



**Universidade de Brasília**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PPG – BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

Produção de quimosina bovina em *Komagataella phaffii* a partir de sistemas de expressão constitutivo

Roberta Ferreira Barros

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Brasília, agosto de 2025

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade

# Produção de quimosina bovina em *Komagataella phaffii* a partir de sistemas de expressão constitutivo

Roberta Ferreira Barros

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

*Tese de doutorado apresentada ao departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biodiversidade.*

Brasília

2025

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Fernando Araripe Gonçalves Torres com apoio financeiro do CNPq e da empresa BIOTECH Fermentos.

### **Banca Examinadora**

Fernando Araripe Gonçalves Torres  
*Presidente da Banca*

Andréa Queiroz Maranhão  
*Membro Titular da Banca*

João Ricardo Moreira de Almeida  
*Membro Titular da Banca*

Spartaco Astolfi Filho  
*Membro Titular da Banca*

Marcelo de Macedo Brígido  
*Membro Suplente*

*“Acreditou no valor dos distintivos  
Sonhou com prêmio inventados  
Quanto suor, quantas renúncias,  
quantas ausências recompensadas  
com carimbos prateados  
E outro dia, outro lugar  
Seus triunfos eram letras misturadas  
E só.”*

Tamara Klink

*Dedico este trabalho a todas aquelas pessoas  
que acreditaram em mim e que me deram  
forças para alcançar minha meta. Em especial  
aos meus pais por toda a entrega e dedicação  
para minha formação, e ao meu companheiro  
de vida por me incentivar e apoiar durante os  
anos de doutorado.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais Márcia e Roberto, e ao meu companheiro Marcos por me apoiarem e me incentivarem, principalmente durante a pandemia e nos momentos mais difíceis que se apresentaram depois, dando as condições para que eu concluísse o doutorado, e sem nunca duvidarem da minha capacidade.

Agradeço ao meu orientador professor Fernando por sempre conseguir extrair o melhor do meu trabalho, transformando minha miscelânea de dados e ideias em um artigo coeso e de qualidade.

À professora Janice que me ensinou sobre purificação de proteínas e corou muitos géis de poliacrilamida comigo, à professora Lídia que me ensinou a cultivar leveduras, me ajudou a batizar minhas linhagens e a interpretar os dados, e à Luiza que vem me ensinando tanto desde os meus anos de mestrado e especialmente por ter segurado as pontas na reta final do meu doutorado, quando eu já não tinha mais forças para prosseguir.

Às minhas amigas Simone, Amanda, Rachel e todas as mulheres do Ateliê Texturas, do Tecendo Histórias, Linhas da Resistência e Manto pelo carinho, escuta compassiva e por serem inspiração de vida para mim.

Aos amigos do saudoso LAB 2 pelas boas conversas, pelos momentos de distração e ajuda nos perrengues de laboratório.

A todos os professores que participaram da minha formação.

À empresa UNIBIOTECH – Biotech Brasil Fermentos e Coagulantes por acreditar nesse projeto, especialmente ao Clodoaldo pela doação de enzimas e ajuda em questões metodológicas.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e paciência para a correção do meu trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“E a gente, enfim, é grande sem medida.”*

Tamara Klink

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	3
<b>Coagulação enzimática do leite</b> .....	3
<b>Quimosina bovina.</b> .....	5
<b>Produção de quimosina bovina recombinante</b> .....	8
<b><i>Komagataella phaffii</i></b> .....	13
HIPÓTESE .....	19
OBJETIVOS.....	19
Objetivos gerais.....	19
Objetivos específicos .....	19
METODOLOGIA .....	20
MATERIAIS:.....	20
METODOLOGIAS.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÕES .....	60
BIBLIOGRAFIA .....	61
ANEXOS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da organização das caseínas do leite em micelas e submicelas. ....	4
Figura 2. Esquema da estrutura da kappa-caseína do leite bovino.. ....	4
Figura 3. Esquema da estrutura linear da pré-pró-quimosina bovina. ....	6
Figura 4. Quimosina bovina .....	7
Figura 5. Gel de eletroforese de dna para análise de restrição dos vetores de expressão com gene CHYMB.....	34
Figura 6. Representação esquemática do vetor utilizado para expressar a quimosina em <i>K. phaffii</i> .....	34
Figura 7. Isolados de transformantes <i>K. phaffii</i> em placas. ....	35
Figura 8. Análise de proteólise em meio MD com leite. ....	36
Figura 9. SDS PAGE 12% corado com prata para identificação da presença de quimosina no sobrenadante de clones $\gamma$ KPC.....	37
Figura 10. SDS PAGE 12% corado com comassie para identificação de pró-quimosina no sobrenadante.. .....	38
Figura 11. Perfil da cromatografia de exclusão. ....	39
Figura 12. SDS PAGE 12% corado com para para análise da purificação da quimosina. ....	40
Figura 13. SDS PAGE 12% corado com comassie para comparação da pureza de amostras de quimosinas comerciais e a quimosina produzida por <i>K. phaffii</i> purificada.....	41
Figura 14. Sequência de aminoácidos da pró-quimosina b bovina.....	42
Figura 15. SDS PAGE 12% corado com comassie para análise do estado de deglicosilação da quimosina recombinante. ....	43
Figura 16. SDS PAGE 12% corado com comassie para análise da atividade específica da quimosina para o substrato kappa-caseína. ....	44
Figura 17. SDS PAGE 12% para análise da ação da quimosina sobre diferentes substratos.. ....	45
Figura 18 termoestabilidade de quimosina recombinante produzida por <i>K. phaffii</i> . ....	46
Figura 19. Sequência de aminoácidos da pró-quimosina. ....	47
Figura 21. SDS PAGE 12% corado com comassei mostrando a presença de quimosina no sobrenadante de $\gamma$ KGC 6, $\gamma$ KTC 31 E $\gamma$ KPC 17 com cultivo a 25 °C em meio YPG.....	50
Figura 22. Cinética de produção de quimosina pelas linhagens YKPC 17, YKGC 6 e YKTC 31 cultivadas a 25°C em meio YPG. ....	52
Figura 23. Rendimento da produção de quimosina para as linhagens $\gamma$ KTC 31, $\gamma$ PGC 6 e $\gamma$ KPC 17 com cultivo em frasco em meio YPG e temperatura de incubação 25°C . ....	53
Figura 27. Produtividade média das linhagens $\gamma$ KPC 17, $\gamma$ KGC 6 e $\gamma$ KTC 31 na temperatura de cultivo de 28 °C.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tipos de quimosina comercialmente disponíveis no mercado.....	8
tabela 2 Enzimas de restrição .....	20
tabela 3 Vetores de expressão.....	21
tabela 4 Primers utilizados.....	21

## RESUMO

*K. phaffii* (*Pichia pastoris*) é considerada uma das plataformas de expressão mais importantes no contexto da biotecnologia industrial devido à sua capacidade de produzir proteínas recombinantes solúveis e em níveis elevados quando comparada a outros sistemas eucarióticos. Os altos níveis de expressão são normalmente atingidos utilizando-se o promotor induzível  $P_{AOX1}$ , dependente de metanol, um composto tóxico e inflamável. A quimosina bovina é uma protease de interesse comercial na indústria alimentícia sendo utilizada na coagulação do leite para fabricação de queijos. Comercialmente, esta enzima é produzida por expressão heteróloga na levedura *Kluyveromyces lactis* e no fungo filamentoso *Aspergillus niger*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma alternativa nacional para a produção industrial de quimosina bovina utilizando a em *K. phaffii* e com o controle da produção baseado nos promotores constitutivos  $P_{PGK}$ ,  $P_{GAP}$  e  $P_{TEF}$ , eliminando a necessidade da adição de metanol. O gene da pró-quimosina B foi clonado em vetores contendo um dos 3 diferentes promotores constitutivos descritos acima, o fator de secreção alfa e o gene de resistência a kanamicina, kanR. Clones de levedura transformantes e secretores de quimosina foram selecionados pela formação de halos de hidrólise em placas contendo meio mínimo YNB e leite. A produção de quimosina pelo promotor  $P_{PGK}$  foi confirmada em gel de poliacrilamida pela presença de uma banda de 40 kDa, identificada como a pró-quimosina que, após ativação em pH ácido, foi processada em sua forma madura (36 kDa). Para os clones contendo os promotores  $P_{GAP}$  e  $P_{TEF}$ , a temperatura de cultivo precisou ser otimizada para a produção da enzima. As atividades de coagulação observadas em todos os clones testados superaram aqueles observados em trabalhos anteriores envolvendo o uso dos promotores  $P_{AOX1}$  e  $P_{GAP}$ . Um maior número de cópias do gene de interesse não resultou em maiores atividades de coagulação. A quimosina secretada pela *K. phaffii* foi purificada em uma única etapa de cromatografia de exclusão molecular, o que resultou na obtenção de 670 mg/L de quimosina. A enzima recombinante apresentou as mesmas características das quimosinas comerciais no que se refere à especificidade ao substrato e termoestabilidade, mostrando-se, assim, como uma alternativa promissora para sua produção industrial.

## ABSTRACT

*K. phaffii* (*Pichia pastoris*) is considered one of the most important expression platforms in industrial biotechnology due to its ability to produce soluble recombinant proteins at high levels compared to other eukaryotic systems. High expression levels are typically achieved using the inducible  $p_{AOX1}$  promoter, which is dependent on methanol, a toxic and flammable compound. Bovine chymosin is a protease of commercial interest in the food industry, used in milk coagulation for cheese production. Commercially, this enzyme is produced by heterologous expression in the yeast *Kluyveromyces lactis* and the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The objective of this work was to develop a national alternative for the industrial production of bovine chymosin using *K. phaffii* and with production control based on the constitutive promoters  $p_{PGK}$ ,  $p_{GAP}$ , and  $p_{TEF}$ , eliminating the need for methanol. The prochymosin B gene was cloned into vectors containing one of the three different constitutive promoters described above: the secretion factor alpha and the kanamycin resistance gene, *kanR*. Transformant and chymosin-secreting yeast clones were selected by the formation of hydrolysis halos on plates containing YNB minimal medium and milk. Chymosin production by the  $p_{PGK}$  promoter was confirmed on polyacrylamide gels by the presence of a 40-kDa band, identified as prochymosin, which, after activation at acidic pH, was processed into its mature form (36 kDa). For clones containing the  $p_{GAP}$  and  $p_{TEF}$  promoters, the culture temperature needed to be optimized for enzyme production. The coagulation activities observed in all clones exceeded those observed in previous studies using the  $p_{AOX1}$  and  $p_{GAP}$  promoters. A higher copy number of the gene of interest did not result in greater coagulation activities. The chymosin secreted by *K. phaffii* was purified in a single-step size exclusion chromatography, resulting in 670 mg/L of chymosin. The recombinant enzyme exhibited the same characteristics as commercial chymosins in terms of substrate specificity and thermostability, thus proving to be a promising alternative for industrial production.

## INTRODUÇÃO

A coagulação enzimática do leite com o uso de quimosina é um dos métodos mais utilizados para a produção de vários tipos de queijo. É a adição desta enzima que promove a precipitação do complexo de caseínas, causando a separação do leite em duas fases: coágulo e soro. O coágulo obtido é a porção que será drenada, colocada em formas e prensada para a fabricação do queijo, portando a etapa de coagulação é determinante na qualidade e no rendimento da produção (Johnson, M E & Lucey, J A, 2006).

A quimosina tem uma ação marcadamente diferente das outras proteases gástricas aspárticas, pois enquanto estas apresentam ampla atividade proteolítica, e processam com eficiência todas as proteínas no lúmen gástrico, a quimosina é específica para a caseína do leite, apresentando baixa atividade proteolítica para outras proteínas. Essa especificidade restrita na capacidade de proporcionar uma alta atividade de coagulação do leite, tornou a quimosina uma enzima muito importante para a indústria de queijo (Foltmann, 1992).

Hoje, aproximadamente 80% dos queijos fabricados no mundo são feitos a partir de enzimas produzidas por microrganismos. Entre elas, temos as enzimas proteolíticas nativas de fungos ou bactérias, mas principalmente as quimosinas recombinantes (Liu, X. et al, 2021).

A produção de quimosina bovina recombinante, ou seja, a partir da expressão heteróloga em organismos geneticamente modificados, apresenta-se como uma alternativa ética e de alta qualidade para a indústria do queijo. Entre os organismos usados como células hospedeiras, bactérias e fungos destacam-se no emprego de tecnologias do DNA recombinante para a síntese de proteínas. Atualmente, as quimosinas recombinantes disponíveis no mercado são produzidas principalmente pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* e a levedura *Kluyveromyces lactis*.

A levedura *Komagataella phaffii* pode ser uma excelente alternativa para a produção da quimosina recombinante, pois une os benefícios de um sistema de expressão eucarioto, como secreção eficiente e modificações pós-traducionais, com as propriedades de crescimento desejáveis de organismos unicelulares, além de já possuir o *status GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) para uso na produção de alimentos e produtos farmacêuticos (Joan Lin, C. & James, M. C., 2000) (Thompson, 2010).

O Brasil é, ainda hoje, um país essencialmente importador de quimosina, por isso o presente projeto de pesquisa de doutorado tem como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma de expressão heteróloga baseada em microrganismos modificados geneticamente para produzir esta enzima de forma recombinante. Esse objetivo geral envolve construir três linhagens de levedura *K. phaffii* produtora de quimosina, de expressão constitutiva a partir dos promotores  $P_{PGK}$ ,  $P_{GAP}$  e  $P_{TEF}$ , eliminando a necessidade de metanol, comparar a produção entre os diferentes promotores e purificar a enzima.

# REVISÃO DA LITERATURA

## Coagulação enzimática do leite

O leite é um fluido complexo, com diferentes componentes difundidos em três fases: solução, dispersão coloidal e emulsão. Na fase solúvel estão principalmente os minerais, vitaminas, a lactose, proteínas do soro e agregados de caseína pequenos; na fase coloidal encontramos as grandes micelas de caseína de, em média, 140 nm e na fase de emulsão estão principalmente os glóbulos de gordura (Cortez, 2017).

Entre as proteínas do leite, as caseínas apresentam grande importância para a indústria de laticínios na transformação em derivados lácteos, pois as propriedades funcionais, e a maioria das características sensoriais de diversos produtos, dependem das caseínas. Essas proteínas têm uma grande estabilidade a temperaturas elevadas e a condições de desidratação. A própria fabricação do queijo é baseada na coagulação da caseína por ação de enzimas proteolíticas ou por condições de acidez acompanhada de aquecimento (Cortez, 2017).

As caseínas são encontradas formando grandes agregados coloidais e representam aproximadamente 80% do conteúdo total de nitrogênio do leite. Consistem principalmente em quatro frações de polipeptídeos fosforilados:  $\alpha$  s1 (s= sensibilidade ao cálcio),  $\alpha$  s2,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas. Devido a presença do fósforo, as  $\alpha$ -caseínas e  $\beta$ -caseína são capazes de ligarem-se ao cálcio para promover a precipitação (Kumar, A. et al, 2010).

A  $\kappa$ -caseína, por possuir apenas um resíduo fosforilado na molécula, consegue manter-se solúvel mesmo em altas concentrações de cálcio e reage hidrofobicamente com  $\alpha$  e  $\beta$ -caseínas, estabilizando essas frações insolúveis do leite mesmo na presença de cálcio (**Figura 1**). Como a carga negativa da  $\kappa$ -caseína não é proveniente da presença de fosfato, que poderia ser neutralizado pelo cálcio, e sim pela sua alta glicosilação, que origina seu perfil hidrofílico, é possível a organização do complexo de caseínas em micelas (Cortez, 2017).

Por estar na região mais superficial da micela, a  $\kappa$ -caseína é a fração mais suscetível a ação de proteases, principalmente à quimosina. A região sensível localiza-se entre os resíduos de aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106), justamente a região mais externa na molécula de  $\kappa$ -caseína (Foltmann, 1992).

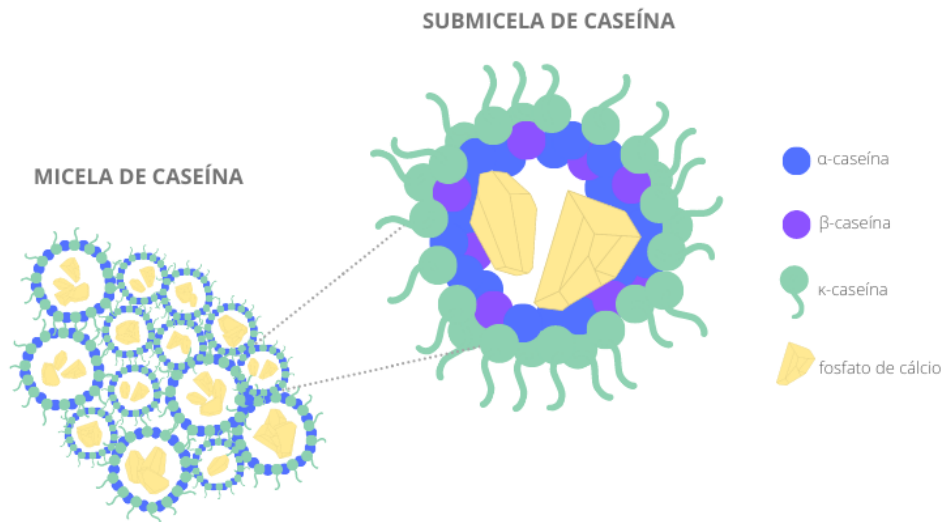


FIGURA 1. ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DAS CASEÍNAS DO LEITE EM MICELAS E SUBMICELAS. As  $\alpha$  e  $\beta$ -caseínas interagem com o cálcio formando o centro hidrofóbico da submicela. A  $\kappa$ -caseína reage hidrofobicamente com o centro da submicela e projeta a porção hidrofílica no ambiente aquoso.

Um terço da molécula da  $\kappa$ -caseína possui uma região iônica C-terminal com três resíduos de oligossacarídeo e o restante da molécula apresenta características hidrofóbicas que corresponde à para- $\kappa$ -caseína, formada após a hidrólise da ligação fenilalanina-metionina, e que será incorporada a massa do queijo. A fração solúvel é altamente hidrofílica, é denominada caseína-macropéptido (CMP) e é retirada junto com o soro formado (**Figura 2**). (Foltmann, 1992).

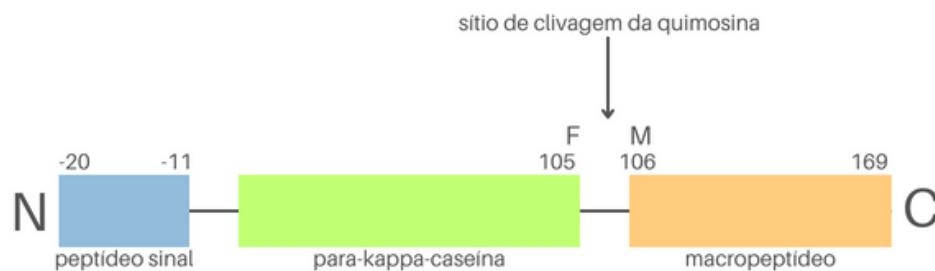


FIGURA 2. ESQUEMA DA ESTRUTURA DA KAPPA-CASEÍNA DO LEITE BOVINO. A quimosina hidrolisa a região C-terminal entre os aminoácidos fenilalanina e metionina originando dois fragmentos, a para- $\kappa$ -caseína insolúvel e o caseína-macropéptido (CMP) solúvel no soro.

A atividade de coagulação é uma indicação da quantidade de quimosina ativa presente na amostra. Na literatura encontramos uma variedade de metodologias para a

quantificação da atividade de coagulação, mas todas se baseiam no método Berridge que consiste em observar a floculação do leite quando incubado com uma amostra contendo quimosina. Neste método, uma unidade de coagulação do leite (U) é definida como a quantidade necessária de enzima para coagular 10 mL de leite desnatado em pó reconstituído, a 30 °C em 100 segundos.

Na literatura científica que trata do tema dois ensaios se destacam: o REMCAT (IDF Standart 157:2007) e o UAC. Ambos são baseados no método Berridge de coagulação do leite, porém diferem entre si em vários aspectos.

Nas duas metodologias encontramos diferenças na concentração de  $\text{CaCl}_2$  presente no substrato, na temperatura de incubação do complexo enzima-substrato, na razão enzima/substrato (E/S) e a unidade final obtida. O ensaio REMCAT, oficialmente aplicado na indústria de laticínios, é o método definido pela Sociedade Internacional de Laticínios e utiliza concentração de  $\text{CaCl}_2$  4,5 vezes menor que no ensaio UAC; a razão  $E/S_{\text{REMCAT}}$  é 0,02 e  $E/S_{\text{UAC}}$  é 0,25; a incubação é feita a 32 °C ao contrário do método UAC em que a temperatura é de 37°C. Essas diferenças fazem com que os valores de UAC sejam superestimados em comparação com o método REMCAT, pois uma maior concentração de cálcio, extrato enzimático e temperatura mais altas aceleram a reação de coagulação.

É importante considerar que a agregação das micelas de caseína só começa a ocorrer quando cerca de 60-80% das  $\kappa$ -caseínas na amostra foram hidrolisadas, ou seja, a reação catalisada pela quimosina, que é a quebra da  $\kappa$ -caseína em para- $\kappa$ -caseína e macropeptídeo, começa a ocorrer muito antes de observarmos qualquer mudança no estado físico do leite (Dalglish, 1995) e, devido a esse motivo, os ensaios de atividade de coagulação atualmente aplicados não permitem a aferição de medidas como a constante de Michaelis ( $K_m$ ), o número e turnover ( $k_{\text{cat}}$ ) e a eficiência catalítica da ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) da quimosina.

### **Quimosina bovina.**

A quimosina (EC 3.4.23.4) é uma hidrolase aspártica com alta atividade específica proteolítica sobre a  $\kappa$ -caseína do leite, mas baixa atividade inespecífica para a quebra das caseínas  $\alpha$  e  $\beta$ . No processo de coagulação do leite para a fabricação de queijo, o coágulo resultante da precipitação das porções hidrofóbicas do complexo de caseínas não continua

sendo degradado, uma vez que a quimosina tem uma baixa atividade proteolítica; este fato garante um alto rendimento do coágulo e reduz a possibilidade de formação de peptídeos de baixo peso molecular que dão sabor amargo indesejável ao queijo (Beppu, 1983).

A enzima é sintetizada na forma de pré-pró-quimosina e secretada pelo tecido da mucosa do quarto estômago (abomaso) de bezerros como uma enzima precursora (zimogênio) chamada pró-quimosina, também conhecida como pró-renina, que contém 365 resíduos de aminoácidos e tem peso molecular de cerca de 41 kDa (**Figura 3**). A porção N-terminal do peptídeo, de 42 resíduos de aminoácidos, sofre autocatálise em pH menor que 5,0, quando é clivado originando a forma ativa da enzima com 35.6 kDa (Beppu, 1983).

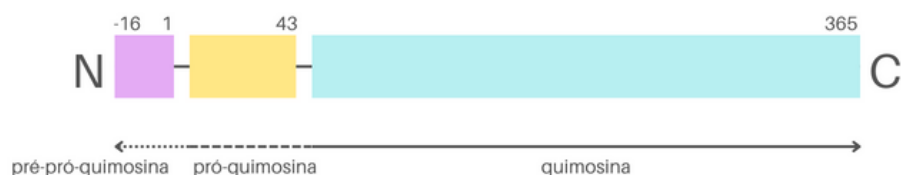


FIGURA 3. ESQUEMA DA ESTRUTURA LINEAR DA PRÉ-PRÓ-QUIMOSINA BOVINA.

A quimosina bovina é uma proteína bilobular formada por 9 alfa-hélices e 29 folhas-beta (**Figura 4**). Possui em sua estrutura 3 ligações dissulfeto: Cys45-Cys50, Cys206-Cys210 e Cys250-Cys283, sendo a última indispensável para o dobramento correto da proteína. O sítio catalítico é conservado no grupo das aspartil-proteases, sendo constituído pelos resíduos Asp34 e Asp216, orientados um de frente para o outro (Kumar, A. et al, 2010).

Na renina são encontrados dois tipos de quimosina: a quimosina A e a quimosina B. A diferença entre as duas enzimas está em apenas um aminoácido na região 244. Enquanto a quimosina A possui um resíduo de aspartato nessa região, que lhe confere uma alta afinidade com a caseína, a quimosina B possui uma glicina que proporciona uma estabilidade maior da enzima em pH ácido (Foltmann, 1992).



**FIGURA 4. QUIMOSINA BOVINA.** Proteína de cadeia única que assume forma bilobular em sua estrutura terciária mantida por ligações de hidrogênio e três ligações dissulfeto. É principalmente constituída de folhas beta-pregueada e poucas alfa-hélices. Cada lóbulo contribui com um resíduo de ácido aspártico para o aparato catalítico (Asp34 e Asp216). Fonte: WWPDB (JENSEN, L ET AL, 2013).

Na primeira etapa do processo catalítico mediado pela quimosina deve ocorrer a interação do sítio catalítico da enzima com uma molécula de água. O resíduo Asp34 é capaz de desprotonar a água que, ao se tornar eletronegativa, faz um ataque nucleofílico sobre o carbono da ligação peptídica da  $\kappa$ -caseína, buscando a estabilização. O resíduo Asp216 da quimosina doa um próton para o oxigênio da carbonila da ligação peptídica da  $\kappa$ -caseína, e o resíduo Asp34 doa um próton para o nitrogênio da ligação peptídica, promovendo a quebra na região Phe105 e Met106 (Theron, 2013).

Tradicionalmente, a quimosina bovina era extraída do abomaso de bezerros, pois é a principal protease aspártica secretada em ruminantes recém-nascidos. A quimosina está intimamente relacionada com a pepsina A (EC 3.4.23.1) que predomina nos mamíferos adultos (Kumar, A. et al, 2010).

Uma série de bactérias e fungos têm sido sugeridos como fontes potenciais de substitutos da quimosina: a indústria de laticínios usa amplamente a renina microbiana produzida a partir de fontes fúngicas, especialmente do fungo filamentoso *Rhizomucor miehei*. No entanto, a atividade proteolítica da renina microbiana causa problemas secundários como, por exemplo, dificuldades no endurecimento do coágulo e perda significativa de gordura e proteína para a porção hidrossolúvel, o soro de leite. Conseqüentemente, os rendimentos do queijo são baixos e as peptonas formadas dão ao queijo sabores e odores indesejáveis (Mohanty, A.K., et al, 1999).

Isso acontece porque a relação entre a atividade de coagulação do leite e a atividade proteolítica da quimosina de bezerro é 1,5 vezes maior do que a de qualquer renina microbiana (Mohanty, A.K., et al, 1999). Por isso, a procura e comercialização de quimosina animal, que confere um sabor característico ao queijo, ainda persiste.

A engenharia genética representa um método alternativo para produzir quimosina funcional idêntica à sua contraparte convencional. Esse método de obtenção de quimosina recombinante pode obter o status de geralmente reconhecido como seguro (*GRAS*) (Flamm, 1991), e são apoiados por várias organizações vegetarianas e autoridades religiosas (Kosher e Halal), apresentando-se como uma solução para o fornecimento de enzimas que atendam tanto as demandas da indústria de laticínios, quanto a dos consumidores de queijo. As quimosinas produzidas por fermentação não possuem pepsina bovina, que está sempre presente em níveis variáveis nos coalhos tradicionais de bezerro. Essa ausência ajuda a melhorar o rendimento do queijo, evitando a proteólise excessiva.

A tabela 1 compila as principais quimosinas comercializadas atualmente, com a descrição do tipo (animal, microbiana ou recombinante), de qual organismo vivo provém a produção, e a empresa fabricante.

TABELA 1 TIPOS DE QUIMOSINA COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS NO MERCADO

Nome comercial	Tipo	Organismo produtor	Fabricante
Naturen	Animal	Bezerro	CHR HANSEN
Carlina	Animal	Bezerro	Dupont
Microlant	Microbiana	<i>Rhizomucur miehei</i>	CHR HANSEN
Hannilase	Microbiana	<i>Rhizomucur miehei</i>	CHR HANSEN
Marzyme	Microbiana	<i>Rhizomucur miehei</i>	Dupont
Maxiren	Recombinante FPC	<i>Kluyveromyces lactis</i>	DSM
CHY-MAX	Recombinante FPC	<i>Aspergillus niger</i>	CHR HANSEN

### Produção de quimosina bovina recombinante

A tecnologia do DNA recombinante é uma das inovações mais significativas do século XX e possui papel fundamental na fabricação de produtos farmacêuticos, como no desenvolvimento de vacinas, e também na melhoria da produção agrícola, pecuária e industrial (Tseng, H & Small, H., 2019).

Essa tecnologia refere-se a um conjunto de métodos laboratoriais usados para juntar fragmentos de DNA de várias fontes e propagar os recombinantes resultantes em organismos vivos, como bactérias, fungos, plantas ou células animais.

No centro dessa tecnologia estão quatro componentes: um vetor de DNA, uma enzima que seja capaz de cortar a molécula de DNA, uma enzima que una fragmentos de DNA e um organismo hospedeiro. O vetor de DNA pode ser um plasmídeo ou DNA viral, circular, capaz de manter um organismo hospedeiro e se autorreplicar com o hospedeiro. As enzimas de corte são as endonucleases de restrição capazes para abrir o DNA do vetor, que de circular torna-se linear para permitir a inserção de DNA de outra fonte. A enzima de união, a DNA ligase, é usada para ligar o DNA do vetor e o material genético exógeno, que pode ser um gene de outro ser vivo, recriando uma molécula de DNA circular estável, que deve ser introduzida em um organismo hospedeiro para propagação através da replicação do DNA.

Proteínas recombinantes são produzidas usando essa tecnologia em sistemas hospedeiros de expressão procariótica, como bactérias, ou eucarióticas, utilizando células de mamíferos, leveduras, células de insetos e plantas transgênicas como hospedeiros. Essa produção heteróloga pode ser feita tanto em escala de laboratório, como em ambientes de grande escala.

A aplicação de enzimas pela indústria de alimentos sempre esteve presente na história, e hoje aumenta continuamente com os avanços biotecnológicos empregados nos processos. O potencial biocatalítico dos microrganismos foi aproveitado durante séculos para produzir pão, vinho, vinagre e outros produtos fermentados comuns, sem a compreensão da base bioquímica de seus ingredientes. Hoje, o uso de enzimas para a fabricação de alimentos e bebidas representa uma grande parte do mercado de enzimas industriais (Singh, R. et al, 2016) (Deckers, M. et al, 2020).

As enzimas são obtidas principalmente por fermentação microbiana, para a qual são utilizadas cepas de tipo selvagem (WT) ou geneticamente modificadas. O rendimento da produção de enzimas alimentícias pode ser aumentado otimizando-se o processo de fermentação, com o uso de linhagens melhoradas ou com a produção recombinante de enzimas (Deckers, M. et al, 2020).

A produção e o uso de enzimas alimentares são regulamentados por três órgãos principais: a JECFA, um comitê conjunto de especialistas em aditivos alimentares da

FAO/ONU (*Food and Agriculture Organization*) com a OMS (Organização Mundial da Saúde); a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA); e a FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos da América. A regulamentação nos EUA segue uma abordagem amplamente orientada para o produto, enquanto a União Europeia enfatiza os processos de produção. Ambos os sistemas possuem e desenvolvem listas de enzimas aprovadas para facilitar o comércio e, ao mesmo tempo, proteger a saúde e o bem-estar do consumidor (Kocabas, D. & Grumet, R., 2019).

No Brasil, a Anvisa é órgão que estabelece quais são os aditivos e os coadjuvantes de tecnologia permitidos para as diferentes categorias de alimentos sem oferecer risco à saúde humana. As normas são fundamentadas em critérios restritos apoiados em regulamentações e sugestões emitidas a nível mundial pelo comitê de especialistas da OMS e FAO.

Em 1990 foi aprovado o primeiro ingrediente alimentar feito por meio de tecnologia de DNA recombinante: a quimosina bovina produzida por bactéria. Em 1987 a FDA recebeu a solicitação para confirmação de status *GRAS* da preparação de quimosina derivada de *Escherichia coli* K-12. Após revisar as informações na petição e na literatura publicada, ficou concluído que o principal componente ativo dessa preparação de quimosina era idêntico ao presente na renina extraída do abomaso de bezerros, e que as impurezas não tornavam a substância insegura para o uso pretendido (Flamm, 1991).

A bactéria Gram negativa *E. coli* é um dos microrganismos mais bem estudados e é comumente usada na expressão de proteínas heterólogas. As vantagens de usá-la como organismo hospedeiro são bem conhecidas: possui uma cinética de rápido crescimento, culturas de alta densidade celular são facilmente alcançadas, os meios de cultura ricos e complexos podem ser feitos a partir de componentes prontamente disponíveis e baratos, e a transformação com DNA exógeno é rápida e de metodologia simples. (Rosano, Germán L. & Ceccarelli, E, 2014).

No entanto, a produção de quimosina bovina pela *E. coli* se dá apenas intracelularmente, pois a proteína acumula-se no citoplasma na forma de corpos de inclusão (Menzella, Hugo G. et al., 2003) (McCaman, 1989) (Schoemaker, J. M. et al., 1985). Esse fato pode ser considerado uma desvantagem, já que exige etapas a mais na sua obtenção pela necessidade de purificação dos corpos de inclusão, de extração e

renaturação da proteína, com considerável perda de rendimento ao longo destes processos (Chen, H. et al., 2000).

No pedido de status *GRAS* da quimosina bovina produzida por *E. coli* K-12, o fato de a pró-quimosina se agregar no citoplasma na forma de corpos de inclusão foi considerado vantajoso, pois nessas estruturas elas ficam isoladas de outros componentes bacterianos e, portanto, os possíveis contaminantes na preparação seriam apenas os químicos usados na extração e renaturação da proteína, que já possuem aprovação como aditivos alimentícios (Flamm, 1991).

Essa organização da pró-quimosina em corpos de inclusão ocorre logo no início da fase exponencial de crescimento bacteriano e se torna mais intensa quando a síntese da proteína é controlada por um promotor de transcrição forte (Kapralek. F. et al, 1991). Os corpos de inclusão são compostos por polímeros de moléculas de pró-quimosina que se interligam parcialmente por ligações dissulfeto, mas também é possível encontrar neles uma grande concentração de pró-quimosina na forma reduzida (Schoemaker, J.M., et al, 1985).

O processo de redobramento (renaturação) da pró-quimosina extraída dos corpos de inclusão purificados consiste, tradicionalmente, em dois estágios: i) a formação e o rearranjo das ligações dissulfeto nativas em pH 11,0, e ii) a formação e o ajuste da estrutura terciária, que leva à conformação nativa, em pH 8,0. O rearranjo das ligações dissulfeto, que é a etapa de limitação da taxa durante o redobramento, pode ser alcançado por troca tiol/dissulfeto iniciada por grupos tiol livres presentes no próprio polipeptídeo de pró-quimosina, por adição de GSH / GSSG ou proteína dissulfeto isomerase. (Wei, C. et al, 1999)

O redobramento pode ser alcançado com apenas um estágio em pH 8,0 na presença do complexo chaperonina GroE ou da proteína dissulfeto isomerase (PDI) sobre a pró-quimosina. O efeito auxiliar varia com os estados de oxidação da pró-quimosina (Wei, C. et al, 2000).

Fica claro que a produção extracelular de proteínas recombinantes acaba sendo mais desejável por reduzir a complexidade de processos e melhorar a qualidade do produto. Porém o uso da bactéria *E. coli* como organismo produtor de enzimas apresenta a desvantagem da falta de sistemas de secreção que transportem de maneira eficiente algumas proteínas no meio de cultura. No caso da produção de quimosina há também a

limitada habilidade de formar ligações dissulfeto extensivamente, devido ao ambiente redutor citoplasmático da bactéria (Kaur, J., et al, 2018).

Os fungos são considerados excelentes biofábricas para a produção de enzimas, tanto nativas quanto recombinantes, devido à alta capacidade de sintetizar e secretar proteínas com processamentos pós-traducionais típicos de eucariotos.

Como exemplo das proteases nativas usadas na coagulação do queijo temos aquelas produzidas pelos fungos *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* e *Cryphonectria parasitica*. As enzimas “tipo quimosina” produzidas por esses fungos filamentosos possuem uma atividade proteolítica mais ampla que a quimosina bovina, e a consequência disso se dá em alterações na textura e nas características organolépticas dos queijos produzidos (Ogel, 2018).

Uma importante vantagem dos fungos, em relação a outras plataformas de expressão heteróloga, é que muitas linhagens desenvolvidas para a produção de enzimas possuem o *status GRAS*, o que as tornam próprias para o uso na indústria de alimentos e de medicamentos. Alguns exemplos de fungos filamentosos com esse *status* são: *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *Trichoderma reesei* (Kluge, J. et al, 2018).

Foi principalmente o fato de serem capazes de produzir grandes quantidades de proteínas com modificações pós-traducionais que tornou os fungos filamentosos atrativos na produção de enzimas para aplicação a nível industrial. Uma das primeiras abordagens nessa direção foi justamente a síntese de quimosina bovina em *A. niger* var. *awamori* para a indústria de laticínios (Archer, 2000) (Dunn-Coleman, N. et al , 1991).

De acordo com a **Tabela 1** é possível constatar que *A. niger* continua sendo, desde 1991, o principal fungo filamentoso utilizado como sistema de produção de quimosina a nível industrial. Os pesquisadores têm se esforçado em tornar *A. oryzae* também em um produtor de quimosina, porém, apesar de sua considerável importância comercial, a produção e secreção de proteínas recombinantes pelo fungo ainda possui numerosos gargalos envolvendo os processos de transcrição, tradução, dobramento de proteínas, translocação, secreção, entre outros (Feng-Jie, J. et al, 2021).

A biotecnologia obtém considerável sucesso na adaptação dos protocolos de bancada laboratoriais, que são realizados em volumes e rendimento baixos, para a produção industrial, transformando células em verdadeiras fábricas automatizadas de alto

rendimento. Essas adaptações ainda encontram certos limitantes e, por isso, os avanços têm sido mais lentos na fermentação com fungos filamentosos. Algumas características que dificultam, embora não impossibilitem a cultura em nível industrial, incluem: colônias semeadas maiores e mais espalhadas que podem produzir esporos que se espalham pelo ar, o que dificulta a coleta; crescimento não homogêneo em meio líquido devido à formação dos micélios que podem dificultar o manuseio; e o potencial para heterocárions (células multinucleadas) (Rothschild-Mancinelli, K. et al, 2020).

Os sistemas de produção em leveduras mostram-se promissores para a produção biotecnológica de proteínas, inclusive aquelas de mamíferos e com importância farmacêutica. As leveduras hospedeiras mais comuns são *Saccharomyces cerevisiae*, *K. phaffii* e *K. lactis*. As três leveduras podem ser utilizadas para a produção de aditivos alimentares, pois possuem o *status* GRAS (Kluge, J. et al, 2018).

Em *S. cerevisiae* não foi possível detectar qualquer secreção de polipeptídeos de quimosina por esferoplastos nem por células inteiras. Uma fração dos polipeptídeos de quimosina em células inteiras fica associada à parede celular (J Mellor et al 1983). Cerca de 80% da pró-quimosina na cepa de levedura CGY461 não ficou solúvel no citoplasma, fenômeno semelhante à presença de corpos de inclusão insolúveis em células de *E. coli* (Goff et al 1984).

As cepas de produção de *K. lactis* são usadas pela empresa DSM para produzir uma variedade de enzimas como a lactase, a quimosina e esterase. Esta linhagem foi adquirida pela Gist-Brocades, que é atualmente a DSM, em 1996 (van den Dungen, M.W. et al., 2021).

### ***Komagataella phaffii***

A levedura metilotrófica *K. phaffii*, anteriormente conhecida como *Pichia pastoris*, foi introduzida há mais de 40 anos pela *Phillips Petroleum* para produção comercial de SCP (*single cell protein*), como aditivo na alimentação animal, devido ao seu processo fermentativo em alta densidade celular, utilizando o metanol como fonte de carbono (Cregg, J. M., et al, 1985).

Com a crise do petróleo nos anos 80, e o aumento drástico nos preços do metanol, a aplicação da levedura para alimentação tornou-se inviável. A empresa *Phillips*

*Petroleum* então iniciou uma parceria com a SIBIA (*Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates*) para estabelecimento da *K. phaffii* como uma plataforma de expressão de proteína heteróloga a partir do desenvolvimento de vetores, linhagens e técnicas de manipulação genética da levedura.

Em 1993 a *Research Corporation Technologies* adquiriu as patentes originais e materiais relacionados, incluindo as cepas e os vetores da *Pichia Expression* da *Philips Petroleum*, e a empresa Life Technologies licencia o uso de suas linhagens e vetores para pesquisa e atividades comerciais.

Atualmente, a patente concedida para a *Research Corporation Technologies* (USA Patente N° US4414329A, 1981) que protegia as linhagens NRRL Y-11431 e NRRL Y-11430, a patente de uso da linhagem X-33 (*his4::HIS4*), está expirada, e seu uso para desenvolvimento de inovações não é mais restrito.

*K. phaffii* é uma levedura da classe *Saccharomycetes* do filo *Ascomycota*, possui 4 cromossomos com aproximadamente 5200 sequências codificadoras, sendo uma levedura preferencialmente haploide que se propaga principalmente por mitose, mesmo em condições de escassez de fontes de nitrogênio e carbono (Ata, O. et al , 2021).

A levedura une os benefícios de um sistema de expressão eucarioto, como secreção eficiente e modificações pós-traducionais (glicosilação e formação de ligações dissulfeto), com as propriedades de crescimento desejáveis de organismos unicelulares robustos, crescendo rapidamente em meio mínimo, além de não produzirem endotoxinas intrínsecas ou DNA viral (Joan Lin, C. & James, M. C., 2000). Uma grande vantagem da *K. phaffii* é sua classificação como uma linhagem GRAS pela FDA liberada para aplicação na indústria de alimentos (Thompson, 2010).

Em relação a *S. cerevisiae*, *K. phaffii* se destaca como uma melhor alternativa para a produção de proteínas heterólogas, pois dá preferência ao metabolismo respiratório, muito embora algumas publicações já tenham observado que a produção de proteína pode aumentar quando a cultura é submetida à condições de hipóxia (Gasset, A. et al, 2022); *K. phaffii* consegue manter a produção em alta densidade celular e, além de não hiperglicosilar proteínas como *S. cerevisiae*, existem linhagens de *K. phaffii* metabolicamente modificadas para sintetizar proteínas recombinantes com um padrão de glicosilação semelhante à proteínas humanas (Ergün, B.G. et al, 2021).

Diferentemente da *S. cerevisiae*, o complexo de Golgi de *K. phaffii* não é espalhado pelo citoplasma, mas sim organizado em pilhas possuindo uma matriz circunvizinha de cisternas, fenestrações e extensões tubulares, como acontece em células de mamífero (Ata, O. et al, 2021).

Uma das maiores vantagens na utilização da *K. phaffii* para a produção de proteínas recombinantes, em comparação a outras leveduras, é que ela secreta comparativamente muito menos proteínas nativas que suas concorrentes principais, *Yarrowia lipolytica*, *K. lactis*, e a própria *S. cerevisiae*. Isso pode facilitar bastante o processamento *downstream* reduzindo consideravelmente os custos (Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J. et al., 2009).

Devido a todas essas vantagens, *K. phaffii* já foi aplicada na produção de mais de 5000 proteínas recombinantes, incluindo biofarmacêuticos e enzimas industriais (Arnau, Gasset, et al., 2022). Hoje ela é a plataforma mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes, depois de *E. coli* (Ergün, B.G. et al, 2021).

*K. phaffii* tem sido testada para a produção de proteínas animais por fermentação para serem usadas na alimentação humana. Alguns avanços nessa direção são a síntese e secreção de  $\alpha$ -lactoalbumina (Deng, M. et al, 2022), a proteína mais abundante do soro de leite humano, e a mioglobina suína (Zhang, B. et al, 2022). Este tipo de estudo, além de estabelecer as bases para a simulação de alimentos fabricados por bioengenharia, também reafirmam a vocação de *K. phaffii* como produtora de proteínas e enzimas recombinantes de mamíferos.

Para a realização de todas essas pesquisas foi necessário um extenso trabalho anterior de construção de ferramentas genéticas variadas para a expressão de proteínas na levedura. É possível controlar a transcrição de genes de interesse através de promotores relacionados ao metabolismo de metanol, sendo o P<sub>AOX1</sub> o promotor induzível mais utilizado, como também a utilização de promotores constitutivos para se obter grandes quantidades de proteína recombinante.

Os promotores induzíveis por metanol ainda são usados em *K. phaffii* devido à sua regulação assente e por levar a uma transcrição bastante eficiente do gene de interesse. No entanto, o metanol é tóxico para a própria levedura e sua utilização como indutor exige que o microrganismo seja antes cultivado em uma fonte de carbono diferente, como glicose ou glicerol, até atingir um volume de biomassa adequado para a indução posterior.

O metanol também é tóxico para humanos e inflamável, e seu uso em grandes volumes pode ser um risco de segurança considerável, logo, não pode ser utilizado em muitas plantas de fermentação (Vogl, T. et al, 2017).

Além disso, o uso do metanol como fonte de carbono indutora leva a secreção de diversas outras proteínas no meio de cultura, prejudicando a fase de purificação (Chung-Jr Huang et al, 2011). Devido a essas importantes desvantagens, o uso do promotor  $P_{AOX1}$  para a produção de produtos alimentícios não é o mais adequado.

O uso de promotores constitutivos na fermentação simplifica o manejo, eliminando o uso de indutores potencialmente perigosos, e providencia a transcrição contínua do gene de interesse (Cankorur-Cetinkaya, A. et al., 2018).

Promotores constitutivamente expressos, como aqueles que controlam a expressão de genes *housekeeping* ou do metabolismo energético, possuem elementos nas regiões *upstream* que são reconhecidos por serem ativadores ubíquos. Em comparação, os promotores que precisam ser induzidos possuem elementos ativadores específicos (Scott D.Pope & Ruslan Medzhitov, 2018).

O promotor constitutivo mais aplicado em *K. phaffii* é o  $P_{GAP}$  que controla a transcrição do gene codificador da enzima da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAP). Waterham *et al.* (1997) caracterizaram o gene de *K. phaffii* e mostraram que com o uso deste promotor a produção de proteína heteróloga consegue atingir níveis semelhantes aos do  $P_{AOX1}$ .

O promotor  $P_{GAP}$  que codifica para a enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é ativo continuamente em várias fontes de carbono, incluindo glicose, glicerol, etanol e ácido oleico (Juturu, V. & Wu, J. C., 2018) e é possível observar um nível de indução deste promotor quando a fonte de carbono utilizada é glicose (Vogl, T. & Glieder, A., 2013). Os níveis de mRNA de *GAP* foram maiores nas células crescidas com glicose e diminuíram aproximadamente dois terços em glicerol, para metade em ácido oleico e um terço em metanol (Waterham, H. R. et al, 1997).

O suprimento de oxigênio também mostrou afetar a produção de proteína heteróloga dirigida por  $P_{GAP}$ . Em hipóxia, a atividade específica de três diferentes proteínas heterólogas testadas foi aumentada significativamente, enquanto o tempo de produção foi diminuído. Nestes experimentos foi observado que o metabolismo de *K.*

*phaffii* altera-se de respiratório para fermentativo, indicando que condições hipóxicas levam a uma regulação positiva da transcrição de genes da glicólise, como o *GAP* (Baumann, K, et al, 2008) (Gasset, A. et al, 2022).

O uso desse promotor não requer a adição de metanol, portanto não se faz necessária a troca de fonte de carbono durante a fase de crescimento e produção de proteína. Essa característica facilita a implementação do cultivo e se apresenta como uma opção para a execução em cultivo contínuo (Vassileva A, et al, 2000).

Recentemente, novos promotores constitutivos têm sido desenvolvidos e estudados para *K. phaffii* como alternativa ao  $P_{GAP}$ , como o promissor  $P_{TEF1}$  ( fator 1- $\alpha$  de alongação) que já foi estudado em vários fungos, como *Ashbya gossypii*, *Aspergillus oryzae* e *Yarrowia lipolytica*, e apresentou uma expressão constitutiva forte, adequada para a produção de proteínas heterólogas (Vogl, T. & Glieder, A., 2013) O fator 1- $\alpha$  de alongação é um componente crucial da maquinaria de tradução em eucariotos, fazendo a mediação da entrega de aminoacil tRNA ao ribossomo para manter a alongação da cadeia de peptídeos (Proud, 1994).

Em relação aos níveis de expressão para  $P_{TEF1}$ , foi observada forte atividade promotora capaz de produzir proteínas recombinantes em níveis semelhantes ou até mesmo superiores aos produzidos pelo  $P_{GAP}$  e uma atividade promotora mais forte em sistema alimentado em batelada com limitação de carbono (Ahn, J, et al, 2007).

Em trabalhos onde o  $P_{TEF1}$  foi utilizado como promotor da expressão foi observado que ele demonstra características de produção de proteína mais estreitamente associadas ao crescimento da levedura, com uma alta produção na fase de crescimento exponencial, e sua posterior diminuição na interfase. (KR Patente N° WO/2007/058407, 2008) (Ahn, J, et al, 2007).

O promotor  $P_{TEF1}$  de *K. phaffii* já foi usado para expressão de CALB e eGFP com diferentes peptídeos sinais (Liang *et al*, 2013), lipase de *Bacillus stearothermophilus* (Ahn, J, et al, 2007), anticorpo humano Fab-3H6 (Cankorur-Cetinkaya, A. et al., 2018) e HSA (Stadlmayr, G. et al., 2010).

O gene *PGK1* de *K. phaffii* codifica para a enzima 3-fosfoglicerato quinase, que transfere o grupamento fosfato do substrato 1,3 bifosfoglicerato para o ADP, gerando a primeira molécula de ATP da via glicolítica. Essa enzima é expressa constitutivamente,

podendo representar até 5% das proteínas totais da célula em *S. cerevisiae*, e por isso seu promotor é considerado forte (Chambers, A et al, 1988). Ele possui uma ORF de 1251 pb e está presente em apenas uma cópia no genoma de *K. phaffii*.

Em 2005, o promotor do gene *PGK1* foi isolado no laboratório de Biotecnologia de Leveduras da Universidade de Brasília (Almeida, J.R.M, et al, 2005) e, desde então, tem sido aplicado no estudo da expressão de diferentes proteínas heterólogas em *K. phaffii* como lipases (Barros, 2019) (Robert, J.M. et al, 2019) hormônio de crescimento humano (Pérez, 2018), amilase (Betancur, 2017) e a própria quimosina (Araújo, 2008) (Baptistello, 2019).

Em relação as condições de cultivo, *K. phaffii* consegue crescer em uma variedade de fontes de carbono. Além do metanol, consegue utilizar glicose, glicerol, etanol, L-ramnose, trealose, manitol, sorbitol, ácido lático, ácido succínico, ácido oléico, ácido acético e ácido cítrico (Ata, O. et al , 2021).

Todas essas características e vantagens aqui elencadas servem de embasamento para a utilização da levedura *K. phaffii* como uma biofábrica na geração de produtos biotecnológicos economicamente competitivos para o mercado e que possibilitarão o desenvolvimento estruturado da bioeconomia.

## HIPÓTESE

A expressão constitutiva da quimosina bovina em *K. phaffii* pode ser uma alternativa viável na produção industrial desta enzima.

## OBJETIVOS

### Objetivos gerais

Desenvolver um sistema de produção de quimosina bovina recombinante baseado na levedura *K. phaffii* utilizando promotores constitutivos para o controle da expressão.

### Objetivos específicos

1. Construção de linhagem de *K. phaffii* produtora de quimosina sobre o controle dos promotores constitutivo P<sub>PGK</sub>, P<sub>GAP</sub> e P<sub>TEF</sub>.
2. Comparação da produção de quimosina pelos diferentes promotores
3. Purificação e caracterização da quimosina bovina recombinante produzida pela levedura.

## METODOLOGIA

### MATERIAIS:

#### Microorganismos

*Escherichia coli* XL-10 gold (Agilent Technologies, EUA): *Tetr*  $\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$  *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [*F'proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>*]

*Komagataella phaffii* X-33 (Invitrogen, EUA) *his4::HIS4* (derivada da linhagem GS115).

#### Gene sintético

O gene da pró-quimosina foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs (EUA) baseado na sequência do cDNA da pró-quimosina B de *Bos taurus* (GenBank n de acesso NM\_180994). O gene desenhado corresponde à pró-quimosina para o correto dobramento da proteína e estabilização do mRNA, possui 1098 pb e apresenta 76,14% de identidade com o gene nativo, pois 225 códons de 365 foram substituídos por códons preferenciais para *K. phaffii*. Foram adicionados sítios de restrição para as enzimas XhoI e NotI às extremidades 5' e 3' do gene para clonagem em vetores de expressão.

#### Enzimas

TABELA 2 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

ENZIMA	SÍTIO	TAMPÃO	Temp
Not I	GCGGC CGC	Buffer 3.1	37°C
XhoI/SlaI	CTCGAG	CutSmart	37°C

Ligase T4 NEB Biolabs

Quimosina bovina recombinante DSM

Quimosina bovina recombinante Proquiga

Quimosina bovina recombinante CHY-MAX

## PNGase Promega

### Plasmídeos

TABELA 3 VETORES DE EXPRESSÃO

PLASMÍDEO	PROMOTOR	SELEÇÃO	HOSPEDEIRO
pPICK2 (Batista, 2012)	<i>PGK</i>	G418	<i>K. phaffii</i>
pPICTEF (Barros, 2019)	<i>TEF</i>	G418	<i>K. phaffii</i>
pPICGAP (Barros, 2019)	<i>GAP</i>	G418	<i>K. phaffii</i>

Os mapas dos vetores se encontram na seção Anexos

### Marcadores

1Kb Plus da ThermoScientific - DNA

1Kb Plus Invitrogen – DNA

Sinapse – proteína

Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher)

### Primers

TABELA 4 PRIMERS UTILIZADOS

Primer	Sequência
HIS F	5'GTGTATCCTGGCTTGGCATCT 3'
HIS R	5'GCCAAGTACGGTGTGACGTT 3'
CHYM F	5'TTGCTTGTGAGGGTGGTTGT 3'
CHYM R	5'GTAGCACCGATAGCTTGTGGA 3'

Primers sintetizados para a qPCR para amplificação de fragmento de 30 pb do gene de interesse.

### Kits

Para ligação de fragmentos com região de homologia: In-Fusion HD EcoDry Cloning kit

Para extração de plasmídeos em pequena escala: Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Para purificação de produto de PCR: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

Para eluição de DNA de gel de agarose: Gen Elute Gel Extraction Kit da Sigma-Aldrich e QIAquick Gel Extraction Kit QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit da QIAGEN

Para extração de DNA plasmidial em grande escala: Wizard Plus Midipreps DNA Purification System da Promega

Deglicosilação PNGase Promega

PCR em tempo real iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

### Tampões e Soluções

#### Antibióticos

A solução estoque de kanamicina 50 mg/mL foi dissolvida em água Milli Q e esterilizada por filtração.

A solução de G418 50 mg/mL foi dissolvida em água Milli Q e esterilizada por filtração.

#### Tampão de transformação I

RbCl 12 g/L

MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 9,9 g/L

Acetato de potássio 0,03 M

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,5 g/L

Glicerol 150 g/L

O pH foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2 M e, a solução esterilizada por filtração.

Foi utilizado acetato de potássio a partir da solução estoque 1 M (pH 7,5) ajustado com ácido acético glacial) esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

#### Tampão de transformação II

MOPS 0,02 M

RbCl 1,2 g/L

CaCl<sub>2</sub> 11 g/L

Glicerol 150 g/L

O pH foi ajustado com NaOH para 6,8 e a solução esterilizada por filtração.

Foi usada uma solução estoque estéril de MOPS 1 M com o pH ajustado para 6,8 utilizando NaOH.

Solução I para extração de DNA plasmidial (miniprep)

Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM

EDTA (pH 8,0) 10 mM

Solução II para extração de DNA plasmidial (miniprep)

NaOH 0,2 M

SDS 1% (p/v)

Solução preparada no momento do uso.

Solução III para extração de DNA plasmidial (miniprep)

Acetato de sódio 3 M

Ácido acético 2 M

O pH foi ajustado para 5,0.

Clorofane

Solução de fenol e clorofórmio (1:1, v/v)

Brometo de Etídio para eletroforese em gel de agarose

EtBr 10 mg/mL

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X para eletroforese em gel de agarose

Tris-Acetato 2 M

EDTA 0,05 M (pH 8,0).

Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose

Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye

Solução YNB (Yeast Nitrogen Base) com sulfato de amônio 10X

Yeast Nitrogen Base w/o ammonium sulfate (Difco) 3,4% (p/v)

Sulfato de Amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (p/v)

Esterilizada por filtração

Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida

- Acrilamida:bisacrilamida (29:1):

Acrilamida 29% (p/v)

Bisacrilamida 1% (p/v)

- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

- Tris-HCl 1 M pH 6,8

- SDS 10% (p/v)

- Persulfato de amônio 10% (p/v) Armazenado a -20°C.

- Tampão de amostra desnaturante 5X:

Tris-HCl 60 mM (pH 6,8)

SDS 2% (p/v)

β-Mercaptoetanol 14,4 mM

Glicerol 25% (p/v)

Azul de bromofenol 0,1% (p/v)

- Tampão de corrida Tris-Glicina 5X

Tris 16,7 g/L

Glicina 104,5 g/L

SDS 0,5% (p/v)

### Meios de cultura

#### Meio Luria-Bertani – LB

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

Peptona 1% (p/v)

NaCl 1% (p/v).

O pH foi ajustado para 7,2. Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v).

#### SOB

Triptona 20 g/L

Extrato de levedura 5 g/L

NaCl 0,6 g/L

KCl 0,5 g/L

MgCl<sub>2</sub> 10 Mm

MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

Foram feitas soluções de MgCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> na concentração de 1 M e filtradas com membrana de 0,22μm e foram adicionadas para a concentração final de 10 mM.

### BMGY

Extrato de levedura 1%  
Peptona 2%  
Tampão fosfato 100 mM (pH 6.0)  
YNB 0.34%  
Sulfato de amônio 1%  
Biotina  $4 \times 10^{-5}\%$  (p/v)  
Glicerol 1%

### YPG - Yeast Peptone Glycerol

Extrato de levedura 1,0 g/L  
Peptona 2,0 g/L  
Glicerol 2,0 g/L

### YPD - Yeast Peptone Dextrose

Extrato de levedura 1,0 g/L  
Peptona 2,0 g/L  
Glicose 2,0 g/L  
Para YPD sólido adicionar ágar 2%

### MD – Meio Mínimo com Dextrose

YNB com sulfato de amônio 1,34% (p/v)  
Biotina  $4 \times 10^{-5}\%$  (p/v)  
Glicose 2% (p/v)  
Ágar 2 % (p/v)

### Meio para atividade proteolítica

YNB com sulfato de amônio 1,34% (p/v)  
Biotina  $4 \times 10^{-5}\%$  (p/v)  
Glicose 2% (p/v)  
Ágar 2 % (p/v)  
Leite em pó desnatado 2,5% (p/v)

## METODOLOGIAS

### Cultivo de microrganismos

As células de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C em velocidade de agitação de 200 rpm quando em meio líquido e as células de *K. phaffii* foram cultivadas a 30 °C, 28 °C e 25 °C em velocidade de agitação de 200 rpm.

### Preparação de células bacterianas competentes

Células de *E. coli* foram semeadas em meio LB ágar e incubadas a 37 °C durante a noite. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB em Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 37°C sob agitação por 16 h. Dois mililitros do pré-inóculo foram inoculados em 100 mL de meio SOB em um Erlenmeyer de 500 mL e incubados a 37°C sob agitação por aproximadamente 1 hora, até atingir a OD<sub>600</sub> necessária de 0,3. A cultura foi resfriada por 15 minutos em banho de água e gelo para posteriormente, as células serem coletadas através de centrifugação a 3.000 g por 5 min a 4 °C.

O precipitado foi suspenso em 32 mL de tampão de transformação I e incubado no gelo por 15 minutos. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação sob as mesmas condições e suspensas em 4 mL de tampão de transformação II. Ao final foram feitas alíquotas de 100 µL que foram armazenadas a -80°C.

### Transformação bacteriana por choque térmico

Em uma alíquota de células competentes foram adicionados 5 µL do sistema de ligação ou plasmídeo intacto. As células foram incubadas no gelo por 30 minutos e posteriormente foram submetidas a choque térmico a 42°C por 90 segundos. Foi adicionado 1mL de meio LB ao sistema, e incubado a 37 °C por 1 hora. As células foram semeadas em meio LB ágar contendo 30 µg/mL de kanamicina.

### Transformação da levedura *K. phaffii*

A levedura foi cultivada em 5 mL de YPD em frasco tipo Erlenmeyer de 125 mL por 15 horas. Em seguida 500 µL da cultura foram transferidos para outro Erlenmeyer de 125 mL com 5 mL de YPD. Foi inoculada em frasco tipo Erlenmeyer de 1.000 mL com 100 mL de YPD quantidade de célula necessária para atingir uma OD<sub>600</sub> entre 1,3 e 1,5. As células foram coletadas por centrifugação a 1.600 g por 5 minutos a 4 °C, e ressuspendidas com 100 mL de água gelada estéril. As células foram coletadas por centrifugação e novamente e ressuspendidas em 50 mL de água gelada estéril, esse passo

foi repetido duas vezes. As células coletadas por centrifugação foram ressuspensas em 4 mL de sorbitol 1 M gelado estéril, centrifugadas novamente e ressuspensas em 300  $\mu$ L sorbitol 1 M gelado estéril. Foram misturados 80  $\mu$ L de células competentes a 5  $\mu$ g ou 10  $\mu$ g de DNA linearizado. Essa mistura foi transferida para cubeta de eletroporação e incubada no gelo por 5 minutos. A eletroporação ocorreu sob as seguintes condições: 1.500 V, 400  $\Omega$  e 25  $\mu$ F. Imediatamente adicionou-se 1 mL de sorbitol 1 M gelado estéril. As células submetidas a eletroporação foram semeadas em meio YPD com G418 (500  $\mu$ g/m).

#### Preparação plasmidial de pequena escala

Para extração de plasmídeos de células bacterianas em pequena escala foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook et al (2001), com adaptações. Cinco mililitros de meio LB contendo o antibiótico adequado foram inoculados com uma colônia transformante e incubados a 37°C por 16-18 horas sob agitação. Três mililitros da cultura foram coletados por centrifugação a 10.000 g por 2 minutos e o precipitado de células foi suspenso em 200  $\mu$ L de solução I. Em seguida, foram adicionados 360  $\mu$ L de solução II recém-preparada; a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300  $\mu$ L de solução III gelada, a mistura homogeneizada e incubada no gelo por 5 minutos. Após esse tempo a amostra foi concentrada por centrifugação a 10.000 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750  $\mu$ L de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e submetida a centrifugação a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 200  $\mu$ L de solução I. Em seguida, foram adicionados 110  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5 M e a mistura homogeneizada vigorosamente seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750  $\mu$ L de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 10.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70% seguido de uma nova centrifugação a 10.000 g por 2 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi seco à temperatura ambiente.

O precipitado foi suspenso em 50 µL de água milli Q contendo RNase A (0,1 mg/mL) e incubado a 37 °C por 15 minutos. O DNA foi armazenado a -20 °C.

#### Preparação plasmidial de média escala

Para linhagens *endA*<sup>-</sup> foi utilizado o kit de extração de plasmídeo Wizard Plus Midipreps DNA Purification System da Promega, de acordo com as indicações do fabricante.

Para linhagens *endA*<sup>+</sup> foi realizada a extração caseira: quinhentos mililitros de meio LB contendo o antibiótico adequado foram inoculados com uma colônia transformante e incubados a 37 °C por 16-18 horas sob agitação. As células foram precipitadas por centrifugação a 8.000 g por 10 minutos e o precipitado de células foi suspenso em 5 mL de solução I. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução II recém-preparada; a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada em gelo por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 7,5 mL de solução III gelada, a mistura homogeneizada e incubada no gelo por 20 minutos. Após esse tempo a amostra foi concentrada por centrifugação a 10.000 g por 30 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 0,6 v de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e submetida a centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 2 mL de solução I. Em seguida, foram adicionados 10 mL de fenol equilibrado e as foram extraídas por vortex por 1 minuto seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Na centrifugação formam-se três fases: a fase aquosa é coletada em um novo Falcon por pipetagem, desprezando a fase fenólica e a interfase

O líquido que foi transferido para outro tubo foi adicionado de 750 µL de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 10.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% seguido de uma nova centrifugação a 10.000 g por 2 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi seco à temperatura ambiente.

O precipitado foi suspenso em 50 µL de água milli Q contendo RNase A (0,1 mg/mL) e incubado a 37 °C por 15 minutos. O DNA foi armazenado a -20 °C.

### Análise de DNA por eletroforese

A análise de DNA por eletroforese foi feita de acordo com Sambrook et al. (2001), com adaptações. O gel foi feito utilizando tampão TAE 1X com uma concentração de 1% de agarose e 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma diferença de potencial provocando a migração e separação dos fragmentos de DNA. A visualização de bandas foi feita com a exposição do gel à luz ultravioleta.

### Purificação e eluição de DNA

A purificação de DNA proveniente de reações de PCR, assim como de bandas provenientes de géis de agarose, foi feita com os kits Gene Elute Gel Extraction Kit da Sigma-Aldrich e QIAquick Gel Extraction Kit QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit da QIAGEN, seguindo as orientações do fabricante.

### Precipitação de DNA

O DNA foi precipitado adicionando acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Após incubação a -20 °C por 16 horas, o sistema foi coletado por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10.000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e depois de completamente seco o precipitado foi suspenso em 10 µL de água milli Q.

### Triagem de transformantes *K. phaffii* em placa deep well

Os transformantes foram cultivados em placa do tipo *deep well* de 96 poços contendo 1 mL de meio MD por 72 horas a 30 °C e 200 rpm. A cultura foi centrifugada a 2.000 g por 5 minutos e o sobrenadante usado para teste de coagulação.

### Crescimento e produção de proteínas em frasco

Produção e pré-inóculo: uma colônia da levedura foi inoculada em 20 ml de meio YPG em Erlenmeyer de 250 mL e incubada a 25 °C por 48 h. Aproximadamente 5mL dessa cultura foi inoculado em 200 ml de meio YPG e incubada a 25 °C por 24 h.

Produção de proteína: O volume apropriado para começar a expressão com uma OD<sub>600</sub> de aproximadamente 3 foi submetido à centrifugação a 4000 g por 5 minutos e inoculado em 200 ml de meio YPG. A nova cultura foi incubada a 25°C ou 28 °C durante 72 horas e amostras foram coletadas a cada 24 h de crescimento e a OD<sub>600</sub> era medida e

a cultura alimentada com 2% de glicerol. As amostras coletadas foram centrifugadas a 4000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi recuperado para os ensaios enzimáticos.

#### Cálculo de peso seco (DCW)

Para o cálculo de peso seco, a levedura selvagem X-33 foi cultivada na temperatura de 28 °C durante 60h com amostras de 5 mL do sobrenadante coletadas a cada 12h. As amostras foram usadas para medida de OD<sub>600</sub> e filtradas com membrana de 0,45 µm, desidratadas em microondas e pesadas em balança de precisão para obtenção da massa seca em gramas. A relação entre OD<sub>600</sub> e o peso seco foram plotados e um gráfico e a seguinte equação da reta ( $R^2 = 0,9983$ ) foi obtida:

$$y = 3,8844x - 0,4471$$

Onde  $y$  é a OD<sub>600</sub> observada e  $x$  o peso seco em g/L.

#### Teste de coagulação UAC

Cem milicrolitros do sobrenadante ativado foram adicionados a 400 µl de leite desnatado 12% (p/v) preparado na hora do ensaio, seguindo-se incubação a 37 C. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade mínima de quimosina necessária ar formar um coalho em 5 minutos nas condições determinadas. Nos experimentos de seleção de transformantes analisou-se apenas o tempo necessário para coagular 400 µl da solução de leite (Araújo, 2008).

A equação para obter a Unidade de Atividade de Coagulação (UAC) segue abaixo:

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

#### Teste de coagulação REMCAT

Em 1 ml de substrato leite desnatado 11% solubilizado em solução de CaCl<sub>2</sub> 4,5 mM (misturado por 30 minutos e estocado no escuro por mais 30 minutos) pH 6,5 e aquecido a 32 °C são adicionados 20 µL de enzima e imediatamente inicia-se o cronometro e a agitação. Assim que forem observados pequenos coágulos na parede ao inverter o tubo a contagem do tempo é interrompida.

$$a_{tc} = \left( \frac{tc_{ref} d}{t_t d_{ref}} \right) ac_{ref}$$

Onde:

$a_{tc}$  = atividade de coagulação total

$tc_{ref}$  = tempo de coagulação da quimosina de referência

$d$  = diluição da mostra teste

$t_t$  = tempo de coagulação da amostra testada

$d_{ref}$  = diluição da amostra de referência

$ac_{ref}$  = atividade de coagulação de amostra de referência (IMCU. mL<sup>-1</sup>)

A quimosina comercial da DSM foi usada como amostra de referência, com uma atividade conhecida de 600 IMCU/mL. O tempo de coagulação da amostra de referência foi obtido na ocasião de cada novo teste.

#### Ativação da pró-quimosina

A ativação da pró-quimosina recombinante é realizada com uma alíquota do sobrenadante da cultura. Os sobrenadantes são adicionados pela adição de HCl e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida o pH deve ser ajustado para 6,0 com adição de KOH 1M e a solução é então incubada por 60 min a 37 °C.

#### Teste de atividade proteolítica em placa

A atividade proteolítica é detectada pela presença de halos de hidrólise no local de aplicação da amostra em placas de Petri contendo YNB ágar com leite integral. As células são transferidas no meio, obedecendo alguma distância entre um clone e outro para evitar que os halos não se fundam aos vizinhos. As colônias crescem por 48 h na temperatura ideal do microrganismo, e depois são colocadas em estufa a 37 °C por 24 h.

#### Purificação da quimosina extracelular *K. phaffii*

Os sobrenadantes de cultivos de 48h – 72h devem ser coletados e concentrados através do sistema Amicon com membrana de nitrocelulose com *cut-off* de 30 kDa. Deve ser aplicado 1 ml desta amostra na coluna Hiload 16/600 superdex 200 pg (GE Healthcare), sistema Akta Pure (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0). A eluição é realizada com fluxo constante de 0,8 ml

por minuto do mesmo tampão. Frações de 3 ml são coletadas e, aquelas que possuem atividade enzimática são reunidas e concentradas.

#### Precipitação da quimosina extracelular *K. phaffii*

As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas com 250  $\mu$ L de TCA 100% adicionados a 1 ml do sobrenadante. A mistura foi incubada a -20 °C durante a noite para depois ser centrifugada a 14000 g por 15 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com acetona 100%. Ao final, o precipitado foi dissolvido em 10  $\mu$ l de tampão de amostra 5X, diluído em Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) para 1X, e fervido por 5 minutos em banho seco para aplicação em gel de poliacrilamida desnaturante SDS PAGE.

#### Eletroforese em SDS PAGE 12%

Para separação eletroforética de proteínas foi utilizado o sistema SDS-PAGE na concentração de 15%. Foi utilizado um sistema de cubas verticais de eletroforese (BioRad, EUA). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão 1X com uma voltagem inicial de 80 V e depois de 200 V.

#### Ensaio de atividade específica da quimosina recombinante

Para determinar a especificidade da quimosina B bovina recombinante para o substrato k-caseína, as caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) para uma concentração final de 1,5mg/ml. Cada reação foi composta de 15  $\mu$ L da solução de cada caseína e 5  $\mu$ l da amostra de quimosina recombinante diluída 5000 vezes. Para o controle negativo foi utilizado água Milli-Q e no controle positivo utilizou-se uma amostra da quimosina recombinante da DSM diluída 5000 vezes. Todas as reações foram incubadas por 60 minutos a 37 °C e posteriormente submetidas a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida 12%.

#### Análise estatística dos dados

Os dados foram coletados em triplicatas e tratados com TesteQ para identificação e eliminação de valores aberrantes. Foram calculadas as médias, desvio padrão, variância e distribuição utilizando o programa Excel Microsoft. O teste t de Student com correção de Welch para variâncias desiguais foi usado para identificar diferenças significativas entre as médias calculadas.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

A levedura *K. phaffii* destaca-se como alternativa para a produção industrial de proteínas heterólogas pela eficiência na secreção e modificações pós-traducionais, predominância do metabolismo respiratório, produção em alta densidade celular, não hiperglicosila proteínas e possui status GRAS (Gasset, A. et al, 2022). No entanto, os trabalhos se concentram na utilização do promotor P<sub>AOX1</sub> para indução da expressão a partir da adição de metanol. O uso desse indutor oferece riscos na produção em grande escala e não é permitido para a produção de fármacos ou aditivos. O uso de promotores constitutivos na fermentação de *K. phaffii* simplifica o manejo, eliminando a necessidade de metanol, e providencia a transcrição contínua do gene de interesse (Cankorur-Cetinkaya, A. et al., 2018).

Visando a aplicação dessa levedura na produção de quimosina bovina, neste trabalho utilizamos 3 promotores constitutivos diferentes: P<sub>PGK</sub>, P<sub>GAP</sub> e P<sub>TEF</sub> para a construção dos vetores pPPGKC, pPGAPC e pPTEFC.

Os vetores pPICK2, que possui o promotor P<sub>PGK</sub> (3629 pb), pPICKTEF (3370 pb), pPICKGAP (3428 pb) foram digeridos com as enzimas de restrição XhoI e NotI para clonagem do gene sintético da quimosina com ligase T4. O fragmento de 1098 pb referente à quimosina sintetizada foi extraído do plasmídeo por digestão com XhoI e NotI para confirmação da clonagem (**Figura 5 e 6**).

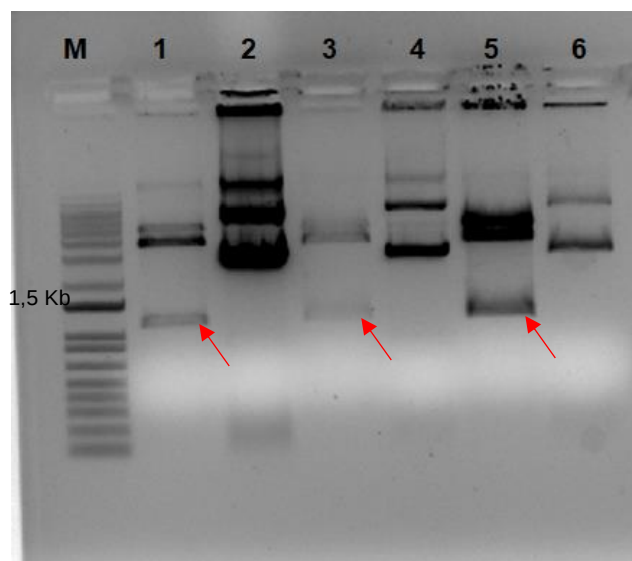


FIGURA 5. GEL DE ELETROFORESE DE DNA PARA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO COM GENE CHYMB. A) Os vetores foram digeridos com XhoI e NotI para a liberação de uma banda de 1063 pb referente à quimosina, e uma banda de mais de 3 kb correspondente aos vetores: M- Marcador 1 Kb Plus Invitrogen; 1- pPPGKC digerido; 2- pPPGKC intacto; 3 - pPTEFC digerido; 4 - pPTEFC intacto; 5 - pPGAPC digerido; 6- pPGAPC intacto.

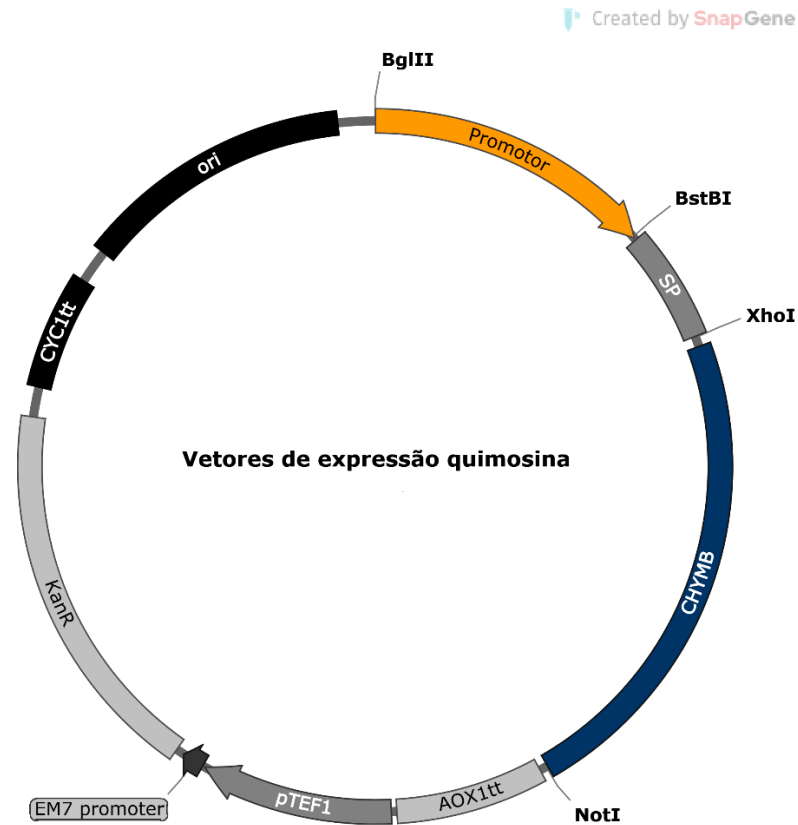


FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR UTILIZADO PARA EXPRESSAR A QUIMOSINA EM *K. PHAFFII*. A barra de seta laranja representa a posição e a direção da transcrição dos promotores constitutivos utilizados para direcionar a expressão de CHYMB. Três vetores foram construídos: pPPGKC ( $P_{PGK}$ ), pPTEFC ( $P_{TEF}$ ) e pPGAPC ( $P_{GAP}$ ). Outras características relevantes são: CHYMB: gene sintético da quimosina B de *Bos taurus*; kan: gene de resistência a kanamicina/G418; alfa-F: sequência de secreção do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* otimizada para *K. phaffii*; ori: origem bacteriana de replicação; pTEF1: promotor do fator de alongamento da tradução de *S. cerevisiae*; AOX1tt: terminador da transcrição AOX1 de *K. phaffii*; EM7: promotor bacteriano sintético; CYC1tt: terminador da transcrição CYC1 de *S. cerevisiae*. Apenas os sítios de restrição relevantes são mostrados no mapa.

## 2. TRANSFORMAÇÃO EM *K. phaffii* POR ELETROPORAÇÃO

Os vetores pPPGKC e pPGAPC foram linearizados na região do promotor como forma de favorecer a recombinação homóloga aumentando a eficiência da transformação. O promotor P<sub>PGK</sub> foi linearizado com a enzima de restrição PvuI e P<sub>GAP</sub> com AvrII. O promotor P<sub>TEF</sub> não pôde ser digerido, pois o sítio de restrição alvo ScaI está presente na sequência do gene *CHYMB*, portanto o plasmídeo foi utilizado intacto para a transformação.

A seleção de clones transformantes foi feita com o uso do antibiótico G418 (500 µg/mL) em meio YPD sólido (**Figura 7**). As leveduras foram incubadas por 72 h em estufa a 30°C.

As colônias da linhagem  $\gamma$ KPC (P<sub>PGK</sub>) cresceram de maneira semelhante à levedura selvagem. Algumas colônias das linhagens  $\gamma$ KGC (P<sub>GAP</sub>) e  $\gamma$ KTC (P<sub>TEF</sub>) tiveram um desenvolvimento menor comparado a X-33.

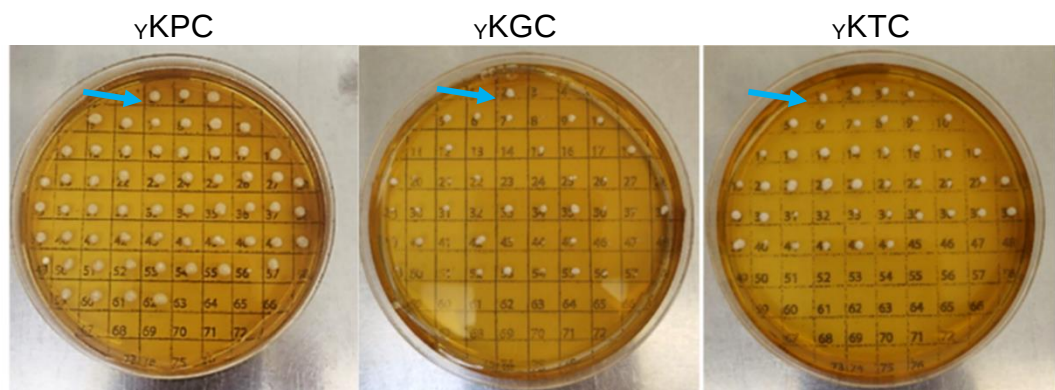
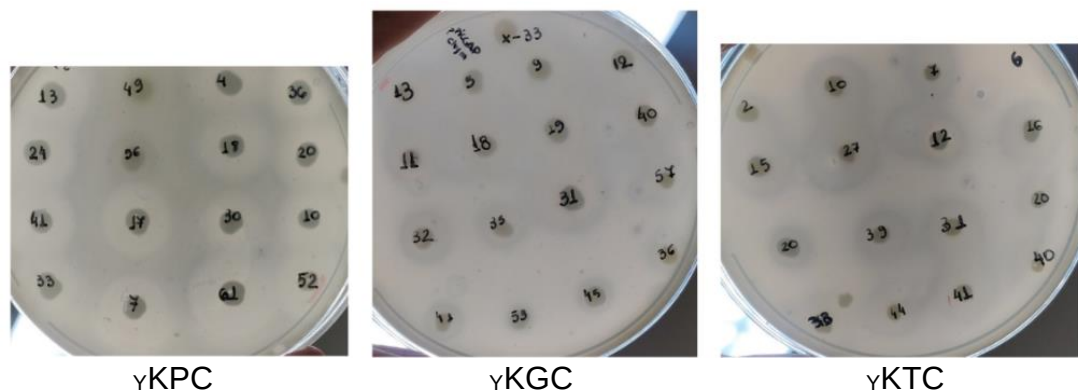


FIGURA 7. ISOLADOS DE TRANSFORMANTES *K. PHAFFII* EM PLACAS. Na primeira linha, os clones de *K. phaffii* derivados de X-33 em meio YPD com G418 (500 µg/ml). A linhagem X-33 WT está indicada pela flecha.

### 3. SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES

Alguns clones de cada transformação foram transferidos, aleatoriamente, em placas contendo YNB ágar com solução de leite integral e foram incubados por 72 h em estufa a 30 °C. Após esse período de crescimento, as placas foram transferidas para uma estufa com temperatura de incubação de 37 °C por 24 h. As placas foram analisadas em busca de halos transparentes em torno das colônias, e apenas as colônias da linhagem  $\gamma$ KPC apresentaram os halos de proteólise. As placas com colônias das linhagens  $\gamma$ KGC e  $\gamma$ KTC foram mantidas por mais 48 h em temperatura ambiente e só então foi possível observar alguma formação de halo (**Figura 8**).

As colônias capazes de apresentar halo foram selecionadas e armazenadas a -80 °C.

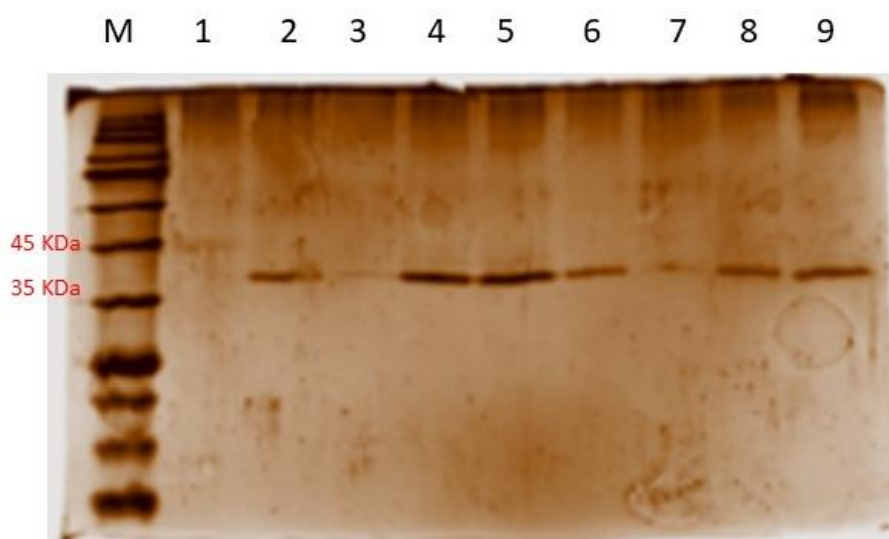


**FIGURA 8. ANÁLISE DE PROTEÓLISE EM MEIO MD COM LEITE.** Foi observada a formação de halos em algumas colônias  $\gamma$ KPC após 24 h de incubação a 37 °C, e nas linhagens  $\gamma$ KGC e  $\gamma$ KTC após 48 h em temperatura ambiente.

Os primeiros ensaios em *deep well* foram feitos em 1 ml de meio mínimo definido onde as colônias que apresentaram halo foram inoculadas por 72 h a 30 °C e 200 rpm. O sobrenadante livre de células foi coletado e tratado com HCl, para ativação da quimosina e o teste de coagulação foi realizado como uma segunda etapa de seleção de clones. Após os 30 min de incubação do sobrenadante livre de células com o substrato à base de leite, apenas os clones  $\gamma$ KPC 53, 3, 13, 17, 24, 33, 41, 7, 52, 53 e 61 testados coagularam o leite. As amostras de sobrenadante foram submetidas à precipitação para análise em gel de poliacrilamida.

No gel SDS PAGE corado com prata é possível identificar a presença de uma banda de aproximadamente 36 KDa, compatível com o tamanho da quimosina

recombinante e que não está presente no sobrenadante tratado com HCl da levedura selvagem (**Figura 9**).



**FIGURA 9. SDS PAGE 12% CORADO COM PRATA PARA IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE QUIMOSINA NO SOBRENADANTE DE CLONES  $\gamma$ KPC.** Os diferentes clones foram cultivados em 1 ml de YPD, incubados a 30 °C por 72h. O sobrenadante foi tratado com HCl para ativação da quimosina, e as proteínas foram precipitadas e aplicadas em gel de poliacrilamida para visualização de bandas de aproximadamente 36 kDa, referentes à quimosina bovina recombinante. Colunas M) Marcador; 1) X-33; 2)  $\gamma$ KPC 7; 3)  $\gamma$ KPC 52; 4)  $\gamma$ KPC 61; 5)  $\gamma$ KPC 17; 6)  $\gamma$ KPC 53; 7)  $\gamma$ KPC 24; 8)  $\gamma$ KPC 41 e 9)  $\gamma$ KPC 33.

Um novo ensaio foi realizado, em 50 ml de meio BMGY, com os clones  $\gamma$ KPC 7, 61 e 17,  $\gamma$ KGC 2, 22 e 31 e  $\gamma$ KTC 12, 40 e 41, tendo a linhagem X-33 usada como controle. Os inóculos foram iniciados com uma OD 600 nm de aproximadamente 4 e incubados por 48 h a 30°C e 200 rpm, com o objetivo que alcançar uma alta concentração de células para melhor observação da quimosina no sobrenadante. Foram coletadas amostras do sobrenadante após 24 h e 48 h de cultivo e separado do material celular por centrifugação e precipitado com TCA 100% para aplicação da amostra em SDS PAGE 12% (**Figura 10**).

Amostras do sobrenadante após as 48h de cultivo também foram utilizadas para testar a capacidade de coagulação do leite a 37 °C. Apenas o sobrenadante dos clones da linhagem  $\gamma$ KPC foram capazes de coagular o leite:  $\gamma$ KPC 7 e 17 em 9 minutos e  $\gamma$ KPC 61 em 20 minutos.

As análises de eletrofose de proteína corroboraram com o resultado obtido no teste de coagulação do leite: apenas foi possível observar a presença de banda correspondente ao tamanho da quimosina nos sobrenadantes da linhagens  $\gamma$ KPC.

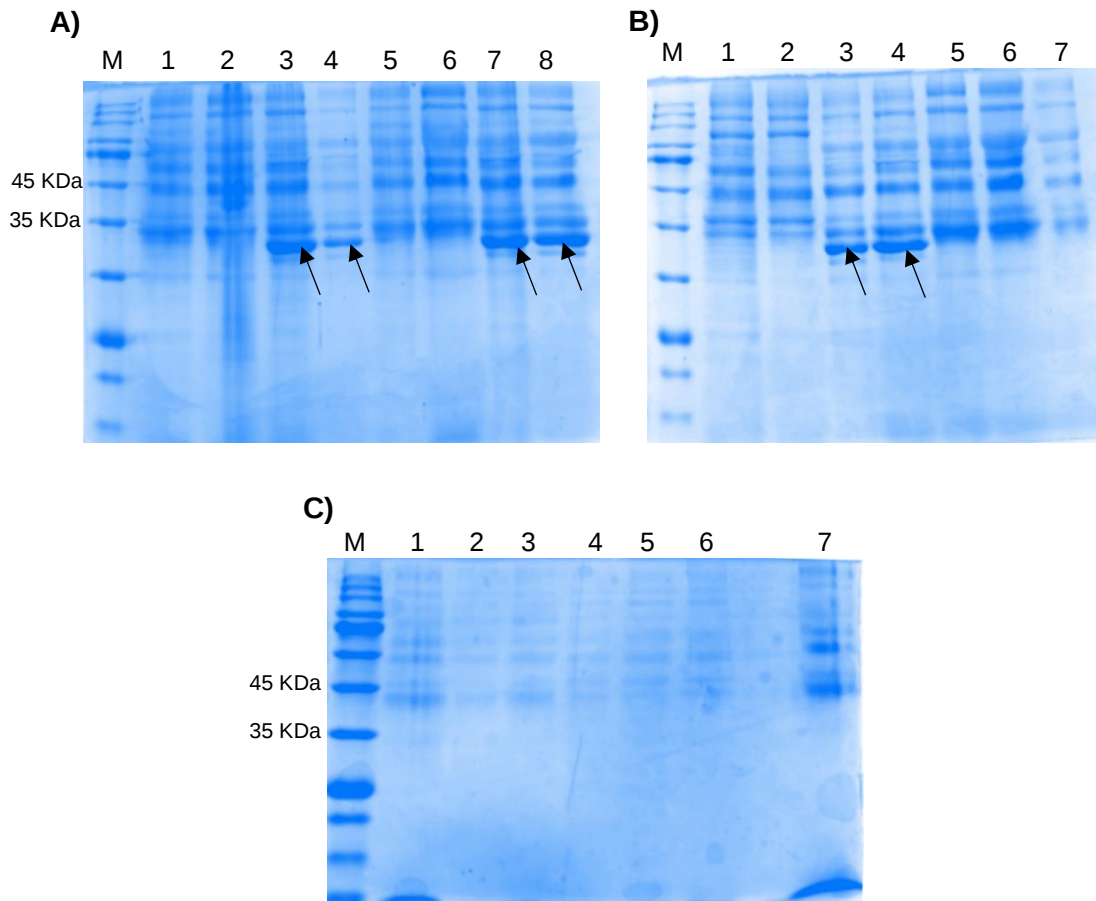


FIGURA 10. SDS PAGE 12% CORADO COM COMASSIE PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRÓ-QUIMOSINA NO SOBRENADANTE. **A:** colunas M) Marcador, 1)X-33 24 h; 2) x-33 48 h; 3)  $\gamma$ KPC 61 24 h; 4)  $\gamma$ KPC 61 48 h; 5)  $\gamma$ KGC 2 24 h; 6)  $\gamma$ KGC 2 48 h; 7)  $\gamma$ KPC 7 24 h e 8)  $\gamma$ KPC 7 48 h. **B:** colunas M) Marcador, 1)  $\gamma$ KGC 31 24 h; 2)  $\gamma$ KGC 31 48 h; 3)  $\gamma$ KPC 17 24 h; 4)  $\gamma$ KPC 17 48 h; 5)  $\gamma$ KGC 22 24 h; 6)  $\gamma$ KGC 22 48 h; 7) X-33 24 h. **C:** colunas M) Marcador, 1)  $\gamma$ KTC 41 24 h; 2)  $\gamma$ KTC 41 48 h; 3)  $\gamma$ KTC 40 24 h; 4)  $\gamma$ KTC 40 48 h; 5)  $\gamma$ KTC 12 24 h; 6)  $\gamma$ KTC 12 48 h; 7) X-33 48 h.

Para prosseguir com os ensaios, o clone  $\gamma$ KPC 7 foi inicialmente selecionado, no entanto ele se mostrou instável e acabou perdendo a capacidade de produzir quimosina. O clone  $\gamma$ KPC 17 foi escolhido para dar continuidade aos estudos.

#### 4. PURIFICAÇÃO DA QUIMOSINA BOVINA PRODUZIDA POR *K. phaffii*.

Para a purificação da quimosina recombinante, a levedura  $\gamma$ KPC 17 foi incubada por 48h a 30 °C e 200 rpm em dois Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de YPG cada.

O sobrenadante obtido foi separado do material celular por centrifugação e filtração em membrana de 0,45  $\mu$ m. O filtrado foi concentrado em Amicon com uma membrana de 30 KDa, e 10 ml do líquido retido (35 mL) obtido foi liofilizado. Para purificação por cromatografia de exclusão, o material liofilizado foi ressuspensionado em 4 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) (**Figura 11**).

Cada fração obtida foi testada para atividade de coagulação do leite após acidificação com HCl, que foi observada apenas nas frações 15, 16, 17, 18 e 19, indicando a presença de quimosina. O IMCU foi calculado através do método REMCAT, e as frações 16 (156 IMCU/mL), 17 (264,7 IMCU/mL) e 18 (120 IMCU/mL), apresentaram os maiores valores.

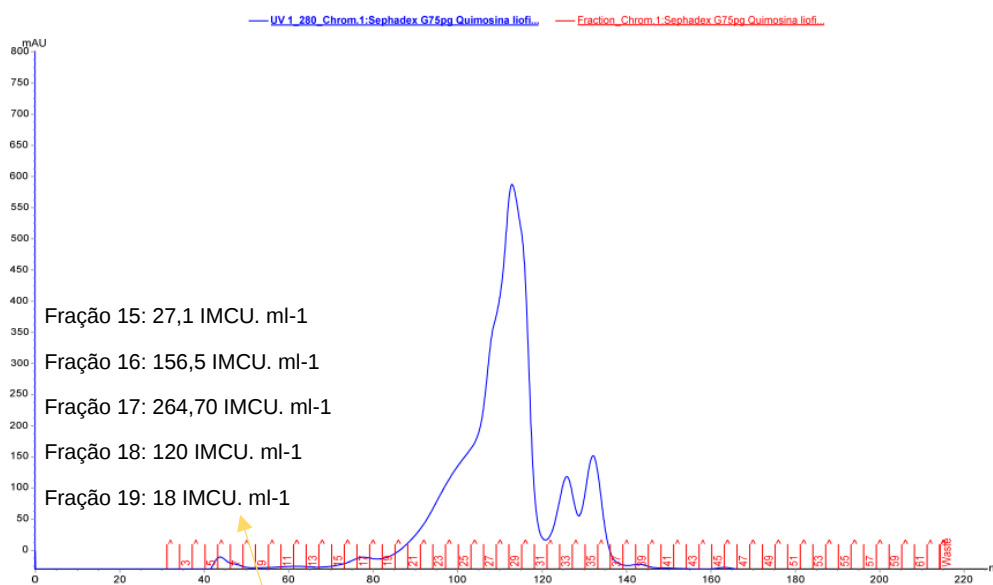
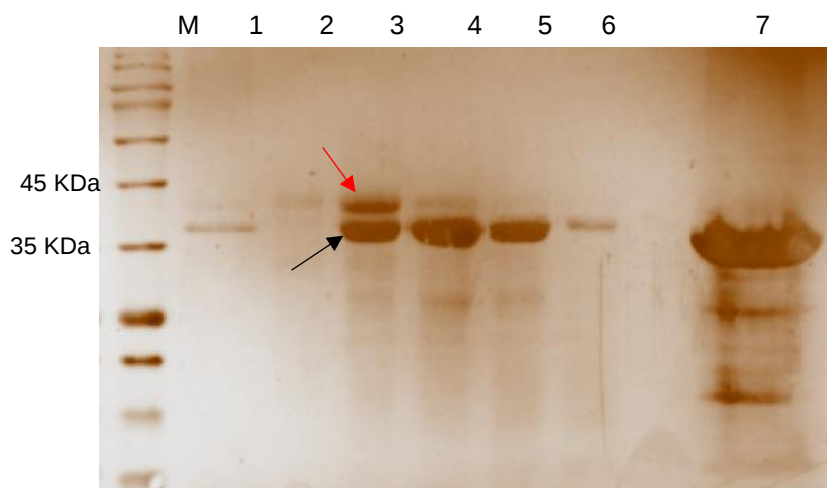


FIGURA 11. PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO. A purificação foi conduzida em coluna hiload 16/600 superdex 200 pg no sistema akta pure previamente equilibrado com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0). Frações de 3 ml foram coletadas e testadas para atividade enzimática.

Após uma etapa de purificação as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida corado com prata (**Figura 12**) e, nas frações 15, 16 e 17 identificamos duas bandas: uma de aproximadamente 40 kDa referente a forma glicosilada da quimosina e uma banda de aproximadamente 35 kDa, compatível com o tamanho da enzima não glicosilada.



**FIGURA 12. SDS PAGE 12% CORADO COM PARA PARA ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA QUIMOSINA.** Colunas M) Marcador; 1) extrato bruto (5 $\mu$ l); 2) fração 15; 3) fração 16; 4) fração 17; 5) fração 18; 6) fração 19 e 7) quimosina recombinante da DSM. A seta vermelha indica a forma glicosilada e a seta preta indica a forma não glicosilada da quimosina.

As frações foram reunidas em uma única amostra, totalizando 9 mL, que foi liofilizada e o sólido obtido foi ressuscitado em 4 mL. A quimosina obtida foi quantificada em mg/ml por absorvância nos comprimentos de onda 280 nm e 260 nm. Em condições não otimizadas de crescimento celular em frasco, foram obtidos 670 mg/L de quimosina após os processos de purificação e 46400 IMCU totais.

Filkin et al (2020), expressando o gene da quimosina sob a indução do promotor P<sub>AOX1</sub> obtiveram em biorreator (2L) o máximo de 80 mg/L de quimosina após 96 h de indução com adição de sorbitol. Após o processo de purificação em duas etapas sendo a primeira por troca iônica e uma segunda etapa de cromatografia por interações hidrofóbicas, conseguiram recuperar 62% da proteína total, que representou na amostra final 31,5 mg de proteína total, o equivalente a 1009 IMCU/mL.

Nosedá et al (2016) ao escalonar a produção de quimosina com o promotor  $P_{AOX1}$  em biorreator, purificou a amostra por cromatografia de troca iônica e obteve 460 IMCU totais.

Ao expressar o gene da pró-quimosina B bovina sobre o controle do promotor  $P_{GAP}$  Jiang et al (2012) obtiveram, em cultivo de 100 mL em YPD, 3705 U/mg de quimosina purificada por cromatografia de troca iônica em duas etapas, ao final de um processo fermentativo de 5 dias. Porém os ensaios de coagulação foram realizados em proporção E/S 1:1 e na temperatura de incubação de 37°C, o que sugere uma superestimação dos resultados.

Neste trabalho obtivemos 1424 IMCU totais ao final da purificação. Houve, no entanto, uma grande perda de proteína durante as etapas de purificação, principalmente após a passagem do extrato bruto pelo Amicon e a segunda liofilização. Estes resultados indicam que a etapa de purificação pode ser melhorada para obter uma porcentagem de recuperação maior da proteína.

Em SDS PAGE 12% foram aplicadas amostras das enzimas comerciais Proquiga, CHY-MAX, DSM, uma amostra de enzima produzida por *E. coli* para efeito de comparação com o perfil de proteínas presentes na amostra purificada obtida (**Figura 13**).

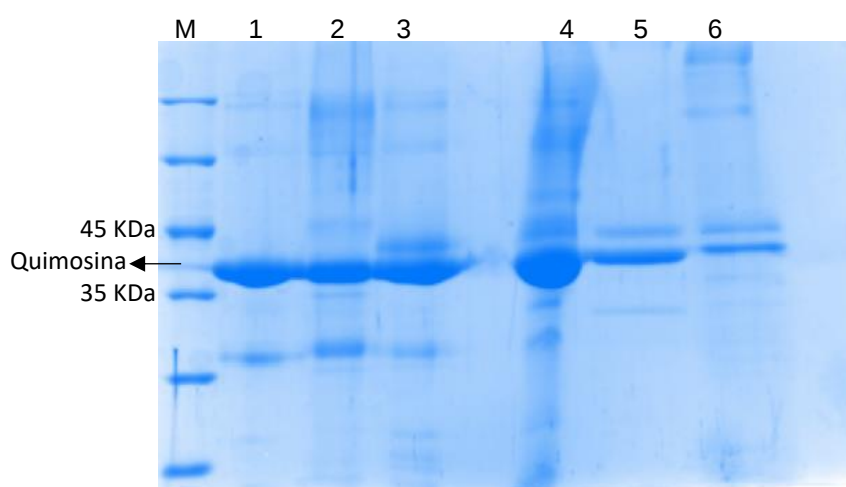


FIGURA 13. SDS PAGE 12% CORADO COM COMASSIE PARA COMPARAÇÃO DA PUREZA DE AMOSTRAS DE QUIMOSINAS COMERCIAIS E A QUIMOSINA PRODUZIDA POR *K. PHAFFII* PURIFICADA. Colunas M) Marcador; 1) Proquiga *K. lactis*; 2) CHY-MAX *A. niger*; 3) Quimosina recombinante

produzida por *E. coli*; 4) DSM *K. lactis*; 5) CHYMB *K. phaffii* e 6) Extrato bruto ativado CHYMB *K. phaffii*.

Ao comparar em gel de poliacrilamida a purificação da quimosina obtida pela levedura *K. phaffii* com amostras de quimosina recombinantes comerciais produzidas pelos fungos *K. lactis*, *A. niger* e pela bactéria *E. coli*, foi possível obter um perfil de purificação semelhante ao já utilizado na indústria, indicando que uma etapa de purificação por cromatografia de exclusão pode ser suficiente.

Esses resultados reforçam a aplicação da levedura *K. phaffii* como um microrganismo alternativo para a produção comercial de quimosina bovina devido ao processamento *downstream* simplificado.

Uma das características da quimosina bovina quando expressa na levedura *K. phaffii* é a glicosilação da enzima, que não é observada na quimosina em sua forma nativa (**Figura 14**).

```
LEKREAEEAETRIPLYKGYKISSKYSGFGEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLF
DTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPKSSSTFQNLGKPLSIHYGTGSMQGILGYDVTVSNIVD
IQQTVGLSTQEPGDVFTYA EFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQ
ESMLTLGAINPSYYTGLHWVPVTVQYQWQFTVDSVTISGVVACEGGCQAILDTGTSKLVGPSS
DILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMPVTVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFACTSGFQSENH
SQKWILGDVFIREYYSVFD RANNLVGLAKAI*
```

**FIGURA 14. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PRÓ-QUIMOSINA B BOVINA.** Em azul está desatacada a região da pró-quimosina e em amarelo estão os possíveis sítios de glicosilação, considerando o motivo N-XXX-S/T de glicosilação em *K. phaffii*.

A glicosilação foi observada nas quimosinas de búfalo, camelo, bode e iaque quando produzidas em *K. phaffii*, além da bovina, pois a glicosilação é um processamento pós-traducional comum em proteínas expressas por leveduras. (Akishev, Z. et al, 2021).

Um ensaio de deglicosilação com PNGase F foi realizado, a amostra tratada foi visualizada em gel de poliacrilamida (**Figura 15**) onde obtivemos uma banda de 35 kDa, o esperado da quimosina bovina em sua forma nativa.

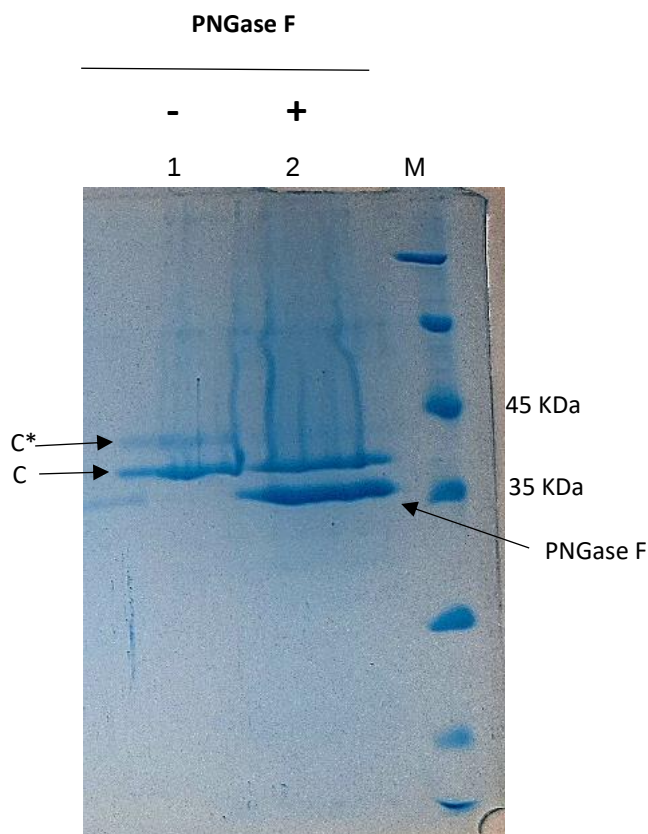


FIGURA 15. SDS PAGE 12% CORADO COM COMASSIE PARA ANÁLISE DO ESTADO DE DEGLICOSILAÇÃO DA QUIMOSINA RECOMBINANTE. Colunas 1) quimosina recombinante purificada apresentando os estados glicosilada (C\*) e não glicosilada (C); 2) apenas quimosina recombinante sem glicosilação após tratamento com PNGase F.

Embora não tenham sido encontradas diferenças na atividade proteolítica da quimosina com glicosilação e sem glicosilação, especula-se que a glicosilação aumente a solubilidade de proteínas, prevenindo a sua agregação na via de secreção, o que poderia aumentar os níveis de proteína secretada. A produção de quimosina bovina altamente glicosilada por *A. niger* resultou em mais atividade do que a forma deglicosilada de quimosina (Van den Brink, H. et al, 2006).

Ao adicionarem um sítio de N-glicosilação na pró-quimosina de camelo a secreção da proteína foi significativamente maior em *K. phaffii*, e contribuiu para uma maior estabilidade térmica da enzima (Wang, N. et al, 2022).

A presença de glicosilação não oferece risco ou alteração negativa, não representando, portanto, um impedimento no uso da levedura *K. phaffii* como plataforma de expressão heteróloga de quimosina bovina para aplicação na indústria de laticínios.

## 5. ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATO E TERMOESTABILIDADE DA QUIMOSINA RECOMBINANTE PURIFICADA:

A especificidade da quimosina bovina recombinante obtida foi testada nos substratos  $\alpha$ -caseína ( $\alpha$ -cn),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -cn) e  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -cn) (**Figura 16**). Amostras desses substratos foram incubadas a 37°C por 1h com a CHYMB purificada e a quimosina recombinante da empresa DSM, ambas diluídas 5000 vezes. Os pesos moleculares de  $\beta$ -cn,  $\kappa$ -cn e  $\alpha$ -cn são 24 kDa, 19 kDa, e 25,2 kDa, respectivamente.

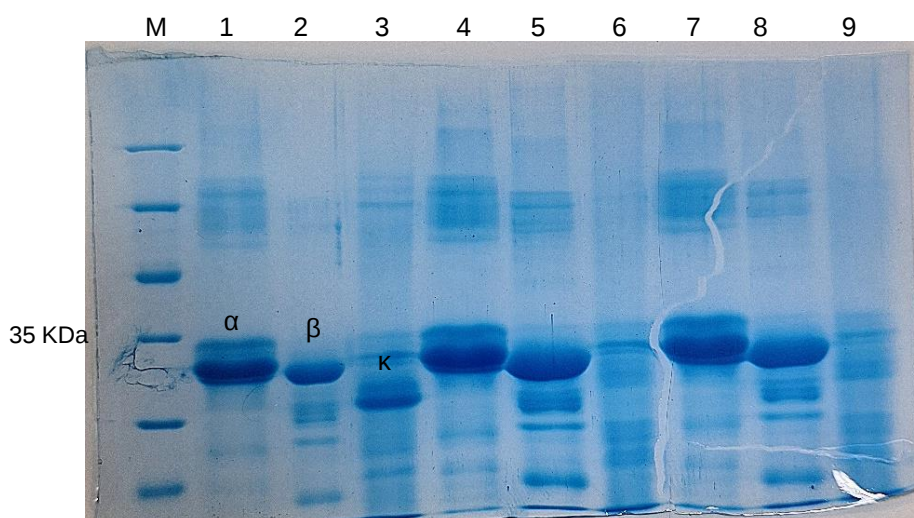


FIGURA 16. SDS PAGE 12% CORADO COM COMASSIE PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA QUIMOSINA PARA O SUBSTRATO KAPPA-CASEÍNA. Colunas M) marcador 1)  $\alpha$ -caseína 2)  $\beta$ -caseína 3)  $\kappa$ -caseína 4)  $\alpha$ -caseína + CHYMB 5)  $\beta$ -caseína + CHYMB 6)  $\kappa$ -caseína + CHYMB 7)  $\alpha$ -caseína + DSM 8)  $\beta$ -caseína + DSM 9)  $\kappa$ -caseína + DSM.

A quimosina tem como substratos  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas do leite, porém sua especificidade decresce ao compararmos a catálise em  $\kappa$ ,  $\beta$  e  $\alpha$ . Na  $\beta$ -cn a enzima hidrolisa a ligação Leu192-Tyr193 e em  $\alpha$ -cn a região de lise é a composta por Phe23-Phe24. Cheng et al (2021) observou que os pesos moleculares de  $\beta$ -cn e  $\alpha$ -cn diminuíram para 21,9 kDa e 20,75 kDa, respectivamente, após incubação com a quimosina. No entanto apesar de induzir a hidrólise de  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseína, essa hidrólise não causa agregação.

O mesmo foi observado quando amostras de quimosina não diluídas foram incubadas com os substratos  $\kappa$ -,  $\beta$ - e  $\alpha$ -caseína por 1 hora a 37 °C (**Figura 17**). Enquanto a kappa-caseína foi totalmente hidrolisada, os substratos beta e alfa-caseína foram apenas parcialmente hidrolisados.

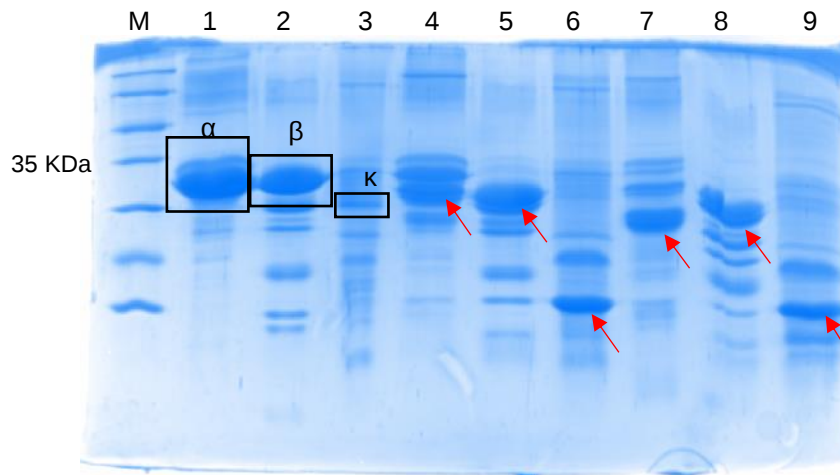


FIGURA 17. SDS PAGE 12% PARA ANÁLISE DA AÇÃO DA QUIMOSINA SOBRE DIFERENTES SUBSTRATOS. Colunas M) marcador 1)  $\alpha$ -caseína 2)  $\beta$ -caseína 3)  $\kappa$ -caseína 4)  $\alpha$ -caseína + CHYMB 5)  $\beta$ -caseína + CHYMB 6)  $\kappa$ -caseína + CHYMB 7)  $\alpha$ -caseína + DSM 8)  $\beta$ -caseína + DSM 9)  $\kappa$ -caseína + DSM.

Esses resultados apresentados indicam que a quimosina recombinante produzida pela levedura *K. phaffii* possui a mesma especificidade para seus substratos encontrada na quimosina comercial expressa pela levedura *K. lactis*.

Amostras da quimosina purificada foram incubadas em diferentes temperaturas para analisar a termoestabilidade da proteína recombinante produzida pela *K. phaffii*. No ensaio (**Figura 18**) foi observada uma queda de 35% na atividade de coagulação quando a enzima é mantida em 40 °C, mas essa queda permanece constante mesmo com o aumento progressivo da temperatura até 50°C.

Jiand et al (2012) observaram uma queda de 10% na atividade relativa da quimosina recombinante após incubação em 50 °C.

Esses resultados são condizentes com as características da quimosina recombinante comercial CHYMAX expressa por *A. niger*, que apresenta perda de atividade, podendo mesmo ser desativada, se incubada por longos períodos, em temperaturas acima de 35 °C (Vallejo, J.A. et al, 2012).

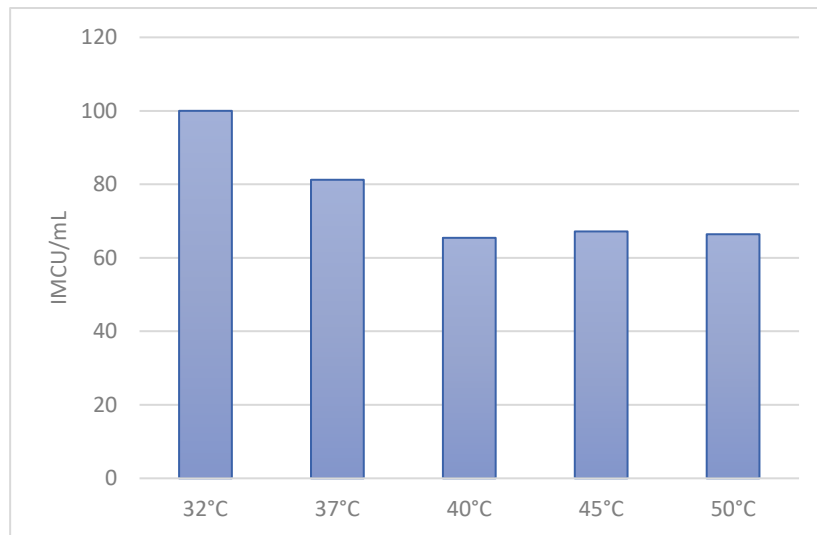


FIGURA 18 TERMOESTABILIDADE DE QUIMOSINA RECOMBINANTE PRODUZIDA POR *K. PHAFFII*.

## 6. EFEITO DA TEMPERATURA E DOS PROMOTORES CONSTITUTIVOS NA PRODUÇÃO DE QUIMOSINA BOVINA EM *K. phaffii*.

A produção de proteínas recombinantes está relacionada a diferentes respostas celulares ao estresse, que gera uma carga metabólica e a necessidade de energia extra para suplantá-la. Esta carga metabólica pode resultar na inibição do crescimento, no baixo nível de acumulação de produto, na diminuição da resistência celular às influências ambientais ou mesmo na lise celular, na instabilidade genética, influenciando a produtividade do sistema de expressão (Glick, B.R. et al, 1995)

Mattanovich (2004) considera que a carga metabólica em leveduras é causada por processos pós-traducionais como o dobramento e secreção da proteína recombinante ou mesmo pela degradação proteica de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático.

Essa carga pode ser acentuada na expressão de proteínas grandes, complexas e com ligações dissulfeto. A formação de ligações dissulfeto, além de consumir ATP, também necessita de oxigênio e produz espécies reativas de oxigênio (EROs) em quantidades estequiométricas ao número de ligações dissulfeto formadas. As EROs geradas acabam por consumir recursos celulares que protegeriam contra o estresse oxidativo dentro da célula (Tyo, K.E. et al, 2010).

Na sequência da pró-quimosina encontramos 7 resíduos de cisteína que resultam em 3 ligações dissulfeto (**Figura 19**).

```
MRCLVLLAVFALSQGAETRIPLYKGKSLRKALKEHGLLEDFLQKQYGISSKYSGFGEVASVPLTNYLDSQYF
GKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPKSSTFQNLGKPLSIHYGTGSMQGILGYDT
VTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNG
QESMLTLGAIDPSYTTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVVACEGGCCQAILDTGTSKLVGPSSDILNIQ
QAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMPTVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSENHSQKWILGDVFIRES
YYSVFDRANNLVGLAKAI
```

FIGURA 19. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PRÓ-QUIMOSINA. Resíduos de cisteínas destacados em amarelo. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00794/entry>

As EROs podem ser formadas em quantidades potencialmente ilimitadas através de múltiplas rodadas de formação e quebra de ligações dissulfeto aleatórias, que aumentam a medida que resíduos de cisteína vão se tornando disponíveis na proteína

nascente no retículo endoplasmático (RE). Esse fenômeno ocorre principalmente quando a taxa de dobramento é lenta em comparação com a taxa de formação das ligações dissulfeto, como resultado da saturação da capacidade geral de dobramento do RE (Tyo, K.E. et al, 2010).

Dragosits et al (2009) observou que a diminuição da temperatura para 20 e 25°C consegue diminuir a carga metabólica, o que resultou em um aumento de até três vezes na taxa de produção de proteínas. O autor especulou que o dobramento de proteínas ou a degradação de proteínas mal dobradas foram reduzidos em temperaturas mais baixas.

Em outro estudo foi demonstrado que o estresse consequente da resposta às proteínas mal-dobradas (UPR) e ao próprio dobramento incorreto pode ser significativamente reduzido em temperaturas mais baixas, levando à redução da degradação de proteínas (Gasser, B. et al, 2007).

Considerando o exposto, avaliamos se as linhagens  $\gamma$ KTC e  $\gamma$ KGC testadas não apresentaram bandas nem atividade de coagulação quando cultivadas a 30 °C por estresse metabólico. Todos os clones destas linhagens armazenados a -80 °C foram plaqueados em meio YPD sem antibiótico, onde ficaram incubados por 72 h. Depois de passarem por uma placa com meio YPD com antibiótico, aqueles que formaram colônias foram cultivados em *deep well* em meio líquido YPD, sem antibiótico, por mais 72 h na temperatura de 28 °C, com o objetivo de diminuir o metabolismo da levedura na hipótese de um alto nível de transcrição do gene heterólogo estar prejudicando a tradução e secreção da quimosina recombinante.

Apenas uma das colônias inoculadas de  $\gamma$ KTC (31) e duas de  $\gamma$ KGC (2 e 6) cresceram em meio líquido. O sobrenadante foi coletado e precipitado para aplicação em gel de poliacrilamida onde foi possível observar a presença de uma banda de 35 KDa que não estava presente no sobrenadante da levedura selvagem, e de tamanho menor que a banda observada na linhagem com o promotor  $P_{PGK}$  (**Figura 20**).

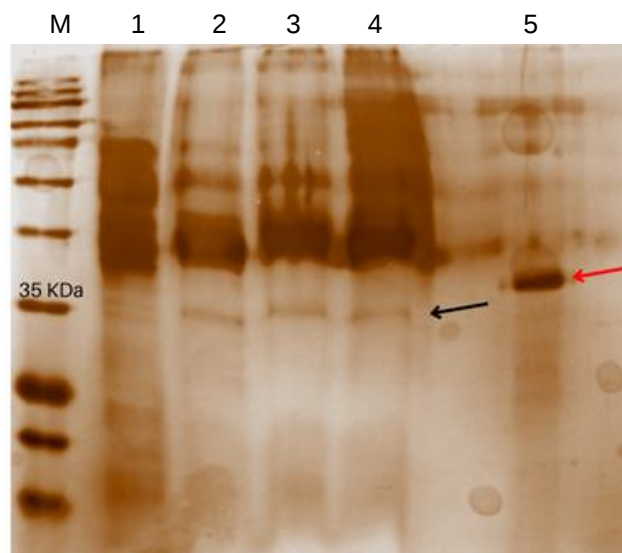


FIGURA 20. SDS PAGE 12% CORADO COM PRATA PARA ANÁLISE DO SOBRENADANTE DE CLONES  $\gamma$ KTC E  $\gamma$ KGC. Coluna M) Marcador; 1) X-33; 2)  $\gamma$ KGC 2; 3)  $\gamma$ KGC 6; 4)  $\gamma$ KTC 31; 5)  $\gamma$ KPC 17 como controle positivo.

Novos testes foram feitos com os clones  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31 cultivados em uma temperatura mais baixa, 25 °C, com o objetivo de confirmar se as bandas de 35 kDa seriam realmente relacionados à quimosina.

Os pré-inóculos foram incubados a 25 °C por 24 h em 25 mL de YPG sob rotação de 200 rpm e posteriormente inoculados em 200 mL de meio YPG novo, para incubação por 48 h a 25 °C para obtenção de pré-inóculo suficiente para triplicatas e cultivos em diferentes temperaturas. A linhagem  $\gamma$ KPC 17 também foi cultivada como um controle positivo da produção de quimosina e amostras sobressalentes de pré-inóculo de cada linhagem foram congeladas para cultivos posteriores.

Os inóculos foram cultivados em 25 ml de YPG, iniciando com uma OD<sub>600</sub> de 3,0 e incubados por 72 h, a 25 °C e 28°C, sendo alimentados a cada 24 h. Amostras foram coletadas a cada 24 h e os sobrenadantes foram ativados com HCl e precipitados para aplicação em gel de poli-acrilamida (**Figura 21**).

No cultivo a 25 °C observamos a presença de uma banda de aproximadamente 36 kDa referente a quimosina nas 3 linhagens testadas. Esse resultado comprovou que as linhagens com os promotores considerados mais fortes,  $\gamma$ KGC e  $\gamma$ KTC enfrentam dificuldades no crescimento e na produção da quimosina quando o cultivo celular é feito em temperaturas mais altas, possivelmente devido ao estresse celular causado pela carga metabólica.

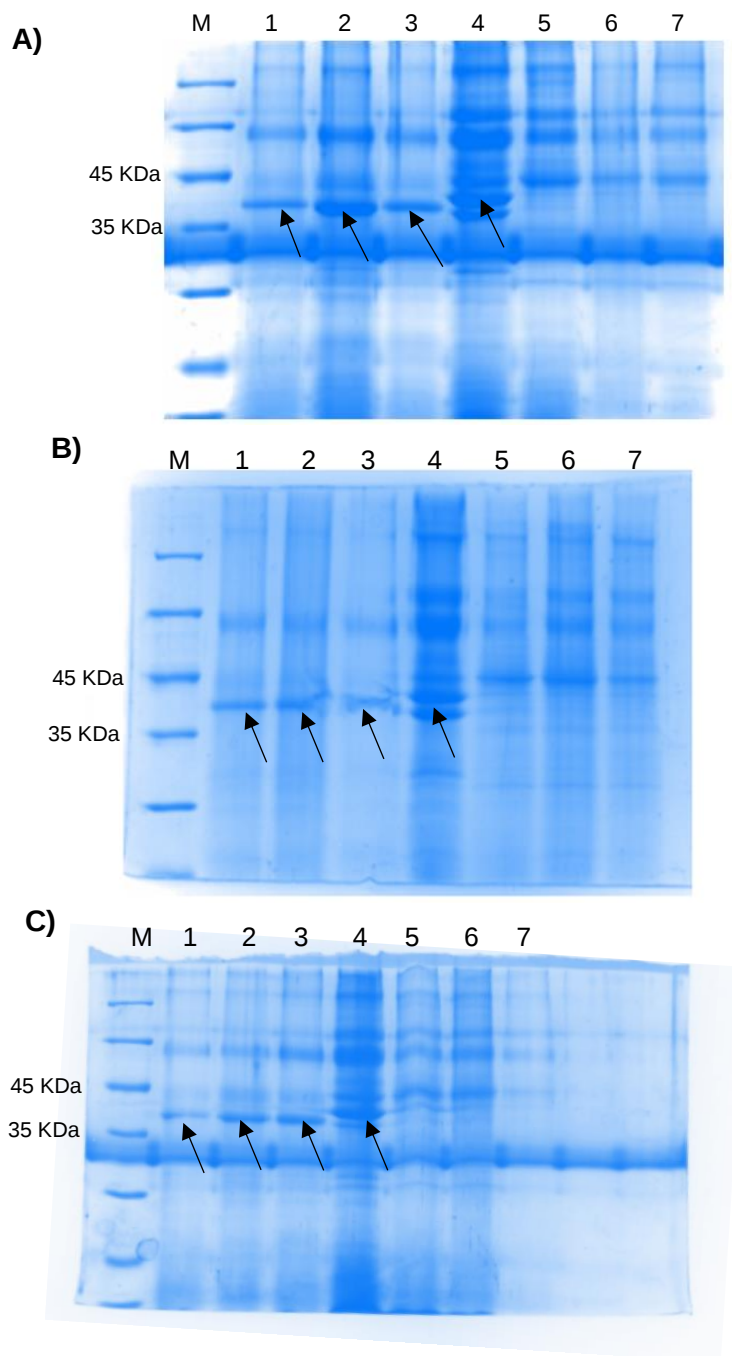


FIGURA 20. SDS PAGE 12% CORADO COM COMASSEI MOSTRANDO A PRESENÇA DE QUIMOSINA NO SOBRENADANTE DE  $\gamma$ KGC 6,  $\gamma$ KTC 31 E  $\gamma$ KPC 17 COM CULTIVO A 25 °C EM MEIO YPG. O sobrenadante coletado foi acidificado com HCl para ativação da pró-quimosina. **A:** colunas M) Marcador; 1)  $\gamma$ KGC 6 24 h; 2)  $\gamma$ KGC 6 48 h 3)  $\gamma$ KGC 6 72 h 4)  $\gamma$ KGC 6 72 h não ativado 5) X-33 24 h 6) X-33 48 h 7) X-33 72 h. **B:** colunas M) Marcador; 1)  $\gamma$ KTC 31 24 h; 2)  $\gamma$ KTC 31 48 h 3)  $\gamma$ KTC 31 72 h 4)  $\gamma$ KTC 31 72 h não ativado 5) X-33 24 h 6) X-33 48 h 7) X-33 72 h. **C:** colunas M) Marcador; 1)  $\gamma$ KPC 17 24 h; 2)  $\gamma$ KPC 17 48 h 3)  $\gamma$ KPC 17 72 h 4)  $\gamma$ KPC 17 72 h não ativado 5) X-33 24 h 6) X-33 48 h 7) X-33 72 h.

O promotor  $P_{PGK}$ , apesar de estar relacionado a uma enzima glicolítica, assim como  $P_{GAP}$ , parece possuir uma força de transcrição moderada em comparação com os demais promotores constitutivos testados, por isso ele pode ser considerado uma alternativa na produção de proteínas heterólogas complexas ou que afetem negativamente o metabolismo da levedura.

Os resultados obtidos através dos géis de poliacrilamida confirmam que a pró-quimosina pode ser expressa e secretada de forma eficiente pelos três promotores constitutivos testados quando a temperatura de cultivo é diminuída para 25 °C.

Apesar do observado neste trabalho e na literatura relacionada, alguns trabalhos publicados buscaram a produção da quimosina recombinante utilizam a temperatura de 30 °C, o que pode explicar, em parte, as baixas quantidades de proteína obtidas nessas pesquisas.

Filkin et al (2020) expressando o gene da quimosina sob a indução do promotor  $P_{AOX1}$  obteve em frasco o equivalente de 20 IMCU/ml. O cultivo foi todo feito a 30 °C, e o teste de coagulação a 37 °C, o que ainda sugere uma superestimação no resultado.

Como apenas na temperatura de 25 °C observamos em  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31 uma banda de mesmo tamanho da quimosina ativada, semelhante ao que encontramos na linhagem  $\gamma$ KPC17, essas três linhagens foram estudadas quanto ao crescimento celular nesta temperatura e atividade de coagulação do leite (**Figura 22**).

Enquanto  $\gamma$ KPC 17 manteve a produção de quimosina acompanhando o crescimento da biomassa celular, acumulando os maiores valores de IMCU/ml ao final das 72 h de cultivo, as linhagens  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31 tiveram um comportamento diferente. Para  $\gamma$ KTC 31, os maiores níveis de IMCU foram obtidos com 48 h de cultivo, declinando após esse período, embora o crescimento celular se mantivesse em fase exponencial.

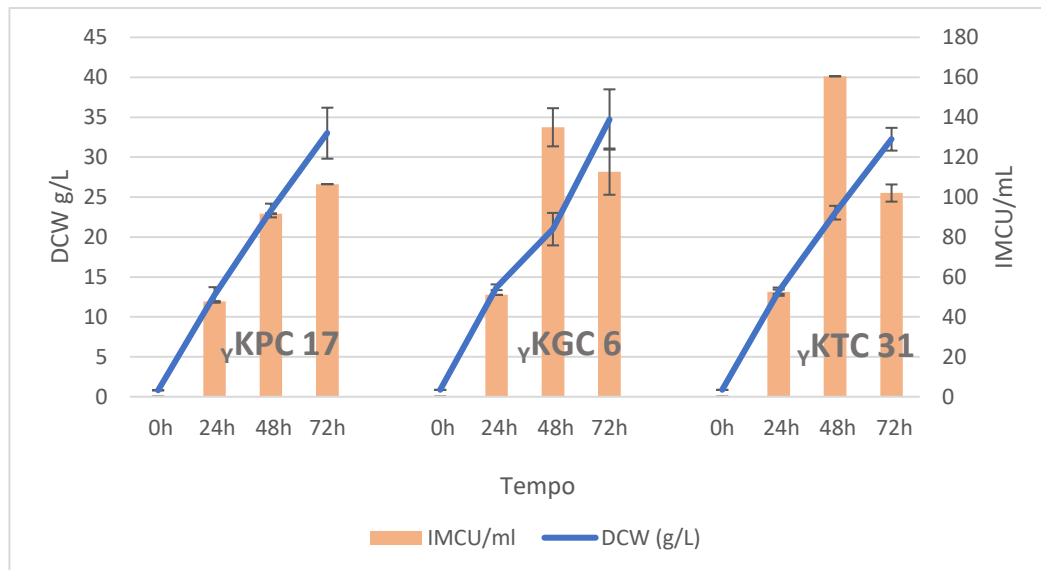


FIGURA 212. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUIMOSINA PELAS LINHAGENS  $\gamma$ KPC 17,  $\gamma$ KGC 6 E  $\gamma$ KTC 31 CULTIVADAS A 25°C EM MEIO YPG.

Com o cultivo durante 48 h a 25 °C o crescimento celular em g/L não apresentou diferença estatística entre as três linhagens nos diferentes tempos. No melhor tempo observado (48 h) a atividade de coagulação em  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31, 134,9 IMCU/ml e 160,5 IMCU/ml, respectivamente, foram maiores que aquela observada para a linhagem  $\gamma$ KPC17, 91,71 IMCU/ml, sendo todas diferentes entre si segundo o teste estatístico aplicado.

Após 72 h de cultivo, as atividades de coagulação das três linhagens foram semelhantes, sendo que para  $\gamma$ KPC 17 observamos um aumento na atividade (106,48 IMCU/ml) em relação à produção de 48 h, e  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31 apresentaram um declínio em comparação, 112,75 IMCU/ml e 102,2 IMCU/ml, respectivamente.

Essa relação de crescimento e produção não acopladas observada em  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31 se diferencia do que é em geral descrito para promotores constitutivos, principalmente para  $P_{GAP}$  (Garcia-Ortega, X. et al, 2016) (Nieto-Taípe, M.A. et al, 2020) que está associado ao crescimento celular por seu papel fundamental na glicólise. Com o uso desse promotor era esperado que a taxa de produção de proteína recombinante fosse acoplada ao crescimento. Para o  $P_{PGK}$ , também associado a uma enzima da via glicolítica, essa tendência foi observada na expressão de lipase (de Macedo, J.R. et al, 2019), e neste trabalho.

A não associação entre crescimento celular e produção de proteína recombinante observada em  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31 parece sugerir a presença de gargalos na via de processamento da proteína quando usamos esses promotores considerados mais fortes.

Nosedá et al (2014) estabeleceu um protocolo de cultivo de *K. phaffii* para a produção de quimosina recombinante induzida por metanol em que a fase de acúmulo de biomassa era realizada a 30 °C com glicerol, e a fase de indução a 25 °C. Quando a produção foi feita em meio BSM em frasco, ao final de 120h de indução obtiveram uma biomassa acumulada de aproximadamente 15 g.L<sup>-1</sup> e 6 IMCU/ml (temperatura de coagulação 37 °C). Esses valores estão bem abaixo dos atingidos no presente trabalho utilizando qualquer um dos promotores constitutivos testados ao invés do P<sub>AOXI</sub>.

Em biorreator obtiveram uma concentração de biomassa de 158g DCW, porém apenas 92 IMCU/ml em meio BSM com metanol (Nosedá, D.G. et al, 2016), o que equivale ao rendimento de 1215 IMCU/g ao final de 120 h de indução.

Para obtenção do rendimento de produção de quimosina por biomassa os valores de IMCU foram convertidos para litro e um gráfico foi plotado com as médias e desvio padrão calculados (**Figura 23**).

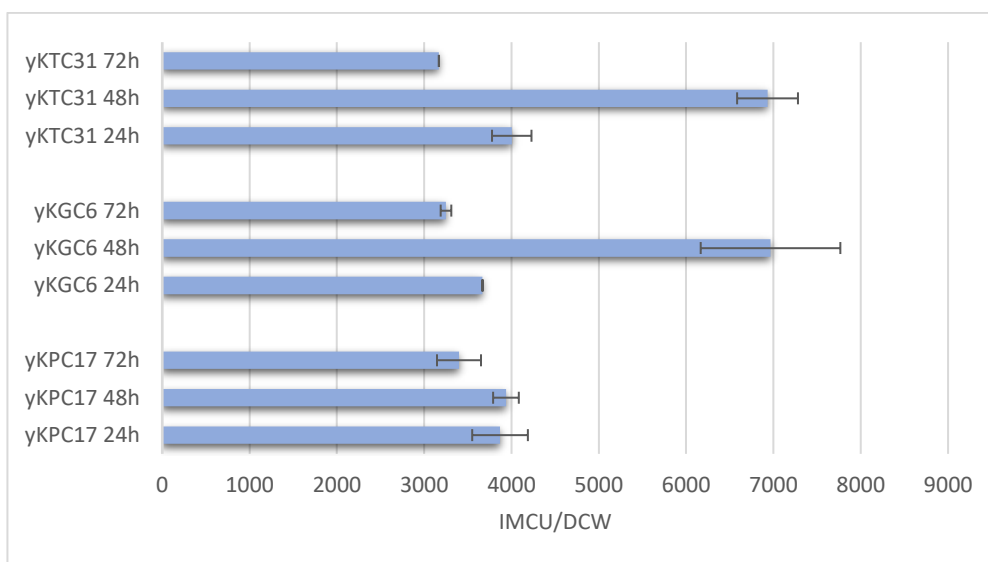


FIGURA 223. RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE QUIMOSINA PARA AS LINHAGENS  $\gamma$ KTC 31,  $\gamma$ PGC 6 E  $\gamma$ KPC 17 COM CULTIVO EM FRASCO EM MEIO YPG E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 25°C .

Com 48 h de crescimento todas as linhagens mostraram seu maior rendimento, sendo que  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31, com os maiores rendimentos na faixa de 7000 IMCU/g, não apresentaram diferença significativa entre si quando o cultivo foi feito a 25 °C. Para

$\gamma$ KPC 17, o rendimento permaneceu constantemente abaixo em relação a  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31.

Os resultados mostram que a diminuição da temperatura de produção parece beneficiar a expressão da proteína quando ela é controlada pelos promotores  $P_{GAP}$  e  $P_{TEF}$ , mas não  $P_{PGK}$  que apresentou um rendimento 44% menor (3936 IMCU).

Esses estudos iniciais, realizados em frasco e com pouco ou mesmo nenhum controle de parâmetros como oxigenação, pH, fonte de carbono e nitrogênio, indicam que os promotores constitutivos  $P_{PGK}$ ,  $P_{GAP}$  e  $P_{TEF}$  são mais eficientes que o promotor  $P_{AOX1}$  na produção de quimosina recombinante.

Uma explicação para a superioridade dos promotores constitutivos em relação ao promotor  $P_{AOX1}$  com indução por metanol na produção da quimosina pode estar no excesso de estresse oxidativo celular gerado.

O uso do metanol como fonte de carbono pela *K. phaffii* tem como consequência a formação de espécies reativas de oxigênio, como o  $H_2O_2$ , e durante o processo fermentativo as células já têm de enfrentar diversos estresses ambientais provenientes do meio de cultura, temperatura, síntese de produtos, entre outros (Lin, N. et al, 2021).

Considerando que esse estresse será somado à carga de EROs gerados no processamento pós-traducional da quimosina para a formação das ligações dissulfeto (Tyo, K.E. et al, 2010) o crescimento e a produtividade podem ficar comprometidos, o que explicaria as atividades enzimáticas baixas na produção de quimosina bovina quando o promotor  $P_{AOX1}$  é usado.

Quando as linhagens são incubadas a 28 °C as atividades de coagulação alcançaram valores significativamente mais altos que os observados na incubação a 25 °C (**Figura 24**), enquanto o acúmulo de biomassa manteve-se estatisticamente semelhante (**Figura 25**).

Ao compararmos a atividade de coagulação no cultivo a 25 °C e 28 °C no tempo 48 h vemos um aumento nas atividades das três linhagens testadas. Para  $\gamma$ KPC 17 observamos que o IMCU vai de 92 para 218 IMCU/ml,  $\gamma$ KGC 6 é 135 IMCU/ml a 25 °C e 180 IMCU/ml a 28 °C, e na linhagem  $\gamma$ KTC 31 a já alta atividade de coagulação observada de 160 IMCU/ml alcança 225 IMCU/ml no crescimento a 28 °C.

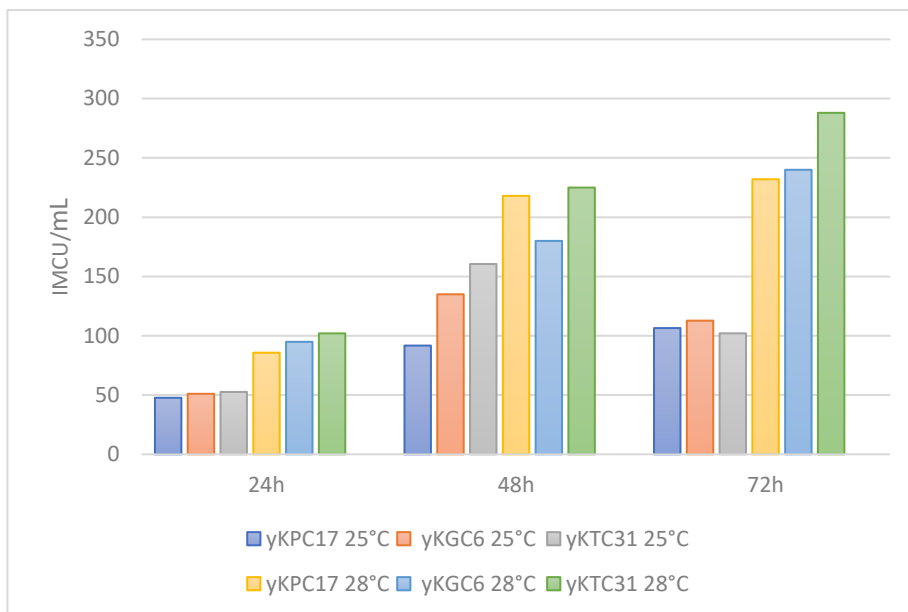


FIGURA 24. ATIVIDADE DE COAGULAÇÃO DA QUIMOSINA RECOMBINANTE OBTIDA NO SOBRENADANTE DAS LINHAGENS  $\gamma$ KPC 17,  $\gamma$ KGC 6 E  $\gamma$ KTC 31 NAS TEMPERATURAS DE CULTIVO 25°C E 28°C EM MEIO YPG.

Também observamos que a produção de quimosina a 28 °C acompanhou o acúmulo de biomassa para todas as três linhagens testadas, diferentemente do observado no cultivo a 25 °C, quando após 48h um maior crescimento celular não resultou em maiores atividades de coagulação para os clones  $\gamma$ KGC 6 e  $\gamma$ KTC 31.

Como a produção de quimosina acompanhou a tendência de aumentar em relação ao acúmulo de biomassa, todas as linhagens tiveram suas maiores atividades com 72h de cultivo.

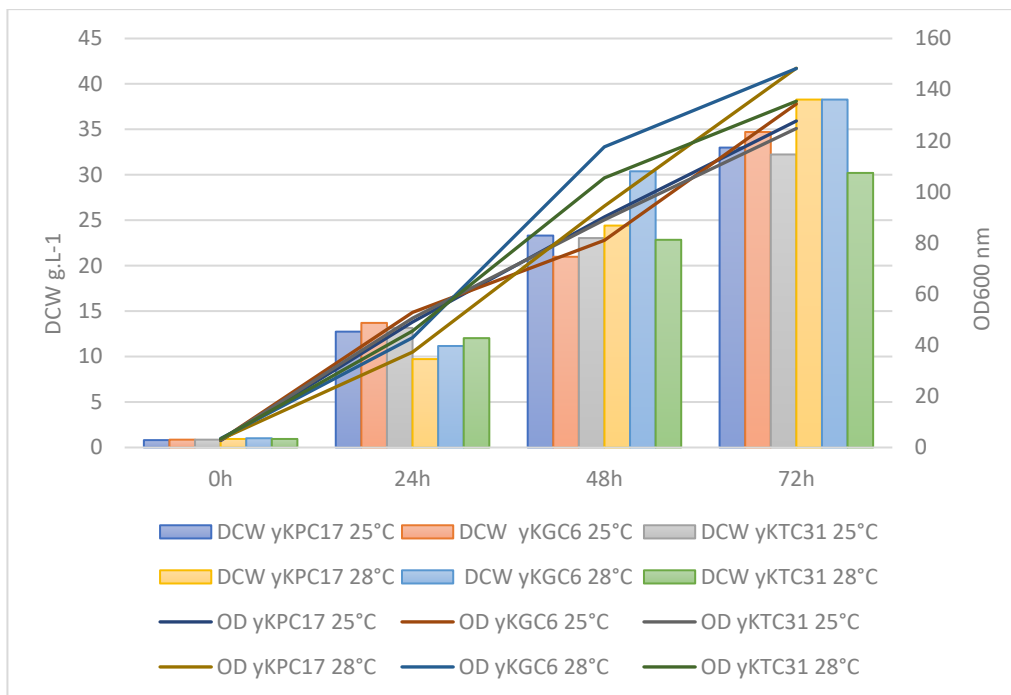


FIGURA 25. CRESCIMENTO CELULAR DAS LINHAGENS  $\gamma$ KPC 17,  $\gamma$ KGC 6 E  $\gamma$ KTC 31 NAS TEMPERATURAS DE CULTIVO 25°C E 28°C EM MEIO YPG.

O aumento na temperatura de produção possibilitou que  $\gamma$ KPC 17 atingisse ao final do cultivo 232 IMCU/ml.

Entre as três linhagens testadas aquela com a expressão do gene da pró-quimosina controlada pelo promotor  $P_{TEF}$  foi a que alcançou os maiores valores de IMCU.ml<sup>-1</sup> ao final do cultivo.

Ao calcularmos o rendimento para cada linhagem (**Figura 26**),  $\gamma$ KPC 17 mantém, durante 48 h, o melhor rendimento entre atividade de coagulação e biomassa. O clone  $\gamma$ KGC 6 apresentou um decaimento pronunciado após 48 h de incubação a 28 °C.

Durante as 72 h de cultivo, a linhagem  $\gamma$ KTC 31 mostrou um rendimento constante entre atividade de coagulação e biomassa acumulada.

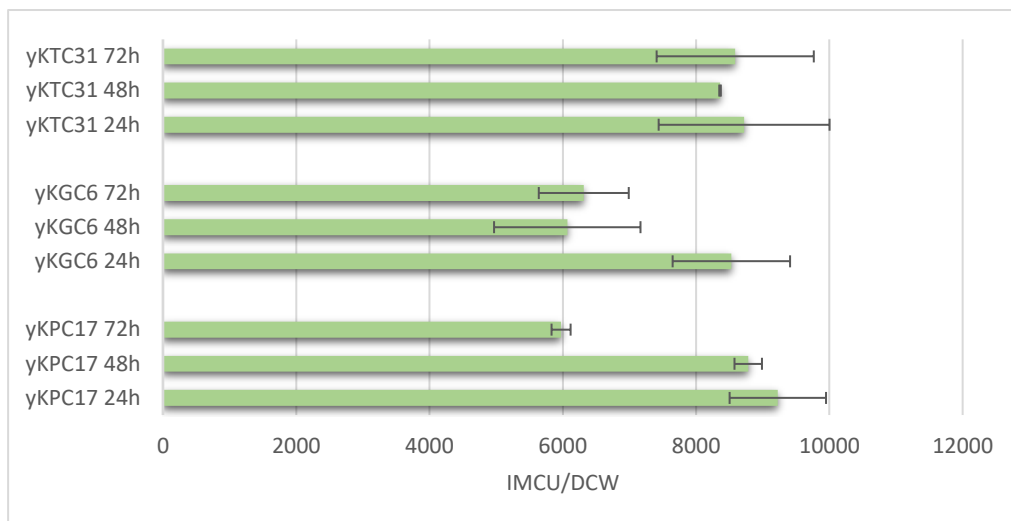


FIGURA 26. RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE QUIMOSINA PARA AS LINHAGENS  $\gamma$ KTC 31,  $\gamma$ PGC 6 E  $\gamma$ KPC 17 COM CULTIVO EM FRASCO EM MEIO YPG E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 28°C

No melhor tempo (48 h) a linhagem  $\gamma$ KTC 31 apresentou a maior produtividade média ( $PM = IMCU.L^{-1}.t^{-1}$ ) equivalente a 4729  $IMCU.L^{-1}.t^{-1}$  e com o rendimento por grama de célula estatisticamente igual ao obtido em  $\gamma$ KPC 17 (Figura 27).

A linhagem  $\gamma$ KGC 6 apresentou os menores valores de produtividade média e rendimento, 3750  $IMCU.L^{-1}.t^{-1}$  e 6067  $IMCU/g$  respectivamente, nas mesmas condições de cultivo.

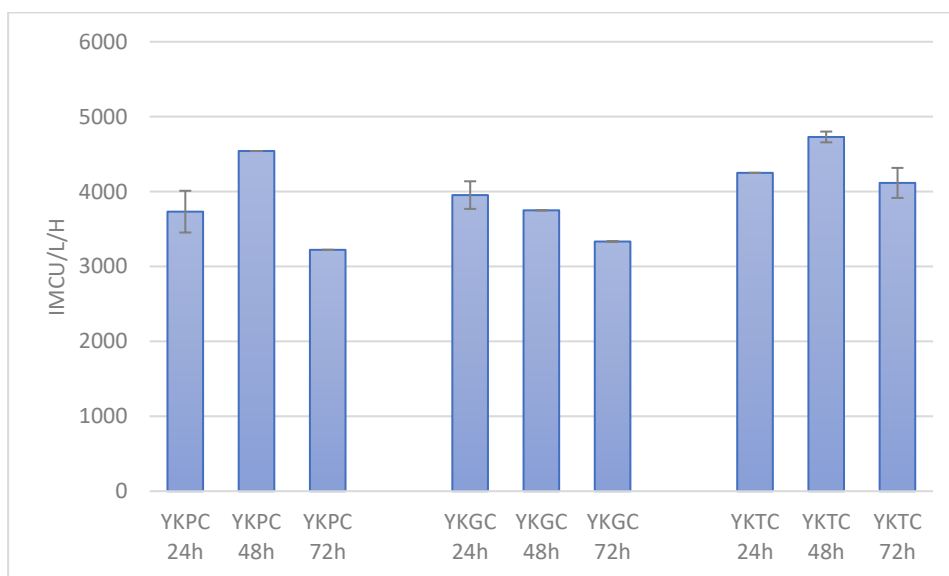


FIGURA 23. PRODUTIVIDADE MÉDIA DAS LINHAGENS YKPC 17, YKGC 6 E YKTC 31 NA TEMPERATURA DE CULTIVO DE 28 °C.

Considerando que os promotores  $P_{TEF}$  e  $P_{GAP}$  são comumente referidos na literatura como promotores igualmente fortes (Shen, Q. et al, 2021) a explicação para essa

diferença na produtividade média poderia estar no número de cópias do gene de interesse nos diferentes clones.

O número de cópias do gene da quimosina foi quantificado para cada linhagem estudada utilizando PCR em tempo real. O gene *HIS4* foi selecionado como controle interno de cópia única. A análise utilizou o método de quantificação absoluta e as curvas padrão utilizadas abrangeram a faixa de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^7$  cópias do gene de interesse.

O número de cópias do gene da pró-quimosina quantificado para cada linhagem foi de 1 cópia para  $\gamma$ KPC 17 e  $\gamma$ KTC 31, e 3 cópias presentes na linhagem  $\gamma$ KGC 6.

A linhagem  $\gamma$ KGC 6, apesar de ter um maior número de cópias do gene de interesse, apresentou os menores valores de IMCU.ml<sup>-1</sup>. Assim como observado por Mellitzer et al (2014) ao expressar a enzima  $\beta$ -manase de *Trichoderma reesei* com P<sub>AOX1</sub>, P<sub>GAP</sub> e P<sub>EN</sub> em *K. phaffii*, a combinação do uso de um promotor forte e a alta dosagem genética pode resultar em um maior nível de transcrição, que acaba por sobrecarregar a maquinaria de dobramento e secreção da célula. O resultado é a diminuição dos níveis de atividade enzimática obtidos a partir do sobrenadante.

Essa tendência é corroborada com o rendimento mais alto observado quando a temperatura de crescimento de  $\gamma$ KGC 6 é mais baixa e, ao diminuir o metabolismo celular, foi possível atingir 7000 IMCU/g em 48h em comparação com 6000 IMCU/g, no mesmo tempo, quando o cultivo foi feito a 28 °C .

O custo biossintético primário parece ser a superexpressão de proteínas e não o custo de replicação na presença de alto número de cópias integradas ao genoma de genes heterólogos (Eguchi et al., 2018; He et al., 2020; Yu et al., 2020). Consistente com isso, uma correlação não linear entre a produção de proteína e a dosagem genética é frequentemente observada na produção de proteínas recombinantes em leveduras (Mellitzer et al., 2014; Cámara et al., 2016; Huang et al., 2018; He et al., 2020).

Ao que tudo indica, as células possuem mecanismos para regular negativamente genes heterólogos ao atingir um determinado patamar de dosagem genética, e o limiar ideal para dosagem genética varia entre os estudos e depende da proteína de interesse (Mellitzer et al., 2012 e 2014). O aumento do número de cópias genéticas para algumas proteínas heterólogas resultou em maiores rendimentos de proteína ativa, enquanto para

outras os rendimentos permaneceram constantes ou até diminuíram (Mellitzer et al., 2012, 2014).

Considerando os dados de IMCU/ml e IMCU/g a expressão do gene da quimosina presente em uma cópia e controlada pelo promotor  $P_{TEF}$  foi a que apresentou os melhores desempenhos entre os três promotores testados nas fermentações em 25 °C e 28 °C.

## CONCLUSÕES

A expressão e secreção de quimosina bovina recombinante foi possível com os promotores  $P_{PGK}$ ,  $P_{TEF}$  e  $P_{GAP}$ .

O promotor  $P_{PGK}$  foi o único dos promotores testados que permitiu a expressão e secreção eficientes de quantidades significativas de quimosina bovina recombinante nas temperaturas de 25 °C, 28 °C e 30 °C.

As maiores atividades de coagulação e rendimento por biomassa foram obtidas com o uso do promotor  $P_{TEF}$  quando o pré-inóculo foi produzido a 25 °C e a produção foi realizada a 28 °C. As atividades de coagulação observadas superaram as obtidas em outros trabalhos publicados.

Um maior número de cópias do gene de interesse não se traduziu em maiores atividades de coagulação, pois o limiar ideal para dosagem genética depende das características da proteína de interesse, como a presença de muitas ligações dissulfeto.

A quimosina secretada pela *K. phaffii* passou pelo processo de purificação de cromatografia de exclusão, o que resultou na obtenção de 670 mg/L de quimosina recombinante.

A quimosina recombinante produzida pela levedura *K. phaffii* apresenta as mesmas características das quimosinas comerciais de especificidade de substrato e termoestabilidade, apresentando-se como uma alternativa viável para a produção industrial nacional dessa enzima.

## BIBLIOGRAFIA

- Aboulnaga, E. A. (março de 2019). Cloning and Expression of Camel Pro-Chymosin Encoding Gene in E. coli and Characterization of the Obtained Active Enzyme. *Journal of Food and Dairy Sciences*, pp. 71-78.
- Ahn, J, et al. (2007). Translation elongation factor 1- $\alpha$  gene from *Pichia pastoris*: Molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Applied Microbiology Biotechnology*.
- Akischev, Z. et al. (2021). Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*. *Helyion*.
- Almeida, J.R.M, et al. (20 de julho de 2005). Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1 ) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, pp. 725-737.
- Araújo, J. (2008). *Produção de quimosina B em Pichia pastoris*. Brasília: Universidade de Brasília.
- Archer, D. B. (2000). Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Current Opinion in Biotechnology*, pp. 478-483.
- Arnau, Gasset, et al. (2022). Innovative Bioprocess Strategies Combining Physiological Control and Strain Engineering of *Pichia pastoris* to Improve Recombinant Protein Production. *Frontier in Bioengineering and Biotechnology*.
- Ata, O. et al . (2021). What makes *Komagataella phaffii* non-conventional? *FEMS Yeast Research*.
- Baptistello, C. (2019). *Produção de quimosina bovina em clones de Komagataella phaffii contendo múltiplas cópias do gene codificador*. Brasília: Universidade de Brasília.
- Barros, R. (2019). *Expressão heteróloga de duas lipases em Komagataella phaffii utilizando promotores constitutivos*. Brasília: Universidade de Brasília.
- Baumann, K, et al. (2008). Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*.

- BCC Publishing. (2018). *BCC Research Market research reports global markets for enzymes in industrial applications; 2018*. Fonte: BCC Research: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications-bio030k.html>
- Benoliel, T. (2019). Estudo dos mecanismos de resposta ao estresse fermentativo em *Zymomonas mobilis*. *Tese de Doutorado*. Brasília, DF: Universidade de Brasília.
- Beppu, T. (1983). The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends in Biotechnology*.
- Betancur, M. (2017). *Estratégias para Integração Múltipla de Cassetes de expressão no genoma de Komagataella phaffii*. Brasília: Universidade de Brasília.
- Betancur, M.O. et al. (2014). *Desenvolvimento de linhagem auxotrófica de Pichia pastoris para o metabolismo de leucina*. Brasília: Universidade de Brasília.
- Betancur, M.O. et al. (2017). Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic. *Microbial cell factories*.
- Bhatwa, A. et al. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontier in Bioengineering and Biotechnology*.
- Cankorur-Cetinkaya, A. et al. (2018). Process development for the continuous production of heterologous proteins by the industrial yeast, *Komagataella phaffii*. *Biotechnology Bioengineering*.
- Carra, S. et al. (2020). High lactobionic acid production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells: a great step for large-scale process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- Caspi et al. (2020). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. *Nucleic Acids Research*, pp. D445–D453.
- Chambers, A et al. (12 de setembro de 1988). The UAS of the yeast PGK gene is composed of multiple functional elements. *Nucleic Acids Research*, pp. 8245-8260.

- Chatzi, K. E., et al. (2017). Preprotein mature domains contain translocase targeting signals that are essential for secretion. *The Journal of cell biology*, pp. 1357-1369.
- Chen, H. et al. (2000). Functional implications of disulfide bond, Cys206-Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochemistry*, pp. 12140-12148.
- Chen, J. (2018). *Food Enzymes: Global Markets*. Fonte: BBC Research: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/food-enzymes-global-markets.html>
- Cheng, C.C. et al. (2021). Influence of Chymosin on Physicochemical and Hydrolysis Characteristics of Casein Micelles and Individual Caseins. *Nanomaterials*.
- Chung-Jr Huang et al. (2011). A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- CNI. (2013). *Bioeconomia: uma agenda para o Brasil*. Brasília: Harvard Business Review Analytic Services.
- Cortez, M. A. (2017). Composição do Leite. Em A. G. Luiz Augusto Nero, *Produção, Processamento e Fiscalização de Leite e Derivados* (pp. 33-74). São Paulo: Atheneu.
- Coton, M et al. (2004). *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Letters in Applied Microbiology*, pp. 152-157.
- Coton, M et al. (2006). Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, pp. 121-125.
- Cregg, J. M., et al. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular Cell Biology*.
- Dalgleish, D. (1995). The Enzymatic Coagulation of Milk. Em P. F. Fox, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. New York: Springer.
- de Macedo, J.R. et al. (2019). Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica*

under the constitutive promoter PGK in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*.

Deckers, M. et al. (2020). Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods*.

Deng, M. et al. (2022). Efficient Bioproduction of Human Milk Alpha-Lactalbumin in *Komagataella phaffii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , pp. 2664-2672.

DiMarco A.A. & Romano A.H. (1985). D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 151–157.

Dragosits, M. et al. (2009). The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of proteome research*.

Dunn-Coleman, N. et al . (1991). Commercial Levels of Chymosin Production by *Aspergillus*. *Nature Biotechnology*, pp. 976-981.

EMBRAPA. (2015). *Produção de enzimas é segmento estratégico para a economia verde*.

Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7691362/producao-de-enzimas-e-segmento-estrategico-para-a-economia-verde#:~:text=Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20enzimas%20%C3%A9%20segmento%20estrat%C3%A9gico%20para%20a%20economia%20verde,-Tweetar&text=A%20ce>

EMBRAPA. (2020). *Mistura de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir de bagaço de cana*.

Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana#:~:text=Desenvolvimento%20e%20Inova%C3%A7%C3%A3o-,Mistura%20de%20enzimas%20mostrou%20alto%20desempenho%20pa>

EMBRAPA Agroenergia. (2011). *Biorrefinarias*. *Biorrefinarias*. Brasília: EMBRAPA.

EMBRAPA Agroenergia. (2011). *Biorrefinarias*. Brasília: EMBRAPA.

Ergün, B.G. et al. (2021). Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from transcriptionally redesigned strains to bioprocess optimization and metabolic modelling. *FEMS Yeast Research*.

- Erin R. Green & Joan Meccas. (2016). Bacterial Secretion Systems - An overview. *Microbiology Spectrum*.
- FAO. (2011). *Global Food Losses*. Fonte: <http://www.fao.org/3/i2697e/i2697e.pdf>
- Felczacki, M.M. et al. (2018). Expression of Phosphofructokinase Is Not Sufficient to Enable Embden-Meyerhof-Parnas Glycolysis in *Zymomonas mobilis* ZM4. *Frontiers in Microbiology*.
- Feng-Jie, J. et al. (2021). Advances in Genetic Engineering Technology and its application in the industrial fungus *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in Microbiology*.
- FGV Projetos e Anufood Brazil. (2019). *O setor de laticínios no Brasil e suas interações com o mercado internacional*.
- Filkin, S.Y. et al. (2020). Optimization of the production method for recombinant chymosin in the methylotrophic yeast *K. phaffii*. *Applied Biochemistry and Microbiology*.
- Flamm, E. (1991). How FDA Approved Chymosin: A Case History. *Nature Biotechnology*, pp. 349–351.
- Foltmann, B. (1992). Chymosin: A short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, pp. 65-79.
- Galanakis, M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*.
- Garcia-Ortega, X. et al. (2016). A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochemistry*.
- Gasser, B. et al. (2007). Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genomics*.
- Gasset, A. et al. (2022). Innovative Bioprocess Strategies Combining Physiological Control and Strain Engineering of *Pichia pastoris* to improve Recombinant protein production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.

- Glick, B.R. et al. (1995). Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. *Bioechnology Advances*.
- Global Data. (2022). *Brazil Cheese (Dairy and Soy Food) Market Size, Growth and Forecast Analytics, 2021-2025*.
- Heyland, J. et al. (2011). Carbon metabolism limits recombinant protein production in *P. pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 1942 - 1953.
- Jensen, L et al. (2013). Camel and Bovine Chymosin: The Relationship between Their Structures and Cheese-Making Properties. *Acta Crystallographica Section D*, pp. 901-913.
- Jiang, X.P. et al. (2012). Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World Journal of Microbiology Biotechnenology*, pp. 2087-2093.
- Jiang, X.P. et al. (2012). Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World Journal of Microbiology Biotechnology*.
- Jiao, L et al. (maio de 2018). New insight into the method of posttransformational vector amplification (PTVA) in *Pichia pastoris*. *Journal of Microbiological Methods*, pp. 151-154.
- Jin, Q. et al. (2018). Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends in Food Science & Technology*.
- Joan Lin, C. & James, M. C. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Johns M.R. et al. (1991). Byproducts from *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.
- Johnson, M.E. & Lucey, J.A. (2006). Major Technological Advances and Trends in Cheese. *Journal of Dairy Science*.
- Juturu, V. & Wu, J. C. (2018). Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem*.

- Kapralk. F. et al. (1991). Fermentation Condition for High-Level Expression of the tac-Promoter-Controlled Calf Prochymosin cDNA in Escherichia coli HB101. *Biotechnology & Bioengineering*, pp. 71-79.
- Kaur, J., et al. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in E.coli: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Kenny, B. et al. (1991). Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from Escherichia coli PCM, CAT or B-galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain. *Molecular Microbiology*.
- Kerr, A. L. et al. (2011). DNA restriction-modification systems in the ethanologen, *Zymomonas mobilis* ZM4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 393-408.
- Klessen, C., et al. (1999). Complete Secretion of activable bovine prochymosin by genetically engineered L forms of *Proteus mirabilis*. *Applied and environmental microbiology*, pp. 1009-1015.
- Kluge, J. et al. (2018). Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Kocabas, D. & Grumet, R. (2019). Evolving regulatory policies regarding food enzymes produced by recombinant microorganisms. *GM Crops & Food*.
- Kumar, A. (2019). *Global Food Waste Management Market*. Fonte: BBC Research: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/food-waste-management-market-report.html>
- Kumar, A. et al. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, pp. 248-253.
- Lars-Göran Josefsson & Linda L. Randall. (1981). Different exported proteins in E.coli show differences in the temporal mode of processing in vivo. *Cell*.
- LEE, H. W. (2008). *KR Patente N° WO/2007/058407*.

- Lin, N. et al. (2021). Oxidative stress tolerance contributes to heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*.
- Linger, J.G. et al. (2010). Heterologous Expression and Extracellular Secretion of Cellulolytic Enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Little, S. et al. (1989). A short N-proximal region of prochymosin inhibits the secretion of hybrid proteins from *Escherichia*. *Gene*.
- Liu, X. et al. (2021). Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. *Food Research International*.
- Luerce, T.D., et al. (2014). Recombinant *Lactococcus lactis* fails to secrete bovine chymosin. *Bioengineered*, pp. 363-370.
- Martien, J.I. et al. (2019). Systems-Level Analysis of Oxygen Exposure in *Zymomonas mobilis*: Implications for Isoprenoid Production. *mSystems*, pp. 1- 23.
- Mattanovich, D. et al. (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology*.
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J. et al. (2 de junho de 2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*.
- McCaman, M. (1988). Fragments of Prochymosin Produced in *Escherichia coli* Form Insoluble Inclusion Bodies. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- McCaman, M. T. (1989). Fragments of prochymosin produced in *Escherichia coli* form insoluble inclusion bodies. *Journal of Bacteriology*, pp. 1225-1227.
- McCormick, K & Kautto, N. (2013). The Bioeconomy in Europe: An Overview. *Sustainability*.
- Mellitzer, A. et al. (2014). Synergistic modular promoter and gene optimization to push cellulase secretion by *Pichia pastoris* beyond existing benchmarks. *Journal of Biotechnology*, pp. 187-195.
- Mellor, J et al. (1983). Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*.

- Menzella, Hugo G. et al. (2003). Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 809-817.
- Mohanty, A.K., et al. (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, pp. 205–217.
- Moreira, L.F. (2019). Do campo para a indústria química: oportunidades para o Brasil da Bioeconomia mundial. *FGV*.
- Nieto-Taípe, M.A. et al. (2020). Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Microbial Biotechnology*.
- Nosedá, D.G. et al. (2014). Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia pastoris* (*Komagataella*) *pastoris* under methanol-inducible AOX1 promoter. *Protein Expression and Purification*.
- Nosedá, D.G. et al. (2016). Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by high-level expression transformant clone of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, pp. 112-121.
- Nosedá, D.G. et al. (2016). Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by a high-level expression transformant clone of *P. pastoris*. *Protein Expression and Purification*.
- Ogel, Z. (2018). *Microbial cultures and enzymes in dairy - Microbial Production of recombinant rennet: recent developments*. IGI Global.
- Ogel, Z. B. (2018). Microbial Production of Recombinant Rennet: Recent Developments. Em Ş. Ö. Budak, & H. C. Akal, *Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology* (pp. 222-233). Hershey: IGI Global.
- Okafor, N. (1978-5). Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, pp. 81-88.
- Panesar, S.P. et al. (2006). *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, pp. 623-635.

- Parente, D., et al. (1991). Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, pp. 243-249.
- Peekhaus, N. & Conway, T. (1998). What's for Dinner?: Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, pp. 3495–3502.
- Penna, A.L.B , Gigante, M.L., Todorov, S.D. (2021). Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. *Foods*.
- Pérez, A. (2018). *Produção de Fator de Crescimento Epidérmico em Komagataella phaffii*. Brasília: Universidade de Brasília.
- Piva, L.C. et al. (2017). Molecular strategies to increase the levels of heterologous transcripts in *Komagataella phaffii* for protein production. *Bioengineered*.
- Proud, C. G. (1994). Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Molecular Biology Reports. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges*. (s.d.).
- Robert, J.M. et al. (15 de julho de 2019). Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* under the constitutive promoter PGK in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, pp. 39-47.
- Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J. et al. . (17 de setembro de 2010). Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*.
- Rosano, Germán L. & Ceccarelli, E. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, pp. 1-17.
- Rothschild-Mancinelli, K. et al. (2020). Bottlenecks and Future Outlooks for High-Throughput Technologies for Filamentous Fungi. Em H. Nevalainen, *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*. (pp. 165–178). Springer, Cham.
- Santos, B.S. et al. (2018). High concentrations of saccharose lead to metabolic changes that favor the formation of co-products in ethanolic fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Genetics and Molecular Research*.
- Scarlat, N. . (2015). The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: policies and facts. *Environmental Development*, pp. 3-34.

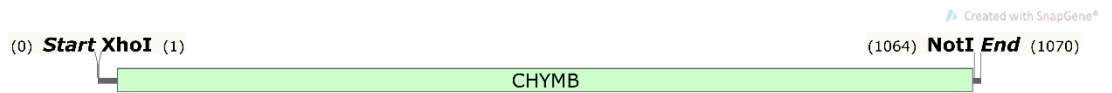
- Schoemaker, J. M. et al. (1985). Examination of calf prochymosin accumulation in *Escherichia coli*: disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. *The EMBO journal*, pp. 775-780.
- Schoemaker, J.M. , et al. (1985). Examination of calf prochymosin accumulation in *Escherichia coli*: disulphide linkages are structural component of prochymosin containing inclusion bodies. *The EMBO Journal*, pp. 775-780.
- Scott D.Pope & Ruslan Medzhitov. (2 de agosto de 2018). Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Molecular Cell*, pp. 389-397.
- Seo, J.S. et al. (2005). The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature Biotechnology*, pp. 63-68.
- Seo, Jeong Sun et al. (2005). The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature Biotechnology*, pp. 63-68.
- Shen, Q. et al. (2021). Identification of a novel promoter for driving antibiotic-resistant genes to reduce the metabolic burden during protein expression and effectively select multiple integrations in *Pichia Pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Silva, M.F.O. et al. (2018). *A Bioeconomia Brasileira em Números*. Brasília: BNDES Setorial 47.
- Singh, R. et al. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. . 3 *Biotech*.
- Stadlmayr, G. et al. (2010). Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *Journal of Biotechnology*.
- Swings, J.; De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological reviews*.
- Theron, L. (2013). *Expression and purification of recombinant extracellular proteases originating from non-Saccharomyces yeasts*. Stellenbosch University.
- Thompson, C. A. (2010). FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema. American journal of health-system pharmacy. *AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*.

- Todhanakasem, T. et al. (2019). Expression and Extracellular Secretion of Endoglucanase and Xylanase by *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Tseng, H & Small, H. (2019). Quantification of knowledge content of a high impact innovation: recombinant DNA. *Helyon*.
- Tsirigotaki, A. , et al. (2017). Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nature Reviews Microbiology*.
- Tyo, K.E. et al. (2010). Imbalance of heterologous protein folding and disulfide bond formation rates yields runaway oxidative stress. *BMC Biology*.
- Vallejo, J.A. et al. (2012). Short communication: a comparative analysis of recombinant chymosins. *Journal of Dairy Science*.
- Van den Brink,H. et al. (2006). Increased production of chymosin by glycosylation. *Journal of Biotechnology*.
- van den Dungen, M.W. et al. (2021). The safety of a *Kluyveromyces lactis* strain lineage for enzyme production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.
- Vassileva A, et al. (2000). Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Biotechnology*.
- Vera, J.M. et al. (2020). Genome-scale Transcription-Translation Mapping Reveals Features of *Zymomonas mobilis* Transcription Units and Promoters. *mSystems*, pp. 1- 21.
- Vogl, T. & Glieder, A. (2013). Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *Nature Biotechnology*.
- Vogl, T. et al. (2017). Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Wang, N. et al. (2022). The introduction of an N.glycosylation site into prochymosin greatly enhances its production and secretion by *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*.

- Waterham, H. R. et al. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*.
- Wegner, E. H. (1981). *USA Patente N° US4414329A*.
- Wei, C. et al. (1999). Oxidative refolding of recombinant prochymosin. *Biochemical Journal*.
- Wei, C. et al. (2000). Chaperone-Mediated Refolding of Recombinant Prochymosin. *Journal of Protein Chemistry*.
- Wu, Bo et al. (2014). Construction of a novel secretion expression system guided by native signal peptide of PhoD in *Zymomonas mobilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, pp. 708-713.
- Wu, Bo; He, Ming Xiong; Feng, Hong; Shui, Zong Xia; Tang, Xiao Yu; Hu, Qi Chun and Zhang, Yi Zheng. (2014). Construction of a novel secretion expression system guided by native signal peptide of PhoD in *Zymomonas mobilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, pp. 708-713.
- Wu, S., & Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*.
- Yanase, H. et al. (2005). Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*.
- Yang, S. et al. (2009). Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nature Biotechnology*, pp. 893-894.
- Yang, S. et al. (2009). Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. *BMC Genomics*, pp. 1- 16.
- Yang, S. et al. (2018). Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032. *Biotechnology for Biofuels*.
- Zhang, B. et al. (2022). Efficient Secretory Expression and Purification of Food-Grade Porcine Myoglobin in *Komagataella phaffii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 10235-10245.

Zheng, X. et al. (2011). Leaderless genes in bacteria: clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *BMC Genomics*, pp. 1 - 13.

# ANEXOS

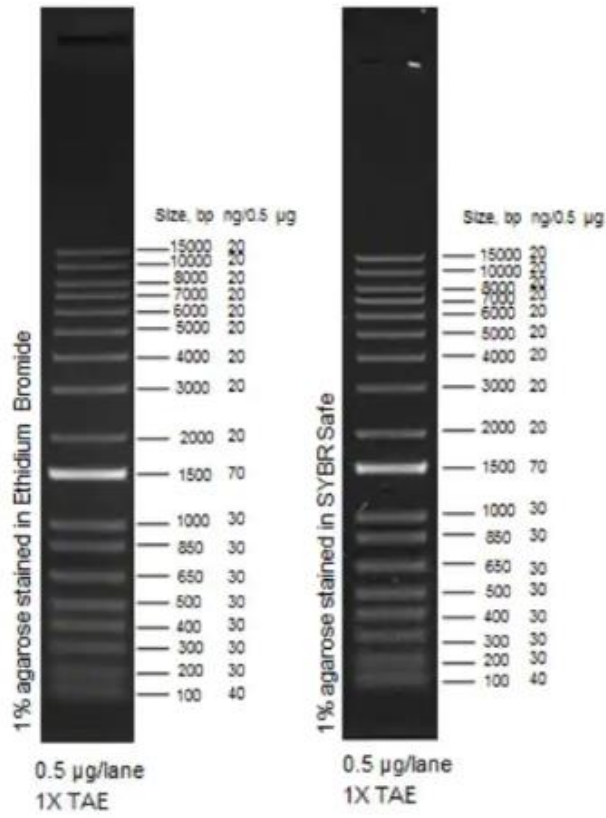


**CHYMB**  
1070 bp

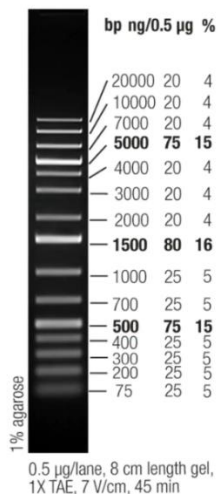
```
CTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTGCTGAGATCACTAGAATCCCATTGTACAAGGGTAAG
TACGGTATCTCTTCTAAGTACTCTGGTTTCGGTGAGGTTGCTTCTGTTCCATTGACTAAC
TACTTGGACTCTCAATACTTCGGTAAGATTTACTTGGGTACTCCACCACAAGAGTTCACT
GTTTTGTTTCGACACTGGTTCTTCTGACTTCTGGGTTCCATCTATCTACTGTAAGTCTAAC
GCTTGTAAAGAACCACAAAGATTCGACCCAAGAAAGTCTTCTACTTTCCAAAACCTGGGT
AAGCCATTGTCTATCCACTACGGTACTGGTTCATGCAAGGTATCTTGGGTTACGACACT
GTTACTGTTTCTAACATCGTTGACATCCAACAACTGTTGGTTTGTCTACTCAAGAGCCA
GGTGACGTTTTTCACTTACGCTGAGTTCGACGGTATCTTGGGTATGGCTTACCCATCTTTG
GCTTCTGAGTACTCTATCCCAGTTTTTCGACAACATGATGAACAGACACTTGGTTGCTCAA
GACTTGTCTCTGTTTACATGGACAGAAACGGTCAAGAGTCTATGTTGACTTTGGGTGCT
ATCAACCCATCTTACTACACTGGTCTTTGCACTGGGTTCCAGTTACTGTTCAACAATAC
TGGCAATTCACTGTTGACTCTGTTACTATCTCTGGTGTGTTGTTGCTTGTGAGGGTGGT
TGTCAAGCTATCTTGGACACTGGTACTTCTAAGTTGGTTGGTCCATCTTCTGACATCTTG
AACATCCAACAAGCTATCGGTGCTACTCAAAACCAATACGGTGAGTTCGACATCGACTGT
GACAACTTGTCTTACATGCCAACTGTTGTTTTTCGAGATCAACGGTAAGATGTACCCATTG
ACTCCATCTGCTTACACTTCTCAAGACCAAGGTTTCTGTACTTCTGGTTTCCAATCTGAG
AACCCTCTCAAAGTGGATCTTGGGTGACGTTTTTCATCAGAGAGTACTACTCTGTTTTTC
GACAGAGCTAACAACTTGGTTGGTTTGGCTAAGGCTATCTAAGCGGCCGC
```

**Anexo 1.** Mapa linear e sequência do oligonucleotídeos de 1070 pb sintetizado para tradução otimizada em *K. phaffii*, retendo 76,14% de similaridade com o gene nativo da quimosina bovina. Em cinza as sequencias correspondentes aos sítios de restrição XhoI e NotI, para ligação nos vetores pPIC (promotor). Em laranja os sítios de ação das proteases KEX2/STE13 que foram adicionados para a perfeita remoção dos sinais de

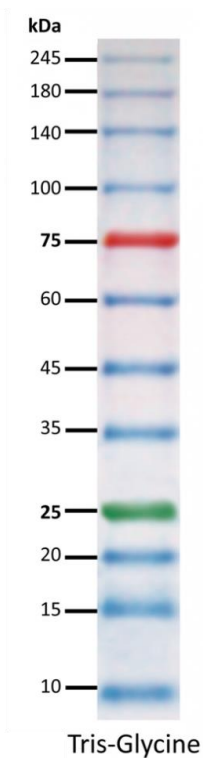
secreção de levedura e liberação da pró-quimosina. A região em azul corresponde à sequência da pró-quimosina.



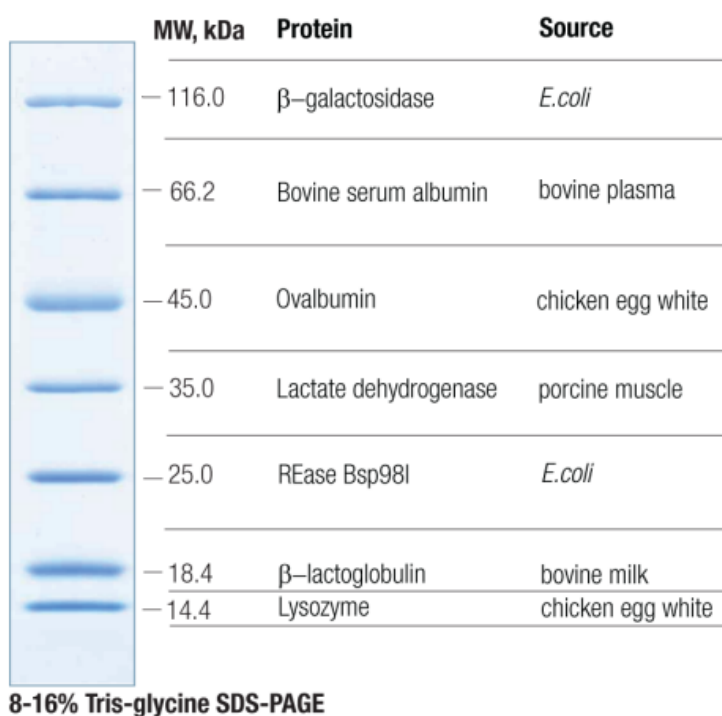
### Anexo 2. Marcador 1 Kb Plus Invitrogen



### Anexo 3. Marcador GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder Thermofisher



**Anexo 4.** Marcador Sinapse TrueColor High Range Protein.



**Anexo 5.** Marcador para proteína Unstained Protein Molecular Weight Marker Thermofisher.