

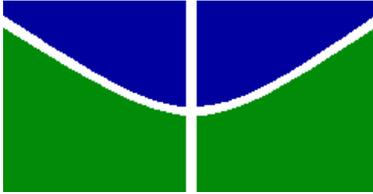


Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Laboratório de Biofísica Molecular

**Purificação e Caracterização Estrutural de uma
 α -amilase de *Cryptococcus flavus* expressa
em *Saccharomyces cerevisiae* “MFL”.**

Muriele Taborda Lottermann

2012



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Laboratório de Biofísica Molecular

**Purificação e Caracterização Estrutural de uma
 α -amilase de *Cryptococcus flavus* expressa
em *Saccharomyces cerevisiae* “MFL”.**

Muriele Taborda Lottermann

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria de Freitas
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Lídia Maria Pepe de Moraes

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular da Universidade de
Brasília como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Biologia Molecular.

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Elizete, por todo apoio, carinho e amor.

“Deus nunca disse que a jornada seria fácil; mas Ele disse que a chegada valeria à pena.”

Max Lucado

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre atender os meus pedidos e me dar forças para encarar todas as dificuldades.

Aos meus pais, João Carlos Lottermann e Elizete Taborda Lottermann, por apoiar as minhas decisões e por estarem comigo em todos os momentos. Mesmo morando longe, sempre me deram apoio, forças e ânimo. Agradeço por nunca terem deixado faltar nada pra mim durante essa caminhada. Amo vocês!

Ao meu irmão, João Pedro Taborda Lottermann, que morou comigo por um tempo, obrigada pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis e obrigada pelos momentos de descontração que passamos juntos.

Ao meu irmão, Carlos Eduardo Taborda Lottermann, por sempre me transmitir alegria e confiança, trazendo felicidade sempre.

À toda a minha família, em especial minha avó, Terezinha de Jesus Taborda, por sempre acreditar em mim e transmitir alegria.

À professora e orientadora, Sonia Maria de Freitas, que me acompanhou durante todos esses anos, com paciência e sabedoria. Obrigada pela confiança, pelo apoio e dedicação.

Às minhas amigas, Kamilla Souza Costa, Larissa Lompa, Taís Lottermann, Roberta Fontana e Letícia Pinheiro pelo carinho e atenção durante toda essa caminhada.

Aos queridos amigos do laboratório de Biofísica Molecular: Sandrielle, Mary-Ann, Willian, Daniella, Diego, Jonny, pelos momentos agradáveis e divertidos e pelo apoio durante a realização dos experimentos.

À querida amiga, Alice, que tornou a vida de laboratório muito mais especial, obrigada pelo apoio e pela ajuda durante todos esses anos.

À querida amiga, Larissa da Costa Souza, grande companheira de laboratório durante todos esses anos, obrigada pela amizade e pela ajuda.

Aos colegas de graduação que me apoiaram durante a seleção do mestrado e fizeram meus dias na UnB mais felizes.

Aos alunos, professores e técnicos do laboratório de Biologia Molecular, pela parceria, ajuda e amizade.

À professora e co-orientadora, Lídia Maria Pepe de Moraes, pelos ensinamentos e dedicação para o desenvolvimento desse trabalho de mestrado.

Ao professor, Cirano, e toda a equipe do laboratório de enzimologia da UFG pela purificação da AMY1 selvagem.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite.

Ao técnico do laboratório, Chiquinho, pela prontidão em ajudar e pela alegria que transmite.

Ao pessoal da secretaria de Pós-graduação em Biologia Molecular, em especial à Ana, pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela oportunidade de crescimento profissional e por todo o apoio.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de formação profissional.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, pela oportunidade de fazer os ensaios de cristalização.

À Capes, ao CNPq e à FAPDF pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho de mestrado.

RESUMO

A crise energética que vem atualmente sendo estabelecida mundialmente deve-se principalmente à elevação de preços e escassez de fontes de petróleo. Em virtude disso, novas fontes para a produção de combustíveis tem sido exploradas, entre elas, o amido para a produção de bioetanol. Para fermentação alcoólica o amido deve ser clivado para liberação das moléculas de glicose presentes em sua estrutura. Uma das enzimas necessárias nesse processo é a α -amilase, responsável pela hidrólise das ligações α -1,4 do amido liberando maltose e oligossacarídeos. Neste trabalho apresentamos estudo biofísico e estrutural de uma α -amilase (Amy1), proteína da levedura *Cryptococcus flavus*, expressa em *Saccharomyces cerevisiae*. A Amy1 foi obtida a partir do crescimento da levedura recombinante por 72 horas em meio de cultura com extrato de levedura como fonte de nitrogênio e purificada por cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular. Essa enzima apresenta atividade ótima em pH 5,5. Estudos de dicroísmo circular (CD) da Amy1 recombinante em comparação com a proteína selvagem mostraram que a expressão em um organismo diferente não alterou significativamente a estrutura da α -amilase recombinante. A estrutura secundária da Amy1 recombinante em água a 25°C é constituída de 9,1% de α -hélice e 32,7% de folhas- β e da Amy1 selvagem de 8,2% de α -hélice e 34,7% de folhas- β . Nenhuma das proteínas apresentou padrão de desnaturação com a elevação da temperatura até 95°C, indicando a estabilidade estrutural dessas moléculas. Estudos de atenuação de fluorescência, utilizando atenuadores carregados e neutros e ajustes de Stern-Volmer, revelaram que a proteína recombinante apresenta uma população de triptofano predominantemente semi-enterrada. O microambiente desse aminoácido é parcialmente carregado positivamente, indicado pelos valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) obtidas para a partir da atenuação de fluorescência pela acrilamida, cloreto de cézio e iodeto de potássio, nos pHs 5,5; 7,0 e 9,0. Mudanças conformacionais da proteína ocorrem em pHs neutro e alcalino levando a inativação da enzima. No entanto, as mudanças ocorridas em pH 5,5 são importantes para o aumento da atividade catalítica dessa enzima.

Palavras-chave: *Cryptococcus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, α -amilase, estrutura de proteínas, dicroísmo circular, fluorescência estática.

ABSTRACT

The energy crisis currently established worldwide has been the main motivation to explore new sources for fuel production, as starch used for bioethanol. In this process the α -amylase, responsible for the hydrolysis of the starch α -1-4 covalent bonds, is used to release maltose and oligosaccharides. Here, we present structural and biophysical studies of the α -amylase (Amy1) from yeast *Cryptococcus flavus*, expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The Amy1 was obtained from recombinant yeast in culture medium for 72 hours with yeast extract as nitrogen source. The enzyme was purified by ion exchange and molecular exclusion chromatography and presents optimal activity in pH 5.5. Structural studies using circular dichroism (CD) spectroscopy showed that recombinant and wild type amylases (Amy1) are structurally similar. The secondary structure content of recombinant and wild Amy1 in water at 25°C consists of 9.1% and 8.2% α -helix, 32.7% and 34.7% β -sheet, respectively. The amylases were characterized as thermal stable proteins, since none denaturation profile was observed under increasing temperature up to 95°C. Fluorescence decay studies using charged and neutral quenchers and Stern-Volmer approximation revealed that the recombinant protein has a population of tryptophan predominantly semi-buried. The tryptophan microenvironment is partially positively charged, indicated by the values of the Stern-Volmer constant (K_{SV}) obtained from attenuation of fluorescence by acrylamide, cesium chloride and potassium iodide at pH 5.5, 7.0 and 9.0. Protein conformational changes occur in neutral and alkaline pH leading to inactivation of the enzyme. However, at pH 5.5 these conformational changes are important for increasing the catalytic activity of this enzyme.

Keywords: *Cryptococcus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, α -amylase, protein structure, circular dichroism, static fluorescence.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XV
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XVI
1. Introdução.....	01
1.1 Considerações Gerais.....	01
1.2 Bioenergia e Bioetanol.....	03
1.3 Mandioca.....	04
1.4 Amido.....	05
1.5 Produção de Bioetanol a partir de Amido.....	07
1.6 Alfa-amilases.....	08
1.6.1 Estrutura e Organização.....	09
1.6.2 Sítio Ativo.....	10
1.6.3 Mecanismo Catalítico.....	11
1.6.4 Sítio de Ligação ao Cálcio.....	12
1.6.5 Estabilidade.....	13
1.7 Amy1 – A α -amilase de <i>Cryptococcus flavus</i>	14
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. Materiais e Métodos.....	16

3.1 Linhagens utilizadas.....	16
3.2 Meios de cultura e soluções.....	16
3.3 Transformação rápida de levedura.....	18
3.4 Ensaio de atividade enzimática.....	18
3.5 Atividade amilolítica em gel de poliacrilamida – Zimograma.....	19
3.6 Quantificação de proteínas.....	19
3.7 Análise das proteínas em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE	20
3.8 Determinação das condições ótimas para a expressão.....	20
3.9 Purificação da proteína.....	21
3.11.1 Cromatografia por troca iônica.....	21
3.11.2 Cromatografia por filtração em gel.....	22
3.10 Análises estruturais por Dicroísmo Circular (CD).....	22
3.11 Análises estruturais por Fluorescência Estática.....	24
3.12 Cristalização da Amy1 recombinante.....	25
4. Resultados e Discussão.....	26
4.1 Produção da α -amilase recombinante de <i>C. flavus</i> expressa em <i>S. cerevisiae</i> MFL-AMY1.....	26
4.1.1 Otimização das condições de cultura.....	26
4.1.2 Produção da AMY1 recombinante.....	29
4.1.3 Purificação da Amy1 recombinante.....	32
4.2 Ensaio de N-deglicosilação e Zimograma.....	34
4.3 Análises por Dicroísmo Circular.....	36

4.3.1 Amy1 recombinante apresenta dobramento diferente da Amy1 selvagem.....	36
4.3.1.1 Efeito do pH e força iônica na estabilidade estrutural da α -amilase recombinante	41
4.3.2 Amy1 recombinante apresenta padrão de dobramento semelhante ao da Amy1 selvagem em condições diferentes de cultivo.....	44
4.4 Fluorescência Estática.....	50
4.5 Cristalização da Amy1 recombinante.....	60
5. Conclusões.....	62
6. Referências.....	64

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1** – Estrutura da Amilose (A) formada somente por ligações do tipo α 1-4 entre as moléculas de glicose; e da Amilopectina (B) formada por ligações α 1-4 e α 1-6 entre as moléculas de glicose (Adaptada de Tester & Karkalas, 2002)..... 06
- Figura 2** – Organização em domínios da α -amilase. (Figura adaptada de Mótyán et al., 2011)..... 09
- Figura 3** – α -Amilase de *Bacillus subtilis* complexada com arcabose. Código no PDB 1UA7 (Kagawa et al., 2003)..... 11
- Figura 4** – Mecanismo catalítico das α -amilases. (I) Protonação do oxigênio glicosídico e ataque no carbono C1 da glicose pelo Aspartato. (II) Ativação da molécula de água, clivagem da ligação covalente entre o carbono C1 da glicose e o Aspartato. (III) Regeneração do estágio inicial de protonação (Figura retirada de Nielsen & Borchert, 2000)..... 12

Resultados e Discussão

- Figura 5** – Crescimento de *S. cerevisiae* MFL-AMY1 em placa de Petri. As regiões não coradas com iodo representam os halos de atividade enzimática..... 26

Figura 6 – Influência da fonte de nitrogênio no crescimento da levedura MFL-AMY1. A OD (600nm) foi medida nos diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata..... 28

Figura 7 – Avaliação do efeito da fonte de nitrogênio na quantidade de proteína total do sobrenadante do meio de cultura produzida pela levedura MFL-AMY1. A quantidade total de proteína ($\mu\text{g/mL}$) foi acompanhada nos diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata..... 28

Figura 8 – Influência da fonte de nitrogênio na produção de Amy 1. A atividade enzimática (UE.mL^{-1}) do sobrenadante foi acompanhada nos diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata..... 29

Figura 9 – Cinética de crescimento da levedura MFL-AMY1 em meio com extrato de levedura. A – $\text{OD}_{600\text{nm}}$; B – peso seco de 1mL de meio de cultura. A leitura da OD (600nm) e o peso seco foram feitos em diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata..... 31

Figura 10 – Cinética de produção enzimática da levedura MFL-AMY1 em meio com extrato de levedura. A – atividade enzimática do sobrenadante; B – proteína total do sobrenadante. A atividade enzimática e a proteína total do sobrenadante foram dosadas em diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata..... 32

Figura 11 – Cinética da produção de Amy 1 em meio com extrato de levedura. A banda de aproximadamente 66,2 kDa referente a Amy1 está destacada, as outras bandas são proteínas produzidas pela levedura ou do meio de cultura e não são de interesse nesse trabalho. Em todos os poços foi colocado a quantidade de proteína presente em 1mL do sobrenadante do meio de cultura. O gel foi corado com comassie coloidal..... 33

- Figura 12** – Perfil cromatográfico do sobrenadante do meio de cultura em coluna de troca iônica (Q-Sepharose). As frações correspondem ao gradiente de NaCl (0-0,5M). As frações com atividade enzimática estão indicadas pelas setas. Essas frações foram reunidas, dialisadas e liofilizadas..... 34
- Figura 13** – Perfil cromatográfico das frações com atividade enzimática da cromatografia de troca iônica em coluna de filtração em gel (Sephadex 200 10/30) feita em FPLC. As frações com atividade enzimática estão indicadas com a seta, essas frações foram reunidas e submetidas a análises em SDS-PAGE..... 35
- Figura 14** – Análise eletroforética em SDS-PAGE da enzima Amy 1 tratada e não tratada com PGNase F. MM – marcador molecular; A – Amy 1 purificada ; B – fração A tratada com PGNaseF. O gel foi corado com coomassie coloidal..... 36
- Figura 15** – Zimograma da Amy1purificada. A região não corada representa o halo de atividade correspondente a banda da α -amilase no gel..... 37
- Figura 16** – Espectros de dicroísmo circular distante do UV das α -amilases recombinante (Amy1) e selvagem (Amy1_w) em pH 7,0 na temperatura de 25°C..... 38
- Figura 17** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 selvagem em pH 7,0. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C..... 40
- Figura 18** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 7,0. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C..... 41
- Figura 19** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV comparando a Amy1 selvagem e a Amy1 recombinante em pH 7,0 nas temperaturas de 25 e 95°C..... 42

- Figura 20** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV da Amy1 recombinante nos pHs 3,0; 4,0; 5,5; 7,0; 7,0 com NaCl 0,2 M e 8,0 na temperatura de 25°C..... 43
- Figura 21** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 8,0. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C..... 44
- Figura 22** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 7,0 em presença de NaCl 0,2 M. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C..... 44
- Figura 23** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV da Amy1 recombinante – comparação entre pH 7,0 com e sem NaCl nas temperaturas de 25° e 95°C..... 45
- Figura 24** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV comparando a Amy1 selvagem e a Amy1 recombinante em água na temperatura de 25°C..... 48
- Figura 25** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 selvagem em água. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C..... 49
- Figura 26** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 5,5. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C..... 50
- Figura 27** – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV comparando a Amy1 selvagem em água e em pH 7,0 nas temperaturas de 25 e 95°C..... 51
- Figura 28** – Espectros de emissão de fluorescência da Amy1 em pH 5,5 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,0 (C) com adição de concentrações crescentes de acrilamida, a 25°C. Excitação em 295 nm..... 54

Figura 29 – Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência com acrilamida da Amy1 recombinante nos pHs 5,5 (■), 7,0 (●) e 9,0 (▲). K_{sv} representa a inclinação da reta, F_0 a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. A linha sólida representa a curva ajustada pela equação clássica de Stern-Volmer..... 55

Figura 30 – Espectros de emissão de fluorescência da Amy1 em pH 5,5 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,0 (C) com adição de concentrações crescentes de cloreto de célio, a 25°C. Excitação em 295 nm..... 57

Figura 31 – Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência com cloreto de célio da AMY1 recombinante nos pHs 5,5 (■), 7,0 (●) e 9,0 (▲). K_{sv} representa a inclinação da reta, F_0 a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. A linha sólida representa a curva ajustada pela equação clássica de Stern-Volmer..... 38

Figura 32 – Espectros de emissão de fluorescência da Amy1 em pH 5,5 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,0 (C) com adição de concentrações crescentes de iodeto de potássio, a 25°C. Excitação em 295 nm..... 59

Figura 33 – Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência com iodeto de potássio da AMY1 recombinante nos pHs 5,5 (■), 7,0 (●) e 9,0 (▲). K_{sv} representa a inclinação da reta, F_0 a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. A linha sólida representa a curva ajustada pela equação clássica de Stern-Volmer..... 60

Figura 34 – Cristal da Amy1 recombinante obtido nas condições: Bis-tris propano 0,1 M pH 7,5; PEG 3350 20% w/v; fluoreto de sódio 0,1 M..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição aproximada do amido de mandioca (Adaptada de Nwokocha <i>et. al</i> , 2009).....	07
Tabela 2 – Comparação das porcentagens de estrutura secundária entre as α -amilases selvagem e recombinante em pH 7,0 nas temperaturas de 25 e 95°C.....	38
Tabela 3 – Porcentagem de estrutura secundária da α -amilase recombinante nos pHs 3,0; 4,0; 5,5; 7,0; 8,0 e 7,0 com NaCl 0,2 M na temperatura de 25°C.....	42
Tabela 4 – Porcentagem de estrutura secundária das α -amilases nativa e recombinante em água a 25 e 95°C.....	47
Tabela 5 - Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) para os atenuadores (acrilamida, iodeto e césio) nos pHs 5,5; 7,0 e 9,0.....	55

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio

μL – microlitro

Å - Ångstron

Amy1 – α-amilase de *C. flavus*

Anfavea – Associação nacional de fabricantes de veículos automotores

Ca⁺² – íon de cálcio

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CBM – Módulo de ligação ao carboidrato

CD – dicroísmo circular

Cepea – Centro de estudos avançados em economia aplicada

cm – centímetro

Conab – Companhia nacional de abastecimento

Cs⁺ – íon de céσιο

C-terminal – Domínio carboxi-terminal da cadeia polipeptídica

Cu⁺² – íon de cobre

EC – Comissão de Enzimas

Fe⁺² – íon de ferro

g/L – grama por litro

GRAS – Generally Recognized as Safe

h – hora

HCl – ácido clorídrico

Hg⁺² – íon de mercúrio

I⁻ – íon iodeto

I⁻³ – triiodeto

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

JCSG – Join Center for structural genomics

kDa – kilo Dalton

K_m – Constante de Michaelis-Mentem

K_{sv} – constante de Stern-Volmer

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

M – molar

mg – miligramas

mg/mL – miligramas por mililitro

Mg⁺² – íon de magnésio

min – minuto

mL - mililitro

mL/h – mililitro por hora

mM – micromolar

Mn⁺² – íon de manganês

NaCl – cloreto de sódio

NH₄ – amônia

nm – nanômetro

nm/min – nanômetro por minuto

N-terminal – Domínio amino-terminal da cadeia polipeptídica

Θ – theta

°C – grau Celsius

OD – densidade óptica

p/v – relação peso/volume

pH – potencial hidrônico

Proálcool – Programa Brasileiro do Álcool

rpm – rotação por minuto

s – segundo

SBD – Domínio de ligação ao amido

SDS – Dodecilsulfato de sódio

TCA – ácido tricloroacético

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

Trp – triptofano

UE/mL – unidade enzimática por mililitro

ÚNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar

UV – ultravioleta

V – volts

YNB – yeast nitrogen base

Zn⁺² – íon de zinco

α – alfa

β – beta

λ_{máx} – comprimento de onda máximo

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

Alfa-amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 de poliglicosídeos como o amido e o glicogênio (Gupta *et al.*, 2003). As α -amilases têm sido aplicadas tecnologicamente em diversas áreas de interesse econômico, principalmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de detergentes. Atualmente essas enzimas têm sido investigadas como fonte natural para a produção de biocombustíveis, uma das alternativas para solução do problema energético mundial, justificável pela escassez e oscilação dos preços do petróleo e aumento de problemas ambientais ligados aos combustíveis fósseis. Nesse contexto, as α -amilases passaram a ser utilizadas na produção de bioetanol por meio da fermentação de biomassa renovável (Khaw *et al.*, 2005).

A utilização da biomassa como fonte de energia renovável e o incentivo tecnológico e científico nessa área são imprescindíveis para o desenvolvimento de empresas locais e para o estabelecimento de uma fonte de rendimento alternativa para os agricultores nas diversas regiões brasileiras. Uma dessas fontes de biomassa que vem sendo objeto de pesquisas é o amido, encontrado no milho e na mandioca, fontes de baixo custo de produção e de alto conteúdo de amido (Urquiaga *et al.*, 2005).

Em 1975 o Brasil lançou o Programa Brasileiro do Álcool (Proálcool) com os objetivos de reduzir o impacto causado pelo aumento do preço do petróleo e diminuir os prejuízos do setor sucroalcooleiro por efeito da queda do preço do açúcar no mercado internacional (Mendonça *et al.*, 2008). A partir da criação desse projeto o Brasil passou a investir no desenvolvimento de tecnologias para a melhoria e maior rendimento na produção do etanol, porém ainda há uma carência de pesquisas nessa área.

Segundo as agências de análise Fo Licht, em 2010, a produção mundial de etanol deve crescer 11%, chegando a atingir 96,8 milhões de metros cúbicos. No

Brasil houve crescimento na demanda interna desde a implementação do Proálcool até o lançamento dos carros bicombustíveis (tipo flex) em 2003, fator que contribui para esse aumento da demanda.

A Associação Nacional de Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea) e a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) divulgaram que em janeiro de 2010 as vendas de carros bicombustíveis representaram 90% da venda total de automóveis. Para atender o aumento dessa demanda de etanol tanto interna como externa é necessário que o Brasil busque fontes alternativas para sua produção.

Em face da importância do investimento nacional no desenvolvimento e implementação de fontes alternativas para a produção de fontes renováveis de energia, os objetivos específicos que nortearam esse trabalho foram a produção e caracterização físico-química e estrutural de uma alfa α -amilase isolada de um fungo do cerrado de Brasília. Nesse sentido, a levedura *Cryptococcus flavus*, objeto de estudo da presente dissertação, foi isolada a partir de frutos do cerrado brasileiro durante uma busca por fontes de α -amilases na biodiversidade do cerrado. Embora essa levedura seja capaz de metabolizar amido, ela não pode ser utilizada na indústria por não possuir *status* GRAS (Generally Recognized as Safe). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui *status* GRAS e é largamente utilizada na indústria de bioetanol, porém não é capaz de degradar amido para produzir açúcares fermentáveis, necessários para a produção de etanol a partir de amido. Para isso é preciso clonar e expressar heterologicamente enzimas amilolíticas nesse organismo.

Considerando a busca por fontes alternativas ao açúcar proveniente de cana-de-açúcar para a produção de etanol e a importância da utilização das α - α -amilases para sua produção a partir de amido, conforme enfatizado anteriormente, esse trabalho tem como objetivo a produção e caracterização biofísica de uma α -amilase de *C. flavus* expressa em *S. cerevisiae*. Adicionalmente, essa enzima será analisada comparativamente com a proteína selvagem visando à comprovação da preservação de suas propriedades físico-

químicas e estruturais durante a expressão, fundamentais para aplicação tecnológica nas áreas descritas acima, principalmente na produção do etanol.

1.2 Bioenergia e Bioetanol

Atualmente há um grande interesse na área biotecnológica e industrial por novas fontes de energia. Tal interesse se deve principalmente à conscientização da sociedade e das autoridades políticas de que as fontes mundiais de petróleo são finitas e à rápida destruição dessas fontes (Bai *et al.*, 2008). As novas fontes de energia precisam ser renováveis, sustentáveis, eficientes, baratas, além de seguras e sem nenhum risco de comprometimento com o meio ambiente (Chum & Overend, 2001).

Grande parte dos problemas ambientais na atualidade se deve ao consumo excessivo de combustíveis derivados do petróleo, como o diesel e a gasolina (Bai *et al.*, 2008). Ao longo dos anos, os preços do petróleo também sofreram aumento e a sociedade moderna vem enfrentando uma crise energética em virtude da falta de fontes para a produção de energia. Em busca de soluções para esses obstáculos, o bioetanol e o biodiesel têm sido alvos de investigações que os colocam como alternativas bioenergéticas em relação aos combustíveis fósseis (Khaw *et al.*, 2007).

O uso de biocombustíveis em veículos apresenta vantagens ambientais em relação aos combustíveis fósseis, como a diminuição das emissões de poluentes pelos veículos que são prejudiciais à saúde humana e/ou ao meio ambiente e a diminuição das emissões de gases que ocasionam o efeito estufa, como o dióxido de carbono (Urquiaga *et al.*, 2005). O bioetanol, por ser renovável e menos prejudicial ao meio ambiente, tende a ser uma das melhores alternativas entre as modalidades de bioenergia (Bai *et al.*, 2008).

Na década de 70, em razão da Crise do Petróleo e da Crise Econômica de 1979, o governo brasileiro implementou o “Proalcool”, Programa Nacional do Álcool, com objetivo de substituir em larga escala os combustíveis derivados de

petróleo por bioetanol (Nitsch, 1991). Por meio desse programa houve um grande investimento tecnológico para aperfeiçoar o sistema de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, o que contribuiu para o Brasil ser hoje um dos grandes produtores mundiais de etanol. Segundo estimativa da consultoria alemã F. O. Licht a produção de etanol no Brasil em 2010/2011 deve subir para 27,4 bilhões de litros, contra 24 bilhões em 2009/2010.

O método de produção de etanol mais utilizado é a fermentação de biomassa por microrganismos, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a mais empregada. As principais fontes de carboidrato utilizadas para a produção de etanol no Brasil são o a cana-de-açúcar e a beterraba, e mais recentemente, a mandioca, o sorgo e a batata doce (Nguyen *et al.*, 2007; Swain *et al.*, 2007). Segundo Cortez *et. al* (2007) o Brasil é responsável por 34% da produção de etanol mundial, estando atrás apenas dos EUA que produz 36%.

1.3 Mandioca

A produção de etanol por meio da fermentação de substratos ricos em amido vem sendo alvo de pesquisas como alternativa em relação aos combustíveis derivados do petróleo, objetivando a utilização como combustível veicular. O milho se destaca entre as matérias-primas vegetais fornecedoras de amido, devido, principalmente, à utilização, em larga escala, na economia norte-americana (Gray *et.al*, 2006). No Brasil a cana-de-açúcar é a principal fonte utilizada para a produção de etanol.

Na economia brasileira, a mandioca vem ganhando destaque em relação à cana-de-açúcar como fonte alternativa de carboidratos para a produção de etanol. Isso se deve, principalmente, a facilidade de cultivo e ao baixo custo de produção. O seu cultivo, geralmente, é associado aos pequenos produtores rurais em razão da variedade de produtos alimentares que podem ser obtidos, como farinha, fécula de mandioca, tapioca, entre outros (Urquiaga *et al.*, 2005).

A cultura da mandioca tem apresentado uma melhoria considerável na produção por consequência da introdução de novas formas de manejo, de novas variedades de mandioca com maior conteúdo de amido e de técnicas agrícolas eficientes. Segundo estimativas do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produção de mandioca no período de 2010/11 foi de 26,131 milhões de toneladas, representando um rendimento de 7,3% a mais e um aumento de 1,777 milhão de toneladas em relação à safra de 2009/10.

A Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) estimou a produção brasileira de 26,65 milhões de toneladas de raiz de mandioca em 2009. De acordo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), a produção de fécula de mandioca atingiu 583,8 mil toneladas em 2010.

Devido às condições desfavoráveis para o plantio e cultivo da cana-de-açúcar, que requer condições climáticas específicas para produtividade expressiva, a busca por outros tipos de culturas é necessária. Nesse contexto, a mandioca tem sido escolhida como uma das mais indicadas para substituir a cana de açúcar porque ela se adapta a vários tipos de climas e solos, além de requerer um nível tecnológico relativamente baixo para sua produção.

Considerando-se o alto conteúdo de amido na mandioca, a possibilidade de se atingir produtividades altas com pouco investimento e do uso de áreas pouco favoráveis às grandes culturas, há interesse crescente na utilização desse material para produção de bioetanol, que ainda se encontra em fase experimental. Segundo Soares *et. al* (2008) uma indústria de processamento da mandioca poderia funcionar o ano todo, pois a cultura é pouco dependente de uma estação específica de colheita e ela ainda pode ser armazenada na forma desidratada.

1.4 Amido

O amido é um biopolímero sintetizado por vegetais e é utilizado como molécula de armazenamento de glicose mais comum e abundante em plantas (Tester & Xin Qi, 2004). As fontes vegetais que mais se destacam no

armazenamento de amido são as sementes de cereais (como o arroz, milho, trigo, cevada, sorgo e outros), as sementes de feijões e ervilhas, os caules do tipo tubérculos (batata, batata doce, inhame) e as raízes de armazenamento (mandioca) (Zeeman *et. al*, 2010). O amido é muito utilizado na alimentação, na indústria e mais recentemente como matéria-prima para a produção de bioetanol.

Os grânulos de amido são compostos por dois tipos de alfa-glucanos, a amilose e a amilopectina (Figura 1). A amilopectina é o componente mais abundante, totalizando 75% ou mais do grânulo de amido (Tester & Xin Qi, 2004; Zeeman *et. al*, 2010). A amilose é longa e linear, apresenta 99% de ligações α 1-4 entre as moléculas de glicose, e é encontrada em diferentes tamanhos e estruturas que dependem da origem botânica. A amilopectina é uma molécula maior que a amilose, com ramificações e estrutura formada por cerca de 95% de ligações glicosídicas α 1-4 e 5% de ligações α 1-6. A estrutura mais comum do amido é formada por interações entre cadeias de amilose (geralmente internas) e cadeias externas de amilopectina formando duplas-hélices que podem se associar (Tester & Xin Qi, 2004).

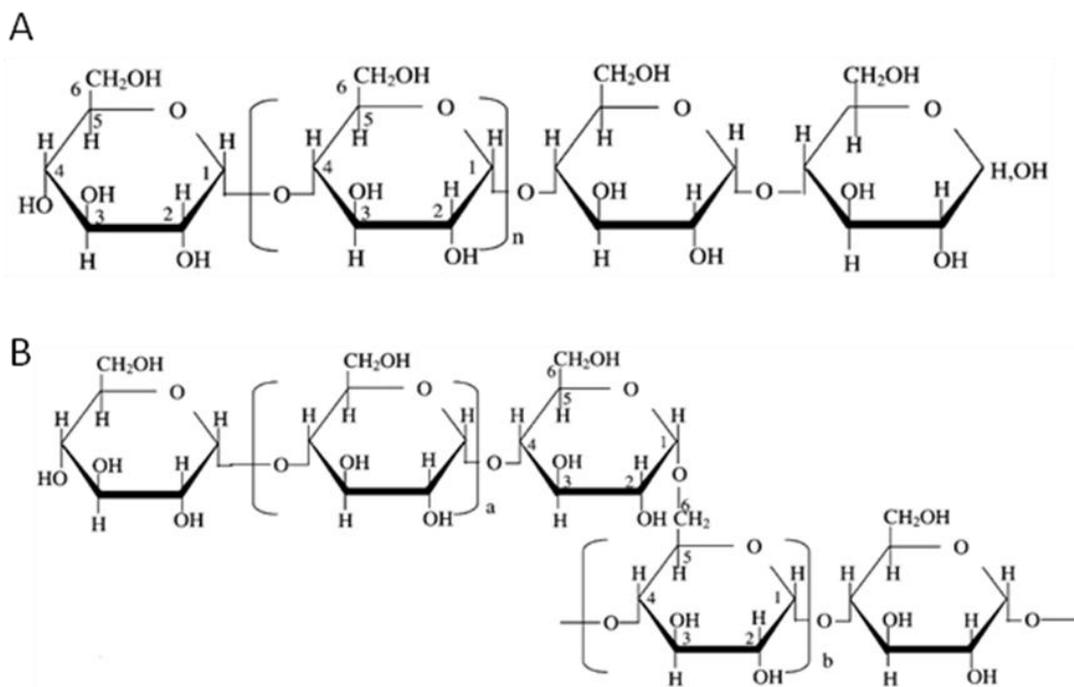


Figura 1 – Estrutura da Amilose (A) formada somente por ligações do tipo α 1-4 entre as moléculas de glicose; e da Amilopectina (B) formada por ligações α 1-4 e α 1-6 entre as moléculas de glicose (Adaptada de Tester & Karkalas, 2002).

As características físicas e as propriedades químicas podem diferir entre amidos de diferentes fontes (Nwokocha *et. al*, 2009). A importância dessas propriedades está relacionada na determinação de como o amido pode ser utilizado. Segundo Leach (1965), as diferenças entre os amidos podem ocorrer devido a diferenças na relação amilose/amilopectina, nas características como peso molecular, comprimento/grau de ramificação e na organização física nos grânulos de amido.

As principais características do amido proveniente da mandioca estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 – Composição aproximada do amido de mandioca (Adaptada de Nwokocha *et. al*, 2009).

Umidade (%)	14,6 ± 0,20
Impurezas (%)	0,29 ± 0,06
Nitrogênio (%)	0,08 ± 0,008
Amilose (%)	29,29 ± 0,03
Faixa de tamanho do grânulo (µm)	2,81 – 14,03
pH a 25°C	6,56
Faixa de temperatura de gelatinização (°C)	60,11 – 72,67

1.5 Produção de bioetanol a partir de amido

O amido é uma fonte em potencial para a produção de etanol, encontrado no milho, trigo, batata-doce e mandioca (Nigam & Singh, 1995). Para a produção de bioetanol a partir de amido é necessário a liquefação desse, que é a conversão do amido em glicose. Esse processo ocorre pela ação catalítica em conjunto das enzimas do tipo α -amilases e glicoamilases (Nigam & Singh, 1995). Esse processo geralmente é realizado em pHs abaixo de 6,0, condição que resulta na maior atividade enzimática e, conseqüentemente, na maior concentração de produtos formados (Nielsen & Borchert, 2000).

Muitos microrganismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizados nos processos de fermentação alcoólica não produzem enzimas que catalisam a hidrólise do amido e por isso não são capazes de degradar amido (Gupta *et al.*, 2003). Para utilizar o amido como substrato para a produção do etanol é necessário, portanto, adicionar enzimas que degradam o amido antes da fermentação ou usar cepas recombinantes que produzam tais enzimas para o utilizarem como fonte de carbono (Altintas *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2002).

1.6 Alfa-amilases

As α -amilases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações O-glicosídicas do amido, do glicogênio e de outros oligossacarídeos (Kuriki & Imanaka, 1999, MacGregor *et al.*, 2001). A Comissão de Enzimas (EC) classifica essas proteínas baseadas na reação por ela catalisada e a essa reação é então atribuído um número EC que a identifica. Para as α -amilases esse número é 3.2.1.1 e a reação é descrita como “endo-hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 em oligossacarídeos e polissacarídeos” (Nielsen & Borchert, 2000).

As α -amilases são encontradas em órgãos animais, como o pâncreas e as glândulas salivares, no plasma e na urina humana. São encontradas também em plantas e em microrganismos como fungos, leveduras e bactérias. Alguns insetos também possuem α -amilases que são as enzimas chave na digestão e no metabolismo de carboidratos (Brena *et al.*, 1996).

Existem inúmeras aplicações industriais e biotecnológicas para as α -amilases. A sua maior utilização é na liquefação do amido no processo de produção de açúcar, álcool e cerveja. As α -amilases também são utilizadas na produção de detergentes, na indústria têxtil, panificadora e farmacêutica, no tratamento de esgotos e na alimentação animal. As α -amilases representam, nos dias atuais, aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas, sendo uma das mais populares e importantes formas de α -amilases industriais (Sidhu *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2003).

1.6.1 Estrutura e Organização

As α -amilases pertencem à família 13 das glicosil hidrolases (GH13) e apresentam propriedades físico-químicas e estruturais semelhantes (Henrissat & Bairoch, 1993). As α -amilases apresentam estrutura tridimensional altamente conservada (Prakash & Jaiswal, 2010). Friedberg (1983) foi o primeiro a sugerir que há homologia entre α -amilases de diferentes origens. Quatro regiões relacionadas ao sítio catalítico e ao sítio de ligação ao substrato são altamente conservadas em α -amilases diferentes (Canganella *et al.*, 1994). A estrutura básica consiste de uma cadeia polipeptídica única dobrada em três domínios denominados A, B e C (Figura 2).

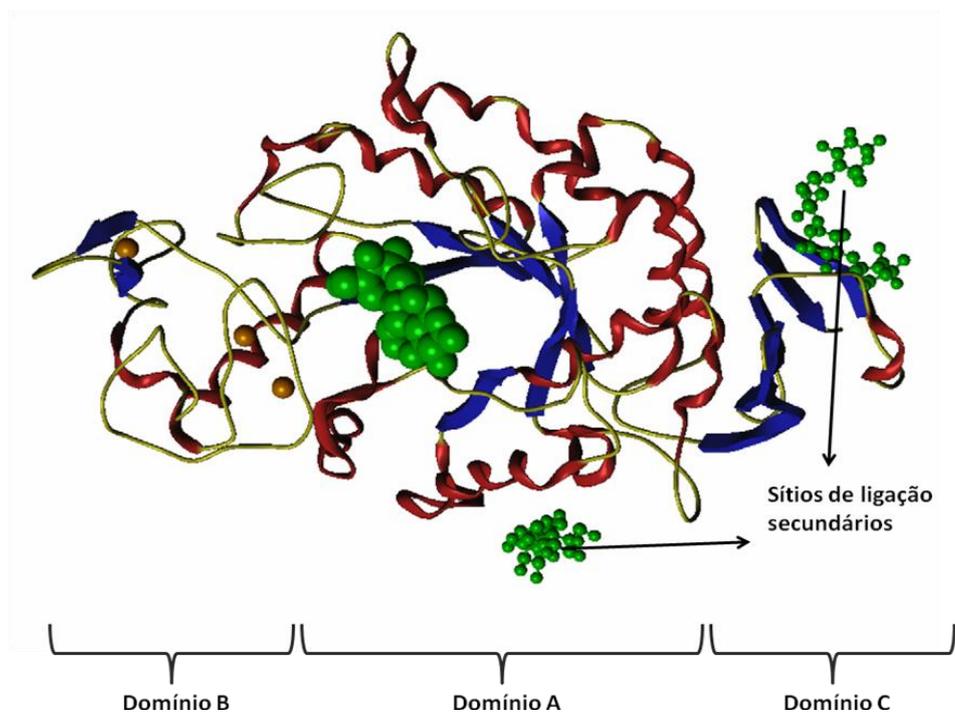


Figura 2 – Estrutura tridimensional da α -amilase organizada em três domínios. (Figura adaptada de Mótyán *et al.*, 2011).

O domínio catalítico A é o mais conservado em todas as famílias de α -amilases. Ele consiste de um barril $(\alpha/\beta)_8$ N-terminal apresentando dobramento altamente simétrico de oito fitas- β paralelas arranjadas em um barril circulado por oito α -hélices (Prakash & Jaiswal, 2010). Este barril é conhecido como barril TIM, pois foi observado pela primeira vez na triose fosfato isomerase (TIM) de músculo de galinha, que está presente em várias proteínas (Banner *et al.*, 1975). O barril

TIM possui quatro regiões altamente conservadas, relacionadas ao sítio ativo presente nas α -amilases. São elas: primeira região – resíduo de histidina na região C-terminal da terceira fita- β que interage com o resíduo de glicose do substrato; segunda região – resíduo de ácido aspártico na quarta fita- β que age como nucleófilo durante a catálise; terceira região – resíduo de ácido glutâmico na quinta fita- β que age como doador/acceptor de prótons; e quarta região – resíduo de histidina e de ácido aspártico na sétima fita- β que podem formar ligações de hidrogênio com o resíduo de glicose do substrato (Van der Maarel *et al.*, 2002).

O Domínio B está localizado entre a terceira fita- β e a terceira α -hélice do barril TIM, ele é formado por uma estrutura irregular rica em folhas- β e varia de tamanho e estrutura entre as α -amilases (Svensson & Soggard, 1991). O domínio B forma grande parte da ligação com o substrato, dá flexibilidade à molécula e presume-se que seja importante para a especificidade de substrato observada entre diferentes α -amilases (Janeček *et al.*, 1997).

O domínio C constitui a região C-terminal e é formado por um sanduíche- β contendo um motivo do tipo chave grega, que auxilia na estabilização do domínio catalítico e na ligação com o substrato (MacGregor, 1988).

Além dos domínios A, B e C, o tipo e o número de domínios extra, como os domínios D e/ou E localizados na porção C-terminal, são muito variáveis na família das α -amilases (Janecek *et al.*, 1997; Jespersen *et al.*, 1991). A função do domínio D é desconhecida. O domínio E está relacionado ao módulo de ligação ao carboidrato (CBM) ou domínio de ligação ao amido (SBD), as diferentes sequências/estruturas dos módulos melhoram a eficiência de uma enzima amilolítica no amido cru (Mótyán *et al.*, 2011).

1.6.2 Sítio Ativo

O sítio ativo é localizado na interface entre o domínio A e o domínio B, na região C-terminal das fitas- β do barril TIM. Por meio de estruturas determinadas por difração de raios-X de α -amilases bacterianas complexadas com arcabose

(Figura 3), um pseudotetrassacarídeo inibitório, se descobriu que a fenda de ligação ao substrato pode acomodar de quatro a dez unidades de glicose, que variam de acordo com a origem da α -amilase (Nielsen & Borchert, 2000).

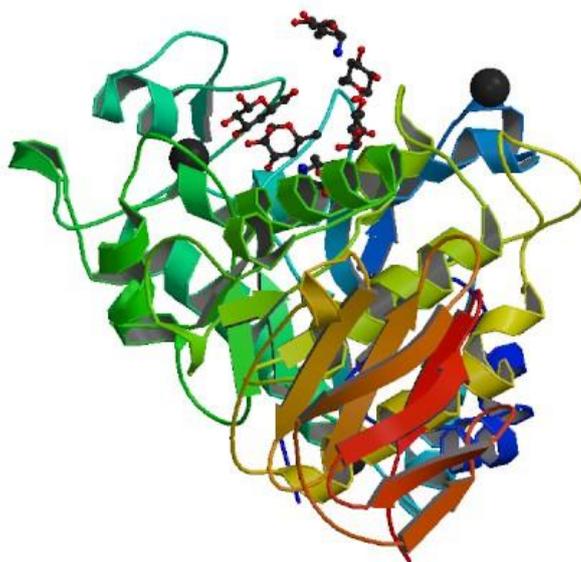


Figura 3 – Estrutura tridimensional da α -Amilase de *Bacillus subtilis* complexada com arcabose. Código no PDB 1UA7 (Kagawa *et al.*, 2003).

Alinhamentos de sequência entre α -amilases baseados na estrutura mostraram que os resíduos chave do sítio ativo são muito semelhantes entre elas. No entanto, os loops β e α do Domínio A apresentam diferenças entre os membros da família GH13, indicando que a arquitetura da fenda de ligação ao substrato é uma característica específica de cada enzima (MacGregor *et al.*, 2001; Kumar, 2010; Mótyán *et al.*, 2011) .

1.6.3 Mecanismo Catalítico

O mecanismo catalítico mais aceito para as α -amilases foi proposto por Koshland (1953) e é denominado mecanismo de dupla substituição. Esse

processo envolve dois resíduos catalíticos no sítio ativo: um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de aspartato (Van der Maarel *et al.*, 2001). Ele consiste de três passos (Figura 4) – o primeiro passo é a protonação do oxigênio do resíduo de glicose pelo doador de prótons, geralmente um resíduo de glutamato da α -amilase (Nielsen & Borchert, 2000). Em seguida, há um ataque nucleofílico pelo nucleófilo catalítico, geralmente um resíduo de aspartato, no carbono C1 do açúcar (Uitdehaag *et al.*, 1999). No terceiro passo há ativação de uma molécula de água pelo doador de prótons, o resíduo de glutamato, que está desprotonado (Nielsen & Borchert, 2000). Essa molécula de água ativada hidrolisa então a ligação covalente entre o oxigênio do nucleófilo e o carbono C1 da glicose, completando, assim, o ciclo catalítico (Nielsen & Borchert, 2000).

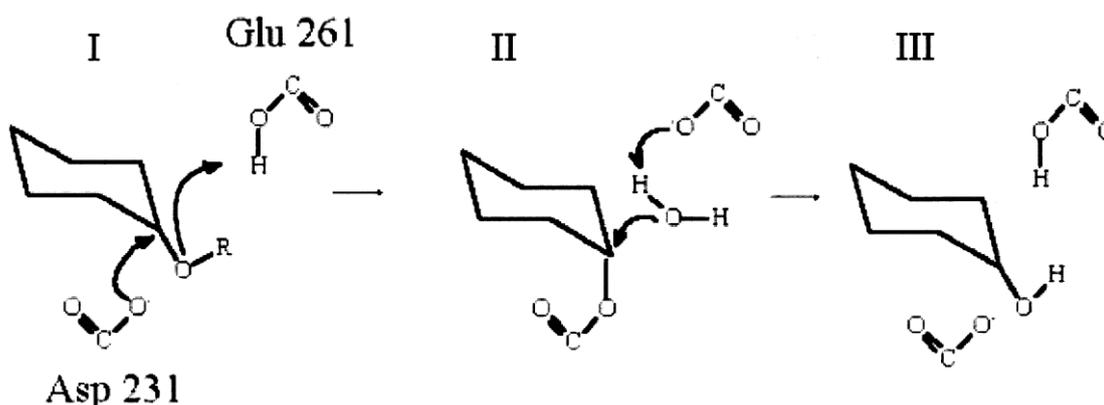


Figura 4 – Mecanismo catalítico das α -amilases. (I) Protonação do oxigênio glicosídico e ataque no carbono C1 da glicose pelo Aspartato. (II) Ativação da molécula de água, clivagem da ligação covalente entre o carbono C1 da glicose e o Aspartato. (III) Regeneração do estágio inicial de protonação (Figura retirada de Nielsen & Borchert, 2000).

1.6.4 Sítio de Ligação ao Cálcio

A maioria das α -amilases conhecidas possui um ou mais íons de cálcio (Ca^{+2}) por molécula, que são essenciais para a atividade enzimática e para a estabilidade (Janeček, 1997; Janeček & Baláz, 1992). O número de sítios varia de um a dez, sendo a afinidade das α -amilases ao Ca^{+2} muito maior do que a outros íons (Gupta *et al.*, 2003). Buisson *et al.* (1987) mostraram que o cálcio liga o barril $(\alpha/\beta)_8$ ao domínio B, estabilizando, dessa forma, a estrutura do sítio ativo.

Algumas α -amilases apresentam um sítio de ligação ao cálcio no sítio ativo e isso justifica a inibição da atividade em concentrações elevadas desse íon (Boel *et al.*, 1990). Estudos com modificações de alguns aminoácidos para a formação de outros sítios de ligação ao Ca^{+2} na α -amilase de *Bacillus licheniformis* mostraram que houve um aumento na estabilidade da enzima, o que reforça o papel do cálcio como estabilizador da proteína (Khajeh *et al.*, 2001).

1.6.5 Estabilidade

As α -amilases são uma das enzimas mais utilizadas nas indústrias. As condições industriais na maioria das vezes são bem adversas, apresentando temperaturas elevadas, pHs ácidos, alta viscosidade, entre outros (Gupta *et al.*, 2003). É sabido que muitas enzimas perdem sua função em algumas faixas de pHs e em temperaturas elevadas devido principalmente a desestabilização de sua estrutura. Segundo Mac Gregor *et al.* (2001) a conformação estrutural e atividade amilolítica são extremamente relacionadas. Há, portanto, um grande interesse biotecnológico em α -amilases mais eficientes que sejam ativas nessas condições.

Segundo Prakash & Jaiswal (2009) mercado anual de enzimas termoestáveis representa aproximadamente U\$ 250 milhões. As α -amilases termoestáveis são muito aplicadas nas indústrias, pois apresentam diversas vantagens, entre elas um menor custo e otimização dos processos (Burhan *et al.*, 2003). Entre as principais fontes de α -amilases termoestáveis para utilização na indústria temos as bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (Prakash & Jaiswal, 2009).

Para determinar a estabilidade térmica e estrutural é necessário o estudo dessas enzimas em diferentes faixas de pH e temperatura. Esses estudos podem ser feitos utilizando diversas técnicas como dicróismo circular, fluorescência, espalhamento de luz dinâmico, entre outras.

1.7 Amy1 – α -amilase de *Cryptococcus flavus*

A levedura *C. flavus* foi isolada a partir de frutos do cerrado brasileiro como resultado de um estudo realizado pelo grupo de Biotecnologia de Leveduras do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília em busca de novas fontes de α -amilases. A α -amilase encontrada nessa levedura é muito eficiente na degradação de amido e, a partir desse fato, vários estudos foram realizados com a enzima.

A caracterização bioquímica da α -amilase de *Cryptococcus flavus* (Amy1) feita por Wanderley *et. al* (2004) indicou que a enzima apresenta um k_m de 0,056 mg/ml, com pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 50°C. Sua atividade foi pouco afetada pelos íons Mn^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} e Ca^{+2} , e foi muito inibida pelos íons Hg^{+2} , Fe^{+2} e Cu^{+2} .

Visando a obtenção de bioetanol a partir de amido de mandioca, no período de 2004 a 2008, o grupo de Biotecnologia desenvolveu uma pesquisa, tema de uma tese de Doutorado defendida em fevereiro de 2008 pelo pesquisador Alexandro Sobreira Galdino (Galdino, 2008), para recombinar a levedura *S. cerevisiae* de modo a expressar esta α -amilase. Esse trabalho de doutorado ganhou o 1º lugar no Prêmio Jovem Inventor em 2008.

A α -amilase recombinante expressa em *S. cerevisiae* apresentou pH ótimo de 5,5 e atividade máxima em 60°C. Os íons Mn^{+2} , Mg^{+2} e Ca^{+2} afetaram pouco a atividade enzimática; o íon NH_4 ativou e os íons Hg^{+2} , Fe^{+2} e Cu^{+2} inibiram essa enzima (Galdino *et al.*, 2008).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Purificação e caracterização estrutural por meio de técnicas biofísicas da AMY1 recombinante, além da comparação com a sua forma selvagem.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Determinar as melhores condições de cultivo da levedura MFL-AMY1.
- ii. Purificar a AMY1 recombinante.
- iii. Avaliar a estabilidade térmica da AMY1 recombinante por dicroísmo circular.
- iv. Avaliar a estabilidade térmica da AMY1 selvagem por dicroísmo circular.
- v. Comparar as α -amilases: selvagem e recombinante.
- vi. Analisar o efeito do pH na estrutura da AMY1 recombinante e o ambiente do triptofano por fluorescência estática.
- vii. Fazer ensaios de cristalização com a AMY1 recombinante.

3. Material e Métodos

3.1 Linhagens utilizadas

3.1.1 Linhagem de *Cryptococcus flavus*

A linhagem da levedura *C. flavus* utilizada neste trabalho foi isolada a partir de frutos do cerrado brasiliense e classificada no Laboratório de Biologia Molecular, pelo grupo de Biotecnologia Molecular da Universidade de Brasília.

3.1.2 Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada neste trabalho foi a MFL, um mutante auxotrófico para leucina obtido pela ruptura do gene *LEU2* a partir da cepa industrial FTPT472, isolada pela Fundação de Pesquisas Tecnológicas André Tosello (Campinas – SP).

3.2 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e algumas soluções foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min. As demais soluções foram esterilizadas utilizando filtros de 0,22 µm.

3.2.1 Meios de cultura

Meio YPD

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

Peptona de caseína 2,0% (p/v)

Glicose 2,0% (p/v)

Para meio sólido foi adicionado agar bacteriológico 1,5% (p/v).

Meio Mínimo SD

YNB 0,67%

Tampão Aspartato Glutamato 8% pH 5,5 0,40%

Glicose 2,0% (p/v)

Para meio sólido foi adicionado Agar bacteriológico 1,5% (p/v).

Quando necessário foi acrescentado 1% de amido.

3.2.2 Soluções

YNB 13,4% (sem aminoácidos)

Yeast Nitrogen Base without Amino Acids 3,4% (p/v)

(NH₄)₂SO₄ 10,0% (p/v)

*Esterilização feita por filtração em membrana milipore 0,22µm.

Tampão Aspartato-Glutamato

Aspartato 8% (p/v)

Glutamato 8% (p/v)

*Esterilização feita por filtração em membrana milipore 0,22µm.

3.3 Transformação rápida de levedura

A linhagem de *S. cerevisiae* MFL foi transformada com o plasmídio YEpAMY1 (Galdino *et al.*, 2008) de acordo com o procedimento descrito por Moraes *et. a* (1995).

3.4 Ensaio de atividade enzimática

A atividade amilolítica foi determinada pelo método de atividade dextrinizante, utilizando amido como substrato. O amido forma um complexo azul com o iodo e com a hidrólise progressiva do amido, ele muda para vermelho-castanho (Gupta *et. al*, 2003). Esse método baseia-se na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (Fuwa, 1954).

Para a determinação da atividade enzimática em solução, o ensaio consistiu da mistura de 60µL de solução de enzima pura ou sobrenadante do meio de cultura e 40µL de tampão acetato de sódio 0,5M pH 5,5 em 100µL de uma solução de amido 0,5% (p/v). Essa mistura foi incubada a 40°C por 10 min. A reação foi então interrompida com a adição de 200µL de ácido acético 1M e corada com 200µL de uma solução de iodo/iodeto. A solução de iodo/iodeto é feita misturando na proporção de 1:1:3, iodo 1% (p/v), iodeto 10% (p/v) e água destilada, respectivamente. O volume da reação foi completado para 5 mL com água destilada, homogeneizado, e a absorbância determinada a 660 nm. A quantidade de amido consumido é calculada de acordo com uma curva padrão preparada com concentrações crescentes de amido solúvel de 0,5 mg/mL. A atividade amilolítica foi monitorada pela degradação do amido conforme descrito por Moraes *et al.* (1995). Uma unidade (1U) de atividade de amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto a 40°C.

3.5 Atividade amilolítica em gel de poliacrilamida – Zimograma

Para determinação de atividade em gel de poliacrilamida (10%) as condições de corrida do gel foram as mesmas descritas no item acima, exceto que o tampão de amostra não continha β -mercaptoetanol. Após a corrida, o gel foi incubado com tampão acetato de sódio (50mM, pH 5,5) por uma hora. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo uma solução de amido (0,5%) dissolvido em tampão acetato 50mM, pH 5,5 e incubado por 12 horas a 4°C. Após esse período, o gel foi incubado por duas horas a 37°C em tampão acetato e revelado com uma solução de iodo-iodeto para visualização das bandas de degradação do amido (Lacks & Springhorn, 1980).

3.6 Quantificação de proteínas

A concentração de proteína total do sobrenadante do meio de cultura nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para a amilase pura a concentração foi determinada relacionando a absorbância a 280 nm e o valor da absorbância 0,1% (1g/L) que é de 1,653.

3.7 Análise das proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A análise do grau de pureza das amostras foi feita utilizando um sistema de eletroforese (Bio-Rad) em gel de poliacrilamida (10%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). A corrida foi realizada utilizando uma voltagem fixa de 120 V. Ao término da corrida eletroforética, as proteínas presentes no gel foram visualizadas utilizando-se o método de coloração com Coomassie Coloidal (Anderson *et al.*, 1991). Brevemente, após a corrida, o gel foi lavado com água destilada e incubado na solução de coomassie coloidal durante 12h. Ao término da incubação o gel foi lavado com água destilada para retirar o excesso de coomassie.

4.8 Determinação das condições ótimas para a expressão

As condições ótimas para a expressão da proteína foram determinadas a partir do crescimento da levedura recombinante (MFL-Amy1) em meio YPD sólido por 48 horas em estufa a 30⁰C. As colônias isoladas obtidas foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para uma placa de Petri contendo meio mínimo sólido com amido 1% para a detecção de atividade em placa. Após o crescimento de 48 horas em estufa a 30⁰C, a placa foi invertida e corada com vapor de iodo e a colônia com maior halo de hidrólise de amido não corado foi cultivada em 20 mL de meio mínimo por 24 horas a 200 rpm e 28⁰C. Foi adicionado pré-inóculo 1% em cada meio de cultura. Três diferentes fontes de nitrogênio foram testadas: YNB 1,34% (p/v), extrato de levedura 0,4% (p/v) e uréia 2% (p/v). A fonte de carbono foi a mesma para todos os meios (glicose 2% (p/v) e todos foram tamponados com tampão aspartato-glutamato 0,4% pH 5,5.

O cultivo foi realizado em “shaker” a 28⁰C, sob agitação (200 rpm) até 72 horas. Em intervalos de 24 horas, alíquotas de 2mL da cultura foram retiradas para verificar o crescimento celular (OD₆₀₀). Em seguida a amostra foi centrifugada a 13400 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi analisado quanto à atividade amilolítica pelo teste de Fuwa (1954) e quanto à quantidade total de proteínas pelo método de Bradford (1976).

Para determinação do peso seco, alíquotas de 1mL do meio de cultura foram retiradas em intervalos de 24 horas e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi colocado em estufa a 60⁰C para secar. Depois de seco o *pellet* foi pesado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A cinética de expressão da proteína foi acompanhada em SDS-page 10%. 1mL de sobrenadante de meio de cultura em diferentes horas de crescimento (0h, 24h, 48h e 72h) foram dialisados, liofilizados e analisados no gel.

3.9 Purificação da proteína

3.9.1 Cromatografia por troca iônica

O sobrenadante obtido da cultura acima descrita foi dialisado e 200 mL foram misturados a 20 mL tampão acetato de sódio 0,5M contendo 10mM de CaCl_2 pH 5,5. Essa amostra foi aplicada em uma coluna (2,5 x 17 cm) de cromatografia de troca iônica, Q-Sepharose *Fast Flow Anion Exchanger* (Pharmacia) com fluxo de 360 mL/h. Em seguida, a coluna foi lavada com 200 ml do mesmo tampão sob o mesmo fluxo. Após a lavagem da coluna foi aplicado um gradiente (150 mL) de NaCl de 0 a 0,5M. Frações de 3 mL foram coletadas e utilizadas para detecção de proteínas (absorbância 280 nm) e atividade amilolítica (Fuwa, 1954). Todas as frações contendo atividade enzimática foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

3.9.2 Cromatografia de exclusão molecular

A amostra obtida na etapa anterior foi ressuspensa em 1 mL de tampão acetato de sódio 50mM contendo 1mM de CaCl_2 e 150mM de NaCl pH 5,5 e aplicada na coluna Sephadex 200 10/30 Global (1,5 x 65 cm) *High Resolution* (GE) acoplada ao sistema de FPLC (Flow Pressure Liquid Chromatography). As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, com um fluxo de 30 mL/h. Frações de 1,0 mL foram coletadas e utilizadas para detecção de proteínas (absorbância 280nm) e atividade amilolítica (Fuwa, 1954). As frações contendo atividade enzimática foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e estocadas a -20°C , até serem utilizadas.

O ensaio de N-deglicosilação da α -amilase recombinante foi realizado utilizando a enzima PNGase F, segundo protocolo descrito pela New England Biolabs® Inc (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productP0704.asp>).

3.9.3 Purificação α -amilase selvagem

A α -amilase selvagem foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Cirano Ulhoa do laboratório de Enzimologia da UFG.

3.10 Análises Estruturais por Dicroísmo Circular (CD)

As análises estruturais da AMY1 selvagem e recombinante em diferentes condições foram realizadas a partir de espectros de dicroísmo circular, utilizando o espectropolarímetro Jasco 816 com entrada para nitrogênio gasoso e acoplado a um sistema Peltier para controle da temperatura. O nitrogênio substitui o oxigênio do interior do aparelho para evitar danos no sistema óptico devido à formação de ozônio que ocorre quando há oxigênio na presença de comprimentos de onda entre 260 – 190 nm.

Os dados foram coletados a partir da média de três medidas do sinal em intervalos de 0,5s para 30s e processadas pelo programa “Spectra Manager”. A velocidade de coleta dos dados foi de 100 nm/min. Os programas utilizados para o registro e tratamento dos dados foram o Spectra Manager (JASCO) e o Origin Pro 8.0.

As concentrações das amostras foram de 0,15 mg/mL para a proteína selvagem e 0,107 mg/mL e 0,041 mg/mL para a recombinante. As análises foram feitas em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. Os dados registrados pelo programa

Spectra Manager foram convertidos de miligraus para elipticidade residual molar usando a seguinte equação:

$$[\Theta]_m = 115 * \Theta / 10 * C * \ell \quad (1)$$

Onde, Θ é o sinal dicróico em milligraus, C é a concentração da amostra (mg/ml) e ℓ é a espessura da cubeta utilizada, em centímetros. Para os experimentos de desnaturação, foi fixado o comprimento de onda a 222 nm. Todos os dados foram corrigidos com a linha de base para que a contribuição do tampão fosse removida.

Vários espectros da Amy1 recombinante e selvagem em diferentes pHs foram obtidos. Para cada condição de pH e de temperatura as porcentagens das estruturas secundárias foram calculadas a partir do ajuste das curvas dicróicas nos comprimentos de onda de 260 a 195 nm, utilizando o software CDNN Spectra Deconvolution (Versão 2.1, <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>; Institut für Biotechnologie, Alemanha) (Bohm *et al.*, 1992).

Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados elevando a temperatura de 25 a 95⁰C. Os espectros foram coletados a cada 10⁰C. A curva de desnaturação térmica foi obtida no comprimento de onda fixo de 222 nm. As modificações estruturais da enzima em diferentes pHs foram acompanhadas em tampões com faixas de pH entre 3,0 a 9,0, sendo Glicina-HCl 2mM pH 3,0; acetato de sódio 2mM pHs 4,0; 5,5; 6,0 e Tris-HCl 2mM pHs 7,0; 8,0; 9,0. A voltagem registrada pelo equipamento foi monitorada para não exceder 700 V.

3.11 Análises estruturais por fluorescência estática

As alterações conformacionais da AMY1 recombinante foram monitoradas a partir de espectros de emissão de fluorescência, utilizando o fluorímetro

(JASCO FP-6500), acoplado a um sistema Peltier (JASCO ETC-273T) com circulação de água. Os parâmetros de leitura foram ajustados com excitação a 295 nm, emissão em 300 nm, com os “slits” de excitação e emissão ajustados para 5,0 nm cada um. A velocidade de coleta dos dados foi de 200 nm/min. Foram feitas três medidas de fluorescência a 25°C e a média foi processada pelo programa “Spectra Manager”.

Para caracterizar o ambiente do triptofano (Trp) foram feitos estudos de atenuação de fluorescência com a AMY1 recombinante ($OD_{280} \leq 0,1$). A solução de proteína foi preparada para um volume final de 500µL em uma cubeta de quartzo, titulada com um atenuador neutro (acrilamida), um atenuador aniônico (íon iodeto, I^-) e um atenuador catiônico (íon césio, Cs^+). As titulações foram feitas adicionando 1µL à solução de proteína de soluções estoque de acrilamida 7,5 M, cloreto de césio 5,01 M e iodeto de potássio 5,01 M. Ao iodeto de potássio foi adicionado 0,2 mM de tiosulfato de sódio para prevenir a formação de triiodeto (I_3^-). Esse procedimento é necessário, pois o I_3^- absorve fluorescência na região do comprimento de onda do triptofano (Lehrer, 1971). As concentrações finais na titulação variaram de 0 a 0,25 M para a acrilamida e de 0 a 0,5 M para o iodeto de potássio e o cloreto de césio. As medidas de atenuação para todos atenuadores foram realizadas em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,5 e tampão tris-HCL 50mM nos pHs 7,0 e 9,0.

Os dados de emissão de fluorescência atenuada foram ajustados de acordo com a equação clássica de Stern-Volmer, descrita abaixo:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

F e F_0 são intensidades de fluorescência na presença e ausência do atenuador, respectivamente; K_{sv} é a constante de Stern-Volmer e Q é a concentração do atenuador. As constantes estáticas resultantes da atenuação por acrilamida, iodeto de potássio e cloreto de césio foram calculadas a partir da equação 2, por método iterativo de χ^2 linear. Os programas utilizados para tratar e processar os dados foram o Spectra Manager (JASCO) e o OriginPro 8.0.

3.12 Cristalização da Amy1 recombinante

Ensaio de cristalização da Amy1 recombinante foram realizados utilizando o método de difusão de vapor em placas de cristalização, em “gota sentada”, utilizando um sistema robotizado (Matrix Maker e Honeybee) do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS).

Esse sistema robotizado utiliza *kits* disponíveis comercialmente como: “Joint Center for Structural Genomics” (JCSG) (Page *et al.*, 2003), “PACT Suite” para encontrar condições iniciais de cristalização (Newman *et al.*, 2005).

O processo de cristalização foi realizado em uma sala com temperatura controlada a 18°C. Uma gota contendo 0,4 mL de proteína em solução aquosa na concentração de 14 mg/mL foi misturada a 0,4 mL de solução do reservatório e foi equilibrada contra 200 µL dessa mesma solução do reservatório. Após a preparação das gotas pelo sistema de robotização, as placas foram vedadas e o monitoramento do crescimento de cristais foi realizado por meio da observação das gotas em uma lupa acoplada ao computador com um programa de captura de imagem.

A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos, foi possível determinar que tampão, aditivo e agente precipitante seriam os mais favoráveis para a cristalização da proteína.

4. Resultados e Discussão

4.1 Produção da A-amilase recombinante de *C. flavus* expressa em *S. cerevisiae* MFL-AMY1

4.1.1 Otimização das condições de cultura

A otimização das condições de cultura da levedura recombinante MFL-AMY1 foi feita com o objetivo de buscar um meio de cultura onde a levedura apresentasse melhor crescimento e produzisse maior quantidade de enzima. Antes dos testes, colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para uma placa de petri com meio mínimo contendo 1% de amido para identificação da colônia com maior halo de hidrólise de amido (Figura 5).

Três diferentes meios de cultura foram testados, onde apenas a fonte de nitrogênio foi variada. As fontes de nitrogênio utilizadas foram as seguintes: uréia, YNB (“Yeast Nitrogen Base”) e extrato de levedura. A linhagem MFL contém o plasmídeo YEpAMY1, onde o gene da α -amilase está sob o controle do promotor glicolítico *PGK1* (3-fosfoglicerato quinase). Este promotor é um promotor considerado forte e está relacionado a altos níveis de expressão (Johnston & Carlson, 1992). Segundo Galdino (2008), houve um aumento no tamanho do halo de hidrólise de amido nas culturas que cresceram em meio com glicose 2% em relação às culturas que cresceram em meio com glicose 0,05% e sem glicose, por isso a fonte de carbono não foi variada e foi mantida em 2% de glicose.

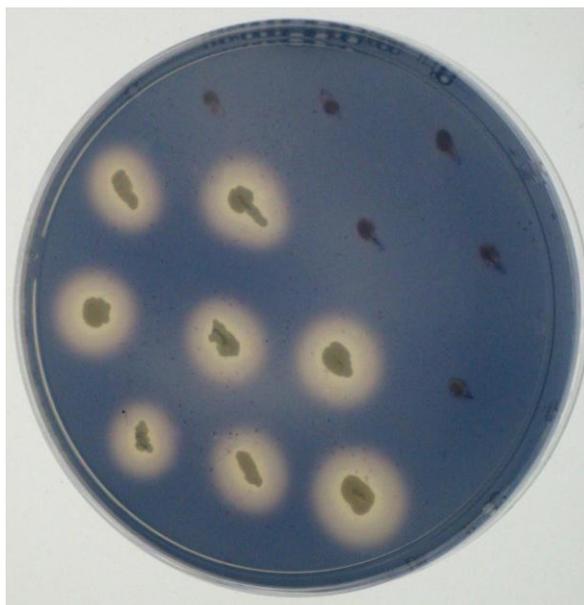


Figura 5 – Crescimento de *S. cerevisiae* MFL-AMY1 em placa de Petri. As regiões não coradas com iodo representam os halos de atividade enzimática.

O crescimento da cultura da MFL-AMY1 foi realizado por 72 horas, a temperatura de 28°C e agitação de 200 rpm, sendo que a cada 24 horas alíquotas foram retiradas para ensaios de atividade enzimática, leitura da OD_{600nm} e quantificação de proteínas.

A levedura apresentou melhor crescimento, maior atividade enzimática e quantidade de proteína total produzida no sobrenadante no meio de cultura com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. O crescimento em extrato de levedura (OD_{600nm} 7,22) foi aproximadamente 1,5 vezes maior em relação ao YNB (OD_{600nm} 4,85) e 18 vezes maior em relação à uréia (OD_{600nm} 0,387) (Figura 6). A atividade enzimática detectada com 72 horas de crescimento foi de 40 U/mL com extrato de levedura, aproximadamente 12 vezes maior em relação à uréia (3,33 UE/mL) e aproximadamente 4 vezes maior em relação ao YNB (10,6 U/mL) (Figura 7). A quantidade de proteína total no sobrenadante estimada pelo método de Bradford (1976) também foi maior no meio com extrato de levedura apresentando 37,85 µg/ml; aproximadamente 26 vezes maior que no meio com uréia (1,46 µg/mL) e aproximadamente 2 vezes maior que no meio com YNB (22,13 µg/mL) (Figura 8).

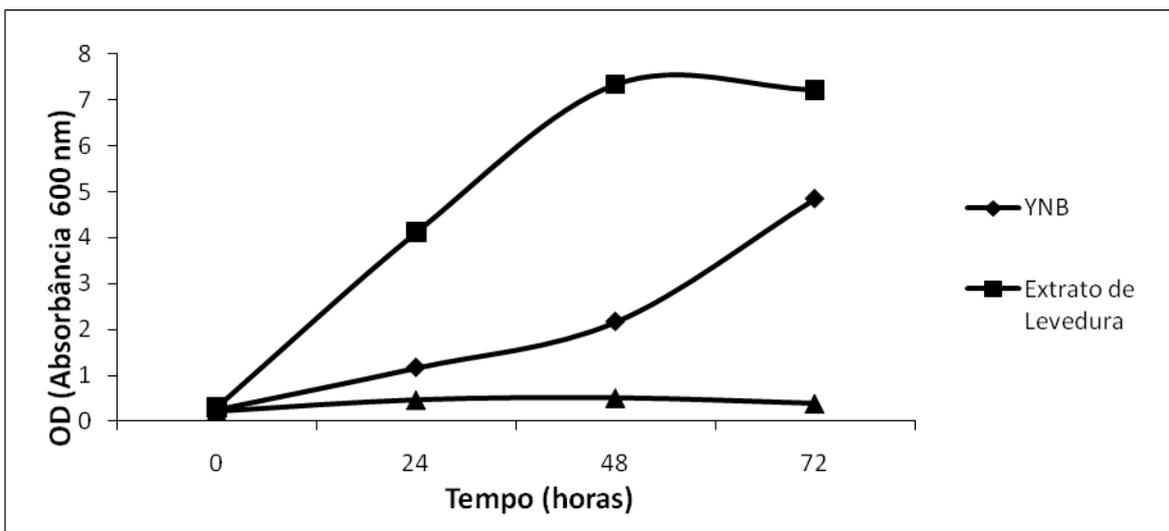


Figura 6 – Influência da fonte de nitrogênio no crescimento da levedura MFL-AMY1. A OD (600nm) foi medida nos diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata.

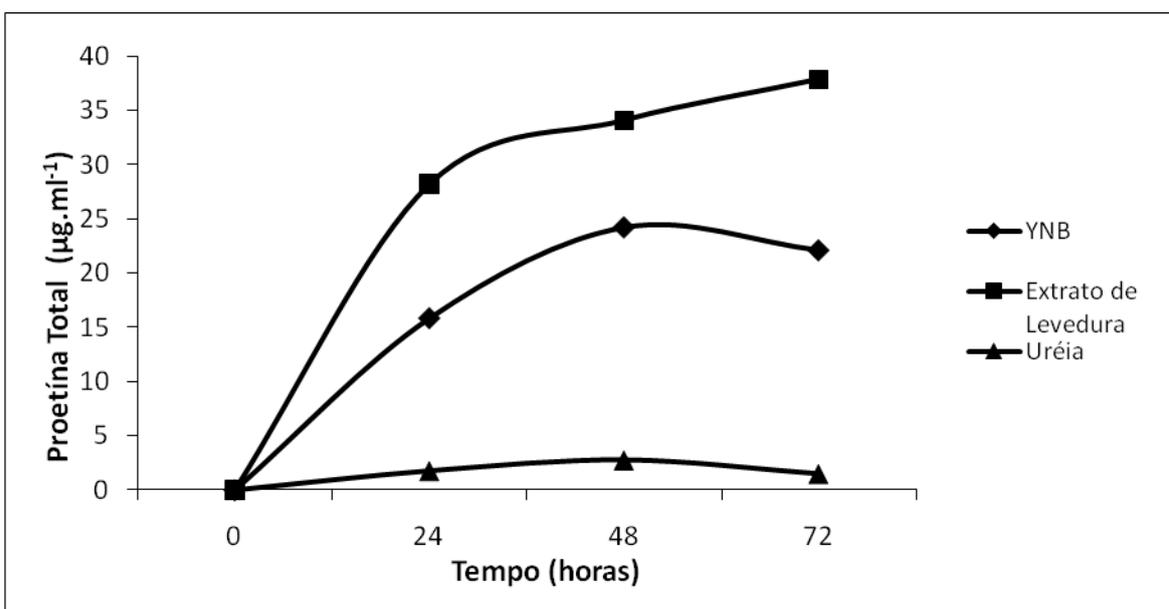


Figura 7 – Avaliação do efeito da fonte de nitrogênio na quantidade de proteína total do sobrenadante do meio de cultura produzida pela levedura MFL-AMY1. A quantidade total de proteína (µg/mL) foi acompanhada nos diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata.

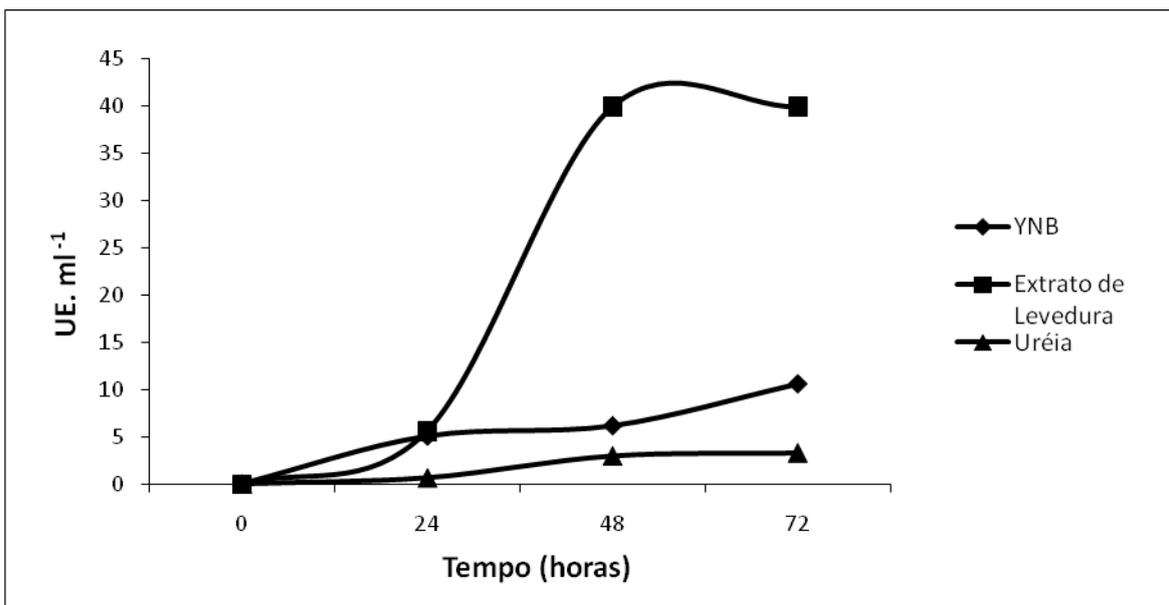


Figura 8 – Influência da fonte de nitrogênio na produção de Amy 1. A atividade enzimática (UE.mL⁻¹) do sobrenadante foi acompanhada nos diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata.

De acordo com Wanderlei *et al* (2004) e Galdino (2008) a levedura *C. flavus* apresentou melhor crescimento em meio contendo YNB como fonte de nitrogênio. O crescimento dessa levedura em meio com extrato de levedura 1,34% foi menor que em meio contendo YNB 1,34% e meio contendo sulfato de amônio 1,34% (Galdino, 2008). Resultados esses que diferem dos obtidos nesse trabalho.

Segundo Gupta *et al.* (2003) extrato de levedura foi utilizado na produção de α -amilase em diversas organismos, como *Streptomyces sp.*, *Bacillus sp.* e *Halomonas meridiana*. Em *A. oryzae* o crescimento utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio aumentou a produtividade da α -amilase em torno de 156% (Gupta *et al.*, 2003). O extrato de levedura é uma fonte orgânica proveniente da própria levedura, por isso é uma fonte de pronto uso.

O resultado obtido nesse trabalho é vantajoso do ponto de vista econômico e biotecnológico, tendo em vista que dentre as três fontes de nitrogênio testadas (YNB, Uréia e Extrato de levedura), o extrato de levedura é a fonte de menor

custo dentre elas. O baixo crescimento da levedura MFL-Amy1 no meio contendo ureia como fonte de nitrogênio pode estar relacionado ao fato da enzima não ter maquinaria enzimática apropriada para utilizar a ureia no seu metabolismo. Além disso, a atividade amilolítica também foi baixa nessas condições. Segundo Galdino (2008) a Amy1 apresentou baixa atividade amilolítica e xilanolítica (Parachin, 2006) em meio contendo ureia.

4.1.2 Produção da AMY1 recombinante

A α -amilase recombinante foi produzida a partir do crescimento da levedura recombinante MFL-AMY1 no meio de cultura que apresentou as melhores condições para o crescimento e produção da enzima – extrato de levedura 0,4%; glicose 2% e tampão aspartato-glutamato 0,4%, pH 5,5. O crescimento foi feito durante 72 horas, sob agitação de 200 rpm e temperatura de 28°C. A cinética de crescimento da cultura (Figura 9), com leitura de OD_{600nm} (Figura 9 – A) e as avaliações de peso seco (Figura 9 – B), de atividade enzimática (Figura 10 – A) e de proteína total (Figura 10 – B) do sobrenadante foi acompanhada a cada 24 horas. A produção da enzima também foi acompanhada analisando as amostras em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Figura 11).

Apesar de haver indícios de morte celular ao final de 72 horas de crescimento, o que está indicado pela queda da OD_{600nm} de 3,7 para 1,8, houve aumento na atividade enzimática nesse intervalo de tempo. Esses dados são reforçados pelo aumento do valor de 6,3 UE/mL em 48 h para 10,87 UE/mL em 72 h, e pela quantidade de proteína total do sobrenadante, 43,85 µg/mL em 48 h para 50,5 µg/mL em 72 h. Portanto, o tempo de crescimento da levedura de 72 horas foi padronizado. Esse aumento na atividade enzimática e na quantidade de proteína total do sobrenadante provavelmente está relacionado com a liberação de mais enzimas no meio e do conteúdo protéico intracelular, em virtude morte celular ocorrida durante o intervalo de 48 a 72h.

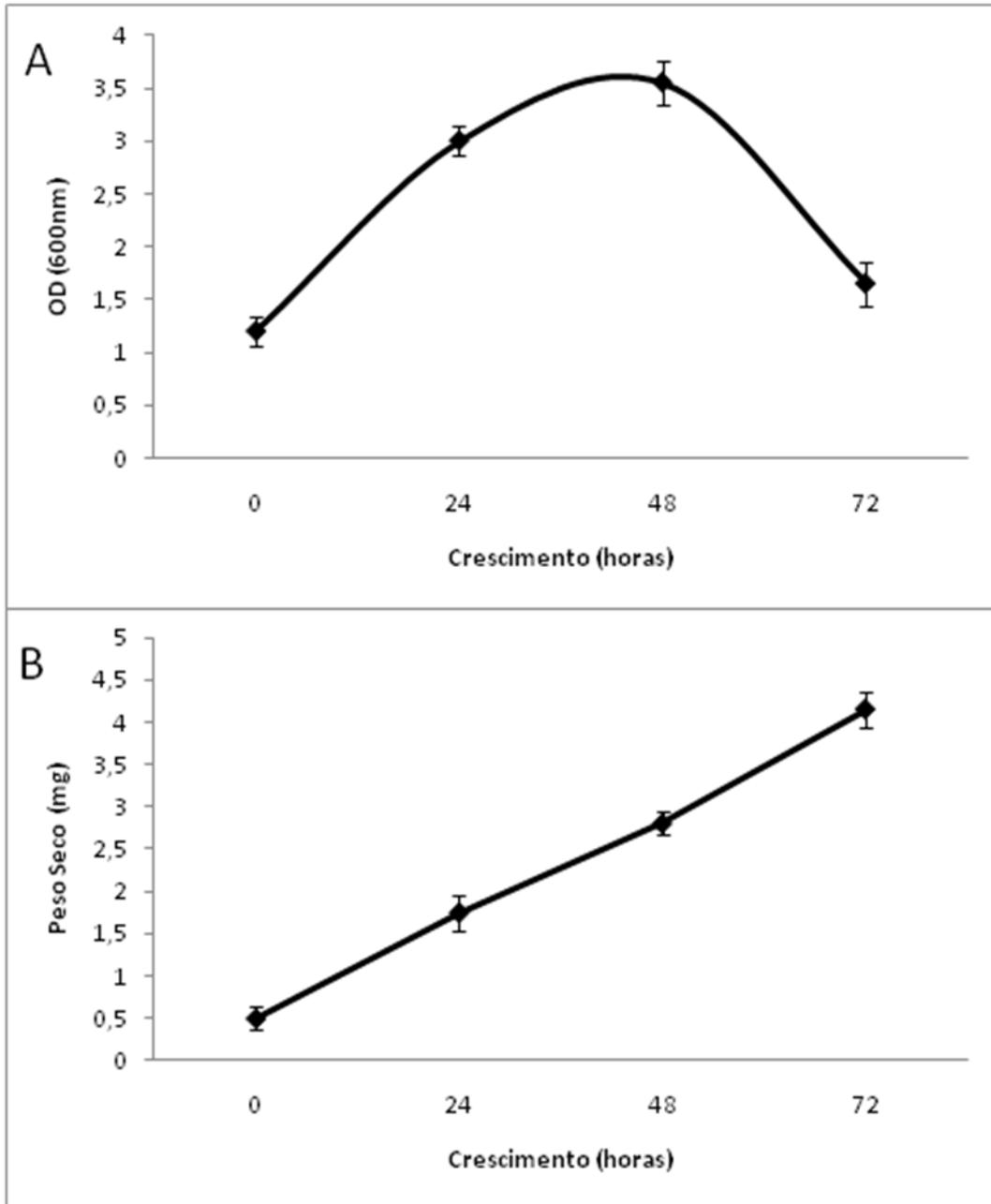


Figura 9 – Cinética de crescimento da levedura MFL-AMY1 em meio com extrato de levedura. A – OD_{600nm}; B – peso seco de 1mL de meio de cultura. A leitura da OD (600nm) e o peso seco foram feitos em diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata.

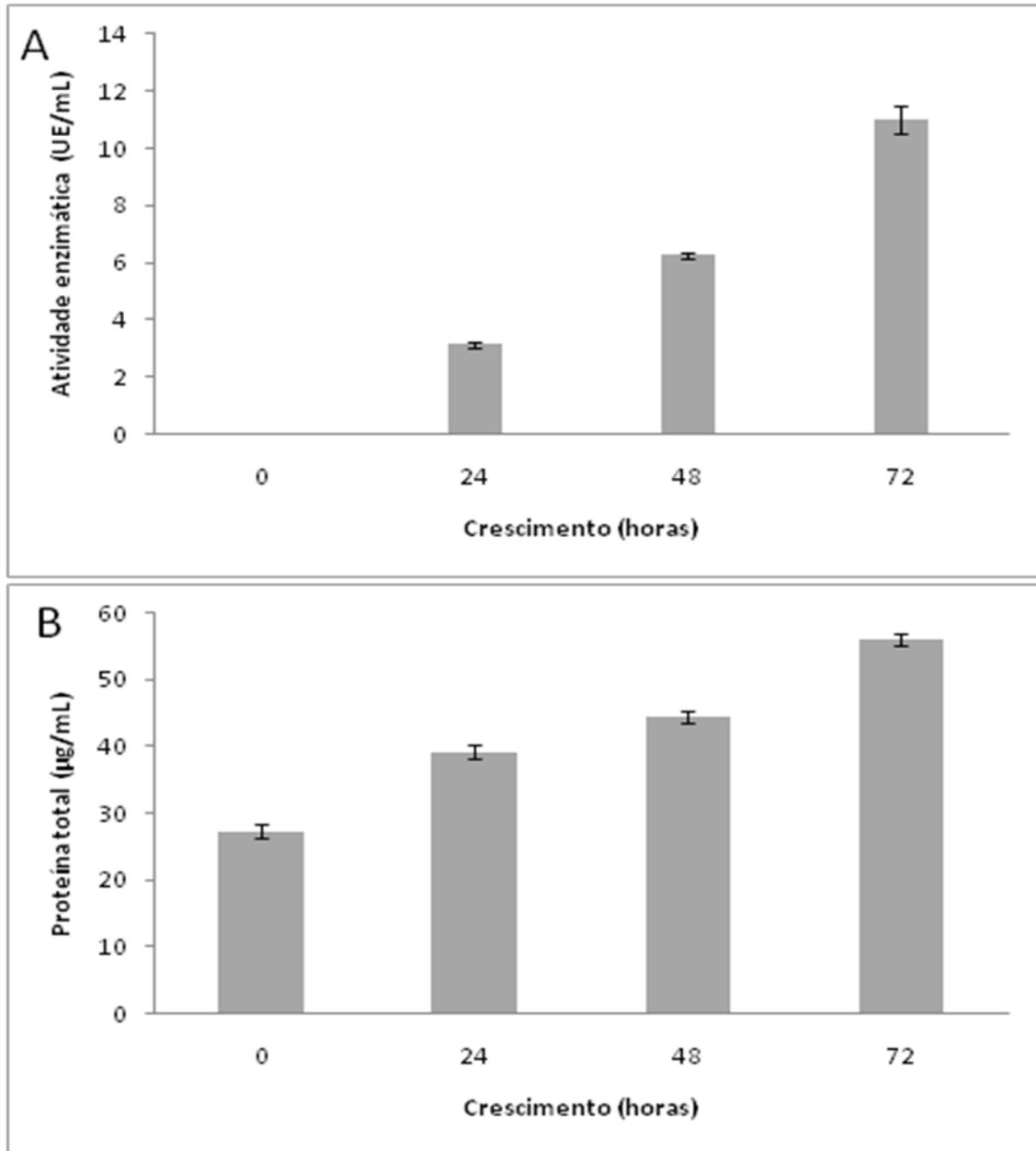


Figura 10 – Cinética de produção enzimática da levedura MFL-AMY1 em meio com extrato de levedura. A – atividade enzimática do sobrenadante; B – proteína total do sobrenadante. A atividade enzimática e a proteína total do sobrenadante foram dosadas em diferentes tempos de crescimento. Os experimentos foram independentes e os ensaios foram feitos em triplicata.

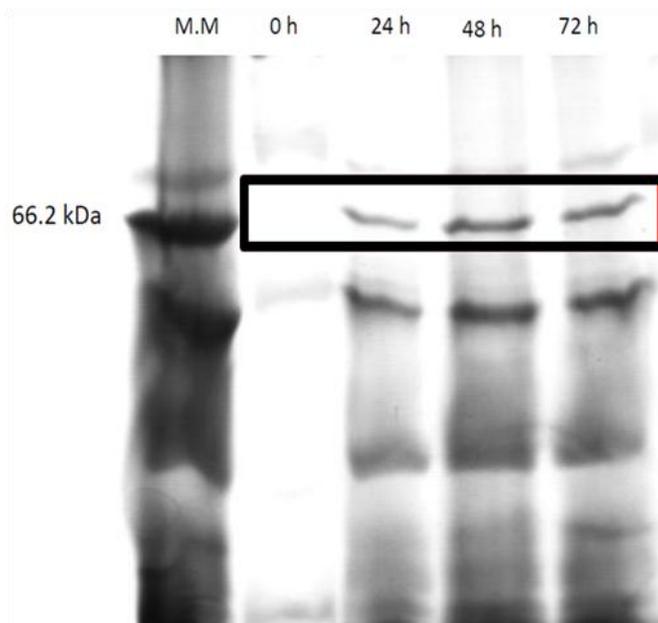


Figura 11 – Cinética da produção de Amy 1 em meio com extrato de levedura. A banda de aproximadamente 66,2 kDa referente a Amy1 está destacada, as outras bandas são proteínas produzidas pela levedura ou do meio de cultura e não são de interesse nesse trabalho. Em todos os poços foi colocado a quantidade de proteína presente em 1mL do sobrenadante do meio de cultura. O gel foi corado com comassie coloidal.

4.1.3 Purificação da Amy1 recombinante

Para a purificação da α -amilase recombinante, primeiramente o meio de cultura foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante coletado. O sobrenadante foi então equilibrado com tampão acetato de sódio 50mM com CaCl_2 1mM pH 5,5 e aplicado em coluna de cromatografia de troca iônica Q-Sepharose, previamente equilibrada com o mesmo tampão. O perfil cromatográfico do gradiente de NaCl (0 – 0,5M) está apresentado na Figura 12. As frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas, dialisadas e liofilizadas. O próximo passo foi aplicar essas frações em coluna de cromatografia de exclusão molecular, coluna Sephadex 200 10/30 global, acoplada em sistema de FPLC. O perfil cromatográfico está apresentado na Figura 13. Com essas duas cromatografias a proteína foi purificada (Figura 14 – fração A).

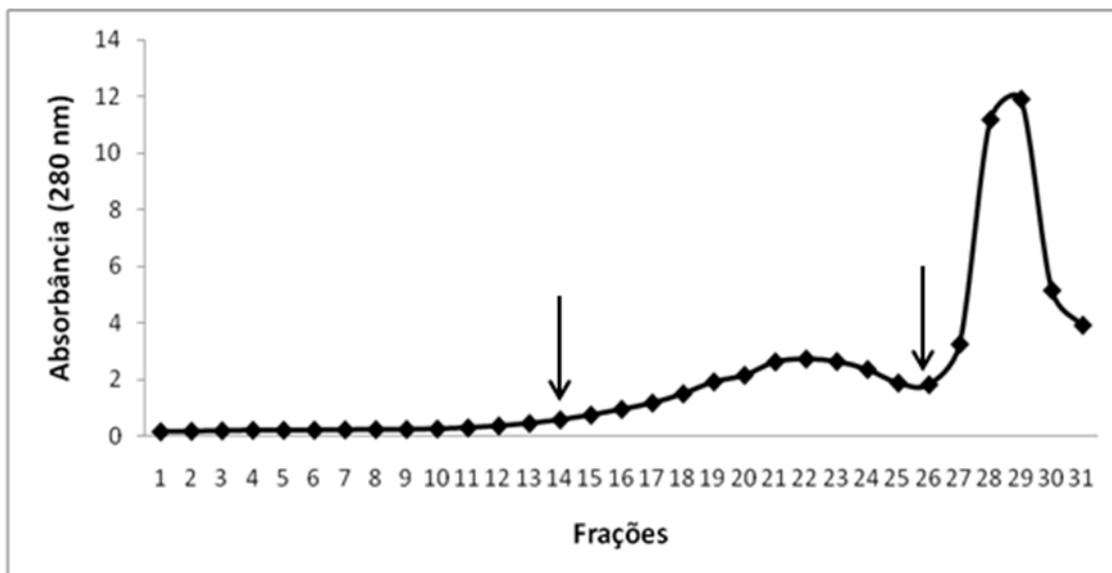


Figura 12 – Perfil cromatográfico do sobrenadante do meio de cultura em coluna de troca iônica (Q-Sepharose). As frações correspondem ao gradiente de NaCl (0-0,5M). As frações com atividade enzimática estão indicadas pelas setas. Essas frações foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

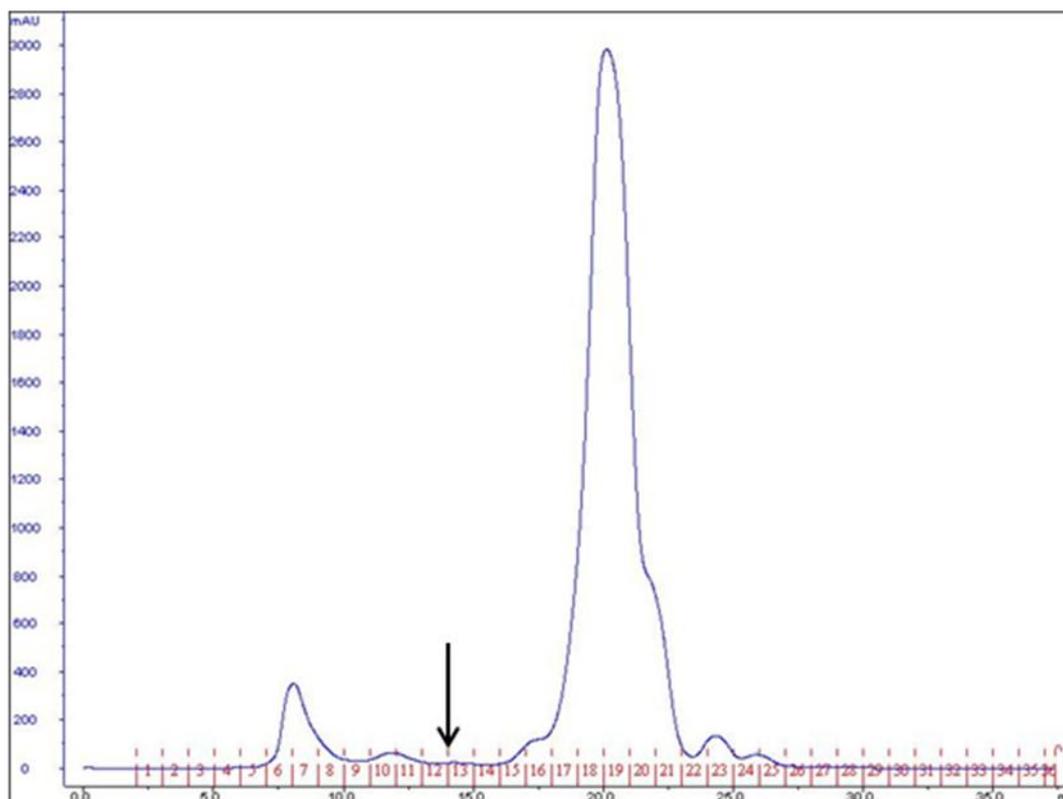


Figura 13 – Perfil cromatográfico das frações com atividade enzimática da cromatografia de exclusão molecular em coluna de filtração em gel (Sephadex 200 10/30) feita em FPLC. As frações com atividade enzimática estão indicadas com a seta, essas frações foram reunidas e submetidas a análises em SDS-PAGE.

4.2 Ensaio de N-deglicosilação e Zimograma

A α -amilase recombinante produzida a partir do crescimento em erlenmeyers aletatos e purificada foi N-deglicosilada utilizando a enzima N-glicosidase F, conhecida como PNGase F. Essa enzima cliva entre os resíduos de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) mais internos e os resíduos de asparagina (Asn) de glicoproteínas N-ligadas. Para os ensaios de N-deglicosilação foram utilizados 25 μ g da enzima Amy1 recombinante purificada. Após a N-deglicosilação, a α -amilase apresentou massa molecular de ~66 kDa (Figura 14), de acordo com a massa molecular predita (65865 Da) a partir da tradução do gene AMY1 (já

excluindo o peptídeo sinal). Esses resultados indicaram que a enzima não é N-glicosilada quando produzida na linhagem de *S. cerevisiae* MFL.

Esses resultados diferem dos apresentados por Barros *et al.* (2009) e Galdino *et al.* (2008). Segundo Barros *et al.* (2009) a enzima Amy1 produzida pela levedura *C. flavus* é N-glicosilada, sendo a N-glicosilação responsável por aproximadamente 5,44% da massa da proteína. Além disso, de acordo com Galdino *et al.* (2008), a Amy1 recombinante obtida na expressão na linhagem CENPK2 de *S. cerevisiae*, também é N-glicosilada, com a sua massa diferindo em aproximadamente 1KDa depois do ensaio.

A Amy1 produzida a partir do crescimento em erlenmeyres aletados purificada foi submetida a ensaio de atividade em gel (zimograma). Os resultados apresentados na figura 15 mostram que a banda no gel de aproximadamente 66 kDa corresponde à enzima purificada e que de fato existe apenas uma α -amilase produzida pela levedura MFL-AMY1 no sobrenadante do meio de cultura.

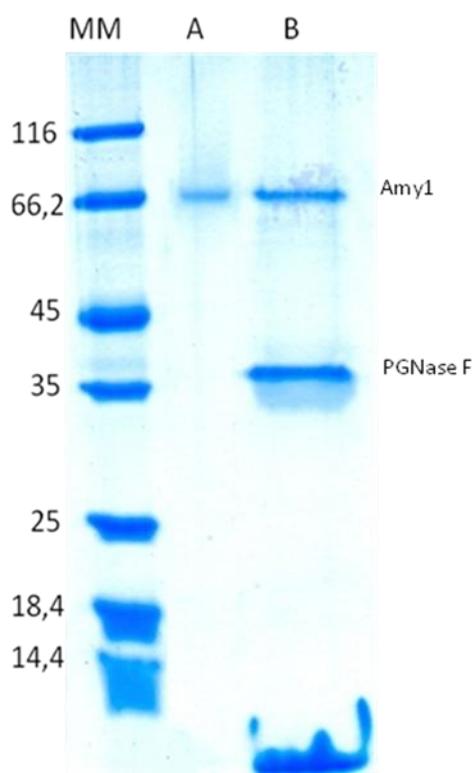


Figura 14 – SDS-PAGE da Amy 1 tratada e não tratada com PGNase F. MM – marcador molecular; A – Amy 1 pura ; B – fração A tratada com PGNaseF. O gel foi corado com coomassie coloidal.



Figura 15 – Zimograma da Amy1 purificada. A região não corada representa o halo de atividade correspondente a banda da α -amilase no gel.

4.3 Análises por Dicroísmo Circular

4.3.1 Amy1 recombinante apresenta dobramento diferente da Amy1 selvagem

A técnica de dicroísmo circular (CD) permite o estudo estrutural de macromoléculas, apresentando vantagens como a pequena quantidade de amostra para os ensaios, análises rápidas e em solução, fácil tratamento dos dados, além de não destruição da amostra, com exceção das amostras submetidas à desnaturação térmica ou química. Os espectros de CD na região distante do UV (190 – 260 nm) fornecem informações de estruturas secundárias e de mudanças conformacionais de proteínas (Kelly & Price, 1997; Kelly *et al*, 2005).

A figura 16 mostra os espectros de dicroísmo circular da Amy1 selvagem e recombinante em pH 7,0 na temperatura de 25°C. Os espectros são diferentes e refletem as alterações no conteúdo de folhas- β , desordenadas e α -hélice entre as duas proteínas. Enquanto as bandas dicróicas de 208nm e 222 nm são predominantemente associadas com estruturas em α -hélice, as bandas dicróicas em 198 e 206 nm podem ser associadas com outros elementos de estrutura secundária na proteína, como estruturas desordenadas e folhas- β (Barrow *et. al*, 1992). A estrutura secundária em ambas as proteínas difere no conteúdo de α -hélices (Amy1 recombinante 5,7% e selvagem 9,5%) e folhas- β antiparalelas (Amy1 recombinante 42,1% e selvagem 32,4%) e é similar para os outros tipos de estrutura secundária (Tabela 2).

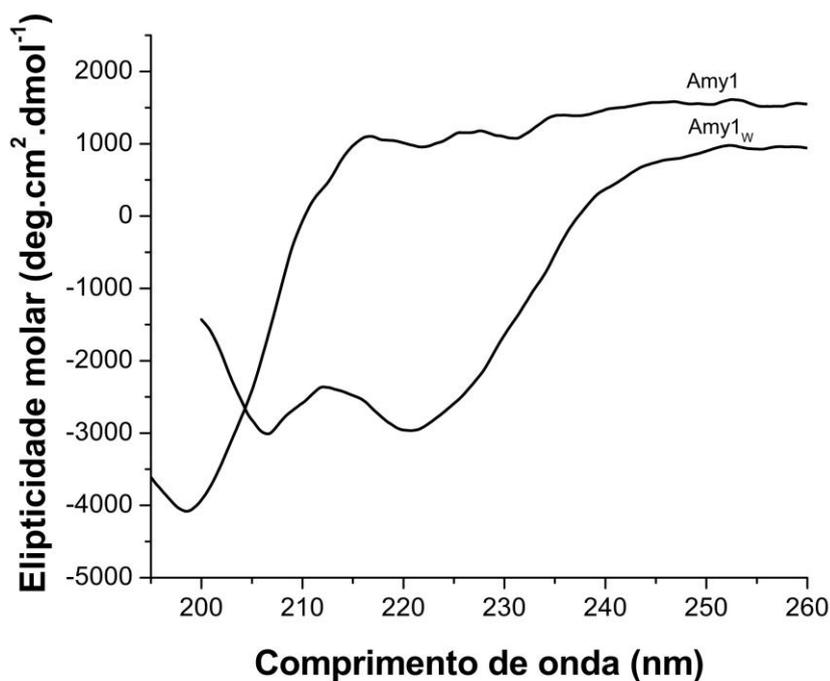


Figura 16 – Espectros de dicroísmo circular distante do UV das α -amilases recombinante (Amy1) e selvagem (Amy1_w) em pH 7,0 na temperatura de 25°C.

Tabela 2 – Comparação das porcentagens de estrutura secundária entre as α -amilases selvagem e recombinante em pH 7,0 nas temperaturas de 25 e 95°C.

Estrutura secundária	Selvagem pH 7,0 25°C	Recombinante pH 7,0 25°C	Selvagem pH 7,0 95°C	Recombinante pH 7,0 95°C
α -hélice	9,5 %	5,7 %	9,8 %	6,8 %
Folha- β antiparalela	32,4 %	42,1 %	30,9 %	38,8 %
Folha- β paralela	5,5 %	5,2 %	5,3 %	5,3 %
Voltas- β	20,8 %	22,5 %	21,4 %	21,5 %
Desordenada	36,6 %	38,1 %	36,5 %	37,4 %

Os espectros de dicroísmo circular elevando a temperatura de 25 até 95°C da Amy1 selvagem e recombinante em pH 7,0 estão indicados nas figuras 17 e 18, respectivamente. As curvas de desnaturação térmica indicaram que as duas α -amilases são termicamente estáveis, tendo em vista que não foi observado padrão de desnaturação que corresponde ao desaparecimento do sinal dicróico. No entanto, o espectro da Amy1 selvagem mostra um aumento nas bandas dicróicas de 206 nm e de 222 nm com o aumento da temperatura (Figura 17). O conteúdo de estrutura secundária foi praticamente preservado (Tabela 2), sugerindo que as alterações nos espectros decorrem de mudanças conformacionais ou rearranjos da estrutura secundária em função da temperatura. Em contraste, o espectro de dicroísmo circular da Amy1 recombinante mostrou aumento gradual da banda dicróica de 222 nm e decréscimo da banda de 200 nm à medida que a temperatura aumenta (Figura 18 e 19). Essas mudanças sugerem alterações de α -hélices (aumento de 5,7% para 6,8%) e folhas- β (decrécimo de 42,1% para 38,8%) (Tabela 2). Esses resultados indicam a estabilidade térmica das α -amilases selvagem e recombinante.

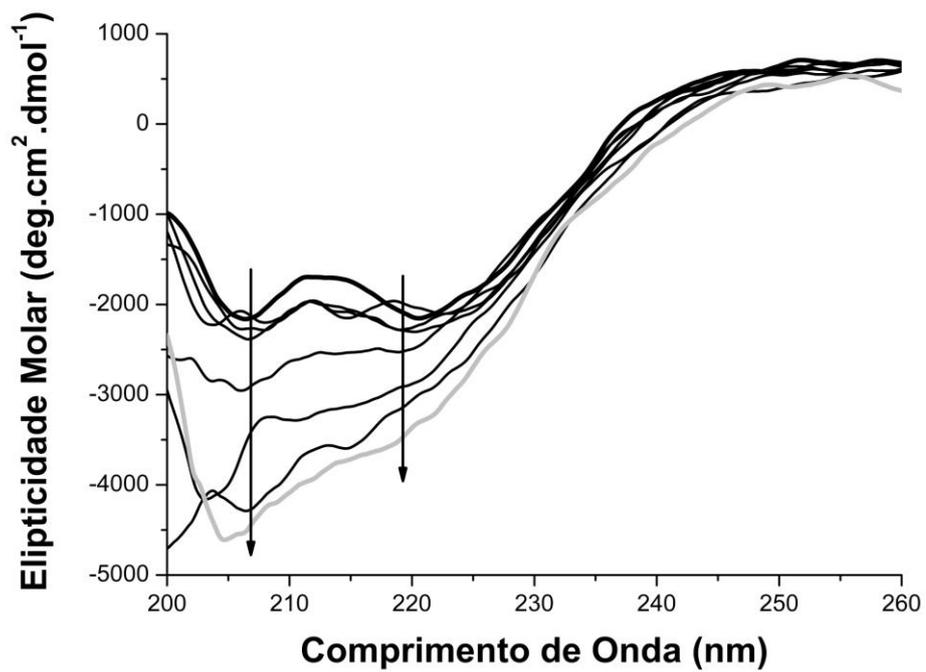


Figura 17 - Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 selvagem em pH 7,0. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C.

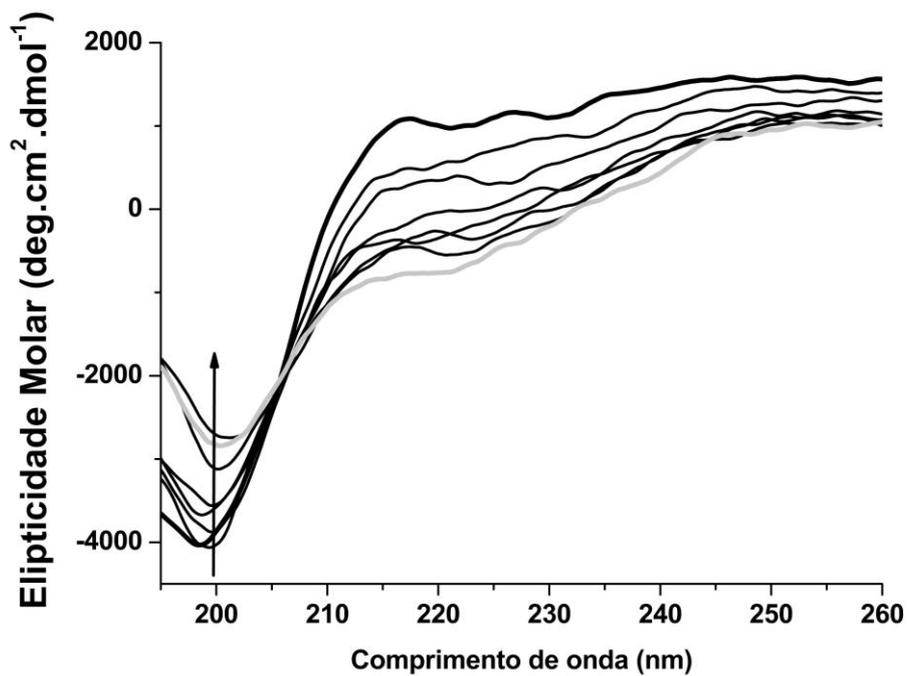


Figura 18 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 7,0. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C.

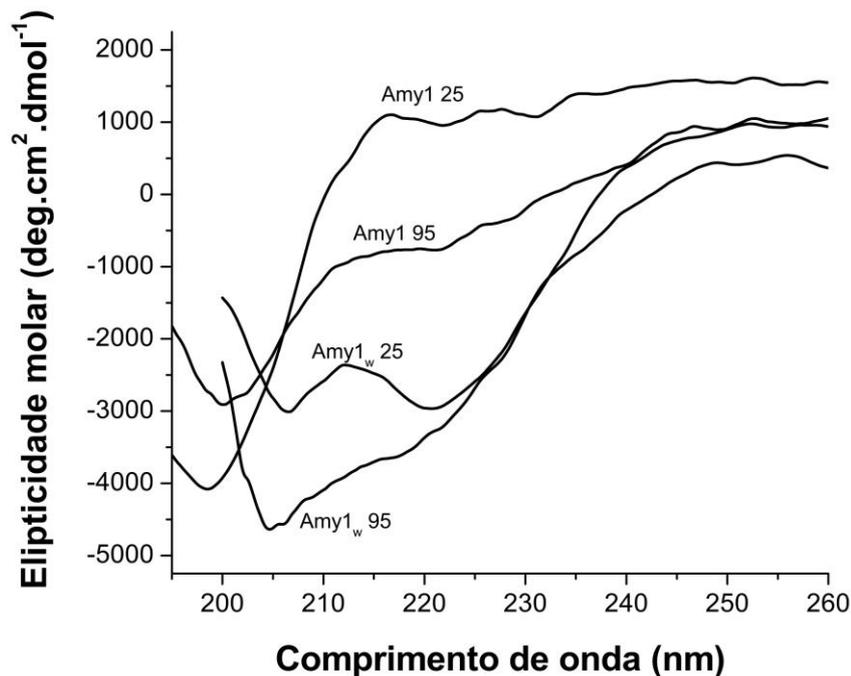


Figura 19 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV comparando a Amy1 selvagem e a Amy1 recombinante em pH 7,0 nas temperaturas de 25 e 95°C.

4.3.1.1 Efeito do pH e força iônica na estabilidade estrutural da α -amilase recombinante

A figura 20 mostra o espectro de dicroísmo circular da α -amilase recombinante em vários pHs. A Amy1 recombinante apresentou similaridade no conteúdo de estrutura secundária (α -hélices 5,7% - 6,5% e folhas- β ~42%) nos pH de 3,0; 5,5 e 7,0; como indicado pelo espectro (Figura 20) e a estimativa das estruturas secundárias (Tabela 3).

Em condições alcalinas e também em pH 4,0 foi verificado aumento no sinal dicróico em 200 nm (Figura 20), compatível com diminuição nos conteúdos de folhas- β (~37%) se comparado com pH 3,0; 5,5 e 7,0 (~42%).

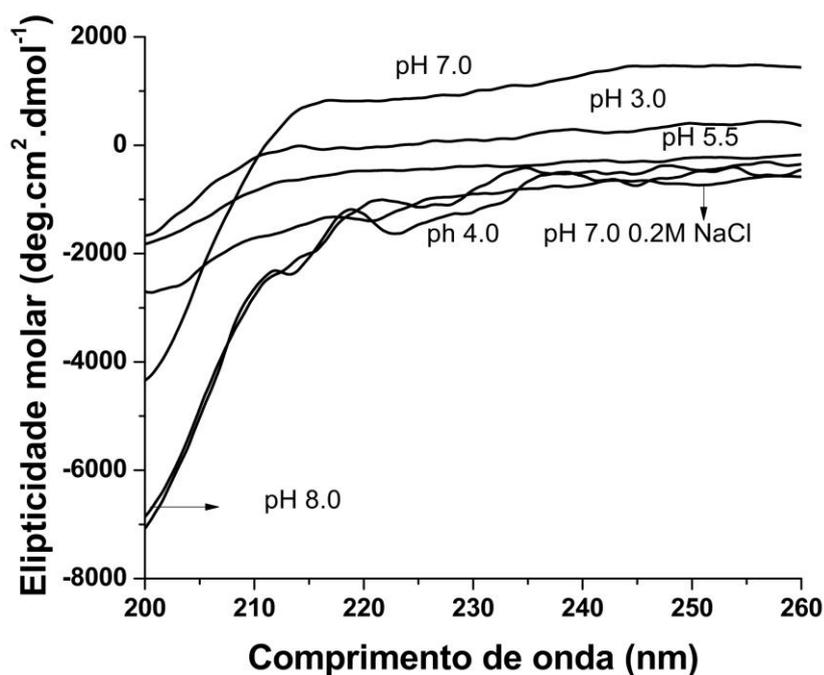


Figura 20 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV da Amy1 recombinante nos pHs 3,0; 4,0; 5,5; 7,0; 7,0 com NaCl 0,2 M e 8,0 na temperatura de 25°C.

Tabela 3 – Porcentagem de estrutura secundária da α -amilase recombinante nos pHs 3,0; 4,0; 5,5; 7,0; 8,0 e 7,0 com NaCl 0,2 M na temperatura de 25°C.

	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,5	pH 7,0	pH 7,0 NaCl 0,2 M	pH 8,0
α -hélice	6,4 %	6,5 %	6,1 %	5,7 %	4,6 %	4,9 %
Folha- β	42,3%	36,5%	43,5%	47,1%	42,8%	37%

Os espectros da Amy1 recombinante elevando a temperatura de 25 a 95°C em pH 8,0 indicam mudanças conformacionais discretas com o aumento da temperatura (Figura 21). O aumento na banda dicróica de 222 nm e a diminuição em 206 nm foi semelhante ao observado em pH 7,0 (Figura 18), o que provavelmente correspondem a mudanças discretas do conteúdo das estruturas secundárias.

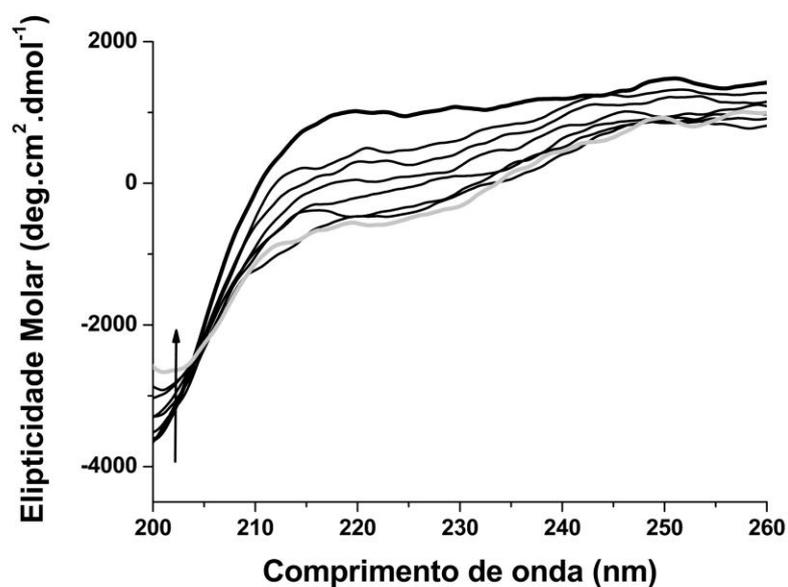


Figura 21 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 8,0. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C.

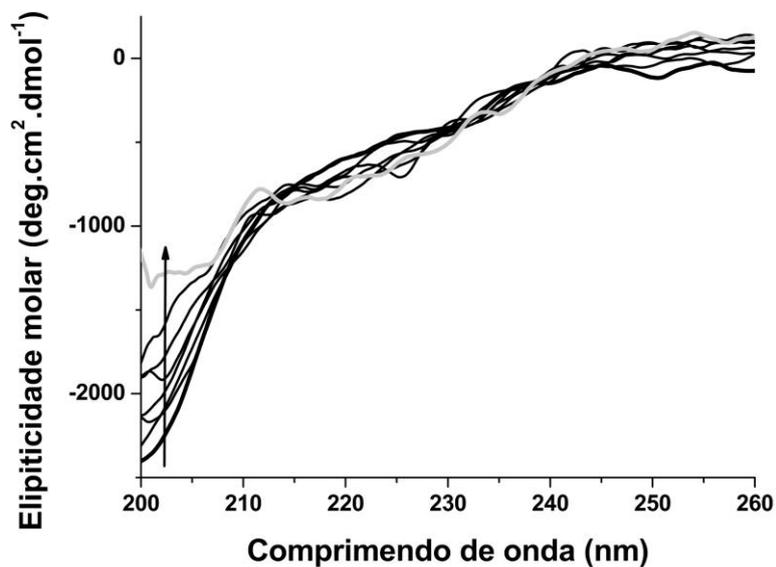


Figura 22 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 7,0 em presença de NaCl 0,2 M. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C.

A figura 22 mostra os espectros de CD de 25 a 95°C da Amy1 recombinante em pH 7,0 na presença de NaCl 0,2 M. A proteína perde em estabilidade comparando com a Amy1 recombinante em pH 7,0 na ausência desse sal (figura 23). As mudanças nas intensidades das bandas dicróicas com o aumento da força iônica do meio indicam diminuição da estabilidade da proteína, uma vez que o sinal dicróico diminui para valores mais próximos de zero na temperatura de 95°C.

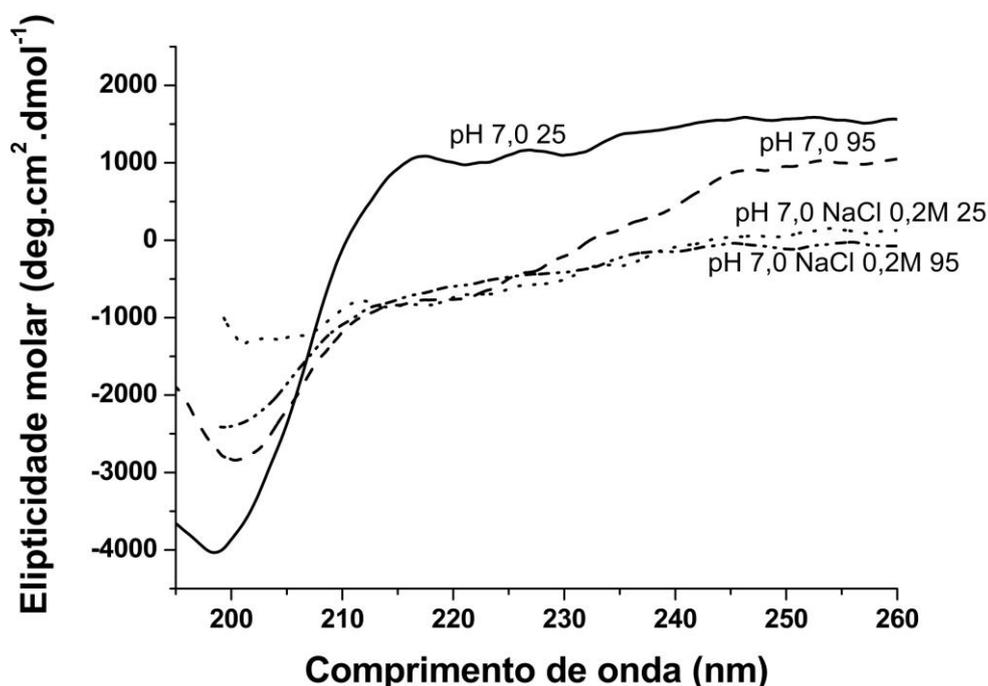


Figura 23 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV da Amy1 recombinante – comparação entre pH 7,0 com e sem NaCl nas temperaturas de 25° e 95°C.

4.3.2 Amy1 recombinante apresenta padrão de dobramento semelhante ao da Amy1 selvagem em condições diferentes de cultivo

Os resultados descritos na sessão anterior mostram que a α -amilase recombinante apresentou, nas condições em que foi expressa, padrão de dobramento diferente da α -amilase selvagem. Esses dados corroboraram com a atividade da enzima que apresentou valor de K_m distinto e de menor afinidade

comparado com os dados da α -amilase selvagem (Galdino *et al.*, 2008; Galdino *et al.*, 2011). Um dos fatores fundamentais na expressão de enzimas recombinantes, visando aplicações biotecnológicas, é a produção dessas moléculas com padrão de dobramento correto ou próximo das condições nativas da fonte de onde são extraídas. Considerando esse fato e os resultados apresentados na sessão anterior, várias questões foram levantadas no sentido de explicar as diferenças observadas no padrão de dobramento entre as duas α -amilases. A primeira suspeita do porque do dobramento distinto da proteína recombinante, em comparação com a selvagem, foi o procedimento de cultivo da levedura. Nesse caso, foi necessário encontrar uma condição de cultivo em que a proteína fosse expressa e dobrada de forma correta, favorecendo a preservação da atividade enzimática, visando a aplicação tecnológica da enzima. Em razão disso testou-se algumas condições de crescimento, diferentes da utilizada na produção da α -amilase anterior.

Inicialmente foi feita a seleção de novas colônias isoladas da levedura recombinante que apresentaram halos maiores de atividade amilolítica. Uma das hipóteses era a de que a amostra de α -amilase obtida anteriormente teria sido proveniente de uma cultura que cresceu muito rápido e, conseqüentemente, produziu a enzima rapidamente e em altas concentrações. Essa superprodução pode ter sobrecarregado toda a maquinaria envolvida na síntese da enzima pela levedura e ter provocado a produção em larga escala sem as condições necessárias e tempo suficiente para o dobramento correto da proteína. A Amy1 se manteve ativa, porém apresentando menor afinidade comparada a α -amilase selvagem. Esses resultados indicaram que a estrutura do sítio ativo foi preservada, mas parte das regiões importantes para a afinidade pode ter sido alterada.

Alternativas no procedimento do cultivo da levedura foram testadas, como o crescimento da cultura em Erlenmeyers aletados de um litro. Esse tipo de frasco possibilita uma maior aeração da cultura. Em condições de pouca disponibilidade de oxigênio a levedura *S. cerevisiae* entra em processo de fermentação, sem que haja uma diminuição da velocidade da glicólise. Em conseqüência, há um aumento da expressão do promotor PGK, que faz parte dessa via. Como a

produção da Amy1 é controlada por esse promotor, nessas condições, há um aumento da sua expressão, levando a uma sobrecarga da maquinaria de secreção desde o retículo endoplasmático até o complexo de Golgi, resultando em proteínas que podem ser mal dobradas. Imagina-se, que nessas condições, a Amy1 é superexpressa e passa por um processo de dobramento incompleto, sendo liberada no meio de cultura com um dobramento diferente do encontrado quando expressa em seu organismo de origem. Além disso, a levedura pode romper, com maior facilidade nessas condições, e liberar no meio de cultura todo o seu conteúdo intracelular, o que pode ser observado na curva de crescimento em frascos não aletados (Figura 9).

Essas alterações nas condições de cultivo possibilitaram a obtenção da Amy1 recombinante com um padrão de dobramento semelhante ao da Amy1 selvagem, sem que a atividade enzimática fosse alterada. As análises a seguir foram feitas com essa Amy1 recombinante e comprovam essa mudança no padrão de dobramento.

O espectro dicróico de ambas as α -amilases recombinante e selvagem em água a 25°C é mostrado na figura 24. Essa proteína é formada predominantemente por α -hélices e menos por folhas- β (Tabela 4). Não houve diferenças significativas entre os conteúdos de estrutura secundária das α -amilases selvagem e recombinante, como indicado pelos valores na Tabela 4. A figura 24 e a tabela 3 indicam que a Amy1 recombinante não apresenta alterações significativas na sua conformação durante a expressão em um organismo diferente (*S. cerevisiae*) do seu de natureza (*C. flavus*).

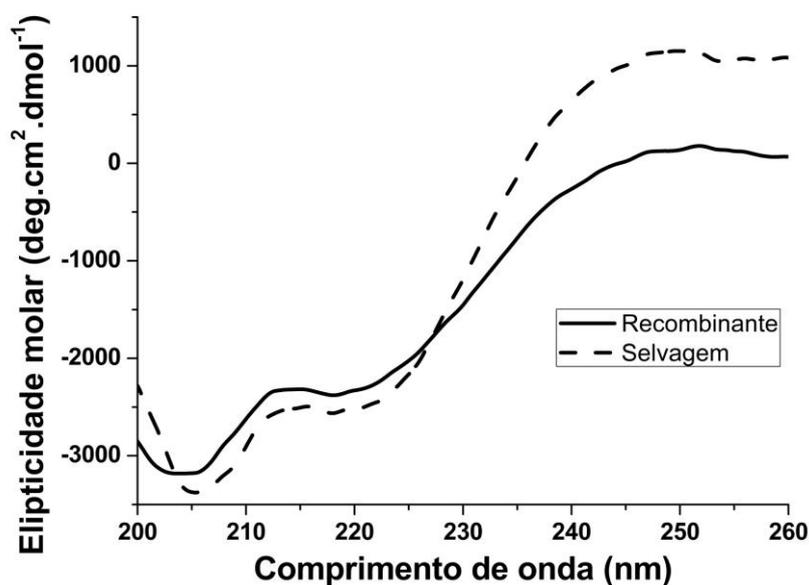


Figura 24 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV comparando a Amy1 selvagem e a Amy1 recombinante em água na temperatura de 25°C.

Tabela 4 – Porcentagem de estrutura secundária das α -amilases nativa e recombinante em água a 25 e 95°C.

Estrutura secundária	Selvagem 25°C	Recombinante 25°C	Selvagem 95°C	Recombinante 95°C
α -hélice	9,1 %	8,2 %	8,4 %	9,7 %
Folha- β antiparalela	32,7 %	34,7 %	31,0 %	30,6 %
Folha- β paralela	5,4 %	5,3 %	5,0 %	5,3 %
Voltas- β	21,5 %	21,3 %	24,0 %	21,8 %
Desordenada	37,0 %	36,8 %	37,9 %	36,9 %

Os espectros de dicroísmo circular da Amy1 selvagem nas temperaturas de 25 a 95°C em água (Figura 25) mostram que essa proteína é termicamente estável, uma vez que nenhum padrão de desnaturação total nessas condições foi

verificado. No entanto, em temperaturas a partir de 55°C a proteína começa a sofrer modificações na sua estrutura, o que pode ser visualizado pelo aumento do sinal dicróico na banda de 206 e 222 nm. Nessas condições as estruturas em α -hélices foram ligeiramente alterada (9,1% para 8,4%) e um discreto aumento na estrutura em folhas- β foi observado (21,5% para 24%) (Tabela 4).

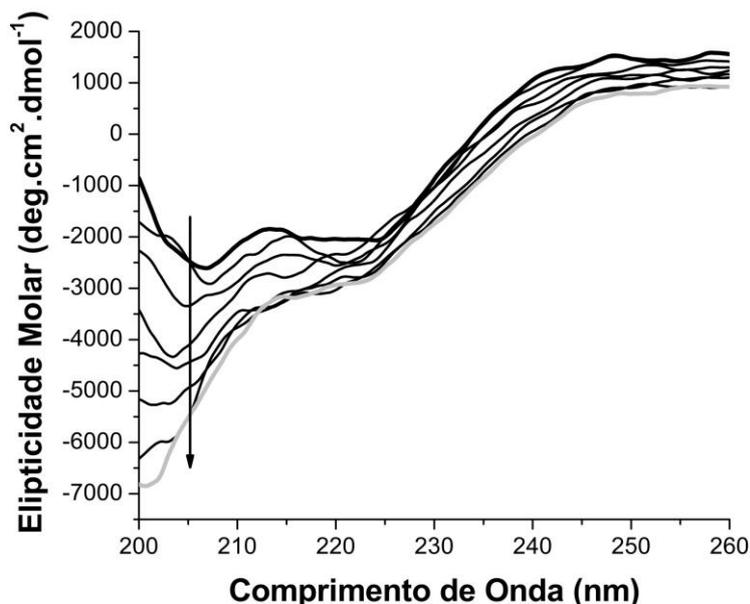


Figura 25 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 selvagem em água. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C.

Os espectros de dicroísmo circular nas temperaturas entre 25 e 95°C da Amy1 recombinante em pH 5,5 indicam que essa proteína é termicamente estável, uma vez que não houve indícios de desnaturação até a temperatura de 95°C (Figura 26). Um aumento na banda dicróica de 208 nm e parcialmente em 222 nm ocorreram, a partir da temperatura de 75°C, o que indica alterações nas hélices, principalmente. No entanto, a proteína não desnatura nessas condições.

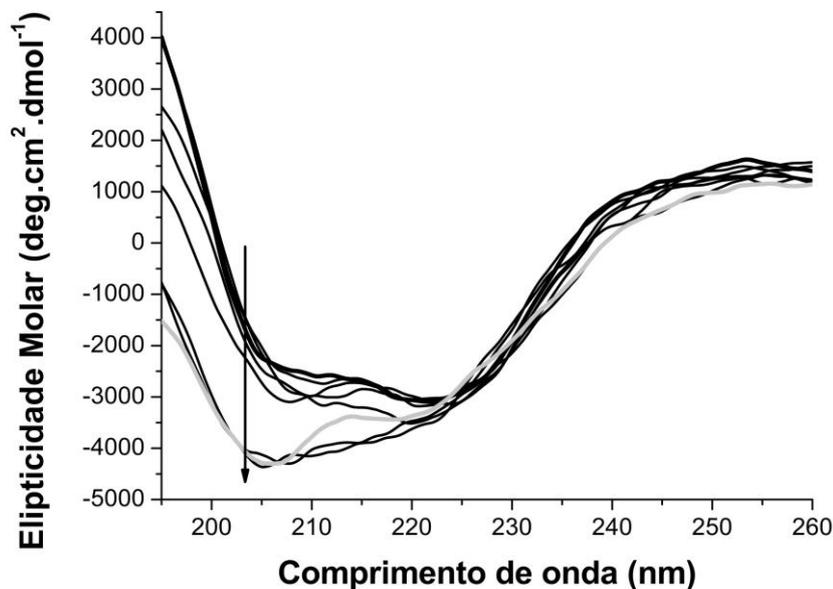


Figura 26 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV registrados de 25 – 95°C da Amy1 recombinante em pH 5,5. A linha mais grossa em preto representa o espectro em 25°C e a linha grossa em cinza representa o espectro em 95°C.

A Figura 27 apresenta a comparação entre os espectros de dicroísmo circular da Amy1 selvagem em água e em pH 7,0 nas temperaturas de 25 e 95°C. Em ambas as condições, na temperatura de 25°C, o espectro é muito parecido indicando que nessa temperatura o não tamponamento do meio não afeta a estrutura da proteína. Porém, na temperatura de 95°C na presença de água houve um aumento da banda dicróica em 206 nm em comparação ao pH 7,0. Essas mudanças no tamponamento da solução não alteram significativamente o padrão das estruturas secundárias sob o efeito da temperatura (Tabelas 2 e 4).

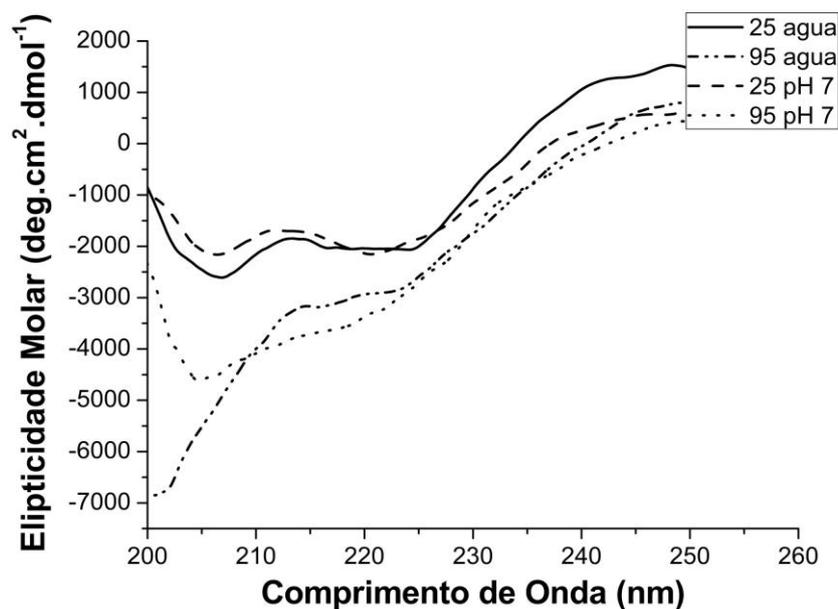


Figura 27 – Espectros de dicroísmo circular distantes do UV comparando a Amy1 selvagem em água e em pH 7,0 nas temperaturas de 25 e 95°C.

5.4 Fluorescência estática

As mudanças nos espectros de emissão fluorescente podem indicar alterações conformacionais de proteínas em resposta as mudanças do meio, associação de subunidades, ligação de ligantes ou desnaturação da proteína por efeito do pH, temperatura e agentes químicos (Laskowski, 2004). As alterações do pH promovem mudanças no padrão de ionização e conformação de proteínas. A técnica de fluorescência é sensível a essas alterações e, portanto, pode ser utilizada para análise de mudanças conformacionais de proteínas, monitoradas pelo ambiente dos resíduos de triptofano.

Nessa dissertação as alterações conformacionais da Amy1 sob o efeito do pH foram avaliadas por atenuação de fluorescência, utilizando atenuadores neutros e carregados. Essa técnica é utilizada para medir a exposição dos resíduos de triptofano (Trp) em meio aquoso e o ambiente estrutural desse

fluoróforo na proteína. Os atenuadores são compostos de baixa massa molecular capazes de diminuir a intensidade da fluorescência por contatos com os grupos aromáticos no estado excitado. A facilidade com que esses grupos são apagados ou atenuados depende da exposição aos atenuadores, o que indica o ambiente ao qual pertencem (Lehrer, 1971; Laskowski, 2004). Os atenuadores iônicos, Cs^+ e I^- , apresentam carga e também são hidratados. Ao contrário da acrilamida que pode acessar a matriz da proteína sem impedimento de grupos carregados, esses atenuadores iônicos são eficazes na discriminação entre resíduos expostos e enterrados e permitem revelar cargas do ambiente próximo dos resíduos de Trp (Idakieva *et al.*, 2006).

Nesse trabalho, os estudos de atenuação da fluorescência foram feitos com o objetivo de analisar mudanças conformacionais da Amy1 recombinante com as alterações no pH do meio. A Amy1 apresentou intensidade máxima de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{máx}}$) em aproximadamente 330 nm em pH 5,5 (Figura 28) e 337 nm nos pHs 7,0 (Figura 30) e pH 9,0 (Figura 32). A intensidade máxima entre 330 nm é típica para Trp em regiões semi-enterradas em um ambiente não-polar, enquanto que o $\lambda_{\text{máx}}$ em 337 é comum para Trp em regiões mais expostas (Burstein *et al.*, 1973; Schütz *et al.*, 2001). Essa alteração no posicionamento do triptofano é devido às diferenças conformacionais e no número de aminoácidos de cadeias laterais que são ionizadas nesses pHs, principalmente a histidina que apresenta pK de ionização próximo de pH 6,5, promovendo mudanças no padrão das ligações não covalentes e, conseqüentemente, mudanças conformacionais que afetam o ambiente do triptofano.

Os dados de atenuação de fluorescência são analisados segundo a equação de Stern-Volmer de onde pode ser calculada a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), utilizada para estimar a acessibilidade do atenuador ao fluoróforo e discriminar, em proteínas, os triptofanos “enterrados” e “expostos” (Möller & Denicolat, 2002; Shütz *et al.*, 2001). A equação de Stern-Volmer (Equação 2) é definida pela relação entre a concentração do atenuador e a intensidade de fluorescência. Valores de K_{sv} , calculados a partir da inclinação das retas ajustadas, acima de $8,0 \text{ M}^{-1}$ e abaixo de $8,0 \text{ M}^{-1}$ indicam a acessibilidade e o enterramento dos resíduos de triptofanos, respectivamente (Laskowski, 2004).

Os gráficos de Stern-Volmer para a Amy1, nos pHs 5,5; 7,0 e 9,0, na presença de concentrações crescentes de acrilamida (0 a 0,25M) (Figura 29), cloreto de cézio (0 a 0,5M) (Figura 31) e iodeto de potássio (0 a 0,5M) (Figura 33) foram obtidos considerando a intensidade de fluorescência em 330 nm. Todos os gráficos obtidos foram lineares permitindo determinar somente uma constante de K_{sv} para cada condição analisada (Tabela 4), correspondente a apenas a população de triptofano semi-enterrado na proteína (Laskowski, 2004).

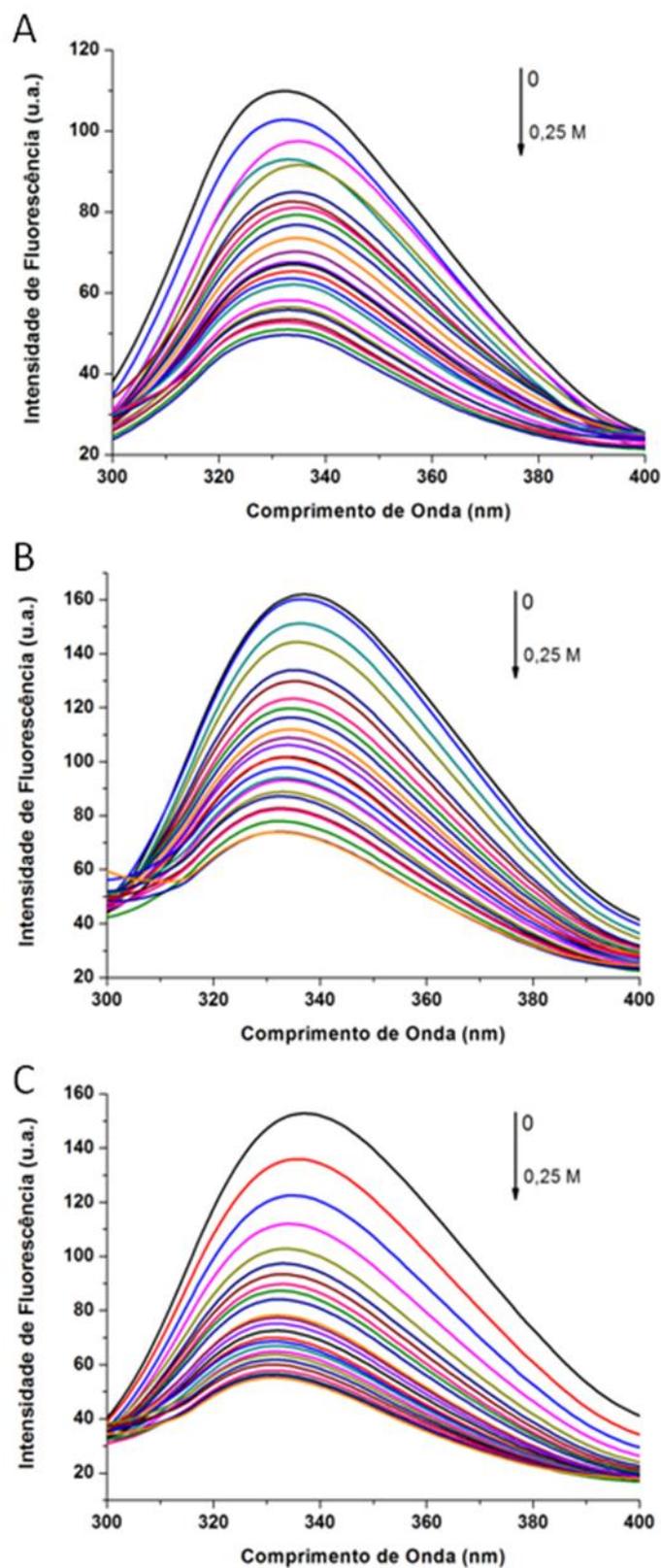


Figura 28 – Espectros de emissão de fluorescência da Amy1 em pH 5,5 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,0 (C) com adição de concentrações crescentes de acrilamida, a 25°C. Excitação em 295 nm.

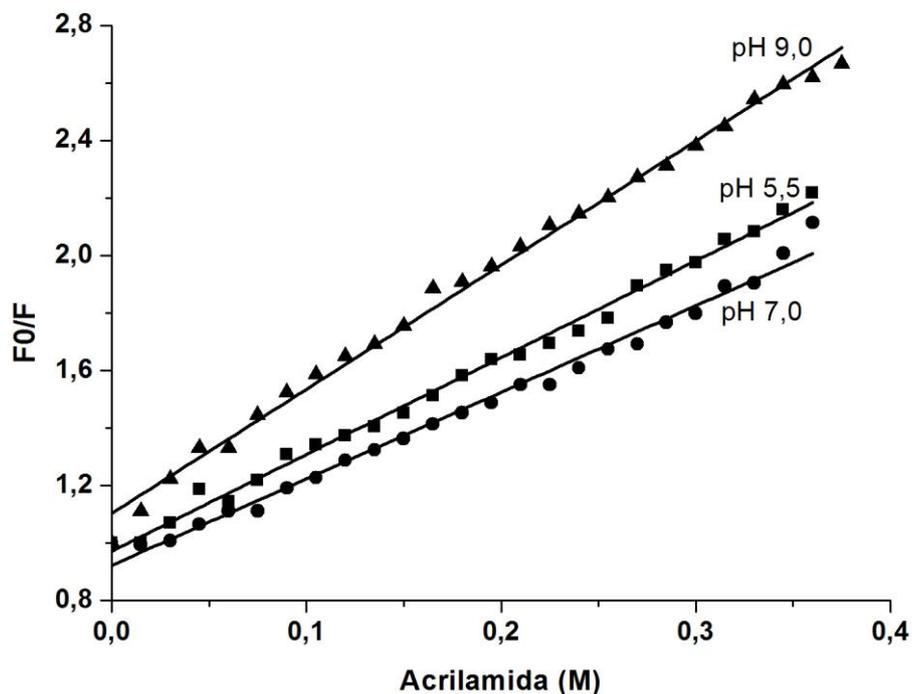


Figura 29 – Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência com acrilamida da Amy1 recombinante nos pHs ■ – pH 5,5; ● – pH 7,0; ▲ – pH 9,0. K_{SV} representa a inclinação da reta, F_0 a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. A linha sólida representa a curva ajustada pela equação clássica de Stern-Volmer.

Os valores de K_{SV} para a acrilamida, o iodeto de potássio (I^-) e o cloreto de cézio (Cs^+) em pH 5,5 foram de $3,36 M^{-1}$ (Figura 29), $2,46 M^{-1}$ (Figura 31) e $0,39 M^{-1}$ (Figura 33), respectivamente (Tabela 5). A acrilamida apresentou maior atenuação comparada aos demais atenuadores devido à facilidade desse reagente neutro acessar a matriz da proteína. Em contraste, os atenuadores iônicos, Cs^+ e I^- , que são carregados e também hidratados, apresentaram efeito mínimo de atenuação devido a impedimentos de grupos carregados na superfície ou próximos ao ambiente do fluoróforo e a estabilidade das interações entre o Trp no microambiente molecular. Entre os atenuadores carregados, o I^- atenuou aproximadamente 6,5 vezes mais que o Cs^+ indicando que em pH 5,5 algumas cadeias laterais próximas aos Trp estão carregadas positivamente ou que estes triptofanos estão participando de interações não covalentes com a vizinhança estrutural, como os aminoácidos arginina, lisina e histidina. Apesar de essa ser a

característica que indica o ambiente carregado ou não próximo ao Trp, nessa α -amilase, os valores obtidos para as constantes K_{sv} obtidas em pH 5,5, principalmente para o iodeto e acrilamida, mostram a estabilidade das interações do trp com a vizinhança molecular e a presença de alguns grupos carregados positivamente nessa região.

Tabela 5 - Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) para os atenuadores (acrilamida, iodeto e césio) nos pHs 5,5; 7,0 e 9,0.

pH	K_{sv} (M^{-1})	K_{sv} (M^{-1})	K_{sv} (M^{-1})
	Acrilamida	Iodeto (I^-)	Césio (Cs^+)
5,5	3,36	2,46	0,39
7,0	3,00	1,20	0,73
9,0	4,31	1,22	0,95

Em pH 7,0 os valores de K_{sv} para os atenuadores acrilamida, I^- e Cs^+ foram de $3,00 M^{-1}$ (Figura 29), $1,20 M^{-1}$ (Figura 31) e $0,73 M^{-1}$ (Figura 33), respectivamente (Tabela 5). Comparada aos atenuadores carregados, a acrilamida apresentou maior atenuação, sendo aproximadamente quatro vezes maior do que o Cs^+ e duas vezes maior do que o I^- . Esse resultado indica que os Trp estão em ambiente semi-enterrado, semelhante aos resultados obtidos para proteína em pH 5,5. O I^- apresentou atenuação aproximadamente 1,5 vezes maior do que o Cs^+ , indicando que em pH 7,0, as mudanças conformacionais decorrentes de diferenças de ionização de grupos carregados positivamente (histidinas, por exemplo) resultam em uma estrutura da α -amilase que dificulta o acesso dos dois atenuadores (K_{sv} de $1,2 M^{-1}$ e $0,73 M^{-1}$ para o iodeto e césio, respectivamente).

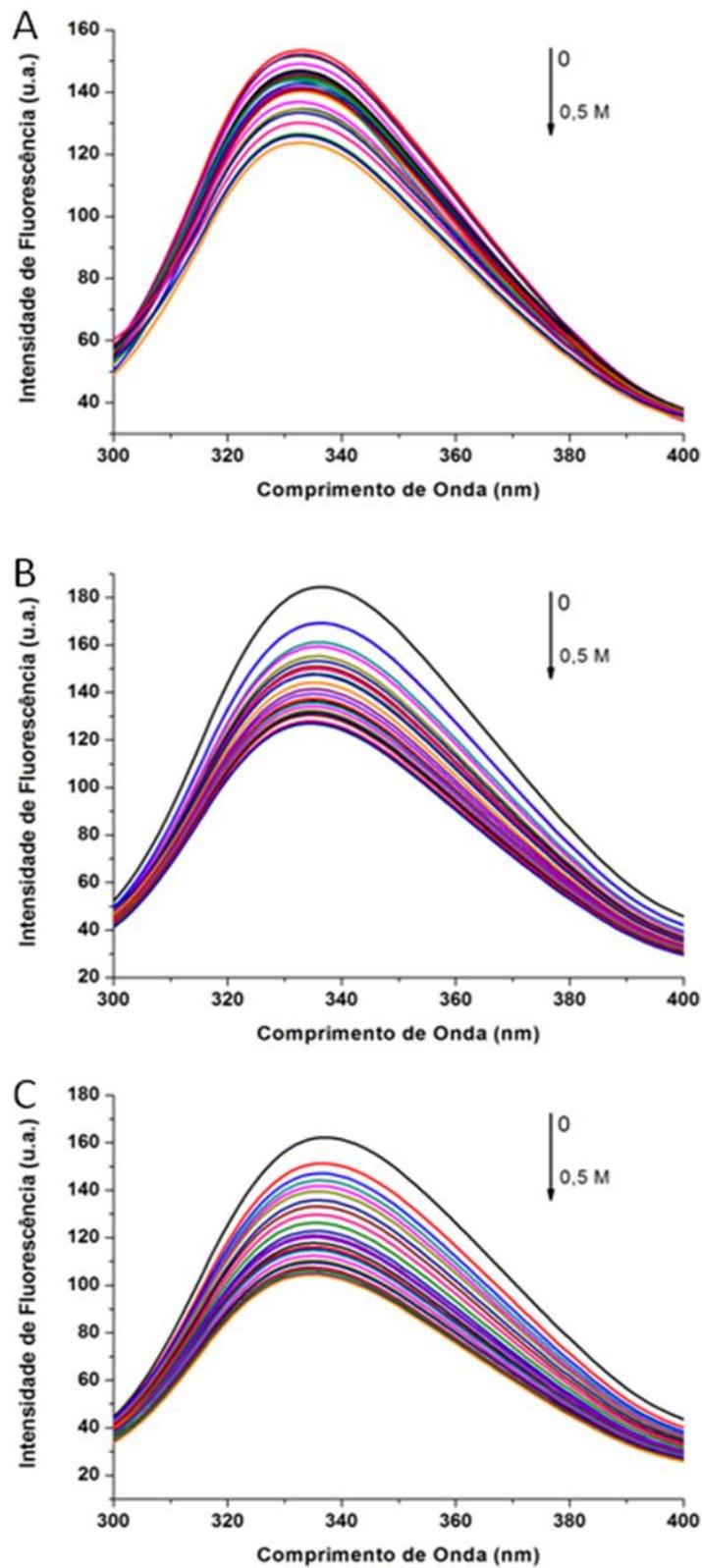


Figura 30 – Espectros de emissão de fluorescência da Amy1 em pH 5,5 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,0 (C) com adição de concentrações crescentes de cloreto de césio, a 25°C. Excitação em 295 nm.

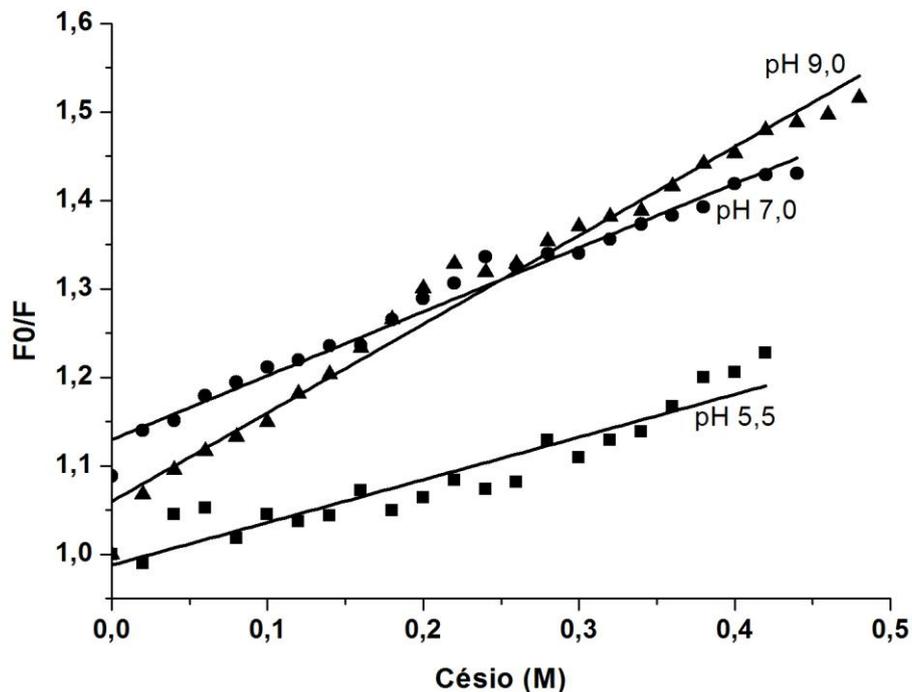


Figura 31 – Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência com cloreto de césio da Amy1 recombinante em diferentes pHs (■ – pH 5,5; ● – pH 7,0; ▲ – pH 9,0). K_{sv} representa a inclinação da reta, F_0 a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. A linha sólida representa a curva ajustada pela equação clássica de Stern-Volmer.

Em pH 9,0 os valores de K_{sv} foram: $4,31 \text{ M}^{-1}$ (Figura 29) para a acrilamida, $1,22 \text{ M}^{-1}$ (Figura 31) para o I^- e $0,95 \text{ M}^{-1}$ (Figura 33) para o Cs^+ (Tabela 5). Assim como nos demais pHs a acrilamida apresentou maior atenuação, aproximadamente 3,5 vezes maior que a do iodeto e 4,5 vezes maior que a do césio, mostrando maior acessibilidade aos Trp localizados no interior da proteína. Entre os atenuadores carregados o I^- apresentou atenuação aproximadamente 1,3 vezes maior que o Cs^+ , indicando que há uma barreira positiva próxima aos Trp expostos que impede o acesso desse atenuador.

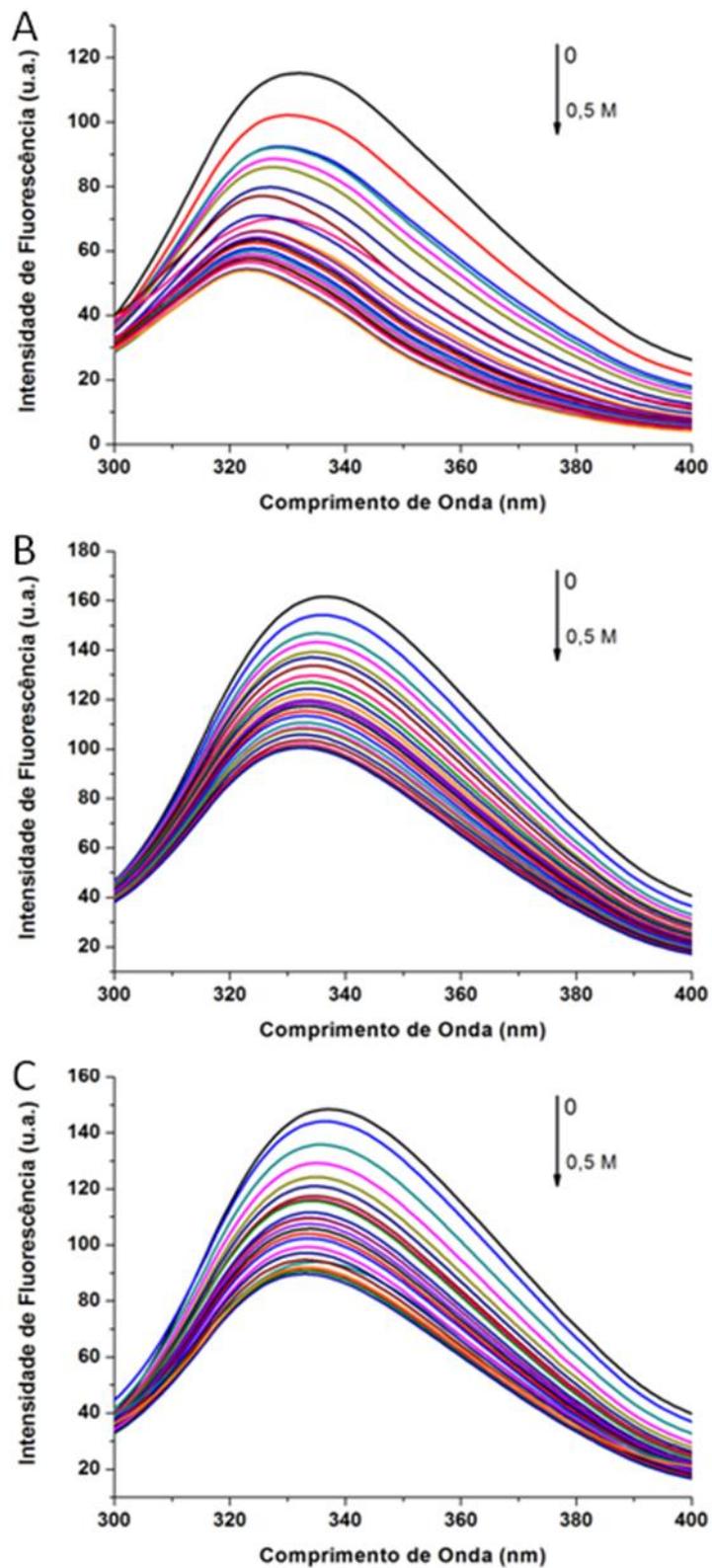


Figura 32 – Espectros de emissão de fluorescência da Amy1 em pH 5,5 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,0 (C) com adição de concentrações crescentes de iodeto de potássio, a 25°C. Excitação em 295 nm.

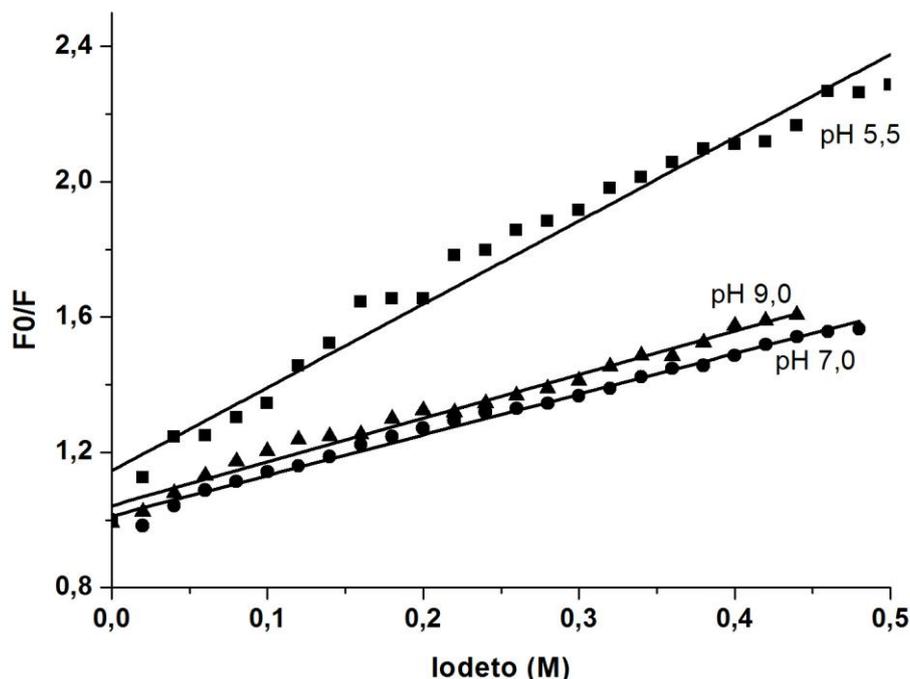


Figura 33 – Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência com iodeto de potássio da Amy1 recombinante em diferentes pHs (■ – pH 5,5; ● – pH 7,0; ▲ – pH 9,0). K_{sv} representa a inclinação da reta, F_0 a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. A linha sólida representa a curva ajustada pela equação clássica de Stern-Volmer.

O valor de K_{sv} para a acrilamida foi maior em pH 9,0 ($4,31 \text{ M}^{-1}$) comparado com os valores em pHs 5,5 ($3,36 \text{ M}^{-1}$) e 7,0 ($3,00 \text{ M}^{-1}$) (Tabela 4). A figura 28 ilustra que a acrilamida reduz a intensidade de fluorescência em aproximadamente 50% nos pHs 5,5 (Figura 28 – A) e 7,0 (Figura 28 – B) e 60% no pH 9,0 (Figura 28 – C). Esses valores de K_{sv} indicam que os Trp da molécula encontram-se semi-enterrados na matriz da proteína e que as alterações no pH do meio induzem mudanças conformacionais na Amy1 sem no entanto alterar o ambiente carregado próximo ao fluoróforo. Essas mudanças conformacionais levam a alterações do padrão das interações envolvendo grupos apolares, permitindo maior acesso da acrilamida aos Trp que se encontram no interior da proteína. Essas alterações são responsáveis pela queda da atividade catalítica da α -amilase em pH 9,0, o que está de acordo com os dados reportados por Galdino (2008).

Em pH 5,5 ocorrem mudanças no padrão de ionização da proteína, principalmente para histidina que pode estar na forma neutra ou carregada positivamente nesse pH, considerando a proximidade do pK de ionização da cadeia lateral desse aminoácido. Essas mudanças de cargas afetam as interações não covalentes e, conseqüentemente, o ambiente do fluoróforo. Esta instabilidade provocada pela diferença de cargas reflete nos valores baixos da constante K_{sv} . Em pH neutro e alcalino, esses resíduos estão carregados positivamente e, comparativamente ao pH 5,5, essa mudança reflete em alterações estruturais e, mesmo que mínimas, em diferenças nos valores de K_{sv} .

Em todas as condições analisadas, a atenuação do céσιο foi a menor dentre os três atenuadores, indicando que o ambiente do Trp não é carregado negativamente. Os resultados apresentados indicam que o Trp está em ambiente semi-enterrado e não carregado em pH neutro e alcalino, e parcialmente carregado positivamente em pH 5,5. Adicionalmente, os resultados mostram que em pH 5,5 as alterações conformacionais são mínimas mas favorecem o aumento da atividade catalítica dessa α -amilase nesse pH.

4.5 Cristalização da Amy1 recombinante

Os ensaios de cristalização da α -amilase foram realizados no sistema robotizado do LNLS. Até o presente momento, foi encontrado um cristal bem formado e com faces definidas (Figura 28), na condição: Bis-tris propano 0,1 M pH 7,5; PEG 3350 20% w/v; fluoreto de sódio 0,1 M. A partir desse resultado, refinamentos das condições de cristalização serão realizados, visando a obtenção de cristais maiores e em maior número para justificar a solicitação de tempo de linha no LNLS.



Figura 34 – Cristal da Amy1 recombinante obtido nas condições: Bis-tris propano 0,1 M pH 7,5; PEG 3350 20% w/v; fluoreto de sódio 0,1 M

5. Conclusões

- 1) A levedura MFL-AMY1 apresentou melhor crescimento e maior produção de enzima no meio de cultura com extrato de levedura 0,4% como fonte de nitrogênio, temperatura de 28°C, agitação de 200 rpm e tempo de crescimento de 72 horas.
- 2) A Amy1 recombinante foi purificada com uma cromatografia de troca iônica seguida de uma cromatografia de exclusão molecular.
- 3) A Amy1 recombinante não é N-glicosilada quando expressa na linhagem de *S. cerevisiae* MFL.
- 4) A variação de pH do meio afeta as estruturas secundárias da Amy1 recombinante. Elas foram semelhantes nos pHs 3,0; 5,5 e 7,0 (α -hélices 5,7% - 6,5% e folhas- β ~42%) e diferiram em condições alcalinas e em pH 4,0 , onde ocorreu uma diminuição no conteúdo de folhas- β (37%).
- 5) A elevação da temperatura para 95°C da Amy1 recombinante em pHs 7,0 e 8,0 induziu modificações na estrutura secundária da Amy 1 recombinante, no entanto, a proteína não foi desnaturada. Resultados semelhantes foram obtidos para a proteína selvagem.
- 6) A mudança da força iônica do meio (NaCl 0,2M) provocou diminuição da estabilidade da Amy1 recombinante, indicada pelos espectros de CD em temperaturas próximas de 95°C. Porém, essas alterações não foram compatíveis com a desnaturação da proteína.
- 7) Alterações nas condições de cultura da MFL-AMY1 permitiram obter a enzima recombinante com padrão de dobramento semelhante ao da selvagem. As porcentagens de estrutura secundária das duas enzimas foram semelhantes.

- 8) Os triptofanos da Amy1 estão em ambiente semi-enterrado e não carregado em pH neutro e alcalino, e parcialmente carregado positivamente em pH 5,5. Em pH 5,5 o Trp participa de interações que estabilizam a vizinhança molecular que é constituída de alguns grupos carregados positivamente. As alterações conformacionais são mínimas, mas favorecem o aumento da atividade catalítica dessa α -amilase nesse pH. Em pH 7,0 ocorrem mudanças conformacionais devido a diferenças de ionização de grupos carregados positivamente, resultando em uma estrutura da α -amilase que dificulta o acesso do iodeto e do césio. Em pH 9,0 ocorrem alterações do padrão de interações envolvendo grupos apolares, que são responsáveis pela queda da atividade catalítica da Amy1 nesse pH.
- 9) Ensaio de cristalização da Amy1 recombinante resultaram em um cristal com faces definidas, na condição Bis-tris propano 0,1 M pH 7,5; PEG 3350 20% w/v; fluoreto de sódio 0,1 M. A partir desse resultado e dos resultados obtidos por atenuação da fluorescência, novas estratégias de cristalização da proteína poderão ser testadas, visando a obtenção de maior número de cristais.

6. Referências Bibliográficas

- Anderson *et al.* 1991. A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. *Electrophoresis*. **12**(11): 907-930.
- Altintas *et al.* 2003. Optimal substrate feeding policy for fed-batch cultures of *S. cerevisiae* expressing bifunctional fusion protein displaying amylolytic activities. *Enzyme and Microbial Technology*. **33**: 262-269.
- Bai *et al.* 2008. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. **26**: 89-105.
- Balsera *et al.* 2003. The single tryptophan of the PsbQ protein of photosystem II is at the end of a 4- α -helical bundle domain. *European Journal of Biochemistry*. **270**: 3916-3927.
- Banner *et al.* 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined by crystallography at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*. **255**: 609–614.
- Barrow *et al.* 1992. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *Journal of Molecular Biology*. **225**: 1075-1093.
- Brena *et al.* 1996. Chromatographic methods for amylases. *Journal of Chromatography*. **684**: 217-237.
- Boel *et al.* 1990. Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* **29**: 6244-6249.
- Bohm *et al.* 1992. Quantitative analyses of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein engineering*. **5**: 191-195.

- Bradford. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Buisson *et al.* 1987. Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amylase at 2.9 Å resolution – Role of calcium in structure and activity. *The EMBO Journal*. **6**: 3909-3916.
- Burhan *et al.* 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* *Process Biochemistry*. **38**: 1397–1403.
- Burstein *et al.* 1973. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **18**: 263-279.
- Canganella *et al.* 1994. Characterization of amylolytic and pullulytic activities from thermophilic Archaea and from a new *Fervidobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **42**: 239–245.
- Chum & Ralph. 2001. Biomass and renewable fuels. *Fuel Processing Technology*. **71**: 187-195.
- Eftink & Ghiron. 1981. Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry*. **114**: 199-227.
- Friedberg. 1983. On the primary structure of amylases. *FEBS Letters*. **152**: 139-140.
- Fuwa. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *Journal of Biochemistry*. **4**: 583-603.
- Galdino *et al.* 2008. Cloning, molecular characterization and heterologous expression of AMY1, an α -amylase gene from *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letter*. **280**: 189-194.
- Gray *et al.* 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*. **10**: 141-146.

- Gupta *et al.* 2003. Microbial amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. **38**: 1599-1616.
- Henrissat & Bairoch. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. **293**: 781-788.
- Idakieva *et al.* 2006. Fluorescence properties and conformational stability of the β -hemocyanin of *Helix pomatia*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1764**: 807-814.
- Janeček & Baláž. 1992. α -amylases and approaches leading to their enhanced stability. *FEBS letters*. **304**(1): 1-3.
- Janeček *et al.* 1997. Domain evolution in the α -amylase family. *Journal of Molecular Evolution*. **45**: 322-331.
- Jespersen *et al.* 1993. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic $(\beta/\alpha)_8$ -barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *Journal of Protein Chemistry*. **12**:791–805.
- Jonhston & Carlson. 1992. Regulation of carbon and phosphate utilization. The Molecular and Cellular Biology of the yeast *Saccharomyces*. Vol. 2, Gene Expression, pages 193-281. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kagawa *et al.* 2003. Crystal Structure of *Bacillus subtilis* α -amylase in complex with arcabose. *Journal of Bacteriology*. **185**(23): 6981-6984.
- Khaw *et al.* 2007. Enhancement of Ethanol Proction by Promoting Surface Contact between Starch Granules and Arming Yeast in Direct Ethanol Fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **103**(1): 95-97.
- Khajeh *et al.* 2001. Chemical modification of bacterial α -amylases: changes in tertiary structures and the effect of additional calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1548**: 229-237.

- Koshland. 1953. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews*. **28**: 416–436.
- Kumar. 2010. Analysis of the key active subsites of glycoside hydrolase 13 family members. *Carbohydrate Research*. **345**(7): 893-898.
- Kuriki & Imanaka. 1999. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **87**(5): 557-565.
- Lacks & Springhorn. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrilamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*. **255**: 7467-7473.
- Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Laskowski. 2004. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer. 2^a ed. 698.
- Leher. 1971. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry*. **10**: 3254-3263.
- MacGregor. 1988. α -Amylase structure and activity. *Journal of Protein Chemistry*. **7**(4): 399-415.
- MacGregor *et al.* 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1546**: 1-20.
- Mendonça *et al.* 2008. Expansão da produção de álcool combustível no Brasil: Uma análise baseada nas curvas de aprendizagem. Apresentação oral no XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural.
- Möller & Denicolat. 2002. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Physical Biochemistry Laboratory*. **30**(3):175-178.

- Moraes *et al.* 1995. Development of yeast strains for the utilisation of starch: evaluation of constructs with Express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **43**(6): 1067-1076.
- Mótyána *et al.* 2011. Computer-aided subsite mapping of α -amylases. *Carbohydrate Research*. **346**: 410-415.
- Nakamura *et al.* 2002. Ethanol production from raw starch by recombinant yeast having saccharification and fermentation activities. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **77**: 1101-1106.
- Newman *et al.* 2005. Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: the PACT/JCSG+ strategy. *Acta Crystallographica*. **D61**:1426–1431.
- Nielsen & Borchert. 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1543**: 253-274.
- Nigam &Singh. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*. **17**: 770-778.
- Nguyen *et al.* 2007. Full chain energy analysis of fuel ethanol from cassava in Thailand. *Environmental Science and Technology*. **41**(11): 4135-4142.
- Nitsch. 1991. O programa de biocombustíveis Proalcool no contexto da estratégia energética brasileira. *Revista de Economia Política*. **11**(2): 123-138.
- Page. 2003. Shotgun crystallization strategy for structural genomics: an optimized two-tiered crystallization screen against the *Thermatoga maritime* proteome. *Acta Crystallographica*. **D59**: 1028–1037.
- Parachin. 2006. Atividade xilanólítica em *Cryptococcus flavus*: Perfil de xilanases secretadas, Clonagem e Expressão de um dos genes (cfXYN1) em *S. cerevisiae*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.

- Prakash & Jaiswal. 2009. α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **167**(7): 2123-2124.
- Schütz *et al.* 2001. Isolation and spectroscopic characterization of the structural subunits of keyhole limpet hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1546**: 325-336.
- Sidhu *et al.* 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*. **21**(7): 525–530.
- Soares *et al.* 2008. Balanço energético na produção de bioetanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Embrapa*. Circular técnica 23.
- Sultan *et al.* 2006. Tryptophan environment, secondary structure and thermal unfolding of the galactose-specific seed lectin from *Dolichos lablab*: fluorescence and circular dichroism spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1760**: 1001-1008.
- Svensson & Sogaard. 1991. Protein engineering of amylases. *Biochemical Society Transactions*. **20**: 34-42.
- Swain *et al.* 2007. Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Research in Microbiology*. **162**: 93-98.
- Tester *et al.* 2004. Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. **39**: 151-165.
- Uitdehaag *et al.* 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nature Structural & Molecular Biology*. **6**(1999): 432-436.
- Urquiaga *et al.* 2005. Produção de Biocombustíveis – A questão do balanço energético. *Revista de Política Agrícola*. **1**: 42-46.
- Van der Maarel *et al.* Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. **94**: 137-155.

- Ventura & Aragão. 1977. The quenching of the tryptophyl fluorescence of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor by iodide and cesium ions – Effect of adjacent ionizable groups. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **49**(2): 329-336.
- Wanderley *et al.* 2004. Biochemical characterization of α -amylase from de yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*. **231**: 165-169.
- Zeeman *et al.* 2010. Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **61**: 209-234.