar essa degradação, como a adição de alguns compostos ao meio de cultivo, como casoaminoácidos, peptona, extrato de levedura, assim como a modificação de alguns parâmetros, como temperatura e pH (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

A cultura do clone P1 em fermentador também foi realizada com as condições ótimas estabelecidas no planejamento fatorial. A força ativa da enzima encontrada no sobrenadante do cultivo, onde alguns parâmetros são mais bem controlados, foi maior do que a encontrada em frascos. No entanto, após 43 horas de cultivo foi observada uma queda na produção enzimática. Atribuímos esta queda na produção da enzima recombinante ao esgotamento da fonte de carbono. Para melhorar a produção da enzima é necessário ainda fazer alguns ajustes quanto a alimentação com a fonte de carbono.

Para purificação da quimosina recombinante por cromatografia de exclusão molecular utilizou-se o sobrenadante da fermentação do clone P1 após 72 horas de crescimento em frasco. Os resultados obtidos (Figura 21) comprovam uma eficiente purificação em relação ao concentrado por liofilização, com a passagem do extrato bruto por apenas uma etapa cromatográfica, diferentemente da maioria dos trabalhos reportados que indicam a utilização de pelo menos duas etapas de purificação para a obtenção da quimosina pura (Zhang *et al.*, 1997; Tichy *et al.*, 1992; Emtage *et al.*, 1983). Beldarraín *et al.* (2000) ao expressarem a quimosina de *M. pusillus* em *P. pastoris* também purificaram a proteína presente no sobrenadante com apenas uma etapa de purificação com a coluna *Fast Flow Q Sepharose* de troca iônica. A quimosina purificada migrou no gel SDS-PAGE com uma massa molecular aparente de ~36 kDa, similar à enzima nativa. A baixa quantidade de proteínas encontrada no sobrenadante da cultura serviu como uma etapa prévia de purificação evitando a contaminação com o *pool* de proteínas intracelulares. Vários trabalhos demonstram que a expressão intracelular da proteína diminui consideravelmente o rendimento da produção. Por exemplo, a expressão da pró-quimosina em *E. coli* sob controle do promotor *tac* induzido pela adição de IPTG, correspondeu a 80-100 mg.L⁻¹ de enzima, no entanto, o rendimento final após purificação foi de apenas 14-20 mg.L⁻¹ (Zhang *et al.*, 1991). Quando comparado à preparação comercial de quimosina (extraída do extrato do

estômago de bezerros) foi possível perceber uma grande diferença na pureza das soluções quando comparada com as enzimas recombinantes. Esses extratos apresentam diversas outras proteínas na solução o que pode afetar a qualidade dos queijos pela ação de outras proteases.

A caracterização da enzima purificada comprovou a presença de proteína já processada no sobrenadante da cultura, assim como a presença de uma pequena quantidade de proteína glicosilada (~23,3 %). É descrito na literatura a presença na enzima de três sítios potenciais para N-glicosilações, no entanto apenas dois recebem efetivamente carboidratos (Foltmann, 1992). É também reportado que a levedura *P. pastoris* reconhece as mesmas seqüências de glicosilação que outros eucariotos, no entanto, a natureza destas glicosilações é diferente (Cabral *et al.*, 2001). Algumas proteínas secretadas em *P. pastoris* recebem muito mais carboidratos apresentando-se em gel com um padrão de hiperglicosilação (Cregg *et al.*, 2001). No caso da quimosina produzida neste trabalho, havia uma pequena fração de quimosina glicosilada que, pela visualização do perfil migratório, sugere um padrão homogêneo de glicosilação. A preparação comercial de quimosina recombinante (Hannilase) também apresentou idêntico padrão. Embora não tenha sido testada a atividade de coagulação do leite na amostra deglicosilada, um trabalho anterior mostra que a deglicosilação não afeta a atividade da enzima (Beldarraín *et al.*, 2000). No entanto, a quimosina do fungo *M. pusillus* expressa em *S. cerevisiae* após ser deglicosilada teve um aumento na atividade de coagulação do leite (Aikawa *et al.*, 1990).

A incubação da quimosina com as frações de caseína demonstrou a alta especificidade da enzima recombinante produzida neste trabalho (Figura 23), característica mais importante para aplicação na indústria de queijo. A quimosina produzida por *P. pastoris* apresentou atividade semelhante à enzima comercial recombinante (Hannilase), específica para a caseína k, indicando que ambas as enzimas clivam a ligação Phe105-Met106. Em trabalho realizado por Starovoitova *et al.* (2006) comparando a quimosina nativa e algumas enzimas recombinantes, foi estabelecido que estas últimas diferem da enzima nativa na ação sobre substratos de baixa massa molecular. No entanto, não foi observada diferença na ação enzimática sobre substratos protéicos. Da mesma forma, Espinosa *et al.* (1998) ao comparar a enzima recombinante

secretada por *P. pastoris* e uma enzima comercial demonstraram que houve apenas ligeiras modificações quanto às propriedades bioquímicas da enzima.

Embora os dois sistemas de expressão tenham se mostrado eficientes, ambos são ainda passíveis de otimização. O fato do promotor *PGK1* ter-se mostrado eficiente na produção enzimática é encorajador para seu uso em processos industriais. Além de não necessitar metanol para sua ativação e nem exigir rígidos controles da concentração de O₂ dissolvido, o tempo de cultivo é reduzido, pois não há a necessidade de se esperar a exaustão de glicerol antes da adição do agente indutor (Almeida *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados aqui constituem a primeira expressão heteróloga do gene sintético da pró-quimosina B de *Bos taurus* com *codon usage* otimizado para expressão em *P. pastoris*. A proteína recombinante demonstrou ser de fácil purificação e com alta especificidade pela caseína κ . Além disto, os meios de cultura propostos neste estudo podem contribuir significativamente para a redução dos custos de produção. No conjunto, os resultados preliminares deste projeto mostram que a produção nacional de quimosina recombinante pode ser uma alternativa viável para substituição do produto importado.

8. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

Utilizando-se o gene sintético CHYMb com otimização dos códons foi possível a expressão de quimosina B bovina funcional e específica para a caseína κ do leite em *P. pastoris*. No conjunto, os resultados deste projeto mostram que a levedura *P. pastoris* pode ser usada como plataforma genética para a produção de quimosina B recombinante.

Os resultados de expressão heteróloga a partir de dois promotores de *P. pastoris* indicam que o promotor constitutivo *PGK1* (clone P1) apresenta algumas vantagens sobre o promotor induzível *AOX1* (clone A3). Foi observado, por exemplo, que a expressão constitutiva permite a produção de quimosina B nas primeiras horas de cultivo e que não há necessidade da fase de crescimento em outra fonte de carbono, como ocorre com a expressão induzida. Além disto, a expressão constitutiva permite a produção de enzima por fermentações contínua sem a necessidade de adição de um agente indutor. Foi observado, ainda, que o sobrenadante de cultura do clone P1 é menos contaminado com proteínas endógenas de *P. pastoris* podendo a quimosina B recombinante ser purificada em uma única etapa cromatográfica.

O farelo de soja e o açúcar invertido foram as fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, que promoveram melhores níveis de produção de pró-quimosina pelo clone P1. Estes resultados são animadores pois tanto o farelo de soja quanto o açúcar invertido são fontes baratas de substratos para a fermentação.

Este trabalho mostrou, ainda, que culturas crescidas em fermentador produzem maiores níveis de pró-quimosina recombinante em comparação com a produção em frascos. Todavia, os experimentos de produção em fermentador representam estudos preliminares, havendo a necessidade de se estender os parâmetros de crescimento analisados para se obter a otimização do processo de produção

Finalmente, para confirmar o tamanho da enzima recombinante assim como seu correto processamento é necessária ainda a realização de análises por espectrometria de massa e seqüenciamento do N-terminal.

9. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. M. (2003). Isolamento e caracterização do gene *PGK1* (3-fosfoglicerato quinase) da levedura *Pichia pastoris*: regulação e uso do seu promotor. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- ALMEIDA, J. R. M.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. (2005). Molecular characterization of the phosphoglycerate kinase (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **22**: 725-737.
- AIKAWA, J.; YAMASHITA, T.; NISHIYAMA, M.; HORINOUCI, S.; BEPPU, T. (1990). Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of *Mucor rennin*, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* **265**: 13955-13959.
- BAKER, H. V. (1991). *GCRI* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **88**: 9443-9447.
- BARR, K.; HOPKINS, S. A.; SREEKRISHNA, K. (1992). Protocol for efficient secretion of HAS developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* **12**: 48-51.
- BELDARREÍN, A.; ACOSTA N.; MONTESINOS, R.; MATA, M.; CREMATA, J. (2000). Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**: 77-84.
- BEPPU, T. (1993). The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends. Biotechnol.* **1**: 85- 89.
- BERKA, R. M.; WARD, M.; WILSON, L. J.; HAYENGA, K. J.; KODAMA, K. H.; CARLOMAGNO, L. P.; THOMPSON, S. A. (1991). Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene* **86**: 153-162.

- BINES, V. E.; YOUNG, P.; LAW, B. A. (1989). Comparison of cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *J. Dairy Res.* **56**: 657-664.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- BOETTNER, M.; PRINZ, B.; HOLZ, C.; STAHL, U.; LANG, C. (2002). High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **99**: 51-62.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248-254.
- BRETTAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**: 193-200.
- BRUSGARD, C. (1993). Regulatory approval and commercialization of chymogen. *Scan. Dairy Infor.* **6**: 46-47.
- BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. (2000). *Methods in yeast genetics*. A Cold Spring Harbor laboratory course manual. Cold Spring Harbor laboratory Press: Cold Spring Harbor, (NY) pp. 113-114.
- CABRAL, C. M.; LIU, Y.; SIFERS, R. N. (2001). Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 619-624.
- CARDOZA, R. E.; GUTIERREZ, S.; ORTEGA, N.; COLINA, A.; CASQUEIRO, J.; MARTÍN, J. F. (2003). Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 249-259.

- CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 329-332.
- CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. (2006). Codon optimization of *Candida rugosa lip1* gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J. Agric. Food. Chem.* **54**: 815-822.
- CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem.* **61**: 395-418.
- COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **69**: 2110-2114.
- COUDEEC, R.; BARATTI, J. (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2279-2289.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, G. P. L. (2001). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS. Microbiol. Rev.* **24**: 45-66.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**: 23-52
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 329-332.
- CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1316-1323.

- CREGG, J. M.; SUNGA, A. J.; CEREGHINO, J. L.; CEREGHINO, G. P. L. (2001). Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet. Eng. (NY)* **23**: 157-69.
- CULLEN, D.; GRAY, G. L.; WILSON, L. J.; HAYENGA, K. J.; LAMSA, M. H.; REY, M. W.; NORTON, S.; BERKA, R. M. (1987). Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol.* **5**: 369-376.
- DALY, R.; HEARN, M. P. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris* and useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **18**: 119-138.
- DAMASO, M. C. T.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA, N. J.; ANDRADE, C. M. M. C.; ALBANO, R. M. (2004). Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces laniginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **10**: 6064-6072.
- DUNN-COLEMAN, N. S.; BLOEBAUM, P.; BERKA, R. M.; BODIE, E.; ROBINSON, N.; ARMSTRONG, G.; WARD, M.; PRZETAK, M.; CARTER, G. L.; LACOST, R.; WILSON, L. J.; KODAMA, H. K.; BALIU, E. F.; BOWER, B.; LAMSA, M.; HEINSOHN, H. (1991). Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Biotechnol. (NY)* **9**: 976-981.
- ELLIS, S. B.; BRUST, P. F.; KOUTZ, P. J.; WATERS, A. F.; HARPOLD, M. M.; GINGERAS, T. R. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1111-1121.
- EMTAGE, J. S.; ANGAL, S.; DOEL, M. T.; HARRIS, T. J. R.; JENKINS, B.; LILLEY, G.; LOWE, P. A. (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **80**: 3671-3675.
- ESPINOSA, A. E. S.; PENA, J. S.; SANTANA, V. M.; FERNANDEZ, R. G.; GRILLO, J. M.; (1999). Comparación de la quimosina bovina secretada al medio de

- cultivo por cepas recombinantes de las levaduras *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Appl.* **3**: 160-164.
- FANG, B.; LIANG, B.; HE, G. (2007). Synonymous codon usage bias and overexpression of a synthetic gene. *Viol. Sinica* **22**: 226-232.
- FLAMM, E. L. (1991). How FDA approved chymosin: A case history. *Biotechnol.* **9**: 349-351.
- FOLTMANN, B. (1970). Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). *Methods Enzymol.* **19**: 421-436.
- FOLTMANN, B. (1992). Chymosin. A short review on fetal and neonatal gastric proteases. *Scan. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **210**: 65-79.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (1999). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. Em: *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Ed. Law, B. A. Blackie Academic & Professional. London pp. 1-49.
- GELLISSEN, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 741-750.
- GERASIMOVA, T. I.; CORCES, V. G. (2001). Chromatin insulators and boundaries: Effects on transcription and nuclear organization. *Ann. Rev. Genet.* **35**: 193-208.
- GILLILAND, G. L.; WINBORNE, E. L.; NACHMAN, J.; WLODAWER, A. (1990). The tree-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins* **8**: 82-101.
- GOFF, C. G.; MOIR, D. T.; KOHNO, T.; GRAVIUS, T. C.; SMITH, R. A.; YAMASAKI, E.; TAUNTON-RIGBY, A. (1984). Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **27**: 35-46.

- GREEN, M. L.; ANGAL, S.; LOWE, P. A.; MARSTON, F. A. O. (1985). Cheddar cheese-making with recombinant calf chymosin synthesized in *Escherichia coli*. *J. Dairy. Res.* **52**: 281-286.
- GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAHAN, S.; MINSHULL, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends. Biotechnol.* **7**: 346-353.
- HARKKI, A.; UUSITALO, J.; BAILEY, M.; PENTILA, M.; KNOWLES, J. K. C. (1989). A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol.* **7**: 596-603.
- HICKS, C. L.; OLEARY, J.; BUCY, J. (1988). Use of recombinant chymosin in the manufacture of cheddar and Colby cheese. *J. Dairy Sci.* **71**: 1127-1131.
- HOHENBLUM, H.; GASSER, B.; MAURER, M.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. (2004). Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **85**: 367-375.
- HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JONSSON, L. J. (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **79**: 438-49.
- HOUEN, G.; MADSEN, M. T.; HARLOW, K. W.; LONBLAD, P.; FOLTMANN, B. (1996). The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **28**: 667-675.
- INAN, M.; ARYASOMAYAJULA, B.; SINHA, J.; MEAGHER, M. M. (2006). Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfid isomerase. *Biotechnol. Bioeng.* **4**: 771-778.
- IWATA, T.; TANAKA, R.; SUETSUGU, M.; ISHIBASHI, M.; TOKUNAGA, H.; KIKUCHI, M.; TOKUNAGA, M. (2004). Efficient secretion of human lysozyme from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Lett.* **26**:1803-1808.

- JAHIC, M. (2003). Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris*. PhD Thesis, Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B. (2002). Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 225-231.
- JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. (2006). Major technological advances and trends in cheese. *J. Dairy Sci.* **89**: 1174-1178.
- KAPPELER, S. R.; BRINK, H. J. M.; RAHBEK-NIELSEN, H.; FARAH, Z.; PUHAM, Z.; HANSEN, B.; JOHANSEN, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**: 647-654.
- KAPRÁLEK, F.; JEĚMEN, P.; SEDLÁČEK, J.; FÁBRY, M.; ZADRAŽIL, S. (1991). Fermentation conditions for high-level expression of the *tac*-promoter-controlled calf prochymosin cDNA in *Escherichia coli* HB101 *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 71-79.
- KAWAGUCHI, Y.; KOSUGI, S.; SASAKI, K.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. (1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1871-1877.
- KOUTZ, P.; DAVIS, G. R.; STILLMAN, C.; BARRINGER, K.; CREGG, J.; THILL, G. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* **5**: 167-177.
- KUMAR, A.; SHARMA, J.; MOHANTY, A. K.; GLOVER, S.; BATISH, V. K. (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **145**: 108-113.

- KUWAE, S.; OHYAMA, M.; OHYA, T.; OHI, H.; KOBAYASHI, K. (2005). Production of recombinant human antithrombin by *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 264-71.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- LAWRENCE, K.; PLOWMAN, J. E.; LIDDELL, M. J.; SMITH, M. H.; HILL, J. P. (1998). Micelle stability: κ -casein structure and function. *J. Dairy Sci.* **81**: 3004-3012.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**: 249-270.
- MARSTON, F. A. O.; ANGAL, S.; WHITE, S.; LOWE, P. A. (1985). Solubilization and activation of recombinant calf prochymosin from *E. coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **13**: 1035.
- MELLOR, J.; DOBSON, M. J.; ROBERTS, N. A.; TUIITE, M. F.; EMTAGE, J. S.; WHITE, S.; LOWE, P. A.; PATEL, T.; KINGSMAN, A. J.; KINGSMAN, S. M. (1983). Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **24**: 1-14.
- MOHANTY, A. K.; MUKHOPADHYAY, U. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.* **17**: 205-217.
- MOHANTY, A. K.; MUKHOPADHYAY, U. K.; KAUSHIK, J. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. (2003). Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Dairy Res.* **70**: 37-43.
- MORALEJO, F. J.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; SISNIEGA, H.; FAUS, I.; MARTÍN, J. F. (2000). Overexpression and lack of degradation of thaumatin in an

- aspergillopepsin A-defective mutant of *Aspergillus awamori* containing an insertion in the pepA gene. Appl. Microb. Biotechnol. **54**: 772-777
- MOSCHOPOULOU, E. E.; KANDARAKIS, I. G.; ALICHANIDIS, E.; ANIFANTAKIS, E. M. (2006). Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. J. Dairy Res. **73**: 49–57.
- NEWMAN, M.; SAFRO, M.; FRAZAO, C.; KHAN, G.; ZDANOV, A.; TICKLE, I. J.; BLUNDELL, T. L.; ANDREEVA, N. (1991). X-ray analyses of aspartic proteinases IV: Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. J. Mol. Biol. **230**: 260-283.
- NISHIMORI, K.; KAWAGUCHI, Y.; HIDAKA, M.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. (1982). Expression of cloned calf prochymosin gene sequence in *E. coli*. Gene **254**: 8447-8456.
- NISHIMORI, K.; SHIMIZU, N.; KAWAGUCHI, Y.; HIDAKA, M.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. (1984). Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. Gene **29**: 41-49.
- PARENTE, D.; FERRA, F. D.; GALLI, G.; GRANDI, G. (1991). Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. FEMS. Microbiol. Lett. **77**: 243-249.
- PEDERSEN, V. B.; CHRISTENSEN, K. A.; FOLTMANN, B. (1978). Investigations on the activation of bovine prochymosin. Eur. J. Biochem. **94**: 573-580.
- RAO, S. (1984). Extraction and purification of chymosin from buffalo calves. PhD thesis, Natl. Dairy Res. Inst., Karnal, Índia.
- REID, J. R.; COOLBEAR, T.; AYERS, J. S.; COOLBEAR, K. P. (1997). The action of chymosin on κ -casein and its macropeptide: effects of pH and analysis of products of secondary hydrolysis. Int. Dairy J. **7**: 559-569.

- RICHTER, C.; TANAKA, T.; YADA, R. Y. (1998). Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem. J.* **335**: 481-490.
- ROGEL, J. I.; PERKO, B.; FRANCKY, A.; PENCA, V.; PUNGERCAR, J. (2001). Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *J. Dairy Sci. Assoc.* **84**: 1020-1026.
- ROGGENKAMP, R.; JANOWICZ, Z.; STANIKOWSKI, B.; HOLLENBERG, C. P. (1984). Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 489-493.
- ROLLINI, M.; PAGANI, H.; RIBOLDI, S.; MANZONI, M. (2005). Influence of carbon source of glutathione accumulation in methylotrophic yeasts. *Ann. Microbiol.* **55**: 199-203.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SARDINAS, J. L. (1967). Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.* **16**: 248-255.
- SEARS I. B.; OCONNOR, J.; ROSSANESE, O. W.; GLICK, B. S. (1998). A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *P. pastoris*. *Yeast* **14**: 783-790.
- SIMONS, G.; RUTTEN, G.; HORNES, M.; NIJHUIS, M.; VAN ASSELDONK, M. (1991). Production of prochymosin in Lactococci. Em: Structure and function of aspartic proteinases. Ed. B. M. Dunn Plenum Press (NY). 115-119.
- SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D. T.; TSAY, B. J. T.; SMITH, P. L.; WIERSCHKE, J. D.; SUBRANANIAN, A.; BIRKENBIRGIR, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55-62.

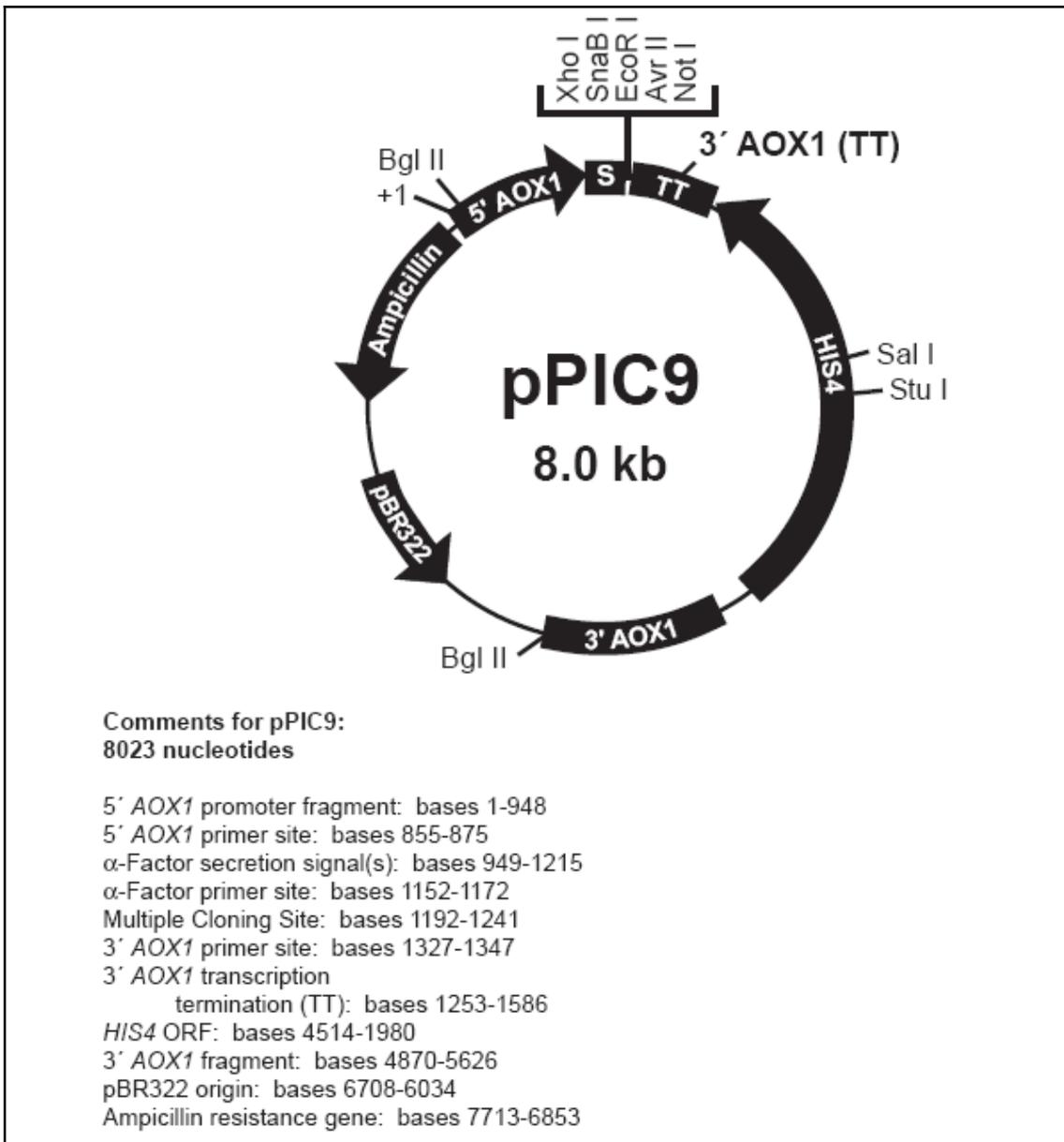
- STANWAY, C.; MELLOR, J.; OGDEN, J. E.; KINGSMAN, A. J.; KINGSMAN, S. M. (1989). The UAS of the yeast *PGK* gene contains functionally distinct domains. *Nucleic. Acids. Res.* **15**: 6855-6873.
- STAROVOITOVA, V. V.; VELICHKO, T. I.; BARATOVA, L. A.; FILIPPOVA, Y. I.; LAVRENOVA, G. I. (2006). A comparative study of functional properties of calf chymosin and its recombinant forms. *Biochem. (Moscow)* **71**: 402-407.
- SU, Z.; WU, X.; FENG, Y.; DING, C.; XIAO, C. Y. L.; FENG, W.; LI, X. (2007). High level expression of human endostatin in *Pichia pastoris* using a syntetic gene construct. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 1355-1362.
- SURRIBAS, A.; STAHN, R.; MONTESINOS, J. L.; ENFORS, S. O.; VALERO, F.; JAHIC, M. (2007). Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. *J. Biotechnol.* **130**: 291-299.
- SZECSI P. B. (1992). The aspartic proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **52**: 5-22.
- TANAKA, R.; ISHIBASHI, M.; TOKUNAGA, H.; TOKUNAGA, M. (2000). Secretion of hen egg white lysozyme from *Kluyveromyces lactis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 2716-2718
- TICHY, P. T.; KAPRÁLEK, F.; JECMEN, P. (1992). Improved procedure for a high-yield recovery of enzymatically active recombinant calf chymosin from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Prot. Express. Purif.* **4**: 59-63.
- TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. (1987). High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* **5**: 1305-1308.
- VALKONEN, M.; WARD, M.; WANG, H.; PENTTILA, M.; SALOHAEIMO, M. (2003). Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var.

- awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response. *Appl. Environ. Microbiol.* **12**: 6979-6986.
- VAN DEN BERG, J. A.; VAN DER LAKEN, K. J.; VAN OUYEN, A. J.; RENNIERS, T. C.; RIETVELD, K.; SCHAAP, A.; BRAKE, A. J.; BISHOP, R. J.; SCHULTZ, K.; MOYER, D.; RICHMAN, M.; SHUSTER, J. R. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnol.* **8**: 135-139.
- VAN DEN BRINK, H. M.; PETERSEN, S. G.; RAHBEEK-NIELSEN, H.; HELLMUTH, K.; HARBOE, M. (2006). Increased production of chymosin by glycosylation. *J. Biotechnol.* **125**: 304-310.
- VASSILEVA, A.; CHUNGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. (2001). Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter. *J. Biotechnol.* **88**: 21-35.
- VEGA-HERNANDEZ, M. C.; GOMEZ-COELLO, A.; VILLAR, J.; CLAVERIE-MARTÍN, F. (2004). Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *J. Biotechnol.* **144**: 69-79.
- WANG, G. (1995). High-level expression of prochymosin in *E. coli*. Effect of the secondary structure of the ribosome binding site. *Protein. Expr. Purif.* **6**: 284-290.
- WARD, M.; WILSON, L. J.; KODAMA, K. H.; REY, M. W.; BERKA, R. M. (1991). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Biotechnol.* **8**: 435-440.
- WITTRUP, M.; JAHIC, M.; HULT, K.; ENFORS, S. (2007). Inducible versus constitutive expression of a lipase in *Pichia pastoris*: A comparative study using different fermentation techniques. *J. Biotechnol.* **131**: 149.

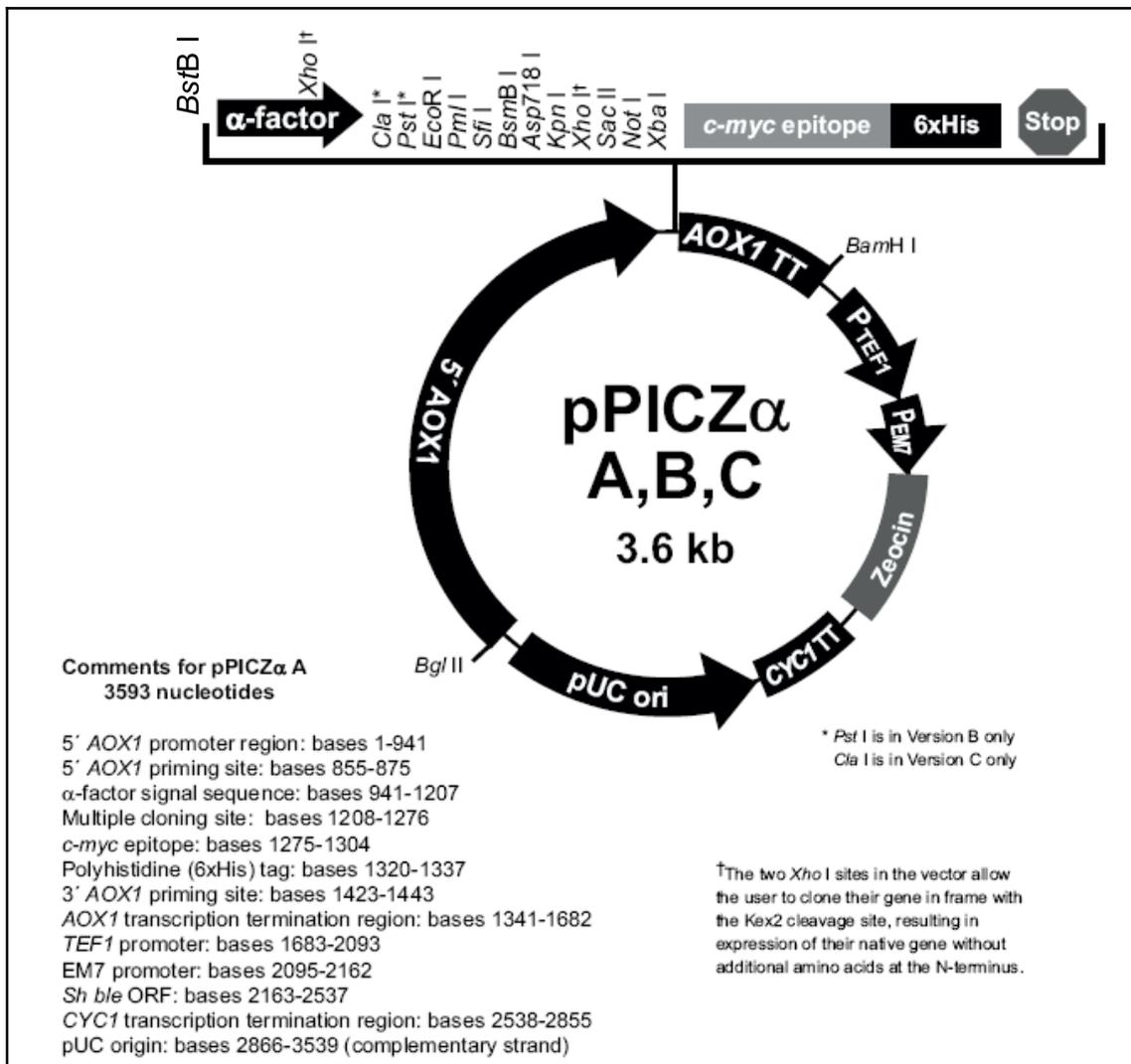
- XIONG, A. S.; YAO, Q. H.; PENG, R. H.; HAN, P. L.; CHENG, Z. M. AND LI, Y. (2005). High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 418-428.
- YA- KUN, W.; SHI-PING, T. (2004). Optimization of media for production of an effective yeast biocontrol agent *Pichia membranaefaciens*. *Agricult. Scienc.* **3**: 286-291.
- ZHANG, Y.; WEI, Z.; LIU, N.; YANG, K. (1991). Expression of calf prochymosin gene in *Escherichia coli*. *Chin. J. Biotechnol.* **7**: 169-75.
- ZHANG, Y.; LI, H.; WU, H.; DON, Y.; LIU, N.; YANG, K. (1997). Functional implications of disulfide bond, Cys45–Cys50, in recombinant prochymosin. *Biochim. Biophys. Acta* **1343**: 278-286.
- ZOU, L. K.; WANG, H. N.; PAN, X.; XIE, T.; WU, Q.; XIEN, Z. W.; ZHOU, W. R. (2006). Design and expression of a synthetic *phyC* gene encoding the neutral phytase in *Pichia pastoris*. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* **38**: 803-11.

10. ANEXOS

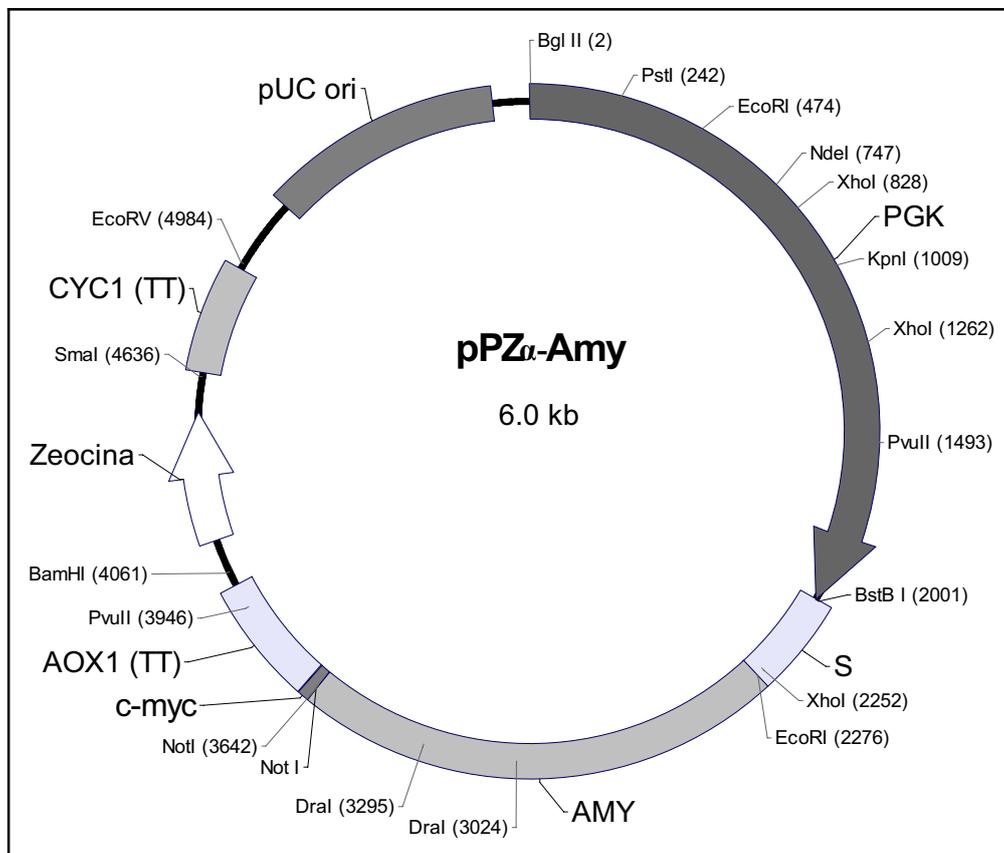
Anexo 1 . Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9 (Invitrogen).



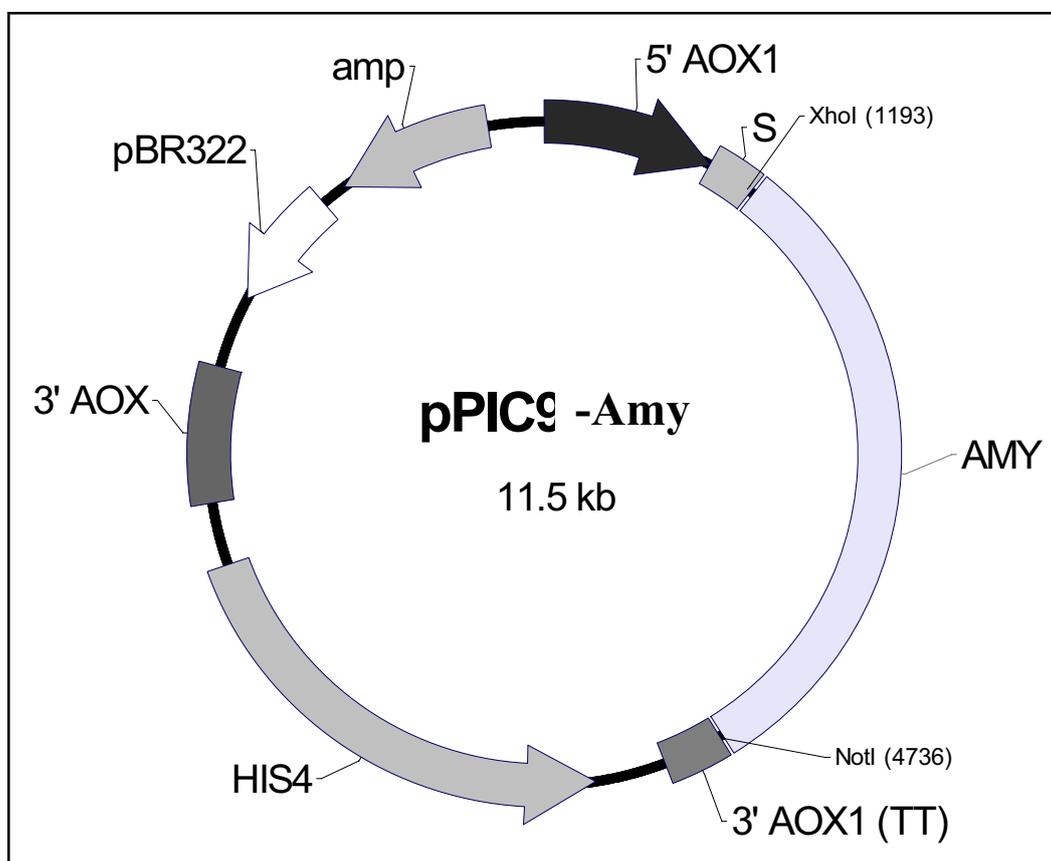
Anexo 2. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPICZ α (Invitrogen).



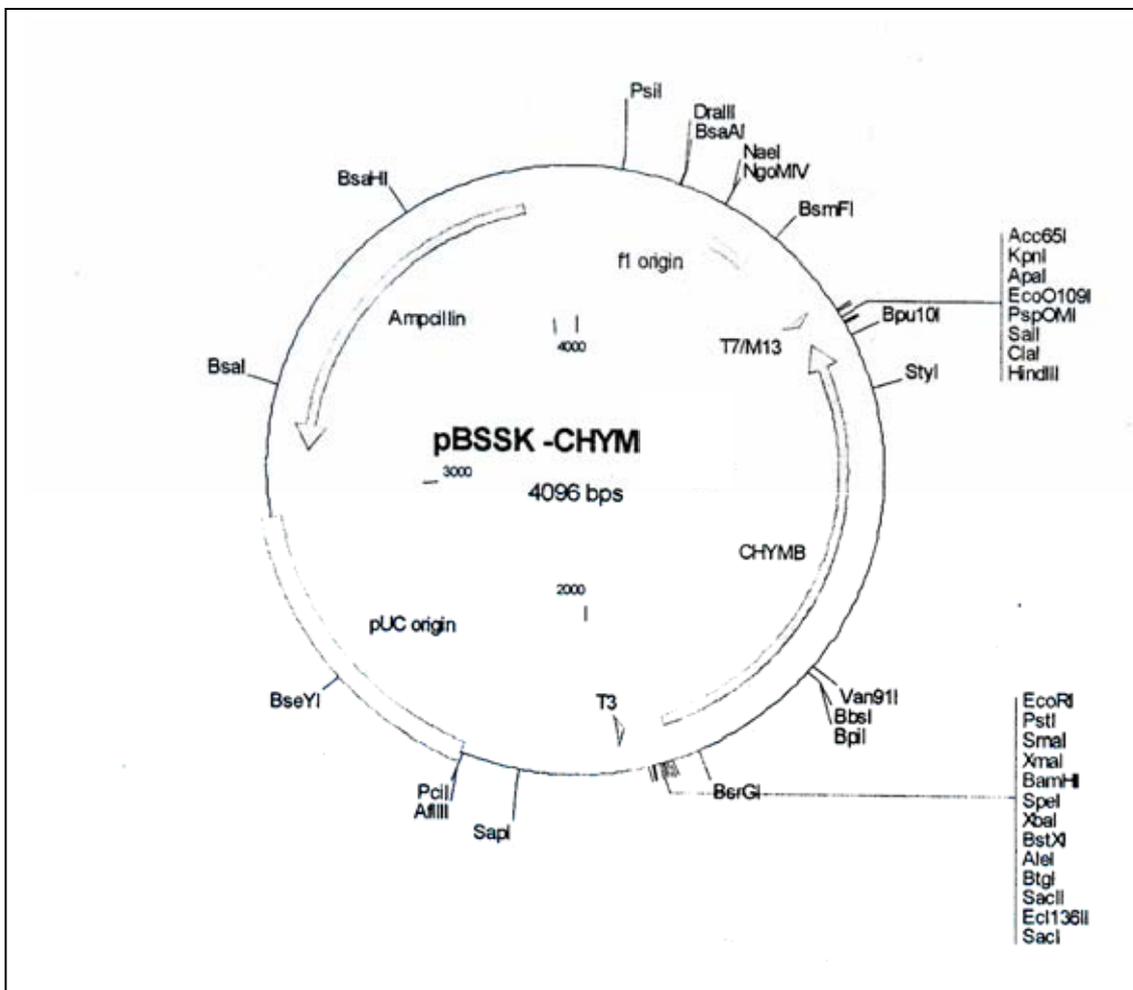
Anexo 3. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPZ α -Amy (Almeida, 2003).



Anexo 4. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPIC9-Amy.



Anexo 5. Representação esquemática do mapa físico do vetor pBSSK-CHYM.



Anexo 6. Tabela dos códons preferenciais de *P. pastoris*.

Pichia pastoris [gbpln]: 137 CDS's (81301 codons)

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

UUU 24.1 (1963)	UCU 24.4 (1983)	UAU 16.0 (1300)	UGU 7.7 (626)
UUC 20.6 (1675)	UCC 16.5 (1344)	UAC 18.1 (1473)	UGC 4.4 (356)
UUA 15.6 (1265)	UCA 15.2 (1234)	UAA 0.8 (69)	UGA 0.3 (27)
UUG 31.5 (2562)	UCG 7.4 (598)	UAG 0.5 (40)	UGG 10.3 (834)
CUU 15.9 (1289)	CCU 15.8 (1282)	CAU 11.8 (960)	CGU 6.9 (564)
CUC 7.6 (620)	CCC 6.8 (553)	CAC 9.1 (737)	CGC 2.2 (175)
CUA 10.7 (873)	CCA 18.9 (1540)	CAA 25.4 (2069)	CGA 4.2 (340)
CUG 14.9 (1215)	CCG 3.9 (320)	CAG 16.3 (1323)	CGG 1.9 (158)
AUU 31.1 (2532)	ACU 22.4 (1820)	AAU 25.1 (2038)	AGU 12.5 (1020)
AUC 19.4 (1580)	ACC 14.5 (1175)	AAC 26.7 (2168)	AGC 7.6 (621)
AUA 11.1 (906)	ACA 13.8 (1118)	AAA 29.9 (2433)	AGA 20.1 (1634)
AUG 18.7 (1517)	ACG 6.0 (491)	AAG 33.8 (2748)	AGG 6.6 (539)
GUU 26.9 (2188)	GCU 28.9 (2351)	GAU 35.7 (2899)	GGU 25.5 (2075)
GUC 14.9 (1210)	GCC 16.6 (1348)	GAC 25.9 (2103)	GGC 8.1 (655)
GUA 9.9 (804)	GCA 15.1 (1228)	GAA 37.4 (3043)	GGA 19.1 (1550)
GUG 12.3 (998)	GCG 3.9 (314)	GAG 29.0 (2360)	GGG 5.8 (468)

Coding GC 42.73 % 1st letter GC 48.72 % 2nd letter GC 37.32 % 3rd letter GC 42.16 %