



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

# Imobilização de enzimas na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol a partir de amido

Carolina Brêttas Baptista

Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular

Brasília - DF

2013



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

# Imobilização de enzimas na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol a partir de amido

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre  
em Biologia Molecular

Aluno: Carolina Brêttas Baptista

Matrícula: 11/0075625

Orientadora: Lídia Maria Pepe de Moraes

Coorientador: Fernando Araripe Gonçalves Torres

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Lídia Maria Pepe de Moraes com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Banca Examinadora**

Professora Dra. Lídia Maria P. de Moraes  
Universidade de Brasília  
Presidente da Banca

Professora Dra. Nádia Skorupa Parachin  
Universidade de Brasília  
Examinadora Externa

Professora Dra. Beatriz Dolabela de Lima  
Universidade de Brasília  
Examinadora Interna

Professora Dra. Janice Lisboa De Marco  
Universidade de Brasília  
Membro Suplente

*A todos aqueles que estiveram ao meu lado durante essa caminhada e me deram força nos momentos de dificuldade.*

## **Agradecimentos**

*A Deus por colocar em meu caminho essa oportunidade e por me dar coragem para continuar mesmo com todas as dificuldades;*

*À toda minha família, avós, tios, primos, que são o meu porto-seguro e fazem da minha vida tão feliz;*

*À minha mãe e meu pai, biólogo como eu, por me apoiarem sempre em qualquer situação e por todo carinho e amor, sou muito feliz por ter vocês como pais;*

*Aos meus irmãos que eu tanto amo e torcem por mim sempre;*

*À minha avó Lita que sempre rezou pelo meu sucesso e minha felicidade;*

*Ao meu namorado, Osmar, que me deu todo apoio dentro do laboratório durante todo o mestrado e me fez tão feliz todos os dias fora dele;*

*Às minhas amigas, Paola, Natália, Mariana, Ana Cecília, Marina e Renata que fizeram parte da minha formação e hoje fazem parte de quem eu sou;*

*Aos meus colegas da biologia que fizeram parte da minha formação profissional e influenciaram nas minhas escolhas atuais;*

*A todos os meus amigos fora da biologia que estiveram presentes nos momentos de diversão e distração fora do ambiente profissional;*

*Aos colegas do Lab 2 que fizeram o trabalho na bancada ser muito mais divertido e me deram conselhos preciosos;*

*A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular que dividiram esse ambiente amigavelmente comigo durante muito tempo e por toda diversão fora dele;*

*À professora Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes que me acolheu desde o início no laboratório disposta a me ajudar e me deu essa oportunidade de crescimento profissional;*

*Ao professor Fernando Araripe Gonçalves Torres que sempre esteve disposto a ajudar e aconselhar nos momentos de necessidade;*

*À Vivis que foi minha primeira orientadora de bancada e me ensinou grande parte do que sei hoje no laboratório;*

*Aos técnicos de laboratório Thompson, Dona Ivonildes e Dona Fátima que  
deram todo apoio ao trabalho e facilitaram sua execução;*

*À colega de laboratório Izabel da Silva que me ajudou tanto nos testes  
estatísticos e teve muita paciência para me ensinar;*

*Às professoras da banca examinadora que aceitaram meu convite e se  
disponibilizaram a corrigir e me ajudar na continuação do meu trabalho;*

***Muito obrigada a todos!***

*“Let it be, let it be  
Let it be, let it be  
There will be an answer:  
Let it be”*

*Paul McCartney*

## ÍNDICE

<b>Índice de figuras</b>	i
<b>Índice de tabelas</b>	v
<b>Lista de abreviaturas e símbolos</b>	vi
<b>Resumo</b>	viii
<b>Abstract</b>	ix
<b>Introdução</b>	1
1. Contexto atual	1
1.1 Brasil	2
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.1 Vetor integrativo e vetor episomal	6
2.2 Promotores	8
2.3 Marcas de seleção	9
2.4 Parede celular	10
2.5 Linhagens industriais	12
3. Imobilização na parede ( <i>cell surface display</i> )	13
3.1 Âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI)	16
3.2 Sistema das aglutininas	18
3.3 Sistema da floculina	19
4. Amilases	20
4.1 $\alpha$ -amilase	21
4.2 Glicoamilase	23
4.3 Coexpressão da $\alpha$ -amilase e da glicoamilase	24
<b>Objetivos</b>	27
1. Objetivo geral	27
2. Objetivos específicos	27
<b>Materiais e Métodos</b>	28
1. Materiais	28
1.1 Micro-organismos	28
1.2 Enzimas	28

1.3 Marcadores moleculares	29
1.4 Kits	29
1.5 Ferramentas de bioinformática	30
1.6 Oligonucleotídeo	30
1.6.1 Oligonucleotídeos utilizados para $\alpha$ -amilase	30
1.6.2 Oligonucleotídeos utilizados para glicoamilase	31
1.6.3 Oligonucleotídeos utilizados para $\alpha$ -aglutinina	32
1.7 Vetores	32
1.8 Meios de cultura	33
1.8.1 Meios de cultura para bactéria	33
1.8.2 Meios de cultura para levedura	34
1.9 Soluções para preparo de célula de bactéria competente	35
1.10 Antibiótico	36
1.11 Soluções para extração de DNA plasmidial por lise alcalina (bactéria)	36
1.12 Análise de DNA em gel de agarose	37
1.13 Precipitação de DNA	38
1.14 Transformação de levedura	38
1.15 Soluções para análise de proteína em gel de poli(acrilamida) desnaturante (SDS-PAGE)	39
1.16 Soluções para coloração com prata	40
1.17 Zimograma	40
1.18 Soluções para coloração do zimograma	41
1.19 Reagentes para atividade enzimática	41
1.20 Soluções para teste de viabilidade celular	42
1.21 Soluções de Aminoácidos	42
1.22 Outras soluções	42
2. Métodos	43
2.1 Amplificação dos genes por PCR	43
2.2 Análise em gel de agarose	44
2.3 Preparo de produto de PCR para ligação no vetor de clonagem	44

2.4	Ligação de fragmentos de DNA a um vetor	44
2.5	Preparo das células bacterianas para choque térmico	45
2.6	Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	45
2.7	Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep)	46
2.8	Extração de DNA plasmidial por lise alcalina em média escala (midiprep)	47
2.9	Análise do DNA por digestão com enzimas de restrição	48
2.10	Purificação e eluição de fragmentos de DNA	48
2.11	Precipitação de DNA	48
2.12	Transformação de levedura	49
2.13	Análise dos halos de hidrólise em placa	49
2.14	Teste de atividade em meio líquido	50
2.15	Teste de viabilidade celular	51
2.16	Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	52
2.17	Coloração com prata	52
2.18	Zimograma	53
2.19	Análises estatísticas	53
	<b>Resultados e discussão</b>	<b>54</b>
1.	Expressão da $\alpha$ -amilase	54
1.1	Amplificação dos genes	54
1.2	Construção da fusão no vetor pIJ2925	58
1.3	Construção do vetor de expressão em levedura	60
1.4	Análise dos halos de hidrólise em placa	63
1.5	Análise quantitativa da atividade em meio líquido	65
1.6	Análise do perfil secretório por SDS-PAGE	70
1.7	Análise comparativa da expressão da $\alpha$ -amilase nas linhagens MFL e CENPK2 de <i>S. cerevisiae</i>	73
1.8	Sequenciamento das construções	77
2.	Expressão da glicoamilase	78
2.1	Amplificação do cDNA de glicoamilase	78
2.2	Construção da fusão no vetor pIJ2925	80
2.3	Construção do vetor de expressão em levedura	83
2.4	Análise dos halos de hidrólise em placa	85

2.5 Análise quantitativa da atividade em meio líquido	86
2.6 Análise do perfil secretório por SDS-PAGE	92
2.7 Sequenciamento das construções	94
<b>Conclusões</b>	96
<b>Perspectivas</b>	98
<b>Referências Bibliográficas</b>	99
<b>Anexos</b>	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Produção de etanol no Brasil de 1980-2011 em milhões de litros.	3
<b>Figura 2.</b> Esquema da estrutura da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> .	11
<b>Figura 3.</b> Estrutura da âncora de GPI intermediando a ligação entre proteína e membrana plasmática.	17
<b>Figura 4.</b> Estrutura da $\alpha$ -aglutinina.	18
<b>Figura 5.</b> Esquema dos domínios da glicoamilase completa	24
<b>Figura 6.</b> Esquema da atuação conjunta da $\alpha$ -amilase e da glicoamilase e os produtos da hidrólise de cada enzima.	25
<b>Figura 7.</b> Esquema dos fragmentos utilizados para clonagem no vetor de expressão em levedura.	55
<b>Figura 8.</b> Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR da região final do gene da $\alpha$ -aglutinina (975 pb).	56
<b>Figura 9.</b> Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do gene da $\alpha$ -amilase.	57
<b>Figura 10.</b> Estratégia de clonagem para a construção da fusão entre o gene da $\alpha$ -amilase e a porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina no vetor pIJ2925.	58
<b>Figura 11.</b> Estratégia de clonagem para a construção do clone secretor de $\alpha$ -amilase no pIJ2925.	59
<b>Figura 12.</b> Análise por eletroforese em gel de agarose da digestão com <i>EcoRI</i> do vetor pIJamyS e da digestão com <i>HindIII</i> dos vetores pIJ $\alpha\alpha$ e pIJ $\alpha\alpha'$ .	59
<b>Figura 13.</b> Estratégia de clonagem utilizada para os vetores de expressão em levedura das construções contendo o gene da $\alpha$ -amilase.	61

<b>Figura 14.</b> Perfil e análise das digestões dos vetores de expressão em levedura dos clones produtores de $\alpha$ -amilase.	62
<b>Figura 15.</b> Análise da atividade amilolítica em placa dos clones produtores de $\alpha$ -amilase.	64
<b>Figura 16.</b> Atividade de $\alpha$ -amilase associada às células.	65
<b>Figura 17.</b> Atividade de $\alpha$ -amilase dosada no sobrenadante de cultura.	67
<b>Figura 18.</b> Contagem de UFC das culturas produtoras de $\alpha$ -amilase durante o crescimento em meio líquido.	69
<b>Figura 19.</b> SDS-PAGE e zimograma do extrato do sobrenadante de cultura dos clones produtores de $\alpha$ -amilase.	71
<b>Figura 20.</b> Análise comparativa da atividade amilolítica em placa pelos clones de MFL e de CENPK2.	74
<b>Figura 21.</b> Atividade de $\alpha$ -amilase associada às células das colônias de MFL e CENPK2.	75
<b>Figura 22.</b> Atividade de $\alpha$ -amilase dosada no sobrenadante de cultura das colônias de MFL e CENPK2.	76
<b>Figura 23.</b> Esquema das três diferentes regiões amplificadas da glicoamilase: <i>gla1</i> , <i>gla2</i> e <i>gla3</i> .	79
<b>Figura 24.</b> Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do cDNA da glicoamilase.	80
<b>Figura 25.</b> Estratégia de clonagem para a construção da fusão entre os três fragmentos do cDNA da glicoamilase e a porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina no vetor pIJ2925.	81
<b>Figura 26.</b> Análise por eletroforese em gel de agarose da digestão com <i>HindIII</i> dos vetores pIJgla1 $\alpha'$ , pIJgla2 $\alpha'$ e pIJgla3 $\alpha'$ .	82
<b>Figura 27.</b> Estratégia de clonagem utilizada para os vetores de expressão em levedura das construções contendo o gene da glicoamilase.	83
<b>Figura 28.</b> Perfil e análise das digestões dos vetores de expressão em levedura dos clones produtores de glicoamilase.	84

<b>Figura 29.</b> Análise da atividade amilolítica em placa dos clones produtores de glicoamilase.	85
<b>Figura 30.</b> Atividade de glicoamilase associada às células.	87
<b>Figura 31.</b> Atividade de glicoamilase dosada no sobrenadante das culturas.	88
<b>Figura 32.</b> Atividade amilolítica associada às células dos clones contendo as diferentes formas de glicoamilase.	89
<b>Figura 33.</b> Atividade amilolítica dosada no sobrenadante de cultura dos clones contendo as diferentes formas de glicoamilase.	90
<b>Figura 34.</b> Contagem de UFC das culturas produtoras de glicoamilase durante o crescimento em meio líquido.	91
<b>Figura 35.</b> SDS-PAGE do sobrenadante de cultura das construções contendo glicoamilase.	93
<b>Figura 36.</b> Perfil de bandas do marcador de massa molecular $\lambda$ EcoRI/HindIII.	113
<b>Figura 37.</b> Perfil de bandas do marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs).	113
<b>Figura 38.</b> Perfil de bandas do marcador de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific) em SDS-PAGE.	113
<b>Figura 39.</b> Representação esquemática do mapa do vetor para clonagem de produto de PCR pGEM <sup>®</sup> -T (Promega).	114
<b>Figura 40.</b> Representação esquemática do mapa do vetor pIJ2925.	114
<b>Figura 41.</b> Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em levedura Yep351PGK.	115
<b>Figura 42.</b> Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em bactéria pABC1. Ami: gene da $\alpha$ -amilase de <i>B. subtilis</i> .	115
<b>Figura 43.</b> Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em levedura pPG.	116

<b>Figura 44.</b> Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em levedura pPB-G.	116
<b>Figura 45.</b> Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde do gene de $\alpha$ -amilase com códon de parada (amyS).	117
<b>Figura 46.</b> Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o gene de $\alpha$ -amilase e a porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina de 975 pb.	118
<b>Figura 47.</b> Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o gene de $\alpha$ -amilase e a porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb.	121
<b>Figura 48.</b> Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o cDNA da glicoamilase completa (gla1) e a porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb.	124
<b>Figura 49.</b> Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o cDNA da glicoamilase (gla2) e a porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb.	128
<b>Figura 50.</b> Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o cDNA da glicoamilase (gla3) e a porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb.	131

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produção mundial de etanol por país em 2010 e 2011 em milhões de litros.	2
<b>Tabela 2.</b> Tipos de vetores integrativos e epissomais e suas principais características.	7
<b>Tabela 3.</b> Proteínas e peptídeos que já foram imobilizados na superfície celular da levedura e seu tamanho.	14
<b>Tabela 4.</b> Enzimas de restrição utilizadas.	28
<b>Tabela 5.</b> Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene da $\alpha$ -amilase.	31
<b>Tabela 6.</b> Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene da glicoamilase.	31
<b>Tabela 7.</b> Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento da porção final do gene da $\alpha$ -aglutinina.	32
<b>Tabela 8.</b> Vetores utilizados em <i>E. coli</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>APS</b>	persulfato de amônio
<b>ARS</b>	sequência de replicação autônoma
<b>Asp</b>	ácido aspártico
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloreto de cálcio
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>dNTP</b>	deoxinucleotídeos trifosfatados
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etileno-diamino-tetra-acético
<b>EtBr</b>	brometo de etídio
<b>GA</b>	glicoamilase
<b>Glc</b>	resíduo de glicose
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetilglicosamina
<b>GlcNH<sub>2</sub></b>	glicosamina
<b>Glu</b>	ácido glutâmico ou glutamato
<b>GPI</b>	glicosilfosfatidilinositol
<b>GRAS</b>	<i>Generally Regarded As Safe</i> (geralmente considerada segura)
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	sulfato de magnésio
<b>MOPS</b>	3-( <i>N</i> -morfolino) ácido propanosulfônico
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>OD<sub>600nm</sub></b>	densidade celular óptica a 600 nm
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase

<b>PEG</b>	polietilenoglicol
<b>p/p</b>	peso por peso
<b>p/v</b>	peso por volume
<b>RbCl</b>	cloreto de rubídio
<b>RNAse A</b>	ribonuclease A
<b>SDS</b>	dodecil-sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio)
<b>SOB</b>	<i>Super Optimal Broth</i> (caldo super ótimo)
<b>TAE</b>	tampão tris-acetato-EDTA
<b>TEMED</b>	N, N, N', N' tetra-metil-etileno-diamina
<b>UFC</b>	unidade formadora de colônia
<b>YCp</b>	plasmídeos centroméricos
<b>YEp</b>	plasmídeos epissômicos
<b>YIp</b>	plasmídeos integrativos
<b>YLp</b>	plasmídeos lineares
<b>YNB</b>	base nitrogenada para leveduras
<b>YPD</b>	extrato de levedura, peptona e dextrose
<b>YRp</b>	plasmídeos replicativos

## RESUMO

A utilização da biomassa tem se tornado uma atrativa fonte alternativa para a produção de energia. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais utilizado na indústria de fermentação alcoólica, porém não possui atividade amilolítica. Portanto, a modificação genética dessa levedura vem sendo feita para obtenção de novas linhagens amilolíticas. O presente trabalho teve como objetivo a construção de um vetor de expressão de proteínas heterólogas na superfície de *S. cerevisiae* para coexpressar a enzima  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* juntamente com a glicoamilase de *Aspergillus awamori* na parede celular da levedura. Para ancorar as proteínas de interesse à parede foi feita a fusão destas com a região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina da própria levedura, contendo a sequência sinal para adição da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e as proteínas expressas na linhagem MFL. Utilizou-se três formas diferentes de glicoamilase, uma contendo o gene completo (gla1), outra apenas com o domínio catalítico e a região altamente O-glicosilada (gla2) e uma última com domínio catalítico e parte da região O-glicosilada (gla3). Os testes de atividade mostraram que a enzima  $\alpha$ -amilase aderiu à parede celular, porém a maior parte da proteína produzida ainda era secretada para fora da célula. As maiores atividades encontradas para as construções contendo  $\alpha$ -amilase fusionada à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina foi de  $0,99 \pm 0,02$  U/mL e  $89,43 \pm 5,27$  U/mL, associada à célula e no sobrenadante, respectivamente. A secreção da  $\alpha$ -amilase para o meio de cultura apresentou grande aumento quando fusionada a outra proteína. A atividade observada para glicoamilase também foi maior no sobrenadante de cultura. As três diferentes formas de glicoamilase fusionadas à  $\alpha$ -aglutinina não apresentaram diferenças significativas de expressão entre si. A análise do perfil secretório mostrou que as enzimas fusionadas encontradas no sobrenadante de cultura apresentam a mesma massa molecular da enzima secretada sem fusão alguma.

**Palavras chave:**  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -aglutinina, glicoamilase, âncora de GPI, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

Biomass has become an attractive alternative source for energy production. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the most used microorganism in industrial fermentation, however it doesn't have amylolytic activity. Therefore, molecular engineering of this yeast have been done to obtain new amylolytic strains. The aim of this work was to construct a vector for expression of heterologous proteins on the cell surface of *S. cerevisiae* to coexpress the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* and the glucoamylase of *Aspergillus awamori* in the yeast cell wall. To anchor the proteins to the wall, they were fused with the C-terminal region of  $\alpha$ -agglutinin containing the signal sequence for addition of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and the protein produced expressed in the MFL strain. We used three different forms of glucoamylase: one containing the complete gene (gla1), another with only the catalytic domain and the highly-glycosylated region (gla2) and the last one with a catalytic domain and part of the O-glycosylated region (gla3). The activity tests showed that the enzyme  $\alpha$ -amylase was attached to the cell wall, but most of the produced protein was secreted to the culture medium. The highest activities found for the constructs containing  $\alpha$ -amylase fused to the C-terminal region of  $\alpha$ -agglutinin was  $0,99 \pm 0,02$  U/mL and  $89,43 \pm 5,27$  U/mL, to pellet and supernatant, respectively. The secretion of  $\alpha$ -amylase protein was greatly increased when fused to another protein. The activity found for glucoamylase was also higher in the culture supernatant. The three different forms of glucoamylase fused to C-terminal region of  $\alpha$ -agglutinin showed no significant differences in expression among them. The secretory analysis showed that merged enzymes found in the culture's supernatant presented the same molecular mass as the enzyme secreted without any fusion.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -agglutinin, glucoamylase, GPI anchor, *Saccharomyces cerevisiae*.

## INTRODUÇÃO

### 1. CONTEXTO ATUAL

Nas últimas décadas, com a diminuição das principais fontes de energia não renováveis e a crescente preocupação em relação aos impactos negativos do consumo excessivo de combustíveis fósseis ao meio ambiente, a utilização da biomassa tem se tornado uma atrativa fonte alternativa para a produção de energia (Hahn-Hägerdal, 2006; Mielenz, 2001). Adicionado a esses problemas, a procura por fontes alternativas de energia também é impulsionada pelo aumento do preço do petróleo. A biomassa tem sido considerada como a fonte de energia renovável com potencial mais promissor para contribuir com a atual demanda de energia no mundo moderno. A bioenergia, energia proveniente da biomassa, pode ser produzida de diversas formas para diferentes aplicações, como etanol, biodiesel ou bioeletricidade (Demirbas *et al.*, 2009).

Políticas governamentais – incentivos fiscais, financiamento de projetos, atualização de frota – têm sido um grande incentivo para o aumento da produção de biocombustíveis em vários países. De 2000 para 2009 a produção de etanol no mundo teve um crescimento de 16,9 para 72 bilhões de litros (Sorda *et al.*, 2010). Porém, a demanda por energia cresce de forma exponencial. Só no Brasil, estima-se que em 2020 a frota de veículos leves e motos irá dobrar seu número atual, o que demandará o dobro de oferta de combustíveis (Unica, 2012).

O etanol é obtido pela fermentação de açúcares por leveduras a partir de matérias primas da biomassa, como a sacarose, o amido e a lignocelulose. No Brasil, a produção de etanol é baseada na fermentação do caldo de cana de açúcar, rica em sacarose; nos Estados Unidos, a principal fonte de biomassa é o amido de milho; e, na Europa, as duas fontes são utilizadas (Mabee, 2007; Otero *et al.*, 2007). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, sendo precedido apenas pelos Estados Unidos (Sorda *et al.*, 2010). A tabela 1 mostra a produção de etanol no mundo nos anos de 2010 e 2011.

**Tabela 1.** Produção mundial de etanol por país em 2010 e 2011 em milhões de litros.

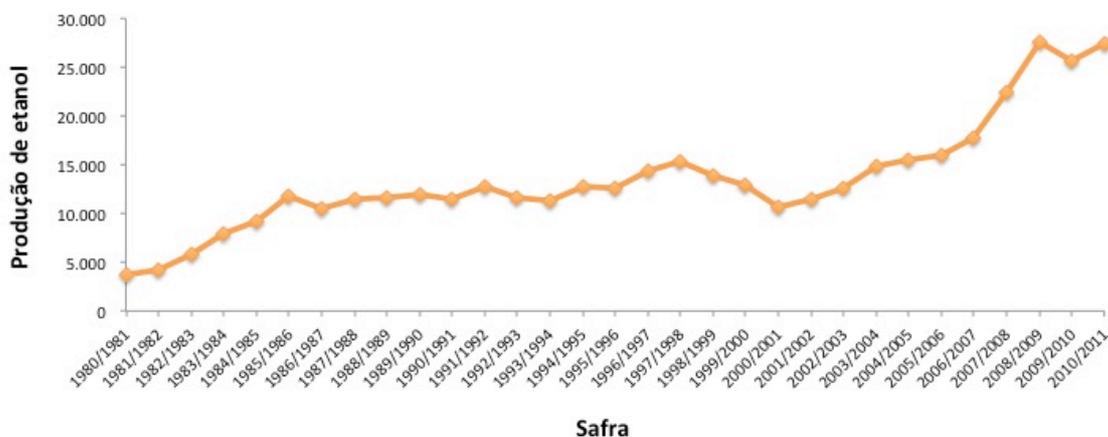
Continentes/país	2010	2011
América do Norte e Central	51.939,6	54.515,0
EUA	50.080,9	52.617,2
Canadá	1.349,9	1.749,9
América do Sul	26.958,8	21.849,0
Brasil	26.200,9	21.097,0
Europa	4.574,9	4.419,9
Ásia	2.974,9	3.367,9
China	2.049,9	2.099,9
África	165,0	145,0
Oceania	249,9	330,1
Austrália	249,9	330,1

\* Dados retirados de: Renewable Fuel Association - RFA, Statistics, Annual World Ethanol Production by Country (based on F.O. Licht estimates) (Renewable Fuel Association, 2013)

## 1.1 Brasil

Historicamente, o Brasil sempre esteve muito envolvido com a produção de cana de açúcar. Porém, até 1970, essa produção era quase inteiramente voltada para o mercado de açúcar. Com as crises do petróleo da década de 70 (1973 e 1979), o preço do barril de petróleo aumentou mais de dez vezes, comparando os preços antes da primeira crise e depois da segunda. A partir desse período, houve um grande investimento do governo para diminuir a dependência do petróleo estrangeiro. Em 1975, foi lançado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que tinha como objetivo principal substituir os combustíveis derivados do petróleo por etanol. No início, o programa teve sucesso, e, em 1985, os carros a etanol já representavam 96% das vendas do mercado automobilístico. O programa também teve seu momento de declínio por causa das altas taxas inflacionárias das décadas de 80 e 90, diminuindo a vendas dos carros e os investimentos do governo (Unica, 2013-a; Mabee, 2007). A partir de 2003, houve retomada no crescimento do setor sucroenergético apresentando uma taxa de 10,4% de crescimento ao ano. A

crise de 2008 desacelerou essa taxa (Unica, 2012). A figura 1 mostra a produção de etanol no país a partir de 1980.



**Figura 1.** Produção de etanol no Brasil de 1980-2011 em milhões de litros. (Dados retirados de: União da Indústria de Cana de Açúcar, Unica, Produção por produto (Unica, 2013-b).

Atualmente, mais de 47% de toda energia utilizada no Brasil vem de fontes renováveis e a cana de açúcar é a segunda maior fonte de energia do país (18% da energia total consumida no país). O Brasil é o maior produtor de açúcar do mundo e sua produção corresponde a 25% do total da produção mundial. Já em relação ao etanol, o Brasil é o segundo maior produtor, sendo responsável pelo equivalente a 20% da produção mundial. Os dados são satisfatórios, mas, com a evolução do consumo da sociedade moderna, a produção deverá ser aumentada e os projetos brasileiros objetivam alcançar o patamar de maior produtor de etanol do mundo (Unica, 2012).

A produção de etanol a partir da cana de açúcar compete com o mercado alimentício. Como maior produtor mundial de açúcar, a safra tem que atender à demanda do mercado interno e externo. Nesse contexto, muitas vezes a produção de etanol fica em segundo plano. Em momentos de alta nos preços do açúcar, a safra se volta para esse mercado, diminuindo a disponibilidade de matéria prima para produção de etanol (Sorda *et al.*, 2010; Demirbas, 2011). Por esse motivo, é importante que o Brasil diversifique as fontes de produção de etanol, para que não falte matéria prima e que o mercado do etanol não seja tão afetado pelo alimentício.

Nesse contexto, uma das soluções é o etanol de segunda geração, ou etanol celulósico. A produção desse etanol tem como fontes resíduos de culturas, madeira, resinosas, resíduos de celulose, herbáceos e resíduos urbanos. Essas matérias primas possuem alto potencial para geração de etanol, contêm até 75% de celulose ou hemicelulose que podem ser extraídas e fermentadas, não competem com o mercado alimentício e não são necessárias novas áreas de plantio, entretanto, a produção do etanol celulósico em escala comercial ainda apresenta altos custos e está em processo de otimização (Cardona *et al.*, 2010; Petrobrás, 2013).

O presente trabalho busca oferecer uma fonte alternativa para a produção do etanol brasileiro: o amido. As principais fontes para a produção de amido no Brasil são mandioca, batata, batata-doce e milho (Vilpoux, 2013). Essas matérias primas apresentam algumas vantagens sobre a cana de açúcar para produção de etanol. São ricas em carboidratos totais, apresentando maior concentração de carboidratos por unidade de matéria prima vegetal que a própria cana de açúcar, o que significa diminuição considerável do manuseio de volumes mássicos, por exemplo, 1 tonelada de cana produz 85 litros de álcool, enquanto 1 tonelada de mandioca com 33% de amido e 2% de glicose produz 211 litros de álcool (Cabello, 2005; Silva, 2013). No caso da mandioca, ela é cultivada em todo território nacional (Riva, 2013). No caso do milho, seu cultivo se concentra nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, mas vem se espalhando para as outras regiões e em algumas localidades ocorre excedente de produção (Giannini, 2012). O milho apresenta a vantagem de poder ser estocado por longos períodos, permitindo a atuação contínua da indústria, enquanto a cana de açúcar deve ser processada em pouco tempo, fazendo com que as usinas parem nos períodos de entressafra (Giannini, 2012). No caso da mandioca, pode-se utilizar a técnica de raspas secas ao sol, em que ela é seca na própria propriedade rural onde foi cultivada perdendo a umidade, dessa forma, permite a estocagem por longos períodos e reduz custos de transporte (Valle, *et al.*, 2013).

A utilização de fontes amiláceas para a produção de etanol ainda é mais cara que a utilização da cana de açúcar, devido às etapas adicionais necessárias para a transformação do amido em glicose. E apesar de também

competir com o mercado alimentício, se relaciona a outro produto, não ficando dependente das flutuações de um mesmo mercado consumidor. O ideal é o uso de diversas fontes para a produção do álcool combustível.

## **2. SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um ascomiceto unicelular pertencente ao Reino *Fungi*. É o organismo eucariótico mais bem conhecido e estudado e é bem estabelecido como modelo de célula eucariótica. Existem relatos de que essa levedura já é utilizada pelo homem há mais de 4 mil anos na panificação e fermentação de bebidas alcoólicas (Nevoigt, 2008; Walker, 1999).

Devido a certas propriedades, é um ótimo micro-organismo para a engenharia genética. Apresenta crescimento rápido em meios simples e com alta densidade celular. É um eucarioto que pode ser manipulado quase tão facilmente quanto a *Escherichia coli* (procarioto), mas não possui a toxicidade dos pirógenos da parede celular desse organismo (Romanos *et al.*, 1992).

A *S. cerevisiae* é conhecida por seu grau de segurança, *status* GRAS (do inglês “*Generally Regarded As Safe*” que significa “geralmente considerada segura”), o que populariza sua utilização na produção de alimentos e biofármacos (Kondo & Ueda, 2004). Devido ao seu papel na indústria alimentícia e de fermentação, possui uma grande importância econômica. Também está relacionada à produção de bioquímicos industrialmente relevantes, como glicerol, propanediol, ácidos orgânicos, esteroides, entre outros (Nevoigt, 2008).

Atualmente, tem ganhado muita visibilidade como organismo fermentador produtor de biocombustíveis. *S. cerevisiae* é relativamente tolerante a baixos pHs e altas concentrações de etanol e açúcar, além de ser bastante resistente a inibidores presentes nos hidrolisados de biomassa e ser anaeróbica facultativa. Essas características a tornaram o micro-organismo mais utilizado na indústria de fermentação alcoólica (Nevoigt, 2008).

Entretanto, essa levedura não possui atividades enzimáticas importantes na produção de etanol a partir de outras fontes de biomassa, como amido ou celulose, sendo incapaz de fermentar esses compostos. Então, para tentar contornar esses obstáculos, a modificação de linhagens de *S. cerevisiae* contendo enzimas de interesse vem sendo feita (Ueda & Tanaka, 2000). Mas apenas inserir um determinado gene externo na levedura não garante sua eficiente expressão, é necessário observar a dinâmica com regiões reguladoras, por exemplo. Por isso, vários parâmetros são estudados e otimizados para aumentar cada vez mais a eficiência de expressão de proteínas de interesse.

## 2.1 Vetor integrativo e vetor epissomal

A inserção de genes heterólogos em levedura pode ser feita de duas maneiras: (1) integração do DNA exógeno no genoma do organismo hospedeiro por um vetor integrativo ou (2) introdução de um vetor epissomal contendo o DNA exógeno na célula hospedeira. Geralmente, os dois tipos de vetores carregam características essenciais em comum, necessárias para o processo de clonagem: elementos genéticos para manipulação em *E. coli*; promotores e terminadores reconhecidos pela levedura; marca de seleção e; sítios de restrição múltiplos para clonagem. Cada vetor tem suas características, vantagens e desvantagens, e a escolha depende do tipo de expressão e da proteína de interesse (Romanos *et al.*, 1992).

A utilização de vetores integrativos oferece maior estabilidade na manutenção do DNA exógeno durante a divisão mitótica, inclusive em meio não seletivo. O principal exemplo de vetores integrativos são os plasmídeos integrativos (Ylp). No geral, esses vetores são digeridos em um único sítio de restrição em uma região homóloga ao DNA cromossomal e é integrado por recombinação. Porém, o número de cópias para esse tipo de vetor é normalmente menor do que os números de vetores epissomais (Romanos *et al.*, 1992). Para aumentar o número de cópias integradas, é necessário inserir o Ylp em sequências de DNA presente em múltiplas cópias. Sequências encontradas em múltiplas cópias no DNA de *S. cerevisiae* são as do rDNA e

sequências Ty $\delta$  e têm sido usadas para integração de DNA exógeno em alto número de cópias em levedura (Lopes *et al.*, 1989; Shuster *et al.*, 1990).

Vetores epissomais não se integram no genoma e ficam dispersos no interior da célula. São exemplos de vetores epissomais: plasmídeos replicativos (YRp), plasmídeos epissômicos (YEp), plasmídeos centroméricos (YCp) e plasmídeos lineares (YLp) (Nobrega, 2001 *apud* Borges, 2009). O YRp e YEp são eficientes para clonagem de DNA exógeno e de fácil manipulação e inserção, sendo necessário menor quantidade de DNA na transformação. Os mais utilizados rotineiramente entre os epissomais são os YEp. Esses vetores são baseados no 2  $\mu$ m, plasmídeo natural de *S. cerevisiae*, e possuem uma origem de replicação que se comporta como a ARS (sequência de replicação autônoma) (Romanos *et al.*, 1992). Podem chegar a manter 200 cópias por genoma haploide (Broach, 1983) e apresentam uma boa estabilidade, ocorrendo a perda de plasmídeo a uma taxa de 1 em 10<sup>4</sup> por geração (Futcher & Cox, 1983).

Abaixo, tabela 2, são brevemente descritos os vetores epissomais e integrativos com suas principais vantagens e desvantagens.

**Tabela 2.** Tipos de vetores integrativos e epissomais e suas principais características. (Fonte: Nobrega, 2001 *apud* Borges, 2009)

Tipo de plasmídeo	Sigla	Características	Vantagens	Desvantagens
Plasmídeos Integrativos	YIp	A expressão a partir destes vetores é baseada na integração da informação genética ao cromossomo da levedura hospedeira através da recombinação homóloga	A informação é muito estável, havendo perda de aproximadamente 0,1% a cada geração, na ausência da pressão seletiva	A frequência de transformação desses vetores é muito baixa, atingindo 1 a 10 transformantes / $\mu$ g de DNA
Plasmídeos Replicativos	YRp	Vetores extracromossomais contendo uma sequência de replicação autônoma (ARS), que funciona como origem de replicação	Vetores ARS estão presentes em múltiplas cópias por célula	São mitoticamente instáveis, cerca de 20% das células perdem seus plasmídeos a cada geração quando crescidas na ausência de pressão seletiva
Plasmídeos Epissômicos	YEp	Vetores que replicam autonomamente por meio de um segmento de plasmídeos natural	Normalmente bifuncionais e são mantidos em aproximadamente 100 cópias por célula	Sua estabilidade é um pouco maior do que vetores ARS, atingindo cerca de 1 a 10% de instabilidade a cada

		de <i>S. cerevisiae</i> 2 $\mu$ m	haplóide	geração
Plasmídeos Centroméricos	YCp	Contêm uma sequência que permite a replicação autônoma na levedura e sequências correspondentes às regiões centroméricas cromossômicas	Possuem segregação estável mantendo-se na célula	Baixo número de cópias por célula (1 a 2 cópias). A perda desse plasmídeo corresponde a aproximadamente 1% por geração
Plasmídeos Lineares	YLp	Contêm sequências teloméricas e elementos ARS para replicação autônoma, mantendo-se lineares dentro da célula.	Apresenta boa estabilidade	Baixa eficiência de transformação

Após determinar o tipo de vetor mais conveniente para expressão heteróloga da proteína de interesse, é necessário determinar as características do vetor. Promotor e marca de seleção são determinantes na expressão e seleção de clones recombinantes.

## 2.2 Promotores

O promotor é a região contendo os sítios de ligação de fatores relacionados à transcrição capazes de promover a transcrição de genes em certo grau com eficiência normal e controle apropriado, são sequências reguladoras (Lewin, 2009). Promotores induzíveis são aqueles que necessitam da presença ou ausência de um determinado fator para desencadear o processo de transcrição, e podem ser muito sensíveis a esse fator ou pouco sensíveis. Já promotores constitutivos promovem a transcrição contínua do gene ao qual estão associados, não necessitando da presença de indutor. Muitas dessas regiões promotoras de certos genes já foram identificadas e isoladas, e são utilizadas na engenharia genética para expressão gênica de proteínas de interesse.

Entre os promotores utilizados em *S. cerevisiae*, estão os regulados por galactose e envolvidos no metabolismo desse carboidrato, os quais foram isolados dos genes *GAL1*, *GAL7* e *GAL10*. São os promotores mais fortemente regulados, sendo necessárias pequenas quantidades de galactose para induzir rapidamente a transcrição. Porém, também são fortemente reprimidos na

presença de glicose, limitando seu uso a meios sem glicose ou ocorrendo a indução (com presença de galactose) após o consumo da glicose do meio. O promotor do gene *PHO5* (fosfatase ácida) é utilizado em induções reguladas por fosfato inorgânico, porém não é um promotor muito forte quando comparado aos regulados por galactose e aos da via glicolítica (Romanos *et al.*, 1992).

Os promotores mais utilizados na expressão gênica quando se deseja grande produção são os da via glicolítica. Promotores constitutivos dos genes *ADH1* (álcool desidrogenase I), *PGK1* (fosfoglicerato quinase I) e *GAP* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) são os promotores mais fortes de *S. cerevisiae* (Romanos *et al.*, 1992). Porém, descobriu-se que, mesmo constitutivos, podem ser induzidos ainda mais com adição de maiores concentrações de glicose (Tuite *et al.*, 1982).

O promotor *PGK1* pode acumular mRNA equivalente a 5% do total existente na célula e quando presente em um vetor com alto número de cópias, a proteína regulada pode constituir até 50% do total de proteínas da célula (Mellor *et al.*, 1985). Sua região promotora apresenta uma sequência *upstream* de ativação (UAS) na posição -402 a -479 essencial para a expressão gênica, dois possíveis TATA box nas posições -152 e -114, que se mostraram dispensáveis para regulação, e uma estrutura na posição de -68 a -39 comum a todos os genes de *S. cerevisiae* que codificam mRNA abundantes (Ogden *et al.*, 1986; Dobson *et al.*, 1982).

### 2.3 Marcas de seleção

As marcas de seleção são utilizadas para facilitar a separação dos clones que absorveram o DNA exógeno de interesse dos demais que não o fizeram. Elas podem ser auxotróficas ou dominantes.

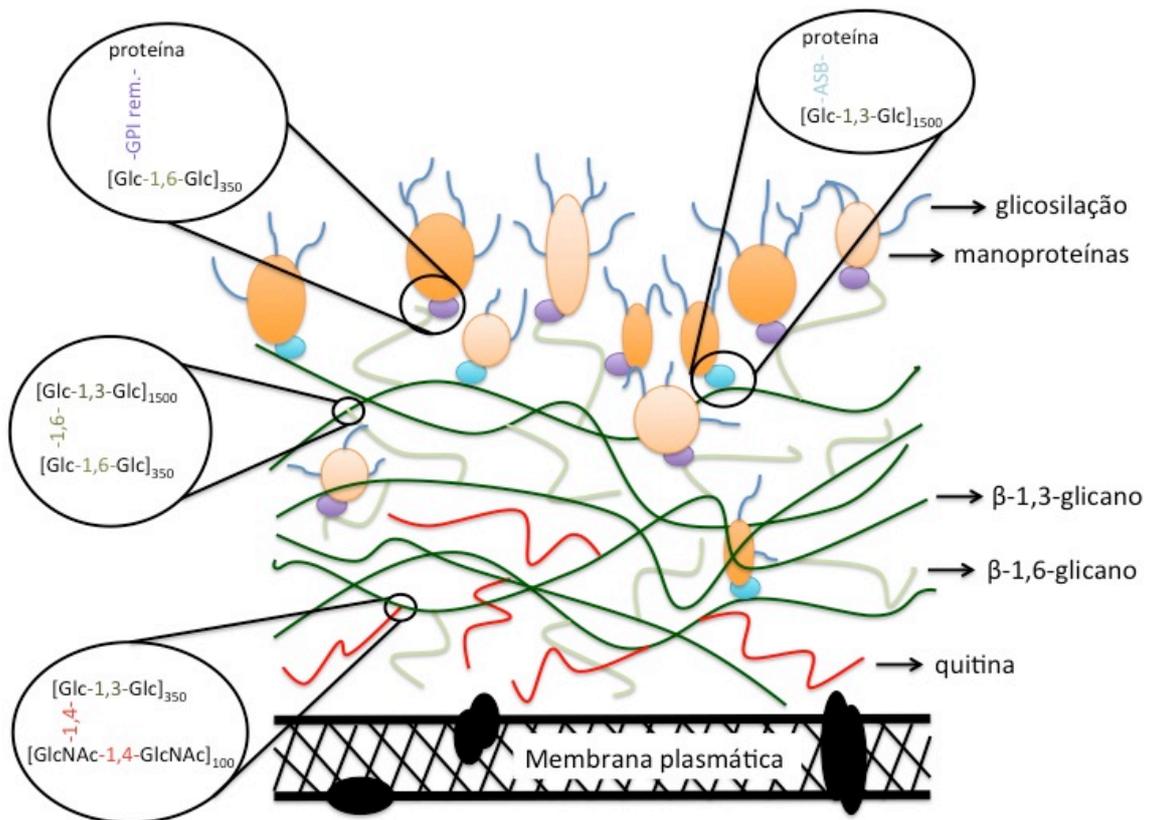
As marcas de seleção auxotróficas comumente usadas são *LEU2*, *TRP1*, *URA3* e *HIS3*. Vetores contendo esses genes são inseridos em linhagens deficientes para esses genes, ou seja, não produzem leucina, triptofano, uracila e histidina, e necessitam da complementação auxotrófica para crescerem. A seleção dos transformantes requer o cultivo em meio mínimo sem o nutriente

específico que falta na linhagem e que é suprido pelo gene do vetor inserido (Romanos *et al.*, 1992). Algumas dessas marcas possuem variantes, como LEU2-d e URA3-d, que consistem no promotor truncado para baixas taxas de expressão do nutriente, o que seleciona apenas transformantes com alto número de cópias na célula (Beggs, 1978; Loison *et al.*, 1989).

Outro tipo de marca de seleção comumente utilizada é a dominante. Essa marca confere resistência a um antibiótico que é adicionado ao meio e apenas os transformantes que contêm o vetor (com o gene de resistência ao antibiótico e o gene de interesse) crescem. Uma vantagem dessa marca para manipulações laboratoriais é que pode ser utilizada em meios complexos. Exemplos de marcas dominantes muito usadas são a resistência aos antibióticos G-418, higromicina B e cloranfenicol (Romanos *et al.*, 1992).

## 2.4 Parede celular

A *S. cerevisiae* possui uma espessa parede celular (200 nm de espessura) que representa aproximadamente 30% do peso seco da célula e é composta principalmente de polissacarídeos (85%) e proteínas (15%). Possui uma estrutura como uma bicamada, pois sua face interna tem composição diferente da face externa. Os componentes encontrados na parede da levedura são glicose – 80% a 90% –, *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) – 1% a 2% – e resíduos de manose – 10 a 20% (Nguyen *et al.*, 1998; Kondo & Ueda, 2004). Um esquema da parede celular de *S. cerevisiae* pode ser observado na figura 2.



**Figura 2.** Esquema da estrutura da parede celular de *S. cerevisiae*. Glc: resíduo de glicose; GlcNAc: *N*-acetilglicosamina; GPI rem.: remanescente da âncora de GPI; ASB: ponte sensível a pH alcalino.

Os resíduos de glicose se ligam por ligações  $\beta$ -1,3 na cadeia principal e  $\beta$ -1,6 nos pontos de ramificação. A cadeia principal forma uma estrutura fibrilar com uma média de 1500 unidades de glicose por cadeia, chamada de  $\beta$ -1,3-glicano, onde se prendem covalentemente as cadeias de quitina,  $\beta$ -1,6-glicano e manoproteínas. Essa estrutura possui uma forma de mola que confere à parede celular elasticidade e resistência à tração (Klis *et al.*, 2002; Lesage & Bussey, 2006).  $\beta$ -1,6-glicano são cadeias menores, com uma média de 350 resíduos de glicose por cadeia, ligadas à cadeia principal como ramificações por ligações  $\beta$ -1,6. É uma estrutura amorfa e serve como um adesivo flexível entre as cadeias de  $\beta$ -1,3-glicano e as cadeias de quitina e manoproteínas por formar ligações covalentes cruzadas (Kollar *et al.*, 1997).

Quitina é um polímero de GlcNAc, em média 100 resíduos, e é o menor constituinte da parede da levedura (1% a 2% do peso seco da célula). Formam microfibras estabilizadas por pontes de hidrogênio que se aderem à cadeia de

$\beta$ -1,3-glicano por ligações  $\beta$ -1,4, e, quando se apresentam em estrutura cristalina, conferem resistência ao alongamento da parede. No geral, estão mais voltadas para a face interna da parede celular (Klis *et al.*, 2002).

As manoproteínas se encontram em grande quantidade voltadas para a superfície externa da parede celular. Essas proteínas glicosiladas podem estar aderidas à parede por meio de um  $\beta$ -1,6-glicano, no caso de proteínas processadas com a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), ou por meio de um  $\beta$ -1,3-glicano, no caso de proteínas presas por ponte sensível a pH alcalino (Lesage & Bussey, 2006).

Existem duas formas de glicosilação de proteínas relatadas para *S. cerevisiae*: N-glicosilação e O-glicosilação. Na N-glicosilação, as proteínas da parede celular, quando chegam ao complexo golgiense, recebem cadeias de oligossacarídeos com mais de 50 resíduos de manose formando ligações N-glicosídicas entre a GlcNAc e um resíduo de asparagina. Essa cadeia oligossacarídica recebe ainda outras pequenas cadeias, formando uma estrutura altamente ramificada com uma média de 200 resíduos de manose (Dean, 1999). Já na O-glicosilação, as proteínas recebem cadeias pequenas de 5 resíduos de manose formando ligações O-glicosídicas com a hidroxila das cadeias laterais de um resíduo de serina ou de treonina. Apesar de pequenas cadeias de manose, proteínas da parede celular podem apresentar uma região rica em serina e treonina e o número de cadeias O-ligadas pode ser bem alto (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999).

## 2.5 Linhagens industriais

Engenharia genética tem sido eficientemente aplicada a linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae*, devido ao grande conhecimento adquirido com anos de pesquisa. Os protocolos já são bem determinados e as características metabólicas e moleculares bem conhecidas. Porém, processos industriais acontecem em condições não estéreis, o que os tornam suscetíveis de contaminação por outros organismos, e pressões seletivas diversas dos processos conduzidos em laboratório. Além da escala industrial ser maior do que a laboratorial (Silva Filho *et al.*, 2005; Wheals *et al.*, 1999). Todas essas

características criam um ambiente diferente do ambiente controlado em laboratório, o que seleciona de forma diferente os organismos mais genética e fisiologicamente adaptados (Silva Filho *et al.*, 2005).

Por esse motivo, linhagens isoladas de ambientes industriais são robustas e melhor adaptadas a condições de estresse e estão sendo mais exploradas na otimização de processos produtivos. Essas leveduras têm maior tolerância ao estresse fermentativo, altas temperaturas, variações de pressão osmótica, ao próprio etanol e suportam baixos pHs (Silva Filho *et al.*, 2005). Porém, do ponto de vista molecular, linhagens industriais são mais complexas e não apresentam estabilidade em seu estado haploide, comumente aparecem como linhagens poliploides, o que também pode ser uma vantagem se considerar que cromossomos extras apresentam superexpressão de genes (Lucena *et al.*, 2007; Pretorius, 2000).

A linhagem utilizada no trabalho, MFL, é uma linhagem semi-industrial, pois é derivada de uma linhagem industrial modificada, a FTPT472 com o gene *LEU2* interrompido. A cepa FTPT472 foi isolada de um fermentador industrial da Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello, Campinas – SP, Brasil (Fitzsimon, 2004).

### **3. IMOBILIZAÇÃO NA PAREDE (CELL SURFACE DISPLAY)**

A imobilização de proteínas heterólogas na parede celular de micro-organismos tem importantes aplicações na microbiologia, na biologia molecular e até na indústria. Esse processo aproveita o sistema de ancoragem de proteínas localizadas na superfície celular existente nas próprias células. Proteínas específicas dos micro-organismos ficam aderidas à superfície das células, onde exercem suas funções, e podem ficar contidas em um domínio em particular (Ueda & Tanaka, 2000-b). Esse método utiliza a região ancoradora ou sinalizadora dessas proteínas para expressar outras proteínas de interesse imobilizadas na parede celular.

A utilização dessa técnica foi primeiramente relatada por Scott e Smith (1990), quando provaram que peptídeos podiam ser fusionados a proteínas de

acoplagem em fago filamentoso sem afetar sua capacidade de infecção em *Escherichia coli*. Essa descoberta possibilitou que mais tarde Chiswell e McCafferty (1992) desenvolvessem um sistema de imobilização de peptídeos em fago para isolar ligantes, antígenos e anticorpos específicos de bibliotecas complexas.

Com interesse em imobilizar peptídeos maiores, o uso do fago não era o mais adequado. Assim, buscaram micro-organismos com capacidade de exibir proteínas maiores e um maior número delas. Muitos trabalhos começaram a ser relatados utilizando a superfície bacteriana como suporte para imobilização (Georgiou *et al.*, 1993).

Com a intenção de introduzir a técnica a processos industriais aplicados a alimentos, bebidas alcoólicas e fármacos, buscou-se um micro-organismo já conhecido e seguro (Kondo & Ueda, 2004). Por já ser usada na produção alimentícia e farmacêutica, a *S. cerevisiae* mostrou-se o micro-organismo mais adequado para tal propósito. Também se apresentou como boa hospedeira para o desenvolvimento do sistema de expressão na superfície celular (Ueda e Tanaka, 2000). Um grande número das mais diferentes proteínas já foram eficientemente aderidas à parede celular dessa levedura, proteínas de 0,93 a 136 kDa, e, em muitos casos, já foram imobilizadas  $10^4$  a  $10^5$  moléculas por célula, a tabela 3 lista proteínas e peptídeos já imobilizados na parede celular (Kondo & Ueda, 2004; Ueda & Tanaka, 2000-b).

**Tabela 3.** Proteínas e peptídeos que já foram imobilizados na superfície celular da levedura e seu tamanho.

<b>Proteína e peptídeos</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>
Sistema da $\alpha$ -aglutinina	
Glicoamilase de <i>Rhizopus oryzae</i>	62
$\alpha$ -amilase de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	59
$\alpha$ -amilase de <i>Streptococcus bovis</i>	57
$\beta$ -glicosidase de <i>Aspergillus aculeatus</i>	136
Endoglicanase de <i>Trichoderma reesei</i>	42
Celobiohidrolase de <i>Trichoderma reesei</i>	-
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	30
Endoxilanase de <i>Trichoderma reesei</i>	-
$\beta$ -xilosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	-

GFP de <i>Aequorea victoria</i>	27
BFP	27
ECFP	27
EYFP	27
Apoaequorin	21
Hexa-His	0,93
ZZ	14
Fragmento de anticorpo (Fab)	50
Sistema da a-aglutinina	
Anticorpo de cadeia simples	27-30
Receptor de célula T de cadeia simples	26-28
Região C-terminal da Flo1p	
Glicoamilase de <i>Rhizopus oryzae</i>	62
EGFP	27
Domínio funcional de floculação da Flo1p	
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	30
EGFP	27

---

\* Fonte: Kondo & Ueda (2004) com modificações.

Imobilização de proteínas na parede celular é útil para separação de peptídeos produzidos, vacinas vivas, produção de biocatalisadores microbianos imobilizados, bioconversão, biorremediação, adesão celular, reconhecimento molecular, entre outros. Podem expor enzimas para bioconversão, anticorpos e receptores proteicos para bioseparação, fatores de reconhecimento de células, antígenos ou proteínas funcionais (Kondo & Ueda, 2004; Ueda & Tanaka, 2000-b).

O uso dessa técnica também tem-se mostrado efetivo na redução dos custos de produção do etanol, inclusive custos energéticos por ser eficiente na fermentação com menor temperatura de cozimento (Shigechi *et al.*, 2004-a). A imobilização das enzimas na superfície celular facilita a captação, pela levedura, da glicose liberada pela ação da enzima e evita gastos com etapas de purificação enzimática, já que a proteína está aderida à célula e não livre no meio onde se encontram os produtos de interesse (Ueda & Tanaka, 2000-b). Também é relatado que a imobilização aumenta a estabilidade da proteína expressa em relação à sua forma livre e permite a reutilização das enzimas que não são descartadas já que estão aderidas à parede (Corcoran, 1985; Baynum,

1980). Além disso, as enzimas são regeneradas pela própria levedura, ocorrendo a reciclagem da proteína – aumentando a vida útil do sistema (Ueda & Tanaka, 2000-b; Kondo & Ueda, 2004).

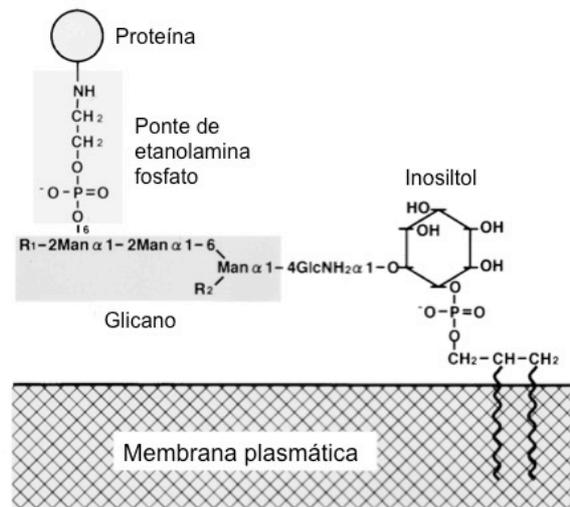
A imobilização genética de proteínas na superfície celular apresenta vantagens sobre outros métodos de imobilização, como a covalente e a por interação iônica. No método covalente, as proteínas se aderem por meio de ligações fortes e muito resistentes, porém existem muitos problemas para se determinar as condições da reação de imobilização, devido a mudanças que podem causar na estrutura das proteínas quebrando a ligação. Já a imobilização por interação iônica é menos prejudicial para a estrutura e função das proteínas, mas é mais facilmente dissociável. O método genético é capaz de superar esses problemas, a proteína de interesse fica aderida à parede covalentemente e é naturalmente imobilizada (Ueda & Tanaka, 2000-b).

Muitas proteínas encontradas na parede da levedura são aderidas pela adição de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é ligada covalentemente à superfície celular. Proteínas como as aglutininas (Aga1p e Aga1p), Flo1p, Sed1p, Cwp1p, Cwp2p, Tip1p/Srp1p são manoproteínas aderidas à parede celular da levedura por meio da âncora de GPI (Lipke *et al.*, 1989; Watari *et al.*, 1994; Hardwick *et al.*, 1992; Van Der Vaart *et al.*, 1995). Essas manoproteínas podem ser usadas na imobilização genética de peptídeos na superfície da célula, porém, os sistemas mais conhecidos e utilizados são o das aglutininas e o da floculina (Van Der Vaart *et al.*, 1997; Kondo & Ueda, 2004).

### **3.1 Âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI)**

A âncora de GPI é encontrada com estrutura bem preservada em muitas proteínas de superfície celular em vários organismos eucarióticos, desde protozoários até mamíferos (Homans *et al.*, 1988; Ueda & Tanaka, 2000-b; Dustin *et al.*, 1987). A região ativa da proteína é covalentemente ligada à âncora por sua porção C-terminal, e a âncora se prende à membrana por meio de interações hidrofóbicas entre os lipídios, o que permite uma associação

estável da proteína à superfície celular, como mostra a figura 3 (Ueda & Tanaka, 2000-b).



**Figura 3.** Estrutura da âncora de GPI intermediando a ligação entre proteína e membrana plasmática. Man: manose; GlcNH<sub>2</sub>: glicosamina. (Fonte: Ueda & Tanaka, 2000-b)

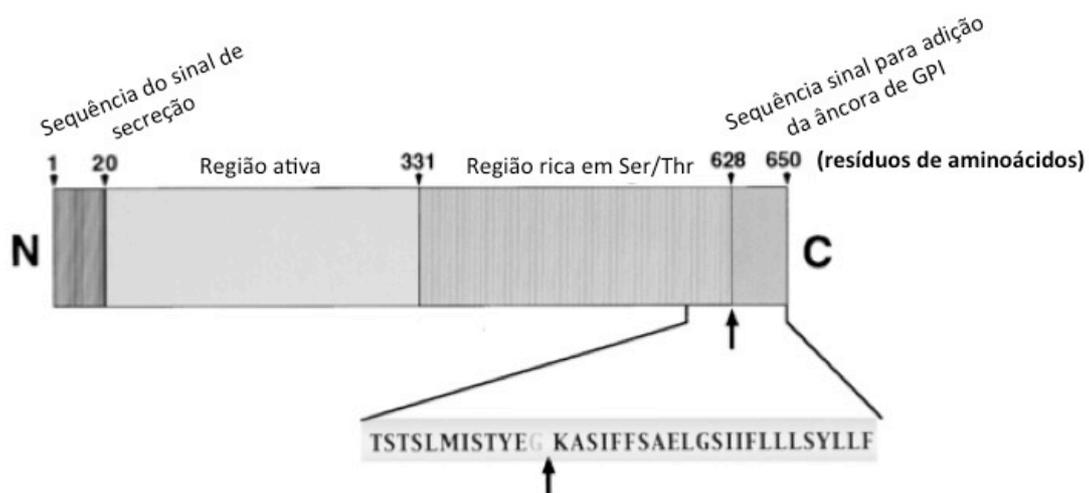
A proteína é traduzida no retículo endoplasmático (RE) e, após o término desse processo, permanece presa à membrana do RE por uma sequência C-terminal hidrofóbica. Uma enzima, presumivelmente uma transamidase, cliva a sequência C-terminal hidrofóbica em um resíduo de glicina, denominado sítio ω (localizado nos últimos 40 aminoácidos da proteína), e substitui essa sequência pela âncora de GPI. A proteína continua voltada para o lúmen do RE e presa à membrana, mas agora pela âncora de GPI (Ueda & Tanaka, 2000-b).

Com a continuação da via de secreção, a proteína é transferida para as cisternas do complexo golgiense e depois para a vesícula de secreção. Esta vesícula se funde à membrana plasmática, expondo a proteína para o exterior da célula (Schekman, 1992). Da membrana plasmática, ela é transferida para a parede celular por uma enzima fosfatidilinositol fosfolipase C específica (PI-PLC) pela adição de um β1,6-glicano à âncora de GPI remanescente, uma etanolamina-PO<sub>4</sub>-oligomanosídeo. Esse processo é dependente da âncora de GPI, e só ocorre se a proteína estiver ligada a essa âncora (Lu & Lipke, 1994; Lesage & Bussey, 2006). Dessa forma, a proteína fica exposta na superfície externa da parede celular da levedura.

### 3.2 Sistema das aglutininas

As aglutininas (a-aglutinina ou  $\alpha$ -aglutinina) são manoproteínas encontradas na superfície externa da parede celular da *S. cerevisiae*. São ativadas na adesão sexual, cada célula haplóide possui um tipo de aglutinina, uma complementar à outra, e medeiam a adesão célula-célula durante o acasalamento (Zhao *et al.*, 2001; Lipke & Kurjan, 1992). Células do tipo a expressam a-aglutininas e células do tipo  $\alpha$  produzem  $\alpha$ -aglutininas.

A  $\alpha$ -aglutinina possui apenas uma subunidade codificada pelo gene *AG $\alpha$ 1* (Lipke *et al.*, 1989), que interage com a subunidade de ligação da a-aglutinina (Aga2p), esta última formada por duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto, uma maior (Aga1p) e outra menor (Aga2p), codificadas pelos genes *AGA1* e *AGA2*, respectivamente (Roy *et al.*, 1991; Cappellaro *et al.*, 1991). Tanto a  $\alpha$ -aglutinina como a subunidade maior da a-aglutinina são compostas por uma sequência sinal para secreção, uma região ativa, uma região suporte rica em resíduos de treonina e serina e uma sequência sinal para adição da âncora de GPI (Roy *et al.*, 1991; Lipke *et al.*, 1989), a estrutura da  $\alpha$ -aglutinina é mostrada na figura 4.



**Figura 4.** Estrutura da  $\alpha$ -aglutinina. Setas: localização do sítio  $\omega$ . (Fonte: Ueda & Tanaka, 2000-b)

Ao se fusionar proteínas heterólogas à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina juntamente com a sequência sinal para âncora de GPI, aproximadamente 320 resíduos de aminoácidos, é possível expressá-las na superfície externa da

parede celular (Ueda & Tanaka, 2000; Murai *et al.*, 1997). No caso da  $\alpha$ -aglutinina, a proteína heteróloga é fusionada à porção N-terminal da subunidade menor (Aga2p), aproximadamente 69 resíduos de aminoácidos, que contém o domínio para formação das pontes dissulfeto com a subunidade maior (Aga1p), que está aderida à célula pela âncora de GPI (Boder & Wittrup, 1997). O uso da  $\alpha$ -aglutinina para imobilização de proteínas de interesse na parede celular é o mais comum (Kondo & Ueda, 2004).

### 3.3 Sistema da floculina

A floculina (Flo1p), proteína semelhante a lectina, são manoproteínas localizadas na face externa da parede celular de *S. cerevisiae*. Desempenha um importante papel na floculação, reconhecendo e aderindo reversivelmente a componentes da parede de outras células, como  $\alpha$ -manose e outros carboidratos, formando flocos de células (Teunissen *et al.*, 1993).

A Flo1p é codificada pelo gene *FLO1* e é formada por uma sequência sinal para secreção, um domínio funcional de floculação, sequência sinal para adição da âncora de GPI e um domínio de ancoragem na membrana (Teunissen *et al.*, 1993; Watari *et al.*, 1994). É uma proteína grande e pode atravessar todo o comprimento da parede celular com uma região repetitiva de 1200 resíduos de aminoácidos (Watari *et al.*, 1994).

Existem duas formas de imobilizar enzimas na parede celular utilizando a estrutura da Flo1p: pelo sistema da âncora de GPI e pelo domínio funcional de floculação. Pela âncora de GPI, a proteína heteróloga é fusionada a um dos seis fragmentos da região C-terminal da Flo1p, todos contendo a sequência sinal para adição da âncora. A diferença entre os seis fragmentos é o comprimento da âncora (42, 102, 146, 318, 428 e 1326 resíduos de aminoácidos) escolhido de acordo com as características da proteína de interesse (Sato *et al.*, 2002). O sistema do domínio funcional de floculação utiliza a região N-terminal da Flo1p, que contém o domínio, para fusionar a proteína heteróloga. Quando expressa, a proteína de interesse ficará aderida

à superfície da célula pela interação não covalente do domínio funcional de flocculação aos carboidratos da parede celular (Matsumoto *et al.*, 2002).

#### 4. AMILASES

O amido é um polissacarídeo de reserva vegetal, amplamente encontrado em batata, milho, arroz, trigo, mandioca, entre outras fontes. Pode ser encontrado como dois tipos de polímero de glicose, a amilose e amilopectina. A primeira é formada por longas cadeias não ramificadas de unidades de D-glicose, sendo constituída exclusivamente por ligações glicosídicas  $\alpha$ 1,4. A amilopectina se apresenta altamente ramificada, sendo formada por ligações glicosídicas  $\alpha$ 1,4 entre as unidades de glicose e ligações  $\alpha$ 1,6 nos pontos de ramificação (Nelson & Cox, 2002).

Industrialmente a hidrólise ácida foi muito utilizada para quebra do amido, pois a ligação glicosídica não é estável a pHs baixos. Nas últimas décadas, esse processo tem sido cada vez mais substituído ou combinado à hidrólise enzimática (van der Maarel *et al.*, 2002).

Várias enzimas atuam na quebra das ligações glicosídicas do amido, e, no geral, são chamadas de amilases. Essas enzimas são divididas em quatro grupos (van der Maarel *et al.*, 2002):

1) endoamilases: clivam as ligações  $\alpha$ 1,4 internas da cadeia de amido de forma aleatória (por exemplo:  $\alpha$ -amilases);

2) exoamilases: hidrolisam apenas as ligações  $\alpha$ 1,4 externas da cadeia (por exemplo:  $\beta$ -amilases) ou as ligações  $\alpha$ 1,4 e  $\alpha$ 1,6 externas da cadeia (por exemplo: amiloglicosidades/glicoamilases e  $\alpha$ -glicosidadeses), nas extremidades não redutoras;

3) desramificadoras: hidrolisam apenas as ligações  $\alpha$ 1,6 nos pontos de ramificação (por exemplo: isoamilases e pululanases);

4) transferases: cliva a ligação  $\alpha$ 1,4 da molécula doadora e transfere parte dessa molécula para um receptor glicosídico, formando uma nova ligação glicosídica, ou uma ligação  $\alpha$ 1,4 (por exemplo: amilomaltases e ciclodextrina glicosiltransferases) ou ligação  $\alpha$ 1,6 (por exemplo: enzima de ramificação).

Amilose e amido em grânulos são insolúveis em água, ao contrário da amilopectina. Para solubilizar essas formas de amido é necessário aquecer a mistura (amido e água) a altas temperaturas. Na indústria de fermentação alcoólica, a solução de amido é aquecida de 100°C a 175°C até que os grânulos inchem de forma irreversível, nesse momento a amilose começa a se espalhar na solução, aumentando a viscosidade da mistura. Os grânulos se separam, aumentando ainda mais a viscosidade, até a formação de um gel elástico. Esse processo é chamado de gelatinização (van der Maarel *et al.*, 2002).

As  $\alpha$ -amilases (endoamilases) são adicionadas assim que o amido é solubilizado, e a temperatura é mantida a 95°C por 90 minutos, ocorrendo a liquefação do gel de amido-água. Em seguida ocorre a sacarificação, em que o hidrolisado de amido é convertido ao produto desejado, no caso, glicose, pela glicoamilase e o processo leva cerca de 50 a 60 horas. A partir de então começa a fermentação propriamente dita, onde o caldo de glicose produzido é usado para inóculo da levedura, que converte glicose em etanol (van der Maarel *et al.*, 2002).

O presente trabalho foi desenvolvido com a utilização das enzimas amilolíticas  $\alpha$ -amilase e glicoamilase, que serão melhor abordadas a seguir.

#### 4.1 $\alpha$ -amilase

As enzimas  $\alpha$ -amilases, ou 1,4- $\alpha$ -D-glicano 4-glicanohidrolases (EC 3.2.1.1), hidrolisam as ligações  $\alpha$ 1,4 das cadeias de amilose ou amilopectina e são incapazes de hidrolisar ligações  $\alpha$ 1,6 nos pontos de ramificação. São uma classe de endoamilases caracterizadas por atuar em vários pontos da cadeia de amido para liberação de oligossacarídeos com configuração  $\alpha$  e  $\alpha$ -dextrinas, sem necessidade de extremidades não redutoras livres (Moraes, 2004; Liu *et al.*, 2010). As  $\alpha$ -amilases são utilizadas em uma extensa variedade de processos industriais, como, processamento do amido, panificação, produção de cerveja, de álcool, de papel, de detergente, entre outros (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

Muitas dessas enzimas são termoestáveis e suportam temperaturas acima de 60°C, o que é uma vantagem para utilização industrial, já que muitos processos são conduzidos a temperaturas altas. As  $\alpha$ -amilases termoestáveis possuem temperatura ótima entre 60°C e 100°C, dependendo do micro-organismo da qual é produzido (Prakash & Jaiswal, 2010).

No geral,  $\alpha$ -amilases são formadas por uma subunidade constituída de três domínios: A, B e C. O domínio A é o domínio catalítico e consiste em um barril N-terminal  $(\beta/\alpha)_8$ , chamado barril TIM, que conecta os outros dois domínios. Essa estrutura possui quatro regiões altamente conservadas e relacionada ao sítio ativo de todas as  $\alpha$ -amilases. O domínio B é bem variado entre as  $\alpha$ -amilases, é ele que forma grande parte da fenda de ligação ao substrato e presume-se ter influência na especificidade a diferentes substratos. O domínio C consiste nos resíduos de aminoácidos da região C-terminal ligado ao domínio A (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006; Prakash & Jaiswal, 2010; van der Maarel *et al.*, 2002).

As  $\alpha$ -amilases são produzidas por uma grande quantidade de seres vivos, sendo encontradas em plantas, animais e micro-organismos. Dentre essas, as mais utilizadas na indústria são as de origem bacteriana e fúngica, devido ao menor tempo e espaço necessário para produção, facilidade na modificação e otimização dos processos (Prakash & Jaiswal, 2010). Entre as bactérias, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* são bons produtores de  $\alpha$ -amilase e suas enzimas são amplamente aplicadas a processos biotecnológicos (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006; Prakash & Jaiswal, 2010).

A  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*, codificada pelo gene *amyE*, é a utilizada nesse trabalho, porém em uma forma reduzida da proteína. Em estudos anteriores, notou-se que a  $\alpha$ -amilase isolada por Souza (1986) não possuía a região codificadora dos últimos 171 aminoácidos quando comparada à proteína original. Essa porção havia sido substituída por uma sequência codificadora de 33 resíduos de aminoácidos sem nenhuma relação com a proteína nativa (Valencia, 1990). Por manter a parte funcional intacta e apresentar alta atividade hidrolítica sobre o amido solúvel, a proteína truncada continuou a ser utilizada em trabalhos subsequentes.

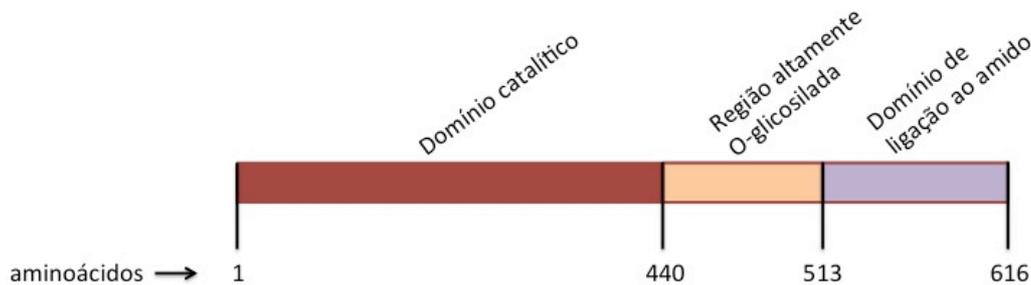
No trabalho de Marco *et al.* (1996), essa  $\alpha$ -amilase reduzida de *B. subtilis* foi expressa em *E. coli*, purificada e caracterizada. Foi determinado que a atividade máxima da enzima é alcançada com pH 6,5 a uma temperatura de 50°C. A proteína truncada foi ainda expressa em outros micro-organismos, em *B. subtilis* (Souza, 1986), *Xanthomonas campestris* (Stripecke, 1988), *Bacillus amyloliquefaciens* (Graef, 1989), *S. cerevisiae* (Moraes *et al.*, 1995) e em *Pichia pastoris* (Arruda, 2008; Oliveira Neto, 2012).

## 4.2 Glicoamilase

As glicoamilases (GA), ou 1,4- $\alpha$ -D-glicano glicohidrolases (EC 3.2.1.3), são capazes de hidrolisar ligações  $\alpha$ 1,4 da cadeia principal do amido e ligações  $\alpha$ 1,6 nos pontos de ramificação. Elas atuam na extremidade não redutora do amido ou de oligossacarídeos e liberam monômeros de glicose (Evans *et al.*, 1990; Moraes, 2004). Essas enzimas são comercialmente importantes na fermentação alcoólica e na produção de glicose, e as mais utilizadas comercialmente são as de origem fúngica (Sauer *et al.*, 2000).

A GA de *Aspergillus niger* possui a mesma estrutura primária da GA de *Aspergillus awamori*, compartilham, assim, muitas características (Nunberg *et al.*, 1984; Boel *et al.*, 1984). A sequência completa da glicoamilase desses organismos contém um domínio catalítico, um domínio de ligação ao amido e uma região altamente O-glicosilada que conecta esses dois domínios. O domínio catalítico é formado por um barril ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> (aminoácidos 1 a 440) e uma região C-terminal que envolve esse motivo (aminoácidos 441 a 471). Essa região C-terminal também constitui a parte N-terminal da região altamente O-glicosilada (aminoácidos 441 a 512), região rica em serina e treonina. Aproximadamente, os últimos 30 resíduos de aminoácidos dessa porção (aminoácidos 482 a 512), parte que conecta com o domínio de ligação ao amido, são altamente O-glicosilados. O domínio de ligação ao amido (aminoácidos 513 a 616) consiste em uma estrutura de barril  $\beta$  retorcido, com dois sítios de ligação ao amido em lados opostos do topo do domínio

(Svensson *et al.*, 1983; Sauer *et al.*, 2000). Um esquema dos domínios da proteína é mostrado na figura 5.



**Figura 5.** Esquema dos domínios da glicoamilase completa: domínio catalítico (440 aa), região altamente O-glicosilada (72 aa) e domínio de ligação ao amido (104 aa).

Ainda não se sabe exatamente a função da região altamente O-glicosilada, acredita-se que ela tenha importância na estabilidade, secreção e digestão do amido cru. O sucesso da expressão heteróloga da GA fúngica é altamente depende do padrão de glicosilação do micro-organismo hospedeiro (Fierobe *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1990).

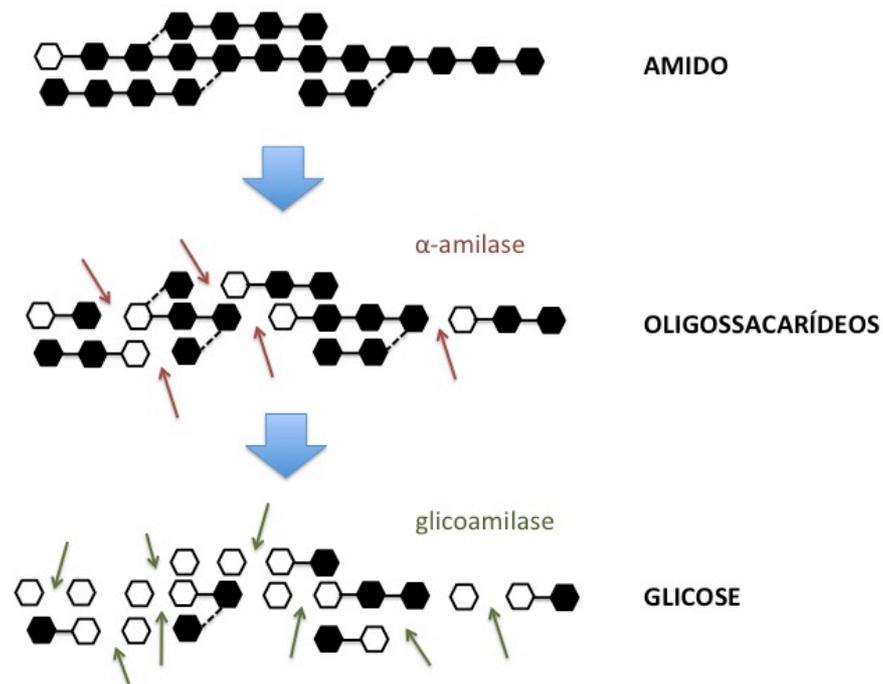
Essa enzima pode ser expressa de duas formas no fungo de origem: 1) GAI, que é a sequência completa e 2) GAI, que é a sequência sem o domínio de ligação ao amido. Apesar de GAI não ter o domínio de ligação ao amido, é uma enzima com atividade normal e é capaz de hidrolisar substratos solúveis. As duas formas são codificadas pelo mesmo gene com diferente processamento pós-transcricional (Svensson *et al.*, 1982).

Nesse trabalho é utilizada a GA de *A. awamori*. Essa enzima é codificada pelo gene *glaA*. Alcança o ótimo de atividade na temperatura entre 55°C a 60°C e pH 4,5 (Allen *et al.*, 1998; Fierobe *et al.*, 1997; Fang & Ford, 1998).

### 4.3 Coexpressão da $\alpha$ -amilase e da glicoamilase

A ação conjunta da  $\alpha$ -amilase e da glicoamilase tem grande importância na otimização da utilização do amido do meio. Por ser uma exoamilase, a glicoamilase age mais rapidamente em um substrato já previamente hidrolisado, por isso, a necessidade de se pré-tratar o amido com uma endoamilase. Já as

$\alpha$ -amilases são importantes na hidrólise inicial do amido por serem endoamilases, atuando em vários pontos da cadeia para liberação de oligossacarídeos, sem necessidade de extremidades não redutoras livres, e dessa forma aumentam a quantidade de extremidades não redutoras existentes no meio para atuação da glicoamilase (Moraes, 2004). A figura 6 ilustra a atuação conjunta dessas enzimas.



**Figura 6.** Esquema da atuação conjunta da  $\alpha$ -amilase e da glicoamilase e os produtos da hidrólise de cada enzima. Linha cheia: ligações  $\alpha$ 1,4; linha tracejada: ligações  $\alpha$ 1,6; figuras brancas: resíduos de glicose com extremidades redutoras livres.

Alguns trabalhos mostram o benefício da hidrólise do amido ser feita com as duas enzimas em conjunto. Murai *et al.* (1999) registraram crescimento mais rápido dos clones coexpressando as duas enzimas em meio contendo amido como única fonte de carbono. Shigechi *et al.* (2004-b) mostraram que clones expressando as duas enzimas produziram etanol de forma eficiente enquanto clones contendo apenas uma das duas enzimas quase não produziram etanol.

A imobilização de enzimas é uma técnica utilizada para o desenvolvimento de colunas de transformação onde o substrato solúvel entra por uma extremidade e o produto sai pela outra extremidade. Nesses sistemas o produto é raramente contaminado com as enzimas diminuindo as etapas de purificação.

Pereira *et al.* (2002) *apud* Moraes (2004) demonstrou que ao imobilizar a  $\alpha$ -amilase purificada em capilares de vidro aumentou-se a estabilidade da enzima e que esta foi reutilizada por 45 dias, além de hidrolisar o amido em menor tempo que no processo convencional com a enzima em solução. Esse teste mostra a potencialidade da utilização de enzimas imobilizadas, e, no caso do presente trabalho, pretende-se ainda imobilizar as enzimas amilolíticas na parede celular da *S. cerevisiae*, que além dessas vantagens, mantém o sistema em constante renovação, pela própria levedura, e não necessita de etapas de purificação enzimática.

O presente trabalho procura o melhoramento dessa técnica de imobilização de enzimas na parede celular da levedura para aperfeiçoar a produção de etanol a partir de amido. Para isso, testa enzimas que apresentaram boas atividades hidrolíticas de origens diferentes das já utilizadas em outros trabalhos. Além disso, também é utilizada uma linhagem de *S. cerevisiae* não usada ainda, a MFL, que é uma boa secretora e boa produtora de etanol.

## OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GERAL

- Construção de um vetor para expressão das enzimas recombinantes  $\alpha$ -amilase e glicoamilase imobilizadas na parede celular da levedura *S. cerevisiae*.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção da fusão gênica entre a região correspondente à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina com o gene da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* truncado ou com o cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori*;
- Clonagem de cada uma das construções em vetor de expressão e inserção em células da linhagem MFL de *S. cerevisiae*;
- Seleção dos transformantes apresentando halos de hidrólise de amido em placa;
- Dosagem da atividade amilolítica associada às células e no sobrenadante em meio líquido.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. MATERIAL

#### 1.1 Micro-organismo

##### Bactérias

*Escherichia coli* XL10-GOLD (Stratagene): *endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]*.

##### Leveduras

*Saccharomyces cerevisiae* linhagem MFL: Apresenta o gene *LEU2* da linhagem industrial FTPT472 interrompido (*leu2*), que permite a seleção auxotrófica com leucina (Fitzsimon, 2004).

*Saccharomyces cerevisiae* linhagem CENPK2: *MATα/a ura3-52/ura3-52; leu2-3,112/leu1-2,112; trp1-289/trp1-289; his3Δ1/his3Δ1; MAL2-8<sup>C</sup>/MAL2-8<sup>C</sup>; SUC2/SUC2*.

#### 1.2 Enzimas

##### Enzimas de restrição

**Tabela 4.** Enzimas de restrição utilizadas.

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão	Temperatura de incubação	Procedência
<i>EcoRI</i>	G <sup>A</sup> AATTC	NEB Buffer <i>EcoRI</i>	37°C	New England Biolabs
<i>HindIII</i>	A <sup>A</sup> AGCTT	NEB 2 Buffer	37°C	New England Biolabs
<i>BglII</i>	A <sup>A</sup> GATCT	NEB 3 Buffer	37°C	New England Biolabs

**Enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs).**

**RNase A:**

RNase A (*DNase-free*) 10 mg/mL

Acetato de sódio pH4,8 50 mM

Fervida em banho-maria por 10 minutos.

**Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific).**

**Enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen).**

**1.3 Marcadores moleculares**

**Marcadores de DNA:**

- Marcador  $\lambda$ EcoRI/HindIII (ver em Anexo 1 figura 36);
- Marcador 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs). (ver em Anexo 1 figura 37)

**Marcadores de proteína:**

- Marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific). (ver em Anexo 1 figura 38)

**1.4 Kits**

**Purificação de banda do gel de agarose**

- Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

**MINI PREP para sequenciamento**

- Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega).

**Purificação de produto de PCR**

- Kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

### **Dosagem de glicose**

- Kit glicose monoreagente (Bioclin).

## **1.5 Ferramentas de bioinformática**

**Busca de sequências:** GenBank (NCBI) - <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>

**Análise de restrição:** NEBcutter V2.0 –  
<<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>>

**Alinhamento de sequências:** BLAST (NCBI) –  
<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

**Obtenção de sequência complementar e/ou reversa:** Molecular Toolkit – <<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/index.html>>

**Análise de sequenciamento:**  
<<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>>

**Análise de eletroferogramas:** Programa Chromas Lite versão 2.01,  
Technelysium Pty Ltd.

**Análises estatísticas:** Programa SPSS 20.0

## **1.6 Oligonucleotídeos**

Todos os oligonucleotídeos listados abaixo foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Inc. - EUA).

### **1.6.1 Oligonucleotídeos utilizados para $\alpha$ -amilase:**

Os oligonucleotídeos apresentados na tabela 5 foram desenhados com base na sequência do gene *amyE* de *B. subtilis* (nº de acesso no GenBank:

K00563). Os sítios de *EcoRI* e *HindIII*, adicionados à sequência da  $\alpha$ -amilase, aparecem sublinhados, em azul é mostrado o códon de iniciação e em laranja é mostrado o códon de terminação da tradução.

**Tabela 5.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene da  $\alpha$ -amilase.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Direção	Função
AMYF	GCGAATTCGAAGCTTATGTTTGAAAAACGATTCAAA <i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	Foward	Para amplificação e sequenciamento de todos os clones contendo o gene da $\alpha$ -amilase
AMR	CTGAATTCATTGAAAGAATGGACTGCCCC <i>EcoRI</i>	Reverso	Para amplificação e sequenciamento dos clones com o gene da $\alpha$ -amilase fusionado ao gene da $\alpha$ -aglutinina
AMYSTOP	CTGAATTCATCAATTGAAAGAATGGACTGCCCC <i>EcoRI</i>	Reverso	Para amplificação e sequenciamento do clone secretor de $\alpha$ -amilase

### 1.6.2 Oligonucleotídeos utilizados para glicoamilase:

Os oligonucleotídeos desenhados com base na sequência do cDNA do gene *glaA* de *A. awamori* (nº de acesso no GenBank: K02465) são mostrados na tabela 6. Os sítios de *EcoRI* e *HindIII* aparecem sublinhados e em azul é mostrado o códon de iniciação da tradução.

**Tabela 6.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene da glicoamilase.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Direção	Função
GLAF	GAATTCGAAGCTTATGTCGTTCCGATCTCTACTC <i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>	Foward	Para amplificação e sequenciamento de todos os clones contendo o cDNA da glicoamilase
GLAR1	GAATTCGCCAGGTGTCAGTCACCGT <i>EcoRI</i>	Reverso	Para amplificação e sequenciamento do ponto final do fragmento gla1 do cDNA da glicoamilase
GLAR2	GAATTCGGTGGGAGTGGTACAGGAGGT <i>EcoRI</i>	Reverso	Para amplificação e sequenciamento do ponto final do fragmento gla2 do cDNA da glicoamilase
GLAR3	GAATTCAGTGGGGGTAGCCGTCGTAGT <i>EcoRI</i>	Reverso	Para amplificação e sequenciamento do ponto final do fragmento gla3 do cDNA da glicoamilase

### 1.6.3 Oligonucleotídeos utilizados para $\alpha$ -aglutinina:

Os oligonucleotídeos apresentados na tabela 7 foram desenhados com base na sequência do gene *AG $\alpha$ 1* de *S. cerevisiae* (Lipke *et al.*, 1989). Os sítios de *EcoRI* e *HindIII* adicionados aparecem destacados.

**Tabela 7.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento da porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Direção	Função
alfaGF	GAATTCAGCGCCAAAAGCTCTTTTATC <i>EcoRI</i>	Forward	Para amplificação e sequenciamento de todos os clones contendo o gene de interesse fusionado à porção final da $\alpha$ -aglutinina
alfaGR	AAGCTTTTAGAATAGCAGGTACGACAAAAG <i>HindIII</i>	Reverso	Para amplificação e sequenciamento dos clones contendo o fragmento de 975 pb da $\alpha$ -aglutinina
Aglut-1	TAGAATAGATACTGGTTTGTGCA	Reverso	Para sequenciamento da porção final da $\alpha$ -aglutinina
Aglut-3	ATGTATTAGATGTTGGCACAGA	Reverso	Para sequenciamento da porção final da $\alpha$ -aglutinina
AGLUT-R	CAAGCTTTGATTATGTTCTTTCTATTT <i>HindIII</i>	Reverso	Para sequenciamento do fragmento de 1,4 kb da $\alpha$ -aglutinina

## 1.7 Vetores

**Tabela 8.** Vetores utilizados em *E. coli* e *S. cerevisiae*.

Vetor	Tipo de vetor	Tamanho	Características	Origem	Observações
pGEM <sup>®</sup> -T	Vetor de clonagem	3,0 kb	Vetor de clonagem de produto de PCR com <i>a-tailing</i>	Promega	Ver em anexo 2 figura 39
pIJ2925	Vetor de clonagem	2,7 kb	Vetor de clonagem com gene de resistência a ampicilina	Janssen & Bibb (1993)	Ver em anexo 2 figura 40
YEp351PGK	Vetor de expressão em levedura	7,5 kb	Gene de seleção dominante (ampicilina) e auxotrófica ( <i>LEU2</i> )	Moraes <i>et al.</i> (1995)	Ver em anexo 2 figura 41
pABC1	Vetor de expressão em bactéria	9,7 kb	Contém o gene da $\alpha$ -amilase reduzida de <i>B. subtilis</i> clonado	Souza (1986)	Ver em anexo 2 figura 42
pPG	Vetor de expressão em levedura	9,4 kb	cDNA da glicoamilase clonado no vetor YEp351PGK	Moraes <i>et al.</i> (1995)	Ver em anexo 2 figura 43
pPB-G	Vetor de expressão em levedura	10,9 kb	Gene da $\alpha$ -amilase e o cDNA da glicoamilase clonados no vetor YEp351PGK	Moraes <i>et al.</i> (1995)	Ver em anexo 2 figura 44

## 1.8 Meios de cultura

### 1.8.1 Meios de cultura para bactéria

- Meio LB (Luria-Bertani)

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

O pH foi ajustado para 7,2 com solução de NaOH e esterilizado por autoclave.

- Meio LB-Ágar

Meio LB adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

- Meio SOB (para preparo de célula competente)

Triptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,06% (p/v)
KCl	0,05% (p/v)
MgCl <sub>2</sub>	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM

O meio foi autoclavado, com exceção das soluções de MgCl<sub>2</sub> e do MgSO<sub>4</sub>, que foram feitas em separado e adicionadas ao meio após a esterilização. A solução contendo 1 M de MgCl<sub>2</sub> e 1 M de MgSO<sub>4</sub> foi esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm.

### 1.8.2 Meio de cultura para levedura

- Meio YPD (Meio extrato de levedura peptona glicose)

Extrato de levedura	1% (p/v)
---------------------	----------

Peptona	2% (p/v)
---------	----------

Glicose	2% (p/v)
---------	----------

O meio foi esterilizado por autoclave.

- Meio YPD-ágar

Meio YPD adicionado de ágar 2% (p/v) antes de ser autoclavado.

- SD (Meio mínimo com glicose)

YNB 20x	1x
---------	----

Tampão Asp-Glu pH 5,5 20x	1x
---------------------------	----

Glicose 20% (p/v)	2% (p/v)
-------------------	----------

Os materiais foram preparados separadamente e diluídos no volume necessário de água destilada previamente esterilizada por autoclave. O preparo das soluções YNB 20x e tampão Asp-Glu pH 5,5 20x está descrito na seção 1.22 de Material e métodos.

- SD-ágar (Meio mínimo com glicose e ágar)

Meio SD adicionado de ágar 2% (p/v). Solução de ágar 4% preparada previamente e esterilizada por autoclave, também foi diluído em água destilada estéril junto com os outros materiais.

- SD-ágar amido  
Meio mínimo adicionado de 1% de amido (Merck). Amido é adicionado ao ágar antes da esterilização por autoclave.
- SD com aminoácidos  
Meio mínimo adicionado de histidina, triptofano e uracila, todos na concentração final de 20 µg/mL. As soluções de aminoácidos estéreis foram adicionados após esterilização do meio por autoclave.
- SD-ágar com aminoácidos  
Meio mínimo adicionado de ágar 2% e histidina, triptofano e uracila, todos na concentração final de 20 µg/mL. Os aminoácidos estavam estéreis e foram adicionados após a esterilização do meio.

### 1.9 Soluções para preparo de célula de bactéria competente

- Tampão de transformação I (100 mL de solução)

RbCl	1,2 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,99 g
Acetato de potássio 1 M pH 7,5	3 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glicerol	12 mL

O pH da solução foi ajustado para 5,8 com ácido acético e depois filtrada com membrana de 0,22µm. Para o preparo da solução de acetato de potássio, o acetato foi diluído em água na concentração final de 1 M com pH ajustado para 7,5 com ácido acético glacial e filtrado em membrana de 0,22 µm para esterilizar.

- Tampão de transformação II (100 mL de tampão)

MOPS 1 M pH 6,8	2 mL
RbCl	0,12 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,1 g
Glicerol	12 mL

O pH da solução foi ajustado para 6,8 com NaOH e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm . Para a solução MOPS, o MPOS foi diluído em água na concentração final de 1 M com pH ajustado para 6,8 com NaOH e filtrado em membrana de 0,22 µm para esterilizar.

### 1.10 Antibiótico

#### Ampicilina

Ampicilina dissolvida em água miliQ na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração.

### 1.11 Soluções para extração de DNA plasmidial por lise alcalina (bactéria)

- Solução I (TE)

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
Diluídos em água destilada.	

- Solução II

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

Dissolvidos em água destilada. Solução preparada para uso imediato.

- Solução III

Acetato de sódio	3 M
------------------	-----

Acido acético 2 M  
 pH 4,8  
 Dissolvidos em água destilada.

- Clorofane

Fenol equilibrado 50% (v/v)  
 Clorofórmio 50% (v/v)

- Álcool 70%

Álcool 100% (Merck) diluído em água destilada.

### 1.12 Análise de DNA em gel de agarose

- Tampão Tris-Acetato EDTA (TAE) 50X

Tris-Acetato 2 M  
 EDTA pH 8,0 50 mM  
 Dissolvidos em água destilada e pH ajustado para 8,0.

- Tampão de amostra para gel de agarose 10X

TAE 20X 50% (v/v)  
 Glicerol 30% (v/v)  
 Azul de bromofenol 0,25% (p/v)  
 Dissolvidos em água miliQ.

- Brometo de Etídio (EtBr)

Brometo de etídio foi dissolvido em água destilada na concentração de 10 mg/mL.

### 1.13 Precipitação de DNA

- Solução I (TE)

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
-----------------	-------

EDTA	1 mM
------	------

Diluídos em água destilada.

- Clorofane

Preparo descrito no item 1.11 de Material e métodos.

- Clorofil

Álcool Isoamílico	1 parte
-------------------	---------

Clorofórmio	24 partes
-------------	-----------

Equilibrado com TE.

- Acetato de sódio 3 M pH 5,0

- Etanol 70%

Preparo descrito no item 1.11 de Material e métodos.

### 1.14 Transformação de levedura

- Tampão de transformação

Acetato de lítio 2 M	0,2 M
----------------------	-------

DTT 1M	100 mM
--------	--------

PEG 3000 50% (p/v)	40% (p/v)
--------------------	-----------

O PEG 3000 foi pesado e diluído em água na concentração final de 50% (p/v) e autoclavado para esterilizar. As outras soluções foram preparadas em concentrações maiores e filtradas com membrana de 0,22 µm.

### 1.15 Soluções para análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

- Tampão de amostra desnaturante para gel de poliacrilamida 2x

Tris-HCl pH 6,8	200 mM
SDS	4% (p/v)
$\beta$ -mercaptoetanol	4% (p/v)
Glicerol	20% (p/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

- Tampão de corrida – Tris-Glicina 5x

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

- Gel separador 12,5% (1 gel pequeno)

Acrilamida:Bis-acrilamida (29,2:0,8)	2,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	0,94 mL
SDS 10% (p/v)	75 $\mu$ L
APS 10% (p/v)	56,25 $\mu$ L
TEMED (Gibco BRL)	8 $\mu$ L
Água destilada	3,63 mL

- Gel concentrador 5% (1 gel pequeno)

Acrilamida:Bis-acrilamida (29,2:0,8)	0,625 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	50 $\mu$ L
APS 10% (p/v)	37,5 $\mu$ L
TEMED (Gibco BRL)	4 $\mu$ L
Água destilada	2,75 mL

### 1.16 Soluções para coloração com prata

- Solução de fixação I:

Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)
Formaldeído	0,05% (v/v)
Água destilada para completar volume.	

- Solução de fixação II:

Etanol	50% (v/v)
Água destilada para completar volume.	

- Solução de sensibilização:

Tiosulfato de sódio	0,02% (p/v)
Dissolvido em água destilada.	

- Solução de prata:

Nitrato de prata	0,2% (p/v)
Formaldeído	0,075% (v/v)
Dissolvido em água destilada.	

- Solução de revelação:

Carbonato de sódio	6% (p/v)
Formaldeído	0,05% (v/v)
Dissolvido em água destilada.	

### 1.17 Zimograma

- Tampão de amostra não desnaturante 2x

Tris-HCl pH 6,8	200 mM
SDS	4% (p/v)

Glicerol	20% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Dissolvido em água destilada	

### 1.18 Soluções para coloração do zimograma

- Tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0
- Solução de amido 0,5%  
Amido solúvel (Synth) diluído diretamente em tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 na concentração de 0,5% (p/v).
- Reagente de Fuwa

Iodo 1% (p/v)	1 parte
Iodeto de potássio 10% (p/v)	1 parte
Água destilada	3 partes

Para a solução de iodo, o iodo (Reagen) foi dissolvido em etanol 100%, e para solução de iodeto de potássio, o iodeto de potássio (Grupo Química) foi dissolvido em água. Reagente de FUWA foi preparado para uso imediato.

### 1.19 Reagentes para atividade enzimática

- Solução de amido 0,5%  
Amido (Merck) dissolvido em água destilada.
- Tampão acetato de sódio 0,5 M pH 6,0 ( $\alpha$ -amilase)
- Tampão acetato de sódio 0,5M pH 4,5 (glicoamilase)
- Ácido acético 1M  
Ácido acético (J. T. Baker) diluído em água destilada na concentração de 1M.

- Reagente de Fuwa ( $\alpha$ -amilase)  
Preparo descrito no item 1.18.

### **1.20 Soluções para teste de viabilidade celular**

- Solução de tween 80  
Tween 80 (Vetec) diluído em água destilada na concentração final de 0,001% (v/v).

### **1.21 Soluções de Aminoácidos**

- Histidina  
Histidina (Sigma-Aldrich) diluída em água na concentração final de 1% (p/v) e esterilizada por autoclave.
- Triptofano  
Triptofano (Sigma-Aldrich) diluído em água na concentração final de 1% (p/v) e esterilizada por autoclave.
- Uracila  
Uracila (Sigma-Aldrich) diluída em água na concentração final de 0,2% (p/v) e esterilizada por autoclave.

### **1.22 Outras soluções**

- YNB 20x  
3,4 g de YNB e 10 g de sulfato de amônio dissolvidos em água destilada, esterilizado por filtração com membrana de 0,22  $\mu$ m.

- Tampão Asp-Glu pH 5,5 20x  
Ácido aspártico 8% (p/v) e ácido glutâmico 8% (p/v) dissolvidos em água destilada e pH ajustado para 5,5 com HCl. Solução esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm.

## 1. MÉTODOS

### 2.1 Amplificação dos genes por PCR

As reações de PCR continham: tampão de reação 1X; dNTP 0,2 M; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (*forward* e reverso); 10 ng de DNA modelo e 1 unidade da Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific).

O preparado foi colocado em termociclador à 98°C de temperatura inicial por 30 segundos, seguido de 30 ciclos nas seguintes condições: 98°C por 10 segundos, temperatura de anelamento específica para os oligonucleotídeos utilizados por 20 segundos e 72°C de temperatura de extensão pelo tempo de 30 segundos por kb de fragmento a ser amplificado, depois mais 72°C por 10 minutos. As concentrações e condições de reação foram seguidas como indicado pelo fabricante.

Para amplificação da região de 975 pb da porção final do gene da α-aglutinina foram utilizados os oligonucleotídeos alfaGF e alfaGR mostrados na tabela 7. O DNA que serviu como modelo foi o DNA total da linhagem de *S. cerevisiae* S288C e a temperatura de anelamento foi 63°C.

O gene da α-amilase truncada de *B. subtilis* foi amplificado com os oligonucleotídeos AMYF e AMYR, mostrados na tabela 5, utilizando como molde o gene dessa enzima clonado no vetor pABC1 (Souza,1986). Para a construção do clone secretor de α-amilase, o gene foi amplificado com os oligonucleotídeos AMYF e AMYSTOP, mostrados na tabela 5, utilizando o mesmo DNA como modelo. A temperatura de anelamento utilizada foi 62°C para as duas amplificações.

O cDNA da glicoamilase de *A. awamori* foi amplificado a partir do plasmídeo pPG (Moraes *et al.*, 1995), que continha o cDNA da forma completa

da glicoamilase. O oligonucleotídeo *forward* foi o mesmo para todos os diferentes fragmentos amplificados de glicoamilase (gla1, gla2 e gla3). O oligonucleotídeo reverso foi específico: GLAR1 para o fragmento gla1, GLAR2 para o fragmento gla2 e GLAR3 para o fragmento gla3, mostrado na tabela 6. A temperatura de anelamento utilizada foi 63°C para os três sistemas.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e com o auxílio de marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs) ou com  $\lambda$ *EcoRI/HindIII*.

## 2.2 Análise em gel de agarose

As digestões e os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Os géis foram preparados na concentração final de 0,8% (p/v) de agarose dissolvida em tampão de corrida TAE 1X e adicionado brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra na concentração final de 1X e aplicadas no gel. Após a corrida, os fragmentos de DNA foram analisados com a exposição do gel a luz ultravioleta.

## 2.3 Preparo de produto de PCR para ligação no vetor de clonagem

Os produtos de PCR foram clonados no vetor de clonagem pGEM<sup>®</sup>-T (Promega). Para isso foi necessário adicionar uma adenina à extremidade do fragmento de PCR. Foi feito um sistema para cada fragmento amplificado contendo aproximadamente 30 ng do DNA, 0,2 mM de dATP, tampão para *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 1X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os sistemas foram deixados 30 minutos em um banho a 70°C.

## 2.4 Ligação de fragmentos de DNA a um vetor

Para ligação de fragmentos de DNA purificados a um vetor, foram feitos sistemas de ligação mantendo a proporção de vetor e inserto entre 1:3 e 1:5.

Foi utilizado 1U da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) e o tampão de ligase fornecido pelo fabricante na concentração final de 1X para cada sistema de ligação. Os sistemas foram incubados em banho a 16°C por 16 horas seguindo as recomendações do fabricante.

## 2.5 Preparo das células bacterianas para choque térmico

Células de *E. coli* da linhagem XL10 gold foram recuperadas do estoque congelado a -80°C em uma placa de meio LB ágar, que foi incubada em uma estufa a 37°C por 24 horas. Uma colônia da placa foi inoculada em 10 mL de meio SOB e crescida a 37°C com agitação durante a noite. Foi inoculado 2 mL desse pré-inóculo em 100 mL de meio SOB, que foi incubado a 37°C com agitação até atingir a OD<sub>600</sub> de 0,3. O frasco foi incubado no banho de gelo e álcool por 15 minutos para parar o crescimento e a seguir as células foram coletadas a 3000 g por 5 minutos a 4°C. Após descartar o meio, as células foram ressuspensas em 32 mL de tampão de transformação I e incubadas no gelo por mais 15 minutos. Centrifugou-se a amostra por 3000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram gentilmente ressuspensas em 6 mL de tampão de transformação II. Por último, foram feitas alíquotas de 100 µL em tubos previamente gelados e as células foram imediatamente congeladas em gelo seco e estocadas a -80°C para utilização posterior.

## 2.6 Transformação de *E. coli* por choque térmico

Utilizou-se o protocolo de transformação de *E. coli* por choque térmico de Cohen *et al.* (1972) com adaptações.

Uma alíquota de 100 µL de células competentes, linhagens XL10 gold, previamente preparadas foi retirada do freezer a -80°C e deixada em gelo até que descongelasse, foi utilizada uma alíquota para cada sistema de ligação. Em seguida, adicionou-se 5 µL ou 10 µL do sistema de ligação às células, que foram incubados em gelo por 30 minutos.

Após essa etapa, o sistema foi submetido a choque térmico de 42°C por 90 segundos, seguido de adição de 500 µL de meio LB líquido e incubados a 37°C por 1 hora.

Cerca de 150 µL de células transformadas foram semeadas em cada placa de petri contendo meio LB ágar com ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. Foram feitas duas placas por sistema de ligação. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante a noite.

## **2.7 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep)**

O protocolo de extração de DNA plasmidial de *E.coli* por lise alcalina foi baseado em Birboim & Dolly (1979) com modificações.

Colônias selecionadas das placas de transformação foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina na concentração final de 100 µg/mL e crescidas a 37°C sob agitação (200 – 250rpm) por cerca de 18 horas.

As células foram coletadas através de centrifugação a 8000 g por 2 minutos e descartou-se o sobrenadante. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de TE (solução I) e foram adicionados 360 µL de solução II, seguido de mistura por inversão do tubo e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Após essa etapa, foi feita a adição de 300 µL de solução III, incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, foram adicionados 750 µL de isopropanol (J. T. Baker) e o tubo foi invertido várias vezes, seguido de centrifugação a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de TE (solução I). Foram adicionados 100 µL de clorofane e, então, os tubos foram agitados vigorosamente. Centrifugou-se a amostra a 6.000 g por 5 minutos, e a fase aquosa (fase superior) foi retirada e transferida para um novo tubo para continuar o processo. Foram adicionados 750 µL de etanol 100% (Merck) gelado e após homogeneização os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos. O precipitado foi lavado (sem ressusensão) com 1 mL de etanol 70% gelado e novamente sedimentado a 10.000 g por 2 minutos. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuspenso em 30 µL de TE (solução I)

contendo RNase A (1  $\mu$ L de RNase 10mg/mL para 100  $\mu$ L de TE) e incubado à 37°C por 30 minutos. O DNA plasmidial foi estocado a -20°C até o uso.

Para extração de DNA para sequenciamento foi utilizado o kit Wizard® plus SV Minipreps DNA purification system (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

## **2.8 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina em média escala (midiprep)**

Para obtenção de grande quantidade de material genético para transformação de levedura, foi feita extração de DNA plasmidial de *E.coli* também baseado no protocolo de Birboim & Dolly (1979) com modificações e em maior escala.

Um clone de cada um dos vetores preparados para inserção em levedura foi crescido em um inóculo de 50 mL de meio LB líquido com ampicilina na concentração final de 100  $\mu$ g/mL e crescidos a 37°C sob agitação (200 – 250rpm) por cerca de 18h.

Cada cultura de células foi sedimentada a 8.000 *g* por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante logo depois. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 2 mL de TE (solução I). Foi adicionado 4 mL de solução II, homogeneizado invertendo-se o tubo várias vezes e incubados a temperatura ambiente por, no máximo, 5 minutos. Após essa etapa, foram adicionados 3 mL de solução III, incubados em gelo por 5 minutos e sedimentados a 10.000 *g* por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 9 mL de isopropanol (J. T. Baker) – 1 volume – e centrifugado a 10000 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensão em 500  $\mu$ L de TE (solução I) e transferido para um novo tubo. Adicionou-se igual volume (500 $\mu$ L) de clorofane, que foi agitado vigorosamente. A solução foi sedimentada a 6.000 *g* por 5 minutos e a fase aquosa (fase superior) transferida para outro tubo, repetiu-se o mesmo procedimento com clorofane mais uma vez. À fase aquosa final, transferida para um novo tubo, foi adicionado 750  $\mu$ L de etanol 100% (Merck) e centrifugada a 10.000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com etanol 70%,

sem ressuspensão, e novamente sedimentado a 10.000 g por 2 minutos. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de água miliQ, sem adição de RNase.

## **2.9 Análise do DNA por digestão com enzimas de restrição**

Para cada DNA analisado foi usado uma enzima de restrição específica. Cada digestão foi feita seguindo as instruções do fabricante da respectiva enzima. Foi utilizado entre 100 ng e 500 ng de DNA a ser analisado, quantidade de enzima e tampão apropriadas e, quando era necessário, BSA (*bovine serum albumin*) na concentração final de 1X. Os sistemas de digestão eram deixados no banho na temperatura específica de cada enzima por 2 a 3 horas. Os parâmetros variavam de acordo com o material a ser digerido e a eficácia da enzima.

## **2.10 Purificação e eluição de fragmentos de DNA**

Após a digestão do plasmídeo contendo o fragmento de interesse com as enzimas apropriadas, o sistema de digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos de interesse foram cortados do gel com uma lâmina de bisturi de aço e eluídos do gel com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante.

## **2.11 Precipitação de DNA**

Foi adicionado TE ao DNA a ser precipitado para completar o volume para 100 µL. Foi adicionado 100 µL de clorofane e o tubo foi agitado vigorosamente. A amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa (fase superior) foi separada e transferida para um tubo novo e adicionou-se mais 50 µL de TE ao clorofane restante. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. As duas fases aquosas foram unidas em um tubo e foi feita uma extração com clorofil. Foi adicionado 100 µL de clorofil aos 150 µL da fase aquosa previamente separada. O sistema foi misturado

vigorosamente e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tudo. Após essa etapa, foi adicionado acetato de sódio na concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. A amostra foi incubada durante a noite a -20°C. Após a incubação, centrifugou-se a amostra a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 1 mL de etanol 70% ao precipitado e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco por exposição ao ar. O precipitado foi ressuscitado em 15 µL de água miliQ e estocado a -20°C.

## 2.12 Transformação de levedura

Células de *S. cerevisiae* da linhagem MFL foram recuperadas do estoque congelado a -80°C em uma placa de meio YPD ágar, que foi incubada em uma estufa a 30°C por 48 horas. Uma colônia isolada da placa foi inoculada em 40 mL de meio YPD líquido e o inóculo foi crescido em uma incubadora orbital a 30°C de temperatura durante a noite (aproximadamente 24h).

Para cada sistema que foi transformado, 200 µL da cultura em fase estacionária foi centrifugada em um tubo estéril por 1 minuto na máxima velocidade. Descartou-se o meio de cultura e as células foram ressuscitadas em 100 µL de tampão de transformação. Foi adicionado de 1 µg a 3 µg de DNA plasmidial de cada sistema. As suspensões de células foram incubadas em banho a 45°C por 1 hora. Foi adicionado 1 mL de água miliQ estéril, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos na máxima velocidade e os sobrenadantes foram descartados. As células transformadas foram ressuscitadas em 400 µL de água e semeadas em placa de meio seletivo (SD-ágar), 2 placas para cada sistema. As placas foram deixadas na estufa a 30°C por 72 horas.

## 2.13 Análise dos halos de hidrólise em placa

Colônias selecionadas foram transferidas para uma nova placa de meio mínimo contendo amido (SD-ágar amido) e crescidas a 30°C por 2 dias (α-

amilase) e por 5 dias (glicoamilase). Para revelação dos halos de hidrólise de amido as placas foram coradas com vapor dos grânulos de iodo (Reagen) colocados na tampa.

#### **2.14 Teste de atividade em meio líquido**

Os pré-inóculos foram feitos a partir de colônias cultivadas em placas de meio mínimo (SD-ágar) por 2 dias em uma estufa a 30°C. Os pré-inóculos foram feitos em 5 mL de meio mínimo (SD líquido) e crescidos por 24 horas a 30°C sob agitação. Quando foi feito o teste de atividade com a levedura CENPK2, foram adicionados aminoácidos ao meio mínimo (SD com aminoácidos).

A quantidade necessária de cada um dos pré-inóculos foram inoculados em 50 mL de meio SD líquido para uma OD<sub>600</sub> inicial de 0,03. As culturas foram crescidas com agitação de 200 rpm a 30°C por 144 horas (6 dias) para  $\alpha$ -amilase e 120 horas (5 dias) para glicoamilase. Alíquotas foram retiradas para análises de atividade enzimática, viabilidade celular e determinação da densidade celular (OD<sub>600</sub>) em intervalos de 24 horas.

O teste de atividade de  $\alpha$ -amilase foi feito segundo o método de Fuwa (1954). Para atividade associada às células, 1 mL da cultura foi centrifugado a 8.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi reservado em outro tubo. As células foram lavadas com 1 mL de água destilada e centrifugado a 8.000 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 1 mL de água destilada. Para reação enzimática foi utilizado de a 60  $\mu$ L de sobrenadante ou suspensão de células misturados a 100  $\mu$ L de solução de amido 0,5% e 40  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 6,0 para  $\alpha$ -amilase ou tampão acetato de sódio 0,5 M pH 4,5 para glicoamilase. Foram feitas três replicatas para cada reação. Para o branco da reação foi adicionado 60  $\mu$ L de água destilada no lugar das amostras. As reações foram incubadas em banho a 40°C por 30 minutos no caso do teste de  $\alpha$ -amilase e 60 minutos para o teste de glicoamilase. Nos pontos em que a atividade era muito alta e não era possível mensurá-la de acordo com o descrito acima, diluiu-se a enzima ou o tempo de incubação foi diminuído, os valores foram corrigidos nos cálculos finais. Para interromper a

reação de  $\alpha$ -amilase foi adicionado 200  $\mu$ L de ácido acético 1M. A coloração do amido não hidrolisado foi feita ao adicionar-se 200  $\mu$ L de reagente de Fuwa preparada na hora, e antes da leitura, mais 4,4 mL de água destilada foram adicionados. Para glicoamilase, a reação foi parada por fervura por 5 minutos e resfriadas até a temperatura ambiente. Uma alíquota de 10  $\mu$ L foi retirada e misturada a 1 mL de reagente de glicose oxidase do kit de dosagem de glicose (Bioclin). Essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 10 minutos, como instruções do fabricante. As amostras foram aliqüotadas em uma placa de leitura de 96 poços transparente e lidas em um espectofotômetro de placa (EnSpire 2300 Multilabel Reader da PerkinElmer) a 660 nm para  $\alpha$ -amilase e 510 nm para glicoamilase.

O teste de atividade para  $\alpha$ -amilase foi feito em triplicata e o teste de atividade para glicoamilase foi feito em duplicata.

Uma unidade de  $\alpha$ -amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 0,1 mg de amido por minuto, sob as condições de ensaio.

Uma unidade de glicoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, sob as condições de ensaio acima citadas.

## 2.15 Teste de viabilidade celular

Para a verificação da viabilidade celular, alíquotas da cultura foram diluídas em solução de tween 80 e cultivadas em placas de meio mínimo contendo amido (SD-ágar amido), incubadas a 30°C por 48 horas, para  $\alpha$ -amilase, e por 96 horas, no caso das placas de glicoamilase, e as colônias contadas para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). As placas foram coradas com vapor de iodo para verificar se alguma colônia viável não produziu halo de hidrólise no amido. Foram feitas diluições entre  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$ , de modo que fossem semeadas no máximo 100 células por placa. Apenas no primeiro tempo coletado (tempo 0 hora) a diluição foi de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ .

## 2.16 Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Transformantes produtores de amilases selecionados foram cultivados em 50 mL de meio mínimo (SD líquido) sob agitação de 200 rpm a 30°C. A produção enzimática foi determinada junto com a curva de crescimento, até que alcançassem a atividade máxima no sobrenadante. Nesse ponto o cultivo foi interrompido e a cultura centrifugada a 8.000 rpm por 5 minutos para retirada das células. O sobrenadante foi concentrado em um centriprep de 12 a 15 mL (Amicon da Millipore) com ponto de corte de 10 kDa a aproximadamente 2 mL. As centrifugações foram feitas por 50 minutos a 3000 x g.

As proteínas presentes no sobrenadante foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante de 12% (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). A 1 volume de cada amostra foi adicionado 1 volume de tampão de amostra desnaturante 2x. As amostras foram fervidas e aplicadas no gel.

## 2.17 Coloração com prata

Após a corrida do gel de poliacrilamida, o gel foi corado com prata seguindo o protocolo de Blum, Beier & Gross (1987) com modificações.

O gel foi incubado durante a noite na solução de fixação I sob agitação branda a temperatura ambiente. Descartou-se a solução de fixação I e adicionou-se a solução de fixação II, deixada por 30 minutos nas mesmas condições anteriores. A solução de fixação II foi descartada e foi adicionada a solução de sensibilização, deixada para agir por 1 minuto. Após esta ser descartada, o gel foi lavado 3 vezes por 20 segundos com água destilada. A solução de prata foi adicionada e incubada sob agitação branda a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir o gel foi lavado 2 vezes por 20 segundos com água destilada. O gel foi então incubado na solução reveladora, agitando manualmente por alguns minutos até a revelação. A reação foi interrompida ao adicionar-se a solução de fixação I.

## 2.18 Zimograma

O gel para o zimograma foi feito como descrito para o SDS-PAGE, no item 2.16 de material e métodos. As diferenças foram que o tampão de amostra utilizado não continha  $\beta$ -mercaptoetanol, as amostras não foram fervidas e não foi utilizado marcador de proteína.

Ao terminar a corrida, o gel foi incubado com tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação branda. O gel foi, então, transferido para um recipiente contendo a solução de amido 0,5% em tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 e incubado durante a noite a 4°C sob agitação branda. Após essa etapa, o gel foi incubado por 2 horas em um banho-maria a 37°C. Descartou-se a solução de amido e o gel foi revelado com o reagente de Fuwa, preparado na hora.

## 2.19 Análises estatísticas

Para comparar as atividades dos diferentes clones e determinar se as diferenças entre elas eram estatisticamente significativas, foi utilizada a ANOVA a dois fatores, com pós teste de Dunn. O nível de significância adotado para as análises foi de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. EXPRESSÃO DA $\alpha$ -AMILASE

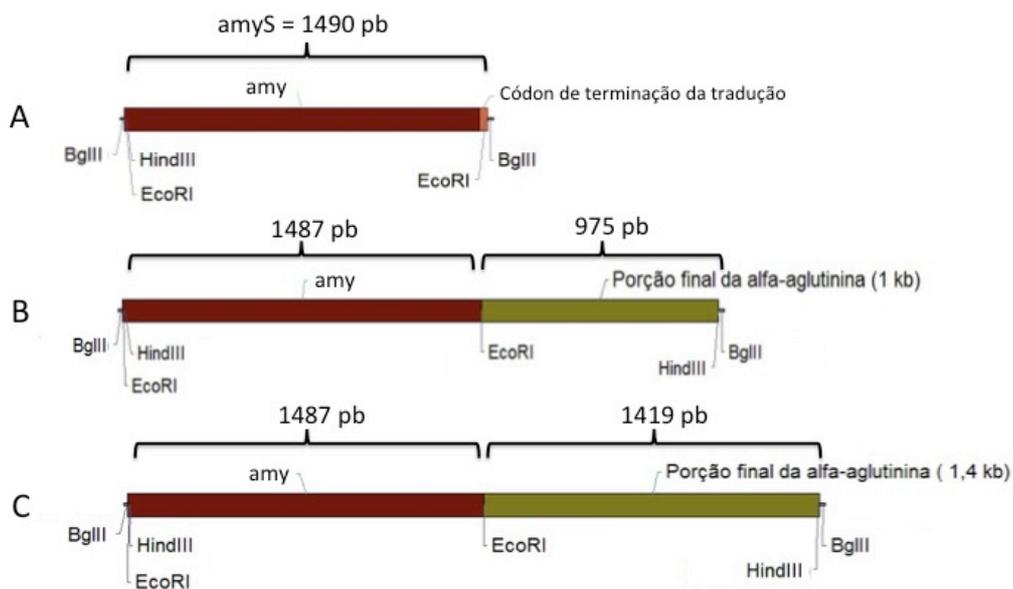
#### 1.1 Amplificação dos genes

Foram construídos dois vetores com regiões do DNA correspondente à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina de diferentes tamanhos. O primeiro foi com uma sequência de 975 pb (região C-terminal rica em serina e treonina e a sequência sinal para adição da âncora de GPI) e o segundo com 1419 pb (região C-terminal rica em Ser e Thr, sequência sinal para adição da âncora de GPI e mais 444 pb da região 3'UTR do gene). Primeiramente, foi utilizada o fragmento de 975 pb, pois corresponde à região codificadora da porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina. O fragmento de 444 pb se encontra após o códon de parada de tradução e não codifica nenhuma parte da proteína (Lipke *et al.*, 1989).

Não foi encontrada nenhuma referência em trabalhos anteriores da utilização do fragmento de 975 pb, por isso, essa porção foi primeiramente usada no presente trabalho, já que continha toda a porção codificadora final da  $\alpha$ -aglutinina. Observou-se que  $\alpha$ -amilase era secretada em maior quantidade do que permanecia ligada às células. Cogitou-se então que pudesse haver alguma sequência importante na região 3'UTR do gene da  $\alpha$ -aglutinina, já que o fragmento de aproximadamente 1,4 kb era utilizado na literatura de referência (Murai *et al.*, 1999; Shigechi *et al.*, 2002; Shigechi *et al.*, 2004-b). Porém, nenhuma alteração significativa nos resultados foi observada ao longo dos experimentos.

O gene da  $\alpha$ -amilase truncada foi amplificado de duas formas diferentes: a primeira com um códon de terminação da tradução adicionado pelo oligonucleotídeo reverso e a segunda sem esse códon de terminação. Para a construção eficiente da fusão, a  $\alpha$ -amilase deveria ser expressa continuamente à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina, portanto, não tinha um códon de

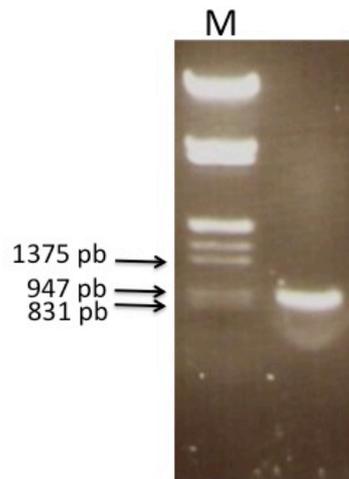
terminação da tradução em sua sequência de DNA. Já para a enzima que deveria ser expressa no sobrenadante, foi adicionado um códon de terminação ao oligonucleotídeo reverso. O fragmento gerado na amplificação com o oligonucleotídeo sem o códon de terminação será chamado durante toda a dissertação de “amy” para facilitar a compreensão e o fragmento gerado com o oligonucleotídeo contendo o códon de terminação será chamado de “amyS”. As regiões amplificadas continham a sequência com o sinal de secreção da própria  $\alpha$ -amilase. A figura 7 mostra um esquema que resume os fragmentos que serão trabalhados nessa seção, destacando os sítios das principais enzimas de restrição e o tamanho de cada fragmento. Os fragmentos mostrados são os insertos finais que foram clonados no vetor de expressão em levedura, que será exposto agora apenas para facilitar a visualização dos insertos.



**Figura 7.** Esquema dos fragmentos utilizados para clonagem no vetor de expressão em levedura. A: Gene da  $\alpha$ -amilase com códon de terminação da tradução (amyS); B: Gene da  $\alpha$ -amilase (amy) fusionado à porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina de aproximadamente 1 kb; C: Gene da  $\alpha$ -amilase (amy) fusionado à porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb.

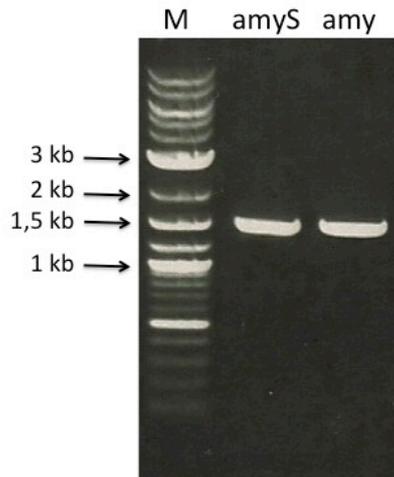
Inicialmente a região final do gene da  $\alpha$ -aglutinina e o gene da  $\alpha$ -amilase truncada foram amplificados por PCR. No oligonucleotídeo alfaGF (*foward*) foi adicionado um sítio para a enzima de restrição *EcoRI* e no oligonucleotídeo

alfaGR (reverso) foi adicionado para a enzima *Hind*III. A figura 8 mostra a amplificação da porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina.



**Figura 8.** Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR da região final do gene da  $\alpha$ -aglutinina (975 pb). M: marcador de massa molecular  $\lambda$ *EcoRI/Hind*III; seta: tamanhos das bandas de DNA do marcador de massa molecular.

Os fragmentos do gene da  $\alpha$ -amilase truncada de *B. subtilis* para a construção da fusão à  $\alpha$ -aglutinina (*amy*) e para a construção do clone secretor de  $\alpha$ -amilase (*amyS*) foram amplificados com o mesmo oligonucleotídeo *forward* (AMYF). Ao oligonucleotídeo *forward* (AMYF) foi adicionado um sítio para a enzima *EcoRI* e outro para *Hind*III, nessa ordem, e foi adicionado um sítio para a enzima *EcoRI* aos oligonucleotídeos reversos de cada um dos fragmentos amplificados, AMYR e AMYSTOP, para amplificação de *amy* e *amyS*, respectivamente. O resultado das duas amplificações do gene da  $\alpha$ -amilase aparece na figura 9.



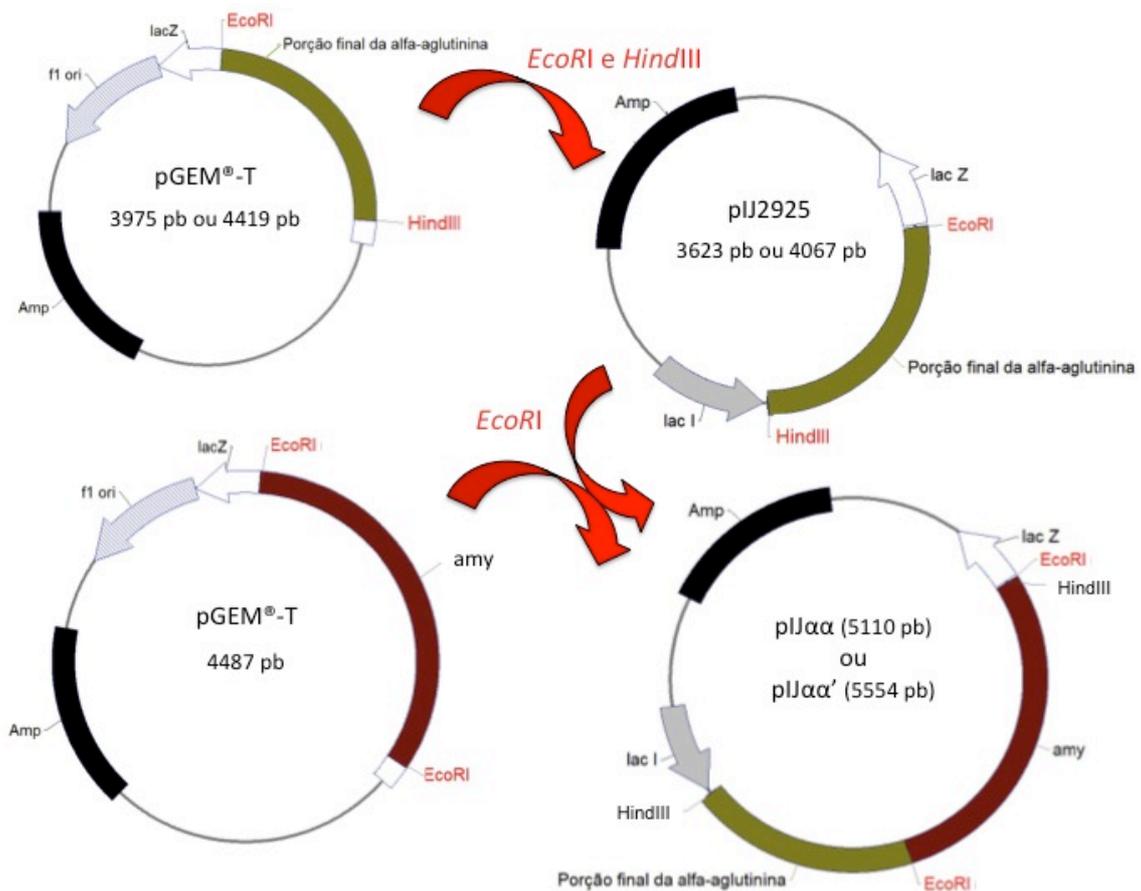
**Figura 9.** Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do gene da  $\alpha$ -amilase. M: marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs); seta: tamanhos das bandas de DNA do marcador de massa molecular; amyS: gene da  $\alpha$ -amilase com códon de terminação da tradução; amy: gene da  $\alpha$ -amilase sem o códon de terminação da tradução.

As amplificações foram realizadas com sucesso. Observa-se na figura 8 um fragmento próximo à banda de 947 pb do marcador que corresponde ao tamanho de 975 pb da porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina. E na figura 9, os fragmentos amplificados encontram-se próximo à banda de 1,5 kb do marcador, correspondente ao tamanho de 1487 pb do gene da  $\alpha$ -amilase.

Os produtos de PCR foram clonados no vetor de clonagem pGEM<sup>®</sup>-T (Promega). Para essa ligação foi necessário a adição de adenina às extremidades dos fragmentos, pois a amplificação foi realizada com a enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) para manter maior grau de fidelidade à sequência. Não foi necessário amplificar a região final do gene da  $\alpha$ -aglutinina no tamanho de 1,4 kb, pois este fragmento já havia sido amplificado anteriormente no laboratório e estava clonado ao vetor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega).

## 1.2 Construção da fusão no vetor pIJ2925

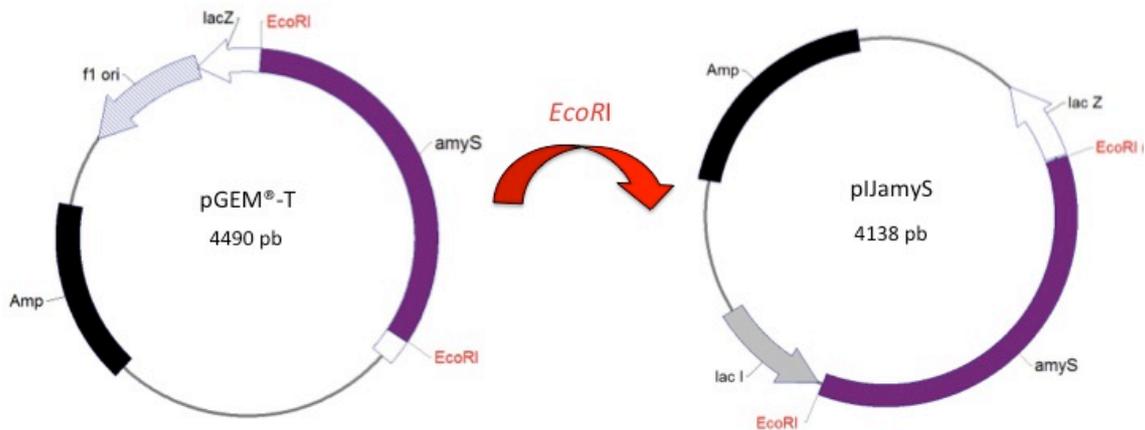
Os fragmentos clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T foram digeridos com as enzimas de restrição adequadas e clonados no vetor pIJ2925 para construção da fusão entre o gene da  $\alpha$ -amilase e a porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina. Os vetores construídos contendo os genes fusionados foram chamados de pIJ $\alpha\alpha$  para a fusão do fragmento amy à região da  $\alpha$ -aglutinina de 1 kb e pIJ $\alpha\alpha'$  para a fusão do fragmento amy à região de 1,4 kb da  $\alpha$ -aglutinina. A figura 10 mostra a estratégia utilizada.



**Figura 10.** Estratégia de clonagem para a construção da fusão entre o gene da  $\alpha$ -amilase e a porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina no vetor pIJ2925.

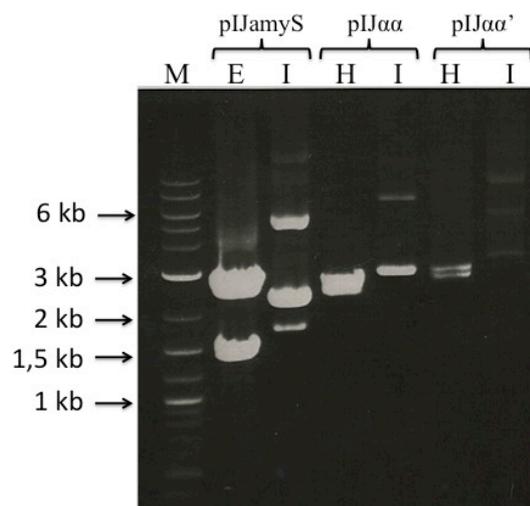
A estratégia de clonagem para a construção do vetor secretor de  $\alpha$ -amilase é apresentada na figura 11. Essa estratégia foi um pouco diferente da

utilizada anteriormente, pois não foi produzida nenhuma fusão. O vetor formado foi chamado de pIJamyS.



**Figura 11.** Estratégia de clonagem para a construção do clone secretor de  $\alpha$ -amilase no pIJ2925.

Após a clonagem dos genes no vetor pIJ2925, foi verificado quais clones continham a construção na orientação correta. A figura 12 mostra a análise dos vetores pIJamyS, pIJ $\alpha$  e pIJ $\alpha'$ .



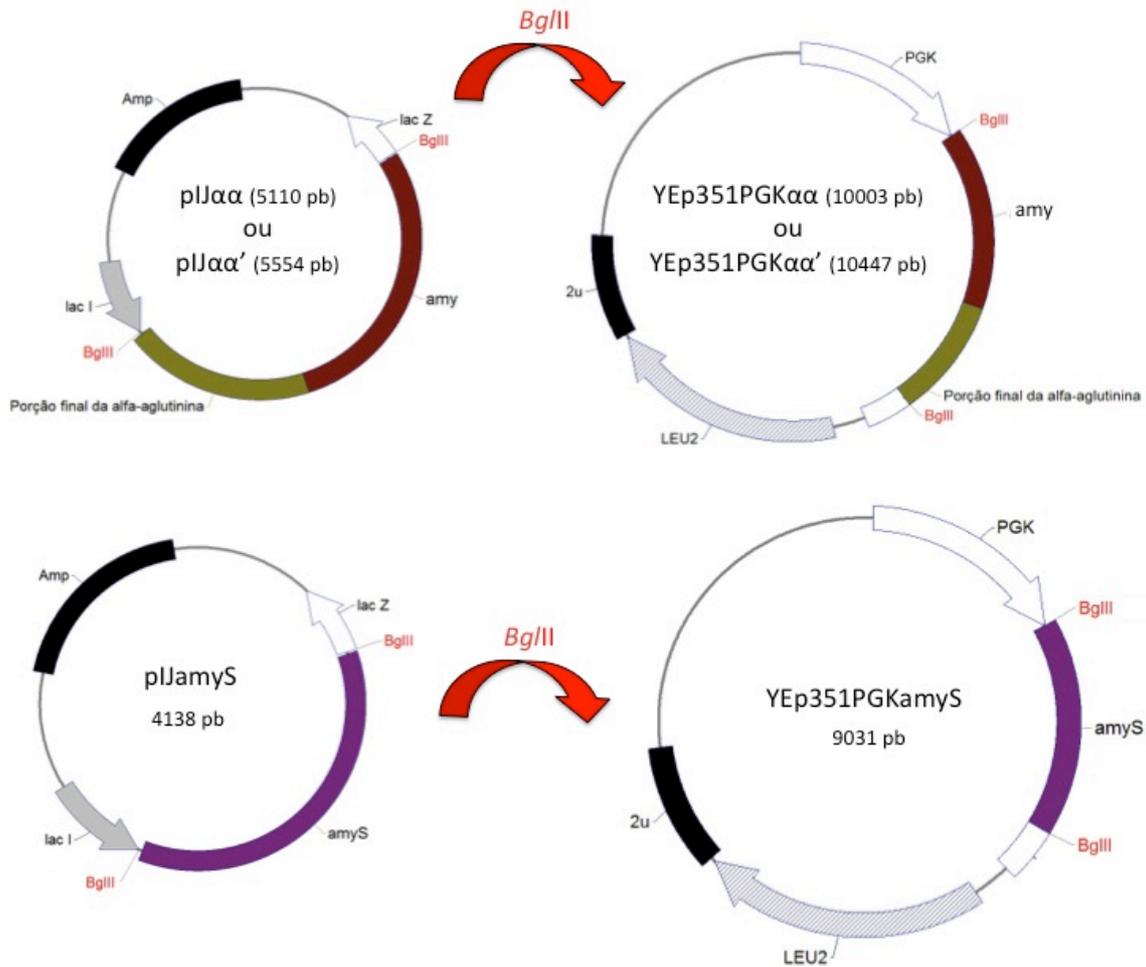
**Figura 12.** Análise por eletroforese em gel de agarose da digestão com *EcoRI* do vetor pIJamyS e da digestão com *HindIII* dos vetores pIJ $\alpha$  e pIJ $\alpha'$ . M: marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs); seta: tamanhos dos fragmentos de DNA do marcador de massa molecular; E: digestão com *EcoRI*; H: digestão com *HindIII*; I: plasmídeos intactos das respectivas amostras.

Todos os clones mostrados na figura 12 foram compatíveis com o perfil esperado, todos que estavam fusionados apresentaram a fusão construída corretamente. Pode-se observar que os clones que continham a fusão liberaram os dois genes fusionados quando digeridos com *HindIII*, pois havia apenas um sítio para essa enzima na extremidade de cada um dos genes, como pode ser observado nos vetores pIJαα e pIJαα' da figura 10.

O vetor pIJamyS não contém a fusão, e libera apenas o gene da α-amilase no tamanho aproximado de 1,5 kb. Esse vetor foi digerido com *EcoRI*, pois possuía dois sítios para essa enzima, um em cada extremidade, e apenas um sítio para *HindIII* em uma das extremidades.

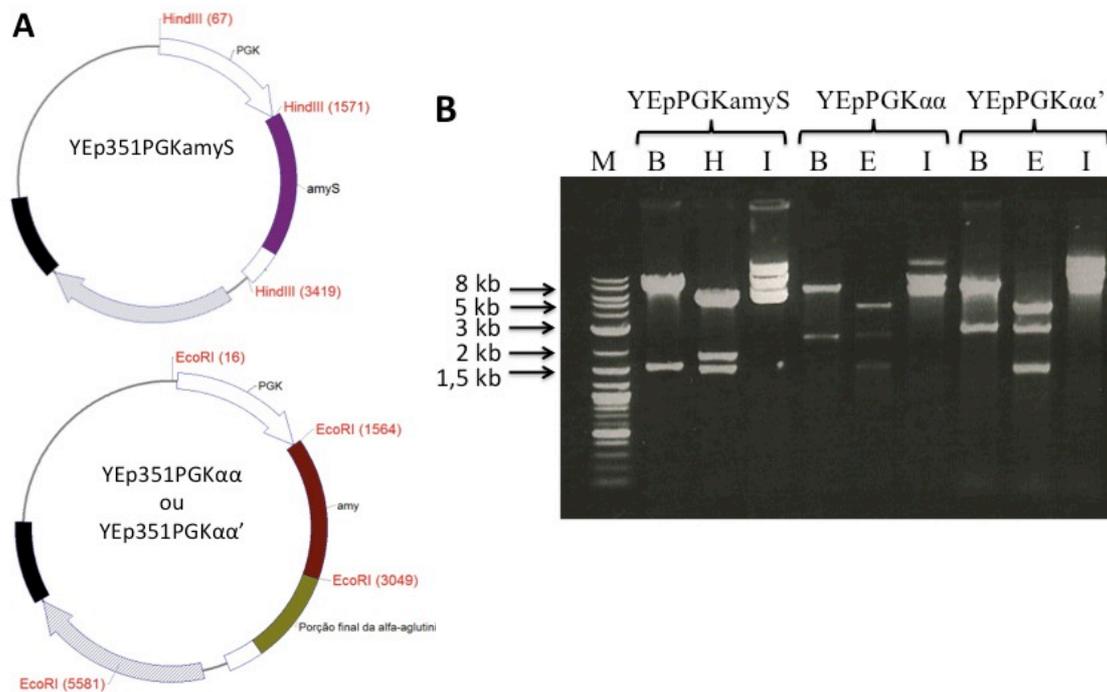
### 1.3 Construção do vetor de expressão em levedura

A fusão formada pela junção do gene da α-amilase à porção final da α-aglutinina, com os dois diferentes tamanhos do fragmento gênico da α-aglutinina, assim como apenas o gene da α-amilase foram clonados no vetor de expressão YEp351PGK, como mostra o esquema da figura 13. As construções corretas de cada vetor foram chamadas de YEp351PGKamyS, YEp351PGKαα e YEp351PGKαα'.



**Figura 13.** Estratégia de clonagem utilizada para os vetores de expressão em levedura das construções contendo o gene da  $\alpha$ -amilase.

A figura 14 mostra a análise dos vetores de expressão contendo o gene da  $\alpha$ -amilase e as fusões com os dois fragmentos de diferentes tamanhos da  $\alpha$ -aglutinina. Os vetores foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl*III para verificar se o inserto de tamanho correto estava clonado e com as enzimas *Hind*III e *Eco*RI para verificar se o inserto estava na orientação correta em relação ao promotor PGK do vetor. Na figura 14 no esquema em A, as posições dos sítios da enzima de restrição *Eco*RI mostrados são do vetor YEp351PGKαα com o fragmento de 975 pb da  $\alpha$ -aglutinina, entretanto os locais dos sítios são iguais aos do vetor YEp351PGKαα', diferenciando apenas na posição 5581 que fica 425 pb mais para frente, por causa do fragmento de  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb.



**Figura 14.** Perfil e análise das digestões dos vetores de expressão em levedura dos clones produtores de  $\alpha$ -amilase. A: Esquema do perfil de digestão da enzima de restrição *HindIII* no vetor YEp351PGKamyS e da enzima de restrição *EcoRI* no vetor YEp351PGK $\alpha\alpha$ . B: Análise por eletroforese em gel de agarose da digestão com *BglII* e *HindIII* do vetor YEp351PGKamyS e com *BglII* e *EcoRI* dos vetores YEp351PGK $\alpha\alpha$  e YEp351PGK $\alpha\alpha'$ . Em A, Números ao lado dos nomes das enzimas nos vetores: posição dos sítios de clivagem. Em B, M: marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs); seta: tamanhos dos fragmentos do marcador de massa molecular; B: digestão com *BglII*; H: digestão com *HindIII*; E: digestão com *EcoRI*; I: intactos das respectivas amostras.

Pode-se observar as construções corretas de cada um dos vetores na figura 14. Os insertos foram clonados no sítio de *BglII*, por isso quando digeridos com essa enzima todos liberaram o tamanho exato do YEp351PGK (7,5 kb) e do inserto em questão, no caso do YEp351PGKamyS, um inserto de aproximadamente 1,5 kb; no caso do YEp351PGK $\alpha\alpha$ , um inserto de aproximadamente 2,5 kb; e no caso do YEp351PGK $\alpha\alpha'$ , um inserto de 2,9 kb.

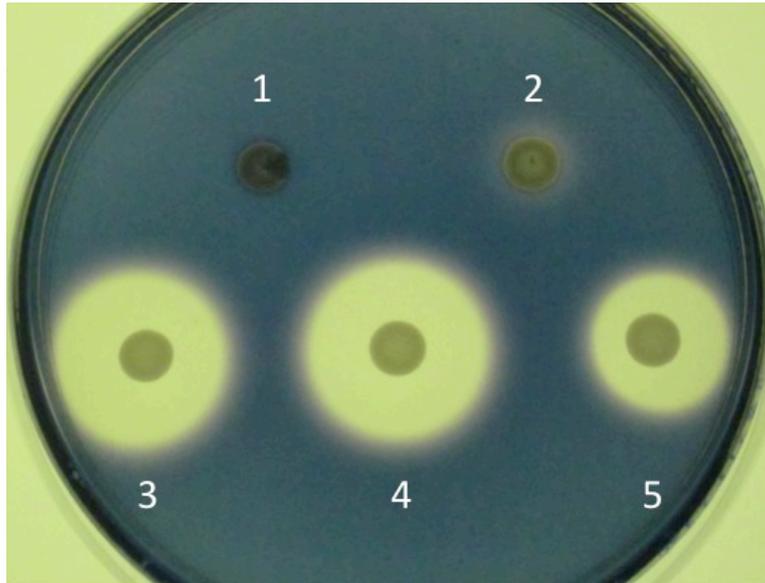
Em fase com o promotor, a digestão do vetor YEp351PGKamyS com *HindIII* liberaria os fragmentos de 1504 pb, 1848 pb e 5688 pb. Esse perfil pode ser observado na análise por eletroforese em gel de agarose da digestão desse vetor com *HindIII*, confirmando a orientação correta do inserto.

Para a orientação correta dos vetores YEp351PGK $\alpha\alpha$  e YEp351PGK $\alpha\alpha'$ , o perfil de bandas esperado na digestão com *EcoRI* era: 1548 pb, 1485 pb, 2532 pb (para o vetor YEp351PGK $\alpha\alpha$ ) ou 2957 pb (para o vetor YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ) e 4450 pb. Como observado na análise por eletroforese em gel de agarose, os dois clones apresentaram o perfil correto. Os fragmentos de 1548 pb e 1487 pb não podem ser distinguidos nesse gel de agarose, e aparecem como uma banda única.

Os vetores de expressão construídos foram utilizados para transformar a linhagem MFL de *S. cerevisiae*. Os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescer em meio mínimo sem leucina e produzir halos de hidrólise em meio contendo amido.

#### 1.4 Análise dos halos de hidrólise em placa

A seleção preliminar dos clones produtores de  $\alpha$ -amilase foi realizada pela análise do tamanho do halo de hidrólise em placa de meio seletivo com amido. Um clone de cada construção foi selecionado para dar continuidade aos testes, assim como um clone de controle negativo – linhagem MFL transformada com o vetor YEp351PGK sem o gene da  $\alpha$ -amilase e nem a região final do gene da  $\alpha$ -aglutinina. Além dos clones selecionados e do controle negativo, foi selecionado um clone da linhagem MFL contendo o vetor pPB-G, produtor de  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* fusionado à glicoamilase de *Aspergillus awamori* sob o controle do promotor PGK (Moraes *et al.*, 1995). Este foi utilizado para comparação da atividade da  $\alpha$ -amilase fusionada à  $\alpha$ -aglutinina e fusionada a outra proteína, no caso, a glicoamilase. A figura 15 mostra os halos de hidrólise de amido em placa corada com vapor de iodo dos clones selecionados. As áreas coradas pelo iodo (em azul) são regiões do meio onde o amido não foi hidrolisado.

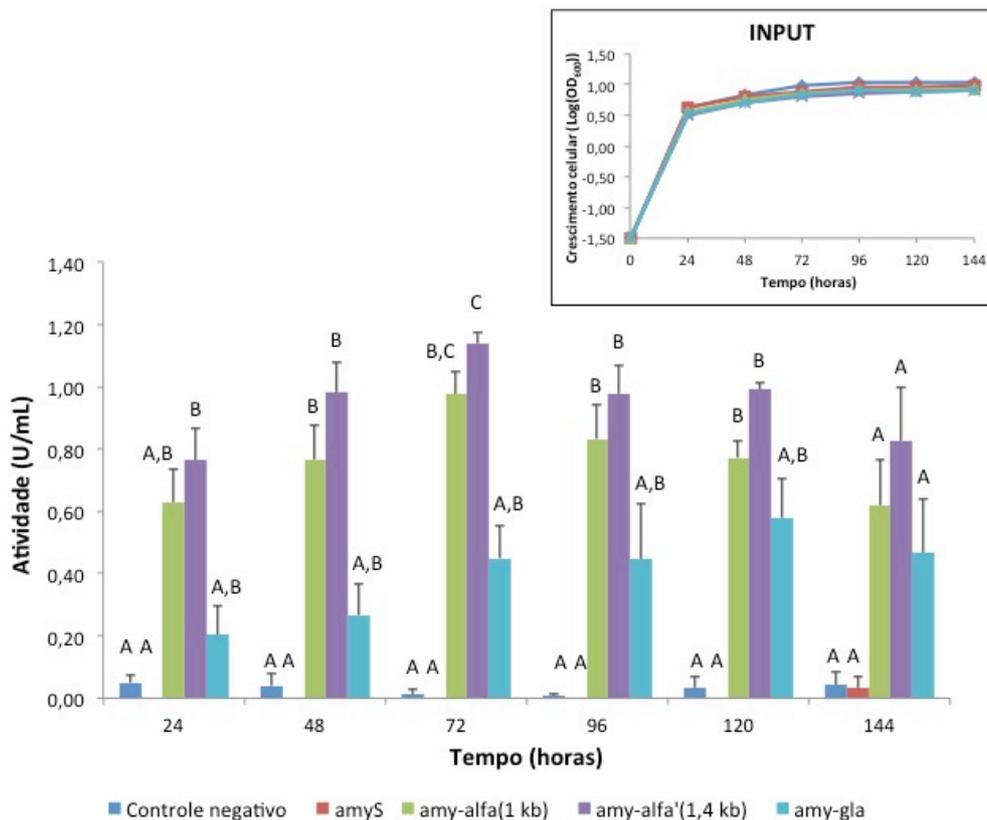


**Figura 15.** Análise da atividade amilolítica em placa dos clones produtores de  $\alpha$ -amilase. As placas de meio mínimo contendo 1 % de amido foram incubadas a 30°C por 2 dias e coradas com vapor de iodo mostrando os halos de hidrólise produzidos pela  $\alpha$ -amilase. 1: MFL/YEp351PGK (controle negativo); 2: MFL/YEp351PGKamyS; 3: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha$ ; 4: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; 5: MFL/pPB-G.

O controle negativo, não produz  $\alpha$ -amilase, e, como esperado, não apresentou halo de hidrólise. Entretanto, não foi observado redução do halo de hidrólise nos clones que continham a fusão quando comparado ao clone secretor de  $\alpha$ -amilase (clone transformado com o vetor YEp351PGKamyS). Eram esperados halos menores das colônias contendo a  $\alpha$ -aglutinina, já que a  $\alpha$ -amilase estaria presa à parede limitando sua atividade a uma região mais próxima das colônias. Os halos de hidrólise observados nos clones contendo a fusão à  $\alpha$ -aglutinina (clones 3 e 4 da figura 15) foram maiores do que o clone que não continha a fusão (clone 2 da figura 15), o que indica que a  $\alpha$ -amilase está se difundindo no meio e provavelmente não está aderida à parede da levedura. Foi observado, também, que mesmo fusionada a outra proteína o halo de hidrólise produzido pelos clones contendo alguma fusão foi maior do que a  $\alpha$ -amilase secretada sozinha, caso do clone contendo a fusão da  $\alpha$ -amilase à glicoamilase (clone 5 da figura 15).

### 1.5 Análise quantitativa da atividade em meio líquido

Para quantificar a atividade e verificar se os transformantes tinham atividade associada à célula (enzima aderida à parede da levedura), foi feito um teste de atividade em meio líquido dos clones selecionados. O sobrenadante foi separado do precipitado de células e a atividade foi dosada nas duas frações. Os resultados do teste de atividade associada às células são mostrados na figura 16, para facilitar a identificação nas legendas o clone com o fragmentos de 975 pb da  $\alpha$ -aglutinina foi chamado de “alfa(1 kb)”. Também é exposto o resultado da análise estatística dos dados, as letras iguais indicam valores estatisticamente semelhantes e letras diferentes indicam valores com diferença significativa estatisticamente.

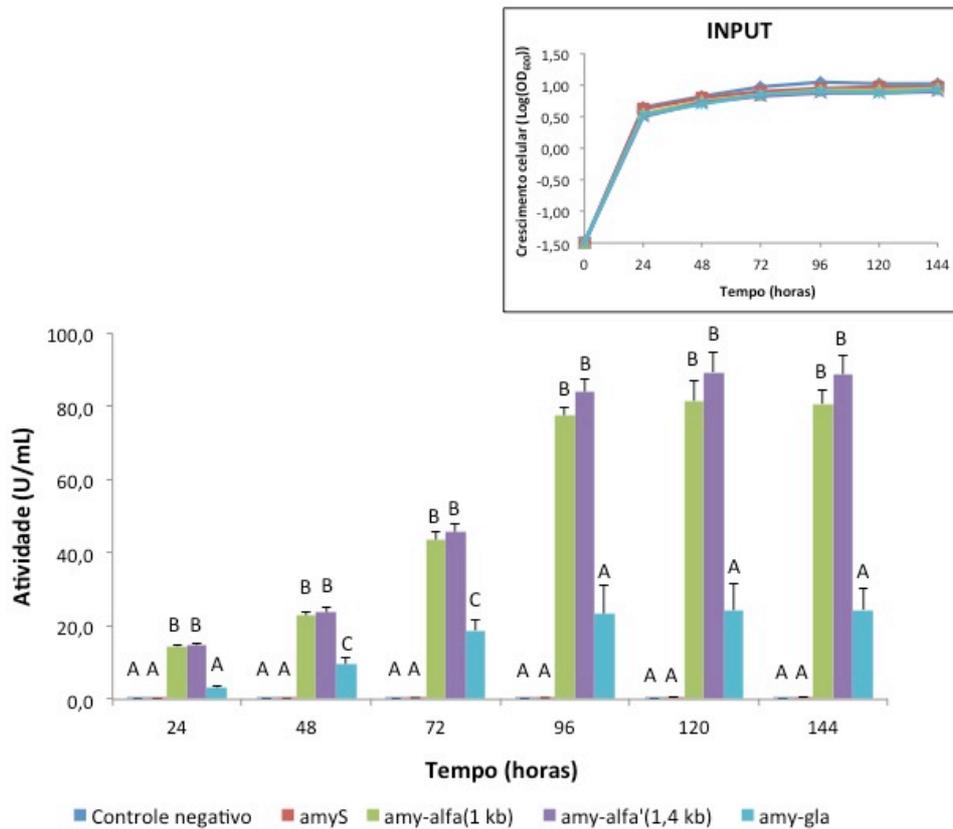


**Figura 16.** Atividade de  $\alpha$ -amilase associada às células. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; amyS: MFL/YEp351PGKamyS; amy-alfa(1 kb): MFL/YEp351PGK $\alpha$ ; amy-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGK $\alpha$ '; amy-gla: MFL/pPB-G; barras: erro padrão das amostras; letras: análises estatísticas; INPUT: crescimento celular dos clones em Log(OD<sub>600</sub>).

Como esperado os clones fusionados à  $\alpha$ -aglutinina apresentaram maior atividade associada à célula que o clone secretor de  $\alpha$ -amilase, este não apresentou atividade em nenhum ponto coletado. Por meio da análise estatística, pode-se afirmar que a atividade encontrada para os clones contendo a fusão entre  $\alpha$ -amilase e região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina foi diferente do controle negativo e do clone secretor de  $\alpha$ -amilase nos tempos entre 48 horas e 120 horas. Isso indica que a  $\alpha$ -amilase ficou aderida à parede da levedura.

O clone contendo a fusão entre a  $\alpha$ -amilase e a glicoamilase também apresentou atividade associada à célula, mesmo não tendo um sistema de adesão celular genético. Esse fato foi também observado por Moraes *et al.* (1995), o clone secretor de glicoamilase (YPG) e o clone contendo a fusão entre  $\alpha$ -amilase e glicoamilase – *S. cerevisiae* transformada com o vetor pPG e vetor pPB-G, respectivamente – apresentaram atividade residual associada à célula, mesmo sem nenhum sistema de adesão à parede. Possivelmente a enzima glicoamilase tem alguma interação com a parede da levedura, o que faz com que fique associada à célula depois das etapas de separação descritas. Porém esse valor teve uma variância muito grande, e, quando analisado estatisticamente, foi mostrado que em algum ponto ele pode se igualar ao valor encontrado no controle negativo e em outro pode alcançar os valores encontrados nos clones contendo a fusão à  $\alpha$ -aglutinina. Por isso não apresentou valores com diferença estatisticamente significativa em relação aos outros clones.

A atividade dosada no sobrenadante pode ser observada na figura 17. A análise estatística também é mostrada como letras sobre as barras de atividade.



**Figura 17.** Atividade de  $\alpha$ -amilase dosada no sobrenadante de cultura. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; amyS: MFL/YEp351PGKamyS; amy-alfa(1 kb): MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha$ ; amy-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; amy-gla: MFL/pPB-G; barras: erro padrão das amostras; letras: análises estatísticas; INPUT: crescimento celular dos clones em Log( $OD_{600}$ ).

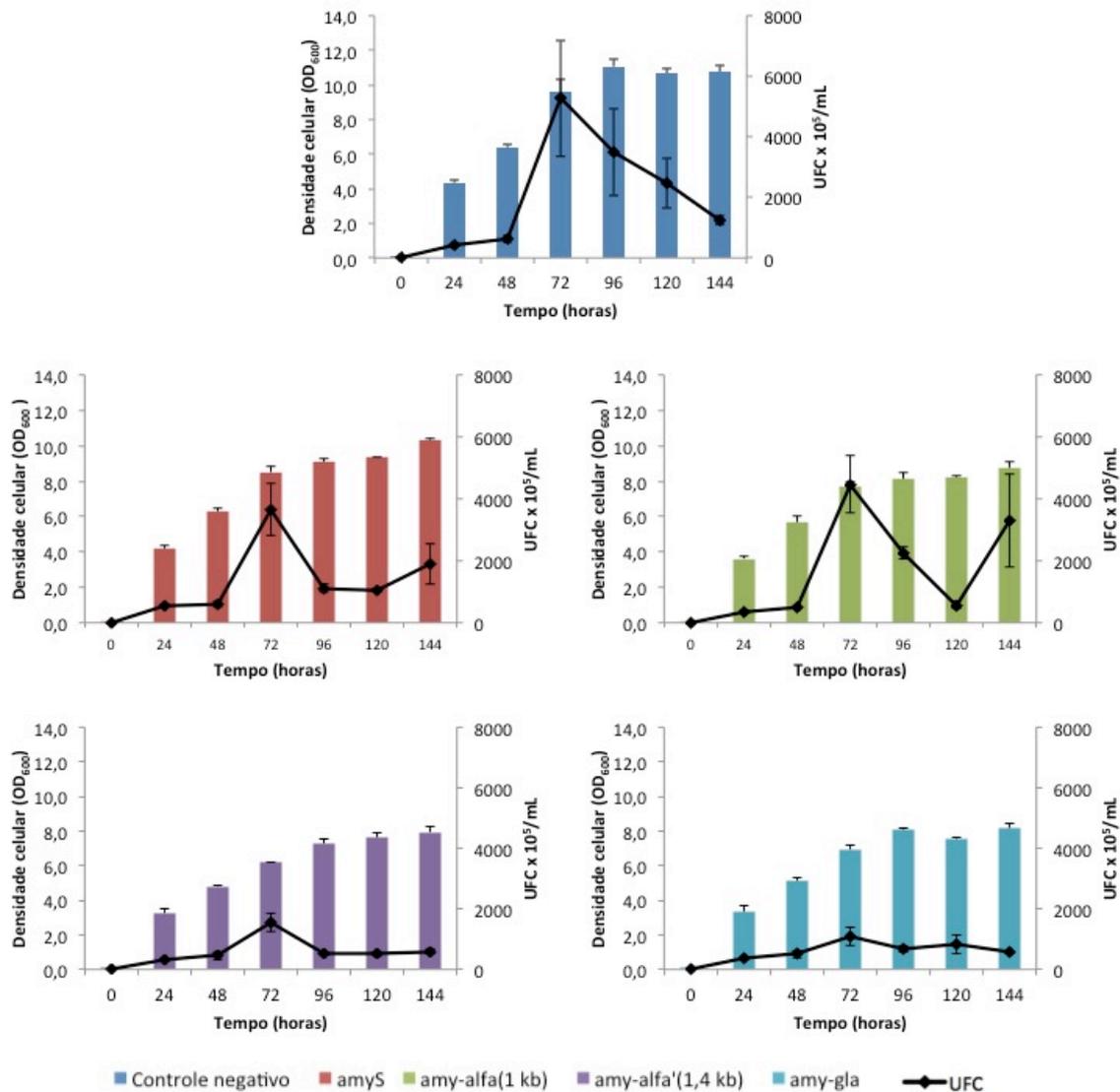
O teste em meio líquido confirmou que os clones contendo a fusão  $\alpha$ -amilase/ $\alpha$ -aglutinina apresentaram maior atividade de hidrólise de amido no sobrenadante quando comparado ao clone secretor de  $\alpha$ -amilase, apresentando diferença significativa em todos os pontos coletados (figura 17). Assim como pode ser observado na atividade associada às células, não houve diferença significativa entre os dois clones fusionados aos diferentes fragmentos da região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina na atividade dosada no sobrenadante. O clone contendo a fusão da  $\alpha$ -amilase com a glicoamilase também mostrou atividade superior à do clone secretor de  $\alpha$ -amilase, porém, mais uma vez, sua variância foi grande em alguns pontos, e a partir de 96 horas não apresentou valores significativamente maiores que o controle negativo.

A atividade dosada no sobrenadante de cultura do clone secretor de  $\alpha$ -amilase foi baixa e os valores encontrados não apresentaram diferença significativa para o controle negativo em nenhum momento (figura 17). A atividade máxima encontrada foi de  $0,47 \pm 0,03$  U/mL em 144 horas, enquanto o clone contendo a fusão ao fragmento de 1,4 kb da  $\alpha$ -aglutinina alcançou  $89,43 \pm 5,27$  U/mL em 120 horas. Portanto, foi criada a hipótese de que a  $\alpha$ -amilase reduzida utilizada nesse trabalho (codificada pelo fragmento de aproximadamente 1,5 kb), sem os últimos 171 resíduos de aminoácidos, não é estável quando expressa nessa forma em *S. cerevisiae*. O que justifica-se pelo fato de que quando fusionada com qualquer uma das proteínas mostradas a atividade aumenta, o que pode indicar que a proteína fusionada à  $\alpha$ -amilase pode dar estabilidade conformacional para que a atividade seja mantida. Não foi encontrada atividade tão baixa da enzima secretada nos outros trabalhos que expressaram essa  $\alpha$ -amilase reduzida, sem fusão a nenhuma outra proteína, mesmo em outros organismos (Moraes *et al.*, 1995; Marco *et al.*, 1996; Arruda, 2008; Oliveira Neto, 2012). O trabalho de Moraes *et al.* (1995) foi o único que expressou essa  $\alpha$ -amilase sozinha e fusionada a outra proteína em *S. cerevisiae*, e as atividades obtidas foram maior do que a encontrada no presente trabalho para o clone secretor de  $\alpha$ -amilase. Porém, quando Moraes *et al.* (1995) expressaram essa enzima sozinha, a  $\alpha$ -amilase reduzida era um fragmento de 2,3 kb, contendo a  $\alpha$ -amilase truncada e uma porção do vetor no qual havia sido clonada anteriormente. Esse dado é outro indício de que provavelmente a  $\alpha$ -amilase codificada pelo fragmento de 1,5 kb não produza uma proteína estável quando expressa em *S. cerevisiae*, e necessite estar fusionada o outro fragmento para manter a atividade normal.

Nas construções contendo a fusão  $\alpha$ -amilase/região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina houve um aumento significativo estatisticamente da atividade amilolítica, tanto associada às células como secretada para o sobrenadante. Porém, a maior parte da atividade enzimática não ficou associada às células, e sim, foi secretada para o meio de cultura.

O teste de contagem de unidades formadoras de células (UFC) foi feito para verificar em quais dias foram observados os maiores índices de células viáveis e dessas quais ainda tinham atividade amilolítica. Era esperado

encontrar maior atividade associada a células no momento em que houvesse mais células viáveis, já que o número de células vivas era maior e, conseqüentemente, a produção de enzima associada à parede também seria. O resultado desse teste é mostrado na figura 18.



**Figura 18.** Contagem de UFC das culturas produtoras de  $\alpha$ -amilase durante o crescimento em meio líquido. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; amyS: MFL/YEp351PGKamyS; amy-alfa(1 kb): MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha$ ; amy-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; amy-gla: MFL/pPB-G; barras: erro padrão das amostras.

Nota-se que o maior número de células viáveis em todas as construções ocorre em 72 horas, o que coincide com os maiores valores referentes à atividade encontrada associada às células (ver figura 16), com exceção do clone contendo a fusão da  $\alpha$ -amilase com a glicoamilase. Esse clone atinge a

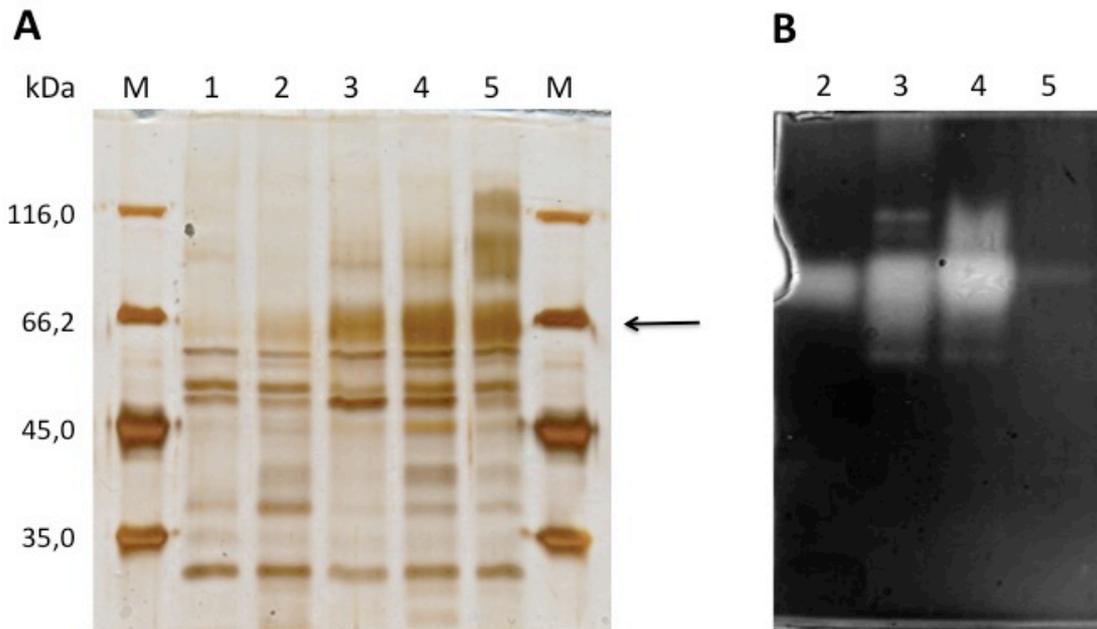
atividade máxima associada à célula em 120 horas, momento em que é possível observar um pequeno aumento do número de UFC em relação ao período anterior (figura 18), de  $675 \pm 110,9 \times 10^5$  UFC/mL para  $833,3 \pm 306,2 \times 10^5$  UFC/mL.

As placas foram coradas com vapor de iodo para verificar se todas as colônias apresentavam halos de hidrólise em amido. Todas as colônias apresentaram halos de hidrólise, o que determinou que todas as células viáveis ainda produziam a  $\alpha$ -amilase ativa. O único clone que não apresentou halos de hidrólise na placa de células viáveis foi o controle negativo, como esperado, já que não produzia  $\alpha$ -amilase.

Apesar da presença de atividade tanto associada a células como no sobrenadante, este último apresentou atividade de  $\alpha$ -amilase muito maior que o primeiro. O que indica que uma pequena parte da enzima produzida pela levedura fica aderida à parede, enquanto a maior parte é secretada para o meio de cultura. Suspeita-se que a  $\alpha$ -amilase esteja sendo clivada da porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina e, conseqüentemente, perde a sequência sinal para âncora GPI, dessa forma, não fica aderida à parede.

## **1.6 Análise do perfil secretório por SDS-PAGE**

Para verificar se a fusão estava sendo clivada e como a  $\alpha$ -amilase estava sendo expressa no meio de cultura, o sobrenadante de cultura de cada uma das construções contendo a fusão, assim como o controle negativo e o clone secretor de  $\alpha$ -amilase foi analisado por SDS-PAGE e zimograma (figura 19).



**Figura 19.** SDS-PAGE e zimograma do extrato do sobrenadante da cultura dos clones produtores de  $\alpha$ -amilase. As culturas foram crescidas durante 4 dias em meio SD líquido. A: SDS-PAGE corado com prata. B: zimograma corado com solução de FUWA. 1: MFL/YEp351PGK (controle negativo); 2: MFL/YEp351PGKamyS; 3: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha$ ; 4: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; 5: MFL/pPB-G; M = marcador de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific); seta:  $\alpha$ -amilase.

A  $\alpha$ -amilase não fusionada tem cerca de 55 kDa, mas devido a glicosilação, que ocorre em grande quantidade em *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999; Dean, 1999), essa massa aumenta. Durante a tentativa de purificar a proteína (dados não mostrados), descobriu-se que a  $\alpha$ -amilase aparece no gel de poliacrilamida na altura da banda de 66,2 kDa do marcador. Observa-se uma nítida banda difusa nessa altura na figura 19-A em todos os clones produtores de  $\alpha$ -amilase, que não está presente de forma tão nítida no controle negativo. Aparentemente a maior parte da  $\alpha$ -amilase não está sendo expressa fusionada à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina, já que apresentou o mesmo tamanho da  $\alpha$ -amilase secretada quando analisada em SDS-PAGE. A banda difusa é característico de proteínas glicosiladas analisadas em gel de poliacrilamida, e o ganho de 10 kDa provavelmente é devido à glicosilação.

Nota-se, no sobrenadante de cultura do clone que contém a fusão da  $\alpha$ -amilase com a glicoamilase (figura 19-A, poço 5), que a banda na altura de 66,2 kDa também aparece nitidamente, indicando que a  $\alpha$ -amilase mais uma

vez não se manteve na forma fusionada, o que já havia sido observado antes no trabalho de Moraes *et al.* (1999). Nesse trabalho a proteína produzida com a fusão entre a  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis* e a glicoamilase de *A. awamori*, plasmídeo pPB-G, e expressa em *S. cerevisiae* foi purificada com uma coluna de afinidade e uma de gel filtração. Notou-se um baixo rendimento de recuperação da  $\alpha$ -amilase, explicado, entre outras razões, pela clivagem da fusão  $\alpha$ -amilase/glicoamilase durante o processo de produção pela *S. cerevisiae*, liberando as duas enzimas ativas separadamente.

Considerando que a  $\alpha$ -amilase seja secretada para o meio junto com a região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina, fusão não aderida à parede por algum motivo, elas teriam juntas 87 kDa, no caso dos dois fragmentos de  $\alpha$ -aglutinina, pois existe um códon de terminação da tradução no final do fragmento menor, então, os 444 pb a mais servem apenas para regulação e não são traduzidos. Na figura 19-A é possível observar uma banda fraca difusa entre as bandas de 66,2 kDa e 116 kDa do marcador de massa molecular que aparece nos poços 3 e 4. Na tentativa de purificação mencionada anteriormente, não foi encontrada uma proteína com esse tamanho, por isso, não é possível confirmar se ela corresponderia à fusão não clivada. No extrato bruto do controle negativo aparece uma banda de intensidade fraca nessa mesma altura, o que indica que provavelmente é apenas uma proteína produzida normalmente pela levedura.

No zimograma, figura 19-B, é possível observar que o sobrenadante de cultura de todas as construções apresentou atividade de hidrólise de amido na mesma região de migração, outro indício de que a  $\alpha$ -amilase está sendo separada da cauda de  $\alpha$ -aglutinina e sendo secretada. O mesmo é observado na fusão com a glicoamilase, a  $\alpha$ -amilase parece ser sempre separada da proteína a qual está fusionada.

Nota-se nos poços 3 e 4 da figura 19-B que aparecem outras bandas mais fracas de atividade de hidrólise abaixo e acima da banda mais forte. Provavelmente a  $\alpha$ -amilase está sendo clivada da cauda de  $\alpha$ -aglutinina em diferentes pontos, liberando fragmentos maiores e menores da enzima, o que resulta em migrações diferentes no gel. Bandas de atividade de hidrólise do amido mais altas podem corresponder à  $\alpha$ -amilase fusionada à  $\alpha$ -aglutinina ou

a algum fragmento desta, que por algum motivo estariam se soltando da parede e sendo liberadas para o sobrenadante de cultura.

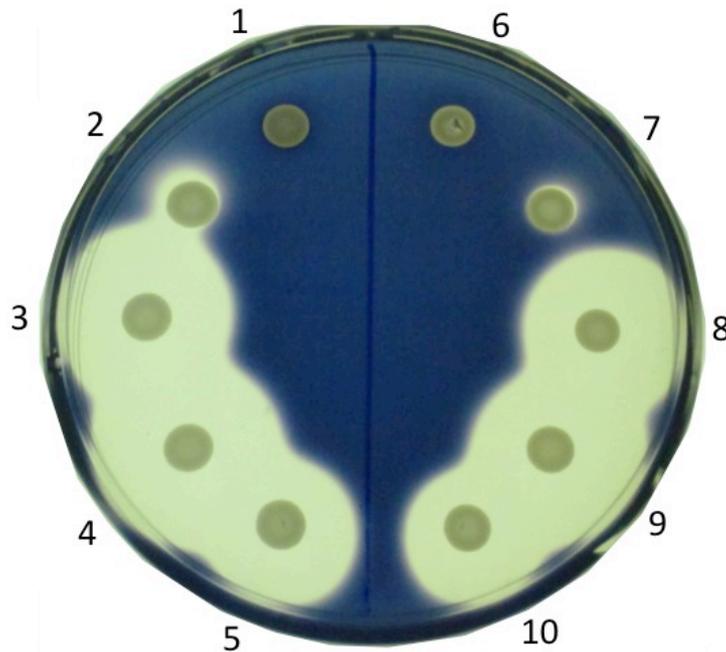
Uma possível explicação para a separação da  $\alpha$ -amilase da porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina é a presença de um sítio de uma protease na região C-terminal da  $\alpha$ -amilase, de forma que não altere a sua atividade. Como relatado no trabalho de Murai *et al.* (1999), a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus stearothermophilus*, utilizada no trabalho para fusão com a porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina, continha um possível sítio para a endopeptidase Kex2 e a maior parte da atividade amilolítica era detectada no sobrenadante. Ao eliminar esse sítio da sequência da enzima a atividade foi encontrada apenas associada às células, indicando que a proteína estava agora aderida à parede celular e o sítio para a protease era a causa da clivagem da fusão.

A  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*, utilizada no presente trabalho, não possui a sequência da região C-terminal na qual foi identificado o sítio para a protease Kex2. Não foi encontrado nenhum outro sítio de Kex2 na sequência remanescente e nem no fragmento de  $\alpha$ -aglutinina usado.

### **1.7 Análise comparativa da expressão da $\alpha$ -amilase nas linhagens MFL e CENPK2 de *S. cerevisiae***

Outra hipótese para a  $\alpha$ -amilase não permanecer fusionada a outra proteína seria alguma característica intrínseca da linhagem MFL ou alguma falha em alguma das enzimas da via de secreção de proteínas com âncora de GPI nessa linhagem utilizada no trabalho, já que a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus stearothermophilus* e *Streptococcus bovis* já foram imobilizada com sucesso na parede celular de levedura de outras linhagens (MT8-1, YF207, YF237) utilizando a fusão à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina (Murai *et al.*, 1999; Shigechi *et al.*, 2004-b; Khaw *et al.*, 2006). Para confirmar essa hipótese, todos os vetores de expressão em levedura construídos foram transformados em células da linhagem laboratorial CENPK2. Um clone com cada construção foi escolhido e crescidos em placa de meio SD ágar com amido sem leucina, a placa continha os aminoácidos histidina, triptofano e uracila para crescimento

das leveduras da linhagem CENPK2, que não produz esses aminoácidos. A figura 20 mostra a placa comparativa com todos os clones de MFL e CENPK2.

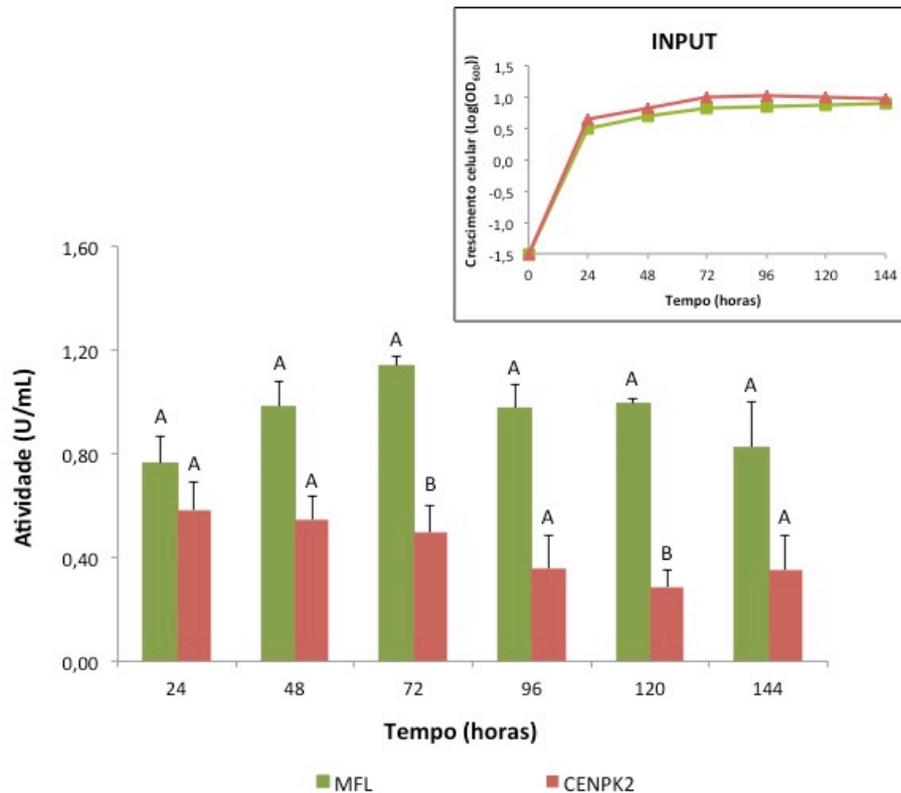


**Figura 20.** Análise comparativa da atividade amilolítica em placa pelos clones de MFL e de CENPK2. As placas de meio mínimo contendo 1 % de amido foram incubadas a 30°C por 2 dias e coradas com vapor de iodo mostrando os halos de hidrólise produzidos pela  $\alpha$ -amilase. 1: MFL/YEp351PGK (controle negativo); 2: MFL/YEp351PGKamyS; 3: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha$ ; 4: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; 5: MFL/pPB-G; 6: CENPK2/YEp351PGK (controle negativo); 7: CENPK2/YEp351PGKamyS; 8: CENPK2/YEp351PGK $\alpha\alpha$ ; 9: CENPK2/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; 10: CENPK2/pPB-G.

Não foi observado nenhuma diferença quanto à produção de halos de hidrólise entre os clones de MFL e CENPK2. Assim como os resultados da MFL, os clones de CENPK2 também não apresentaram redução nos halos produzidos pelos clones que continham a  $\alpha$ -amilase fusionada à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina quando comparados ao clone secretor de  $\alpha$ -amilase.

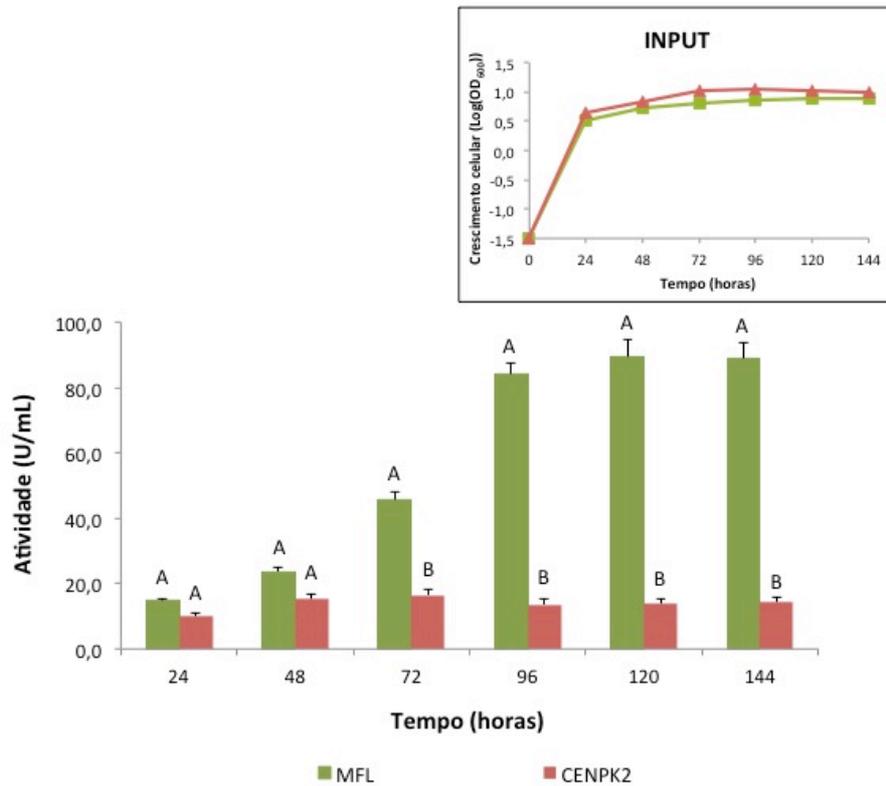
Para quantificar a atividade e confirmar esse resultado, um clone de MFL e um de CENPK2 contendo a mesma construção foram crescidos em meio SD líquido. Os clones escolhidos foram os que continham a construção da  $\alpha$ -amilase fusionada à porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb (YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ). A atividade também foi dosada associada à célula e no sobrenadante, como nos outros testes em meio líquido. Os resultados da

atividade obtida associada à célula são mostrados na figura 21 e os resultados da atividade dosada no sobrenadante de cultura na figura 22.



**Figura 21.** Atividade de  $\alpha$ -amilase associada às células das colônias de MFL e CENPK2. MFL: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; CENPK2: CENPK2/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; barras: erro padrão das amostras; letras: análises estatísticas; INPUT: crescimento celular dos clones em Log(OD<sub>600</sub>).

Os dois clones apresentaram atividade amilolítica associada à célula, porém o transformante de MFL foi mais eficiente na hidrólise do substrato, mesmo apresentando crescimento um pouco menor do que o apresentado pela CENPK2 (figura 21, Input). Durante a maior parte do experimento, a diferença entre os dois clones foi desprezível estatisticamente, a exceção das alíquotas coletadas em 72 horas e 120 horas, pontos em que a diferença foi significativa.



**Figura 22.** Atividade de  $\alpha$ -amilase dosada no sobrenadante de cultura das colônias de MFL e CENPK2. MFL: MFL/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; CENPK2: CENPK2/YEp351PGK $\alpha\alpha'$ ; barras: erro padrão das amostras; letras: análises estatísticas; INPUT: crescimento celular dos clones em Log(OD<sub>600</sub>).

Já no sobrenadante, os dois clones apresentaram atividade, como pode ser observado na figura 22, porém a partir de 72 horas o transformante de MFL se destacou e mostrou atividade maior com diferença significativa. As atividades máximas atingidas pelos clones foram de  $89,43 \pm 5,27$  U/mL em 120 horas, para MFL, e  $16,53 \pm 1,75$  U/mL em 72 horas, para CENPK2.

A CENPK2 foi eficiente para manter a  $\alpha$ -amilase aderida à parede, porém a maior parte da enzima produzida ainda é encontrada no sobrenadante de cultura, assim como aconteceu com a MFL. A linhagem CENPK2 também se mostrou pior secretora de enzima. Foi provado que a clivagem da enzima da fusão não era devido a alguma característica intrínseca da linhagem MFL ou alguma falha nas enzimas da via de secreção que não permitiu a permanência da  $\alpha$ -amilase aderida à parede celular, o mesmo ocorreu com a outra linhagem testada, a CENPK2.

## 1.8 Sequenciamento das construções

Para confirmar que não ocorreu nenhuma mutação que poderia modificar a atividade do clone secretor de  $\alpha$ -amilase ou das construções fusionadas à cauda da  $\alpha$ -aglutinina, a sequência de nucleotídeos de todos os clones foi caracterizada.

A análise do sequenciamento das construções contendo a  $\alpha$ -amilase no programa “Blast 2 sequences” é mostrada nas figuras 45, 46 e 47 do anexo 3. Quase toda a sequência foi caracterizada, e apareceram apenas duas mutações no final do fragmento da  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb: uma deleção de uma adenina e uma troca de nucleotídeo de timina por citosina. As mutações se encontram nos 444 pb após o códon de parada na porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina, portanto, não fazem diferença na conformação da proteína já que estão em uma região que não é traduzida. Como essas mutações estão nos 444 pb finais da  $\alpha$ -aglutinina, só aparecem na construção contendo a fusão da  $\alpha$ -amilase ao fragmento de 1,4 kb da  $\alpha$ -aglutinina.

Para total caracterização da  $\alpha$ -amilase contendo o códon de terminação da tradução faltaram 89 nucleotídeos não sequenciados. Pode ter ocorrido alguma mutação nessa região gerando uma enzima com dobramento incorreto, e dessa forma com a atividade alterada. Será necessária a caracterização de toda a sequência para determinar o motivo da perda de atividade dessa forma reduzida da proteína.

Várias enzimas já foram imobilizadas na parede celular de levedura, e o sistema mais utilizado foi o da  $\alpha$ -aglutinina. Esse sistema mostrou-se bem versátil, capaz de aderir proteínas de 0,93 a 136 kDa à superfície da levedura (Kondo & Ueda, 2004). Foi também uma das três mais eficientes proteínas utilizadas como âncora na expressão heteróloga, inclusive mais eficiente do que a Flo1p (Van der Vaart *et al.*, 1997). Por isso, foi usado esse sistema de ancoragem no presente trabalho. Porém, Shigechi *et al.* (2004-b) produziram dois vetores para expressão de  $\alpha$ -amilase na parede de *S. cerevisiae*: um com a porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina e outro com a porção N-terminal da Flo1p, e observaram o oposto. Nesse trabalho, foi encontrada maior atividade associada à célula na fusão da  $\alpha$ -amilase à porção N-terminal da Flo1p.

Ao que tudo indica, existe algum problema quanto aos genes utilizados na construção da fusão, o que não permite total adesão das proteínas à superfície celular. Uma possibilidade para futuros trabalhos é a imobilização por meio do sistema com a Flo1p, já que esse sistema apresenta variadas formas de aderência à parede e pode-se utilizar a região C-terminal ou a N-terminal.

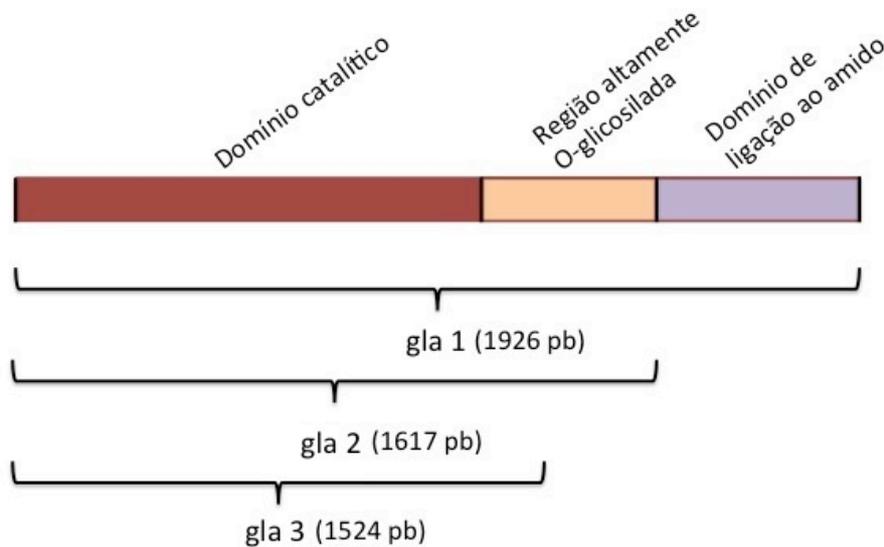
## 2. EXPRESSÃO DA GLICOAMILASE

### 2.1 Amplificação do cDNA de glicoamilase

Primeiramente, foram determinadas três regiões do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* a serem utilizadas. Depois dos resultados observados para a  $\alpha$ -amilase cogitou-se que diferentes domínios da glicoamilase poderiam influir na integridade conformacional da fusão com a  $\alpha$ -aglutinina. No trabalho de Evans *et al.* (1990) várias formas truncadas da proteína glicoamilase foram produzidas, cada uma com um C-terminal diferente, resultando em diferentes tamanhos. Nesse estudo supôs-se que a região altamente O-glicosilada pode ter importância na manutenção da estabilidade conformacional do domínio catalítico, na manutenção da integridade da enzima ou na secreção. Concluíram que o máximo possível para retirada era até o resíduo de aminoácido 482, que corresponde à região logo após ao C-terminal do domínio catalítico que envolve o barril  $(\alpha/\alpha)_6$ .

Por esse motivo o presente trabalho procurou analisar a atuação das diferentes formas da enzima fusionadas à  $\alpha$ -aglutinina. A região amplificada chamada de glicoamilase 1 (gla1) é o cDNA completo com todos os domínios e corresponde ao tamanho de 1926 pb. A glicoamilase 2 (gla2), correspondente a GAll em *A. awamori*, é formada pelo domínio catalítico e a região altamente O-glicosilada e tem o tamanho de 1617 pb. E por último, a glicoamilase 3 (gla3) é constituída apenas pelo domínio catalítico e parte da região O-glicosilada, com o tamanho de 1524 pb e estão esquematizadas na figura 23. Na gla3, parte da

região O-glicosilada foi retirada, pois, no trabalho de Evans *et al.* (1990), esse foi o menor tamanho dessa região que mantém a atividade enzimática, a remoção de um fragmento maior leva a perda da atividade e da estabilidade da enzima.



**Figura 23.** Esquema das três diferentes regiões amplificadas da glicoamilase: gla1, gla2 e gla3.

Os três diferentes fragmentos do cDNA da glicoamilase de *A. awamori* (gla1, gla2 e gla3) foram amplificados com o mesmo oligonucleotídeo *forward* (GLAF), ao qual foi adicionado um sítio para a enzima *EcoRI* e outro para *HindIII*, nessa ordem. O oligonucleotídeo reverso foi específico, cada um anelando em uma região diferente do cDNA da glicoamilase para gerar os três fragmentos da enzima. A todos os oligonucleotídeos reversos foi adicionado um sítio para a enzima *EcoRI*. A figura 24 mostra o resultado da amplificação dos três diferentes fragmentos do cDNA da glicoamilase.

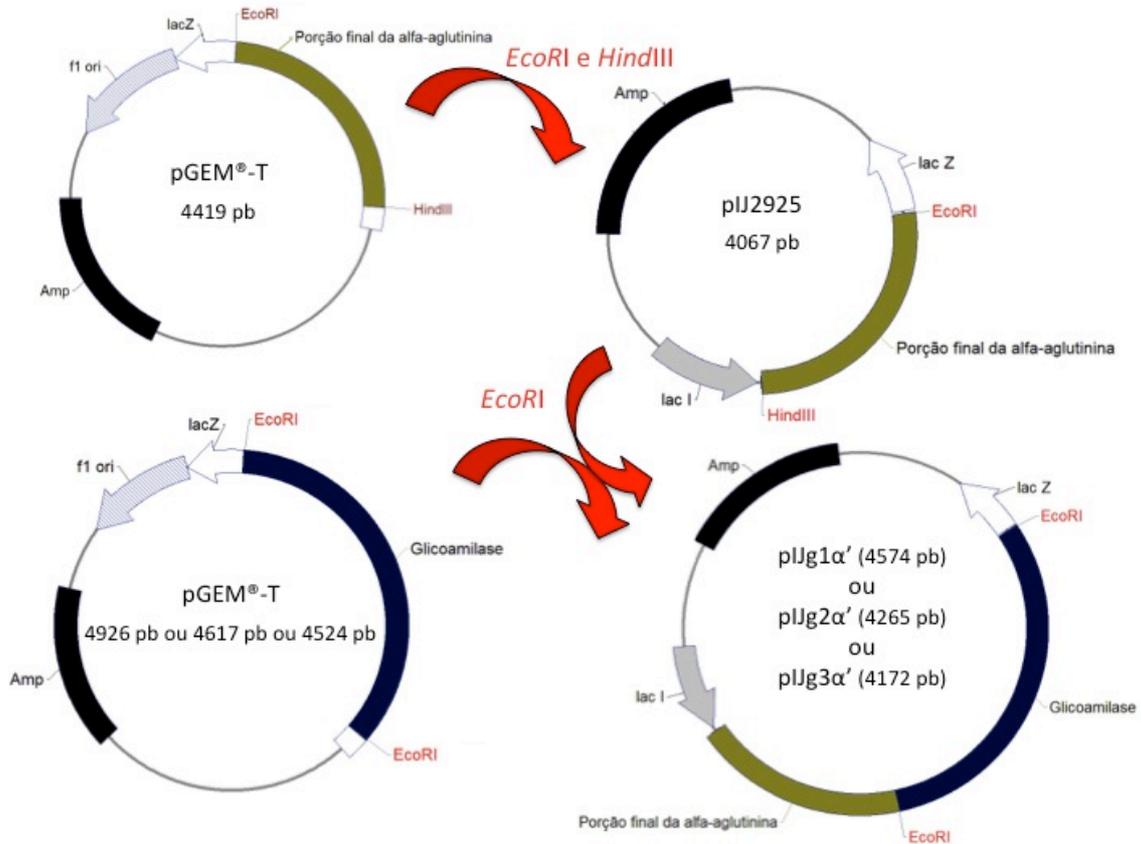


**Figura 24.** Análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação por PCR do cDNA da glicoamilase. M: marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs); seta: tamanhos das bandas de DNA do marcador de massa molecular.

Todos os três fragmentos foram amplificados corretamente: o fragmento gla1, de 1926 pb, próximo à banda de 2 kb do marcador de massa molecular; o fragmento gla2, de 1617 pb, um pouco acima da banda de 1,5 kb do marcador de massa molecular; e o fragmento gla3, de 1524 pb, também próximo à banda de 1,5 kb do marcador de massa molecular.

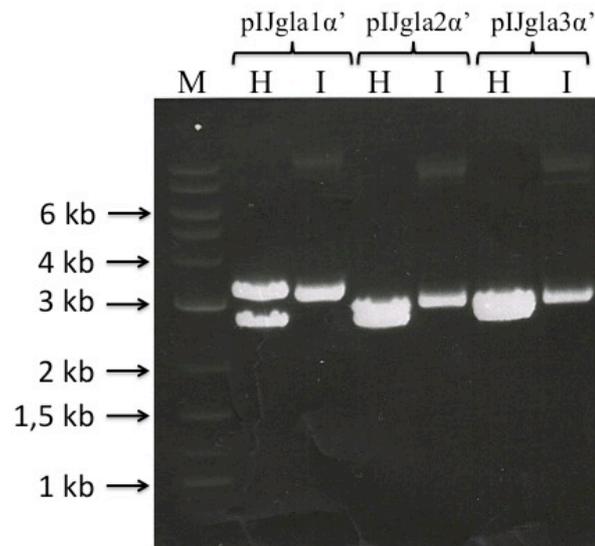
## 2.2 Construção da fusão no vetor pIJ2925

Após amplificação de cada uma das regiões do cDNA da glicoamilase, a estratégia utilizada para formar a fusão à porção final da  $\alpha$ -aglutinina foi a mesma utilizada para a produção da fusão entre esta e a  $\alpha$ -amilase. Primeiro, os produtos de PCR foram adenilados e clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) e, então, a fusão foi construída no vetor pIJ2925, formando os vetores pIJgla1 $\alpha'$ , pIJgla2 $\alpha'$  e pIJgla3 $\alpha'$  para cada uma das formas da glicoamilase. Essa estratégia está ilustrada na figura 25. Para essas construções foi utilizada apenas o fragmento de 1,4 kb da  $\alpha$ -aglutinina, pois, no início dessas construções, acreditava-se que a porção menor da  $\alpha$ -aglutinina não era suficiente para manter a estabilidade da fusão gênica, com base nos resultados obtidos para a  $\alpha$ -amilase.



**Figura 25.** Estratégia de clonagem para a construção da fusão entre os três fragmentos do cDNA da glicoamilase e a porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina no vetor pIJ2925.

A figura 26 abaixo mostra a confirmação da construção da fusão no vetor pIJ2925 pela digestão com a enzima de restrição *HindIII*. Os três vetores construídos foram digeridos com essa enzima e era esperado a liberação da fusão inteira, já que existe um sítio para *HindIII* apenas em uma das extremidades de cada um dos genes fusionados, como pode ser observado na figura 25.

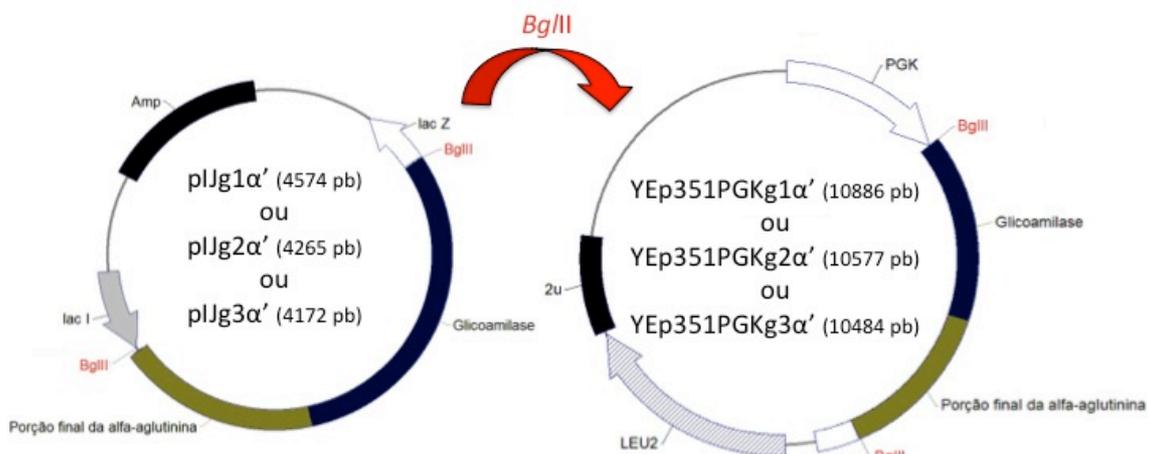


**Figura 26.** Análise por eletroforese em gel de agarose da digestão com *Hind*III dos vetores pIJgla1 $\alpha$ ' , pIJgla2 $\alpha$ ' e pIJgla3 $\alpha$ '. M: marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs); seta: tamanhos dos fragmentos de DNA do marcador de massa molecular; H: digestão com *Hind*III; I: intactos das respectivas amostras.

Observa-se na figura 26 que as três fusões foram construídas de forma correta. Na construção com gla1 foram liberados os fragmentos de 2,7 kb (tamanho do vetor pIJ2925) e de aproximadamente 3,3 kb da fusão da porção final da  $\alpha$ -aglutinina com o fragmento gla1 da glicoamilase, vistos no gel de agarose como bandas um pouco abaixo do fragmento de 3 kb do marcador de massa molecular e um pouco acima do fragmento de 3 kb do marcador de massa molecular, respectivamente. Para a construção com o fragmento gla2 foram liberados os fragmentos de 2,7 kb e aproximadamente 3 kb, respectivamente, o vetor e a fusão com gla2, que aparecem no gel de agarose como bandas um pouco abaixo da banda de 3 kb do marcador de massa molecular e na mesma altura dessa banda. E para a construção com o fragmento gla3 é vista apenas uma banda, pois a diferença de tamanho entre a fusão e o vetor é de aproximadamente 200 pb e a grande quantidade de material no gel de agarose dificultou a delimitação das bandas. Neste último caso, mesmo muito próximos, os fragmentos também encontram-se nos tamanhos corretos: 2,7 kb do vetor e aproximadamente 2,9 kb da fusão com gla3, um pouco abaixo da banda de 3 kb do marcador de massa molecular.

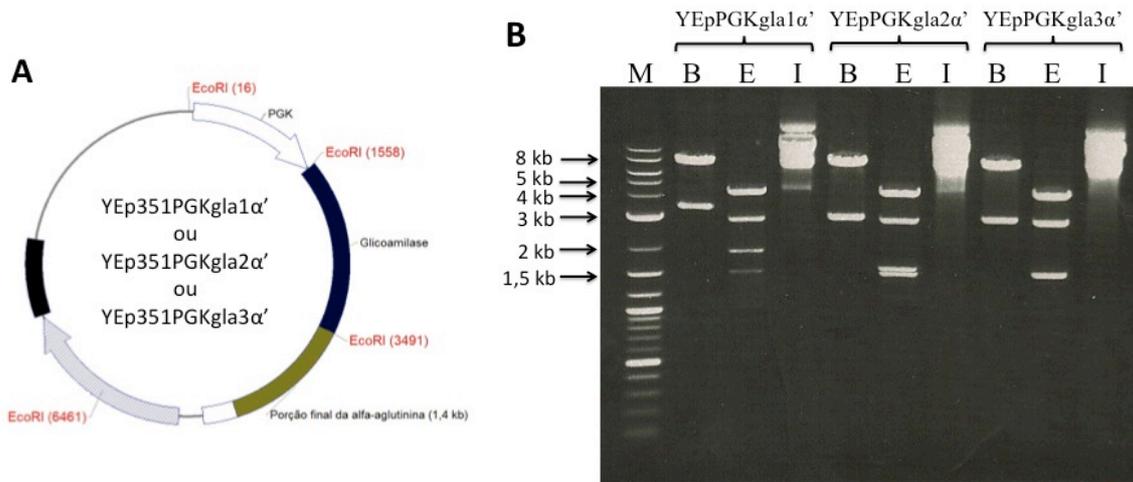
### 2.3 Construção do vetor de expressão em levedura

Após a construção da fusão, os fragmentos de interesse foram clonados no vetor de expressão em levedura. Tanto o YEp351PGK como o pIJgla1 $\alpha'$ , o pIJgla2 $\alpha'$  e o pIJgla3 $\alpha'$  foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl*II. Os vetores de expressão em levedura produzidos foram chamados YEp351PGKgla1 $\alpha'$ , YEp351PGKgla2 $\alpha'$  e YEp351PGKgla3 $\alpha'$ , respectivamente, para as construções com o fragmento gla1, gla2 e gla3, todos fusionados à porção final da  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb. A figura 27 abaixo ilustra essa estratégia.



**Figura 27.** Estratégia de clonagem utilizada para os vetores de expressão em levedura das construções contendo o gene da glicoamilase.

A figura 28 mostra a digestão das três construções com *Eco*RI e *Bgl*II para confirmar a presença do inserto no vetor YEp351PGK. A digestão com *Bgl*II libera o inserto e comprova apenas a clonagem do fragmento de tamanho esperado. A digestão com *Eco*RI permite a verificação da orientação do inserto em relação ao promotor PGK do vetor. No esquema em A da figura 21, o fragmento de glicoamilase representado é o gla1, então os sítios de *Eco*RI nas posições 3491 e 6461 ficam, respectivamente, nas posições 3182 e 6152, para gla2, e 3089 e 6059, para gla3.



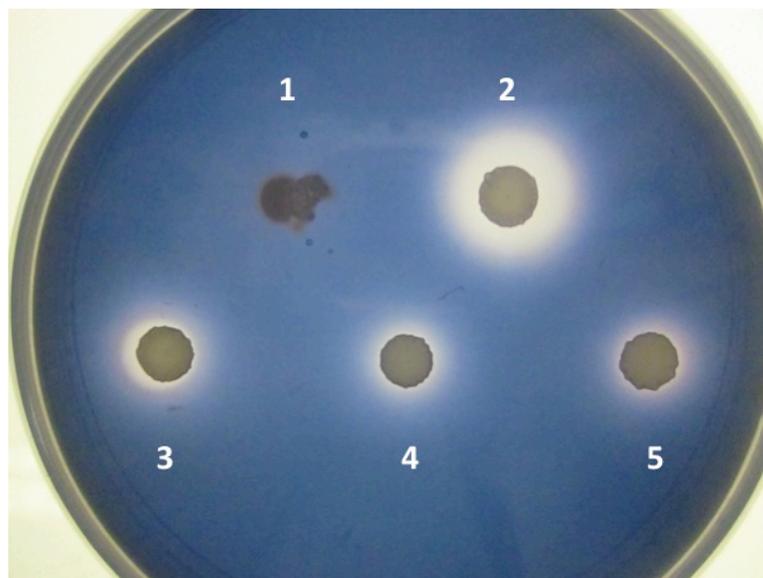
**Figura 28.** Perfil e análise das digestões dos vetores de expressão em levedura dos clones produtores de glicoamilase. A: Esquema do perfil de digestão da enzima de restrição *EcoRI* nos vetores YEp351PGKgla1 $\alpha'$ . B: Análise por eletroforese em gel de agarose da digestão com *BglII* e com *EcoRI* dos vetores YEp351PGKgla1 $\alpha'$ , YEp351PGKgla2 $\alpha'$  e YEp351PGKgla3 $\alpha'$ . Números ao lado dos nomes das enzimas nos vetores: posição dos sítios de clivagem; M: marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs); seta: tamanhos dos fragmentos do marcador de massa molecular; B: digestão com *BglII*; E: digestão com *EcoRI*; I: intactos das respectivas amostras.

Nota-se pela figura 21 que os insertos foram clonados corretamente, já que na digestão com *BglII* observa-se uma banda de aproximadamente 7,5 kb (vetor) e outra menor de aproximadamente 3,3 kb, ou 3 kb, ou 2,9 kb, respectivamente, as construções com gla1, gla2 e gla3. Esse perfil foi resultado de sítios para esta enzima nas duas extremidades do inserto. A digestão com *EcoRI* apresenta o perfil de bandas com tamanhos de 1542 pb, 1926 pb ou 1617 pb ou 1524 pb (fragmento gla1, gla2 ou gla3, respectivamente), 2970 pb e 4450 pb. Na digestão de YEp351PGKgla3 $\alpha'$  com *EcoRI* não é possível distinguir os fragmentos de 1542 pb e 1524 pb por serem muito próximos, e aparecem na figura 21-B como uma banda única próxima à banda de 1,5 kb do marcador de massa molecular.

Os vetores de expressão construídos foram utilizados para transformar a linhagem MFL de *S. cerevisiae*. Os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescer em meio mínimo sem leucina e produzir halos de hidrólise em meio contendo amido.

## 2.4 Análise dos halos de hidrólise em placa

As placas resultantes da transformação foram analisadas com coloração por vapor de iodo para visualização dos halos de hidrólise do amido em torno das colônias. Um clone de cada construção foi selecionado. A figura 29 mostra a placa de meio mínimo corada com vapor de iodo contendo os clones selecionados, um clone secretor de glicoamilase e um clone controle negativo (MFL transformada com vetor YEp351PGK sem o cDNA da glicoamilase). O clone secretor de glicoamilase foi a linhagem MFL transformada com o vetor pPG, que secreta glicoamilase completa, igual ao fragmento gla1, sob o controle do promotor PGK, sem a fusão à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina (Moraes *et al.*, 1995).



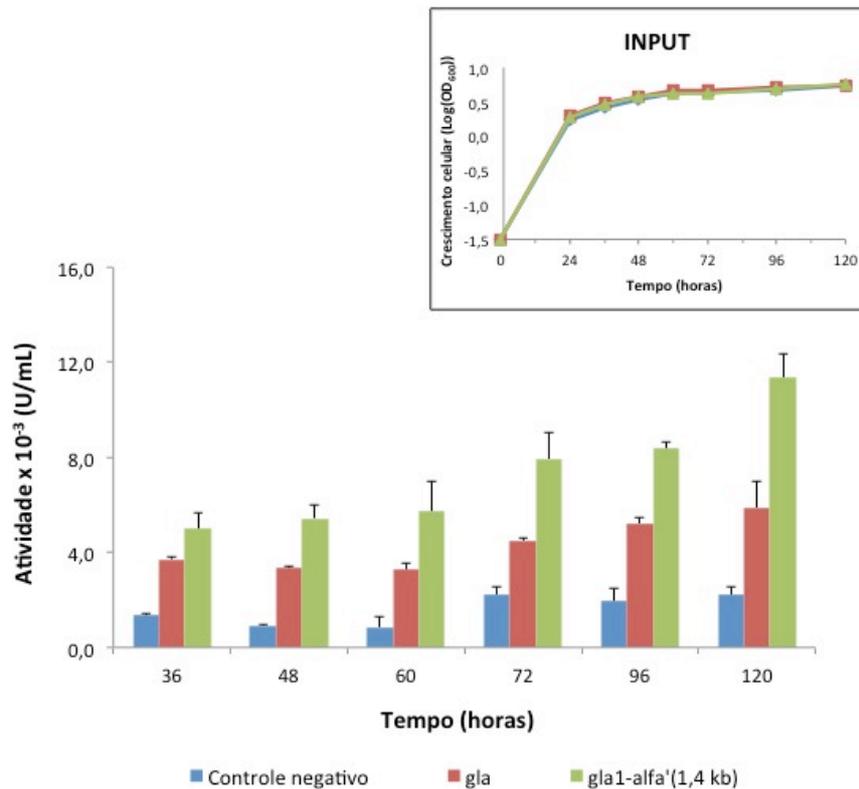
**Figura 29.** Análise da atividade amilolítica em placa dos clones produtores de glicoamilase. Placa de meio mínimo contendo 1% de amido crescida a 30°C por 5 dias e corada com vapor de iodo mostrando os halos de hidrólise produzidos pela glicoamilase. 1 = MFL/YEp351PGK (controle negativo); 2 = MFL/pPG; 3 = MFL/YEp351PGKgla1 $\alpha$ '; 4 = MFL/YEp351PGKgla2 $\alpha$ '; 5 = MFL/YEp351PGKgla3 $\alpha$ '.

Nota-se a diminuição dos halos de hidrólise em volta das colônias dos clones contendo as fusões da glicoamilase com a região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina quando comparado ao halo do clone secretor de glicoamilase, não ancorada na parede celular, como esperado. As três formas de glicoamilase apresentaram diminuição dos halos. O controle negativo não apresentou halo

de hidrólise de amido, pois não tinha atividade amilolítica. As placas contendo os clones produtores de glicoamilase foram incubadas para crescimento por mais tempo do que as placas contendo os clones produtores de  $\alpha$ -amilase, pois a glicoamilase hidrolisa o amido mais lentamente que a  $\alpha$ -amilase. Por ser uma exoamilase, a glicoamilase precisa de extremidades não redutoras livres para atuar, o que não está disponível em grande quantidade em um substrato rico em amilose, utilizado no trabalho, sem tratamento prévio com outras enzimas (Moraes, 2004).

## **2.5 Análise quantitativa da atividade em meio líquido**

O teste de atividade em meio líquido foi feito para quantificar a atividade dos clones escolhidos e se realmente a atividade enzimática associada às células era maior que no sobrenadante (glicoamilase secretada). O teste também foi necessário para avaliar qual das três formas da proteína apresentava maior atividade associada à célula quando comparadas entre si. Esse teste foi feito apenas em duplicata. Os resultados das atividades associadas às células para comparação do clone secretor de glicoamilase e do clone contendo a fusão da glicoamilase completa (gla1) à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina são mostrados na figura 30. A análise estatística não é mostrada no gráfico porque não foi observada diferença significativa entre os valores de atividade em nenhum ponto mensurado.

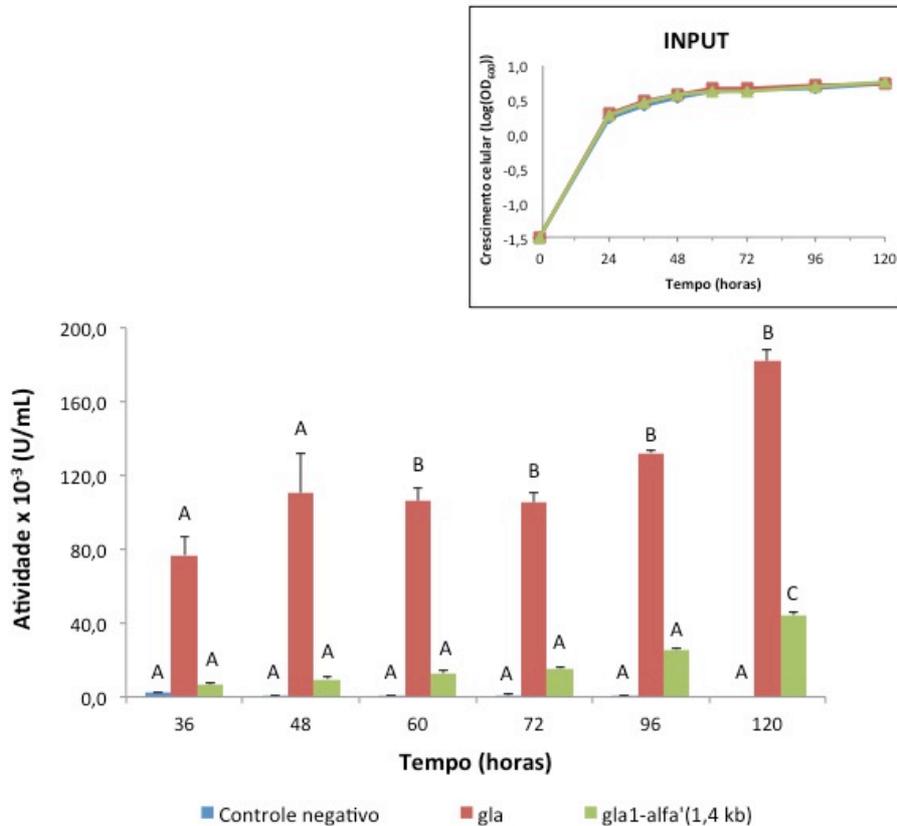


**Figura 30.** Atividade de glicoamilase associada às células. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; gla: MFL/pPG; gla1-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla1 $\alpha'$ ; barras: erro padrão das amostras; INPUT: crescimento celular dos clones em Log(OD<sub>600</sub>).

O clone secretor de glicoamilase e o clone contendo a fusão de gla1 à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina apresentaram atividade amilolítica associada à célula, e este último apresentou atividade maior ainda que o primeiro, como esperado. Porém, quando analisados estatisticamente, não mostram diferença significativa em nenhum momento por causa do grau de variância encontrado, indicando que em algum ponto os valores encontrados para os clones com atividade amilolítica se assemelham ao controle negativo e não apresentam atividade.

Nota-se que o clone secretor de glicoamilase apresentou atividade associada às células, mesmo não tendo um sistema de adesão celular genético, comportamento também observado para o clone contendo a fusão entre a  $\alpha$ -amilase e glicoamilase (ver figura 16). Outro indício que possivelmente a glicoamilase tem alguma interação com a parede da levedura que mantém a enzima próxima à célula.

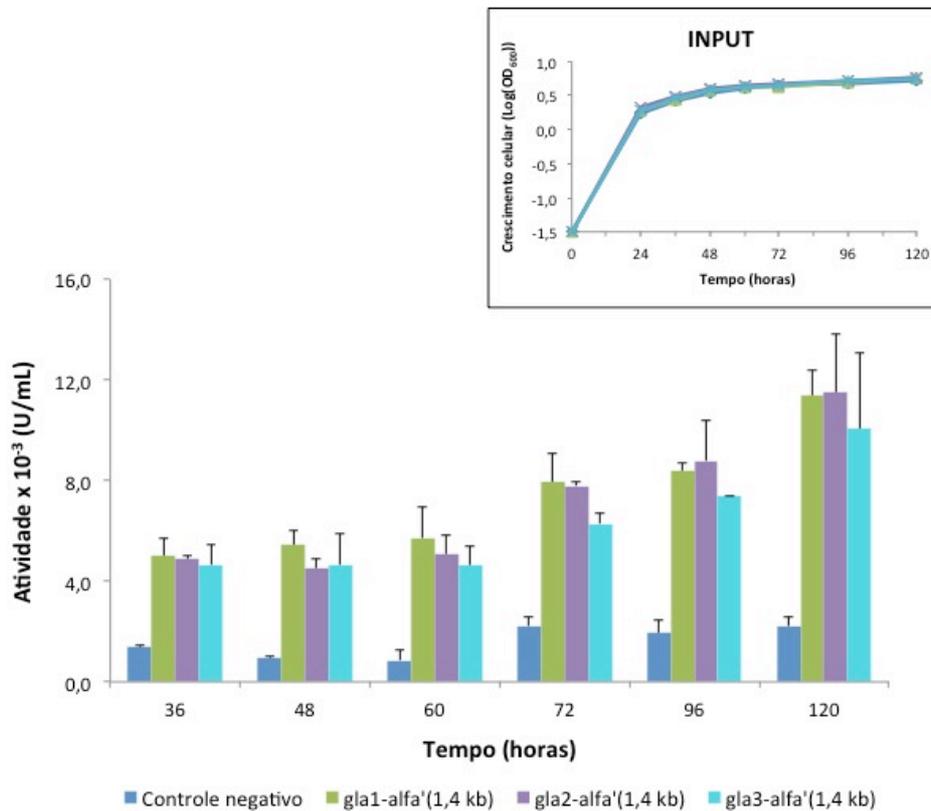
A atividade foi dosada também no sobrenadante de cultura. A dosagem dessa atividade é mostrada na figura 31. A análise estatística aparece sobre as barras do gráfico.



**Figura 31.** Atividade de glicoamilase dosada no sobrenadante das culturas. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; gla: MFL/pPG; gla1-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla1 $\alpha'$ ; barras: erro padrão das amostras; letras: análises estatísticas; INPUT: crescimento celular dos clones em Log(OD<sub>600</sub>).

Quanto à atividade dosada no sobrenadante das culturas, observou-se que o clone secretor de glicoamilase apresentou maior atividade do início ao fim do ensaio. Era esperado que esse clone apresentasse maior atividade no sobrenadante que o clone contendo a fusão, já que ele secreta a enzima para o meio. Também foi encontrada atividade amilolítica no sobrenadante de cultura do clone contendo a fusão, embora essa atividade não tenha apresentado diferença estatística dos valores encontrados para o controle negativo. Nota-se na figura 31 que a atividade do clone contendo a fusão aumenta ao longo do tempo, e no último ponto, 120 horas, é considerado estatisticamente diferente do controle negativo.

As três construções com os diferentes fragmentos de glicoamilase foram comparados entre si para testar se algum deles apresentava maior eficiência na hidrólise do amido. A figura 32 apresenta os dados obtidos no teste de atividade em meio SD líquido associada à célula e a figura 33 os dados obtidos na dosagem do sobrenadante de cultura.

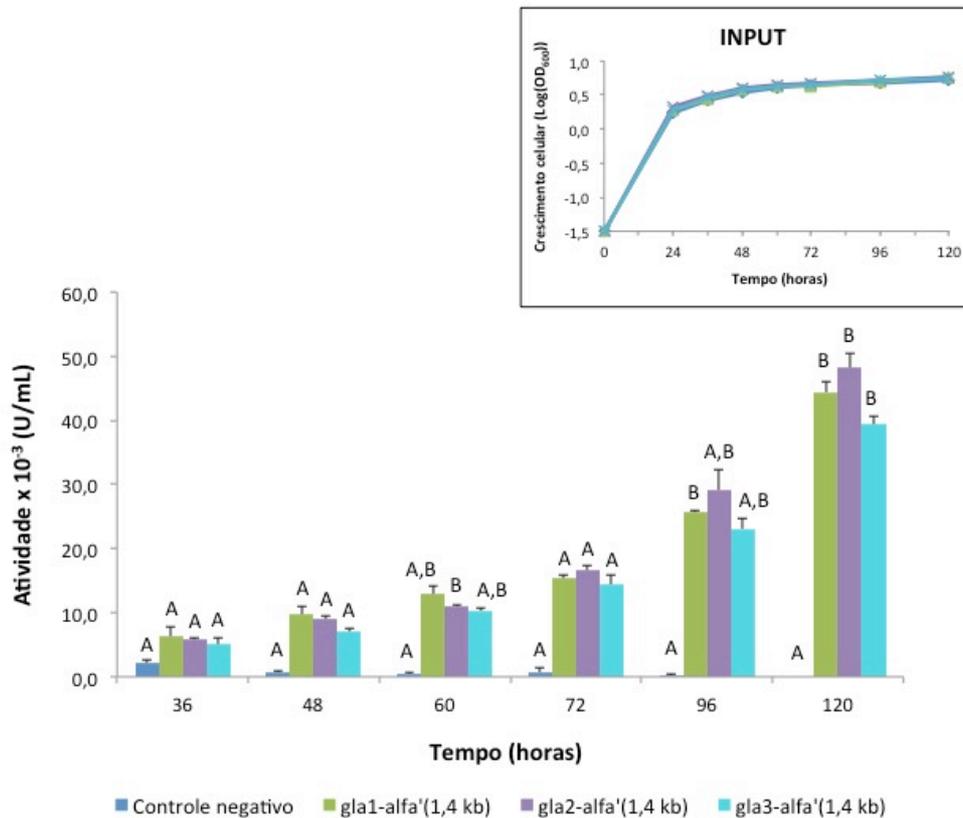


**Figura 32.** Atividade amilolítica associada às células dos clones contendo as diferentes formas de glicoamilase. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; gla1-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla1 $\alpha$ '; gla2-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla2 $\alpha$ '; gla3-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla3 $\alpha$ '; barras: erro padrão das amostras; INPUT: crescimento celular dos clones em Log(OD<sub>600</sub>).

Todos os clones contendo os diferentes fragmentos de glicoamilase fusionados à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina apresentaram atividade associada à célula, e em todos os pontos coletados mantiveram atividade semelhante. Porém, houve uma variância grande em torno das médias e a diferença nos valores encontrados entre os clones produtores de glicoamilase e o controle negativo não foi significativa estatisticamente.

Na figura 32, nota-se que a maior atividade é encontrada para todos os clones em 120 horas, mas é nesse ponto que os erros são maiores, e

admitindo essa variação, a atividade se iguala à atividade dosada nos tempos de 72 horas e 96 horas. Pode-se dizer que existe a manutenção relativamente constante da atividade amilolítica associada à célula de 72 horas a 120 horas. Esse fato é corroborado com o aumento da densidade celular, que começa a estabilizar a partir de 60 horas.



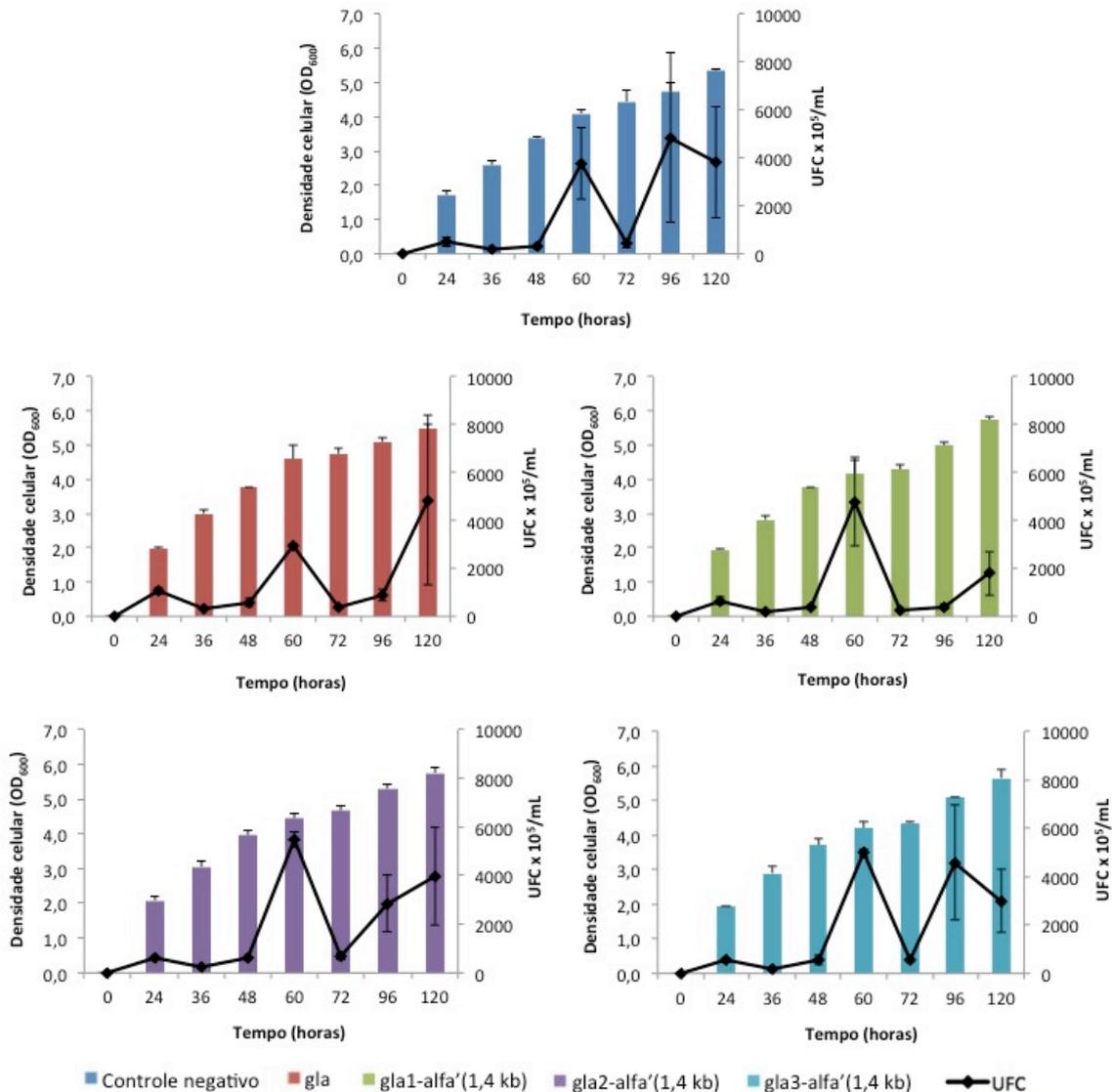
**Figura 33.** Atividade amilolítica dosada no sobrenadante de cultura dos clones contendo as diferentes formas de glicoamilase. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; gla1-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla1 $\alpha$ '; gla2-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla2 $\alpha$ '; gla3-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla3 $\alpha$ '; barras: erro padrão das amostras; letras: análises estatísticas; INPUT: crescimento celular dos clones em Log(OD<sub>600</sub>).

Mais uma vez a atividade encontrada no sobrenadante de cultura foi maior que a atividade encontrada associada às células. Todos os três clones contendo a glicoamilase fusionada à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina apresentaram atividade similar no sobrenadante, sem grandes diferenças entre si. Em alguns pontos coletados a atividade encontrada é diferente estatisticamente do controle negativo.

A maior atividade observada para todos os clones foi em 120 horas, e observa-se um aumento dessa atividade ao longo do tempo de cultivo. O que

pode contribuir para esse aumento de atividade é a morte celular, quando as enzimas presas na parede das células mortas são liberadas para o meio.

Para verificar se estava ocorrendo morte celular e possivelmente a liberação de enzimas antes presa à parede no meio de cultura, foi feito o teste de viabilidade celular. As UFCs foram contadas e as placas coradas para verificar quais colônias ainda produziam halo de hidrólise. A figura 34 mostra a contagem de UFC relacionada a densidade celular para cada clone.



**Figura 34.** Contagem de UFC das culturas produtoras de glicoamilase durante o crescimento em meio líquido. Controle negativo: MFL/YEp351PGK; gla: MFL/pPG; gla1-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla1 $\alpha$ '; gla2-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla2 $\alpha$ '; gla3-alfa'(1,4 kb): MFL/YEp351PGKgla3 $\alpha$ '; barras: erro padrão das amostras.

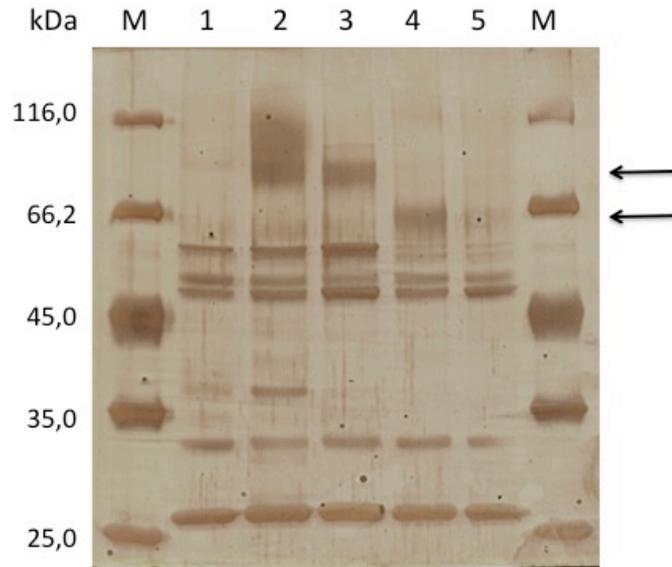
Em quase todos os clones a maior concentração de células viáveis foi encontrada em 60 horas, quando a leitura da densidade celular começa a estabilizar. Para os outros clones foi em 96 horas ou 120 horas. Porém, nesse último caso, os valores para UFC tiveram uma variação muito alta, o que pode ser observado como barras de erro muito grandes no gráfico da figura 34, o que indica que o valor encontrado pode ser bem maior ou bem menor do que a média mostrada.

A contagem de UFC mostra que é possível que as células estejam morrendo e a enzima liberada para o meio, pois em 60 horas, ponto de maior viabilidade celular para a maioria dos clones, a leitura de densidade celular começa a estabilizar, indicando que a partir desse ponto ocorreu pouco crescimento celular e a manutenção da densidade celular associada à diminuição de células viáveis (queda de UFC em 72 horas) indica que existem células mortas no meio.

Em todos os pontos, todas as colônias das placas produziram halos de hidrólise, indicando que ainda estavam expressando a glicoamilase ativa. Com exceção do controle negativo que não possuía atividade amilolítica.

## **2.6 Análise do perfil secretório por SDS-PAGE**

Como foi observada atividade de glicoamilase no sobrenadante de cultura, assim como os testes feitos para as construções contendo  $\alpha$ -amilase, foi feito um SDS-PAGE para avaliar como a glicoamilase estava sendo expressa no meio de cultura. Os clones foram crescidos em meio SD líquido e o extrato bruto concentrado. Foram analisados os sobrenadantes de cultura de todos os clones contendo as construções com a fusão à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina, do clone secretor de glicoamilase e do controle negativo. O gel SDS-PAGE é mostrado na figura 35.



**Figura 35.** SDS-PAGE do sobrenadante da cultura das construções contendo glicoamilase. As culturas foram crescidas durante 5 dias em meio SD e o SDS-PAGE corado com prata. 1: MFL/YEp351PGK (controle negativo); 2: MFL/pPG; 3: MFL/YEp351PGKgla1 $\alpha$ '; 4: MFL/YEp351PGKgla2 $\alpha$ '; 5: MFL/MFL/YEp351PGKgla3 $\alpha$ '; M = marcador de proteína Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific); setas: cada uma das formas de glicoamilase.

Nota-se no SDS-PAGE da figura 35 duas bandas que não estão no extrato bruto do controle negativo: uma entre as banda 116,0 kDa e 66,2 kDa do marcador de massa molecular, que aparece nos sobrenadantes de cultura do clone secretor de glicoamilase e na construção com gla1; e outra na altura da banda de 66,2 kDa do marcador de massa molecular, que aparece nos sobrenadantes de cultura dos clones com as construções com gla2 e gla3 (indicadas pelas setas na figura 35). A glicoamilase completa tem massa de 68 kDa, mas aparece no gel de poliacrilamida com maior massa. Provavelmente por causa das glicosilações que ocorrem em *S. cerevisiae*, assim como mostrado nos resultados para as construções com a  $\alpha$ -amilase. O mesmo foi observado com as formas menores, construções com gla2 e gla3, que possuem massa de 57 kDa e 54 kDa, respectivamente. As duas proteínas aparecem no SDS-PAGE na altura da banda de 66,2 kDa do marcador de massa molecular.

Também pode ser observado que a glicoamilase secretada e a glicoamilase da fusão entre gla1 e a porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina, figura 35 clones 2 e 3, respectivamente, aparecem no gel de poliacrilamida na mesma

altura. O que indica que a glicoamilase está sendo clivada da região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina e está sendo expressa em seu tamanho original.

## 2.7 Sequenciamento das construções

Por último, as construções foram analisada em eletroferograma para ver se havia alguma mutação que estivesse impedindo a expressão correta das proteínas.

No sequenciamento das fusões contendo de gla1 e gla2 não foi possível caracterizar o cDNA da glicoamilase de forma contínua, pois a sequência era de grande extensão e não foi feito um oligonucleotídeo interno que anelasse no meio, figuras 48 e 49 no anexo 3, respectivamente. Já para a fusão contendo gla3 quase todo o cDNA foi caracterizado continuamente, figura 50 no anexo 3.

Em todos os sequenciamentos foi confirmada uma mutação no cDNA da glicoamilase na posição 506, uma troca de adenina por guanina. Essa troca de nucleotídeo não gera troca no aminoácido, continua codificando um resíduo de glutamina, mutação silenciosa. No sequenciamento das construções com gla2 e gla3 aparece mais uma mutação no cDNA da glicoamilase, que não aparece na construção com gla1 porque essa região não foi caracterizada. Ocorre uma troca de uma citosina por uma adenina, que causa a mudança de um resíduo de treonina por um de asparagina. Os dois são aminoácidos pertencentes ao grupo dos polares neutros, e a troca de um pelo outro provavelmente não determina alteração conformacional da proteína.

A primeira mutação citada (troca de adenina por guanina) aparece no sequenciamento do cDNA de glicoamilase usado como molde para a amplificação por PCR, o fragmento clonado no vetor pPG, vetor que também é usado no transformante secretor de glicoamilase (resultado não mostrado). O que confirma que não é uma mutação que fez diferença na atividade da enzima. A segunda mutação está em uma região que não foi caracterizada do cDNA molde, então não se sabe que diferença ela causa realmente.

Aparecem mais duas mutações na caracterização dos clones contendo a construção da glicoamilase fusionada à região final da  $\alpha$ -aglutinina, as duas já encontradas no sequenciamento da construção contendo a  $\alpha$ -amilase. São

modificações nos 444 pb finais da  $\alpha$ -aglutinina, que se encontram após o códon de terminação da tradução e não é traduzido. Portanto, essas mutações possivelmente não alteram a proteína.

## CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados conclui-se que a  $\alpha$ -amilase foi aderida à parede celular da levedura quando fusionada à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina que continha a sequência sinal para adição da âncora de GPI. Os clones com essa fusão apresentaram atividade associada à célula significativamente maior do que a atividade dosada no controle negativo e no clone secretor de  $\alpha$ -amilase. Entretanto, a maior parte da  $\alpha$ -amilase produzida ainda é secreta para o sobrenadante de cultura mesmo nos clones fusionados à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina. O SDS-PAGE e o zimograma indicam que a maior parte da  $\alpha$ -amilase produzida está sendo clivada da cauda de  $\alpha$ -aglutinina e é secretada para o meio com a mesma massa da  $\alpha$ -amilase secretada sem estar fusionada a nenhuma proteína.

O mesmo aconteceu quando as construções foram transformadas na linhagem CENPK2 de *S. cerevisiae*. A maior atividade amilolítica foi detectada no sobrenadante de cultura. A clivagem dos dois peptídeos não é causada por alguma característica intrínseca da MFL.

A  $\alpha$ -amilase reduzida (codificada pelo fragmento de 1,5 kb), sem o domínio de ligação ao amido, secretada para o meio sem nenhuma fusão, parece não ser estável quando expressa em *S. cerevisiae*. Apresentou valores de atividade muito baixos e em momento algum mostrou valores com diferença significativa do controle negativo. A fusão a outros peptídeos parece ter influência na estabilidade da  $\alpha$ -amilase truncada.

Apesar de apresentar atividade amilolítica associada à célula, não foi observada diferença significativa das construções contendo a glicoamilase para o controle negativo, e não foi possível determinar se a glicoamilase foi eficientemente aderida à parede celular da levedura. As construções contendo a fusão da glicoamilase à porção C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina também apresentaram maior atividade no sobrenadante de cultura. A morte celular e a liberação de enzimas para o meio pode ser um dos motivos que contribui para

essa maior atividade, já que o número de células viáveis cai após 60 horas, momento em que a atividade observada no sobrenadante de cultura é maior.

Pela análise por SDS-PSGE é possível observar que a glicoamilase está sendo expressa para o meio de cultura separada da cauda de  $\alpha$ -aglutinina, pois aparece na mesma altura da glicoamilase sem fusão alguma.

Quando comparados entre si, as construções com os diferentes fragmentos de glicoamilase fusionada à região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina não apresentaram diferença significativa, tanto associada à célula quanto no sobrenadante de cultura. As partes excluídas das sequências não influenciam na atividade quando a enzima está associada à cauda de  $\alpha$ -aglutinina.

## PERSPECTIVAS

Para as próximas etapas do trabalho, o primeiro experimento a ser concluído é o teste de atividade em meio líquido da glicoamilase. Falta o último ensaio para que os dados sejam apresentados em triplicata.

Espera-se descobrir a razão da clivagem da fusão, tanto para a  $\alpha$ -amilase quanto para a glicoamilase. Para tanto, serão avaliadas as sequências das proteínas produzidas para verificar a presença de um possível sítio de proteases encontradas em *S. cerevisiae*, além de Kex2. As enzimas serão purificadas para confirmação da clivagem em SDS-PAGE e seu C-terminal sequenciado para determinar em que ponto ocorre a clivagem.

Outra meta importante é a determinação do motivo da perda de atividade do clone contendo a  $\alpha$ -amilase secretada sem nenhuma fusão. Deverá ser feita a caracterização da sequência completa da  $\alpha$ -amilase contendo o códon de terminação da tradução. Se não houver nenhuma mutação, deverá ser feita a comparação da atividade da  $\alpha$ -amilase reduzida com a  $\alpha$ -amilase completa, que contém o domínio de ligação ao amido. Esse teste servirá para verificar se a fusão com a região C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina realmente aumenta a atividade da enzima ou se é a falta do domínio de ligação ao amido que diminui a atividade e a fusão a outro peptídeo apenas restaura os níveis originais de atuação.

Uma vez confirmado o aumento de atividade da  $\alpha$ -amilase quando fusionada à  $\alpha$ -aglutinina, serão feitos testes para explicar a razão do aumento dessa atividade nos clones contendo essa fusão. Deverá ser avaliada a estabilidade do mRNA e se houve mudança conformacional da enzima devido a presença da  $\alpha$ -aglutinina, esses testes podem ser feitos com as técnicas de PCR quantitativo e espectroscopia de fluorescência junto com dicroísmo circular, respectivamente.

Após essas etapas, os melhores clones produtores de  $\alpha$ -amilase e glicoamilase serão utilizados para fermentação e avaliação da eficiência na produção de enzimas e de etanol a partir de amido.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALLEN, M. J; COUTINHO, P. M; FORD, C. F. 1998. Stabilization of *Aspergillus awamori* glucoamylase by proline substitution and combining stabilizing mutations. *Protein Eng.*, 11: 783-788.
- ARRUDA, A. *Utilização do promotor do gene PGK1 de Pichia pastoris para expressão heteróloga*. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- BEGGS, J. D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, 275: 104-109.
- BEYNUM, G. M. A. 1980. Immobilized biocatalysts. *Biotechnology Letters*, 2: 127-132.
- BIRNBOIM, H.C; DOLLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids res.*, 7: 1513-1523.
- BLUM, H; BEIER, H; GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- BODER, E. T; WITTRUP, K. D. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 15: 553-557.
- BOEL, E; HJORT, I; SVENSSON, B; NORRIS, F; NORRIS, K. E; FILL, N. P. 1984. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.*, 3: 1097-1102.
- BROACH, J. R. 1983. Construction of high copy vectors using 2  $\mu$ m circle sequences. *Methods Enzymol*, 101: 307-325.

- CABELLO, C. 2005. Produção de álcool da mandioca. *Revista ABAM*, ano II, nº 10.
- CAPPELLARO, C; HAUSER, K; MRSA, V; WATZELE, M; WATZELE, G; GRUBER, C; TANNER, W. 1991. *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ - and  $\alpha$ -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J.*, 10: 4081-4088.
- CARDONA, C. A; QUINTERO, J. A; PAZ, I. C. 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101: 4754-4766.
- CHISWELL, D. J; McCAFFERTY, J. 1992. Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol*, 10: 80-84.
- 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.*, 69: 2110-2114.
- CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. England: Ellis Horwood, 1985. v.10, p.12-50.
- DEAN, N. 1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426: 309-322.
- DEMIRBAS, M. F; BALAT, M; BALAT, H. 2009. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Conversion and Management*, 50:1746–1760
- DEMIRBAS, A. 2011. Competitive liquid biofuels from biomass. *Applied Energy*, 88: 17–28

- DOBSON, M. J; TUIITE, M. F; ROBERTS, N. A; KINGSMAN A. J; KINGSMAN, S. M; PERKINS, R. E; CONROY, S. C; DUNBAR, B; FOTHERGILL, L. A. 1982. Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 10(8): 2625-2637.
- DUSTIN, M. L; SELVARAJ, P; MATTALIANO R. J; SPRINGER T. A. 1987. Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature*, 329: 846-848.
- EVANS, R; FORD, C; SIERKS, M; NIKOLOVC, Z; SVEASSON, R. 1990. Activity and thermal stability of genetically truncated forms of *Aspergillus glucoamylase*. *Gene*, 91(1): 131-134.
- FANG, T. Y; FORD, C. 1998. Protein engineering of *Aspergillus awamori* glucoamylase to increase its pH optimum. *Protein Eng.* 11(5): 383-388.
- FIEROBE, H. P; MIRGORODSKAYA, E; FRANDBSEN, T. P; ROEPSTORFF, P; SVENSSON, B. 1997. Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-type and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts. *Protein Expr. Purif.*, 9(2): 159-170.
- FITZSIMON, R; MORAES, L. M. P; SIÑERIZ, F; LUCCA, M. E. 2004. Evaluation of Starch Fermentation Products by Amylolytic Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(5): 155-159.
- FUTCHER, A. B; COX, B. S. 1983. Maintenance of the 2  $\mu$ m circle plasmid in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 154: 612-622.

- FUWA, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *The Journal of Biochemistry*, 41(5): 583-603.
- GEORGIU, G; POETSCHKE, H. L; STATHOPOULOS, C; FRANCISCO, J. A. 1993. Practical applications of engineering gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol*, 11: 6-10.
- GIANNINI, R. A. 2012. Etanol de milho no Brasil: uma oportunidade estratégica de renda e desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.simtec.com.br/web/port/palestras/2012/Ricardo%20Giannini%20-%20Consultoria%20Celeres.pdf>>.
- GRAEL, E. *Análise da expressão do gene de  $\alpha$ -amilase de Bacillus subtilis em bactérias recombinantes*. 1989. Dissertação. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- HAHN-HÄGERDAL, B; GALBE, M; GORWA-GRAUSLUND, M. F, LIDÉN, G; ZACCHI, G. 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24: 549-556.
- HARDWICK, K. G; BOOTHROYD, J. C; RUDNER, A. D; PELHAM, H. R. B. 1992. Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO J*, 11: 4187-4195.
- HOMANS, S. W; FERGUSON, M. A; DWEK, R. A; RADEMACHER, T. W; ANAND, R; WILLIAMS, A. F. 1988. Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*, 333: 269-272.
- JANSSEN, G. R; BIBB, M. J. 1993. Derivatives of pUC18 that have *Bgl*II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. *Gene*, 124: 133-134.

- KHAW, T. S; KATAKURA, T; KOH, J; KONDO, A; UEDA, M; SHIOYA, S. 2006. Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains for direct ethanol production from raw starch. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70: 573–579.
- KLIS, F. M; MOL, P; HELLINGWERF, K; BRUL, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 239-256.
- KOLLAR, R; REINHOLD, B. B; PETRAKOVA, E; YEH, H. J; ASHWELL, G; DRGONOVA, J; KAPTEYN, J. C; KLIS, F. M; CABIB, E. 1997. Architecture of the yeast cell wall: beta(1-6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-3)-glucan, and chitin. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(28): 17762–17775.
- KONDO, A; UEDA, M. 2004. Yeast cell-surface display – applications of molecular display. *Applied Microbiol Biotechnol*, 64: 28-40.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LESAGE, G; BUSSEY, H. 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2): 317–343.
- LEWIN, B. 2009. *Genes IX*. 9. ed. Porto Alegre: Artmed. 912 p.
- LIPKE, P. N; WOJCIECHOWICZ, D; KURJAN, J. 1989. AG $\alpha$ 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol*, 9: 3155-3165.

- LIPKE P. N, KURJAN J. 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev*, 56: 180-194.
- LIU, Y; LU, F; CHEN, G; SNYDER, C. L; SUN, J; LI, Y; WANG, J; XIAO, J. 2010. High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium-temperature  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett*, 32: 119-124.
- LOISON, G; VIDAL, A; FINDELI, A; ROITSCH, C; BALLOUL, J. M; LEMOINE, Y. 1989. High-level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 5(6): 497-507.
- LOPES, T. S; KLOOTWIJK, J; VEENSTRA, A. E; VAN DER AAR, P. C; VAN HEERIKHUIZEN H; RAÚE, H. A; PLANTA, R. J. 1989. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene*, 79: 199-206.
- LU, C. F; KURJAN, J; LIPKE, P. N. 1994. A pathway for cell anchorage of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin. *Mol Cell Biol*, 14: 4825-4833.
- LUCENA, B. T. L; SILVA FILHO, E. A; COIMBRA, M. R. M; MORAIS, J. O. F; SIMÕES, D. A; MORAIS JR., M. A. 2007. Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. *Genetics and Molecular Research*. 6(4): 1072-1084.
- MABEE, W. E. 2007. Policy options to support biofuel production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 329-357.
- MARCO, J. L; BATAUS, L. A; VALENCIA, F. F; ULHOA, C. J; ASTOLFI-FILHO, S; FELIX, C. R. 1996. Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* -amylase produced by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44: 746-752.

- MATSUMOTO, T; FUKUDA, H; UEDA, M; TANAKA, A; KONDO, A. 2002. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl Environ Microbiol*, 68: 4517-4522.
- MELLOR, J; DOBSON, M. J; ROBERTS, N. A; KINGSMAN, A. J; KINGSMAN, S. M. 1985. Factors affecting heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 33: 215-226.
- MIELLENZ, J. R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 324-329.
- MORAES, L. M. P; ASTOLFI-FILHO, S; OLIVER, S. G. 1995. Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express  $\alpha$ -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Applied Microbiol Biotechnol*, 43: 1067-1076.
- MORAES, L. M. P; ASTOLFI FILHO, S; ULHOA, C. J. 1999. Purification and some properties of an  $\alpha$ -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15: 561-564.
- MORAES, L. M. P. 2004. Amilases. Cap. XIII. *In: Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004.
- MURAI, T; UEDA, M; YAMAMURA, M; ATOMI, H; SHIBASAKI, Y; KAMASAWA, N; OSUMI, M; AMACHI, T; TANAKA, A. 1997. Construction of a Starch-Utilizing Yeast by Cell Surface Engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4): 1362-1366.
- MURAI, T; UEDA, M; SHIBASAKI, Y; KAMASAWA, N. 1999. Development of an arming yeast strain for efficient utilization of starch by co-display of sequential amylolytic enzymes on the cell surface. *Applied Microbiol Biotechnol*, 51: 65-70.
- NELSON, D. L; COX, M. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

- NEVOIGT, E. 2008. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3): 379-412.
- NGUYEN, T. H; FLEET, G. H; ROGERS, P. L. 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 206-212
- NOBREGA, G. M. A. *Construção de um novo vetor para caracterização de promotores de leveduras industriais e de laboratório*. 2001. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001 *apud* BORGES, T. F. B. *Construção de um vetor integrativo em múltiplas cópias para Saccharomyces cerevisiae utilizando seqüências delta*. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- NUNBERG, J. H; MEADE, J. H; COLE, G; LAWYER, F. C; MCCABE, P; SCHWEICKART, V; TAL, R; WITTMAN, V. P; FLATGAARD, J. E; INNIS, M. A. 1984. Molecular Cloning and Characterization of the Glucoamylase Gene Of *Aspergillus awamori*. *Molecular and Cellular Biology*, 4(11): 2306-2315.
- OGDEN, J. E; STANWAY, C; KIM, S; MELLOR, J; KINGSMAN, A. J; KINGSMAN, S. M. 1986. Efficient expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGK gene depends on an upstream activation sequence but does not require TATA sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 6(12): 4335-4343.
- OLIVEIRA NETO, O. S. *Identificação e análise funcional de sinais de secreção de Pichia pastoris*. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- OTERO, J. M; PANAGIOTOU, G; OLSSON, L. 2007. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 1-40.

PEREIRA, S. E; ULHOA, C. J; FERNANDES, K. J. Imobilização e caracterização da  $\alpha$ -amilase produzida por *Cryptococcus flavus*. Em 5 Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Programa e Resumos. Resumo S5-02-31, pg. 119, 2002 *apud* MORAES, L. M. P. 2004. Amilases. Cap. XIII. *In: Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004.

PETROBRÁS. 2013. Produção comercial de etanol de segunda geração tem meta para 2015. Disponível em <<http://fatosedados.blogspetrobras.com.br/2013/03/20/producao-comercial-de-etanol-de-segunda-geracao-tem-meta-para-2015/>>, acesso em: 10 de abril de 2013.

PRAKASH, O; JAISWAL, N. 2010.  $\alpha$ -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 160: 2401-2414.

PRETORIUS I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16: 675-729.

RFA – Renewable Fuels Association. 2013. Statistics. Disponível em <<http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics#E>>, acesso em: 03 de março de 2013.

RIVA, A. Álcool de mandioca – “Nesta terra, em se plantando, tudo dá. Disponível em <<http://www.abam.com.br/includes/index.php?menu=3&item=4>>, acesso em: 09 de abril de 2013.

ROMANOS, M. A; SCORER, C. A; CLARE, J J. 1992. Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast*, 8: 423-488.

- ROY A, LU C-F, MARYKWA DL, LIPKE PN, KURJAN J. 1991. The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein  $\alpha$ -agglutinin. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4196-4206.
- SATO, N; MATSUMOTO, T; UEDA, M; TANAKA, A; FUKUDA, H; KONDO, A. 2002. Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 469-474.
- SAUER, S; SIGURSKJOLD, B. W; CHRISTENSEN, U; FRANDSEN, T. P; MIRGORODSKAYA, E; HARRISON, M; ROEPSTOR, P; SVENSSON, B. 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543: 275-293.
- SCHEKMAN R. 1992. Genetic and biochemical analysis of vesicular traffic in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, 4: 587-592.
- SCOTT, J. K; SMITH, G. P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249: 386-390.
- SHIGECHI, H; UYAMA, K; FUJITA, Y; MATSUMOTO, T; UEDA, M; TANAKA, T; FUKUDA, H; KONDO, A. 2002. Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting  $\alpha$ -amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17: 179-187.
- SHIGECHI, H; FUJITA, Y; KOH, J; UEDA, M; FUKUDA, H; KONDO, A. 2004 (a). Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. *Biochem. Eng. J.*, 18: 149-153.

- SHIGECHI, H; KOH, J; FUJITA, Y; MATSUMOTO, T; BITO, Y; UEDA, M; SATOH, E; FUKUDA, H; KONDO, A. 2004 (b). Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and  $\alpha$ -Amylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 5037-5040.
- SHUSTER, J. R; LEE, H; MOYER, D. L. 1990. Integration and amplification of DNA at yeast delta sequences. *Yeast*, 6: 79.
- SILVA, J. R. B. Álcool de mandioca. Disponível em <<http://www.abam.com.br/includes/index.php?menu=3&item=4>>, acesso em: 09 de abril de 2013.
- SILVA FILHO, E. A; MELO, H. F; ANTUNES, D. F; SANTOS, S. K. B; RESENDE, A. M; SIMÕES, D. A; MORAIS JR., M. A. 2005. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(10): 481-486.
- SIVARAMAKRISHNAN, S; GANGADHARAN, D; NAMPOOTHIRI, K. M; SOCCOL, C. R; PANDEY, A. 2006. Alpha-amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, 44: 173-184.
- SORDA, G; BANSE, M; KEMFERT, C. 2010. An overview of biofuel policies across the world. *Energy Policy*, 38: 6977–6988.
- SOUZA, M. B. N. S. *Clonagem molecular e expressão do gene de  $\alpha$ -amilase de Bacillus sp.* 1986. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1986.

STRAHL-BOLSINGER, S; GENTZSCH, M; TANNER, W. 1999. Protein O-mannosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426: 297-307.

STRIPECKE, R. *Expressão do gene de  $\alpha$ -amilase de Bacillus subtilis em Xanthomonas campestris*. 1988. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

SVENSSON, B; SVENDSEN, T. G; SVENDSEN, I. B; SAKAI, T; OTTESEN, M. 1982. Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Commun.*, 47: 55-69.

SVENSSON, B; LARSEN, K; SVENDSEN, I; BOEL, E. 1983. The complete amino acid sequence of the glycoprotein, glucoamylase G1, from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Commun*, 48: 529-544.

TEUNISSEN, A. W; HOLUB, E; VAN DER HUUCHT, J; VAN DEN BERG, J. A; STEENSMA, H. Y. 1993. Sequence of the open reading frame of the FLO1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9: 423-427.

TUITE, M. F; DOBSON, M. J; ROBERTS, N. A; KING, R. M; BURKE, D. C; KINGSMAN, S. M; KINGSMAN, A. J. 1982. Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 1(5): 603-608.

UEDA, M; TANAKA, A. 2000 (a). Cell surface engineering of yeast: construction of arming yeast with biocatalyst. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90:125-136.

UEDA, M; TANAKA, A. 2000 (b). Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnology Advances*, 18: 121-140.

UNICA – União da indústria da Cana de Açúcar. 2012. Livreto do movimento mais etanol. Disponível em <<http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/>>.

UNICA – União da indústria da Cana de Açúcar (a). 2013. Linha do tempo. Disponível em <<http://www.unica.com.br/documentos/interatividade/>>, acesso em: 03 de março de 2013.

UNICA – União da indústria da Cana de Açúcar (b). 2013. Unicadata. Disponível em <<http://www.unicadata.com.br/>>, acesso em: 03 de março de 2013.

VALENCIA, F. F. *Sequenciamento do gene de  $\alpha$ -amilase de Bacillus subtilis*. 1990. 136 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1990.

VALLE, T. L; FELTRAN, J. C; CARVALHO, C. R. L. Mandioca para produção de etanol. Disponível em <<http://www.abam.com.br/includes/index.php?menu=3&item=5>>, acesso em: 09 de abril de 2013.

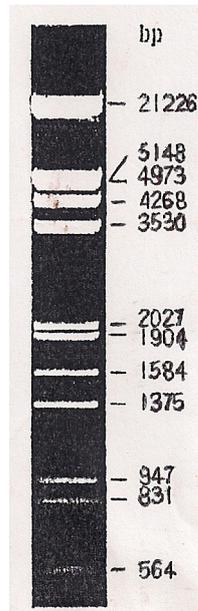
VAN DER MAAREL, M. J. E. C; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M; LEEMHUIS, H; DIJKHUIZE, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94: 137-155.

VAN DER VAART, J. M; CARO, L. H. P; CHAPMAN, J. W; KLIS, F. M; VERRIPS, C. T. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*, 177: 3104-3110.

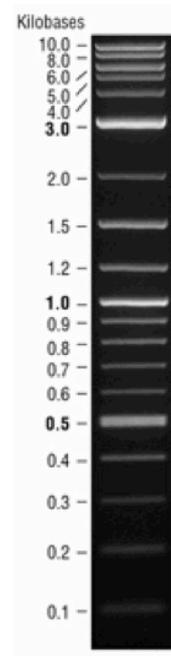
- VAN DER VAART, J. M; BIESEBEKE, R. T; CHAPMAN, J. W; TOSCHKA, H. Y; KLIS, F. M; VERRIPS, C. T. 1997. Comparison of Cell Wall Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as Anchors for Cell Surface Expression of Heterologous Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2): 615-620.
- VILPOUX, O. O mercado do amido no mundo. Disponível em <<http://www.abam.com.br/includes/index.php?menu=3&item=4>>, acesso em: 09 de abril de 2013.
- WALKER, G. M. 1999. Introduction to yeast. *In: Yeast Physiology and Biotechnology*. Ed. Wiley. p. 1-9.
- WATARI, J; TAKATA, Y; OGAWA, M; SAHARA, H; KOSHINO, M; ONNELA, M. L; AIRAKSINEN, U; JAATINEN, R; PENTTILA, M; KERANEN, S. 1994. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1. *Yeast*, 10: 211-225.
- WHEALS, A. E; BASSO, L. C; ALVES, D. M. G; AMORIM, H. V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol*, 17: 482-487.
- ZHAO, HUI. SHEN, ZHENG-MING. KAHN, PETER C. LIPKE, PETER N. 2001. Interaction of  $\alpha$ -agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules. *Journal of Bacteriology*. 183(9): 2874-2880.

## ANEXOS

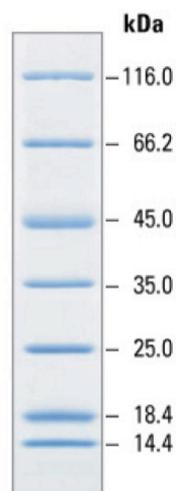
## Anexo 1 – Marcadores de massa molecular.



**Figura 36.** Perfil de bandas do marcador de massa molecular  $\lambda$ EcoRI/HindIII.

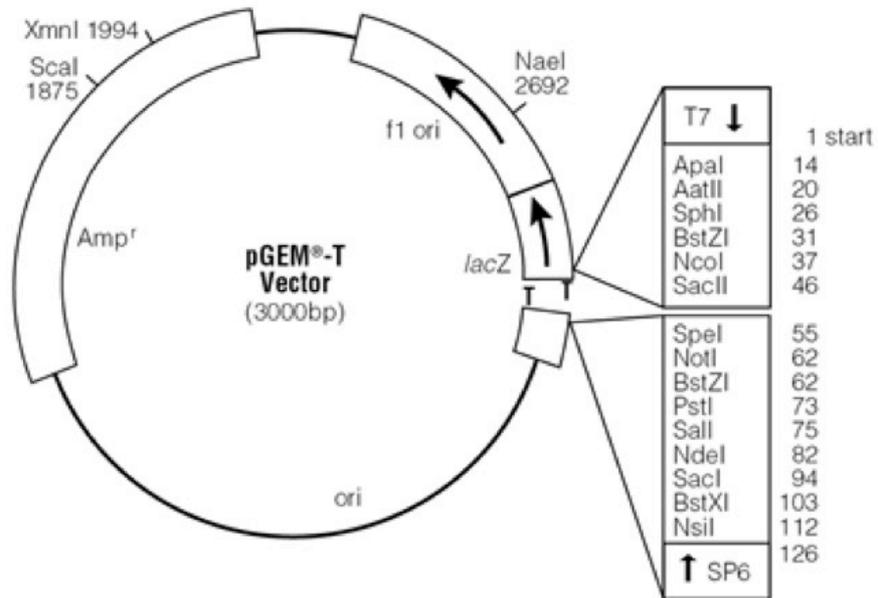


**Figura 37.** Perfil de bandas do marcador de massa molecular 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs).

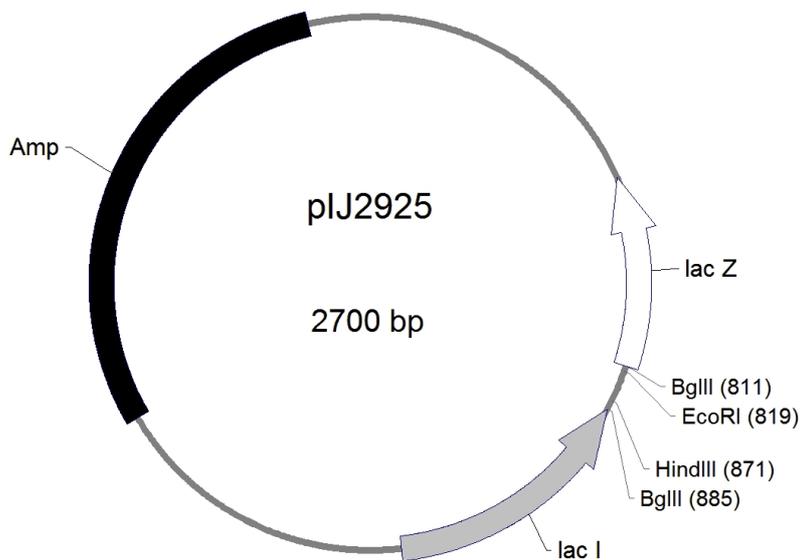


**Figura 38.** Perfil de bandas do marcador de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific) em SDS-PAGE.

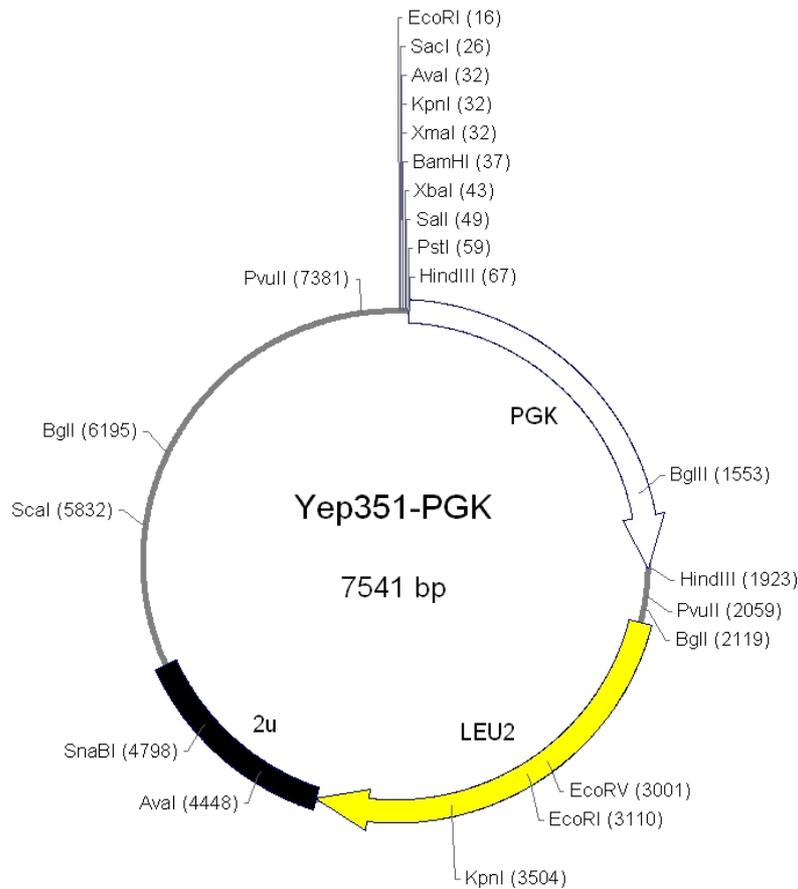
Anexo 2 – Vetores



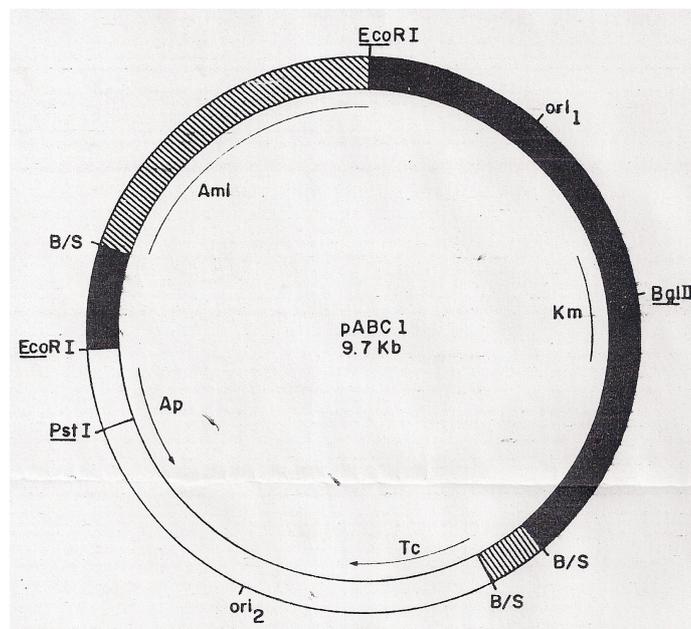
**Figura 39.** Representação esquemática do mapa do vetor para clonagem de produto de PCR pGEM<sup>®</sup>-T (Promega).



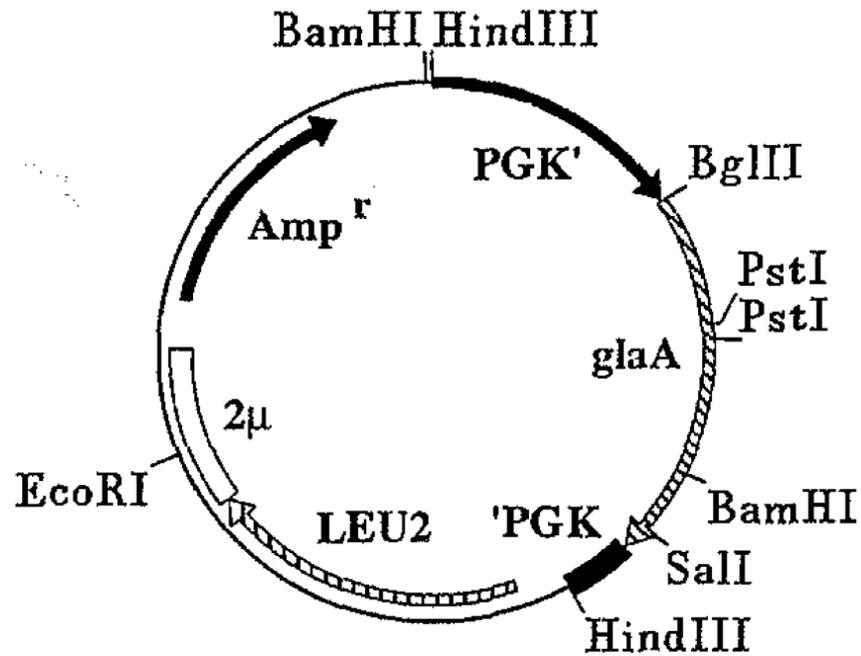
**Figura 40.** Representação esquemática do mapa do vetor pIJ2925.



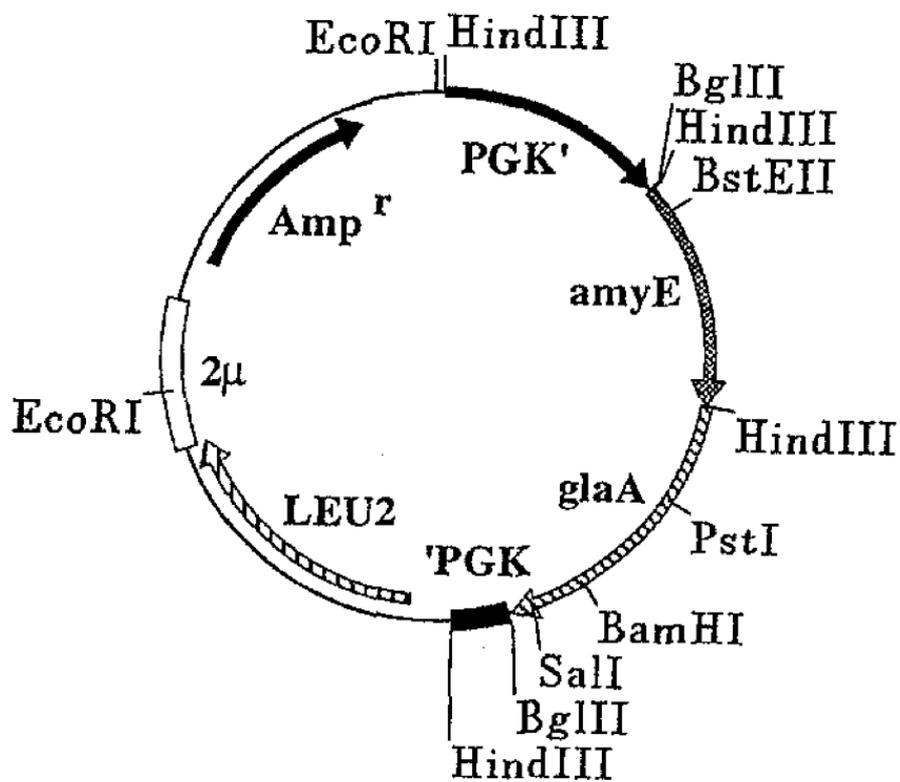
**Figura 41.** Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em levedura Yep351PGK.



**Figura 42.** Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em bactéria pABC1. Ami: gene da  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*. (Fonte: Souza, 1986)



**Figura 43.** Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em levedura pPG. (Fonte: Moraes *et al.*, 1995).



**Figura 44.** Representação esquemática do mapa do vetor de expressão em levedura pPB-G. (Fonte: Moraes *et al.*, 1995).

## ANEXO 3 – Análise de sequenciamento

### Sequenciamento amyS

Score = 2650 bits (1378), Expect = 0.0

Identities = 1378/1378 (100%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 58  gccggatttttattgctgtttcatttggtttgtcaggcccggcggtgcaaacgctgaa 117
          |
Sbjct: 1   gccggatttttattgctgtttcatttggtttgtcaggcccggcggtgcaaacgctgaa 60

Query: 118 actgcaaacaatcgaataaggtgaccgcgtcatcgggtcaaaaacgggaccatcctccat 177
          |
Sbjct: 61  actgcaaacaatcgaataaggtgaccgcgtcatcgggtcaaaaacgggaccatcctccat 120

Query: 178  gcatggaattggctgttcaatacgttaacacaaaatatgaaagatattcgtgatgctgggc 237
          |
Sbjct: 121 gcatggaattggctgttcaatacgttaacacaaaatatgaaagatattcgtgatgctgggc 180

Query: 238  tatgcagcattcagacgtctccgattaaccaagtaaaggaaggaaccaaggagataaaa 297
          |
Sbjct: 181  tatgcagcattcagacgtctccgattaaccaagtaaaggaaggaaccaaggagataaaa 240

Query: 298  agcatgaggaactggactggctgtatcagccgacatcgtaccaaactcggcaaccgttac 357
          |
Sbjct: 241  agcatgaggaactggactggctgtatcagccgacatcgtaccaaactcggcaaccgttac 300

Query: 358  ttaggcactgaacaagaatttaaggacatgtgtgcagcccggaataatgggtgtaaaa 417
          |
Sbjct: 301  ttaggcactgaacaagaatttaaggacatgtgtgcagcccggaataatgggtgtaaaa 360

Query: 418  gtcattgttgatgctgggttatcaaccataccaccagcgattatgggtgctgatttctgacgag 477
          |
Sbjct: 361  gtcattgttgatgctgggttatcaaccataccaccagcgattatgggtgctgatttctgacgag 420

Query: 478  attaagcgtattccaaactggaccatggaacacacaaaattaaaaattggctcggatcga 537
          |
Sbjct: 421  attaagcgtattccaaactggaccatggaacacacaaaattaaaaattggctcggatcga 480

Query: 538  tgggacgtcactcaaaattcattgcttgggctgtatgattggaatacacagaataactgag 597
          |
Sbjct: 481  tgggacgtcactcaaaattcattgcttgggctgtatgattggaatacacagaataactgag 540

Query: 598  gtgcaggcctatctgaaacgtttcttggaaagagcattgaatgacggagcagacggggttc 657
          |
Sbjct: 541  gtgcaggcctatctgaaacgtttcttggaaagagcattgaatgacggagcagacggggttc 600

Query: 658  cgctatgatgccgccaagcatatagagcttccggatgacgggaattacggcagccaattt 717
          |
Sbjct: 601  cgctatgatgccgccaagcatatagagcttccggatgacgggaattacggcagccaattt 660

Query: 718  tggccgaatattacaaatacatcagcggagttccaatacggagaaatcctgcaagacagc 777
          |
Sbjct: 661  tggccgaatattacaaatacatcagcggagttccaatacggagaaatcctgcaagacagc 720

Query: 778  gcgtccagagatactgcttatgccaattatatgaatgtgacggcttctaactacgggcat 837
          |
Sbjct: 721  gcgtccagagatactgcttatgccaattatatgaatgtgacggcttctaactacgggcat 780

```

```

Query: 838 tccatcagatccgctttaagaaccgtaatctgagtggtgcgaatatctcccattatgca 897
          |||
Sbjct: 781 tccatcagatccgctttaagaaccgtaatctgagtggtgcgaatatctcccattatgca 840

Query: 898 tctgacgtgtctgcggaagttagtcacatgggtggaatcacatgatacgtatgccaat 957
          |||
Sbjct: 841 tctgacgtgtctgcggaagttagtcacatgggtggaatcacatgatacgtatgccaat 900

Query: 958 gatgatgaagagtccacatggatgagtgatgacgatattcgtttaggctgggcagtgatt 1017
          |||
Sbjct: 901 gatgatgaagagtccacatggatgagtgatgacgatattcgtttaggctgggcagtgatt 960

Query: 1018 ggttcccgcctcaggaagcacgcctcttttctttccagacctgagggcgaggaaatggg 1077
          |||
Sbjct: 961 ggttcccgcctcaggaagcacgcctcttttctttccagacctgagggcgaggaaatggg 1020

Query: 1078 gtaagatttccggaaaaagtcaaataggagatcgcgggagcgccttatttaaagatcag 1137
          |||
Sbjct: 1021 gtaagatttccggaaaaagtcaaataggagatcgcgggagcgccttatttaaagatcag 1080

Query: 1138 gcgatcactgcgggtcaatacatttcacaatgtaatggccggcagcccaggaaactctcg 1197
          |||
Sbjct: 1081 gcgatcactgcgggtcaatacatttcacaatgtaatggccggcagcccaggaaactctcg 1140

Query: 1198 aatccgaatgggaacaaccaaactctttatgaatcagcgcggctcaaaaggcgttggtgctg 1257
          |||
Sbjct: 1141 aatccgaatgggaacaaccaaactctttatgaatcagcgcggctcaaaaggcgttggtgctg 1200

Query: 1258 gcaaatgcaggatcgtcttctgtcaccatcaatacttcaacgaaattacctgacggcagg 1317
          |||
Sbjct: 1201 gcaaatgcaggatcgtcttctgtcaccatcaatacttcaacgaaattacctgacggcagg 1260

Query: 1318 tatgataatagggccggcgcgggttcatttcaagtagcgaacggcaaactgacaggtacg 1377
          |||
Sbjct: 1261 tatgataatagggccggcgcgggttcatttcaagtagcgaacggcaaactgacaggtacg 1320

Query: 1378 atcaatgccagatcggcggctggttctttatcctgatgatattggaaatgcgctcatg 1435
          |||
Sbjct: 1321 atcaatgccagatcggcggctggttctttatcctgatgatattggaaatgcgctcatg 1378

```

**Figura 45.** Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde do gene de  $\alpha$ -amilase com códon de terminação da tradução (amyS). Correlação no programa *Blast 2 sequences*. *Query*: sequência original; *Subject*: sequência clonada e sequenciada.

### Sequenciamento amy-aglut(1 kb)

Score = 4517 bits (2349), Expect = 0.0

Identities = 2349/2349 (100%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 55 ttcgccgatttttattgctgtttcatttggttttgtcaggcccggcggctgcaaacgct 114
          |||
Sbjct: 1 ttcgccgatttttattgctgtttcatttggttttgtcaggcccggcggctgcaaacgct 60

Query: 115 gaaactgcaaacaaatcgaataaggtgaccgcgctcatcggtcaaaaacgggaccatcctc 174
          |||
Sbjct: 61 gaaactgcaaacaaatcgaataaggtgaccgcgctcatcggtcaaaaacgggaccatcctc 120

Query: 175 catgcatggaattggctggttcaatacgttaacacaaaatatgaaagatattcgtgatgcg 234
          |||
Sbjct: 121 catgcatggaattggctggttcaatacgttaacacaaaatatgaaagatattcgtgatgcg 180

```

Query: 235 ggctatgcagccattcagacgtctccgattaaccaagtaaaggaagggaaaccaaggagat 294  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 181 ggctatgcagccattcagacgtctccgattaaccaagtaaaggaagggaaaccaaggagat 240

Query: 295 aaaagcatgaggaactggtactggctgtatcagccgacatcgtaccaaactcggaaccgt 354  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 241 aaaagcatgaggaactggtactggctgtatcagccgacatcgtaccaaactcggaaccgt 300

Query: 355 tacttaggcactgaacaagaatttaaggacatgtgtgcagccgcgaaaaatatggtgta 414  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 301 tacttaggcactgaacaagaatttaaggacatgtgtgcagccgcgaaaaatatggtgta 360

Query: 415 aaagtcattggtgatgcggttatcaaccataaccaccagcgattatggtgcgatttctgac 474  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 361 aaagtcattggtgatgcggttatcaaccataaccaccagcgattatggtgcgatttctgac 420

Query: 475 gagattaagcgtattccaaactggacccatggaacacacaaattaaattggtcggat 534  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 421 gagattaagcgtattccaaactggacccatggaacacacaaattaaattggtcggat 480

Query: 535 cgatgggacgctcactcaaaattcattgcttgggctgtatgattggaatacacagaatact 594  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 481 cgatgggacgctcactcaaaattcattgcttgggctgtatgattggaatacacagaatact 540

Query: 595 gaggtgcaggcctatctgaaacgtttcttggaaagagcattgaatgacggagcagacggg 654  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 541 gaggtgcaggcctatctgaaacgtttcttggaaagagcattgaatgacggagcagacggg 600

Query: 655 ttccgctatgatgccgccaagcatatagagcttccggatgacgggaattacggcagccaa 714  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 601 ttccgctatgatgccgccaagcatatagagcttccggatgacgggaattacggcagccaa 660

Query: 715 ttttgccgaatattacaatacatcagcggagttccaatacggagaaatcctgcaagac 774  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 661 ttttgccgaatattacaatacatcagcggagttccaatacggagaaatcctgcaagac 720

Query: 775 agcgcgtccagagatactgcttatgcaattatatgaatgtgacggcttctaactacggg 834  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 721 agcgcgtccagagatactgcttatgcaattatatgaatgtgacggcttctaactacggg 780

Query: 835 cattccatcagatccgctttaagaaccgtaactctgagtgtgtcgaatatctccattat 894  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 781 cattccatcagatccgctttaagaaccgtaactctgagtgtgtcgaatatctccattat 840

Query: 895 gcatctgacgtgtctgcggaacgtagtcacatgggtggaatcacatgatacgtatgcc 954  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 841 gcatctgacgtgtctgcggaacgtagtcacatgggtggaatcacatgatacgtatgcc 900

Query: 955 aatgatgatgaagagtccacatggatgagtgatgacgatattcgtttagctgggcagtg 1014  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 901 aatgatgatgaagagtccacatggatgagtgatgacgatattcgtttagctgggcagtg 960

Query: 1015 attggtcccgcctcaggaagcagcctcttttcttttccagacctgagggcggaggaaat 1074  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 961 attggtcccgcctcaggaagcagcctcttttcttttccagacctgagggcggaggaaat 1020

Query: 1075 ggtgtaagatttcccgaaaaagtcaaataggagatcgcgaggagcgcctattttaagat 1134  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1021 ggtgtaagatttcccgaaaaagtcaaataggagatcgcgaggagcgcctattttaagat 1080

Query: 1135 caggcgatcactgcggtcaatacatttcacaatgtaatggccgggagcccgaggaactc 1194  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1081 caggcgatcactgcggtcaatacatttcacaatgtaatggccgggagcccgaggaactc 1140

Query: 1195 tcgaatccgaatgggaacaaccaatctttatgaatcagcgggctcaaaaggcgttgtg 1254  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1141 tcgaatccgaatgggaacaaccaatctttatgaatcagcgggctcaaaaggcgttgtg 1200

Query: 1255 ctggcaaatgcaggatcgtcttctgtcaccatcaatacttcaacgaaattacctgacggc 1314  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1201 ctggcaaatgcaggatcgtcttctgtcaccatcaatacttcaacgaaattacctgacggc 1260

Query: 1315 aggtatgataatagggccggcgccggttcatttcaagtagcgaacggcaactgacaggt 1374  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1261 aggtatgataatagggccggcgccggttcatttcaagtagcgaacggcaactgacaggt 1320

Query: 1375 acgatcaatgccagatcggcggtgttctttatcctgatgatattggaaatgcgctcat 1434  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1321 acgatcaatgccagatcggcggtgttctttatcctgatgatattggaaatgcgctcat 1380

Query: 1435 gtctttcttgagaattaccaaacgggggagtcatttctttcaatgaattcagcgccaaa 1494  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1381 gtctttcttgagaattaccaaacgggggagtcatttctttcaatgaattcagcgccaaa 1440

Query: 1495 agctcttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaacactagtgcgtattcc 1554  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1441 agctcttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaacactagtgcgtattcc 1500

Query: 1555 actggatccatttccacagtagaaacaggcaatcgaactacatcagaagtgatcagccat 1614  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1501 actggatccatttccacagtagaaacaggcaatcgaactacatcagaagtgatcagccat 1560

Query: 1615 gtggtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcctgacaattgcacaa 1674  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1561 gtggtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcctgacaattgcacaa 1620

Query: 1675 accagtatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagatattcacaccacatca 1734  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1621 accagtatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagatattcacaccacatca 1680

Query: 1735 gaagtgattagtgatgtggaaccattagcagagaaacagcttcgaccgtttagccgct 1794  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1681 gaagtgattagtgatgtggaaccattagcagagaaacagcttcgaccgtttagccgct 1740

Query: 1795 ccaacctcaacaactggatggacaggcgctatgaatacttacatctcgcaatttacatcc 1854  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1741 ccaacctcaacaactggatggacaggcgctatgaatacttacatctcgcaatttacatcc 1800

Query: 1855 tcttctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcatcagcagatattgaaacc 1914  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1801 tcttctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcatcagcagatattgaaacc 1860

Query: 1915 tcagatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatcacgaatactgtgctgttcca 1974  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1861 tcagatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatcacgaatactgtgctgttcca 1920

Query: 1975 tctgaagagcccacttttgtaaatgccacagagaaactccttaaattccttctgcagcagc 2034  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1921 tctgaagagcccacttttgtaaatgccacagagaaactccttaaattccttctgcagcagc 1980

Query: 2035 aaacagccatccagtcctcatcttatacgtcttccccactcgtatcgtccctctccgta 2094  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1981 aaacagccatccagtcctcatcttatacgtcttccccactcgtatcgtccctctccgta 2040

Query: 2095 agcaaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacatctaatacatatatac 2154  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2041 agcaaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacatctaatacatatatac 2100

Query: 2155 aaaacgaaaaatacgggttactttgagcacacggcctttgacaacatcttcagttggcctt 2214  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2101 aaaacgaaaaatacgggttactttgagcacacggcctttgacaacatcttcagttggcctt 2160

Query: 2215 aattcttttagtgaaacagcagtcctcatctcagggaaacgaaaattgacaccttttttagtg 2274  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2161 aattcttttagtgaaacagcagtcctcatctcagggaaacgaaaattgacaccttttttagtg 2220

```

Query: 2275 tcatccttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagccaattgtccggtatccaacag 2334
          |||
Sbjct: 2221 tcatccttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagccaattgtccggtatccaacag 2280

Query: 2335 aatttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaagcgtctatatttttc 2394
          |||
Sbjct: 2281 aatttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaagcgtctatatttttc 2340

Query: 2395 tcagctgag 2403
          |||
Sbjct: 2341 tcagctgag 2349

```

**Figura 46.** Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o gene de  $\alpha$ -amilase e a porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina de 975 pb. Correlação no programa *Blast 2 sequences*. Sequência em azul: ponto de fusão da  $\alpha$ -amilase e da  $\alpha$ -aglutinina; *Query*: sequência original; *Subject*: sequência clonada e sequenciada.

### Sequenciamento amy-aglut'(1,4 kb)

```

Score = 5339 bits (2777), Expect = 0.0
Identities = 2786/2788 (99%), Gaps = 1/2788 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 60 cggatttttattgctgtttcatttggttttgtcaggcccgcggtgcaaacgctgaaac 119
          |||
Sbjct: 1 cggatttttattgctgtttcatttggttttgtcaggcccgcggtgcaaacgctgaaac 60

Query: 120 tgcaaacaaatcgaataaggtgaccgctcatcgggtcaaaaacgggaccatcctccatgc 179
          |||
Sbjct: 61 tgcaaacaaatcgaataaggtgaccgctcatcgggtcaaaaacgggaccatcctccatgc 120

Query: 180 atggaattggtcgttcaatacgttaacacaaaatatgaaagatattcgtgatgccccgcta 239
          |||
Sbjct: 121 atggaattggtcgttcaatacgttaacacaaaatatgaaagatattcgtgatgccccgcta 180

Query: 240 tgcagccattcagacgtctccgattaaccaagtaaaggaaggaaccaaggagataaaaag 299
          |||
Sbjct: 181 tgcagccattcagacgtctccgattaaccaagtaaaggaaggaaccaaggagataaaaag 240

Query: 300 catgaggaactggtactggctgtatcagccgacatcgtaccaaactcggcaaccggttactt 359
          |||
Sbjct: 241 catgaggaactggtactggctgtatcagccgacatcgtaccaaactcggcaaccggttactt 300

Query: 360 aggcaactgaacaagaatttaaggacatgtgtgcagcccggaataatggtgtaaaagt 419
          |||
Sbjct: 301 aggcaactgaacaagaatttaaggacatgtgtgcagcccggaataatggtgtaaaagt 360

Query: 420 cattgttgatgccccgttatcaaccataaccaccagcgattatggtgcgatttctgacgagat 479
          |||
Sbjct: 361 cattgttgatgccccgttatcaaccataaccaccagcgattatggtgcgatttctgacgagat 420

Query: 480 taagcgtattccaaactggaccatggaacacacaaaattaaaaattggtcggatcgatg 539
          |||
Sbjct: 421 taagcgtattccaaactggaccatggaacacacaaaattaaaaattggtcggatcgatg 480

Query: 540 ggacgtcactcaaaattcattgcttgggctgtatgattggaatacacagaataactgaggt 599
          |||
Sbjct: 481 ggacgtcactcaaaattcattgcttgggctgtatgattggaatacacagaataactgaggt 540

```

Query: 600 gcaggcctatctgaaacgtttcttgaaagagcattgaatgacggagcagacgggttccg 659  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 541 gcaggcctatctgaaacgtttcttgaaagagcattgaatgacggagcagacgggttccg 600

Query: 660 ctatgatgccgccaagcatatagagcttccggatgacgggaattacggcagccaatsttg 719  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 601 ctatgatgccgccaagcatatagagcttccggatgacgggaattacggcagccaatsttg 660

Query: 720 gccgaatattacaaatacatcagcggagttccaatacggagaaatcctgcaagacagcgc 779  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 661 gccgaatattacaaatacatcagcggagttccaatacggagaaatcctgcaagacagcgc 720

Query: 780 gtccagagatactgcttatgccaattatatgaatgtgacggcttctaactacgggcattc 839  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 721 gtccagagatactgcttatgccaattatatgaatgtgacggcttctaactacgggcattc 780

Query: 840 catcagatccgctttaaagaaccgtaactctgagtggtgcgaatatctcccattatgcatc 899  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 781 catcagatccgctttaaagaaccgtaactctgagtggtgcgaatatctcccattatgcatc 840

Query: 900 tgacgtgtctgaggacaagttagtcacatgggtggaatcacatgatacgtatgccaatga 959  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 841 tgacgtgtctgaggacaagttagtcacatgggtggaatcacatgatacgtatgccaatga 900

Query: 960 tgatgaagagtccacatggatgagtgatgacgatattcgtttaggctgggcagtgattgg 1019  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 901 tgatgaagagtccacatggatgagtgatgacgatattcgtttaggctgggcagtgattgg 960

Query: 1020 ttcccgcctcaggaagcagcctcttttctttccagacctgagggcgaggaaatgggtgt 1079  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 961 ttcccgcctcaggaagcagcctcttttctttccagacctgagggcgaggaaatgggtgt 1020

Query: 1080 aagatttcccggaaaaagtcaaataggagatcgcgggagcgccttatttaagatcaggc 1139  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1021 aagatttcccggaaaaagtcaaataggagatcgcgggagcgccttatttaagatcaggc 1080

Query: 1140 gatcactgcgggtcaatacatttcacaatgtaatggccgggcagcccaggaactctcgaa 1199  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1081 gatcactgcgggtcaatacatttcacaatgtaatggccgggcagcccaggaactctcgaa 1140

Query: 1200 tccgaatgggaacaaccaaatctttatgaatcagcgcggctcaaaaggcgttggtgctggc 1259  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1141 tccgaatgggaacaaccaaatctttatgaatcagcgcggctcaaaaggcgttggtgctggc 1200

Query: 1260 aaatgcaggatcgtcttctgtcaccatcaatacttcaacgaaattacctgacggcaggta 1319  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1201 aaatgcaggatcgtcttctgtcaccatcaatacttcaacgaaattacctgacggcaggta 1260

Query: 1320 tgataatagggccggcgccggttcatttcaagtagcgaacggcaaaactgacaggtacgat 1379  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1261 tgataatagggccggcgccggttcatttcaagtagcgaacggcaaaactgacaggtacgat 1320

Query: 1380 caatgccagatcggcggtgttctttatcctgatgatattggaaatgagcctcatgtctt 1439  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1321 caatgccagatcggcggtgttctttatcctgatgatattggaaatgagcctcatgtctt 1380

Query: 1440 tcttgagaattaccaaaccggggcagtcattctttcaatgaattcagcgcgcaaaagctc 1499  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1381 tcttgagaattaccaaaccggggcagtcattctttcaatgaattcagcgcgcaaaagctc 1440

Query: 1500 ttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaacactagtgcgattocactgg 1559  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1441 ttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaacactagtgcgattocactgg 1500

Query: 1560 atccatttccacagtagaacaacagggaatcgaactacatcagaagtgatcagccatgtggt 1619  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1501 atccatttccacagtagaacaacagggaatcgaactacatcagaagtgatcagccatgtggt 1560

Query: 1620 gactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcctgacaattgcacaaaccag 1679  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1561 gactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcctgacaattgcacaaaccag 1620

Query: 1680 tatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagatattcacaccacatcagaagt 1739  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1621 tatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagatattcacaccacatcagaagt 1680

Query: 1740 gattagtgatgtggaaccatttagcagagaaacagcttcgaccgtttagcgcgtccaac 1799  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1681 gattagtgatgtggaaccatttagcagagaaacagcttcgaccgtttagcgcgtccaac 1740

Query: 1800 ctcaacaactggatggacagggcgtatgaatacttacatctcgcaatttacatcctcttc 1859  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1741 ctcaacaactggatggacagggcgtatgaatacttacatctcgcaatttacatcctcttc 1800

Query: 1860 tttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcacagcagatattgaaacctcaga 1919  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1801 tttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcacagcagatattgaaacctcaga 1860

Query: 1920 tgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaaatcacgaatactgctgctgttccatctga 1979  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1861 tgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaaatcacgaatactgctgctgttccatctga 1920

Query: 1980 agagcccacttttgtaaatgccacgagaaactccttaaattccttctgcagcagcaaca 2039  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1921 agagcccacttttgtaaatgccacgagaaactccttaaattccttctgcagcagcaaca 1980

Query: 2040 gccatccagtcctcatcttatacgtcttcccactcgtatcgtcctctccgtaagcaa 2099  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1981 gccatccagtcctcatcttatacgtcttcccactcgtatcgtcctctccgtaagcaa 2040

Query: 2100 aacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacatctaatacatatatcaaac 2159  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2041 aacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacatctaatacatatatcaaac 2100

Query: 2160 gaaaaatacgggttactttgagcacacggctttgacaacatcttcagttggccttaattc 2219  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2101 gaaaaatacgggttactttgagcacacggctttgacaacatcttcagttggccttaattc 2160

Query: 2220 ttttagtgaaacagcagctctcatctcagggaaacgaaaattgacaccttttagtgatc 2279  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2161 ttttagtgaaacagcagctctcatctcagggaaacgaaaattgacaccttttagtgatc 2220

Query: 2280 cttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagccaattgtccggatccaacagaattt 2339  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2221 cttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagccaattgtccggatccaacagaattt 2280

Query: 2340 cacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaagcgtctatatttttctcagc 2399  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2281 cacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaagcgtctatatttttctcagc 2340

Query: 2400 tgagctcggttcggatcatttttctgcttttgcgtacctgctattc~~taa~~aacgggtactg 2459  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2341 tgagctcggttcggatcatttttctgcttttgcgtacctgctattc~~taa~~aacgggtactg 2400

Query: 2460 tacagttagtacattgagtcgaaatatacgaattattgttcataattttcatcctggct 2519  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2401 tacagttagtacattgagtcgaaatatacgaattattgttcataattttcatcctggct 2460

Query: 2520 ctttcttcttcaacctagttaaatggacagttcatatctt~~aa~~aactctaataatacttt 2579  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2461 ctttcttcttcaacctagttaaatggacagttcatatctt~~-aa~~aactctaataataacttt 2519

```

Query: 2565 tctagttcttataccttttccgtctcaccgcagattttatcatagatttaaatttatattt 2624
          |||
Sbjct: 2520 tctagttcttataccttttccgtctcaccgcagattttatcatagatttaaatttatattt 2579

Query: 2625 tgttcgtaaaaagaaaaatgtgtgagcgttaccgctcgtttcattaccogaaggctgttt 2684
          |||
Sbjct: 2580 tgttcgtaaaaagaaaaatgtgtgagcgttaccgctcgtttcattaccogaaggctgttt 2639

Query: 2685 cagtagaccactgattaagtaagtagatgaaaaaatttcatcaccatgaaagagttcgat 2744
          |||
Sbjct: 2640 cagtagaccactgattaagtaagtagatgaaaaaatttcatcaccatgaaagagttcgat 2699

Query: 2745 gagagctactttttcfaatgcttaacagctaaccgccattcaataatggttacgttctctt 2804
          |||
Sbjct: 2700 gagagctactttttcfaatgcttaacagctaaccgccattcaataatggttacgctctctt 2759

Query: 2805 cattctgctgctacggttatctaacaaga 2832
          |||
Sbjct: 2760 cattctgctgctacggttatctaacaaga 2787

```

**Figura 47.** Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o gene de  $\alpha$ -amilase e a porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb. Correlação no programa *Blast 2 sequences*. Sequência vermelha: mutação; Sequência em azul: ponto de fusão da  $\alpha$ -amilase e da  $\alpha$ -aglutinina; Sequência em verde: códon de parada da  $\alpha$ -aglutinina; *Query*: sequência original; *Subject*: sequência clonada e sequenciada.

## Sequenciamento gla1-aglut(1,4 kb)

Score = 1529 bits (795), Expect = 0.0

Identities = 797/798 (99%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 54 gcacaggggttgcaaatgtgatttccaagcgcgcgaccttgattcatggttgagcaacg 113
          |||
Sbjct: 1 gcacaggggttgcaaatgtgatttccaagcgcgcgaccttgattcatggttgagcaacg 60

Query: 114 aagcgaccgtggctcgtactgccatcctgaataacatcggggcggacgggtgcttgggtgt 173
          |||
Sbjct: 61 aagcgaccgtggctcgtactgccatcctgaataacatcggggcggacgggtgcttgggtgt 120

Query: 174 cgggcgcggactctggcattgtcgttgctagtcccagcacggataaaccggactacttct 233
          |||
Sbjct: 121 cgggcgcggactctggcattgtcgttgctagtcccagcacggataaaccggactacttct 180

Query: 234 acacctggactcgcgactctggtctcgtcctcaagaccctcgtcgatctctccgaaatg 293
          |||
Sbjct: 181 acacctggactcgcgactctggtctcgtcctcaagaccctcgtcgatctctccgaaatg 240

Query: 294 gagataaccagtctcctctccaccattgagaactacatctccgccaggcaattgtccagg 353
          |||
Sbjct: 241 gagataaccagtctcctctccaccattgagaactacatctccgccaggcaattgtccagg 300

Query: 354 gtatcagtaaccctctggtgatctgtccagcggcgtggtctcgggtgaaccaagttca 413
          |||
Sbjct: 301 gtatcagtaaccctctggtgatctgtccagcggcgtggtctcgggtgaaccaagttca 360

Query: 414 atgtcgatgagactgcctacactggttcttggggacggccgcagcgagatggtccggctc 473
          |||
Sbjct: 361 atgtcgatgagactgcctacactggttcttggggacggccgcagcgagatggtccggctc 420

```

```

Query: 474 tgagagcaactgctatgatcggcttcgggcaatggctgcttgacaatggctacaccagca 533
      |
Sbjct: 421 tgagagcaactgctatgatcggcttcgggcaatggctgcttgacaatggctacaccagca 480

Query: 534 cgcgaacggacattgtttggccctcgttaggaacgacctgtcgtatgtggctcaatact 593
      |
Sbjct: 481 cgcgaacggacattgtttggccctcgttaggaacgacctgtcgtatgtggctcaatact 540

Query: 594 ggaaccagacaggatatgatctctgggaagaagtcaatggctcgtctttctttacgattg 653
      |
Sbjct: 541 ggaaccagacaggatatgatctctgggaagaagtcaatggctcgtctttctttacgattg 600

Query: 654 ctgtgcaacaccgcgcccttgctogaaggtagtgccttcgacgacggccgtcggctcgtcct 713
      |
Sbjct: 601 ctgtgcaacaccgcgcccttgctogaaggtagtgccttcgacgacggccgtcggctcgtcct 660

Query: 714 gctcctggtgtgattctcaggcaccgaaattctctgctacctgcagtccttctggaccg 773
      |
Sbjct: 661 gctcctggtgtgattctcaggcaccgaaattctctgctacctgcagtccttctggaccg 720

Query: 774 gcagcttcattctggccaacttcgatagcagccgttccggcaaggacgcaaacaccctcc 833
      |
Sbjct: 721 gcagcttcattctggccaacttcgatagcagccgttccggcaaggacgcaaacaccctcc 780

Query: 834 tgggaagcatccacacctt 852
      |
Sbjct: 781 tgggaagcatccacacctt 799

```

Score = 4238 bits (2204), Expect = 0.0

Identities = 2213/2215 (99%), Gaps = 1/2215 (0%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 1088 tgggacaagcaggggtcgttggaggtcacagatgtgtcgtggacttcttcaaggcactg 1147
      |
Sbjct: 799 tgggacaagcaggggtcgttggaggtcacagatgtgtcgtggacttcttcaaggcactg 858

Query: 1088 tgggacaagcaggggtcgttggaggtcacagatgtgtcgtggacttcttcaaggcactg 1147
      |
Sbjct: 1 tgggacaagcaggggtcgttggaggtcacagatgtgtcgtggacttcttcaaggcactg 60

Query: 1148 tacagcgatgctgctactggcacctactcttcgtccagttcgacttatagtagcattgta 1207
      |
Sbjct: 61 tacagcgatgctgctactggcacctactcttcgtccagttcgacttatagtagcattgta 120

Query: 1208 gatgccgtgaagactttcgccgatggcttcgtctctattgtggaactcacgcccgaagc 1267
      |
Sbjct: 121 gatgccgtgaagactttcgccgatggcttcgtctctattgtggaactcacgcccgaagc 180

Query: 1268 aacggctccatgtccgagcaatacgacaagtctgatggcgagcagctttccgctcgcgac 1327
      |
Sbjct: 181 aacggctccatgtccgagcaatacgacaagtctgatggcgagcagctttccgctcgcgac 240

Query: 1328 ctgacctggtcttatgctgctctgctgaccgccaacaaccgtcgtaactccgtcgtgcct 1387
      |
Sbjct: 241 ctgacctggtcttatgctgctctgctgaccgccaacaaccgtcgtaactccgtcgtgcct 300

Query: 1388 gcttcttggggcgagacctctgccagcagcgtgcccgccacctgtgcccacacatctgcc 1447
      |
Sbjct: 301 gcttcttggggcgagacctctgccagcagcgtgcccgccacctgtgcccacacatctgcc 360

```

Query: 1448 attggtacctacagcagtgactgtcacctcgtggccgagtatcgtggctactggcggc 1507  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 361 attggtacctacagcagtgactgtcacctcgtggccgagtatcgtggctactggcggc 420

Query: 1508 accactacgacggctacccccactggatccggcagcgtgacctcgaccagcaagaccacc 1567  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 421 accactacgacggctacccccactggatccggcagcgtgacctcgaccagcaagaccacc 480

Query: 1568 gcgactgctagcaagaccagcaccagtagctcatcaacctcctgtaccactcccaccgcc 1627  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 481 gcgactgctagcaagaccagcaccagtagctcatcaacctcctgtaccactcccaccgcc 540

Query: 1628 gtggctgtgactttcgtatctgacagctaccaccacctacggcgagaacatctacctggtc 1687  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 541 gtggctgtgactttcgtatctgacagctaccaccacctacggcgagaacatctacctggtc 600

Query: 1688 ggatcgatctctcagctgggtgactgggaaaccagcgacggcatagctctgagtgtgac 1747  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 601 ggatcgatctctcagctgggtgactgggaaaccagcgacggcatagctctgagtgtgac 660

Query: 1748 aagtacacttccagcgaccgcctctggtatgtcactgtgactctgccggctggtagtgcg 1807  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 661 aagtacacttccagcgaccgcctctggtatgtcactgtgactctgccggctggtagtgcg 720

Query: 1808 tttgagtacaagtttatccgattgagagcgtgactccgtggagtgggagagtgatccc 1867  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 721 tttgagtacaagtttatccgattgagagcgtgactccgtggagtgggagagtgatccc 780

Query: 1868 aaccgagaatacaccgttcctcagggcgtgcggaacgtcgaccgacggtagtgcacacc 1927  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 781 aaccgagaatacaccgttcctcagggcgtgcggaacgtcgaccgacggtagtgcacacc 840

Query: 1928 tggcgggaattcagcgccaaaagctcttttatctcaaccactactactgatttaacaagt 1987  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 841 tggcgggaattcagcgccaaaagctcttttatctcaaccactactactgatttaacaagt 900

Query: 1988 ataaacactagtgcgatattccactggatccatttccacagtagaaaacaggcaatcgaact 2047  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 901 ataaacactagtgcgatattccactggatccatttccacagtagaaaacaggcaatcgaact 960

Query: 2048 acatcagaagtgatcagccatgtggtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctact 2107  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 961 acatcagaagtgatcagccatgtggtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctact 1020

Query: 2108 accagcctgacaattgcacaaaccagtagtctattctactgactcaaatatcacagtagga 2167  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1021 accagcctgacaattgcacaaaccagtagtctattctactgactcaaatatcacagtagga 1080

Query: 2168 acagatattcacaccacatcagaagtgattagtgatgtggaaccattagcagagaaaca 2227  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1081 acagatattcacaccacatcagaagtgattagtgatgtggaaccattagcagagaaaca 1140

Query: 2228 gcttcgaccggttagccgctccaacctcaacaactggatggacagggcgctatgaatact 2287  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1141 gcttcgaccggttagccgctccaacctcaacaactggatggacagggcgctatgaatact 1200

Query: 2288 tacatctcgcaatttacatcctcttctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctct 2347  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1201 tacatctcgcaatttacatcctcttctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctct 1260

Query: 2348 tcatcagcagtagttgaaacctcagatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatc 2407  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1261 tcatcagcagtagttgaaacctcagatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatc 1320

Query: 2408 acgaatactgctgctgttccatctgaagagcccacttttgtaaatgccacgagaaactcc 2467  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1321 acgaatactgctgctgttccatctgaagagcccacttttgtaaatgccacgagaaactcc 1380

```

Query: 2468 ttaaattccttctgcagcagcaaacagccatccagtcacctcatcttatacgtcttcccca 2527
          |||
Sbjct: 1381 ttaaattccttctgcagcagcaaacagccatccagtcacctcatcttatacgtcttcccca 1440

Query: 2528 ctcgatcgtccctctccgtaagcaaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtg 2587
          |||
Sbjct: 1441 ctcgatcgtccctctccgtaagcaaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtg 1500

Query: 2588 ccaacatctaatacatatatcaaaacgaaaaatacgggttactttgagcacacggctttg 2647
          |||
Sbjct: 1501 ccaacatctaatacatatatcaaaacgaaaaatacgggttactttgagcacacggctttg 1560

Query: 2648 acaacatcttcagttggccttaattcttttagtgaaacagcagtcctcatctcagggaaagc 2707
          |||
Sbjct: 1561 acaacatcttcagttggccttaattcttttagtgaaacagcagtcctcatctcagggaaagc 1620

Query: 2708 aaaattgacaccttttttagtgatccttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagc 2767
          |||
Sbjct: 1621 aaaattgacaccttttttagtgatccttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagc 1680

Query: 2768 caattgtccggtatccaacagaatttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaa 2827
          |||
Sbjct: 1681 caattgtccggtatccaacagaatttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaa 1740

Query: 2828 ggtaaagcgtctatatttttctcagctgagctcgggttcgatcatttttctgcttttctgctg 2887
          |||
Sbjct: 1741 ggtaaagcgtctatatttttctcagctgagctcgggttcgatcatttttctgcttttctgctg 1800

Query: 2888 tacctgctattctaaaacgggtactgtacagtttagtacattgagtcgaaatatacgaat 2947
          |||
Sbjct: 1801 tacctgctattctaaaacgggtactgtacagtttagtacattgagtcgaaatatacgaat 1860

Query: 2948 tattgttcataattttcatcctggctctttgtttcttcaaccatagttaaatggacagtt 3007
          |||
Sbjct: 1861 tattgttcataattttcatcctggctctttgtttcttcaaccatagttaaatggacagtt 1920

Query: 3008 catatcttaaaactctaataaacttttctagttcttatccttttccgctctcaccgcagat 3067
          |||
Sbjct: 2719 catatctt-aaaactctaataaacttttctagttcttatccttttccgctctcaccgcagat 2777

Query: 3068 tttatcatagtattaaatttatattttgttcgtaaaaagaaaaatttgtgagcggtaccg 3127
          |||
Sbjct: 2778 tttatcatagtattaaatttatattttgttcgtaaaaagaaaaatttgtgagcggtaccg 2837

Query: 3128 ctcgtttcattaccggaaggctgtttcagtagaccactgattaagtaagtagatgaaaaa 3187
          |||
Sbjct: 2838 ctcgtttcattaccggaaggctgtttcagtagaccactgattaagtaagtagatgaaaaa 2897

Query: 3188 atttcatcaccatgaaagagttcgatgagagctactttttcaaagcttaacagctaacc 3247
          |||
Sbjct: 2898 atttcatcaccatgaaagagttcgatgagagctactttttcaaagcttaacagctaacc 2957

Query: 3248 gccattcaataatggttacgttctcttcattctgctggctacgttatctaacaagag 3302
          |||
Sbjct: 2958 gccattcaataatggttacgctctcttcattctgctggctacgttatctaacaagag 3012

```

**Figura 48.** Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o cDNA da glicoamilase completa (*gla1*) e a porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb. Correlação das partes sequenciadas no programa *Blast 2 sequences*. Sequência vermelha: mutação; Sequência em azul: ponto de fusão da glicoamilase e da  $\alpha$ -aglutinina; Sequência em verde: códon de parada da  $\alpha$ -aglutinina; *Query*: sequência original; *Subject*: sequência clonada e sequenciada.

## Sequenciamento gla2-aglut(1,4 kb)

Score = 1398 bits (727), Expect = 0.0

Identities = 729/730 (99%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 52  ctgcacagggttgcaaatgtgatttccaagcgcgaccttggattcatggttgagcaa 111
          |||
Sbjct: 1  ctgcacagggttgcaaatgtgatttccaagcgcgaccttggattcatggttgagcaa 60

Query: 112 cgaagcgaccgtggctcgtactgccatcctgaataacatcggggcgacggtgcttgggt 171
          |||
Sbjct: 61 cgaagcgaccgtggctcgtactgccatcctgaataacatcggggcgacggtgcttgggt 120

Query: 172 gtcgggcgcgactctggcattgtcgttgcctagtagtcccagcacggataaccggactactt 231
          |||
Sbjct: 121 gtcgggcgcgactctggcattgtcgttgcctagtagtcccagcacggataaccggactactt 180

Query: 232 ctacacctggactcgcgactctggtctcgtcctcaagaccctcgtcgatctcttccgaaa 291
          |||
Sbjct: 181 ctacacctggactcgcgactctggtctcgtcctcaagaccctcgtcgatctcttccgaaa 240

Query: 292 tggagataaccagtctcctctccaccattgagaactacatctccgccaggcaattgtcca 351
          |||
Sbjct: 241 tggagataaccagtctcctctccaccattgagaactacatctccgccaggcaattgtcca 300

Query: 352 gggatcagtaaccctctggtgatctgtccagcggcgctggtctcgggtaaccgaatt 411
          |||
Sbjct: 301 gggatcagtaaccctctggtgatctgtccagcggcgctggtctcgggtaaccgaatt 360

Query: 412 caatgctgatgagactgcctacactggttcttggggacggccgcagcgagatggtccggc 471
          |||
Sbjct: 361 caatgctgatgagactgcctacactggttcttggggacggccgcagcgagatggtccggc 420

Query: 472 tctgagagcaactgctatgatcggcttcgggcaatggctgcttgacaatggctacaccag 531
          |||
Sbjct: 421 tctgagagcaactgctatgatcggcttcgggcaatggctgcttgacaatggctacaccag 480

Query: 532 caccgcaacggacattggttggccctcgttaggaacgacctgctcgtatgtggctcaata 591
          |||
Sbjct: 481 caccgcaacggacattggttggccctcgttaggaacgacctgctcgtatgtggctcaata 540

Query: 592 ctggaaccagacaggatatgatctctgggaagaagtcaatggctcgtctttctttacgat 651
          |||
Sbjct: 541 ctggaaccagacaggatatgatctctgggaagaagtcaatggctcgtctttctttacgat 600

Query: 652 tgctgtgcaacaccgcgcccttgtcgaaggtagtgcttcgcgacggccgtcggctcgtc 711
          |||
Sbjct: 601 tgctgtgcaacaccgcgcccttgtcgaaggtagtgcttcgcgacggccgtcggctcgtc 660

Query: 712 ctgctcctggtgtgattctcaggcaccgaaattctctgctacctgcagtccttctggac 771
          |||
Sbjct: 661 ctgctcctggtgtgattctcaggcaccgaaattctctgctacctgcagtccttctggac 720

Query: 772 cggcagcttc 781
          |||
Sbjct: 721 cggcagcttc 730

```

Score = 1327 bits (690), Expect = 0.0

Identities = 692/693 (99%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 840  gcatccacacctttgatcctgaggccgcatgcgacgactccaccttcagccctgctccc 899
          |||
Sbjct: 1    gcatccacacctttgatcctgaggccgcatgcgacgactccaccttcagccctgctccc 60

Query: 900  cgcgcgcgctcgccaaccacaaggaggtttagactctttccgctcaatctataccctca 959
          |||
Sbjct: 61  cgcgcgcgctcgccaaccacaaggaggtttagactctttccgctcaatctataccctca 120

Query: 960  acgatggtctcagtgacagcgaggctgttgcggtgggtcggtagcctgaggacacgtact 1019
          |||
Sbjct: 121 acgatggtctcagtgacagcgaggctgttgcggtgggtcggtagcctgaggacacgtact 180

Query: 1020 acaacggcaccccggttctctgtgcaccttggtgcccagagcagttgtacgatgctc 1079
          |||
Sbjct: 181 acaacggcaccccggttctctgtgcaccttggtgcccagagcagttgtacgatgctc 240

Query: 1080 tataccagtgggacaagcaggggtcgttggaggtcacagatgtgtcgctggacttcttca 1139
          |||
Sbjct: 241 tataccagtgggacaagcaggggtcgttggaggtcacagatgtgtcgctggacttcttca 300

Query: 1140 aggcactgtacagcgatgctgctactggcacctactcttctcagttcgacttatagta 1199
          |||
Sbjct: 301 aggcactgtacagcgatgctgctactggcacctactcttctcagttcgacttatagta 360

Query: 1200 gcattgtagatgccgtgaagactttcgcgatggcttctctctattgtggaaactcacg 1259
          |||
Sbjct: 361 gcattgtagatgccgtgaagactttcgcgatggcttctctctattgtggaaactcacg 420

Query: 1260 ccgcaagcaacggctccatgtccgagcaatacgacaagtctgatggcgagcagctttccg 1319
          |||
Sbjct: 421 ccgcaagcaacggctccatgtccgagcaatacgacaagtctgatggcgagcagctttccg 480

Query: 1320 ctcgcgacctgacctggtcttatgctgctctgctgaccgccaacaaccgtcgtaactccg 1379
          |||
Sbjct: 481 ctcgcgacctgacctggtcttatgctgctctgctgaccgccaacaaccgtcgtaactccg 540

Query: 1380 tcgtgcctgcttcttggggcgagacctctgccagcagcgtgcccgccacctgtgcgggcca 1439
          |||
Sbjct: 541 tcgtgcctgcttcttggggcgagacctctgccagcagcgtgcccgccacctgtgcgggcca 600

Query: 1440 catctgccattggtacctacagcagtgactgtcacctcgtggccgagtatcgtgggcta 1499
          |||
Sbjct: 601 catctgccattggtacctacagcagtgactgtcacctcgtggccgagtatcgtgggcta 660

Query: 1500 ctggcggcaccactacgacggctacccccactg 1532
          |||
Sbjct: 661 ctggcggcaccactacgacggctacccccactg 693

```

Score = 2617 bits (1361), Expect = 0.0

Identities = 1370/1372 (99%), Gaps = 1/1372 (0%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 1626 aattcagcgccaaaagctcttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaaca 1685
          |||
Sbjct: 1    aattcagcgccaaaagctcttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaaca 60

```

Query: 1686 ctagtgcgattccactggatccatttccacagtagaacaaggcaatcgaactacatcag 1745  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 61 ctagtgcgattccactggatccatttccacagtagaacaaggcaatcgaactacatcag 120

Query: 1746 aagtgatcagccatgtggtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcc 1805  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 121 aagtgatcagccatgtggtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcc 180

Query: 1806 tgacaattgcacaaaccagtatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagata 1865  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 181 tgacaattgcacaaaccagtatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagata 240

Query: 1866 ttcacaccacatcagaagtgattagtgatgtggaaaccattagcagagaaacagcttcga 1925  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 241 ttcacaccacatcagaagtgattagtgatgtggaaaccattagcagagaaacagcttcga 300

Query: 1926 ccgttgtagccgctccaacctcaacaactggatggacagggcgctatgaatacttacatct 1985  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 301 ccgttgtagccgctccaacctcaacaactggatggacagggcgctatgaatacttacatct 360

Query: 1986 cgcaatttacatcctctcttctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcacatcag 2045  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 361 cgcaatttacatcctctcttctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcacatcag 420

Query: 2046 cagtatttgaaacctcagatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatcacgaata 2105  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 421 cagtatttgaaacctcagatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatcacgaata 480

Query: 2106 ctgctgctgttccatctgaagagcccacttttgtaaagccacgagaaaactccttaaatt 2165  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 481 ctgctgctgttccatctgaagagcccacttttgtaaagccacgagaaaactccttaaatt 540

Query: 2166 ccttctgcagcagcaaacagccatccagtcctcatcttatacgtcttccccactcgtat 2225  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 541 ccttctgcagcagcaaacagccatccagtcctcatcttatacgtcttccccactcgtat 600

Query: 2226 cgtccctctccgtaagcaaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacat 2285  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 601 cgtccctctccgtaagcaaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacat 660

Query: 2286 ctaatacatatatcaaaacgaaaaatacgggttactttgagcacacggctttgacaacat 2345  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 661 ctaatacatatatcaaaacgaaaaatacgggttactttgagcacacggctttgacaacat 720

Query: 2346 cttcagttggccttaattcttttagtgaacacagcagtcctcatctcagggaaacgaaaattg 2405  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 721 cttcagttggccttaattcttttagtgaacacagcagtcctcatctcagggaaacgaaaattg 780

Query: 2406 acaccttttagtgtcatccttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagccaattgt 2465  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 781 acaccttttagtgtcatccttgatcgcatatccttcttctgcatcaggaagccaattgt 840

Query: 2466 ccggtatccaacagaatttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaag 2525  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 841 ccggtatccaacagaatttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaag 900

Query: 2526 cgtctatattttctcagctgagctcggttcgatcattttctgcttttctgctacctgc 2585  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 901 cgtctatattttctcagctgagctcggttcgatcattttctgcttttctgctacctgc 960

Query: 2586 tattc**taa**aacgggtactgtacagttagtagacattgagtcgaaatatacgaattattggt 2645  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 961 tattc**taa**aacgggtactgtacagttagtagacattgagtcgaaatatacgaattattggt 1020

Query: 2646 cataatttcatcctggctctttgtttcttcaaccatagttaaatggacagttcatalct 2705  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1021 cataatttcatcctggctctttgtttcttcaaccatagttaaatggacagttcatalct 1080





Query: 1430 tgtgcgccacatctgccattggtacctacagcagtgactgtcacctcgtggccgagt 1489  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1381 tgtgcgccacatctgccattggtacctacagcagtgactgtcacctcgtggccgagt 1440

Query: 1490 atcgtggctactggcggcaccactacgacggctacccccactgaattcagcgccaaaagc 1549  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1441 atcgtggctactggcggcaccactacgacggctacccccactgaattcagcgccaaaagc 1500

Query: 1550 tcttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaacactagtgcgtattccact 1609  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1501 tcttttatctcaaccactactactgatttaacaagtataaacactagtgcgtattccact 1560

Query: 1610 ggatccatttccacagtagaaacaggcaatcgaactacatcagaagtgatcagccatgtg 1669  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1561 ggatccatttccacagtagaaacaggcaatcgaactacatcagaagtgatcagccatgtg 1620

Query: 1670 gtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcctgacaattgcacaaacc 1729  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1621 gtgactaccagcacaaaactgtctccaactgctactaccagcctgacaattgcacaaacc 1680

Query: 1730 agtatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagatattcacaccacatcagaa 1789  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1681 agtatctattctactgactcaaatatcacagtaggaacagatattcacaccacatcagaa 1740

Query: 1790 gtgattagtgtggtgaaaccatttagcagagaaacagcttcgaccgtttagccgctcca 1849  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1741 gtgattagtgtggtgaaaccatttagcagagaaacagcttcgaccgtttagccgctcca 1800

Query: 1850 acctcaacaactggatggacagggcgctatgaatacttacatctcgcaatttacatcctct 1909  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1801 acctcaacaactggatggacagggcgctatgaatacttacatctcgcaatttacatcctct 1860

Query: 1910 tctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcatcagcagatattgaaacctca 1969  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1861 tctttcgcaacaatcaacagcacaccaataatctcttcatcagcagatattgaaacctca 1920

Query: 1970 gatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatcacgaatactgctgctgttccatct 2029  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1921 gatgcttcaattgtcaatgtgcacactgaaaatatcacgaatactgctgctgttccatct 1980

Query: 2030 gaagagcccacttttgtaaatgccacgagaaaactccttaaattccttctgcagcagcaaa 2089  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 1981 gaagagcccacttttgtaaatgccacgagaaaactccttaaattccttctgcagcagcaaa 2040

Query: 2090 cagccatccagtcacctcatcttatacgtcttcccactcgtatcgtccctctccgtaagc 2149  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2041 cagccatccagtcacctcatcttatacgtcttcccactcgtatcgtccctctccgtaagc 2100

Query: 2150 aaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacatctaatacatatatcaaa 2209  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2101 aaaacattactaagcaccagttttacgccttctgtgccaacatctaatacatatatcaaa 2160

Query: 2210 acgaaaaatacgggttactttgagcacacggctttgacaacatcttcagttggccttaat 2269  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2161 acgaaaaatacgggttactttgagcacacggctttgacaacatcttcagttggccttaat 2220

Query: 2270 tcttttagtgaacagcagctctcatctcaggaacgaaaattgacaccttttagtgtca 2329  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2221 tcttttagtgaacagcagctctcatctcaggaacgaaaattgacaccttttagtgtca 2280

Query: 2330 tccttgatcgcataatccttcttctgcatcaggaagccaattgtccggtatccaacagaat 2389  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2281 tccttgatcgcataatccttcttctgcatcaggaagccaattgtccggtatccaacagaat 2340

Query: 2390 ttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaagcgtctatatttttctca 2449  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 2341 ttcacatcaacttctctcatgatttcaacctatgaaggtaaagcgtctatatttttctca 2400

```

Query: 2450 gctgagctcggttcgcgatcatttttctgcttttgctcgtacctgctattctaaaacgggtac 2509
          |
Sbjct: 2401 gctgagctcggttcgcgatcatttttctgcttttgctcgtacctgctattctaaaacgggtac 2460

Query: 2510 tgtacagttagtagcattgagtcgaaatatacgaaattattgttcataattttcacacctgg 2569
          |
Sbjct: 2461 tgtacagttagtagcattgagtcgaaatatacgaaattattgttcataattttcacacctgg 2520

Query: 2570 ctctttgtttcttcaaccatagttaaatggacagttcatalcttaaactctaataatact 2629
          |
Sbjct: 2521 ctctttgtttcttcaaccatagttaaatggacagttcatalctt-aaactctaataatact 2579

Query: 2630 tttctagttcttatccttttccgtctcaccgcagattttatcatagtattaaatttata 2689
          |
Sbjct: 2580 tttctagttcttatccttttccgtctcaccgcagattttatcatagtattaaatttata 2639

Query: 2690 tttgttcgtaaaaagaaaaatttgtagcggtaccgctcgtttcattaccgaaggctgt 2749
          |
Sbjct: 2640 tttgttcgtaaaaagaaaaatttgtagcggtaccgctcgtttcattaccgaaggctgt 2699

Query: 2750 ttcagtagaccactgattaagtaagtagatgaaaaaatttcaccatgaaagagttcg 2809
          |
Sbjct: 2700 ttcagtagaccactgattaagtaagtagatgaaaaaatttcaccatgaaagagttcg 2759

Query: 2810 atgagagctactttttcaaatgcttaacagctaaccgccattcaataatgttacgttctc 2869
          |
Sbjct: 2760 atgagagctactttttcaaatgcttaacagctaaccgccattcaataatgttacgctctc 2819

Query: 2870 ttcattctgcggtacgttatctaacaagaggttt 2904
          |
Sbjct: 2820 ttcattctgcggtacgttatctaacaagaggttt 2854

```

**Figura 50.** Análise comparativa da sequência construída e a sequência molde da fusão entre o cDNA da glicoamilase (*gla3*) e a porção final do gene da  $\alpha$ -aglutinina de 1,4 kb. Correlação no programa *Blast 2 sequences*. Sequência em vermelho: mutação; Sequência em azul: ponto de fusão da glicoamilase e da  $\alpha$ -aglutinina; Sequência em verde: códon de parada da  $\alpha$ -aglutinina; *Query*: sequência original; *Subject*: sequência clonada e sequenciada.