

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

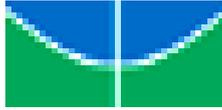
Clonagem e expressão de uma α -amilase de
Cryptococcus flavus e sua aplicação na degradação
do amido.

Alexsandro Sobreira Galdino

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Co-orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Brasília, Fevereiro de 2008



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Clonagem e expressão de uma α -amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido.

Alexsandro Sobreira Galdino

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Co-orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Tese de Doutorado apresentada
ao Departamento de Biologia celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito
parcial à obtenção do título de doutor em
Ciências Biológicas – Biologia
Molecular.

Brasília, Fevereiro de 2008

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Co-Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nei Pereira Junior (UFRJ) – Examinador externo

Prof. Dr. Carlos Bloch Junior (Embrapa-Cenargen) – Examinador interno

Prof^a. Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa-Cenargen) – Examinador interno

Prof^a. Dr^a. Janice Lisboa De Marco (UnB) – Examinador interno

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (UFG) – Co-orientador

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres - Orientador

Membro suplente

Prof^a. Dr^a. Lídia Maria Pepe de Moraes (UnB).

Jamais desesperes, mesmo perante as mais sombrias aflições da sua vida, pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda.

Provérbio chinês

Dedico este trabalho aos meus Pais, Idilvia e José Roberto, aos meus irmãos, Allyson e Daniel e ao meu eterno avô Iderval (*in memoriam*) pelo apoio incondicional durante a realização deste trabalho. Vocês são fonte de luz e inspiração!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente durante a realização deste trabalho, por ter me apresentado pessoas maravilhosas e por mostrar a cada dia que para se trabalhar com biologia molecular é preciso ter fé.

Aos meus pais, Idilvia e José Roberto, pelo apoio incondicional mesmo a 2.400 km de distância. Ao meu Pai pelo apoio e amor que me deu, meu agradecimento pela ajuda em Brasília e por mostrar, do seu jeito, que a vida é bem diferente daquela que imaginamos. Ao significado de toda a minha existência, a minha mãezona, que ficou várias vezes “doente” quando a bolsa de doutorado atrasava e imediatamente ela tinha que tomar alguma decisão. Você é o meu espelho, fonte de inspiração. TE AMO MUITO!

Aos meus irmãos, Allyson e Daniel, sem vocês eu não teria conseguido. Vocês são exemplo de Dedicção, Competência, Amor e União. Amo muito vocês.

Ao amigo Ivan Portes muito obrigado pelo incentivo e por acreditar que tudo daria certo.

À minha namorada querida, Mariana, que me conheceu ao acaso em Brasília e me mostrou que AMAR é: estar ao lado nas dificuldades, ouvir, compreender e respeitar. Sem você presente na minha vida eu não teria conseguido. Muito mais que tudo, ter te conhecido, para mim, já valeu à pena estar aqui. Muito obrigado pela paciência com as minhas inconstâncias, pelas conversas diárias e pela preocupação com a minha vida. Muito obrigado por ler e reler os meus textos e ahhhhhhhhhh! Por ter conseguido o clone da amilase no pGEM-T após precipitação com acetona! Enfim, deu certo!. Te amo muito....e você sabe né.....já era!

A toda família da minha namorada, especialmente aos seus pais, Murilo e Lúcia, por me tratarem como um filho e por tornarem os meus finais de semanas prazerosos, alegres e menos sofridos. Muito obrigado por tudo.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, muito obrigado por todos os ensinamentos. Especialmente com carinho, gostaria de agradecer aos professores Tadeu, Benildo, Márcio, Dirce, Joaquim Albenísio e Maria da Guia pelo incentivo e por terem apostado nesse projeto de doutorado.

Ao meu ex-orientador, prof. Thalles Grangeiro, por todos os ensinamentos em biologia molecular e por ter me feito perceber que lá no Ceará a gente também faz pesquisa de ponta.

Ao meu orientador Fernando, primeiramente por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse fazer o meu doutorado. Gostaria de agradecer por ter confiado no meu trabalho e pela paciência com os resultados que não vinham. Muito obrigado por ter passado parte da sua experiência de vida para mim, pelas idéias, sugestões e pela imensa ajuda que deu no início da minha vida em Brasília.

Ao meu co-orientador Cirano, por tudo que você fez por mim. Muito obrigado pela confiança no meu trabalho, pelo tratamento, pelas conversas diárias e por sempre achar, calmamente, que tudo tem solução.

À prof^a Lídia por todos os seus ensinamentos sobre biologia molecular e amilases. Sempre disposta a ajudar através das suas idéias e sugestões que foram a base de parte dos resultados dessa Tese. Muito obrigado!

À prof^a Sueli por acreditar no meu potencial e por sempre estar disposta em ajudar. Inclusive, obrigado antecipadamente pela dedicação e empenho na escrita do nosso projeto de Pós-Doutorado.

Aos professores do laboratório de Biologia Molecular e integrantes, Marcelo Brígido, Andréa, Marcio, Ildinete, Cynthia, Marcos e Élide pela grande contribuição no meu aprendizado.

Aos demais professores Félix e Edivaldo por sempre estarem dispostos em ajudar. Marisia, Muito obrigado por todas as amostras liofilizadas! Você foi sensacional.

Ao professor Carlos Bloch pela contribuição no seqüenciamento da amilase de *C. flavus*.

À Janice por sempre estar disposta em ajudar e sempre ter fornecido algum material sobre enzimologia. Muito obrigado!

Ao Roberto (UFG), pelos conselhos, dicas e sugestões quanto à purificação da amilase deste trabalho e pela confecção dos gráficos. E Também aos demais alunos do prof. Cirano e da profa. Fabrícia (UFG).

À Alessandra Dantas e a sua mãe, tia Sônia, por terem me ajudado muito em Brasília. Alessandra, você é uma grande amiga.

Às minhas amigas de todas as horas, Loise (com sua pipetas milagrosas) e Patvet, muito obrigado pelos conselhos, pela confiança, pelos papos-cabeça e por sempre acreditarem que cada etapa iria ser vencida, era só uma questão de tempo.

Aos meus grandes amigos (*Brothers in arms*), Saulinho, Basti, Túlio, Rafa (lab.1) e Marciano (por ter se perdido na biovinil!). Muito obrigado pelos momentos descontraídos e pela amizade durante estes 4 anos.

À Vivis que gerencia o Lab.2 na ausência dos orientadores. Muito obrigado pela sua imensa ajuda durante o doutorado. Obrigado pelas dicas e ensinamentos.

Aos demais colegas e ex-integrantes do Lab.2; Juliana, Andrelaise, Carol Brêtas, Carol Araújo, Theyssa, Bruno Benoliel, Polyanna, Camila (Patvet), Camila, Luanne, Nádia, Rafael (Patvet) e Hugo (principalmente pela ajuda na hora das correções em inglês e por ter ajudado a montar o gene da amilase) pelo carinho, pelas discussões e pelo espírito de viver em grupo, uns ajudando os outros. Muito obrigado!

À Isabel por tudo o que você fez por mim. Obrigado por ter quebrado todos os meus galhos quando eu mais precisava!

Aos amigos da Biomol: Hernandez e Bárbara (pelos intermináveis jogos de *War*), Yuri, Janaína, Maryani, Fernanda, Luana, Carol, Victor, Leo, Thiago, Lorena, Thiago (Lab.0), Renata, Greice, Davi (pela paciência no almoxarifado), Simoneide, Larissa, André Amaral pela amizade de vocês e pela convivência diária.

Aos meus melhores amigos do Ceará, Daniel e Valmique, obrigado pela amizade, ajuda, conselhos e pelos momentos de descontração. Apesar da distância, vocês moram no meu coração!

Aos meus mestres do judô, Gilmair & Gilson, pelo incentivo e por acreditar que tudo é possível quando se deseja intensamente.

Ao meu grande amigo Adilson, obrigado por ter me recebido em sua casa várias vezes quando fui à Goiânia para fazer partes dos meus experimentos.

À Dona Fátima e à Dona Ivonildes meus eternos agradecimentos por sempre estarem à disposição para autoclavar o que eu queria. Sem vocês o que seria da sala de lavagem?. Muito obrigado pela paciência que tiveram comigo e por ter agüentado as minhas inconstâncias devido à correria na geração de resultados.

À CAPES, pelo apoio financeiro

E a todos que contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
INTRODUÇÃO	1
1. Energia: Uma visão econômica	1
2. Produção de etanol a partir de biomassa (Bioetanol)	3
3. O amido	5
3.1 Amilose	6
3.2 Amilopectina	7
4. Enzimas de degradação do amido	8
4.1 Endoamilases	8
4.2 Exoamilases	9
4.3 Classificação das amilases	11
4.3.1 Propriedades bioquímicas das α -amilases	12
4.3.2 Mecanismo de ação das α -amilases	13
4.3.3 Origens e métodos de produção das α -amilases	14
4.3.4 Indução das α -amilases	15
4.3.5 Extração e purificação das α -amilases	15
4.3.6 Aplicações industriais das α -amilases	16
5. Leveduras amilolíticas	16
5.1 A levedura <i>Cryptococcus flavus</i>	17
6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como hospedeira para a expressão heteróloga	17
6.1 Expressão de amilases em <i>S. cerevisiae</i>	18
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVOS	20
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos	20
MATERIAL E MÉTODOS	21

MATERIAL	21
1. Linhagens utilizadas	21
1.1 linhagem de <i>Cryptococcus flavus</i>	21
1.2 Linhagens bacterianas	21
1.3 Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2. Plasmídios utilizados	22
3. Meios de cultura e substratos	25
4. Soluções e Tampões	27
4.1 Dosagem de atividade amilolítica	27
4.2 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	28
4.2.1 Revelação das proteínas com corante <i>Comassie blue</i>	30
4.2.2 Revelação das proteínas por coloração com nitrato de prata	30
4.3 Extração de DNA de levedura	31
4.4 Extração de DNA plasmidial	32
4.5 Análise de ácidos nucleicos em gel de agarose	33
4.6 Transformação rápida de levedura em fase estacionária	34
MÉTODOS	34
1. Manutenção da levedura e condições de cultura	34
2. Produção da amilase nativa de <i>C. flavus</i> (Amy1)	34
3. Purificação da Amy1	35
3.1 Cromatografia por troca iônica	35
3.2 Cromatografia por filtração em gel	36
4. Determinação de proteínas	36
5. Preparo das amostras para SDS-PAGE	36
6. Análise das proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	36
7. Técnicas de coloração do gel	37
7.1 Coloração com nitrato de prata	37
7.2 Coloração com <i>comassie Brilliant Blue G-250</i>	37
8. Detecção de atividade amilolítica em gel de poliacrilamida - Zimograma	37
9. Seqüenciamento N-terminal da Amy1	38
10. Extração de DNA total de levedura	38
11. Extração de RNA total	39
12. Síntese de cDNA – Transcrição Reversa	39

13. PCR	40
14. Purificação dos produtos de PCR	40
15. Análise de ácidos nucleicos em gel de agarose	40
15.1 Purificação de fragmentos de DNA	41
16. Digestão de DNA com enzimas de restrição	42
16.1 Purificação do sistema de digestão	42
17. Defosforilação de vetor linearizado	42
18. Ligação dos fragmentos de DNA	42
19. Seqüenciamento de DNA e análise <i>in silico</i>	43
20. Transformação de <i>E. coli</i>	43
20.1 Choque térmico	43
20.2 Eletroporação	44
21. Mini-preparação de plasmídios por lise alcalina	45
22. Midi-preparação de plasmídios	45
23. Transformação rápida de levedura em fase estacionária	45
24. Seleção de clones recombinantes	46
25. Determinação de atividade amilolítica	46
25.1 Atividade amilolítica dextrinizante	46
25.2 Atividade amilolítica sacarificante	47
26. Determinação da concentração de glicose	47
27. Produção da amilase recombinante produzida por <i>S. cerevisiae</i>	48
28. Purificação da amilase recombinante	48
29. Ensaio de N-deglicosilação	49
30. Caracterização bioquímica da amilase recombinante	49
30.1 Determinação do pH e temperatura ótimos	49
30.2 Efeito dos íons e DTT	49
30.3 Determinação de K_m e V_{max}	50
30.4 Cromatografia em camada delgada (TLC)	50
31. Análise do perfil de degradação do amido	51
32. Fermentação em pequena escala	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
1. Produção da amilase nativa de <i>C. flavus</i>	53
1.1 Otimização das condições de cultura	53

1.1.1 Determinação da melhor fonte de nitrogênio	54
1.2 Produção da Amy1	56
2. Purificação da Amy1	57
2.1 Análise eletroforética da Amy1 purificada e detecção de atividade amilolítica em gel – Zimograma	60
3. Seqüenciamento parcial de Amy1	61
4. Clonagem e análise do gene <i>AMY1</i>	61
5. Expressão heteróloga de <i>AMY1</i> em <i>S. cerevisiae</i>	70
5.1 Clonagem do gene <i>AMY1</i> no vetor de expressão YEp351-PGK	70
5.2 Transformação de <i>S. cerevisiae</i> e seleção dos clones recombinantes	73
6. Produção da Amy1 recombinante por <i>S. cerevisiae</i> CENPK2	77
7. Purificação da Amy1 recombinante expressa em <i>S. cerevisiae</i>	78
7.1 Perfil protéico da Amy1 recombinante purificada e detecção da atividade amilolítica em gel – Zimograma	81
8. Ensaio de N-deglicosilação	82
9. Caracterização bioquímica da amilase recombinante	83
9.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima	83
9.2 Efeito de íons e DTT na atividade da enzima	86
9.3 Determinação de K_m e V_{max}	88
9.4 Especificidade da amilase	89
10. Clonagem e expressão do gene da glicoamilase (GA) de <i>Aspergillus awamori</i>	91
11. Co-expressão dos genes <i>AMY1</i> e GA em <i>S. cerevisiae</i> CENPK2	95
12. Análise da degradação do amido dos clones recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	99
CONCLUSÕES	103
PERSPECTIVAS	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXO 1	124
ANEXO 2	126
ANEXO 3	129
ANEXO 4	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Polímeros do amido.	6
Figura 2. Diferentes enzimas envolvidas na degradação do amido.	9
Figura 3. Imagem da estrutura estendida de glucoamilase de <i>Aspergillus niger</i> idêntica à glicoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> .	10
Figura 4. Estrutural tridimensional predita da amilase de <i>Cryptococcus</i> sp S-2	12
Figura 5. Representação das quatro regiões conservadas na família das α -amilases.	13
Figura 6. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM-T.	23
Figura 7. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão YEp351-PGK.	23
Figura 8. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão YEp352-PGK	24
Figura 9. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pG5.	24
Figura 10. Foto do “fermentômetro” usado no experimento.	52
Figura 11. Influência da fonte de nitrogênio na produção da Amy1	55
Figura 12. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento celular de <i>C. flavus</i>	56
Figura 13. Cinética de crescimento e produção de amilase por <i>C. flavus</i>	57
Figura 14. Purificação da Amy1	58
Figura 15. Perfil eletroforético das etapas de purificação de Amy1	61
Figura 16. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos <i>primers</i> no gene amy-CS2	62
Figura 17. Reação de amplificação da versão genômica do gene <i>AMY1</i>	63
Figura 18. Reação de amplificação da versão cDNA do gene <i>AMY1</i>	63
Figura 19. Clonagem das versões genômica e cDNA do gene <i>AMY1</i>	64
Figura 20. Seqüência de nucleotídeos do gene <i>AMY1</i> e a seqüência protéica predita	66
Figura 21. Alinhamento das seqüência primárias das amilases Amy1 e AMY-CS2	68

Figura 22. Alinhamento múltiplo das regiões conservadas (I, II, III e IV) das α -amilases de vários organismos	69
Figura 23. Representação esquemática de perfis de restrição do vetor YEp351-PGK contendo cDNA do gene <i>AMY1</i>	71
Figura 24. Confirmação da orientação do gene <i>AMY1</i> no vetor YEp351-PGK após digestão com <i>Bam</i> HI	72
Figura 25. Representação esquemática do perfil de restrição do vetor YEpAMY1 após digestão com <i>Sac</i> I	72
Figura 26. Análise de restrição do vetor YEpAMY1	73
Figura 27. Atividade amilolítica em placa de clones transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	75
Figura 28. Cinética de produção de amilase recombinante por <i>S. cerevisiae</i> CENPK2	78
Figura 29. Purificação de Amy1 recombinante	79
Figura 30. Perfil eletroforético das etapas de purificação da Amy1 recombinante	82
Figura 31. Deglicosilação de Amy1	82
Figura 32. Determinação do efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) da Amy1 recombinante	84
Figura 33. Determinação do efeito da temperatura (A) e da termoestabilidade (B) na atividade da Amy1 recombinante	85
Figura 34. Efeito de DTT na atividade da Amy1 recombinante	87
Figura 35. Gráfico de Lineweaver-Burk para os valores de K_m e V_{max} da Amy1 recombinante purificada em presença de diferentes concentrações de amido.	88
Figura 36. Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da Amy1 recombinante	90
Figura 37. Estratégia de clonagem do gene GA	92
Figura 38. Digestão dos plasmídios pG5 e YEp352 com <i>Hind</i> III	93
Figura 39. Confirmação da clonagem do cassete de expressão contendo o gene GA no vetor YEp352-PGK após digestão com <i>Hind</i> III	94
Figura 40. Atividade amilolítica em placa e clones transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	94

Figura 41. Atividade amilolítica em placa dos clones transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	96
Figura 42. Atividade amilolítica em placa dos clones transformantes de <i>S. cerevisiae</i> .	98
Figura 43. Análise da eficiência de utilização do amido por clones recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> CENPK2	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas neste trabalho e seus respectivos genótipos.	21
Tabela 2. Seqüência dos <i>primers</i> utilizados em reações de PCR com suas respectivas seqüência, temperaturas de anelamento e sítios de restrição sublinados	25
Tabela 3. Etapas de purificação da Amy1	59
Tabela 4. Etapas de purificação da Amy1 recombinante	80
Tabela 5. Efeito de vários íons sobre a atividade da Amy1 recombinante	87
Tabela 6. Especificidade da Amy1 recombinante por diferentes substratos	90

ABREVIATURAS

%	- por cento
μ	- micro
μg	- micrograma
μg/μL	- microgramas por microlitro
μL	- microlitro
1X	- concentração de uso
5X	- cinco vezes concentrado
10X	- dez vezes concentrado
20X	- vinte vezes concentrado
100X	- cem vezes concentrado
cDNA	- ácido deoxirribonucléico complementar
<i>AMY1</i>	- gene da amilase de <i>C. flavus</i> (versão genômica ou cDNA)
amy-CS	- gene da amilase de <i>Cryptococcus</i> sp S-2
<i>Amy1</i>	- amilase de <i>Cryptococcus flavus</i>
AMY-CS2	- amilase de <i>Cryptococcus</i> sp S-2
YEpAMY1	- plasmídeo YEp351-PGK contendo o cDNA do gene <i>AMY1</i>
GA	- glicoamilase de <i>Aspergillus awamori</i>
YEpGA	- plasmídeo YEp352-PGK contendo o cDNA do gene da glicoamilase de <i>Aspergillus awamori</i>
Sc YEpAMY1	- clone de <i>S. cerevisiae</i> expressando a amilase de <i>C. flavus</i>
Sc YEpGA	- clone de <i>S. cerevisiae</i> expressando a glicoamilase de <i>Aspergillus awamori</i>
Sc YEpAMY1 + YEpGA	- clone de <i>S. cerevisiae</i> expressando a amilase e a glicoamilase simultaneamente.
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DNase	- deoxirribonuclease
dNTP	- deoxirribonucleotídeo

DTT	- ditioneitol
g	- grama
<i>g</i>	- velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
h	- hora
kb	- kilobases
kDa	- kiloDaltons
L	- litro
M	- molar
mA	- miliamper
mg	- miligrama
min	- minuto
mL	- mililitro
mM	- milimolar
MM	- meio mínimo
mRNA	- ácido ribonucléico mensageiro
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
°	- graus
°C	- graus centígrado
OD	- densidade óptica
p/v	- peso por volume
PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	- pares de base
PCR	- reação de polimerização em cadeia
pI	- ponto isoelétrico
PGK	- 3-fosfoglicerato quinase
pH	- potencial de hidrogênio
pmol	- picomol
q.s.p.	- quantidade suficiente para
RNA	- ácido ribonucléico
RNAse	- ribonuclease
rpm	- rotações por minuto

RT-PCR	- transcrição reversa- reação da polimerização em cadeia
SDS	- sódio dodecil sulfato
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tm	- temperatura de desnaturação
Tris	- tri(hidroximetil) aminometano
U	- unidade de atividade enzimática
V	- volts
v	- volume
v/v	- volume por volume
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3indoxil- β -D-galactopiranosídeo
Q-Se	- Resina de troca iônica Q-sepharose
S-100	- Resina de filtração em gel Sephacryl S-100
S-200	- Resina de filtração em gel Sephacryl S-200

RESUMO

α -Amilases têm aplicações nas indústrias de processamento do amido, produção de álcool, têxtil e outras. Na busca por fontes de amilases na biodiversidade do cerrado, uma levedura foi isolada e classificada como *Cryptococcus flavus*. Embora esta levedura seja capaz de metabolizar amido, ela não pode ser usada na indústria por não possuir *status GRAS*. Por outro lado, *S. cerevisiae*, amplamente utilizada na indústria de etanol, não é capaz de degradar amido para produzir açúcares fermentescíveis, sendo necessária a clonagem e expressão heteróloga de enzimas amilolíticas nesse microrganismo.

Neste trabalho, o gene da amilase de *C. flavus* (*AMY1*) codificando uma amilase extracelular foi clonado e expresso com sucesso em *S. cerevisiae*. A sequência de nucleotídeos do cDNA revelou uma ORF de 1896 pb codificando uma cadeia polipeptídica de 631 aminoácidos apresentando uma homologia (97%) com a amilase da levedura *Cryptococcus* sp S-2. A presença das quatro regiões conservadas, (I) ¹⁴⁴DVVVNH¹⁴⁹, (II) ²³⁵GLRIDSLQQ²⁴³, (III) ²⁶³GEVFN²⁶⁷ e (IV) ³²⁷FLENQD³³² classificou essa enzima na família 13 das glicosil hidrolases (G13). A cinética de produção da amilase recombinante alcançou a atividade amilolítica máxima (3,93 U/mL) em 60 horas de cultivo. A proteína recombinante apresentou uma massa molecular similar a amilase nativa (~ 67 kDa), parte devido à N-glicosilação. Além disso, a amilase recombinante foi caracterizada bioquimicamente apresentando um pH ótimo de 5,5, temperatura ótima de 60 °C e $K_m = 0,37$ mg/mL para o amido.

Com o objetivo de desenvolver uma cepa de *S. cerevisiae* capaz de degradar o amido de forma mais eficiente, o gene da glicoamilase de *Aspergillus awamori* foi clonado no vetor YEp352-PGK para co-expressão com o gene da amilase de *C. flavus*, clonado previamente no vetor YEp351-PGK. O clone de *S. cerevisiae* expressando as duas enzimas foi capaz de crescer em meio contendo amido como única fonte de carbono. Dados preliminares de fermentação em frasco mostraram que esse clone é capaz de produzir 116 g de etanol/L durante 120 horas de cultivo.

ABSTRACT

α -Amylases have applications in starch processing, alcohol production, textile and others industries. On screening for amylolytic yeasts in the Brazilian Cearado, a yeast was isolated and classified as *Cryptococcus flavus*. Although *C. flavus* is able to metabolize starch, it cannot be used in industry because it does not possess GRAS status. On the other hand, *S. cerevisiae*, which is widely used in ethanol industry, cannot degrade starch to fermentable sugars, requiring for that the cloning and heterologous expression of amylolytic enzymes from other microorganisms.

In this work, a *C. flavus* α -amylase gene (*AMY1*) encoding an extracellular α -amylase has been cloned and successfully expressed in *S. cerevisiae*. The nucleotide sequence of the cDNA revealed an ORF of 1896 pb coding for a 631 amino acid polypeptide with high identity (97%) to a homologous protein isolated from *Cryptococcus* sp S-2. The presence of four conserved regions, (I) ¹⁴⁴DVVVNH¹⁴⁹, (II) ²³⁵GLRIDSLQQ²⁴³, (III) ²⁶³GEVFN²⁶⁷ and (IV) ³²⁷FLENQD³³², places the enzyme in the GH13 α -amylase family. The assessment of the time course of amylase secretion in *S. cerevisiae* revealed a maximal extracellular amylolytic activity (3.93 U/mL) at 60 hours of incubation. The recombinant protein had an apparent molecular mass similar to the native enzyme (~67 kDa), part of which was due to N-glycosylation. On further characterization it was found that the recombinant amylase has optimal activity on pH 5.5 at 60 °C. Its for starch is $K_m = 0.37$ mg/mL .

In order to develop a *S. cerevisiae* strain able to degrade starch more efficiently, the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene was cloned into the YEp352-PGK vector with a view to co-expression with the *C. flavus* α -amylase gene, previously cloned into YEp351-PGK. This new strain expressing both enzymes was able to grow in medium containing starch as sole carbon source. Preliminary data of flask fermentation suggest that this strain is able to produce 116g ethanol/L in 120 h of incubation.

INTRODUÇÃO

1. Energia: uma visão econômica

A energia começou a ser utilizada em larga escala pela humanidade quando foi descoberto que a energia química armazenada no carvão e na madeira poderia ser usada para aquecimento, cozimento e produção de luz. Posteriormente, foi visto que essa mesma energia poderia ser usada na transformação de materiais brutos como ouro, prata, cobre e ferro em utensílios como armas. Com o passar do tempo, outras fontes de energia foram usadas culminando no século 20 com a energia nuclear e o uso de petróleo, a fonte de energia mais utilizada no mundo. Atualmente, os combustíveis fósseis representam 80,1% do total da energia utilizada no mundo, sendo a energia nuclear e as energias renováveis representando 6,3% e 13,6%, respectivamente (Goldemberg, 2007). Na década precedente à crise energética de 1973, a estabilidade relativa na oferta de petróleo era oferecida principalmente pelas companhias petrolíferas. Mas a necessidade dos países industrializados de obterem maior quantidade de petróleo importado deu maior poder político e econômico aos países produtores.

Em dezembro de 1997, em Kyoto, no Japão, foi realizada a terceira conferência das Nações Unidas sobre mudanças climáticas com a presença de representantes de mais de 160 países, o que resultou no Protocolo de Kyoto. Embora o Protocolo de Kyoto tenha sido acordado em 1997, este só entrou em vigor em fevereiro de 2005 com a ratificação do protocolo pela Rússia. O documento que regulamenta a UNFCCC – Convenção Quadro das Nações Unidas sobre a Mudança do Clima, assinado por 141 países, estabelece metas para redução de gases poluentes pelos países industrializados que, acredita-se, sejam os principais emissores de gases responsáveis pelo efeito estufa (Calsing, 2005). Países industrializados se comprometeram a reduzir, até 2012, as suas emissões de dióxido de carbono a níveis pelo menos 5% menores do que os que vigoraram em 1990 (Marmo, 2007). O acordo estabelece que os países em desenvolvimento, como o Brasil, são os que menos contribuem para as mudanças climáticas, atuando como signatários e mantendo a ONU informada sobre os seus níveis de emissão. Caso não consiga reduzir as emissões previstas, cada país poderá comprar, dos demais, títulos conhecidos como Certificados de Emissões Reduzidas (CERs) ou Créditos de Carbono. A aquisição de tais créditos está prevista no artigo 12 do Protocolo de Kyoto sobre Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL). Em 2007, o mercado de créditos de carbono movimentou 30 bilhões de dólares, uma fonte alternativa muito promissora para os países em desenvolvimento que poderão utilizar o capital estrangeiro para promover o desenvolvimento

sustentável no país e gerar emprego (Herzog, 2007). Dados do Ministério da Ciência e da Tecnologia (MCT) registram que, até o dia 13 de janeiro de 2008, o Brasil ocupa o terceiro lugar em número de projetos em MDL, com 261 projetos (9%), sendo que em primeiro lugar encontra-se a China com 963 e, em segundo, a Índia com 819 projetos (Ministério da Ciência e da Tecnologia, 2008).

No final dos anos 80, devido ao grande consumo de petróleo, o mundo estava preocupado em desenvolver fontes alternativas de energia renováveis que poluíssem menos. Dentre as várias alternativas propostas, destacam-se a energia eólica, solar e aquela proveniente da conversão de biomassa. Apesar da incerteza considerável sobre qual será o principal combustível do futuro, álcoois alifáticos, em particular metanol e etanol, são, atualmente, a escolha mais economicamente viável e representam o principal foco da pesquisa mundial. Isto se deve aos seguintes fatores:

- **Álcoois podem ser produzidos localmente, reduzindo os impostos pagos no câmbio exterior com a importação do petróleo.** O maior exemplo é o Brasil, o maior produtor de álcool a partir da cana-de-açúcar e que possui condições climáticas favoráveis ao aumento da produção local (Sánchez & Cardona, 2007).
- **Álcoois são fáceis de usar (requerem pequenos ajustes prévios em máquinas desenhadas para funcionar à base de petróleo).** O Brasil já domina a tecnologia de ajustes de motores que usam tanto carros movidos a etanol quanto à gasolina (veículos *flexfuel*). As vendas de bicompostíveis representaram 83,8% do total de veículos vendidos em maio de 2007 (Camacho, 2007).
- **Álcoois são altamente competitivos com os combustíveis à base de petróleo.** Depois da ratificação do protocolo de Kyoto, alguns países, como por exemplo, o Japão já assinou acordo de importação do álcool brasileiro para adição de etanol à gasolina em diferentes quantidades (Orellana & Neto, 2006).

Atualmente, o gasto de energia para manter os padrões de vida é de aproximadamente 2 kw/pessoa/mês, sendo que os países industrializados, mesmo tendo apenas 23% da população mundial, são responsáveis por 70% do consumo total de energia. Obviamente, à medida que os países emergentes se industrializarem, maior será a pressão sobre os estoques de energia existentes, majoritariamente os de petróleo, o que pode levar ao aumento do aquecimento global. Desta forma, o mundo terá que encontrar soluções para o uso mais inteligente de energia.

2. Produção de etanol a partir de biomassa (bioetanol)

Com o crescente aumento da demanda energética, as fontes de energia não-renováveis vêm se tornando escassas e, atualmente, a procura por fontes renováveis economicamente viáveis tem sido cada vez maior. O principal candidato a combustível do século XXI é o bioetanol. O bioetanol é principalmente produzido pelo processo de fermentação, usando como substratos açúcares já disponíveis (cana-de-açúcar, beterraba e frutas), materiais amiláceos (grãos, tubérculos, etc) e materiais lignocelulolíticos (madeira, rejeitos agrícolas, etc) (Gray *et al.*, 2006; Liu & Shen, 2008). Atualmente a biomassa representa aproximadamente 10% da demanda de energia no mundo (Antoni *et al.*, 2007).

O bioetanol ganha importância no cenário mundial como principal fonte de energia alternativa ao petróleo em curto prazo. Segundo Demain *et al.* (2005), o bioetanol apresenta inúmeras vantagens se comparado aos combustíveis convencionais:

- é derivado de uma fonte renovável, ou seja, plantas, ou parte da planta rica em açúcares;
- a sua combustão emite uma percentagem bem menor de gases nocivos ao meio-ambiente;
- é biodegradável e menos tóxico que combustíveis a base de petróleo;
- em quantidades maiores que 5%, podem ser misturados à gasolina e utilizado como combustível sem necessitar de grandes ajustes nos motores;
- é produzido por um método bem conhecido e estudado, a fermentação alcoólica microbiana;
- possui maior octanagem (resistência a compressão sem entrar em combustão) que a gasolina;
- produz menos fumaça;
- gera menos resíduos provenientes da queima.

Atualmente no Brasil, o custo de produção do álcool é competitivo com o custo de produção de gasolina. Isto ocorre primariamente porque os custos de produção foram reduzidos desde o Programa Brasileiro de Álcool (ProÁlcool) a um terço do seu valor inicial e, em segundo lugar, entre 1975-2000, o petróleo aumentou os seus preços e estes, no futuro, tenderão a aumentar mais ainda (Leite, 2005). Em 2006 o custo médio para a produção de um litro de etanol no Brasil foi de US\$ 0,20, enquanto que nos EUA o custo foi de US\$ 0,31 em

média (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2006). O Brasil domina a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, possuindo cerca de 300 usinas em operação no país que são responsáveis por um terço da produção mundial de etanol (Lin & Tanaka, 2006). A Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) divulgou seu último levantamento da safra nacional de cana-de-açúcar 2007/2008. A produção de etanol foi de 20,88 bilhões de litros, superior em 19,53% (3,41 bilhões de litros) à da safra 06/07 (Portal Unica, 2007). Os Estados Unidos são o segundo maior produtor de etanol do mundo, obtendo o produto a partir de amido de milho. O produto é subsidiado pelo governo norte-americano para manutenção da produção, já que o valor agregado dos derivados do milho é superior ao do álcool. O valor do subsídio é maior que o custo da produção de etanol no Brasil (Leite, 2005).

Em 2006, os Estados Unidos consumiram aproximadamente 20 milhões de barris de petróleo bruto, dos quais 60% foram importados (Gray *et al.*, 2006). Grandes quantidades de etanol devem ser produzidas no futuro devido a duas leis federais norte-americanas: uma taxa de crédito de US\$ 0,51 por galão de etanol usado como combustível e um novo mandato para a produção de 7,5 bilhões de galões de etanol que serão adicionados à gasolina até 2012 (Farrel *et al.*, 2006). Visando a redução do impacto da emissão de gases de efeito estufa, diversos países adotaram medidas para adesão às exigências ambientais do Protocolo de Kyoto. A União Européia passou a recomendar o uso de 2% de etanol na gasolina e o Japão pretende adicionar 3% (Orellana & Neto, 2006). Essas medidas resultam em um aumento substancial na demanda mundial de etanol e estimulam os países a produzirem ou comprarem este combustível. Em poucos anos, economias mundiais deverão começar a importar etanol proveniente de vários países, sobretudo do Brasil (Leite, 2005).

No entanto, a entressafra da cana, o aumento do preço do açúcar no mercado internacional e conseqüente o aumento do preço do álcool hidratado levaram o governo brasileiro a diminuir a percentagem de álcool na gasolina, de 25 para 20%, para impedir o aumento deste combustível. Esta instabilidade na produção de álcool tem de ser resolvida antes de o Brasil se tornar um exportador mundial de álcool combustível (Lage, 2006).

Dentre os substratos disponíveis no Brasil, a mandioca se apresenta como um substrato bastante promissor no incremento da produtividade nacional de álcool, apresentando algumas vantagens em relação à cana-de-açúcar:

- é produzida em todos os Estados do Brasil sendo um produto genuinamente brasileiro;

- existem variedades adequadas de mandioca para serem colhidas em épocas diferentes do ano;
- tem menor nível de exigência do solo;
- possui menor sensibilidade climática;
- processo de colheita mais simples – sem poluição;
- tem baixos custos de produção;
- é uma cultura de poucos riscos necessitando de baixos investimentos.

Sendo assim, torna-se evidente que o amido de mandioca é um forte candidato como substrato para a produção de bioetanol. Um estudo de Viabilidade Técnica Econômica e Comercial (EVETEC) sobre a comparação da produção de etanol a partir de amido de mandioca e cana-de-açúcar foi realizado pelo Centro de Apoio Desenvolvimento e Tecnológico (CDT), da Universidade de Brasília. O parecer deste estudo foi que *a implementação de microdestilarias para a produção de álcool a partir de mandioca é plenamente viável e o produto é altamente competitivo, se consideradas as proporções mercadológicas globais e focado nos arranjos produtivos locais.*

3. O amido

O amido, polissacarídeo de reserva encontrado em plantas, constitui um importante macronutriente da dieta humana. Além do seu uso como alimento, o amido é usado em numerosos processos industriais, químicos ou enzimáticos, para obtenção de xaropes de glicose, maltose e de frutose empregados em confeitarias, cervejarias, fábricas de biscoito, geléias e refrigerantes (Fungaro & Junior, 2002).

O amido é um polímero de D-glicose onde as moléculas são unidas entre si por ligações O-glicosídicas, que são formadas quando um grupo hidroxila no carbono 1 (C1) de uma molécula de açúcar reage com o átomo de carbono anomérico de outra molécula de açúcar (Lehninger *et al*, 2002). Esta ligação glicosídica é estável em pHs altos, mas hidrolisada em pHs baixos. Na extremidade do polímero, um grupo aldeído latente está presente. Este grupo é conhecido como extremidade redutora. Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido: (i) amilose e (ii) amilopectina (Figura 1).

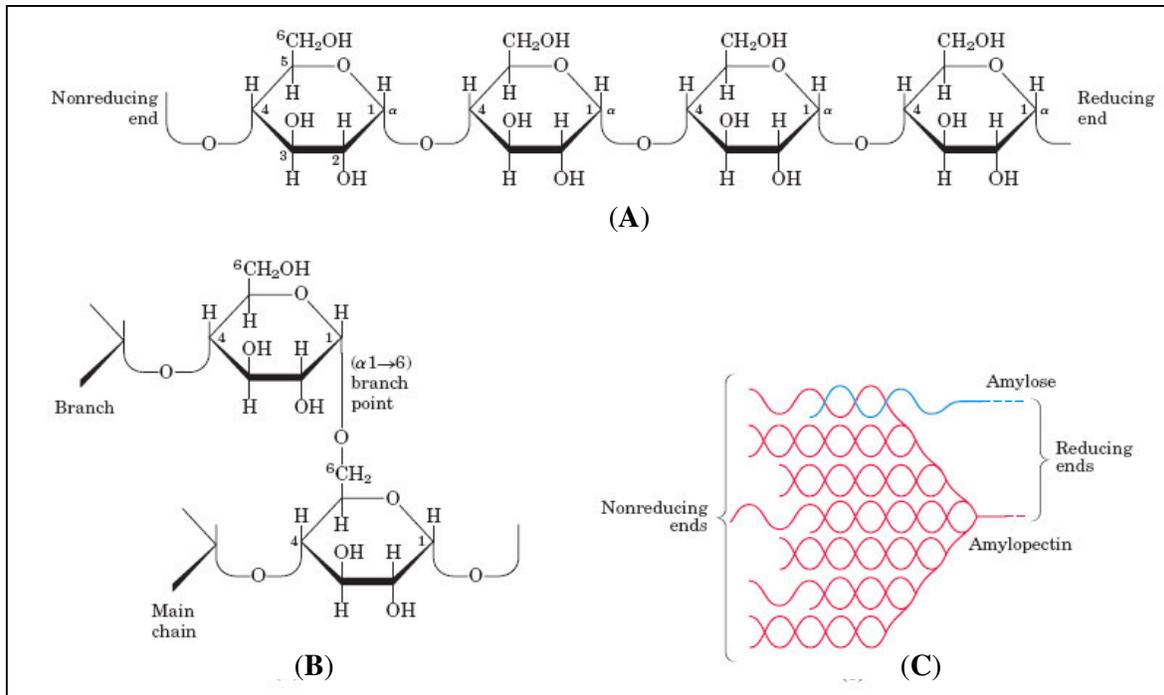


Figura 1. Polímeros do amido. (A) um pequeno segmento da amilose, um polímero linear de moléculas de D-glicose. (B) Estrutura da amilopectina mostrando um ponto de ramificação. (C) Disposição das moléculas de amilose e amilopectina no grão de amido. Fonte: Lehninger *et al.* (2002).

3.1 Amilose

Amilose é um polímero linear consistindo em média de 500 - 20,000 unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 1A). Poucas ligações glicosídicas do tipo α -1,6 são encontradas e grupos fosfatos também podem estar presentes (Hoover, 2001), mas eles têm pouca influência no comportamento da molécula (Buléon *et al.*, 1998). O número de resíduos de glicose na amilose, também indicado pelo grau de polimerização (DP), varia com a espécie botânica da qual se originou. Por exemplo, amilose de batata ou mandioca tem grau de polimerização de 1000 - 6000 enquanto que amilose de milho ou trigo variam entre 200 e 1200 resíduos de glicose. O conteúdo de amilose pode variar em média de 0 a 75%, mas o valor típico é de 20 a 25% do amido (Ramesh & Tharanathan, 2003).

A amilose tem uma estrutura estendida que tende a se enovelar em uma hélice simples mas também pode formar zonas de junções de dupla hélice esquerdas paralelas (Imberty *et al.*, 1988). A amilose pode se ligar às moléculas de iodo carregadas resultando em compostos poliiodetos (cadeias de I_3^- e I_5^- formando estruturas como I_9^{3-} and I_{15}^{3-}), onde cada volta da

hélice contém aproximadamente dois átomos de iodo. Assim, a cor azul intensa da interação entre o iodo e o amido resultante da adsorção do iodo (na forma I_5^-) é devido à interação aceptor-doador entre a água e os compostos poliiodetos deficientes de elétron (Imberty *et al.*, 1988)

As ligações de hidrogênio entre as cadeias alinhadas são as responsáveis pela retrogradação da amilose quando as mesmas são desfeitas com as moléculas de água. A retrogradação ocorre quando a suspensão de amido e água é aquecida fazendo com que grânulos de amido inchem até a irreversibilidade. Durante este processo, a amilose se expande para fora do grânulo e causa um aumento na viscosidade da suspensão. Um maior aumento da temperatura leva ao inchamento máximo dos grânulos e aumento da viscosidade. Finalmente, os grânulos se quebram resultando em uma suspensão coloidal altamente viscosa. O subsequente resfriamento do amido coloidal resulta na formação de um gel elástico (retrogradação). Durante a retrogradação, o amido sofre uma mudança de um estado dissolvido e dissociado para um estado associado. A retrogradação é primeiramente causada pela amilose; a amilopectina, devido ao seu alto estado ramificado, é menos susceptível a retrogradação (Myers *et al.*, 2000).

3.2 Amilopectina

A amilopectina consiste de pequenas cadeias lineares unidas por ligações glicosídicas α -1,4 com 10-60 unidades de glicose e cadeias laterais ligadas por ligações glicosídicas α -1,6, consistindo de 15-45 unidades de glicose. A percentagem média de pontes de ramificação na amilopectina é 5%, mas varia com a origem vegetal. A molécula completa de amilopectina contém uma média de 2.000.000 de unidades de glicose, sendo desse modo uma das maiores moléculas encontradas na natureza (Van der Maarel *et al.*, 2002).

A amilopectina exhibe níveis hierárquicos de organização estrutural. Na escala de 0,1 a 1 nm a estrutura é descrita pela localização das ramificações e pelo comprimento da cadeia. Nesse nível, a estrutura da amilopectina é conhecida por possuir as cadeias A (cadeias ramificadas mais externas), B (cadeias ramificadas mais internas) e C (única cadeia contendo uma extremidade redutora simples). O próximo nível estrutural ocorre na escala de 10 nm, onde existem regiões amorfas e cristalinas muito conhecidas pela sua resistência à hidrólise ácida. Estas regiões da estrutura contribuem para a formação de camadas concêntricas responsáveis pelo “crescimento dos anéis” no grão de amido que são visíveis através de microscopia óptica. No próximo nível estrutural, na escala de 100 nm, é possível identificar, por meio de

microscopia eletrônica, a orientação das moléculas de amilopectina em uma secção transversal de um grão de amido (Myers *et al.*, 2000).

Amilopectinas de fontes vegetais (por exemplo, amilopectinas de tomate) possuem grupos fosfatos ligados a grupos hidroxil que podem aumentar sua hidrofobicidade. (Myers *et al.*, 2000)

Em relação a coloração com iodo, o complexo iodo-amilopectina produz uma cor violácea. Desta forma, o amido solúvel comercializado para uso como indicador deve consistir basicamente de amilose, separada da amilopectina.

4. Enzimas de degradação do amido

Uma grande variedade de organismos usa enzimas hidrolíticas capazes de degradar o amido para servir como fonte de energia. Para a quebra completa da molécula do amido, várias enzimas que clivam o polímero em locais diferentes são necessárias. Existem, basicamente, 4 grupos de enzimas de degradação do amido (Figura 2): (i) endoamilases; (ii) exoamilases; (iii) enzimas desramificadoras; e (iv) transferases (Van der Maarel *et al.*, 2002).

4.1 Endoamilases

Endoamilases são enzimas capazes de quebrar as ligações glicosídicas presentes na parte interna (endo-) da cadeia de amilose e amilopectina. A α -amilase (EC 3.2.1.1) é uma endoamilase bem conhecida. É encontrada em uma grande variedade de microrganismos, desde *Archaea* até *Bacteria* e *Eucaria*. Os produtos finais da ação das α -amilases são oligossacarídeos de diversos tamanhos em uma configuração anomérica α , e dextrinas limites, na qual constituem os oligossacarídeos ramificados (Van der Maarel *et al.*, 2002). Com o passar dos anos, os pesquisadores têm dado maior ênfase às α -amilases produzidas por microrganismos. A maior vantagem do uso de microrganismos para a produção dessas proteínas é a capacidade de produção de baixo custo e a facilidade de manipulação para obtenção de enzimas com características desejáveis (Lonsane & Ramesh, 1990).

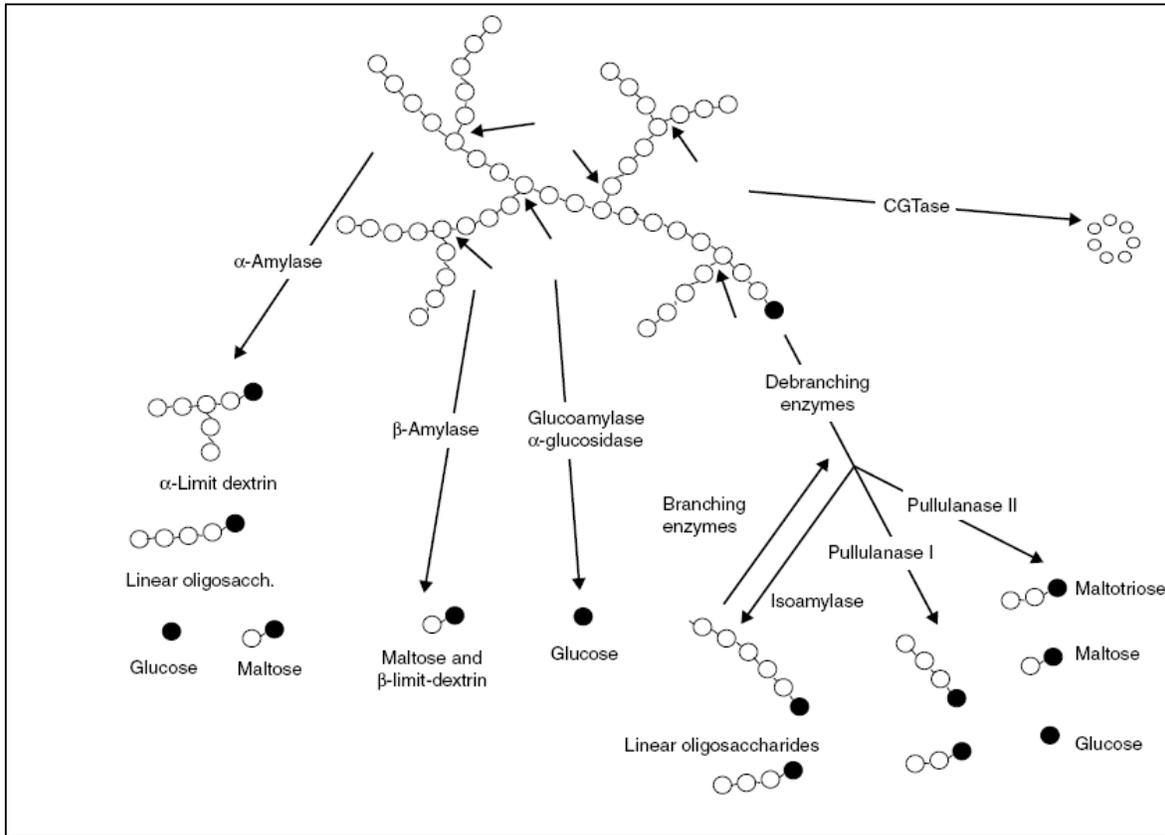


Figura 2. Diferentes enzimas envolvidas na degradação do amido. A estrutura em forma de anel fechado representa a extremidade redutora de uma cadeia oligossacarídica. Fonte: Bertoldo & Antranikian (2002).

α -Amilases têm sido isoladas de vários fungos, leveduras e bactérias e, contudo, as enzimas de fungos e bactérias têm maiores aplicações em diversos setores industriais (Pandey *et al.*, 2000).

4.2 Exoamilases

As exoamilases agem sobre os resíduos externos de glicose da amilose e da amilopectina produzindo somente glicose. Entre as enzimas pertencentes a esta classe, destaca-se a glicoamilase.

A glicoamilase também conhecida como amiloglicosidase ou γ -amilase (E.C 3.2.1.3) é capaz de hidrolizar as ligações glicosídicas α -1,4 em amido solúvel e oligossacarídeos relacionados com inversão da configuração para produzir β -glicose. Além da atividade α -1,4, a enzima hidrolisa lentamente as ligações α -1,6 do amido (Norouzian *et al.*, 2006). A eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) para a hidrólise das ligações α -1,6 é apenas 0,2% da atividade α -1,4

(Frandsen *et al.*, 1995). Este efeito adverso compromete o rendimento da sacarificação em nível industrial. No entanto, um aumento no rendimento de glicose produzida na etapa de sacarificação pode chegar a níveis maiores que 96% por meio da atividade glicosídica α -1,6 das glicoamilases (Sauer *et al.*, 2000). Esta enzima tem uma grande importância industrial na produção de xaropes de glicose e em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) para a produção de etanol (Saville *et al.*, 2006).

Várias espécies de fungos produzem glicoamilases em condições diferentes de fermentação e os estudos têm focado na busca de glicoamilases que hidrolisem amido em elevadas temperaturas (Norouzian *et al.*, 2006). Alguns fungos que sintetizam glicoamilases em temperaturas elevadas incluem *Aspergillus awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Mucor rouxians*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus delma* e *Rhizopus oryzae* (Pandey *et al.*, 2000)

As glicoamilases de fungos possuem dois domínios, um domínio catalítico e um domínio de ligação ao amido. Esses dois domínios estão conectados por um *linker* O-glicosilado que está presente na extremidade N-terminal (Lemos *et al.*, 2003) (Figura 3). O sítio de ligação ao amido na glicoamilase tem função tanto na hidrólise do amido cru quanto na adsorção da enzima na parede celular. Essa adsorção faz com que haja um aumento da concentração de glicoamilase *in situ*, promovendo a quebra de substratos e conseqüentemente liberando glicose para a célula (Kaneko *et al.*, 1996).

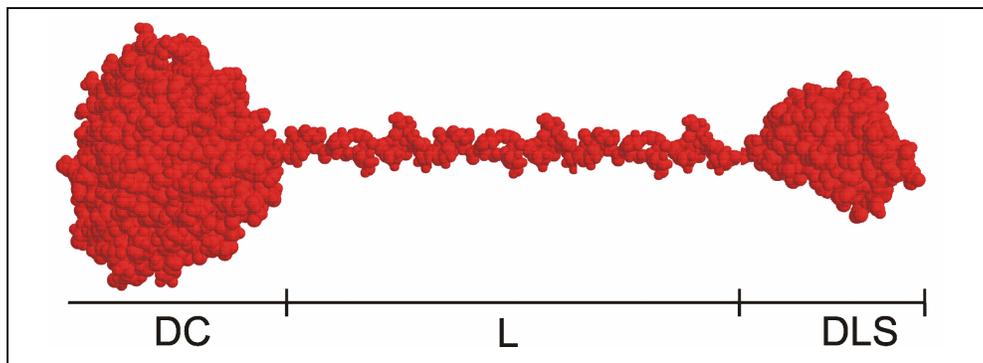


Figura 3. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de *Aspergillus niger* idêntica à glicoamilase de *Aspergillus awamori*. O domínio catalítico (DC), O *linker* conector (L) e o domínio de ligação ao substrato (DLS) estão representados na figura. fonte: Lemos *et al.* (2003), com modificações.

4.3 Classificação das amilases

Muitas das enzimas de degradação do amido pertencem a famílias baseadas na homologia de seqüência de aminoácidos. (Henrissat, 1991). De acordo com esta classificação, 301 seqüências de aminoácidos das glicosil hidrolases correspondendo a 39 números na comissão de enzimas (EC number) foram agrupados em 39 famílias. Dentre estas, a família 13 das glicosil hidrolases abrange mais de 30 especificidades enzimáticas diferentes (Henrissat, 1991; MacGregor *et al.*, 2001), entre elas a α -amilase. Já a glicoamilase é classificada na família 15. No entanto, essa classificação apresenta alguns problemas de ambigüidade: enzimas com diferentes especificidades de substrato são, às vezes, agrupadas na mesma família, e enzimas com a mesma especificidade são muitas vezes agrupadas em famílias diferentes. Estes problemas não foram resolvidos mesmo quando o número de seqüências de aminoácidos das glicosil hidrolases aumentou para 480 (Henrissat & Bairoch, 1996).

Por isso Coutinho & Henrissat (1999) propuseram uma nova classificação para as hidrolases baseada no posicionamento do domínio de ligação ao amido (SBD). Esse domínio é um módulo distinto na estrutura de uma hidrolase que aumenta a eficiência da enzima ao se ligar e degradar amido cru (Lo *et al.*, 2002). Vários desses módulos de ligação a carboidrato (CBM) têm sido classificados em sete famílias CBMs: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41 e CBM 45 (Coutinho & Henrissat, 1999; Machovič & Janeček, 2006). A família CBM20 é a mais estudada e compreende, entre outras enzimas, a amilase maltogênica de *Bacillus stearothermophilus* e as glicoamilases de *Aspergillus niger* e de *Aspergillus awamori* (Machovič & Janeček, 2006). Nesta família os domínios SBDs geralmente são posicionados no C-terminal da enzima. Já a família CBM21 caracteriza-se por SBDs localizados na posição N-terminal da enzima. Entre elas, destacam-se as amilases de *Lipomyces kononenkoae* e *Lipomyces starkeyi* e a glicoamilase de *Rhizopus oryzae* (Machovič *et al.*, 2005; Machovič & Janeček, 2006).

4.3.1 Propriedades bioquímicas das α -amilases

Em geral, as α -amilases possuem as seguintes propriedades bioquímicas: (i) grande especificidade para o amido como substrato (Gupta *et al.*, 2003); (ii) pHs ótimos de ação variando de 2 a 12 (Vihinen & Mäntsälä, 1989); (iii) faixas ótimas de temperaturas para sua atividade, 25-60 °C e 100-130 °C (Chary & Reddy, 1985; Fogarty & Kelly, 1980); (iv) massas moleculares variando de 10 a 210 kDa (Grootegoed *et al.*, 1973; Ratanakhanokchai *et al.*, 1992); (v) presença ou não de resíduos de carboidratos na estrutura protéica; (vi) inibição da atividade por íons de metais pesados; (vii) requerimento ou não de íons cálcio para expressão da atividade biológica e termoestabilidade; (viii) Os resíduos catalíticos estão contidos em uma estrutura protéica em forma de barril paralelo (α/β)₈ análogo ao barril da triose fosfato isomerase (TIM *barrel*) (MacGrecor *et al.*, 2001) (Figura 4); (ix) Todas tem quatro regiões altamente conservadas em sua seqüência primária contendo o sítio catalítico e os mais importantes sítios de ligação ao substrato, além de conter os resíduos catalíticos altamente conservados (Figura 5).



Figura 4. Estrutura tridimensional predita da amilase de *Cryptococcus* sp S-2. A figura mostra a estrutura protéica em forma de barril paralelo (α/β)₈. Fonte: RCSB PDB Protein Data Bank.

(A)			
I	116 VDVVANH 122	II	202 GLRIDTVKH 210
	●		●
III	226 YCIGEVLD 233	IV	292 FVENHD 297
(B) More generally			
I	XDXXXNH	II	GXRDXZZ
III	XXX(G/A)EZZZ	IV	XXBBHD

Figura 5. Representação das quatro regiões conservadas na família das α -amilases. Regiões conservadas para a amilase de *A. oryzae* (Taka-amylase) (A) e um grupo generalizado de seqüências consenso para outras amilases (B). Em (B) os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos estão representados pelas letras **X** e **B**, respectivamente. Resíduos importantes para a especificidade estão representados pela letra **Z**. Os resíduos catalíticos estão representados por (●). Fonte: MacGrecor *et al.* (2001), com modificações.

4.3.2 Mecanismo de ação das α -amilases

Para as α -amilases, o mecanismo catalítico mais aceito é o de duplo deslocamento com manutenção da configuração anomérica original (α) do produto originado. Esse mecanismo envolve 2 resíduos catalíticos no sítio ativo; um ácido glutâmico que atua na catálise ácido/base e um aspartato que atua como nucleófilo. Todo o mecanismo pode ser agrupado em 5 etapas: (i) depois de o substrato ter se ligado ao sítio ativo, o ácido glutâmico protonado doa um próton para o oxigênio da ligação glicosídica, (ii) um estado de transição com um íon oxocarbônio é formado seguido pela formação de um intermediário covalente; (iii) uma molécula de glicose protonada deixa o sítio ativo, enquanto uma molécula de água ou uma nova molécula de glicose interage no sítio ativo a ataca a ligação covalente entre a molécula de glicose e o aspartato; (iv) um estado de transição com um íon oxocarbônio é formado novamente; (v) o glutamato que atua na catálise agora como uma base aceita um hidrogênio da água ou da nova molécula de glicose (Van der Maarel *et al.*, 2002).

4.3.3 Origens e métodos de produção das α -amilases

Amilases podem ser encontradas em microrganismos, plantas e animais. α -Amilases industriais podem ser obtidas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. No entanto, α -amilase bacteriana é geralmente preferida à fúngica por serem mais termoestáveis. As vantagens de se usar amilases termoestáveis em processos industriais incluem; baixo risco de contaminação, eliminação da etapa de resfriamento e aumento da taxa de difusão (Lin *et al.*, 1998). A seleção da cepa produtora é um importante fator no processo de produção de amilases. Às vezes, uma única cepa pode produzir mais que uma enzima, como α -amilases e glicoamilases. A produção comercial de amilases é seguida de vários passos de padronização de cultivo do microrganismo, isso porque as condições exigidas para um ótimo crescimento do microrganismo nem sempre são as mesmas para a produção de enzimas. Esses parâmetros incluem suplementação nutricional, pH do meio de cultura, pressão osmótica, grau de aeração, temperatura e controle da contaminação durante o cultivo (Pandey *et al.*, 2000).

Bactérias do gênero *Bacillus* e fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são considerados fontes importantes de amilases, sendo usados para a produção de enzimas através de técnicas de fermentação submersa (SmF) e fermentação em estado sólido (SSF) (Ragunathan & Swaminathan, 2005; Shoji *et al.*, 2007; Gangadharan *et al.*, 2007; Swain & Ray, 2007;). A fermentação em estado sólido tem despertado grande interesse em vista das vantagens econômicas e de engenharia, isto é, planejamento e construção de fermentadores (Pandey *et al.*, 2000). A composição do meio de cultura é simples com um custo relativamente baixo. Baseia-se normalmente em resíduos agrícolas como soro de queijo, farinha de soja, espiga de milho, farelo de trigo, palha de arroz e melaço de cana-de-açúcar, que são complementados com uma fonte de nitrogênio, em geral sulfato de amônio, uréia ou nitrito de potássio, e uma fonte de fosfato, como o fosfato monobásico e o fosfato dibásico de sódio e de potássio. Alta densidade celular e alta taxa de crescimento específico podem ser obtidas com glicose, mas alta atividade específica e alta taxa de produção de enzima são obtidas usando o amido como única fonte de carbono (Pandey *et al.*, 2000). Várias metodologias que se baseiam em fermentação submersa (SmF), estado sólido (SSF) ou por imobilização celular estão descritos na literatura para a produção de amilases (Krishna, 2005; Kunamneni *et al.*, 2005; Ertan *et al.*, 2007). Para bactérias são comumente usados: processo bifásico, bioprocessamento de reciclagem celular, acoplamento de fermentação e microfiltração, fermentação contínua e reciclagem celular. Para fungos filamentosos e leveduras o cultivo em estado sólido usando resíduos agrícolas tem mostrado os melhores resultados (Pandey *et al.*, 2000). O fungo

termofílico *Thermomyces lanuginosus* foi relatado como um excelente microrganismo produtor de α -amilase (Kunamneni *et al.*, 2005).

4.3.4 Indução das α -amilases

Em microrganismos amilolíticos as amilases são induzidas na presença de amido (ou dos seus produtos de hidrólise, como maltooligosacarídeos) como única fonte de carbono. Existem muitos relatos na literatura sobre indução de amilases em diversas linhagens de *Aspergillus oryzae* sugerindo que a molécula indutora geralmente é a maltose (Errat *et al.*, 1984). Outras fontes de carbono como lactose, trealose e α -metil-D-glicosídeo também foram descritos na literatura como indutores (Yabuki *et al.*, 1977). α -Amilases e outras enzimas induzidas estão sujeitas à repressão catabólica por sacarose e frutose (Carlsen & Nielsen, 2001), glicose e outros monosacarídeos (Morkeberg *et al.*, 1995; Bhella & Altosaar, 1985). Contudo existe controvérsia em relação ao papel da glicose como fonte repressora para a produção de amilases em alguns microrganismos. Por exemplo, Carlsen & Nielsen (2001) relataram a repressão da produção da α -amilase de *A. oryzae* (A1560) quando glicose foi adicionada no meio a uma concentração menor que 10 mg/L.

4.3.5 Extração e purificação das α -amilases

A aplicação de enzimas nos setores farmacêuticos e clínicos requer amilases puras de alta qualidade. Assim é importante desenvolver processos economicamente viáveis para obtenção de enzimas puras e com máxima atividade específica. Tradicionalmente, a purificação de amilases do meio de cultivo inclui diversas etapas como centrifugação da cultura, concentração seletiva do sobrenadante (comumente por ultrafiltração ou por liofilização), diálise, precipitação das enzimas por sulfato de amônio ou solventes como ácido tricloroacético (TCA), etanol e acetona gelada. O extrato bruto ou sobrenadante é submetido à liofilização e em seguida à cromatografia (de afinidade, troca-iônica ou gel filtração). Muitas amilases já foram purificadas usando apenas uma única etapa de cromatografia, mas dependendo das características bioquímicas da amilase em questão, são necessárias duas ou mais etapas de purificação (Gupta *et al.*, 2003).

Outra tecnologia com grande potencial para ser usada na purificação e imobilização de α -amilases está relacionada ao sítio de ligação ao amido dessas enzimas. Esse domínio está presente em 10% das amilases e enzimas relacionadas. Nesta tecnologia, o amido pode ser

usado como uma excelente matriz de afinidade, principalmente devido às suas propriedades físico-químicas e seu baixo custo. Explorando as características dessa matriz, pesquisadores têm usado os SBDs de várias amilases como etiquetas (*tags*) para purificação de proteínas recombinantes (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005). Usando esta tecnologia, Dalmia & Nikolov (1994) expressaram em *E. coli* uma proteína de fusão formada pela β -galactosidase e o domínio SBD e, desta forma, foi possível purificar a proteína usando uma coluna de amido. Neste trabalho os autores relataram que depois da eluição com maltodextrina a proteína de fusão manteve a atividade de β -galactosidase.

4.3.6 Aplicações Industriais das α -amilases

As amilases representam 25% do mercado de enzimas e encontram aplicações em todos os processos industriais que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido (Saxena *et al.*, 2007). Indústrias como as de alimentos, de bebidas, de detergentes, têxteis e de papel lideram o mercado consumidor de α -amilases (Pandey *et al.*, 2000). Assim, amilases microbianas têm substituído completamente a hidrólise química do amido em escala industrial (Gupta *et al.*, 2003), constituindo o maior mercado de vendas de enzimas (Aehle & Misset, 1999; Gupta *et al.*, 2003). Elas podem também ter aplicações nas indústrias farmacêuticas e de química analítica. Além disso, uma das aplicações mais importante de amilases e glicoamilases é na produção industrial de glicose e frutose a partir do amido e na produção de etanol.

5. Leveduras amilolíticas

A habilidade das leveduras em hidrolisar amido está distribuída em diferentes gêneros e espécies de leveduras. Estima-se que na natureza existam mais de 150 espécies de leveduras amilolíticas e muitas delas não são adequadas para promover uma fermentação a partir do amido (Spencer & Spencer, 1997)

Schwanniomyces occidentalis produz amilase (Yáñez *et al.*, 1998), α -glicosidase (Sato *et al.*, 2005) e fermenta muitos substratos amiláceos completamente. Essa levedura tem sido chamada de uma “superlevedura”, pois é capaz de fermentar vários substratos. (Ingledew, 1987).

Saccharomycopsis capsularis, além de produzir amilases (Soni *et al.*, 1996), consegue degradar amido a glicose e produzir etanol (Tsuyoshi *et al.*, 2005). Um número de leveduras do

gênero *Pichia* (incluindo *Hansenula*), por exemplo, *Hansenula capsulata*, também fermenta substratos amiláceos.

5.1 A levedura *Cryptococcus flavus*

A levedura *Cryptococcus flavus*, utilizada neste trabalho, foi isolada a partir de frutos do cerrado brasileiro. Ensaios biológicos demonstraram que *C. flavus* possui uma alta atividade amilolítica. A amilase nativa desta levedura foi primeiramente isolada por Wanderley *et al.* (2004). Esta enzima apresenta algumas propriedades bioquímicas interessantes para aplicação industrial, tais como: alta afinidade pelo amido como substrato ($K_m = 0,056$ mg/mL), temperatura ótima de 55°C e termoestabilidade.

Embora o gênero *Cryptococcus* seja bastante conhecido na literatura por abranger a levedura patogênica *Cryptococcus neoformans*, pouco se sabe sobre a biologia molecular das espécies de *Cryptococcus* e muito menos sobre as enzimas hidrolíticas produzidas por estes organismos. Embora *C. flavus* seja capaz de metabolizar amido, este microrganismo não pode ser usado para a produção de etanol por não possuir *Status GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) e por ter baixa tolerância ao etanol. Até a elaboração do trabalho dessa tese, existiam apenas dois trabalhos citados na literatura sobre amilases de *Cryptococcus*; *Cryptococcus* sp. S-2 (Iefuji *et al.*, 1996) e *C. flavus* (Wanderley *et al.*, 2004).

6. *Saccharomyces cerevisiae* como hospedeira para expressão heteróloga

Leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares que são bastante atrativos para utilização em processos de biotecnologia devido à facilidade de manipulação genética e por realizarem processamento pós-traducionais eucariótico nas proteínas que expressam. *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo muito bem estudado e informações sobre sua genética, biologia celular, biologia molecular (Herskowits *et al.*, 1992) e fisiologia têm contribuído para o entendimento da célula eucariótica, bem como da biologia humana. Além disso, este organismo teve o seu genoma funcional publicado (Giaever *et al.*, 2002). Desde muitos anos *S. cerevisiae* tem sido usada pelo homem para fabricação de pães e bebidas alcoólicas e atualmente, devido à sua classificação como organismo GRAS (*Generally Regarded as Safe*), é utilizada em processos industriais. Isso só foi possível devido a todo esse tempo de aplicação na fabricação de produtos de consumo humano e por ser um

microrganismo não-patogênico (Ostergaard *et al.*, 2000), apesar de, em alguns casos, ser um patógeno oportunista (Goldstein & McCusker, 2001).

Durante as duas últimas décadas os estudos em engenharia genética têm permitido construir linhagens de microrganismos capazes de produzir proteínas de interesse em grandes quantidades e de boa qualidade. *S. cerevisiae* é um microrganismo facilmente manipulado geneticamente pela tecnologia do DNA recombinante e seu processo de fermentação é bem conhecido e estabelecido. Devido a essas vantagens e a possibilidade de se modificar as vias metabólicas a fim de aumentar o rendimento de produção, muitas proteínas heterólogas são produzidas nesse microrganismo, dentre elas, a primeira vacina recombinante comercializada, para hepatite B (Gellissen & Hollenberg, 1997). A expressão heteróloga em *S. cerevisiae* é facilitada, pois possui um protocolo de transformação simples e uma taxa de recombinação homóloga muito eficiente *in vivo*, além de ser um dos poucos eucariotos que possui um plasmídeo natural, o 2 µm, que permite a construção de vetores para a transferência de genes e sistemas de expressão (Brandão, 1996).

6.1 Expressão de amilases em *S. cerevisiae*

Atualmente, as leveduras do gênero *Saccharomyces* ainda são as mais usadas para a produção de etanol devido à grande tolerância a esse composto (Bai *et al.*, 2008), mas são incapazes de usar amido como única fonte de carbono (Ghang *et al.*, 2007). Por isso, vários autores têm desenvolvido cepas de *S. cerevisiae* contendo genes de amilases e glicoamilases de outros organismos, possibilitando, desta forma, que esses novos clones sejam capazes de degradar amido para a produção de etanol (Steyn & Pretorius, 1991; Moraes *et al.*, 1995; Janse & Pretorius, 1995; Murai *et al.* (1999); Marin *et al.* (2001); Eksteen *et al.* (2003); Ghang *et al.* (2007) e Wong *et al.* (2007).

Essa levedura já foi utilizada como sistema heterólogo para expressão de amilases oriundas de diversos organismos: *Cryptococcus* sp. S-2 (Iefuji *et al.*, 1996), *A. oryzae* (Nieto *et al.*, 1999), *Schwanniomyces occidentalis* (Kang *et al.*, 2003) e *Streptococcus bovis* (Khaw *et al.*, 2005). A manipulação destas leveduras para produzir enzimas hidrolíticas poderia tornar a hidrólise do amido mais eficiente e assim melhorar o rendimento da fermentação alcoólica (Marin *et al.*, 2001).

JUSTIFICATIVA

Com o crescente aumento da população mundial, as fontes de energia não-renováveis vêm se tornando escassas e, atualmente, a procura por fontes renováveis alternativas tem sido cada vez maior. Tais fontes são vistas como uma solução parcial à crise de energia, principalmente, porque podem ajudar a diminuir a dependência do país da importação do petróleo. O etanol é uma dessas fontes renováveis que não polui tanto o ambiente como os combustíveis fósseis. Com o advento e melhor familiarização da tecnologia do DNA recombinante, o uso de leveduras geneticamente modificadas para produzir etanol tem sido uma alternativa bastante promissora.

Nesse contexto, os Laboratórios de Enzimologia (UFG e UnB) e o de Biologia Molecular (UnB) vêm desenvolvendo pesquisas no sentido de caracterizar novas amilases e produzir novas cepas de *S. cerevisiae* transformadas geneticamente com genes heterólogos de amilases. Dentre esses trabalhos, destaca-se a construção de uma proteína de fusão formada pela α -amilase de *B. subtilis* e a glicoamilase de *A. awamori* que foi expressa em *S. cerevisiae*, conferindo a essa levedura geneticamente modificada a capacidade de crescer em meio contendo amido como única fonte de carbono (Moraes *et al.*, 1995). Além desse trabalho, buscaram-se novas fontes de amilases na biodiversidade do cerrado para que novas propriedades amilolíticas fossem exploradas. Um dos resultados dessa pesquisa foi o isolamento de uma cepa da levedura, classificada como *C. flavus*, que é capaz de secretar uma amilase que apresenta algumas propriedades importantes para aplicações biotecnológicas, tais como: alta afinidade pelo substrato ($K_m = 0,056$ mg/mL), temperatura ótima de 55 °C e termoestabilidade. A clonagem e expressão heteróloga do gene correspondente a esta enzima é uma etapa importante para a confirmação desta atividade.

A hipótese de trabalho a ser investigada é que a ação combinada da amilase de *C. flavus* com a glicoamilase de *A. awamori* poderá levar a uma degradação mais eficiente do amido.

OBJETIVOS

1. Geral

Este trabalho tem como objetivo a clonagem e expressão de um gene da amilase de *C. flavus* (*AMY1*) e sua aplicação na degradação do amido.

2. Específicos

1. Clonar e caracterizar as versões genômica e cDNA do gene da amilase de *C. flavus* (*AMY1*);
2. Clonar o cDNA do gene *AMY1* no vetor de expressão YEp351-PGK e expressar em *S. cerevisiae* CENPK2;
3. Co-expressar os genes *AMY1* e da glicoamilase (GA) de *Aspergillus awamori* em *S. cerevisiae* CENPK2.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Linhagens utilizadas

1.1 Linhagem de *Cryptococcus flavus*

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

1.2 Linhagens bacterianas

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho e seus respectivos genótipos estão descritos na tabela abaixo. As linhagens celulares foram estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio *Luria-Bertani* – LB (ver seção de meios de cultura) contendo 25% de glicerol estéril.

Tabela 1. Linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho e seus respectivos genótipos

Linhagem	Genótipo	Referência
DH5 α	<i>EndA1 recA1 hsdR17 supE44 gyr A96 thi-1 relA1</i>	Sambrook & Russel (2001)
EPI300	<i>ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i>-<i>hsdRMS</i>- <i>mcrBC</i>) ϕ80<i>dlacZ</i>ΔM15 <i>ΔlacX74 recA1 endA1</i> <i>araD139 Δ(ara, leu)7697</i> <i>galU galK λ- rpsL nupG</i> <i>trfA tonA</i></i>	EPICENTRE [®] Biotechnologies

1.3 Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada neste trabalho foi a CENPK2, de genótipo (*MATa/a*, *ura3-52/ura3-52*, *leu 2-3,112/ leu 2-3, 112*, *trp1-289/trp1-289*, *his3-1/his3-1*).

2. Plasmídios utilizados

Plasmídios	Referência
pGEM-T (Figura 6)	Promega
YEp351-PGK (Figura 7)	Moraes <i>et al.</i> , 1995
YEp352-PGK (Figura 8)	Moraes <i>et al.</i> , 1995
pG5 (Figura 9)	Moraes <i>et al.</i> , 1995

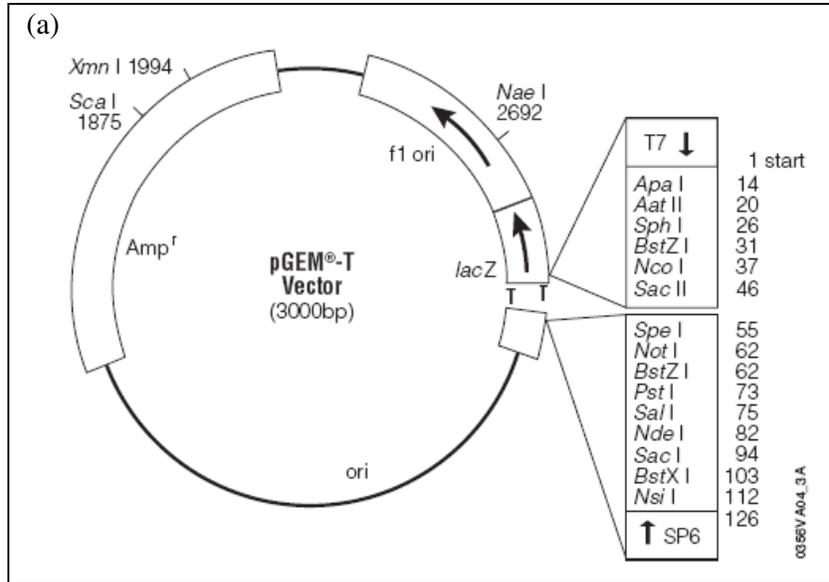


Figura 6. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM-T.

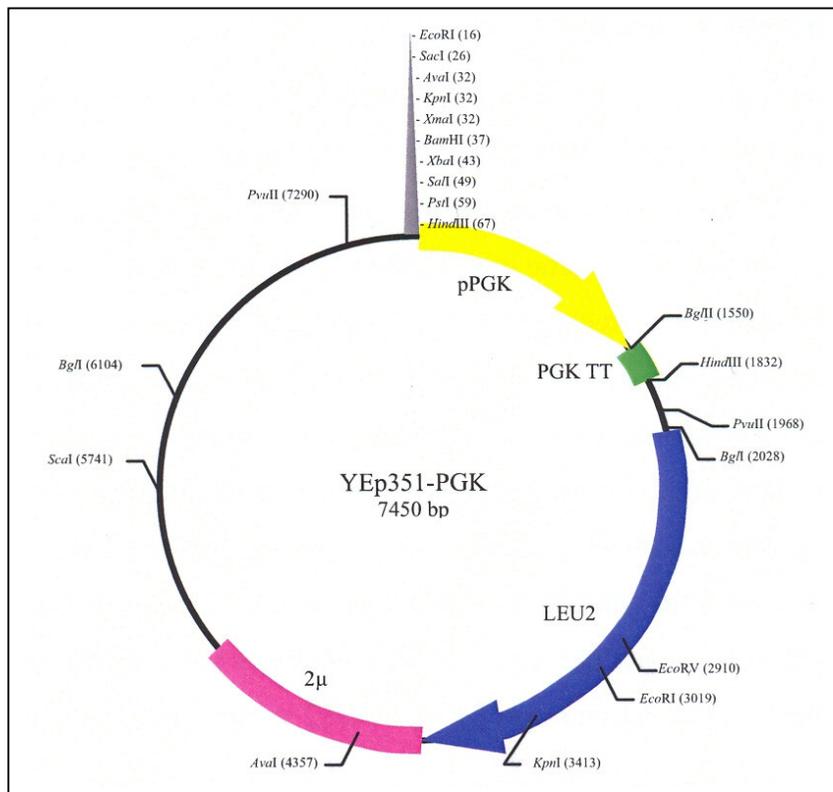


Figura 7. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão YEp351-PGK.

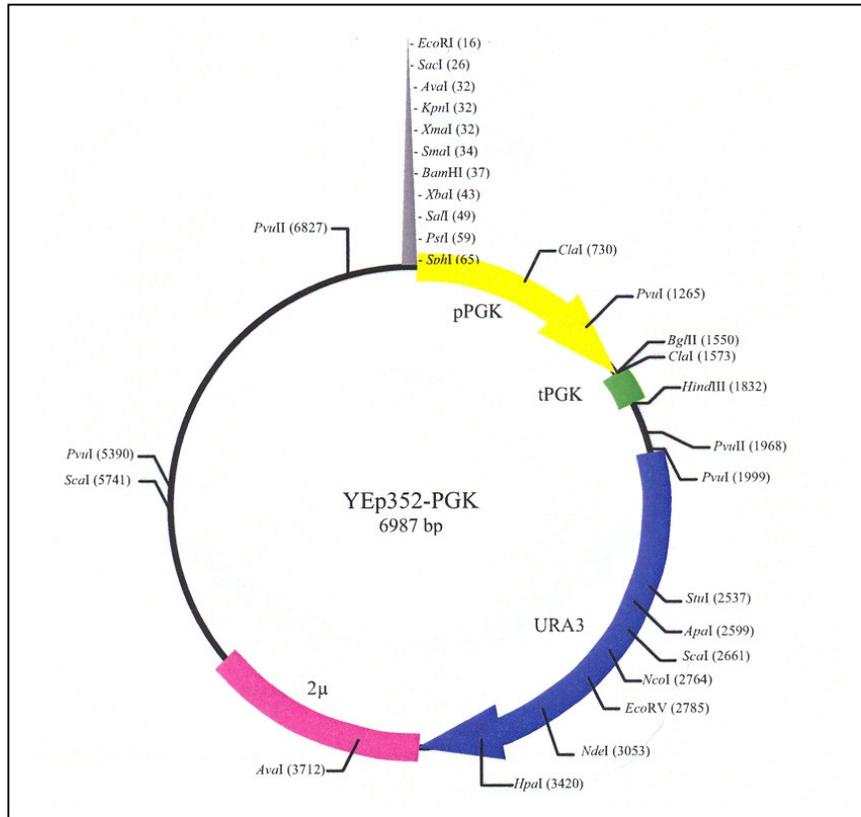


Figura 8. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão YEp352-PGK.

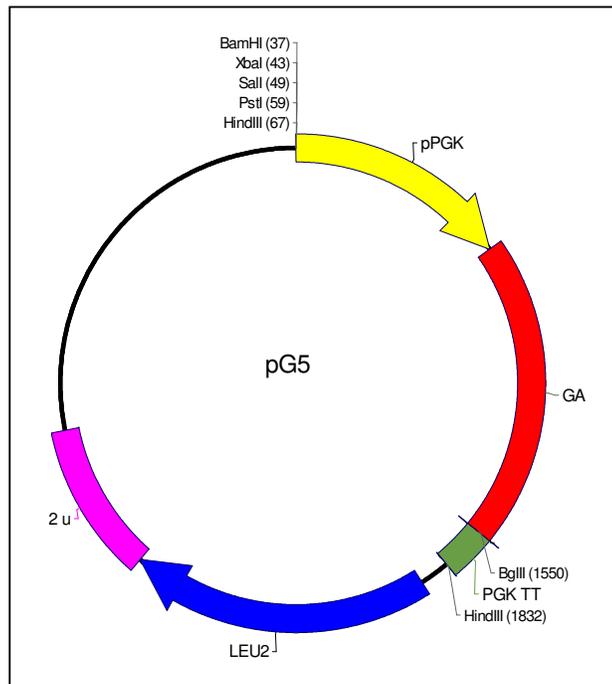


Figura 9. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pG5

Tabela 2 . Seqüência dos *primers* utilizados em reações de PCR, com suas respectivas seqüências, temperaturas de anelamento e sítios de restrição sublinhados.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	T _m (°C)	sítio
CFAMY5	<u>AGATCT</u> ACCATGGCTCCTGTCCGCTCCCTAG	66,1	<i>Bgl</i> III
CFAMY3	<u>AGATCT</u> CTAGGAGGACCACGTAAACTC	58,7	<i>Bgl</i> III
CFSP5	<u>CGAATT</u> CCTGTCTCCAGCCGAATGGCGA	88,0	<i>Eco</i> RI
CFAMYSEQ3	TCTGACTGCTCGGACACAAC	57,1	-
CFAMYSEQ5	CAAAGGTGCCATTGCAGTAG	54,3	-
CF5	GCTTACCACGGTACTGG	67	-
CF3	CCACAGTGCCTCTCGGT	68	-
M13 – Universal Forward	GTTTTCCCAGTCACGAC	52	-
M13 – Universal Reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	54	-

3. Meios de cultura e substratos

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

Meio Luria-Bertani (MEIO LB)

Peptona caseína 1,0% (p/v)

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

NaCl 1,0% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2

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

Meio SOB

Bacto-Triptona 2,0% (p/v)

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

NaCl	0,0584% (p/v)
KCl	0,0186% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2

Meio SOC

SOB	100 mL
Glicose	20 mM
MgCl ₂	5,0 mM
MgSO ₄	5,0 mM

As soluções de glicose, MgCl₂, e MgSO₄, foram preparadas em água bidestilada e esterilizadas por filtração em membrana milipore (0,2 µm).

Meio YPD

Extrato de Levedura	1,0% (p/v)
Peptona de caseína	2,0% (p/v)
Glicose	2,0% (p/v)

A glicose foi autoclavada separadamente.

Para meio sólido foi adicionado 15g/L de Agar bacteriológico

YNB 13,4% (Sem aminoácidos)

<i>Yeast Nitrogen Base without Amino Acids</i> (Difco)	3,4% (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10% (p/v)

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

Meio mínimo SD (*Synthetic Dextrose minimal media*)

YNB	0,67%
Tampão Acetato de Sódio 0,5M pH 5,5	50 mM
Glicose*	2% (p/v)

Quando necessário acrescentar os aminoácidos e bases nas seguintes concentrações:

Uracila	0,002% (p/v)
Triptofano	0,002% (p/v)
Histidina	0,002% (p/v)

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

* A glicose 2% foi substituída por amido 1% em experimentos para verificação da capacidade de degradação do amido em meio líquido. No experimento de fermentação, dos transformantes de *S. cerevisiae* (expressando a amilase, a glicoamilase ou as duas enzimas simultaneamente).

Meio SDA (*Synthetic Dextrose Agar minimal médium*)

Para detecção de atividade amilolítica o meio SD foi acrescido dos complementos necessários e de:

Amido solúvel 1%

Suplementos apropriados para cada transformante de *S. cerevisiae* (ver acima)

Meio de indução de amilase (SSM, *Synthetic Starch médium*)

Amido solúvel 2% (p/v)

Fonte de Nitrogênio **

** Foram utilizadas uma dessas fontes de nitrogênio; YNB 0,67% (p/v), YNB 1,34% (p/v), Extrato de levedura 1,34%, Uréia 1,34% (p/v), Sulfato de amônio 1,34% (p/v), extrato de levedura 0,67% (p/v) + uréia 0,67% (p/v) e extrato de levedura 0,67% (p/v) + sulfato de amônio 0,67% (p/v).

4. Soluções e Tampões

Todos os reagentes e águas utilizados no preparo de soluções para uso em experimentos com RNA estavam em condições livres de RNase preparados conforme descrito por Sambrook & Russel (2001).

4.1 Dosagem de atividade amilolítica

TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,5M – pH 5,5

Acetato de Sódio 41g

Água destilada (q.s.p) 1L

* corrige o pH para 5,5 com Ácido acético glacial

ÁCIDO ACÉTICO 1M

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

REAGENTE FUWA

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

Amido (Sigma) solúvel 0,5%

0,5 g de amido foi pesado e dissolvido em aproximadamente 80 mL de água destilada. Em seguida foi aquecida em forno microondas até se tornar transparente sem entrar em ebulição. Usando uma proveta, o volume foi completado para 100 mL com água destilada. Logo após esse procedimento, a solução foi deixada à temperatura ambiente.

4.2 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

ACRILAMIDA:BIS ACRILAMIDA (39:1)

Acrilamida	39 g
Bis-acrilamida	1 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada ao abrigo da luz a 4 °C.

TRIS-HCL 1,5M pH 8,8

TRIS	18,2 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

O pH foi ajustado com HCL fumegante

TRIS-HCL 1M pH 6,8

TRIS	12,1 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

O pH foi ajustado com HCL fumegante

SDS 10% (p/v)

SDS	1 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

PERSULFATO DE AMÔNIO (P.A) 10% (p/v)

P.A	1 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

O P.A foi dissolvido em água e estocado a - 20 °C.

ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)

Um volume de 1 mL de água destilada foi adicionado a 50 g de ácido tricloroacético. Após todo o ácido ser dissolvido, adicionou-se água destilada suficiente para um volume final de 50 mL e a solução obtida foi estocada a 4 °C.

TAMPÃO DE AMOSTRA DESNATURANTE (5X)

Tris-HCl 1 M pH 6,8	60 mM
SDS 10% (p/v)	2%
β-Mercaptoetanol	14,4 mM
Glicerol 50%	25%
Azul de bromofenol	0,1%
Água destilada (q.s.p)	10 mL

TAMPÃO DE AMOSTRA NÃO DESNATURANTE (5X)

Tris-HCl 1M pH 6,8	312,5 mM
Glicerol	50%
Azul de bromofenol	0,05%
Água destilada (q.s.p)	10 mL

TAMPÃO DE CORRIDA – TRIS-GLICINA 5X (ESTOQUE)

Tris	16,7 g
Glicina	104,5 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

No momento do uso, foi adicionado SDS para a concentração final de 0,1%.

MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PARA PROTEÍNAS

Foram utilizados os seguintes marcadores: 10 kDa *Protein ladder* (Gibco BRL), SDS-6H2 (Sigma) e *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas Life Science). Todos esses marcadores foram previamente fervidos por 5 minutos antes de ser aplicado no poço.

4.2.1 Revelação das proteínas com corante *Comassie blue*

SOLUÇÃO CORANTE

<i>Comassie blue</i>	0,5 g
Metanol (99,8%)	225 mL
Ácido acético glacial (99,7%)	50 mL
Água destilada (q.s.p)	500 mL

SOLUÇÃO DESCORANTE PARA “COOMASSIE BLUE”

Metanol (99,8%)	30 mL
Ácido acético glacial (99,7%)	7 mL
Água destilada (q.s.p)	100 mL

4.2.2 Revelação das proteínas por coloração com nitrato de prata

SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO

Metanol (99,8%)	500 mL
Ácido Acético Glacial	120 mL
Formaldeído (36,5 a 38%)	1 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

SOLUÇÃO DE LAVAGEM

Etanol (99,8%)	500 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

SOLUÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTO

Tiosulfato de Sódio	20 mg
Água destilada (q.s.p)	100 mL

Preparo no momento do uso.

SOLUÇÃO DE IMPREGNAÇÃO COM PRATA

Nitrato de Prata	0,2 g
Formaldeído (36,5% a 38%)	75 µL
Água destilada (q.s.p)	100 mL

SOLUÇÃO DE REVELAÇÃO

Carbonato de Sódio (estoque)	6,0%
------------------------------	------

A solução reveladora foi preparada misturando-se 98 mL da solução estoque de carbonato de sódio com 2 mL da solução de tratamento e adicionando 0,05% de formaldeído a 37% e tiosulfato de sódio 4mg/mL.

SOLUÇÃO DE PARADA

Metanol (P.A)	500 mL
Ácido Acético Glacial (P.A)	120 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

SOLUÇÃO DESCORANTE PARA PRATA

Ferrocianeto de Potássio	1,56 g
Tiosulfato de Sódio	0,61 g
Carbonato de Sódio	0,33 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

4.3 Extração de DNA de levedura

TAMPÃO SE

Sorbitol	0,9 M
EDTA	100 mM

O pH foi ajustado para 7,5

SOLUÇÃO DE NOVOZIMA

Novozima 100 mg/mL em água

SOLUÇÃO TE₂₀

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

SOLUÇÃO DE EQUILÍBRIO

Tris-HCL (pH 8,5)	100 mM
NaCL	100 mM

CLOROFANE

Fenol	1,0 v
Clorofórmio	1,0 v
8-Hidroxiquinolina	0,05%
β-mercaptoetanol	0,50%

Homogeneizar repetidas vezes com solução de equilíbrio

SOLUÇÃO TE

Tris-HCL (pH 7,5)	10 mM
EDTA	1 mM

4.4 Extração de DNA plasmidial

SOLUÇÃO ESTOQUE DE AMPICILINA 500X

Ampicilina	10 mg
Água destilada	100 mL

Esterilizar por filtração

SOLUÇÃO I

Tris-HCL (pH 8,0)	25 mM
EDTA	10 mM
Glicose	50 mM

SOLUÇÃO II

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

Preparada no momento do uso.

SOLUÇÃO III

Acetato de Sódio	3,0 M
Ácido acético	2,0 M

SOLUÇÃO RNase A

RNaseA	4 mg/mL
--------	---------

A solução foi preparada em água deionizada e aquecida por 100 °C. A solução foi estocada a – 20 °C.

4.5 Análise de ácidos nucléicos em gel de agarose

SOLUÇÃO DE BROMETO DE ETÍDIO

Brometo de Etídeo	1,0% (p/v)
H ₂ O destilada (q.s.p)	100mL

TAMPÃO DE CORRIDA PARA GEL DE AGAROSE-TEB (10X)

Trizma base	0,89 M
Ácido Bórico	0,89 M
EDTA	0,08 M

Ajustar o pH para 8,4

TAMPÃO DE AMOSTRA PARA GEL DE AGAROSE (10X)

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

4.6 Transformação rápida de levedura em fase estacionária

TAMPÃO One-step

Acetato de Lítio *	0,2 M
PEG 3350 (p/v)**	40%
DTT*	100 mM

* filtrado com filtros de 0,22 µm, ** autoclavado

MÉTODOS

1. Manutenção da levedura e condições de cultura

A linhagem selvagem da levedura *C. flavus* foi semeada e mantida em YPD-Ágar, temperatura ambiente, com a finalidade de se obter colônias isoladas durante 72 horas. Para o crescimento em culturas líquidas, foram inoculadas colônias isoladas em YPD, crescidas a 28 °C e rotação de 200 rpm até atingir a OD₆₀₀ desejada. Para a extração de RNA da levedura *C. flavus*, as células crescidas previamente em meio YPD foram lavadas duas vezes com água destilada estéril gelada antes de serem inoculadas no meio de indução (SSM). As culturas de indução foram crescidas a 28 °C sob agitação de 200 rpm durante 48 horas.

Para detecção de atividade amilolítica, as linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* e selvagem de *C. flavus* foram cultivadas em meio mínimo SD com os suplementos apropriados. Este mesmo meio acrescido de glicerol na concentração final de 25% estéril foi utilizado para a manutenção desses clones a – 80 °C.

2. Produção da amilase nativa de *C. flavus* (Amy1)

O experimento de produção enzimática iniciou-se com o pré-crescimento da levedura em meio YPD durante 48 horas. Antes da adição do pré-inóculo em cada meio de indução, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min, as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril, ressuspendidas em água destilada estéril e a concentração celular foi determinada através da medida de OD₆₀₀. Foi adicionada uma quantidade de células para uma OD₆₀₀ = 1,0 no meio de indução (Parachin, 2006). Seis

diferentes fontes de nitrogênio foram testadas: YNB 1,34% (p/v), Extrato de levedura 1,34% (p/v), Uréia 1,34% (p/v), sulfato de amônio 1,34% (p/v), extrato de levedura 0,67% (p/v) e uréia 0,67% (p/v) (1:1) e extrato de levedura 0,67% (p/v) e sulfato de amônio 0,67% (p/v) (1:1).

O cultivo foi realizado em *shaker* a 28 °C, sob agitação (200 rpm) até 120 horas. Em intervalos de 24 horas, alíquotas de 2 mL da cultura foram retiradas para verificar o crescimento celular (OD_{600}) e em seguida a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi analisado quanto à atividade amilolítica pelo teste de Fuwa (1954).

Para o experimento de produção enzimática para a purificação da amilase, uma curva de crescimento da levedura *C. flavus* foi feita durante 30 horas de crescimento, onde a cada 3 horas, 2 mL da cultura foram retirados para dosar o crescimento celular e atividade enzimática conforme descrito anteriormente.

3. Purificação da Amy1

3.1 Cromatografia por troca iônica.

A primeira etapa de purificação da Amy1 consistiu em dialisar o sobrenadante obtido no item 2 contra água destilada por aproximadamente 10 horas, a 4 °C. Após dialisado o sobrenadante foi congelado e liofilizado. Após liofilizado, cada 4 gramas de material foi solubilizado em 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, contendo 1 mM de $CaCl_2$. Esta amostra foi aplicada em uma coluna (3,0 x 24cm) de cromatografia de troca iônica, Q-sepharose *Fast Flow Anion Exchanger* (Sigma) com um fluxo de 60 mL/h. As amostras contendo proteínas que não ligaram na coluna foram coletadas em um becker e usadas para a determinação da atividade amilolítica. Em seguida, a coluna foi lavada com 200 mL de tampão acetato de sódio 50 mM contendo 1 mM $CaCl_2$ e 0,02% (p/v) de azida sódica sob fluxo de 60 mL/h. Após a lavagem da coluna foi aplicado um gradiente de NaCl de 0 a 0,5M. Frações de 1,5 mL foram coletadas e utilizadas para determinação de proteínas (absorbância 280nm) e atividade amilolítica. As frações contendo atividade de amilase foram reunidas, dialisadas, congeladas e concentradas por liofilização. Para a amilase nativa e recombinante o gradiente de NaCl foi aplicado a partir do tubo que se detectou a atividade amilolítica pelo método de Fuwa (1954).

3.2 Cromatografia por filtração em gel

Aproximadamente 500µL da amostra obtida na etapa anterior foram aplicados em uma coluna de filtração em gel, Sephacryl S-100 (1,5 x 48cm) *High Resolution* (Pharmacia). As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, contendo 1 mM de CaCl₂ e 100 mM de NaCl, com um fluxo de 20 mL/h. Frações de 1,0 mL foram coletadas e utilizadas para determinação de proteínas (absorbância 280nm) e atividade amilolítica (Fuwa, 1954). As frações contendo atividade enzimática foram reunidas, dialisadas, congeladas, concentradas por liofilização e estocadas a -20°C, até serem utilizadas.

4. Determinação de proteínas

A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

5. Preparo das amostras para SDS-PAGE

As amostras protéicas obtidas durante as etapas de purificação da amilase nativa de *C. flavus* para visualização em gel SDS-PAGE, foram liofilizadas em tubos Eppendorfs de 1,5 mL de forma que a quantidade de amostra aplicada fosse de aproximadamente 30 µg de proteína/poço. Em relação à amilase recombinante, aproximadamente 5 mL da cultura do sobrenadante e 1-2 mL do eluído das etapas cromatográficas foram liofilizados em tubos Falcon de 15 mL para visualização em SDS-PAGE. Todas as amostras foram ressuspensas em tampão desnaturante. Em seguida as amostras foram fervidas por cinco minutos, aplicadas no gel ou estocadas a -20 °C.

6. Análise das proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A análise do grau de pureza das amostras foi feita utilizando um sistema de eletroforese (Mini-Gel, Sigma) em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). A corrida foi realizada utilizando-se uma voltagem de aproximadamente 80 V até as amostras

entrarem no gel separador e posteriormente a voltagem foi aumentada para 100 V até o final da corrida.

7. Técnicas de coloração do gel

7. 1 Coloração com nitrato de prata

Ao término da corrida eletroforética, as proteínas presentes no gel foram visualizadas utilizando-se o método de coloração com nitrato de prata, conforme descrito por Blum *et al.* (1987). Brevemente, após a corrida, o gel foi incubado, sob agitação constante, durante 1 hora na solução fixadora. Em seguida, o gel foi incubado na solução de lavagem durante 20 min. Após repetir o procedimento de lavagem três vezes, o gel foi incubado na solução de tratamento durante 1 min, seguindo-se de 3 lavagens com água destilada durante 30 segundos cada. Ao término das lavagens, o gel foi incubado durante 20 min na solução de equilíbrio. Novamente, o gel foi lavado com água destilada duas vezes de 20 segundos cada e revelado com a solução de revelação. A reação foi interrompida, após o aparecimento das bandas, transferindo-se o gel para a solução de parada.

7. 2 Coloração com *comassie Brilliant Blue G-250*

As bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após incubação deste durante 1 hora, sob agitação, na solução corante preparada com *Coomassie Brilliant Blue G-250* seguida pela descoloração, incubando o gel sob agitação durante 30 min, ou durante a noite quando necessário, sob agitação, na solução descorante.

8. Detecção de atividade amilolítica em gel de poliacrilamida –Zimograma.

Para determinação de atividade em gel de poliacrilamida (12%) as condições de corrida do gel foram as mesmas descritas no item 6, exceto que o tampão de amostra não continha β -mercaptoetanol. Após a corrida, o gel foi incubado com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5.5) por uma hora. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo uma solução de amido (0,5%) dissolvido no tampão acetato 50 mM, pH 5,5 e incubado por 12 horas a 4 °C . Após esse período, o gel foi incubado por duas

horas a temperatura de 37 °C e revelado com uma solução de iodo-iodeto para visualização das bandas de degradação do amido (Lacks & Springhorn, 1980).

9. Seqüenciamento N-terminal da Amy1

Aproximadamente 50 µg da amilase nativa purificada ressuspensa em água MilliQ foi usada para digestão com tripsina e os peptídeos gerados tiveram suas massas determinadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

10. Extração de DNA total de levedura

A levedura *C. flavus* foi crescida até saturação em 40 mL de meio YPD em um frasco de 250 mL. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g durante 5 min a temperatura ambiente e ressuspensas em 3 mL de tampão SE. Em seguida foi adicionado 100 µL de solução de novozima (100 mg/mL) sendo a suspensão de células incubada a 37 °C. Após 60 min de incubação, a suspensão foi centrifugada a 3000 x g durante 5 min e as células ressuspensas em 3 mL de TE₂₀. A seguir foi adicionado 0,5 mL de SDS 10% sendo agitado gentilmente e incubado a 65 °C durante 30 min. Ao final do período de incubação foi adicionado 1,5 mL de acetato de potássio 5M, e a suspensão incubada no gelo. Após 30 min a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi transferido para um tubo de centrífuga. Adicionou-se 1 volume de clorofane e misturou-se por inversão várias vezes. A mistura foi centrifugada a 3.000 x g durante 10 min sendo a fase aquosa transferida para um tubo de centrífuga limpo. A precipitação do DNA se deu por adição de 2,5 volumes de etanol 100% sendo a amostra incubada a temperatura ambiente. Após 5 min, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C. O precipitado foi lavado com 5 mL de etanol 70% e centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. Após secar, foi ressuspensado em 200 µL de TE acrescido de 4 µL RNase A 4 mg/mL. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% e estocado a -4 °C.

11. Extração de RNA total

Para a extração do RNA total da levedura *C. flavus* foi empregado o reagente TRIzol® (Invitrogen™). Um clone da levedura que estava expressando amilase foi crescido durante 48 h em meio de indução SSM e posteriormente a cultura foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 min. Em seguida, 300 mg do pellet foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 mL, adicionou-se 1 mL do reagente TRIzol ao tubo e o pellet foi homogeneizado até sua completa solubilização. Após esse procedimento, cada amostra foi transferida para outro tubo Eppendorf contendo bolinhas de vidro (*glass beads*) até a marca de 100 µL do próprio tubo. Em seguida, cada tubo Eppendorf foi vedado com *Parafilm* e submetido agitação vigorosa durante 30 minutos. Logo após esse procedimento, cada amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo Eppendorf novo de 1,5 mL e adicionou-se 0,5 mL de isopropanol (0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de TRIzol). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi deixado na bancada até secar sendo ressuscitado em 200µL de água tratada com DEPC.

12. Síntese de cDNA- Transcrição Reversa

A síntese do cDNA foi realizada, utilizando-se o Kit comercial *Superscript*® III *First-strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), catálogo nº 18080-093. Cada reação foi preparada usando os seguintes componentes:

- RNA 2,0 µg
- dNTP(10 mM) 1,0 µL
- OligodT 1,0 µL
- H₂O para o volume final de 13 µL.

Cada reação foi incubada a 65 °C. Após 5 minutos as reações foram colocadas no gelo durante um minuto para a adição do tampão 5X da reação da transcriptase reversa

(contendo MgCl₂), DTT 0,1M, solução RNase *Out* e Superscript III. Em seguida, as reações foram incubadas a 50 °C por 50 minutos. A transcrição reversa foi inibida aumentando-se a temperatura para 70 °C. Após 15 min, as reações foram incubadas novamente no gelo seguindo-se de uma rápida centrifugação e tratamento com RNase H a 37 °C durante 20 minutos. Foram utilizados 2 µL da reação de transcrição reversa como molde para as reações da PCR.

13. PCR

Os *primers* utilizados, apresentados na tabela 2, foram ressuspensos em água MilliQ ou tampão Tris-HCl 4mM, pH 8,0,. As reações de PCR contendo 20 ng de DNA genômico da *C. flavus* ou 1ng de DNA plasmidial (como molde), dNTPs 0,2 mM, tampão da *Taq* DNA polimerase, MgCl₂ 2-3 mM, *Taq* DNA polimerase 1U (CENBIOT), 10 pmol dos *primers* 5' e 3' em um volume final de 50µL, foram realizadas nas seguintes condições: (94 °C/1min), anelamento (50 a 55°C/1 min), extensão (72 °C/1,5 min), extensão final (72°C/5min), por 30 ciclos de desnaturação/anelamento/extensão. As reações de RT-PCR foram realizadas usando *Tgo* DNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals). Outras reações de PCR com Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e Platinum[®] *Pfx* DNA polymerase Amplification System (Invitrogen) foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

14. Purificação dos produtos de PCR

Para purificação dos produtos de PCR foram utilizados os *kits QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen) ou *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante

15. Análise de ácidos nucléicos em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação do tamanho dos fragmentos de DNA, conforme descrito por Azevedo *et al.* (2003). A agarose foi preparada em uma solução tampão TEB (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1mM

pH 8,2) ou TAE (Tris-Acetato 40Mm, EDTA 1Mm pH 8,5) em concentração de 0,8 ou 1%.

Como marcadores moleculares para DNA foram utilizados 1 Kb plus *DNA ladder*, 1 Kb *ladder* (Invitrogen, New England Biolabs ou Promega), *100 bp DNA ladder* (Promega), DNA de fago λ digerido com *EcoRI* e *Hind III* ou DNA de fago λ digerido com *BstE II*.

15.1 Purificação de fragmentos de DNA

A região do gel que continha o fragmento de interesse foi excisada e submetida à purificação utilizando os seguintes *kits* *QIAEX II* (Qiagen), *Concert™ Rapid Gel Extraction System* (Gibco), *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) ou ainda pelo protocolo *GeneClean* modificado: a porção retirada do gel foi pesada, e adicionou-se solução de iodeto de sódio 6M, na proporção de 300 μ L por 100mg de gel, e incubou-se a 55 °C agitando-se freqüentemente até a completa dissolução da agarose. Adicionou-se posteriormente 5 μ L de solução *glassmilk* (sílica em água na proporção 1:1 v/v), e agitou-se no *vortex* até homogeneização. O tubo foi incubado no gelo por 5 min e centrifugado a 10.000 x g por 30s. O precipitado foi ressuspenso em 500 μ L de solução de iodeto de sódio e novamente centrifugado a 10.000 x g por 30s e o precipitado ressuspenso em 250 μ L de solução de iodeto de sódio e centrifugado a 10.000 x g por 30s. Em seguida o precipitado foi lavado três vezes, em cada vez o *pellet* foi ressuspenso com 300 μ L de solução *New Wash* (Etanol 50%: NaCl 0,1M; Tris 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM), agitado no *vortex* e centrifugado a 10.000 por 30s. Após a última lavagem, o precipitado foi ressuspenso em 10 μ L de TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10mM, pH 8,0) e incubado a 55 °C por 3 min, e centrifugado a 10.000 x g por 30s para recuperação do DNA. O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi novamente ressuspenso em 10 μ L de TE, incubado a 55 °C por 3 min e depois centrifugado. Juntou-se os dois sobrenadantes e centrifugou-se novamente a 10.000 x g por 1 minuto para assegurar a inexistência de sílica e o DNA foi estocado a – 20 °C.

16. Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões de moléculas de DNA com enzimas de restrição foram realizadas em sistemas de 10 a 100 µl durante, 1 a 16 h, de acordo com as condições indicadas pelos fabricantes (tampão, BSA e temperatura) utilizando-se 10 a 20 U de enzima para cada 1 µg de DNA.

16.1 Purificação do sistema de digestão

O volume do sistema de digestão foi ajustado para 100 µL, adicionado 100 µL de clorofane (fenol:clorofórmio, 1:1, pH 6,0), agitado vigorosamente no *vortex* durante 3 min e centrifugado a 2.300 x g por 5 min. A fase aquosa foi coletada em um novo tubo e o procedimento foi repetido. Depois de coletar a fase aquosa foram adicionados 5 µL de glicogênio 20 mg/mL, 0,1 volume de NaCl 3M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado, a mistura foi agitada no *vortex* e mantida a – 20 °C por pelo menos 1 h. O sistema foi centrifugado a 12.000 x g por 45 min a 4°C, o sobrenadante e ao precipitado foi adicionado 500 µL de etanol 70% v/v e outra vez centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. O precipitado depois de seco foi ressuscitado em água MilliQ em um volume variando de 10-20 µL.

17. Defosforilação de vetor linearizado

Os vetores linearizados com apenas uma enzima foram defosforilados com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP) da *USB Corporation*. O sistema de defosforilação contendo 500 ng de vetor, 1U da SAP e tampão, foi incubado a 37 °C por 1 h, e a seguir para inativação da enzima, a 65 °C por 30 min.

18. Ligação dos fragmentos de DNA

Nos sistemas de ligação, as concentrações de DNA (razão molar vetor:inserir) variaram entre 1:3 e 1:5. O sistema foi incubado por pelo menos 14 h de acordo com a ligase utilizada, a 16 °C quando o sistema de ligação era composto pela T4 DNA ligase fornecida pela New England Biolabs Inc ou USB (*USB Corporation*), ou a 4 °C quando a T4 DNA ligase utilizada era originada do Kit do pGEM-T System I (Promega). A

quantidade de T4 DNA ligase para cada sistema de ligação foi feita de acordo com as recomendações de cada fabricante.

19. Seqüenciamento de DNA e análise *in silico*

As reações de seqüenciamento foram realizadas com 100 a 200 ng de plasmídios, quantificados por espectrofotometria utilizando o GeneQuant RNA/DNA *Calculator pro* (Biochrom, UK) e analisados no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences®), utilizando-se o kit MegaBACE *Dye Terminator*. A qualidade do seqüenciamento foi realizada pelos programas PHRED e PHRAD (<http://adenina.biomol.unb.br/phph>) e a análise das seqüências foi feita por comparação com as seqüências depositadas em bancos de dados, com o auxílio do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

Os sítios putativos de N-glicosilação foram preditos usando o programa NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). O programa Compute Pi/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) foi usado para o cálculo da massa molecular da amilase. Os alinhamentos das seqüências foram realizados utilizando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Para análise de restrição de seqüências foi usado o programa NEBcutter v.2.0 disponível na internet (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

20. Transformação de *E. coli*

20.1 Choque térmico

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado conforme descrito por Cohen *et al.* (1972) com modificações. As células de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação (250 rpm). Em seguida 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e a cultura de células incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir a OD₆₀₀ de 0,3. As células foram então coletadas por centrifugação durante 10 minutos a 4 °C, velocidade de 3.000 x *g*. O sedimento resultante da centrifugação foi ressuspenso em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e recentrifugado nas condições anteriores. As células foram

então ressuspensas em 1 mL de CaCl_2 100 mM contendo 15% de glicerol e aliqüotadas em volumes de 100 μL para posterior estocagem a -80°C .

Uma alíqüota de 100 μL de células competentes foi descongelada e a seguir acrescentada de no máximo 1/10 do volume de DNA e incubado no gelo. Após 30 minutos de incubação no gelo, o sistema de transformação foi submetido ao choque térmico a 37°C durante 5 minutos ou a 42°C durante 90 segundos. A seguir foi adicionado 1 mL de meio LB e o sistema incubado a 37°C por 1 hora. As células foram semeadas variando o volume de 50 a 200 μL por placas de Petri contendo 20 mL de meio LB ágar com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), X-gal 2% e IPTG 10 mM quando necessário.

20.2 Eletroporação

As células bacterianas da linhagem escolhida foram crescidas durante a noite em 50 mL de meio SOB a 37°C sob agitação de 150 rpm. No dia seguinte, 500 μL de cultura foram diluídos em 200 mL de meio SOB seguido de incubação nas mesmas condições descritas anteriormente até que se atingisse uma OD_{600} de 0,8. Em seguida, as células foram centrifugadas a $3.000 \times g$ durante 10 min a 4°C e o precipitado ressuspensado em 40 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% sendo feitas aliqüotas de 100 μL e estocadas a -80°C . Uma alíqüota de 100 μL foi utilizada para 10 μL de sistema de ligação. O sistema de transformação permaneceu durante 20 minutos no gelo sendo posteriormente colocadas na cubeta de eletroporação previamente resfriada para a realização do choque elétrico. O pulso elétrico foi feito sob os seguintes parâmetros: 25 μF , 200 Ω e 2,5 KV. As células foram removidas da cubeta, utilizando-se 3 mL de meio SOC. Após 1 hora a 37°C , sob agitação de 150 rpm, as células foram semeadas variando o volume de 50 a 200 μL em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB ágar com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), X-Gal 2% e 10 mM de IPTG quando necessário.

21. Mini-preparação de plasmídios por lise alcalina

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 5 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina e crescida por 16-18 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. As células de 3 mL de cultura foram sedimentadas a 10.000 x g durante 2 min e ressuspensas em 200 µL de TE. Em seguida foi adicionado 360 µL de solução II sendo a suspensão homogeneizada por inversão do tubo e incubada a temperatura ambiente. Após 5 min foram adicionados 300 µL de solução III sendo o tubo invertido várias vezes e incubado no gelo durante 5 min. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 x g durante 5 min e o sobrenadante transferido para um tubo contendo 750 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 10.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de TE contendo 4 µL de RNase 4 mg/mL. Após 30 min de incubação a 37 °C, foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e misturado vigorosamente durante 5 min. Em seguida a solução foi centrifugada a 10.000 x g durante 10 min, o sobrenadante transferido para outro tubo e adicionado 750 µL de etanol 100% gelado. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g durante 5 min. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. Após secar na bancada o sedimento foi ressuspendido em 30µL de água.

22. Midi-preparação de plasmídios

Para realizar a purificação de plasmídios em média escala, 50 mL de cultura, foi utilizado o método acima descrito, ajustando-se os volumes dos reagentes; 2 mL de TE, 3,6 mL de solução II, 3 mL da solução III, 1,1 mL de acetato de amônio, 7,5 mL de etanol 100% gelado e lavagem com 2 mL de etanol 70% gelado. Após secar na bancada o sedimento foi ressuspendido em 100-150 µL de água. Alternativamente foi utilizado o Kit comercial *Plasmidial Midi Kit* (Qiagen).

23. Transformação rápida de levedura em fase estacionária

A introdução de plasmídios em leveduras foi realizada utilizando o protocolo descrito por Chen *et al.* (1992). As células da levedura *S. cerevisiae* foram crescidas a

30 °C sob a agitação de 200 rpm. Após atingir a fase estacionária, aproximadamente 18 horas de crescimento, 200 µL da cultura de células foram coletadas e centrifugados a 10.000 x g durante 10 segundos. O sedimento foi ressuspenso em tampão *One Step* ao qual foram adicionados de 50 a 100 ng de DNA plasmidial para um volume final de 100 µL. As células foram incubadas a 45 °C durante 1 hora e semeadas em meio mínimo SD. As placas foram incubadas na estufa a 30 °C durante no mínimo 48 h.

24. Seleção de clones recombinantes

As colônias de *S. cerevisiae* obtidas na transformação foram aleatoriamente selecionadas e transferidas para uma placa de Petri contendo meio mínimo SDA para detecção de atividade em placa. As placas foram incubadas na estufa a 30 °C durante no mínimo 48 horas. As placas foram invertidas e coradas com vapor de iodo e os possíveis clones positivos foram selecionados de acordo com a formação do halo de hidrólise não corado. Como controle negativo da expressão enzimática, células de *S. cerevisiae* foram transformadas com plasmídeo vazio.

25. Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada por dois métodos diferentes, utilizando amido como substrato. O primeiro denominado de atividade dextrinizante, baseia-se na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (Fuwa, 1954). O segundo denominado de método sacarificante, baseia-se na produção de açúcares redutores (Bernfeld, 1955).

25.1 Atividade amilolítica dextrinizante

Para a determinação da atividade enzimática em solução, a reação consiste em acrescentar 60 µL de solução de enzima pura ou sobrenadante e 40 µL de tampão acetato de sódio 0,5M pH 5,5 em 100 µL de uma solução de amido 0,5% (p/v). Essa mistura foi incubada a 40 °C por 30 min. A reação foi então interrompida com a adição de 200 µL da solução de ácido acético 1M e corada com 200 µL de uma solução de iodo/iodeto (Iodo 1% (p/v) dissolvido em etanol. O volume da reação foi completado para 10 mL com água destilada, homogeneizado, e a absorbância

determinada a 660 nm. A quantidade de amido consumido é calculada de acordo com uma curva padrão preparada com concentrações crescentes de amido solúvel de 0–5 mg/mL. A atividade amilolítica foi monitorada pela degradação do amido conforme descrito por Moraes *et al.* (1995). Uma unidade (1U) de atividade de amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto a 40 °C.

25.2 Atividade amilolítica sacarificante

A 40 µL de tampão acetato de sódio (0,5M, pH 5,5), foram adicionados 60 µL de amostra enzimática e 100 µL de solução de amido 0.5% (p/v). A mistura foi incubada a 40°C por 12 horas. Após este tempo, 100 µL da mistura de reação foram coletadas e adicionadas em tubo de ensaio contendo 1,0 mL do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A mistura foi fervida por 5 minutos em banho-maria a 96°C e a absorbância determinada a 550nm. Para os demais experimentos, a 200 µL da amostra (sobrenadante da cultura) foi adicionado 1 mL do reagente DNS. Em seguida essa mistura foi fervida por 5 minutos e após o resfriamento adicionou-se 7 mL de água destilada. A leitura da amostra foi determinada pela absorbância a 550 nm. A quantidade de açúcares redutores formados foi calculada de acordo com uma curva padrão de glicose ou maltose. Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 1mg de açúcar redutor por minuto de reação (Bernfeld, 1955).

26. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose no sobrenadante da cultura de *S. cerevisiae* CENPK2 foi determinada usando o kit de dosagem de glicose “GLUCOX 500” (Doles) de acordo com as recomendações do fabricante.

27. Produção da amilase recombinante produzida por *S. cerevisiae* CENPK2

O experimento de produção iniciou-se com o pré-crescimento da levedura em meio mínimo SD durante 48 horas. Foi adicionando uma quantidade de células para uma $OD_{600}= 0,3$ no meio mínimo SD para a produção da enzima.

O melhor tempo de produção amilolítica em *S. cerevisiae* foi determinado por meio de uma curva de crescimento durante 60 horas, onde a cada 12 horas, 2 mL da cultura foram retirados e o crescimento celular e a atividade enzimática determinadas. Brevemente, um clone amilolítico, previamente selecionado em placa com meio SDA foi pré-crescido em 25 mL de meio mínimo SD e incubado a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm durante 48 h. Após esse período, foi feita a leitura da OD_{600} do pré-inoculo e adicionada uma quantidade de células de $OD_{600}= 0,3$ em 200 mL de meio mínimo SD em Erlenmeyers de 1L. A cultura foi incubada a 30 °C sob agitação de 200 rpm durante 60 horas sendo retirados 2 mL de amostra a cada um dos seguintes tempos: 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas. As células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 5000 rpm durante 10 min. O sobrenadante obtido foi usado como fonte potencial de atividade amilolítica.

Para os experimentos de degradação do amido, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima. No entanto, 2 mL de amostras foram retirados a cada um dos seguintes tempos: 00, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120.

28. Purificação da amilase recombinante

A estratégia de purificação da amilase recombinante foi a mesma empregada para a purificação da amilase nativa, uma coluna de troca iônica e em seguida uma coluna de filtração em gel conforme descrito no item 3. No entanto, a coluna de troca iônica utilizada foi a Sephacryl S-200 *High Resolution* (Pharmacia).e o volume aplicado foi 250 mL do sobrenadante da cultura.

29. Ensaio de N-deglicosilação

O ensaio de deglicosilação das amilases nativa e recombinante foi realizado usando a enzima PNGase F, segundo protocolo descrito pela New England Biolabs® Inc (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productP0704.asp>).

30. Caracterização bioquímica da amilase recombinante

Todos os experimentos de caracterização foram realizados utilizando-se do método de Fuwa (1954) para determinação da atividade amilolítica.

30.1 Determinação do pH e temperatura ótimos

O efeito do pH na atividade da amilase foi determinado incubando-se o sobrenadante da cultura ou a enzima purificada com tampões de mesma força iônica em diferentes valores de pH. Foram utilizados os seguintes tampões na concentração de 50 mM: Glicina-HCL (pH 1-3); acetato de sódio (pH 4,0 - 5,5); fosfato de sódio (pH 6,0 - 7,0) e Tris-HCl (pH 8-10). O efeito do pH na estabilidade da enzima foi realizado pela pré-incubação da enzima por 60 minutos, nos diferentes tampões e, em seguida, a atividade foi determinada conforme descrito no subitem 25.1, nas condições ótimas. O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado incubando a enzima ou sobrenadante da cultura em diferentes temperaturas no pH ótimo. As temperaturas testadas foram 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C. O efeito da temperatura na estabilidade da enzima foi determinado após pré-incubação da enzima nas temperaturas de 55 e 60 °C por 15, 30, 45 e 60 min, e posterior determinação da atividade conforme item 25.1

30.2 Efeito dos íons e DTT

O efeito de íons na atividade da amilase foi determinado após a pré-incubação, por 15 minutos, da enzima com 4mM dos seguintes compostos: MgSO₄, MnCl₂, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, ZnCl₂, CuSO₄ e HgSO₄. O efeito de Ditiotreitól (DTT) na atividade da amilase foi determinado após a pré-incubação, por 15 minutos, da amilase com as seguintes concentrações de DTT: 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mM.

30.3 Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$

As propriedades cinéticas da amilase foram determinadas incubando a enzima em concentrações crescentes de amido (0 a 1,0 mg/mL). Os cálculos dos valores das constantes foram feitos por regressão linear pelo método de Lineweaver-Burk.

30.4 Cromatografia em camada delgada (TLC)

Inicialmente foram preparados os seguintes substratos na concentração de 0,5% (p/v): amido solúvel (Synth), amilopectina (Sigma), amilose (Sigma), glicogênio (USB) e pululana. Em seguida, foram feitas reações separadas com cada um desses substratos contendo 40 μ L de tampão acetato de sódio (0,5M, pH 5,5), 60 μ L de amostra enzimática e 100 μ L do respectivo substrato na concentração de 0,5% (p/v). As amostras foram incubadas a 40°C por 6 e 12 horas. Em seguida, foram retirados 100 μ L de cada amostra de um dos tempos de incubação para analisar a especificidade pelo substrato através da dosagem de açúcares redutores como descrito no subitem 25.2.

Para a TLC as amostras com 12 horas de incubação foram analisadas. De cada reação foram retirados 10 μ L de amostra, misturados com 10 μ L de etanol, e cuidadosamente aplicados 10 μ L em placas de sílica gel (Sigma). Para esta cromatografia utilizou-se um solvente como fase móvel uma mistura contendo *n*-butanol-metanol-água na proporção de 4:2:1 (Chung *et al.*, 1995), colocada na cuba receptora por 1 hora antes de aplicar as amostras. Foram utilizados os seguintes padrões: glicose, maltose, maltotriose e maltotetrose na concentração de 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5. Assim que as amostras e padrões foram aplicados, a placa de sílica foi colocada em posição horizontal numa cuba receptora, de forma que o solvente ocupasse apenas 1 cm de altura, sem cobrir o local onde as amostras foram aplicadas. Para a revelação e identificação dos produtos de hidrólise da α -amilase sobre os substratos, a placa foi borrifada com uma solução contendo 7,5 mL de ácido fosfórico (85%); 1,0 mL de anilina comercial; 1,0 g de difenilamina e quantidade suficiente para 50 mL de acetona. Em seguida, a placa foi incubada a 100°C por aproximadamente 2 horas.

31. Análise do perfil de degradação do amido

Clones transformantes de *S. cerevisiae* foram pré-inoculados em 20 mL de meio mínimo SD com glicose 2% e incubado a 30°C em *shaker* sob agitação constante de 200 rpm durante 48 h. Quando a glicose do meio foi consumida, foi feita a leitura do crescimento celular através da OD₆₀₀ e adicionada uma quantidade de células suficiente para uma OD final de 0,3 a 100 mL de meio mínimo SDA em erlenmeyers de 500 mL. Essa cultura foi incubada a 30 °C em *shaker* sob agitação constante a 200 rpm por 120h. Em intervalos de 12 horas, 2 mL de cada cultura foram retirados para análise do perfil de degradação do amido através das seguintes dosagens; açúcares redutores pelo método do DNS, Glicose pelo método “GLUCOX 500”(Doles), degradação do amido pelo método de Fuwa (1954) e crescimento celular pela leitura através da OD₆₀₀.

32. Fermentação em pequena escala

O procedimento de fermentação foi realizado em um recipiente conhecido como “fermentômetro” (Figura 10), que possibilitou acompanhar o processo fermentativo por meio da perda de peso, decorrente da liberação de CO₂ através de um pequeno volume (~ 7 mL) de água (selo d’água) de modo que as perdas por evaporação ou por arraste do gás que se desprendesse fossem minimizadas. Inicialmente foi feito um pré-inóculo de um clone recombinante de *S. cerevisiae* em meio mínimo SD (contendo 2% de glicose) e incubado a 30 °C em *shaker* sob agitação constante a 200 rpm durante 48 h. Quando a glicose do pré-inóculo foi consumida, foi feita a leitura do crescimento celular através da OD₆₀₀ e adicionada uma quantidade de células suficiente para uma OD final de 0,3 no meio para iniciar a fermentação (meio mínimo SD contendo amido como única fonte de carbono). O “fermentômetro” foi incubado a 30 °C em *shaker* sob agitação constante de aproximadamente 70 rpm durante 120 h. Em intervalos de 12 horas, o fermentômetro foi retirado do agitador e pesado em uma balança Digimed KN1000 e o peso referente a cada intervalo de 12 horas foi registrado.

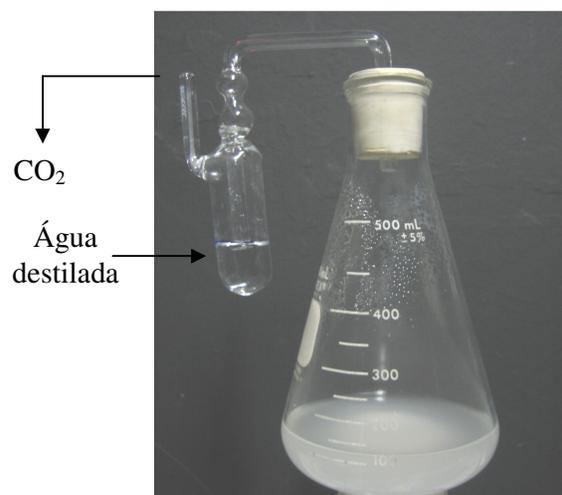


Figura 10. Foto do “fermentômetro” usado no experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Produção da amilase nativa de *C. flavus*

A levedura *C. flavus* é capaz de crescer em meio contendo amido como única fonte de carbono. Ensaios de detecção de atividade amilolítica no sobrenadante da cultura deste microrganismo mostraram que este é capaz de secretar uma amilase com alta atividade específica. Até o presente, esta é a única amilase encontrada em *C. flavus* já que não foi observada atividade amilolítica associada ao meio intracelular nem à parede celular (dados não mostrados). A primeira etapa deste projeto envolve a purificação da amilase secretada por *C. flavus*, doravante chamada Amy1, e que foi utilizada para se clonar o gene que a codifica (*AMY1*)

1.1 Otimização das condições de cultura

Inicialmente, com o objetivo de purificar a Amy1 foi feita uma otimização das condições de cultura para essa levedura.

A produção amilolítica em microrganismos pode variar bastante de acordo com as fontes de carbono e nitrogênio em que estes são crescidos. Estudando parâmetros nutricionais e de cultura, vários autores têm descrito a produção amilolítica em leveduras utilizando diferentes fontes de carbono como: farelo de trigo e farelo de milho. No entanto, a indução de amilases de microrganismos selvagens é melhor quando se utiliza amido ou seus produtos de hidrólise como única fonte de carbono (Gupta *et al.*, 2003). Vários trabalhos disponíveis sobre a indução de amilases em diferentes linhagens de *Aspergillus oryzae* sugerem que maltose pode ser a molécula indutora (Errat *et al.*, 1984). Outras moléculas como lactose, trealose e α -metil-D-glicosídeo também agem como indutores (Yabuki *et al.*, 1977). Errat *et al.* (1984) relataram um aumento de vinte vezes na atividade enzimática de uma amilase de *A. oryzae* (NCR 401013), quando maltose e amido foram usados como indutores no cultivo desse microrganismo. No entanto, o amido atua como melhor fonte de carbono (Yabuki *et al.*, 1977). De fato, Lachmund *et al.* (1993) relataram uma forte indução da amilase de *A. oryzae* DSM 63303 quando o amido foi usado com única fonte de carbono. Tendo em vista que os trabalhos na literatura relatam que o amido é

a melhor fonte indutora de amilases, optou-se por utilizar este substrato neste trabalho.

1.1.1 Determinação da melhor fonte de nitrogênio

Foram testadas seis fontes de nitrogênio de acordo com trabalho de Parachin (2006): *Yeast Nitrogen Base* (YNB), sulfato de amônio, extrato de levedura, uréia, extrato de levedura + sulfato de amônio e extrato de levedura + uréia (Figura 11). A melhor produção amilolítica (~ 15U/mL) foi observada quando YNB foi a única fonte de nitrogênio, atingindo um pico máximo no tempo de 24 horas de indução (Figura 11). Esse resultado está de acordo com os obtidos por Wanderley *et al.* (2004), que relataram que o melhor tempo de produção da amilase de *C. flavus* ocorre no tempo de 24 horas, quando provavelmente todo o amido do meio foi consumido pela levedura.

YNB contém 10% de sulfato de amônio, um sal que tem sido bastante empregado como fonte principal de nitrogênio para o crescimento de leveduras e fungos. Fernández-Espinar *et al.* (1994) observaram que a produção de uma α -arabinofuranosidase de *A. nidulans* foi otimizada quando se utilizaram sulfato de amônio e cloreto de amônio ao invés de fontes orgânicas de nitrogênio. Pandersen & Nielsen (2000), analisando a influência de fontes de nitrogênio sobre a produção da α -amilase de *A. oryzae*, verificaram que o sulfato de amônio foi melhor do que o nitrato de amônio. Além disso, observaram que a produção desta enzima era maior quando se usava uma mistura de amônia com outras fontes de nitrogênio complexas, como extrato de levedura ou caseína hidrolisada. Neste trabalho, entretanto, a combinação de extrato de levedura com sulfato de amônio resultou em uma das menores produções amilolíticas pela levedura *C. flavus* (Figura 11). Além disso, quando se utilizou sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio, a produção amilolítica não foi a maior. Lemos *et al.* (2001) também observaram uma baixa produção xilanolítica em *A. awamori* quando este microrganismo era crescido em meio contendo somente sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

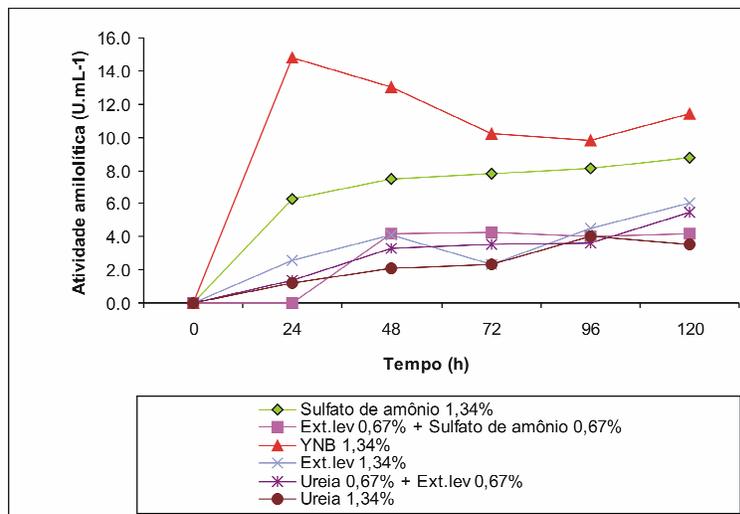


Figura 11. Influência da fonte de nitrogênio na produção da Amy1

Os autores associaram essa baixa atividade ao pH ácido (2,9) encontrado no sobrenadante de cultura. O meio de cultura contendo sulfato de amônio é acidificado uma vez que o nitrogênio é transportado para o meio intracelular na forma de amônio deixando o íon de hidrogênio no meio extracelular resultando em sua acidificação (Lemos *et al.*, 2001). Entretanto, Parachin (2006) relatou que a melhor atividade xilanolítica produzida por *C. flavus* se deu usando na presença de sulfato de amônio. Os meios contendo extrato de levedura resultaram em uma produção amilolítica extremamente baixa (Figura 11). Além disso, baixas atividades amilolíticas foram observadas quando uréia foi utilizada como única fonte de nitrogênio. Parachin (2006) também relatou que a produção xilanolítica na levedura *C. flavus* foi a menor nos meios onde o extrato de levedura foi combinado com fontes inorgânicas de nitrogênio. Esse resultado é diferente do descrito na literatura uma vez que o extrato de levedura combinando com fontes de nitrogênio atuam como um bom indutor amilolítico (Pandersen & Nielsen, 2000).

Quanto ao crescimento celular da *C. flavus* (Figura 12), foram observadas diferenças entre os meios de cultura utilizados. Assim como para a produção amilolítica, o melhor meio para o crescimento é aquele que contém YNB como única fonte de nitrogênio.

A levedura atingiu seu crescimento máximo em 24 horas de indução (máximo de atividade amilolítica) (Figura 12). Esses resultados estão de acordo com o trabalho

de Wanderley *et al.* (2004) que estabeleceram que a levedura *C. flavus* possui um crescimento celular e atividade amilolítica máximos no mesmo tempo de indução.

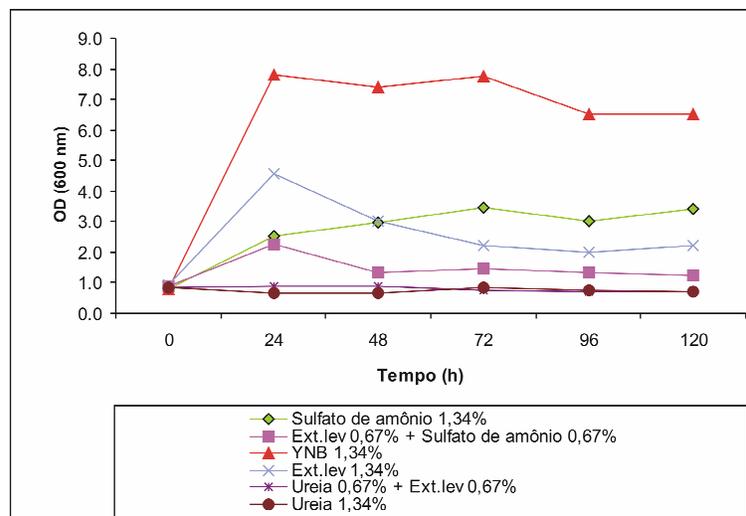


Figura 12. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento celular de *C. flavus*

No meio em que foi utilizado extrato de levedura como única fonte de carbono, a levedura atinge o máximo de crescimento em 24 horas de indução havendo, posteriormente, uma redução no crescimento celular (Figura 12). Além disso, nos meio em que foi utilizado extrato de levedura + sulfato de amônio e extrato de levedura + uréia, a levedura teve um baixo crescimento. Estes dados sugerem que a combinação de extrato de levedura com outras fontes de nitrogênio tem um efeito negativo para o crescimento da levedura. De acordo com os resultados mostrados acima, a combinação de amido com YNB (meio SSM) parece ser a melhor condição de cultivo tanto para o crescimento quanto para a produção da amilase de *C. flavus*.

1.2 Produção da Amy1

Após a determinação da melhor fonte de carbono e nitrogênio, foi feita uma cinética de crescimento e produção da Amy1. Para isto, um clone foi inoculado em meio indutor SSM. Amostras do meio de cultura foram coletadas em triplicata e, a cada 3 horas, o crescimento celular (OD 600nm) e atividade amilolítica foram determinados (Figura 13). A levedura alcançou a atividade amilolítica máxima (~ 7.0

U/mL) em aproximadamente 24 horas de cultivo, havendo um decaimento após esse período, o que coincide com a entrada da levedura na fase estacionária. Wanderley *et al.* (2004) e Pereira (2002) relataram que o tempo de 24 horas de indução da Amy1 é o tempo ótimo para o crescimento e produção amilolítica. Os resultados desse trabalho estão de acordo com os resultados relatados na literatura em se tratando da amilase nativa de *C. flavus*.

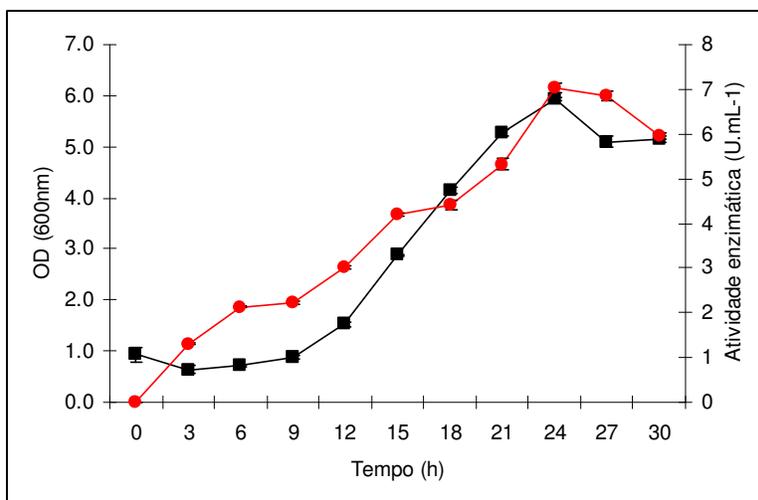


Figura 13. Cinética de crescimento e produção de amilase por *C. flavus*.
Curva de crescimento (■) e atividade enzimática (●)

2. Purificação da Amy1

Para a purificação da α -amilase secretada no meio de cultura, o primeiro passo foi aplicar o sobrenadante obtido na etapa anterior em uma coluna de troca iônica (Q-Sepharose). Foram observados dois picos de proteínas e somente um único pico de atividade amilolítica eluído entre as frações 26 e 36 após aplicação do gradiente de 0,5 M de NaCl (Figura 14A). Parte dessa eluição foi dialisada e concentrada por liofilização para posterior análise em SDS-PAGE.

As frações contendo atividade amilolítica, foram concentradas por liofilização e aplicadas em uma coluna de gel filtração (Sephacryl S-100). Dois picos de proteínas entre as frações 30 e 60 foram observados. Novamente, apenas um único pico de atividade amilolítica foi detectado (Figura 14B). As principais frações deste pico foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas para análise do perfil eletroforético em SDS-PAGE.

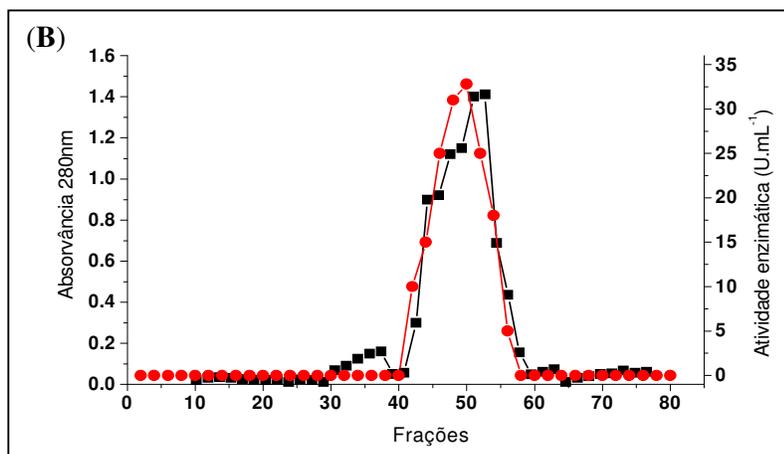
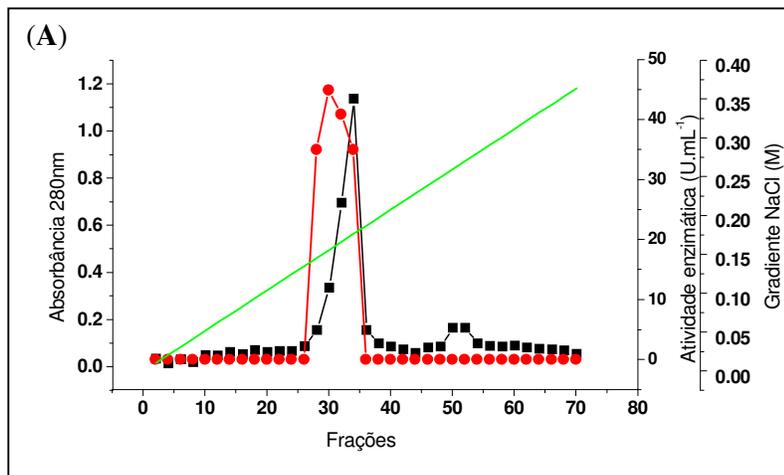


Figura 14. Purificação de Amy1. Perfil de eluição em colunas de troca iônica (Q-sepharose) (A) (fluxo 60 mL/h) e filtração em gel (Sephacryl S-100) (fluxo 20 mL/h) (B). Atividade enzimática (●); Proteína 280 nm (■) e gradiente de NaCl 0,5M (—).

Na Tabela 3 estão mostradas as etapas de purificação da Amy1, apresentando um rendimento de aproximadamente 30%.

Tabela 3. Etapas de purificação da Amy1.

Etapas	Vol (mL)	Atividade (U/mL)	Atividade total (U)	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
SOB	50	15,33	766,50	0,073	3,65	210,0	1	100
Q-SEP	12	44,90	538,80	0,051	0,61	883,2	4,2	70,3
S-100	7	32,80	229,60	0,035	0,24	956,6	4,5	29,9

As siglas SOB, Q-SEP e S-100 significam sobrenadante, Q-Sepharose e Sephacryl-100, respectivamente. vol = volume

Várias metodologias de purificação de amilase de microrganismos estão descritas na literatura. Uguru *et al.* (1997) descreveram uma amilase termoestável de *Bacillus subtilis* que foi purificada com fator de purificação igual a 24 obtendo uma atividade específica final de 2200 U/mg/L de cultura. Uma α -amilase termoestável produzida por *B. liqueniformis* foi purificada usando duas etapas de purificação, a primeira etapa através de um sistema contendo polietilenoglicol/dextrana por gel filtração e a segunda etapa por uma cromatografia de troca iônica.

Ilori *et al.* (1997) purificou uma amilase extracelular de *Micrococcus luteus* e *Lactobacillus brevis*. O fator de purificação foi de 28 e 70 vezes usando gel filtração e troca-iônica, respectivamente. Uma amilase termoestável de *Thermococcus profundus* foi purificada até a homogeneidade usando precipitação com sulfato de amônia, cromatografia por DEAE-Toyopearl e filtração em gel por Superdex 200 HR (Chung *et al.*, 1995). Existem poucos relatos na literatura sobre a purificação de amilases de leveduras. Moraes *et al.* (1999) purificaram uma enzima de fusão (amilase/glicoamilase) expressa em *S. cerevisiae* em duas etapas usando uma coluna de afinidade contendo β -ciclodextrina acoplada com Sepharose 6B-Epoxi ativada e, em seguida, uma cromatografia de gel filtração Sephadex G-100 obtendo um rendimento final de 2%. A amilase AMY-CS2 de *Cryptococcus* sp S-2 foi purificada usando uma única etapa, através de uma coluna de α -ciclodextrina acoplada com Sepharose 6B (Iefuji *et al.*, 1996). Prieto *et al.* (1995) purificaram uma nova α -amilase da levedura *Lipomyces kononenkoae* até a homogeneidade usando as

seguintes etapas; tratamento com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade usando amido e uma cromatografia por DEAE-Biogel. A amilase de *C. flavus* foi purificada pela primeira vez por Wanderley *et al.* (2004) em uma única etapa de purificação usando uma coluna de filtração em gel, a Sephacryl S-100 e, com essa técnica, esse autor obteve um rendimento de 50,2%. Pereira (2002), usando uma cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose) seguida por uma cromatografia em filtração em gel (Sephacryl S-100) para purificar esta mesma amilase, afirmou que o rendimento final obtido foi de 81%. Devido a esse alto rendimento encontrado por este autor decidimos purificar a amilase de *C. flavus* por meio dessa metodologia. No entanto, o rendimento encontrado neste trabalho (~30%) é bem expressivo se comparado com os relatados na literatura, mas bem diferente do rendimento encontrado por Wanderley *et al.* (2004) (50,2%) e Pereira (2002) (81%) para purificar a mesma enzima.

2.1 Análise eletroforética da Amy1 purificada e detecção da atividade amilolítica em gel - Zimograma

A concentração das amostras por liofilização para esta enzima é um método bastante empregado. Essa metodologia foi escolhida uma vez que não se obteve êxito usando técnicas de precipitação por TCA ou sulfato de amônio. O uso de TCA ou sulfato de amônia, muitas vezes, acabam por precipitar amido que está solúvel no sobrenadante mesmo após várias centrifugações.

Assim, as amostras provenientes de cada etapa de purificação da Amy1 foram dialisadas contra água e concentradas por liofilização. Foram adicionados em cada poço ~ 30 µg de proteínas. Em presença do meio SSM, *C. flavus* secreta pouca quantidade de proteínas. Com isso, a dosagem de proteína ficou bastante limitada. Algumas vezes durante a execução deste trabalho o sobrenadante de *C. flavus* foi concentrado por liofilização para dar prosseguimento à dosagem de proteínas. A análise por SDS-PAGE das etapas de purificação da Amy1 mostrou uma única banda protéica de ~ 67 kDa (Figura 15A) e esta coincide com a banda de atividade amilolítica do sobrenadante da cultura (Figura 15B).

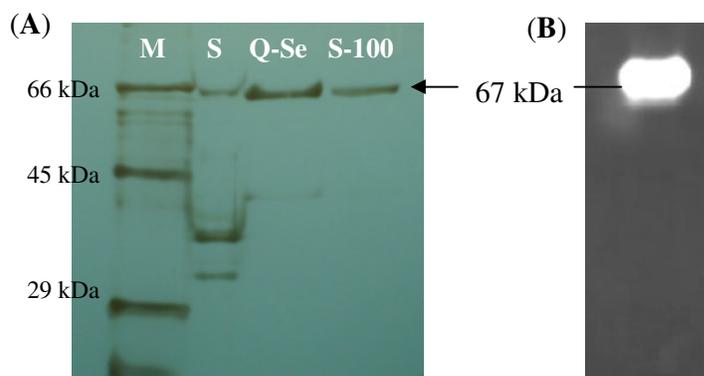


Figura 15. Perfil eletroforético das etapas de purificação de Amy1. M- marcador de massa molecular SDS-6H2 (Sigma) (A) SDS-PAGE 12% após coloração com prata do sobrenadante da cultura (S); eluído da Q-sepharose (Q-Se) e eluído da Sephacryl S-100 (S-100). (B) Zimograma do sobrenadante da cultura.

3. Seqüenciamento parcial da Amy1

A análise do seqüenciamento N-terminal e de um fragmento tríptico de Amy1 revelou 100% de identidade com as seqüências encontradas nas posições 21-38 (LSPA EWRSQSIYQVV TDR) e 420-433 (IQVPYTDSNHIVTR) de AMY-CS2, a α -amilase secretada por *Cryptococcus* sp S-2 (Iefuji *et al.*, 1996). Esta evidência sugere que Amy1 e AMY-CS2 devem ser altamente similares e que as seqüências codificadoras já publicadas da segunda podem ser usadas para se clonar *AMY1*.

4. Clonagem e análise do gene *AMY1*

α -Amilases têm aplicações nas indústrias de processamento do amido, produção de álcool, têxtil e outras. Na busca por fontes de amilases na biodiversidade do cerrado, a levedura amilolítica *Cryptococcus flavus* foi isolada embora esta levedura seja capaz de metabolizar amido, ela não pode ser usada na indústria por não possuir *status GRAS*. Com o objetivo de estudar a atividade amilolítica detectada no sobrenadante de culturas de *C. flavus*, o gene correspondente a esta amilase (*AMY1*) foi isolado e clonado.

As seqüências dos genes de amilases originados de leveduras são pouco descritas na literatura. No que se refere ao gênero *Cryptococcus*, foram encontradas apenas duas seqüências gênicas descritas, a de *Cryptococcus* sp S-2 (amy-CS2), com seqüência completa no Genebank (D83540, D83541, Iefuji *et al.*, 1996), e a de

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* JEC21, com seqüência parcial depositada no GeneBank (XM_572174, Loftus *et al.*, 2005). Tendo como base a única seqüência de amilase completa descrita na literatura, a do gene *amy-CS2*, foram desenhados os *primers* CF3 e CF5 que se anelam em porções internas deste gene. Quando utilizado DNA genômico de *C. flavus* como *template* foi obtido um produto de amplificação de ~0.9 kb que foi clonado e seqüenciado mostrando uma alta identidade (92%) com o gene *amy-CS2*. Por causa da alta identidade entre as duas seqüências nucleotídicas, foram desenhados os *primers* CFAMY5 e CFAMY3 que amplificam toda a região codante do gene. Esse par de *primers* possui em suas extremidades sítios para a enzima de restrição *Bgl*III para facilitar a clonagem do gene em vetor de expressão de levedura (ver Material e Métodos). A Figura 16 mostra as posições relativas de anelamento dos *primers* no gene *amy-CS2* e que foram utilizados neste trabalho.

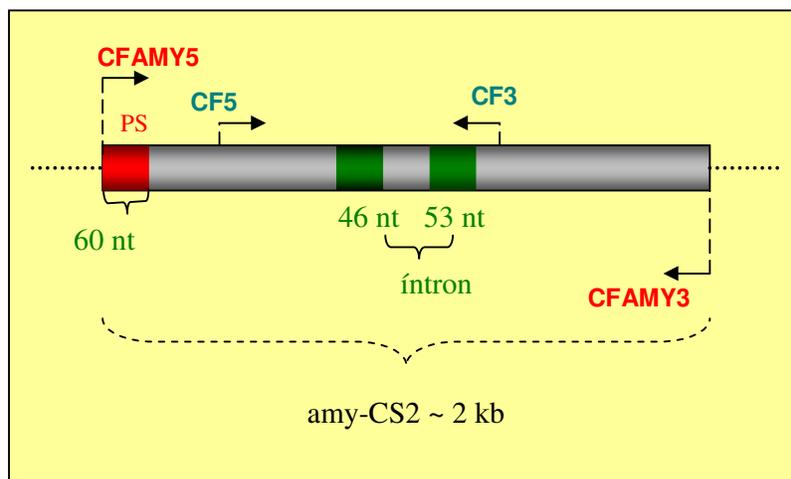


Figura 16. Esquema mostrando as posições relativas de anelamento dos *primers* no gene *amy-CS2*.

Os tamanhos dos produtos obtidos a partir da amplificação de cada combinação desses *primers* foram: CFAMY5/CFAMY3: 1990 pb (genômico) e 1890 pb (cDNA); CFAMY5/CF3: 1230 pb (genômico) e 1130 pb (cDNA); CF5/CFAMY3: 1700 pb (genômico) e 1600 pb (cDNA) CF5/CF3: 936 pb (genômico) e 836 pb (cDNA). A combinação deste *primers* foi utilizada para a amplificação do gene *AMY1*.

A versão genômica do gene *AMY1* foi obtida por PCR. Os *primers* CFAMY5 e CFAMY3 foram usados para amplificação de um produto de aproximadamente 2 kb. A Figura 17 mostra a amplificação do fragmento genômico. De acordo com Iefuji

et al. (1996), a seqüência do gene Amy-CS2 possui dois introns com cerca de 46 e 53 pb, respectivamente. Quanto à versão do cDNA do gene *AMY1*, usando os *primers* CFAMY5 e CFAMY3 foi possível amplificar um fragmento com o tamanho esperado de ~ 1.9 kb, (Figura 18). Esse resultado está de acordo com o tamanho da versão cDNA segundo seqüência descrita para o gene *amy-CS2* (Iefuji *et al.*, 1996).

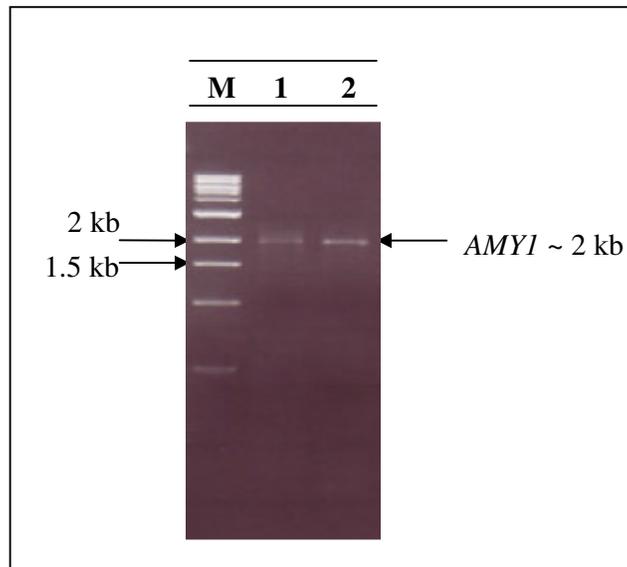


Figura 17. Reação de amplificação da versão genômica do gene *AMY1*. Análise eletroforética dos produtos da PCR em gel de agarose 1%. M: Marcador de massa molecular, 1 kb ladder (New England Biolabs), 1 e 2: amplicons obtidos com *primers* CFAMY5/CFAMY3 usando-se DNA genômico de *C. flavus* como *template*.

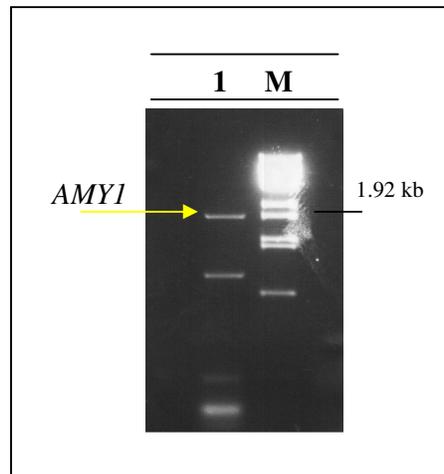


Figura 18. Reação de amplificação da versão cDNA do gene *AMY1*. Análise eletroforética dos produtos da PCR em gel de agarose 1%. 1: amplicon obtido com *primers* CFAMY5/ CFAMY3 usando-se cDNA de *C. flavus* como *template*; M: Marcador de massa molecular, fago λ digerido com *BstEII*.

Os amplicons obtidos tanto da versão genômica (~2 kb) quanto do cDNA (~1.9 kb) do gene *AMY1* foram ligados ao vetor pGEM-T e utilizados para transformação de *E. coli* DH5 α . As colônias transformantes foram analisadas quanto à presença de insertos a partir da digestão com *Bgl*III. A análise em gel de agarose 1% revelou a liberação de um único fragmento de ~2 kb para a versão genômica (Figura 19A) e ~1.9 kb (Figura 19B) para o cDNA, como esperado.

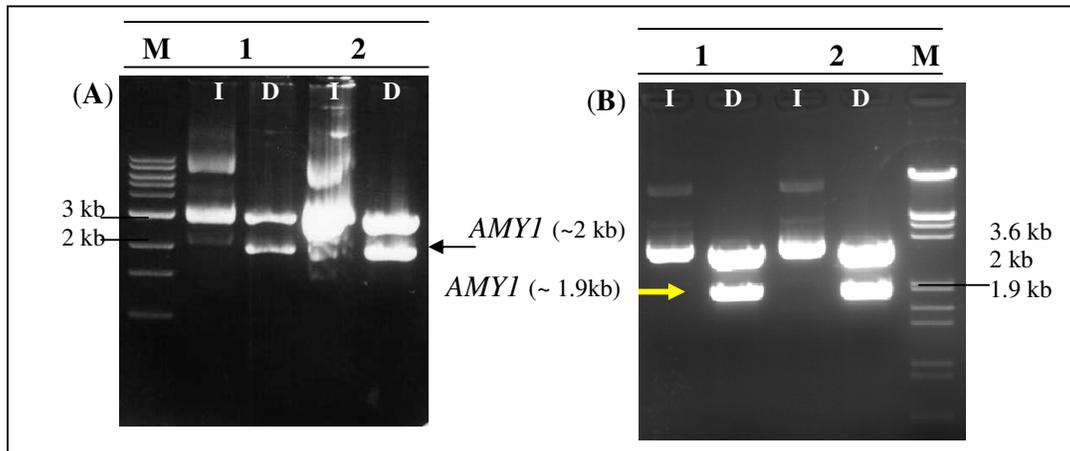


Figura 19. Clonagem das versões genômica e cDNA do gene *AMY1*. Análise de restrição por digestão com *Bgl*III dos clones genômico (A) e cDNA (B). Plasmídios intactos (I) e digeridos (D) com *Bgl* III M – Marcador de massa molecular 1 kb ladder (New England Biolabs) (A) e DNA de fago λ digerido com *Eco*R I/*Hind* III (B).

Os clones contendo a versão genômica do gene *AMY1* ou o cDNA foram confirmados por seqüenciamento utilizando-se os *primers* CF5/CF3 e M13 Universal/M13 Reverso. O seqüenciamento da versão genômica gerou um *contig* de aproximadamente 1200 pb.

Quando se submeteu este *contig* ao programa BLASTn, a seqüência de nucleotídeos mostrou maior similaridade (93%) com a seqüência de DNA da amy-CS2 obtendo um e-value = 0.0. O mesmo *contig* foi submetido ao programa BLASTx, onde a seqüência de nucleotídeos foi traduzida para uma seqüência de proteína e alinhada com seqüência protéicas depositadas no banco de dados. O resultado do alinhamento apresentou 98% de identidade de aminoácidos com a AMY-CS2, a amilase de *Cryptococcus* sp S-2, e 54% de identidade com uma amilase produzida por *Fusicocum* sp. BCC4124.

A seqüência gerada a partir do clone contendo o cDNA da amilase foi analisada da mesma forma que o clone genômico. Após submeter a seqüência ao

programa BLASTn, observou-se uma maior similaridade (92%) e um e-value = 0.0 com a seqüência cDNA que codifica para a AMY-CS2. Esses resultados são forte evidência de que o fragmento clonado corresponde a um gene codificador de amilase.

A partir do alinhamento das seqüências geradas do gene *AMY1* com o gene amy-CS2 disponível no *GenBank*, foram desenhados os *primers* CFAMYSEQ3 (para a região 3'), CFAMYSEQ5 (para a região 5'). Esses *primers* juntamente com os *primers* previamente desenhados a partir da seqüência do gene amy-CS2, CFAMY5, CFSP5, CF5, CF3 e CFAMY3 foram usados para seqüenciar o gene *AMY1* completo (ver Anexo 1). O alinhamento completo entre os genes *AMY1* e amy-CS2 revelou 92% de similaridade. Este dado mostra que o gene clonado e seqüenciado corresponde a um gene de amilase do gênero *Cryptococcus*. Uma vez que o gene *AMY1* foi totalmente seqüenciado, foi realizada a caracterização molecular deste gene.

O resultado do seqüenciamento N-terminal confirmou que Amy1 possui um peptídeo sinal de 20 resíduos de aminoácidos. Esse resultado confirmou que a amilase estudada no presente trabalho refere-se a uma amilase de um organismo do gênero *Cryptococcus*. A versão genômica do gene *AMY1* apresentou 1979 pb enquanto que a versão cDNA apresentou 1896 pb (Figura 20). A seqüência de nucleotídeos do gene *AMY1* foi depositada no GenBank sob o número de acesso EU014874 (ver Anexo 2). Analisando a versão genômica do gene *AMY1*, foram observados dois introns nas posições 867-912 e 1024-1060. Os introns no gene *AMY1* iniciam com GT(G/A)AGT e terminam com AG (Figura 20). Segundo Lodish *et al.* (2001) existem seqüências consenso entre os limites exon-íntron em mRNAs eucarióticos, sendo os nucleotídeos mais conservados o 5' GT e o 3' AG. Essas seqüências também foram encontrados nos três íntrons do gene da xilanase 1 (*CfXYN1*) de *C. flavus* (Parachin, 2006). É provável que os íntrons em *C. flavus* sejam removidos como estruturas laço no qual a região 5'AG do íntron se liga a adenosina perto da extremidade 3' do íntron formando uma ligação 2'-5'-fosfodiéster. Este mecanismo de retirada de íntrons é o mais descrito em mRNAs eucarióticos. O primeiro íntron no gene *AMY1* é igual a e do mesmo tamanho que o primeiro íntron presente no gene amy-CS2 (46 pb), enquanto que o segundo íntron (37 pb) é menor que o seu correspondente (Figura 20).

1 M A P V R S L A G A L L A S L G L V A G L S P A E W R S Q S
1 ATGGCTCCTGTCGGCTCCCTAGCTGGGGCCCTGCTCGCCTCTTAGGACTGGTCGCTGGCCTGTCTCCAGCCGAATGGCGAAGCCAGTCC
31 I Y Q V V T D R F A L D N G G N S P S C S G Q S E L N L Y C
91 ATCTACCAGGTCGTCACCGACCGCTTTGCGCTCGACAATGGCGAAACTGCCTTCTTGCTCGGGTCAAAGCGAGCTCAACCTCTACTGC
61 N G T F A G I I D K L D Y I Q N M G F T A I W I S P V V K N
181 AATGGCACCTTTGCAGGCATCATCGACAAGCTGGACTATATCCAGAACATGGGCTTACCAGCCATCTGGATCTCGCCGTGGTCAAGAAC
91 I D G G S P N G Y T P D G S A Y H G Y W A Q D I Y E I N P H
271 ATCGACGGTGGCTCACCTAATGGCTACACGCTGACGGATCCGCTTACCAGGCTACTGGGCTCAGGACATCTACGAGATCAACCCAC
Region I
121 F G G A S G L T D L S N A L H N R G M Y L M V D V V V N H M
361 TTCGGCGGAGCTCAGGCTGACCGACCTGTCGAACGCTTTGCACAACCGGGCATGTACTTGATGGTGGAGCTTTCGTCACCATATG
151 A Y Y C G T N G G C G P G N S V N Y G S F T P F N S E S Y F
451 GCGTACTACTCGCGCACAATGGCGGATGGGTCCTCCGCGCAACTCGGTCAACTACGGATCGTTACAGCCTTTCAACAGCGAGTCATACTTC
181 H P F C E I D Y N N R T S I L D C W E G D E I V P L V D L R
541 CACCCGTTCTGCGAGATCGATTACAACAACCGCAGCAGCATCTCGACTGCTGGGAGGGTGACGAGATCGTGCCGCTCTGCTGACCTCCGG
Region II ●
211 T E D S D V Q S I F N S W I S N L I Q T Y N I D G L R I D S
631 ACAGAGGACTCGGACGTGCAGTCCATCTTCAACTCGTGGATCAGCAACTTGATCCAGACGTACAACATCGACGGCCTCCGGATAGACTCG
Region III ●
241 L Q Q S G S F F F P G F N Q A A G G M Y M V G E V F N G N P
721 CTCACGACTCGGCTCCTTCTTCTCCCGGGTTCAACCAGGCGGGGGGCATGTATATGGTCGGCGAGGCTTCAACGGCAACCCG
271 S Y V C P Y Q Q A G M P G V L N Y P M
811 TCCTACGTCTGCCCTTACCAGCAGGCTGGCATGCCAGGTGCTCCCAACTACCTATgtgagtcttctgctgcccagccgatgagactaacg
900 F F Y I T N A F Q T S S G S M S Q L A Q G I S A M Q
291 ctcacgctaaagtTCTTCTACATCACCAATGCTTCCAGACCTCGTCTGGCAGCATGAGCCAGCTCGCTCAGGGAATTCGGCCATGCA
Region IV ●
316 S D C S D T T L L G S F L E N Q D N
991 ATCTGACTGCTCGGACACAACGCTCCTCGGAAGGtaagtcttctgctgggggactctagctcataagacagCTTCTGGAGAACCAGGACA
334 P R F P S Q T N D L T R A Q N A I A F T M L Q D G I P I T Y
1081 ACCCAGCTTCCCAGTCAGACGAACGACCTAACCCGCTGCTCAGAACGCGATCGCCTTACCATGCTGCAGGACGGTATCCCCATCACCT
364 Y G Q E Q H L S G S G V P L N R E A L W T S G G Y D S S S P
1171 TACGGCCAAGAGCAGCACCTGTCCGGCTCTGGCTCCCCCTAACCGAGAGGGCTGTGGACGTGGGGCGATACGACTCCTCGTCCGCC
394 L Y K M I T T V N Q L R T L A I K Q N G G F V T Y K I Q V P
1261 CTGTACAAGATGATTACGACGGTGAACCACTGAGAACGCTCGCGATCAAGCAGAAGCGGGCTTTGTGACCTACAAGATCCAGGTGCCA
424 Y T D S N H I V T R K G N S G Y Q I V G V Y T N V G S A G A
1351 TACACCGACTCGAACCTATATCGTCACGGCAAGGGCAACTCGGGCTACCAGATTGCTGGGCTTACACCAACGTCGGCTCCGCTGGCGG
454 S S T L S L S S S E T G F Q A S E P V M D V L S C T L Y H T
1441 TCTTCAACCTTATCCCTCTTCTGTCGAGACCGGGTTCCAGGCTCTGAACCGTTCATGGACGTCCTGCTCTGACGCTGTACCATACT
484 G S D G S L S F T M T G G L P R V F Y N A T A L A E S S L C
1531 GGTAGTGACGGGAGCCTGTATTCACCATGACTGGCGGCTGCCCGAGTCTTCTACAACGCCAGGGCCCTGGCCGAGAGCAGTCTCTGC
514 T T Y T T A T P P P G G C S A G T V V F D V Y V Q T Q Y G Q
1621 ACAACCTACACGACGGGACCCCGCGCTGGCGGCTGCTCCGCGGCACTGTGGTGTTCGACGCTATGTCCAGACGAGTACGGCCAG
544 S V V I A G N I P Q L G N W S P A N G L N L N A N Q Y T A S
1711 AGCGTCGTCATCGCGGTAACATCCCCAGCTCGGCAACTGGAGCCCGGCAACGGCTTGAACCTCAACGCAACCCAGTACACGGCATCG
574 S P K W T G T I T G V A P G T T F Q W K P I V V T N G N D N
1801 AGCCCCAAGTGGACCGGGACCATCACCGGCTGCGACCCGGTACCAGTTCAGTGAAGCCATCGTCTTACCAATGGTAAATGACACA
604 W Y T G S N Q Q A T T G S A C S S P A T D I E F T W S S *
1891 GGTACACTGGCAGCAACCAGCAGCGGTTTCGGCCTGTAGCTCGCCCGCAGCCGATATCGAGTTTACGTGGTCTCTCTtag

Figura 20 Sequência de nucleotídeos do gene *AMY1* e a sequência protéica predita. Introns e região codante estão representados por letras minúsculas e maiúsculas, respectivamente. Os fragmentos trípticos sequenciados estão em retângulos cinza. O peptídeo sinal está sublinhado. As regiões conservadas (I, II, III e IV) estão mostradas dentro de retângulos vazios. Os círculos pretos indicam os principais resíduos catalíticos. Os possíveis sítios de N-glicosilação estão mostrados em vermelho. O asterisco indica o códon de terminação.

Os introns no gene *AMY1* são menores em relação aos íntrons de amilases descritos na literatura para *Lipomyces kononenkoae* (média de 61 pb) (Steyn *et al.*, 1996), *Schizosaccharomyces pombe* (média de 63 pb) (Kuhn & Käufer, 2003), e *Aspergillus oryzae* (média de 68) (Wirsel *et al.*, 1989) e muito menores em relação aos íntrons de vertebrados (600 pb) e de *Saccharomyces cerevisiae* (250-550 pb) (Woolford, 1989).

Em relação ao cDNA, quando a seqüência de nucleotídeos foi submetida ao programa BLASTn, encontrou-se a maior similaridade com os genes de amilases de *Cryptococcus* sp S-2 (92%) e *Aspergillus niger* (89%). Usando o programa BLASTp, foi feita a tradução da proteína predita, Amy1. A enzima possui 631 resíduos de aminoácidos (Figura 21) e exibe identidade com as amilases de *Cryptococcus* sp S-2 (97%), *Aspergillus terreus* (46%), *A. fumigatus* (45%), *A. clavatus* (44%) e *A. kawachii* (44%).

A seqüência predita da Amy1 apresenta 13 diferenças com relação a AMY-CS2, ¹³⁶Asn→Ser, ¹⁵⁷Asn→Asp, ²⁶⁹Asn→Ser, ³⁴¹Asn→Ser, ³⁹⁰Ser→Thr, ³⁹⁶Lys→Glu, ⁴⁵³Ala→Ser, ⁴⁵⁹Leu→Ile, ⁴⁸⁵Ser→Thr, ⁵²⁰Thr→Ser, ⁶⁰⁶Thr→Pro, ⁶⁰⁸Ser→Asn e ⁶²³Thr→Ala. Estas diferenças, contudo, em sua grande maioria, são relacionadas a aminoácidos com identidades químicas semelhantes (Figura 21). Isto é evidência de que Amy1 e AMY-CS2 provavelmente são a mesma enzima.

É interessante o fato de que a Amy1 teve altos valores de identidade com amilases do gênero *Aspergillus* mesmo não sendo *C. flavus* um fungo filamentoso. Embora o grau de identidade entre as seqüências de amilases entre reinos seja de apenas 10%, a comparação de seqüência de amilases dentro do mesmo reino mostra um grau de identidade bem maior (Da Lage *et al.*, 2004). Esses autores afirmaram que as amilases são um excelente modelo sujeito à transferência horizontal de genes. Talvez isso possa explicar o grau de identidade encontrado entre Amy1 com as amilases de espécies do gênero *Aspergillus*.

Amy1	1	MAPVRSLAGALLASLGLVAGLSPAEWRSQSIYQVVTDRFALDNGGNSPSCSGQSELNLYC	60
AMY-CS2	1	MAPVRSLAGALLASLGLVAGLSPAEWRSQSIYQVVTDRFALDNGGNSPSCSGQSELNLYC	60
Amy1	61	NGTFAGIIDKLDYIQNMGFATAIWISPVVKNIDGGSPNGYTPDGSAYHGYWAQDIYEINPH	120
AMY-CS2	61	NGTFAGIIDKLDYIQNMGFATAIWISPVVKNIDGGSPNGYTPDGSAYHGYWAQDIYEINPH	120
Amy1	121	FGGASGLTDLNLSALHNRGMYLMVDVVVNHMAYYCGTNGGCGPGNSVNYGSFTPFNSESYF	180
AMY-CS2	121	FGGASGLTDLNLSALHNRGMYLMVDVVVNHMAYYCGTNGGCGPGNSVNYGSFTPFNSESYF	180
Amy1	181	HPFCEIDYNNRRTSILDCWEGDEIVPLVDRTESDVQSFNSWISNLIQTYNIDGLRIDS	240
AMY-CS2	181	HPFCEIDYNNRRTSILDCWEGDEIVPLVDRTESDVQSFNSWISNLIQTYNIDGLRIDS	240
Amy1	241	LQQSGSFFFPGFNQAAGGMYMVGEVFNGPSYVCPYQQAGMPGVLNYPMFFYITNAFQTS	300
AMY-CS2	241	LQQSGSFFFPGFNQAAGGMYMVGEVFNGPSYVCPYQQAGMPGVLNYPMFFYITNAFQTS	300
Amy1	301	SGSMSQLAQGISAMQSDCSDTLLGSLFNQDNPRFPSQTNLDLTRAQNAIAFTMLQDGIPI	360
AMY-CS2	301	SGSMSQLAQGISAMQSDCSDTLLGSLFNQDNPRFPSQTSIDLTRAQNAIAFTMLQDGIPI	360
Amy1	361	ITYYGQEQHLSGSGVPLNREALWTSGGYDSSSPLYKMITTVNQLRTLAIKQNGGFVTYKI	420
AMY-CS2	361	ITYYGQEQHLSGSGVPLNREALWTSGGYDSSSPLYEMITTVNQLRTLAIKQNGGFVTYKI	420
Amy1	421	QVPYTDNSNHIVTRKNSGYQIVGVYTNVGSAGASSTLSLSSSETGFQASEPVMVLSCTL	480
AMY-CS2	421	QVPYTDNSNHIVTRKNSGYQIVGVYTNVGSAGASSTLSLSSSETGFQASEPVMVLSCTL	480
Amy1	481	YHTGSDGSLSFMTGGLPRVFNATALAESSLCTTYTTATPPPGGCSAGTVVFDVYVQTQ	540
AMY-CS2	481	YHTGSDGSLSFMTGGLPRVFNATALAESSLCTTYTTATPPPGGCSAGTVVFDVYVQTQ	540
Amy1	541	YGQSVVIAGNIPQLGNWSPANGLNLNANQYTASSPKWTGTITGVAPGTTFQWKPIVVTNG	600
AMY-CS2	541	YGQSVVIAGNIPQLGNWSPANGLNLNANQYTASSPKWTGTITGVAPGTTFQWKPIVVTNG	600
Amy1	601	NDNWTGSGNQQATTGSACSSPATDIEFTWSS	631
AMY-CS2	601	NDNWTGSGNQQATTGSACSSPATDIEFTWSS	631

Figura 21. Alinhamento das seqüências primárias das amilases Amy1 e AMY-CS2. Os resíduos de aminoácidos diferentes estão destacados por uma caixa cinza.

A comparação entre a seqüência de Amy1 com seqüência de amilases de vários organismos permitiu a classificação dessa enzima como pertencente à família 13 das α -amilases ou família 13 das glicosil-hidrolases (GH13) por possuir quatro regiões conservadas (I, II, III e IV) e os resíduos catalíticos altamente conservados Asp-239, Glu-264 e Asp-332 presentes nas regiões II, III e IV, respectivamente. Estas características são assinaturas das enzimas desta família (MacGregor *et al.* 2001). As regiões I, II, III e IV estão presentes nas seguintes posições: 144-149, 235-243, 263-267 e 327-332 (Figura 22).

Organismo	Região I		Região II		Região III		Região IV	
Bacteria								
Bacli	129	DVVINH	256	GFRLDAVKH	289	AEYWQ	352	FVDNHD
Bacsu	138	DAVINH	213	GFRFDAAKH	248	GEILQ	305	WVESH
Ecoli	101	DVVVNH	231	GFRIDAVKH	264	AEYWS	327	LVANHD
Archaea								
Pyrfu	132	DVVINH	219	GWRFDYVKG	246	GEYWD	309	FVANHD
Pyrsp	133	DIVINH	220	AWRFDYVKG	247	GEYWD	310	FVANHD
Thchy	129	DIVINH	216	AWRFDYVKG	244	GEYWD	306	FVANHD
Eucaria								
Aspor	138	DVVANH	223	GLRIDTVKH	250	GEVLD	313	FVENHD
Crysp	144	DVVVNH	235	GLRIDSLQQ	263	GEVFN	327	FLENQD
Cryfl	144	DVVVNH	235	GLRIDSLQQ	263	GEVFN	327	FLENQD
BarHIG	101	DIVINH	200	GWRFDFAKG	226	AEIWT	308	FVDNHD
<i>Consenso</i>		DvViNH		gFRfD vK		*gEyw		fvdnhD*

Figura 22. Alinhamento múltiplo das regiões conservadas (I, II, III e IV) das α -amilases de vários organismos. Bacli (*B. liqueniformis* ATCC 27811, número de acesso P06278), Bacsu (*B. subtilis*, número de acesso P00691), Ecoli (*E. coli* JA11, número de acesso P26612), Pyrfu (*P. furiosus* DSM 3638, número de acesso U96622), Pyrsp (*Pyrococcus*. sp KOD1, número de acesso D83793), Thchy (*T. hydrothermalis* AL662 número de acesso AF068255), Aspor (*A. oryzae*, número de acesso P10529), Crysp (*Cryptococcus* sp, número de acesso D83540), Cryfl (este trabalho, *C. flavus*, número de acesso EU014874) e BarHIG (*H. vulgare*, número de acesso P04063). Os três resíduos catalíticos Asp, Glu e Asp nas regiões II, III e IV estão representados por asteriscos.

Os cinco resíduos conservados nas seqüências de amilases descrita na literatura His-149, Asp-239, Glu-264, Gln-331 e Asp-332 foram encontrados na seqüência predita de Amy1 (Figura 22) e correspondem aos resíduos His-122, Asp-206, Glu-230, His-296 e Asp-297 na seqüência da amilase de *Aspergillus oryzae* (Taka-amilase) (Janeček, 1997). Os resíduos Asp-206, Glu-230 e Asp-297 têm funções relacionadas à catálise enquanto que os resíduos His-122, His-210 e His-296 estão envolvidos tanto no reconhecimento do substrato no sítio ativo da amilase pancreática de mamíferos (Ishikawa *et al.*, 1992, 1993) quanto na estabilização do estado de transição, mas não diretamente na catálise da amilase de cevada (Søgaard *et al.*, 1993b). Foi observado que as regiões II e IV da Amy1 contêm o resíduo não-carregado de Gln (Gln-242 e Gln-331) no lugar dos resíduos de His altamente

conservados (His-210 e His-296) encontrados na estrutura da Taka-amilase. Uma substituição similar foi observada na região II para a amilase de *Lipomyces kononenkoae* (Kang *et al.*, 2004). Janeček *et al.* (1999) observaram que a substituição da glicina pela histidina no final da região II é uma característica geral de amilases de *Archaea* e plantas. Lee *et al.* (1996) observaram que estes resíduos podem estar envolvidos em mecanismos catalíticos na amilase de *Thermococcus profundus*.

O resíduo de histidina da amilase de *Bacillus stearothermophilus*, que é equivalente ao resíduo His-120 na Taka-amilase, pode controlar a especificidade e a estabilidade da enzima (Vihinen *et al.*, 1990). A mesma função foi relatada para o mesmo resíduo em *Bacillus subtilis*. Em glicosiltransferases (CGTases), os resíduos de histidina provavelmente são responsáveis pelas atividades amilolíticas e de ciclicidade. Contudo, a atividade bem como a especificidade dessas enzimas pode ser modificada por mutação de aminoácidos não-essenciais adjacentes ou próximos aos resíduos catalíticos (Takase, 1992; Inohara-Ochiai *et al.*, 1997).

5. Expressão heteróloga de *AMY1* em *S. cerevisiae*

5.1 Clonagem do gene *AMY1* no vetor YEp351-PGK

A levedura *S. cerevisiae*, amplamente utilizada na indústria de etanol, não é capaz de degradar amido para produzir açúcares fermentescíveis, sendo necessária a clonagem e expressão heteróloga de enzimas amilolíticas nesse microrganismo. Neste sentido o gene *AMY1* foi clonado no vetor YEp351-PGK e expresso em *S. cerevisiae* CENPK2.

Uma vez confirmada que a versão cDNA correspondia a um gene de amilase, foi realizada a subclonagem do mesmo no vetor YEp351-PGK para expressão em *S. cerevisiae*. Isto foi feito pela ligação do fragmento de ~1.9 kb do cDNA no vetor YEp351-PGK, ambos previamente digeridos com *Bgl*III. O vetor YEp351-PGK possui na sua seqüência um único sítio para a enzima *Bgl*III que se localiza logo após a seqüência do promotor *PGK* (pPGK). Em seguida, células de *E. coli* DH5 α foram transformadas com o sistema de ligação. Após extração plasmidial de 10 clones, a confirmação da subclonagem e determinação da orientação correta do gene foi feita em um única etapa usando a enzima *Bam*HI. Essa enzima foi escolhida porque, além de possuir um único sítio no vetor YEp351-PGK na posição 37, também tem sítio

único no gene *AMY1* na posição 307 (ver Anexo 1) a partir da extremidade 5'. Dessa forma, dependendo da orientação do gene, após digestão com *Bam*HI, poderia ocorrer a liberação de um único fragmento com tamanho de 1.8 kb (orientação correta) ou de aproximadamente 3.0 kb (orientação errada) (Figura 23).

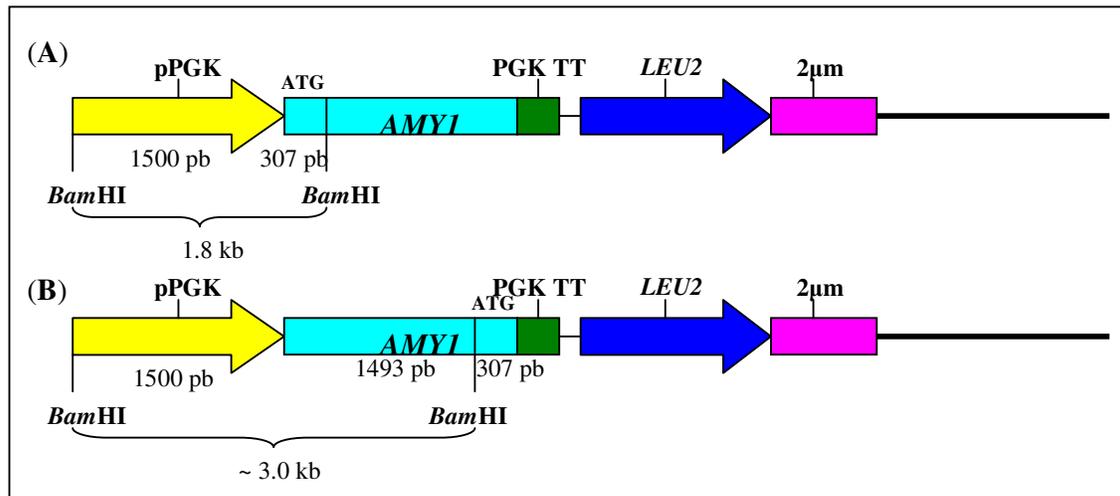


Figura 23. Representação esquemática de perfis de restrição do vetor YEp351-PGK contendo o cDNA do gene *AMY1*. (A) Posicionamento do gene *AMY1* na orientação correta para a expressão ou (B) na orientação contrária.

Dos 4 clones escolhidos para análise com *Bam*HI, apenas dois clones (clones 2 e 3) continham o gene *AMY1* e este estava na orientação correta para a expressão. Isto foi comprovado pela liberação de um único fragmento de aproximadamente 1.8 kb (Figura 24). Os demais clones possivelmente recombinaram não havendo, desta forma, nenhum clone na orientação contrária à expressão.

Dessa forma, dentre os plasmídios que estavam com o gene na orientação correta, o clone 2, chamado doravante de YEpAMY1, foi utilizado para novas análises de restrição a fim de confirmação a clonagem do gene *AMY1*. Foi feita a digestão com a enzima *Bgl*II para confirmar a presença do inserto, e com *Sac*I para confirmar a orientação do mesmo. Essa enzima foi escolhida porque, além de possuir um único sítio no vetor YEp351-PGK na posição 26, também cliva uma única vez no gene *AMY1* na posição 167 (ver Anexo 1). Dependendo da orientação do gene, após digestão com *Sac*I poderia haver a liberação de um único fragmento de aproximadamente 1.66 kb (orientação correta) ou de um com aproximadamente 3.2 kb (orientação errada) (Figura 25).

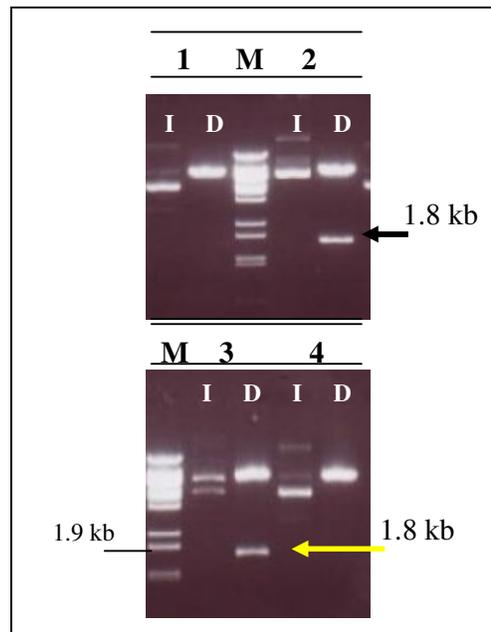


Figura 24. Confirmação da orientação do gene *AMY1* no vetor YEp351-PGK após digestão com *Bam*HI. Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% do perfil de restrição de 4 clones dos sistema de transformação YEp351-PGK + *AMY1* após digestão com *Bam*HI. M - marcador de massa molecular 1 kb ladder (Biolabs). Plasmídios YEpAMY1 intactos (I) e digeridos (D) com *Bam*HI.

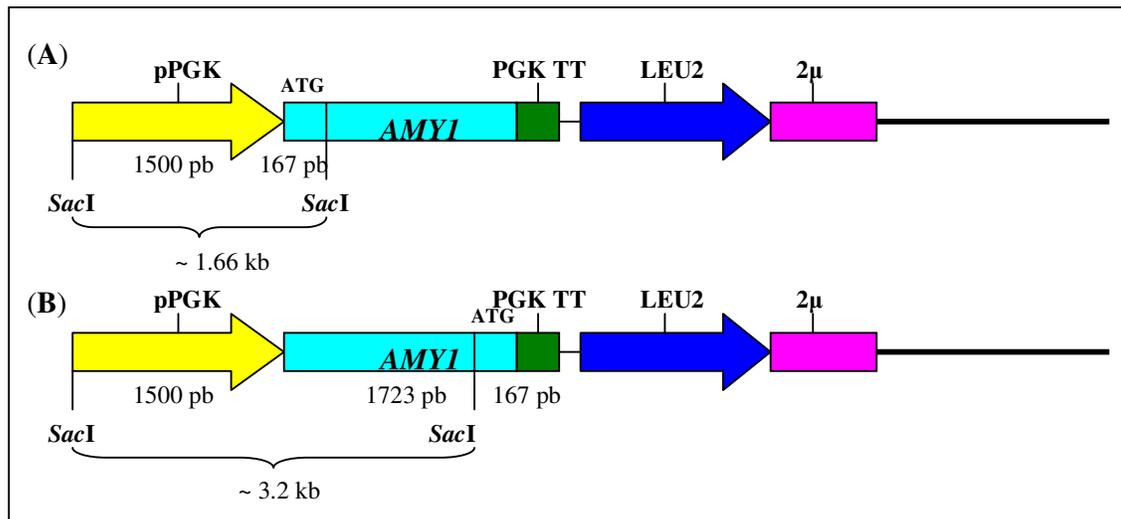


Figura 25. Representação esquemática do perfil de restrição do vetor YEpAMY1 após digestão com *Sac*I. (A) Posicionamento do gene *AMY1* na orientação correta para a expressão ou (B) na orientação contrária.

O perfil eletroforético do vetor YEpAMY1 após digestões separadas com *Bgl*III e *Sac*I, mostrou a liberação de um único fragmento de aproximadamente 1.9 kb e 1.6 kb, respectivamente (Figura 26).

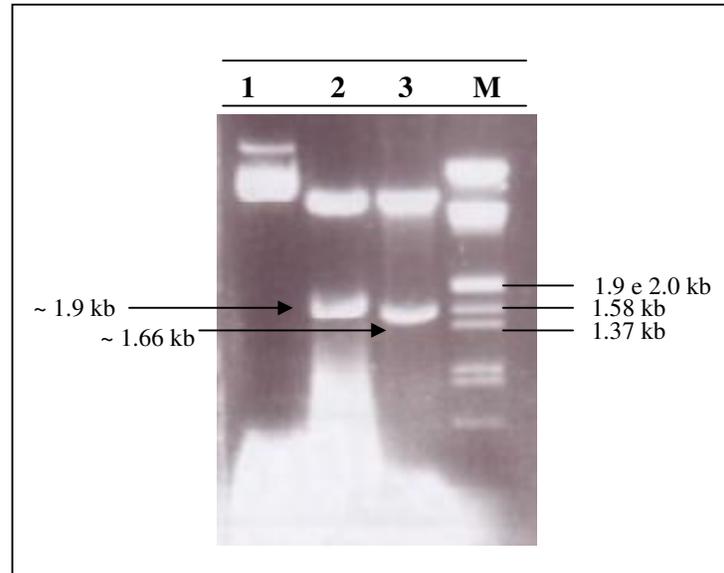


Figura 26. Análise de restrição do vetor YEpAMY1. Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% do perfil de restrição do clone 2 (YEpAMY1). 1. plasmídeo intacto; 2 e 3, YEpAMY1 digerido com *Bgl*III e *Sac*I, respectivamente. M- marcador de massa molecular DNA de fago λ digerido com *Eco*RI/*Hind*III.

Dessa forma, todos os resultados apresentados acima revelam que a versão cDNA do gene *AMY1* foi clonada com sucesso no vetor de YEp351-PGK, resultando no vetor YEpAMY1, que foi usado para transformar células de *S. cerevisiae*.

5.2 Transformação de *S. cerevisiae* e seleção dos clones recombinantes

A versão escolhida do gene *AMY1* para expressão em *S. cerevisiae* foi o cDNA completo incluindo o peptídeo sinal nativo de Amy1 (dados não mostrados). Normalmente, aconselha-se o uso do cDNA para a expressão heteróloga em levedura já que este organismo nem sempre é capaz de reconhecer os sinais de processamento de íntrons heterólogos (Kingsman *et al.*, 1985). De fato, várias tentativas sem sucesso foram realizadas para expressar a versão genômica do gene *AMY1* em *S. cerevisiae* (dados não mostrados), o que pode ser atribuído ao não-processamento do pré-mRNA de *AMY1*.

Após transformação da linhagem CENPK2 de *S. cerevisiae* com o vetor YEpAMY1, clones transformantes foram selecionados em meio mínimo sem leucina sendo transferidos, em seguida, para placas contendo meio mínimo com amido. As placas foram coradas com vapor de iodo (I_2), após pelo menos 48 horas de crescimento, com o objetivo de se detectar visualmente a atividade amilolítica. A comparação do halo de hidrólise foi realizada com a linhagem controle (CENPK2 transformada com o YEp351-PGK). A análise visual mostrou que todos os clones transformados apresentavam halos de hidrólise, indicando que estavam secretando Amy1 com sucesso (Figura 27A). A expressão da Amy1 sob o controle do promotor *PGK* foi bastante eficiente e, aparentemente, a levedura foi capaz de reconhecer os sinais de secreção de *C. flavus*.

Foi realizado um teste para verificar o efeito da concentração de glicose sobre a atividade amilolítica dos clones transformantes. Alguns transformantes foram transferidos para placas contendo meio SDA + glicose 0,05% e 2% e, após 48 horas de crescimento, todos os clones exibiram um halo de hidrólise bem maior em relação às placas que não continham glicose. Ainda, a atividade amilolítica dos clones não foi inibida por glicose, mostrando um halo de hidrólise bem maior nas placas onde foi usada glicose 2% (Figura 27B). Os promotores mais usados para expressão heteróloga em *S. cerevisiae* dirigem a transcrição de genes da via glicolítica, como álcool desidrogenase I (*ADHI*), fosfoglicerato kinase (*PGK*) e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAP*) (Romanos *et al.*, 1992; Kingsman & Kingsman, 1988). Embora esses promotores sejam constitutivos, a adição de glicose ao meio leva a aumentos de 3 a 10 vezes nos níveis de expressão (Johnston & Carlson, 1992). Genes da via glicolítica são altamente expressos e podem representar de 30-60% das proteínas solúveis totais de *S. cerevisiae* (Fraenkel, 1982). A fosfoglicerato kinase (*PGK*) também atua na via gliconeogênica e pode representar 5% das proteínas totais da célula (Holland & Holland, 1978). Devido a esses altos níveis de expressão, o promotor *PGK* tem sido usado na construção de vetores para expressão em leveduras e fungos filamentosos (Tuite, 1982; Streatfield & Roberts, 1993).

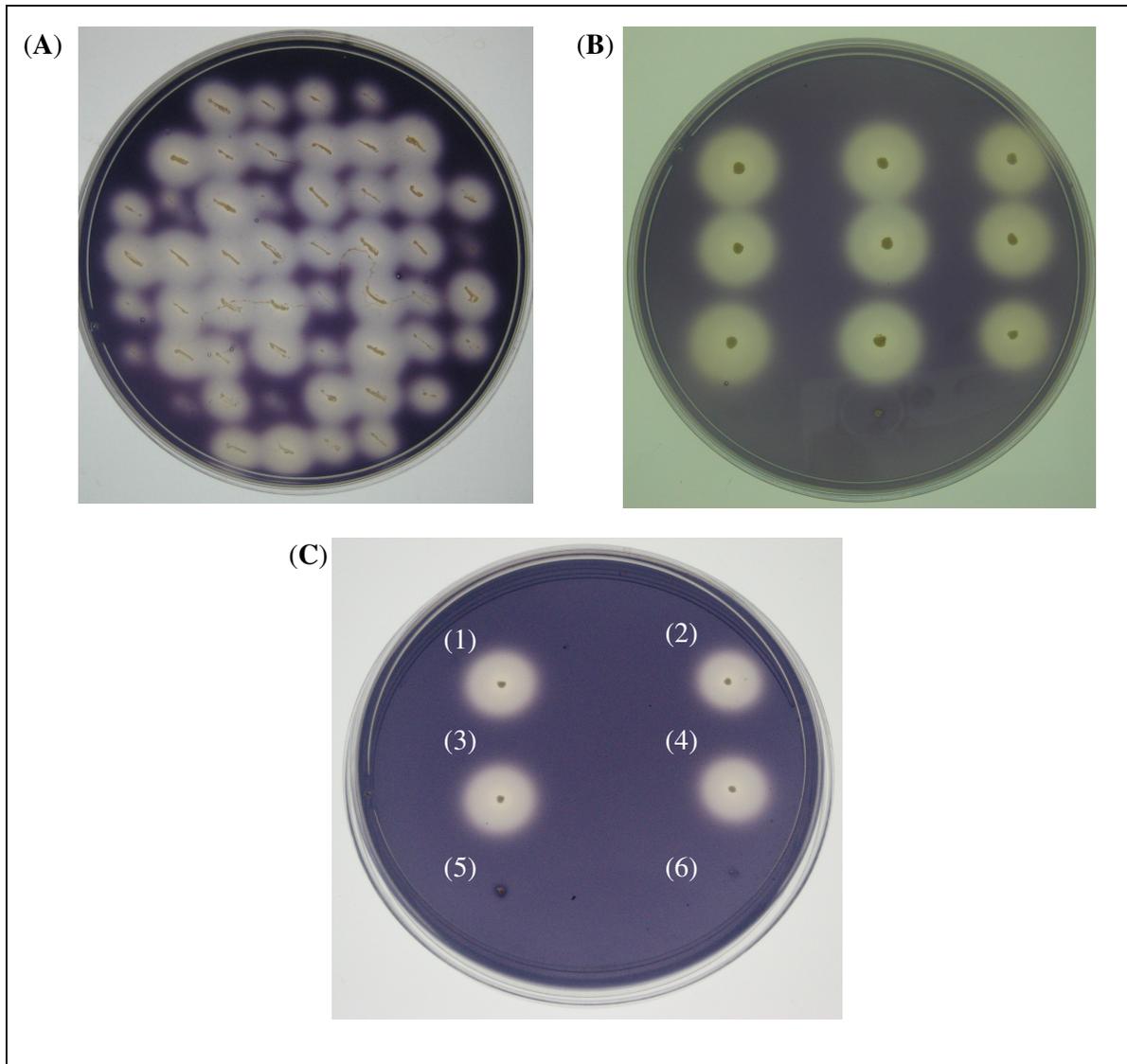


Figura 27. Atividade amilolítica em placa de clones transformantes de *S. cerevisiae*. Clones de *S. cerevisiae* CENPK2 transformados com o vetor YEpAMY1 e crescidos em meio mínimo SDA sem glicose (A) ou com 2% de glicose (B). (C) Crescimento em meio mínimo SDA e coloração com vapor de iodo após 48 horas de crescimento a 30°C. 1-4 Colônias de *S. cerevisiae* CENPK2 transformadas com vetor YEpAMY1; 5) YEp351PGK; 6) células não-transformadas.

Após padronizar o ensaio, alguns clones foram selecionados e transferidos para uma placa contendo meio mínimo SDA e glicose 2%. A expressão dos clones amilolíticos foi comparada com os controles negativos (linhagem CENPK2 transformada com YEp351PGK ou linhagem CENPK2 não-transformada) (Figura 27C).

Todos os resultados descritos acima mostram que Amy1 foi expressa com sucesso em células de *S. cerevisiae*. Genes de amilases de *Aspergillus oryzae* (Nieto *et al.*, 1999), *Schwanniomyces occidentalis* (Kang *et al.*, 2003) e *Streptococcus bovis* (Khaw *et al.*, 2005) já foram expressos com sucesso em *S. cerevisiae*. Entretanto Iefuji *et al.* (1996) não obtiveram sucesso na expressão da amilase de *Cryptococcus* sp S-2. Esses autores especularam que, ao tentar expressar a amilase em células de *S. cerevisiae*, a enzima ficava retida na parede celular e uma quantidade muito baixa de enzima era secretada. No entanto, quando a seqüência C-terminal da amilase foi deletada, a enzima foi secretada eficientemente, porém, pouca atividade amilolítica era detectada. Baseado nesses dados, esses autores afirmaram que, possivelmente, o domínio C-terminal da amilase AMY-CS2 estaria de alguma forma impedindo que a amilase atravessasse livremente a parede celular da levedura. Como foi mostrado anteriormente, Amy1 tem 97% de identidade com AMY-CS2. Conforme mostrado na Figura 21, existem 3 substituições na região C-terminal desta enzima nas seguintes posições: 606 (Pro→Thr), 608 (Asn→Ser) e 623 (Ala→Thr). No entanto, não podemos afirmar ainda se essas modificações *per se* promovem uma eficiente secreção da Amy1 em *S. cerevisiae*.

Iefuji *et al.* (1996) também propuseram que a região C-terminal da AMY-CS2 está relacionada a um Domínio de Ligação ao Amido (SBD). O SBD é geralmente uma seqüência distinta estruturalmente que aumenta a eficiência de uma enzima amilolítica por se ligar e degradar amido cru ou granular (Lo *et al.*, 2002). Muitos domínios de ligação a carboidratos (CBM) têm sido classificados em 7 famílias: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41 e CBM45 (Machovič & Janeček, 2006). Devido ao alto grau de identidade entre as amilases Amy1 e AMY-CS2, que parecem ter um domínio SBD na posição C-terminal, estas enzimas devem ser incluídas na família CBM20.

6. Produção da Amy1 recombinante por *S. cerevisiae* CENPK2

Um clone transformante de *S. cerevisiae* contendo o gene da amilase de *C. flavus* (clone 14) foi crescido em meio mínimo SD (sem leucina) com o objetivo de se determinar o melhor tempo de produção enzimática, além de ser obter quantidade suficiente de enzima para posterior caracterização bioquímica. Foram retiradas amostras em triplicata, em intervalos de 12 em 12 horas, durante 60 horas de cultivo. A atividade amilolítica extracelular aumentou durante o crescimento da levedura e alcançou a atividade máxima (3,93 U/mL) em aproximadamente 48 horas de crescimento, havendo uma estabilização na quantidade de amilase produzida, o que coincide com a entrada da levedura na fase estacionária (Figura 28A). O crescimento celular do clone transformado foi equivalente ao clone transformado com o vetor YEp351-PGK (dado não mostrado), indicando que a produção de amilase foi constitutiva e acumulativa, não interferindo no crescimento celular. A atividade amilolítica foi correlacionada com uma banda protéica de massa molecular aparente de ~ 67 kDa (Figuras 28B e C), a qual é similar à massa da amilase nativa. É interessante observar que a levedura *C. flavus* produziu quase que o dobro de atividade amilolítica (7,1 U/mL) em um tempo mais curto de crescimento (24 horas) se comparado com a *S. cerevisiae* recombinante que alcançou a atividade máxima (3,93 U/mL) apenas em 48 horas de crescimento.

Como *C. flavus* é um microrganismo selvagem, é possível que possua outras amilases ainda não detectadas e que ajudem na degradação do amido de forma mais eficiente. Isto pode ser uma explicação para o rápido crescimento dessa levedura em apenas 24 horas de cultivo. Por outro lado, mesmo a *S. cerevisiae* recombinante crescendo em meio mínimo com glicose 2% não foi capaz obter um crescimento máximo no mesmo tempo da levedura nativa. A linhagem de *S. cerevisiae* CENPK2 é auxotrófica para uracila (*ura3-52/ura3-52*), leucina (*leu 2-3,112/ leu 2-3, 112*), triptofano (*trp1-289/trp1-289*) e histidina (*his3-1/his3-1*) o que pode explicar o crescimento mais lento dessa levedura em relação a uma espécie selvagem.

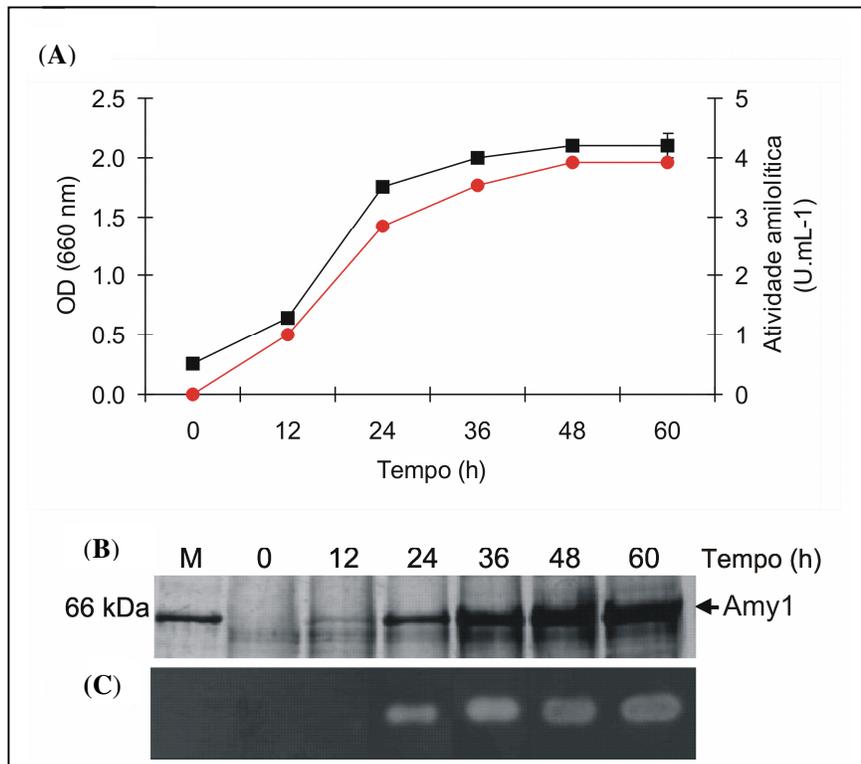


Figura 28. Cinética de produção da Amy1 recombinante por *S. cerevisiae* crescida em meio mínimo SD. Curvas de crescimento celular (■) e atividade amilolítica (●) de um clone expressando *AMY1* (A). SDS-PAGE (B) e zimograma (C) de sobrenadantes de diferentes tempos de coleta. M, marcador de massa molecular

7. Purificação da Amy1 recombinante expressa em *S. cerevisiae*

Para a purificação da Amy1 recombinante secretada no meio de cultura, foi feito o mesmo procedimento da purificação da amilase nativa. Foram observados dois picos de proteínas e somente um único pico de atividade amilolítica eluído entre as frações 26 e 30 após aplicação do gradiente de 0,5M de NaCl (Figura 29A). Parte dessa eluição foi dialisada e concentrada por liofilização para posterior análise em SDS-PAGE.

As frações contendo atividade amilolítica, foram concentradas por liofilização e aplicadas em uma coluna de gel filtração (Sephacryl S-200). Apenas um pico de proteína foi observado. Novamente, apenas um único pico de atividade amilolítica foi detectado entre as frações 55 e 70 (Figura 29B). É interessante observar que no pico onde se verifica atividade enzimática não foi verificado nenhum pico correspondente

à proteína. Isto pode ser explicado pela alta atividade específica da amilase recombinante. As principais frações deste pico foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas para análise do perfil eletroforético em SDS-PAGE 12%.

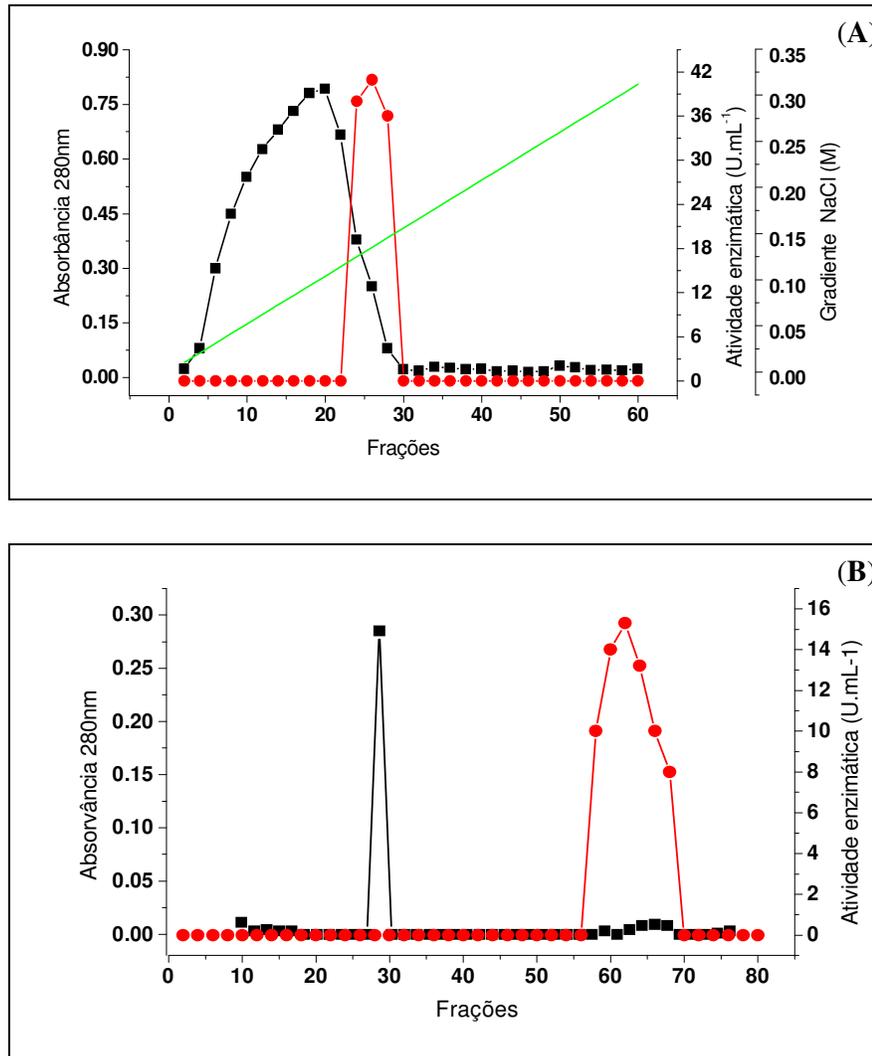


Figura 29. Purificação de Amy1 recombinante. Perfil de eluição de Amy1 produzida em *S. cerevisiae* em colunas de troca iônica (Q-sepharose) (A) (fluxo 60 mL/h) e filtração em gel (Sephacryl S-200) (fluxo 40 mL/h) (B). Atividade enzimática (●); Proteína 280 nm (■) e gradiente de NaCl 0,5M (—).

Na Tabela 4 estão mostradas as etapas de purificação da Amy1 recombinante que apresentou um rendimento de aproximadamente 10,4%.

Tabela 4. Etapas de purificação da Amy1 recombinante.

Étapas	Vol (mL)	Atividade (U/mL)	Atividade total (U)	Proteína (mgx10⁻³/mL)	Proteína (mgx10⁻³)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
SOB	250	7,69	1922,5	0,07	17,5	109,8	1	100
Q-SEP	12	40,90	490,8	0,01	0,12	4090	37,2	25,5
S-200	13	15,38	199,9	0,0037	0,048	4164	37,9	10,4

As siglas SOB, Q-SEP e S-200 significam sobrenadante, Q-sepharose e Sephacryl-100, respectivamente. A sigla vol = volume.

De acordo com a Tabela 4, pode-se observar que *S. cerevisiae* secretou uma quantidade muito pequena de proteína (0,07 x 10⁻³ mg/mL) se comparada com a levedura nativa *C. flavus* (0,073 mg/mL). Mesmo sob o controle de um forte promotor constitutivo (promotor *PGK*) para expressar a Amy1 em *S. cerevisiae*, a quantidade de proteína expressa foi relativamente menor. No entanto, a atividade específica da amilase recombinante é bastante expressiva (Tabela 4). A atividade da amilase purificada na coluna Sephacryl S-200 (15,38 U/mL) decresceu quase que 3 vezes da atividade da enzima purificada pela resina Q-Sepharose (40,9 U/mL). Para eluir a amilase da resina Q-Sepharose foi utilizado um gradiente de NaCl 0,5M.

Testes preliminares do efeito de NaCl 0,5M sobre a atividade da amilase mostram que essa enzima é pouco afetada (dados não mostrados). Esse relato pode ser observado através da purificação da enzima nativa (Tabela 3) em que a atividade da amilase purificada pelas resinas Q-Sepharose e Sephacryl-S100 foi de 44,9 U/mL e 32,8 U/mL, respectivamente. Pereira (2002) relatou a perda de atividade para essa enzima de 30 U/mL para 25 U/mL quando a enzima foi purificada pela mesma estratégia. O baixo rendimento da purificação da amilase recombinante (10%) se comparado com a purificação da amilase nativa (30%) possivelmente pode explicado pelo uso de diferentes resinas de filtração em gel. Para purificar a amilase recombinante foi usada a resina Sephacryl S-200, enquanto que a nativa foi purificada pela resina Sephacryl S-100. Como essas resinas têm limites de exclusão diferentes, possivelmente isso afeta o rendimento da purificação. Por meio de diferentes

estratégias de purificação de amilases vários autores têm conseguido rendimentos variáveis. Marco *et al.* (1996) relataram um rendimento final de 17% para purificação de uma amilase truncada de *Bacillus subtilis* expressa em *E. coli*. Nagarajan *et al.* (2006) conseguiram um rendimento de 45,2% para a purificação de uma amilase de *Bacillus subtilis* KCC103. Zhang & Zeng (2007) purificaram uma amilase produzida por *Nocardiosis* sp com rendimento de 10,1%. Liu *et al.* (2008) caracterizando uma amilase expressa em *Bacillus subtilis* relataram um rendimento de 23%.

7.1 Perfil protéico da Amy1 recombinante purificada e detecção da atividade amilolítica em gel – Zimograma

Devido à baixa concentração de proteínas encontradas no sobrenadante da cultura da *S. cerevisiae* recombinante, foi necessário liofilizar as amostras de cada etapa de purificação para se poder ter uma quantificação razoável da quantidade de proteínas em cada fração. Por causa deste problema, optou-se pela coloração do gel SDS-PAGE com prata.

Assim, as amostras provenientes de cada etapa de purificação da amilase recombinante foram dialisadas contra água e concentradas por liofilização. Devido à baixa quantidade de proteínas secretadas por *S. cerevisiae*, foram realizadas várias tentativas com a finalidade de padronizar a quantidade de proteína aplicada no gel SDS-PAGE para as diferentes frações. Inicialmente, para quantificar as proteínas no sobrenadante foram liofilizados 2mL de amostra. Para as etapas de purificação pela Q-Sepharose e Sephacryl S-200 foi necessário 1mL de amostra.

A análise por SDS-PAGE das etapas de purificação da amilase recombinante mostrou uma única banda protéica com massa molecular aparente de 67 kDa (Figura 30A) (similar ao tamanho da amilase nativa) e que coincide com a banda de atividade amilolítica detectada no sobrenadante da cultura (Figura 30B). Esta amilase apresentou uma atividade específica alta uma vez que foram aplicados apenas 100 µL do sobrenadante da amostra que compreende aproximadamente 7 ng de proteína.

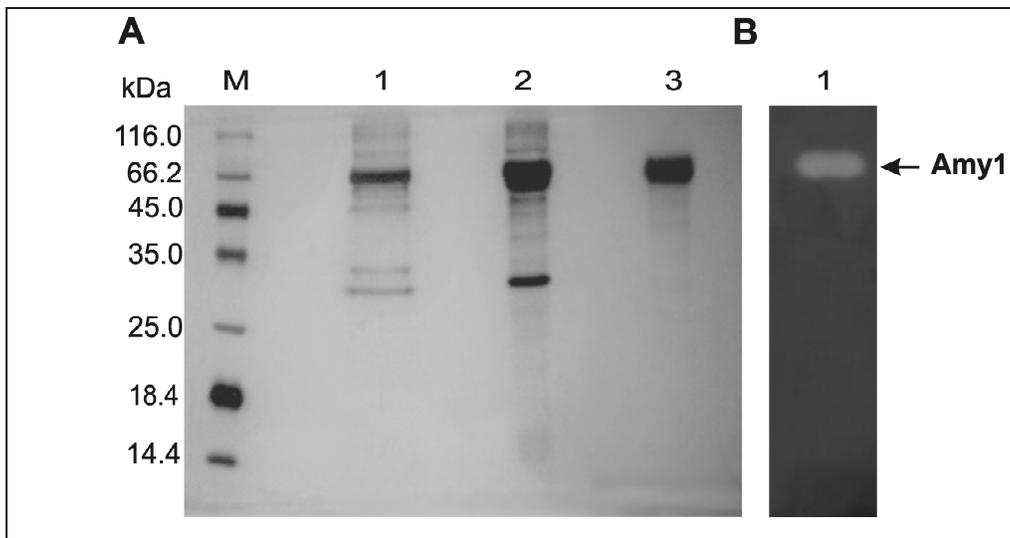


Figura 30. Perfil eletroforético das etapas de purificação da Amy1 recombinante. (A) SDS-PAGE 12% após coloração com prata; M- marcador de massa molecular “*Unstained Protein Molecular Weight Marker*” (Fermentas Life Science); 1. Sobrenadante da cultura; 2. eluído da Q-Sepharose e 3. eluído da Sephacryl S-200 (B) Zimograma do sobrenadante da cultura.

8. Ensaio de N-deglicosilação

Uma vez purificadas, as amilases nativa e recombinante foram deglicosiladas usando a enzima N-glicosidase F, mais conhecida como PNGase F. Essa enzima cliva entre os resíduos de N-acetil-glicosamina (GlcNac) mais internos e os resíduos de asparagina (Asn) de glicoproteínas N-ligadas. Após a deglicosilação, ambas as amilases, nativa e recombinante, mostraram uma massa molecular de ~66 kDa (Figura 31) que está de acordo com a massa molecular predita (65865 Da) a partir da tradução conceptual do gene *AMY1* (já excluindo o peptídeo sinal). Esses resultados indicam que tanto a enzima nativa como a recombinante são glicosiladas.

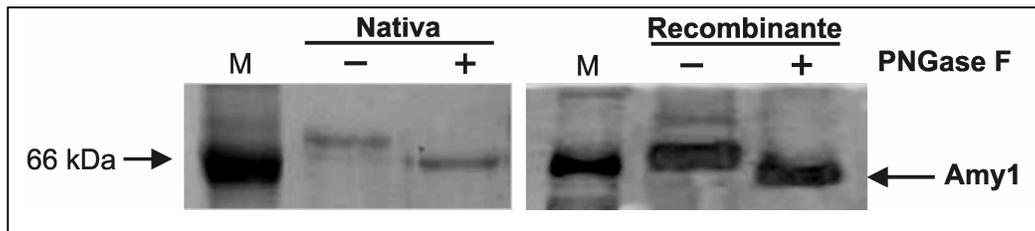


Figura 31. Deglicosilação de Amy1. SDS-PAGE 12% corado com prata da amilase nativa e recombinante sem (–) ou com (+) tratamento com PNGase F. M- marcador de massa molecular (Fermentas Life Science)

Três sítios de glicosilação foram encontrados na seqüência protéica da amilase de *C. flavus* (Figura 20): ⁶¹NGT, ¹⁹⁰NRT e ²⁶⁹NPS, mas outros experimentos precisam ser realizados para a confirmação do estado de glicosilação desses sítios. Ramada (2007) usando o antibiótico tunicamicina para analisar o efeito da N-deglicosilação sobre o crescimento e atividade amilolítica de *C. flavus* também encontrou que a amilase tratada com esse antibiótico possui massa molecular de aproximadamente 66 kDa. A existência de amilases glicosiladas tem sido relatada na literatura. Amilases de *Trichosporon pullulans* (De Mot & Verachtet, 1986), *Schwanniomyces alluvius* (Wilson & Ingledew, 1982), *Lipomyces kononenkoae* (Prieto *et al.*, 1995) e *Candida antarctica* (De mot & Verachtet, 1987) são exemplos de glicoproteínas.

9. Caracterização bioquímica da Amy1 recombinante

As α -amilases encontram aplicações nas indústrias de alimentos, de bebidas, de detergentes, têxtil, de papel e, sobretudo, em processos industriais que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido. Cada aplicação requer propriedades únicas em relação à especificidade, estabilidade, temperatura e pH. Assim, como o objetivo de elucidar as propriedades bioquímicas da amilase recombinante essa enzima foi caracterizada.

9.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima

A influência do pH na atividade enzimática é mostrada na Figura 32A. Pode-se observar que a enzima apresenta uma maior atividade na faixa de pH entre 5.0 e 6.0, com atividade máxima em pH 5.5. O efeito do pH na estabilidade enzimática também foi testado após pré-incubação da enzima nos referidos tampões por 60 min. A enzima é estável em uma faixa ampla de pH, mantendo aproximadamente 80% da atividade em pHs variando de 4 a 6, mas apresentando 75,5% e 68,5% nos pHs 3 e 7, respectivamente (Figura 32B).

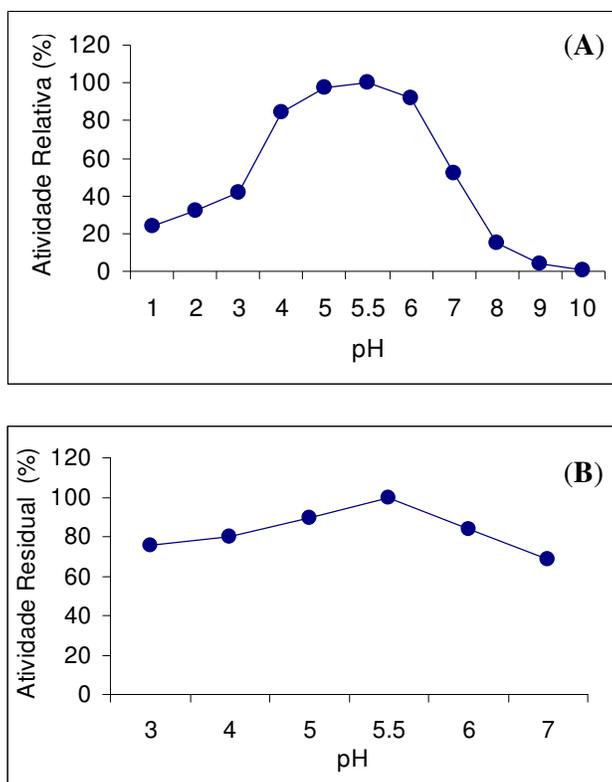


Figura 32. Determinação do efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) da Amy1 recombinante. Para os valores de pH de 1-3 foi utilizado tampão Glicina-HCl (50mM), de 4-5,5 tampão acetato de sódio (50mM), de 6-7 tampão fosfato de sódio (50mM) e de 8-10 tampão Tris-HCl (50mM). Os dados cotados representam uma média de medidas em triplicata e os desvios padrão foram quotados, no entanto, apresentaram valores menores que 5%.

Estes resultados sugerem que a Amy1 recombinante não foi sensível às variações de pH e estão de acordo com os valores encontrados na literatura para grande parte das amilases caracterizadas, que geralmente são estáveis em pHs variando de 5,5 a 8,0 (Fogarty & Kelly, 1980). *Lipomyces kononenkoae*, por exemplo, apresenta um pH ótimo entre 4,5 e 5,5 e mantém mais de 80% de sua atividade em pHs variando de 3,0 a 6,0 (Prieto *et al.*, 1995). *Schwanniomyces alluvius* apresentou um pH ótimo entre 3,7 e 5,5 e mostrou-se estável com atividade residual acima de 80% na faixa de 3,5 a 6,5 (Moranelli *et al.*, 1987).

Da mesma forma que foi feito o pH ótimo para a atividade e estabilidade enzimática, foi realizado o experimento para verificação da temperatura ótima, alterando-se apenas a temperatura de incubação. A Figura 33A mostra que a enzima apresentou atividade máxima na temperatura de 60°C. Este valor está de acordo os valores de temperaturas ótimas descritas na literatura para a AMY-CS2 tratada com

1 mM de CaCl_2 (Iefuji *et al.*, 1996) e *Aureobasidium pullulans* (Li *et al.*, 2007). A termoestabilidade de uma enzima é considerada um importante critério para aplicação industrial de enzimas de microrganismos. A termoestabilidade da enzima foi testada pela incubação prévia da mesma nas temperaturas de 55°C e 60°C. A Figura 33B mostra que a enzima incubada no tempo de 55°C mantém praticamente 90% da sua atividade durante 1 hora. Entretanto a 60°C, a enzima recombinante perdeu 50% da sua atividade residual.

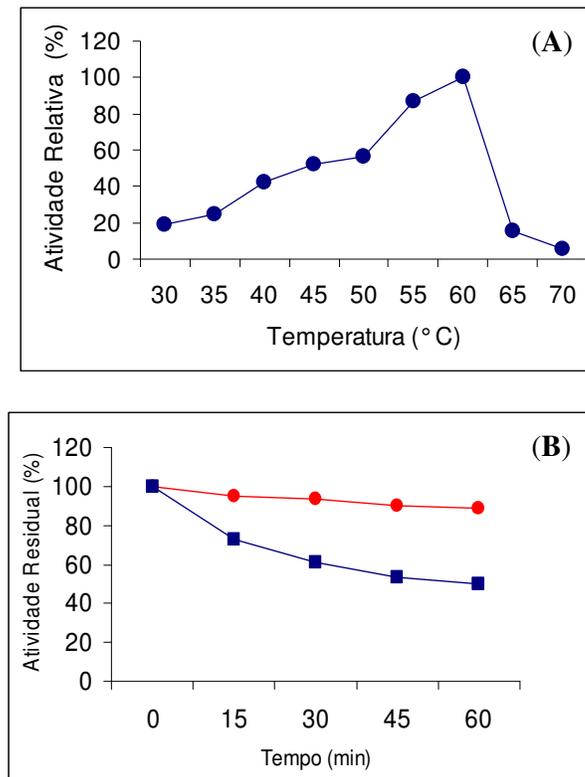


Figura 33. Determinação do efeito da temperatura (A) e da termoestabilidade (B) na atividade da Amy1 recombinante. Para a termoestabilidade (B) a enzima foi incubada a 55°C (●) e 60°C (■). Os dados cotados representam uma média de medidas em triplicata e os desvios padrão foram quotados, no entanto, apresentaram valores menores que 5%.

Esses resultados sugerem que a Amy1 recombinante parece ter uma considerável termoestabilidade. Iefuji *et al* (1996) propuseram que a região C-terminal da AMY-CS2 deve estar relacionada com a termoestabilidade da enzima. Estes autores relataram que quando a região C-terminal da enzima foi deletada, a amilase perdeu a sua termoestabilidade. Devido à grande identidade (97%) entre Amy1 e AMY-CS2 é possível que a região C-terminal da Amy1 também seja

responsável pela termoestabilidade da enzima. Um dado bastante interessante é que *C. flavus* é uma levedura mesófila com crescimento ótimo a 25°C, no entanto, apresenta uma amilase termoestável com temperatura ótima de 50°C (Wanderley *et al.*, 2004). A temperatura ótima da Amy1 recombinante deste trabalho foi de 60°C, maior do que a temperatura ótima da Amy1 nativa de *C. flavus*. Mijts & Patel (2002) também encontraram diferenças entre as temperaturas ótimas de amilases nativas e recombinantes. Expressando a amilase de *Halothermotrix orenii* em *E. coli*, os autores verificaram que a temperatura ótima da enzima recombinante era maior (65°C) do que a nativa (60°C).

9.2 Efeito de íons e DTT na atividade da enzima

O efeito de íons sobre a atividade da amilase foi determinado adicionando-se ao sistema de reação 4 mM do sal correspondente e realizado o ensaio de atividade nas condições ótimas de temperatura e pH.

Os resultados indicaram que a enzima foi pouco afetada por vários íons (Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+}), uma vez que a atividade relativa da enzima foi maior 70% (Tabela 5). Além disso, também foi observado que a presença de 10 mM de $CaCl_2$ mantém a atividade relativa da enzima em torno de 70% (dados não mostrados), sugerindo, desta forma, que o íon Ca^{+2} tem pouco efeito sobre a atividade da amilase. Esses resultados estão de acordo para a amilase nativa de *C. flavus* (Wanderley *et al.*, 2004). O íon NH_4^+ teve um efeito ativador sobre a atividade da enzima, mostrando o maior valor de atividade relativa (111%). Contudo, os íons Zn^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} atuam como inibidores da atividade da enzima. Os íons Cu^{+2} e Hg^{2+} mostraram os menores valores de atividade relativa (0%) (Tabela 5). A inibição da atividade pelo íon mercúrio pode indicar a importância do grupamento indol da cadeia lateral de alguns aminoácidos na função da enzima (Gupta *et al.*, 2003; Ramirez-Zavala *et al.*, 2004). AMY-CS2 foi estabilizada por $CaCl_2$ e inibida por Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} e Mg^{2+} (Iefuji *et al.*, 1996) enquanto que a amilase de *L. kononenkoae* CBS 5608 é inibida por Ag^+ e Cu^{2+} (Prieto *et al.*, 1995). Uma observação bastante interessante é que a amilase da levedura *Aureobasidium pullulans* N13d (Li *et al.*, 2007) e a amilase de *Bacillus halodurans* 38C-2-1 expressa em *E. coli* (Murakami *et al.*, 2007) não foram inibidas por Cu^{2+} , tendo este um efeito ativador na atividade destas enzimas.

Tabela 5. Efeito de vários íons sobre a atividade da Amy1 recombinante.

Composto (4 mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100
MgSO ₄	88,6
MnSO ₄	77,9
CaCl ₂	71,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	111
ZnCl ₂	20,1
CuSO ₄	0
HgSO ₄	0

Os dados cotados representam uma média de medidas em triplicata.

A atividade da amilase recombinante não foi afetada quando concentrações de DTT, variando de 5 a 25 mM, foram usadas (Figura 34). Este dado foi diferente do observado para a amilase de *Thermotoga maritima* MSB8 expressa em *E. coli* (Ballschmitter *et al.*, 2006). Esses autores relataram que a atividade desta enzima aumentou mais de três vezes na presença de concentrações de DTT de 5 a 20 mM.

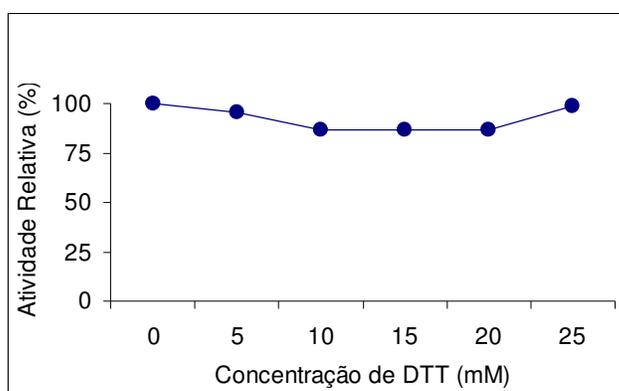


Figura 34. Efeito de DTT na atividade da Amy1 recombinante. Os dados cotados representam uma média de medidas em triplicata e os desvios padrão foram quotados, no entanto, apresentaram valores menores que 5%.

9.3 Determinação de K_m e V_{max}

A velocidade inicial da reação, em função de diferentes concentrações de substrato foi determinada utilizando-se amido solúvel em concentrações variando de 0 a 1,0 mg/mL. Neste experimento a atividade amilolítica foi determinada usando-se o método de Fuwa e a atividade foi expressa em U/mL. O K_m determinado para a amilase purificada foi de 0,37 mg/mL quando o amido foi usado como substrato e o valor de V_{max} foi de 22,98 mg/mL/min (Figura 35).

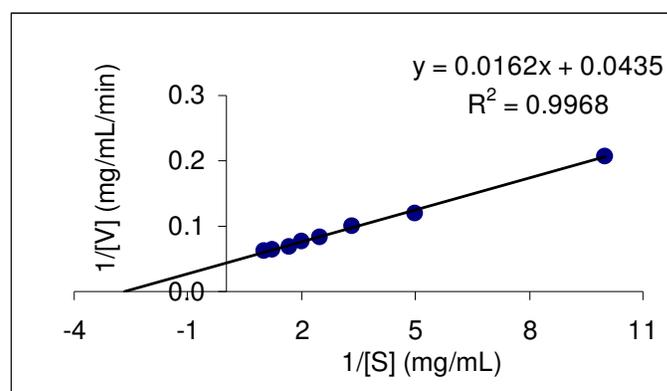


Figura 35. Gráfico de Lineweaver-Burk para os valores de K_m e V_{max} da Amy1 recombinante purificada em presença de diferentes concentrações de amido. Os dados cotados representam uma média de medidas em triplicata e os desvios padrão foram quotados, no entanto, apresentaram valores menores que 5%.

No entanto, este valor de K_m encontrado para a Amy1 recombinante foi diferente do observado para a Amy1 nativa (0,056 mg/mL/min, Wanderley *et al.* (2004). Uma explicação para essas diferenças de valores de K_m pode ser atribuída a uma pequena alteração no dobramento da proteína recombinante. Entretanto, apenas experimentos específicos de determinação da estrutura terciária como Dicroísmo Circular (CD) e cristalização de raio X poderiam ajudar a comprovar qualquer mudança no *fold*ing dessa amilase. Apesar dessa diferença, o valor do K_m para a Amy1 recombinante deste trabalho está de acordo com os valores de K_m para as seguintes amilases de leveduras encontradas na literatura: *Schwanniomyces alluvius* (0,36 mg/mL/min; Wilson & Ingledew, 1982) e *Thermomonospora curvata* (0,39 mg/mL; Glymph & Stutzenberger, 1977) e similar a outros valores de K_m de amilases

observados para *Streptococcus bovis* JB1 (0,88 mg/mL; Freer, 1993), *Aspergillus flavus* (0,5 mg/mL ; Khoo *et al.*, 1994) e *Lipomyces kononenkoae* (0,80 mg/mL; Prieto *et al.*, 1995).

9.4 Especificidade da amilase

Com o objetivo de avaliar o grau de afinidade da enzima por diferentes substratos, a Amy1 recombinante foi incubada na presença de amido solúvel, amilose, amilopectina, glicogênio e pululana por 6 e 12 horas em condições ótimas de pH e temperatura. Após esse tempo, foi realizada uma dosagem de açúcares redutores produzidos nos meios de reação e determinada a atividade relativa em relação a cada substrato. A Amy1 recombinante liberou uma quantidade de açúcar redutor maior no tempo de 6 horas de incubação do que no tempo de 12 horas (dados não mostrados). Isso sugere que a especificidade da enzima para cada substrato testado foi alta em apenas 6 horas de incubação. No entanto, o tempo de 12 horas foi escolhido para determinar a atividade relativa de cada substrato e também para verificar os produtos de hidrólise em cromatografia de camada delgada (TLC). A enzima teve alta especificidade tanto para substratos lineares (amido solúvel) como para substratos ramificados (amilopectina). A atividade relativa foi maior para o amido solúvel (100%), seguido de amilopectina (97,4%), amilose (50,4%), glicogênio (41,4%) e pululana (0%) (Tabela 6). Este resultado está de acordo com os resultados observados por Marco *et al* (1996) em que a especificidade de uma amilase truncada de *Bacillus subtilis* expressa em *E. coli* foi maior para o amido (100%), seguido de amilopectina (82%), amilose (77%), glicogênio (16%) e pululana (2%) durante 12 horas de incubação. No entanto, a enzima nativa teve maiores especificidades para amido solúvel, glicogênio, amilopectina e amilose. Possivelmente esta diferença de especificidade entre as Amy1 nativa e recombinante pode ser explicada pelos valores diferentes de K_m , refletindo, dessa forma, na especificidade diferente da enzima por cada substrato.

Tabela 6. Especificidade da Amy1 recombinante por diferentes substratos.

Substrato (0.5%)	Tipo de ligação	Atividade Relativa (%)
Amido	(α -1,4 / α -1,6)	100
Amilopectina	(α -1,4 / α -1,6)	97,4
Amilose	(α -1,4)	50,4
Glicogênio	(α -1,4 / α -1,6)	41,4
Pululana	(α -1,6)	0

Os dados cotados representam uma média de medidas em triplicata.

Quando a enzima foi incubada com amido solúvel, amilopectina, amilose, glicogênio e pululana, os principais produtos da hidrólise observados por TLC foram oligossacarídeos de diversos tamanhos (Figura 36).

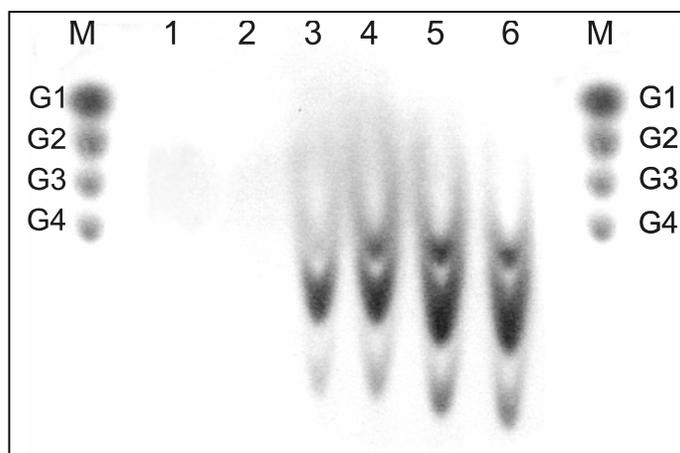


Figura 36. Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da Amy1 recombinante. M- marcadores; G1 = glicose, G2 = maltose, G3 = maltotriose e G4 = maltotretose. 1. amido sem enzima (controle negativo); 2. pululana; 3. glicogênio; 4. amilose; 5. amilopectina e 6. amido solúvel.

Não foi observada a liberação de pequenos carboidratos como glicose, maltose ou maltotriose. As α -amilases podem ser classificadas em enzimas de sacarificação ou enzimas de liquefação. Enzimas de liquefação têm uma grande aplicação industrial. A α -amilase recombinante é uma α -amilases típica de liquefação, pois os principais produtos da hidrólise dos polissacarídeos usados foram oligossacarídeos de diversos tamanhos. Mesmo incubando a enzima por 12 h não foi observado o aparecimento de

glicose. Os principais produtos de hidrólise da Amy1 nativa sobre amido, amilopectina e amilose foram maltose e maltotriose (Wanderley *et al.*, 2004). Essas diferenças nos produtos de hidrólises gerados entre as Amy1 nativa e recombinante podem ser devido à diferença nos valores de K_m entre as duas enzimas.

10. Clonagem e expressão do gene da glicoamilase (GA) de *Aspergillus awamori*

A levedura *S. cerevisiae* ainda é o microrganismo mais usado para a produção de etanol (Bai *et al.*, 2008). No entanto, esta levedura é incapaz de usar amido como única fonte de carbono (Ghang *et al.*, 2007). Desta forma, a manipulação genética dessas leveduras para produzir α -amilase e glucoamilase simultaneamente poderia aumentar a eficiência de utilização do amido para produção de etanol.

Inicialmente, com o objetivo de construir uma cepa de *S. cerevisiae* expressando α -amilase de *C. flavus* e glicoamilase de *A. awamori* simultaneamente, o gene GA foi clonado no vetor de expressão de *S. cerevisiae* YEp352. A estratégia de clonagem está esquematizada na Figura 37.

A clonagem do gene GA foi realizada após digestão do plasmídeo pG5 (Moraes *et al.*, 1995) com *Hind* III, liberando o cassete de expressão (pPGK – GA – PGK TT) que foi ligado no vetor YEp352 (sem promotor PGK) previamente digerido com a mesma enzima. O plasmídeo resultante foi chamado de YEpGA (YEp352GAPGK). O objetivo desta clonagem foi transferir o cassete de expressão contendo o gene GA de um plasmídeo que contém a marca auxotrófica *LEU2* para o plasmídeo YEp352 que continha a marca *URA3*.

Com o objetivo de purificar o cassete de expressão, inicialmente foi feita uma *midiprep* do plasmídeo pG5. Após obter uma concentração significativa desse plasmídeo, o mesmo foi digerido com *Hind*III. Após digestão, foi observado a liberação de um único fragmento de aproximadamente 3.5 kb (Figura 38A). O plasmídeo YEp352 sem o promotor *PGK* possui um único sítio de restrição para a enzima *Hind*III. Após digestão foi observado que este plasmídeo foi linearizado apresentando um tamanho esperado de aproximadamente 5.1 kb (Figura 38B).

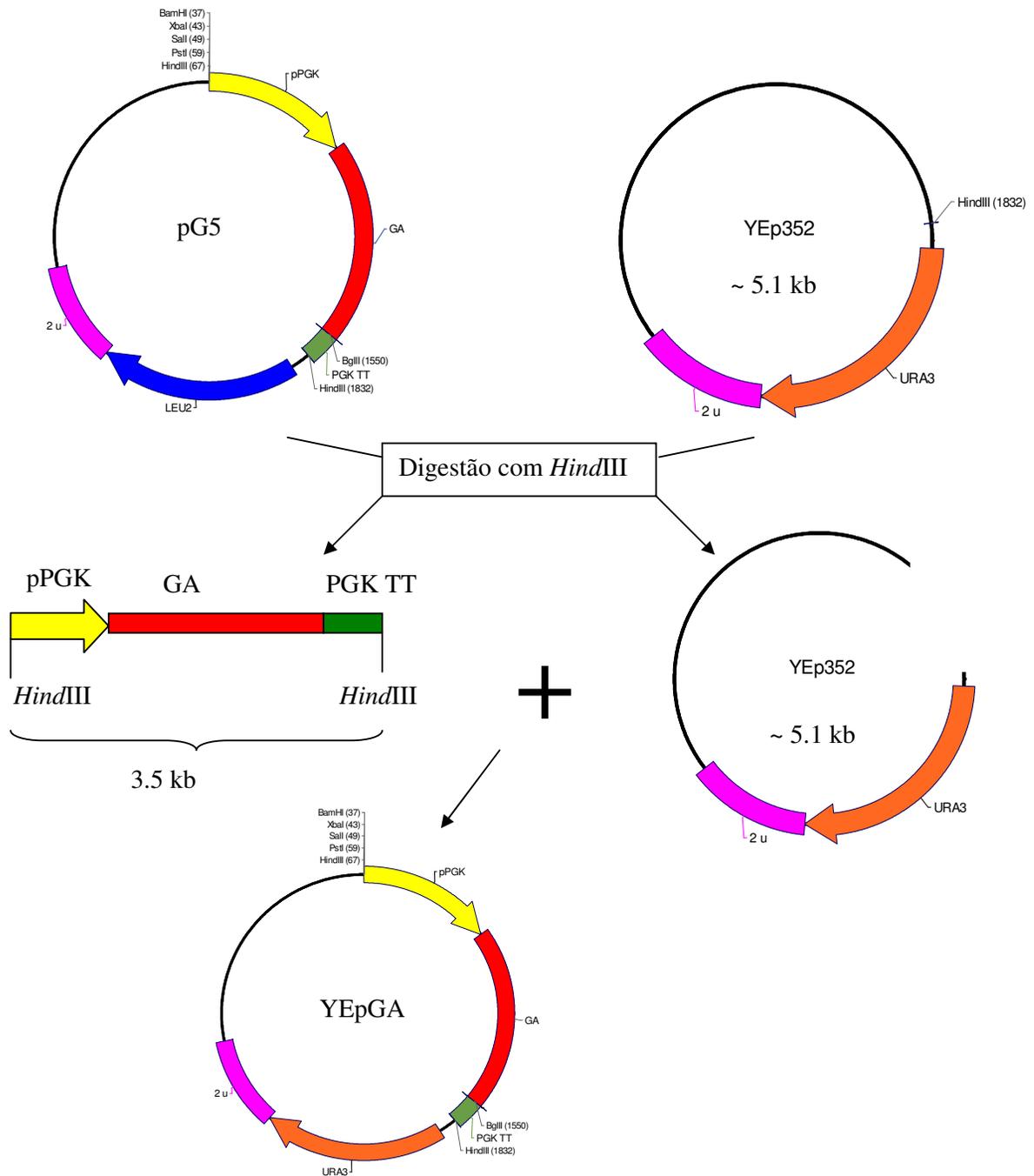


Figura 37. Estratégia de clonagem do gene GA. Após digestão do vetor pG5 com *HindIII*, o cassete de expressão (pPGK – GA – PGK TT) foi clonado no vetor YEpl352 previamente digerido com *HindIII*, originando o vetor YEplGA (YEpl352GAPGK).

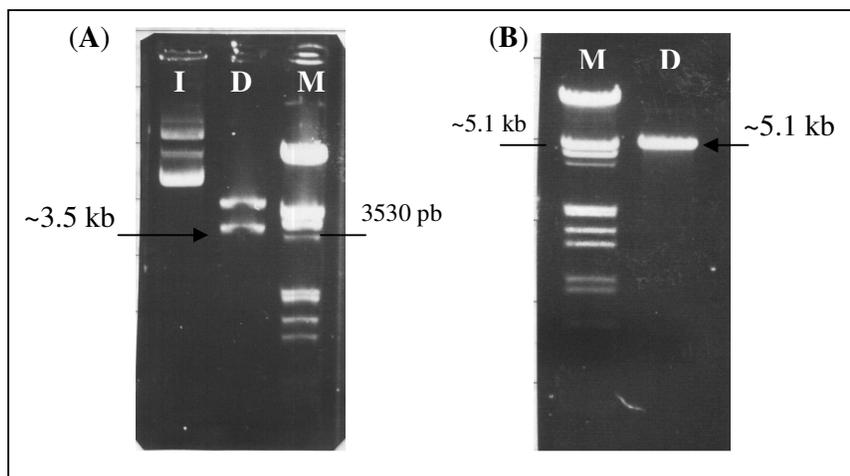


Figura 38. Digestão dos plasmídios pG5 e YEp352 com *Hind*III. Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% do perfil de restrição dos plasmídios pG5 (A) e YEp352 (B) após digestão com *Hind* III. I. Plasmídios intactos e D. plasmídios digeridos. M- marcador de massa molecular DNA de fago λ digerido com *Eco*RI/*Hind*III.

Assim, uma vez confirmado os tamanhos esperados para o cassete de expressão e para a linearização do YEp352, eles foram purificados do gel para fazer a reação de ligação. Após a purificação do vetor YEp352 linearizado, este foi tratado com fosfatase alcalina de camarão (SAP) e depois foi feita uma ligação do cassete de expressão (previamente digerido com *Hind* III) com o vetor YEp352. Após a ligação, células de *E. coli* EPI300 foram transformadas com o YEpGA. Após extração plasmidial de 24 clones, 10 desses clones foram escolhidos, baseados no perfil de migração diferenciado no gel, para confirmação da clonagem do cassete de expressão no vetor YEp352 por digestão com *Hind*III. A Figura 39 mostra que todos os clones analisados liberaram um único fragmento de aproximadamente 3.5 kb, confirmando que o cassete de expressão contendo o gene GA foi clonado com sucesso no vetor YEp352. O plasmídio resultante foi chamado YEpGA.

Uma vez obtido a construção YEpGA, um clone foi escolhido aleatoriamente para transformar células de *S. cerevisiae*. Os clones transformantes foram selecionados em meio mínimo sem uracila sendo transferidos, em seguida, para placas contendo meio SDA. Estas placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 48 h. Após esse período, as placas foram coradas com vapor de iodo (I_2) com o objetivo de se detectar visualmente a atividade amilolítica. A análise visual dos clones mostrou que todos os transformantes de *S. cerevisiae* apresentaram halos de hidrólise indicando que estavam secretando GA (Figura 40).

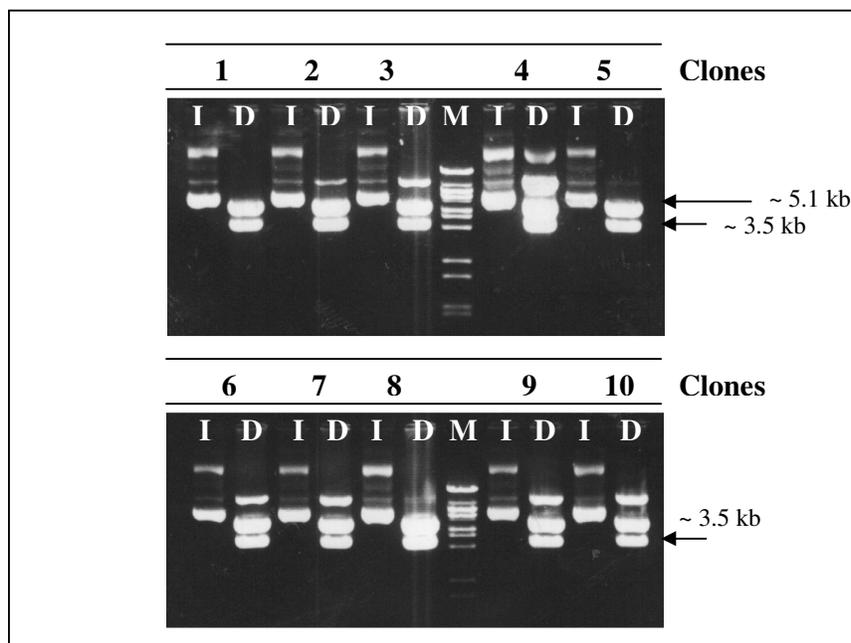


Figura 39. Confirmação da clonagem do cassete de expressão contendo o gene GA no vetor YEp352-PGK após digestão com *Hind* III . Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% do perfil de restrição dos plasmídios YEpGA intactos (I) e digeridos (D) com *Hind* III. M- Marcador de massa molecular DNA de fago λ digerido com *BstE* II.

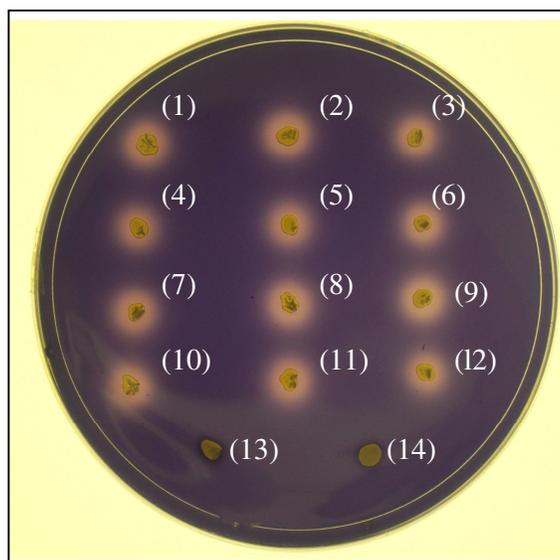


Figura 40. Atividade amilolítica em placa de clones transformantes de *S. cerevisiae*. Clones de *S. cerevisiae* CENPK2 transformados com o vetor YEpGA foram crescidos em meio mínimo SDA sem uracila. Após 48 horas de crescimento a 30°C, a placa foi corada com vapor de iodo. Colônias de *S. cerevisiae* CENPK2 foram transformadas com vetor YEpGA (1-12) e com o vetor YEp352 (13, 14).

Foi observado que o halo de hidrólise obtido pela ação da GA sobre o amido foi bem diferente dos halos de hidrólises dos clones de *S. cerevisiae* secretando a Amy1. Esta diferença pode ser explicada pelo modo de ataque ao amido diferenciado entre as duas enzimas e pelo mecanismo como as moléculas de iodo se ligam no amido (Moraes *et al.*, 1995). Geralmente, amilases de liquefação são endoamilases que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1-4. O estágio inicial da ação dessas enzimas é caracterizado por um decréscimo da massa molecular do substrato e conseqüentemente quebra da estrutura do substrato, especialmente da amilose. Devido às moléculas de iodo se intercalarem nas hélices das cadeias de amilose, a quebra da estrutura da amilose resulta em um rápido decréscimo da coloração iodo-amido. Este fenômeno é produzido pela clivagem de um pequeno número de ligações glicosídicas sendo acompanhado de uma pequena liberação de açúcares redutores (Bernfeld, 1955).

Como conseqüência, pouca atividade amilolítica é necessária para produzir um halo branco. Por outro lado, GA é uma exoenzima que hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 a partir das extremidades redutoras do polímero, liberando glicose. Muitas formas desta enzima também hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,6, quando a próxima ligação na seqüência é do tipo α -1-4 (Steyn & Pretorius, 1990). Assim, a glicoamilase *per se* não causa decaimento abrupto nas propriedades de coloração do complexo iodo-amido porque a mesma não quebra a estrutura da amilose na mesma intensidade que a α -amilase. Como conseqüência, a glicoamilase produz um halo de coloração violáceo ao invés de um halo branco produzido pela α -amilase. Assim, o grande halo branco não necessariamente indica a habilidade de utilizar amido eficientemente para o crescimento (Moraes *et al.*, 1995).

11. Co-expressão dos genes *AMY1* e GA em *S. cerevisiae* CENPK2

Com o objetivo de produzir uma cepa recombinante de *S. cerevisiae* que utilize amido de forma eficiente, um clone de *S. cerevisiae* expressando apenas a glicoamilase foi escolhido aleatoriamente e utilizado para ser transformado com o plasmídio YEpAMY1.

Inicialmente um clone de *S. cerevisiae* CENPK2 expressando apenas a glicoamilase foi crescido em meio mínimo sem uracila a 30°C durante 48 h. Após esse tempo de incubação, esse clone foi transformado com o plasmídio YEpAMY1.

As células transformadas foram plaqueadas em meio SD sem leucina e sem uracila para selecionar os clones que possuem as duas enzimas já que essas marcas auxotróficas estão presentes nos plasmídios que contêm a amilase e a glicoamilase, respectivamente. Em seguida, os clones transformantes foram transferidos para placas contendo meio SDA (sem leucina e uracila) e incubados a 30°C por 48h. Após esse tempo, as placas foram coradas com vapor de iodo (I₂) com o objetivo de se detectar visualmente a atividade amilolítica. A análise visual dos clones mostrou que todos os clones de *S. cerevisiae* contendo a GA ao serem transformados com o plasmídio YEpAM1 tiveram os seus halos de hidrólise aumentados indicando que os clones de *S. cerevisiae* receberam o gene Amy1 (Figura 41).

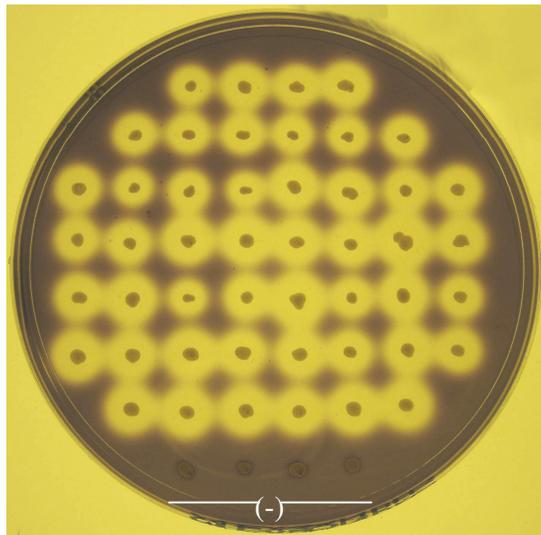


Figura 41. Atividade amilolítica em placa dos clones transformantes de *S. cerevisiae*. Clones de *S. cerevisiae* CENPK2 transformados com o vetores YEpGA e YEpAMY1 crescidos em meio mínimo SDA sem uracila e leucina. Após 48 horas de crescimento a 30°C, a placa foi corada com vapor de iodo. Colônias de *S. cerevisiae* CENPK2 foram transformadas com vetores YEp352PGK e YE351PGK (-)

Outra evidência do sucesso dessa transformação foi observada pela capacidade desses clones de crescerem em meio sem leucina e sem uracila. Somente os clones de *S. cerevisiae* que continham os plasmídios YEpGA e YEpAMY1 seriam capazes de crescer nesse meio.

Com o objetivo de verificar se realmente os clones de *S. cerevisiae* estavam expressando a α -amilase e a glicoamilase simultaneamente, clones de *S. cerevisiae* que estavam expressando somente a glicoamilase (Sc YEpGA), somente a amilase (Sc YEpAMY1) e as duas enzimas simultaneamente (Sc YEpGA + YEpAMY1) foram transferidos para placas com meio mínimo SDA com seus respectivos suplementos. A análise visual dos clones mostrou um maior halo de hidrólise para o clone Sc YEpGA + YEpAMY1 em relação aos clones que estavam expressando a amilase ou a glicoamilase separadamente (Figura 42A). Isso pode ser explicado por um efeito sinérgico entre as atividades de amilase e glicoamilase refletindo no crescimento celular e no tamanho do halo de hidrólise gerado. O maior halo de hidrólise gerado para o clone Sc YEpAMY1 pode ser explicado pela forte ativação do promotor *PGK*. A placa de detecção (Figura 42A) além de amido, continha glicose 2% como fontes de carbono. Como esse promotor é um gene da via glicolítica e que, embora seja constitutivo, aumenta os níveis de expressão na presença de glicose, esse clone produziu mais enzima que atuou sobre o amido, degradando-o. Outra explicação é que o amido usado no ensaio em placa parece ter uma quantidade maior de amilose em relação à amilopectina. Assim, pouca quantidade de amilase produzida seria suficiente para gerar um grande halo de hidrólise como comentado anteriormente.

Com o objetivo de verificar a eficiência de utilização do amido, esses mesmos clones foram transferidos para placas contendo apenas amido como única fonte de carbono. Em seguida as placas foram incubadas a 30°C por 84 horas. A Figura 42B mostra que apenas o clone Sc YEpGA + YEpAMY1 foi capaz de degradar o amido e, conseqüentemente, gerar um maior halo de hidrólise. Esse resultado confirma, de fato, que as duas enzimas foram expressas com sucesso em *S. cerevisiae*. Ainda, o halo de hidrólise gerado reflete um efeito sinérgico entre as duas enzimas, onde os produtos de degradação da amilase seriam utilizados pela glicoamilase, permitindo que a levedura obtenha uma fonte de carbono assimilável para o seu crescimento.

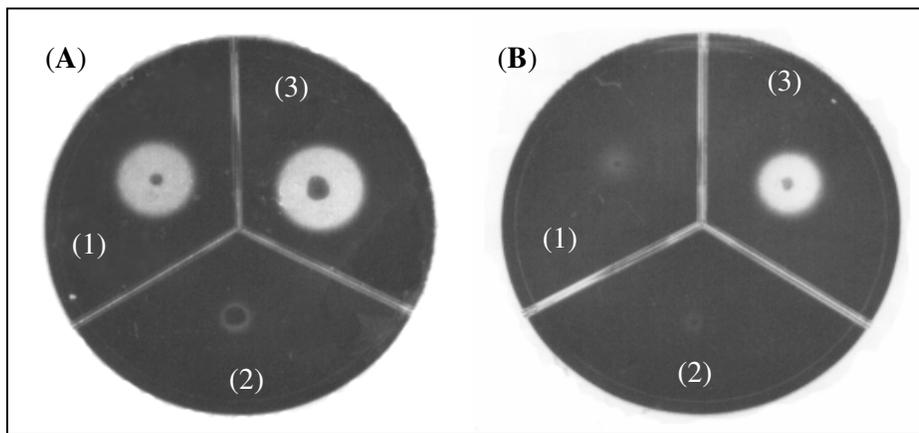


Figura 42. Atividade amilolítica em placa dos clones transformantes de *S. cerevisiae*. Clones de *S. cerevisiae* CENPK2 transformados com YEpAMY1 (1); YEpGA (2) e YEpAMY1 + YEpGA (3). Após 84h horas de crescimento a 30°C, as placas com meio mínimo SDA + glicose (A) SDA sem glicose (B) foram coradas com vapor de iodo.

12. Análise da degradação do amido dos clones recombinantes de *S. cerevisiae*.

Com o objetivo de avaliar a eficiência de utilização do amido em meio líquido SDA contendo amido como única fonte de carbono, os clones Sc YEpGA, Sc YEpAMY1 e Sc YEpGA + YEpAMY1 foram crescidos a 30°C durante 120 horas sob agitação de 200 rpm. Em intervalos de 12 horas, 2 mL da cultura foram retirados para avaliar a degradação de amido (Abs 660nm), o crescimento celular (OD 600nm), açúcares redutores (Abs 550 nm) e glicose (Abs 510 nm). Como pode ser observado na figura 43A, os clones Sc YEpGA + YEpAMY1 e Sc YEpAMY1 degradaram praticamente todo o amido do meio em 48h de crescimento e a quantidade de amido no meio não chegou a zero possivelmente pelo limite de detecção do método de dosagem de amido (Fuwa, 1954). A lenta degradação do amido pelo clone Sc YEpGA é explicada pelo modo de ação desta enzima. Como já foi explicado anteriormente, os clones que expressam amilase obtêm um decaimento brusco da coloração do complexo iodo-amido em relação ao clone Sc YEpGA. Como pode ser observado na Figura 43B o clone Sc YEpAMY1 + YEpGA cresceu melhor do que os clones que expressavam cada enzima separadamente, pois na co-expressão existe uma maior eficiência de utilização do amido em relação aos clones que expressam as enzimas separadamente. Isso pode ser explicado pela liberação de açúcares redutores e glicose no meio (Figuras 43C e D). Ao gerar açúcares redutores de pequena cadeia pela ação da amilase sobre o amido, o efeito sinérgico da glicoamilase promove a liberação de glicose no meio, sendo rapidamente assimilado pela levedura (Figuras 43C e D).

O crescimento do clone Sc YEpGA pode ser explicado pela grande liberação de glicose no meio ao longo de 120 h (Figura 43D). No entanto, dentre as construções, essa cepa produz a menor quantidade de açúcares redutores (Figura 43C). O menor crescimento observado para o clone Sc YEpAMY1 é explicado pelo fato de a amilase expressa não gerar fonte de carbono assimilável pela levedura, muito embora tenha sido liberada uma grande quantidade de açúcares redutores no meio (Figuras 43C).

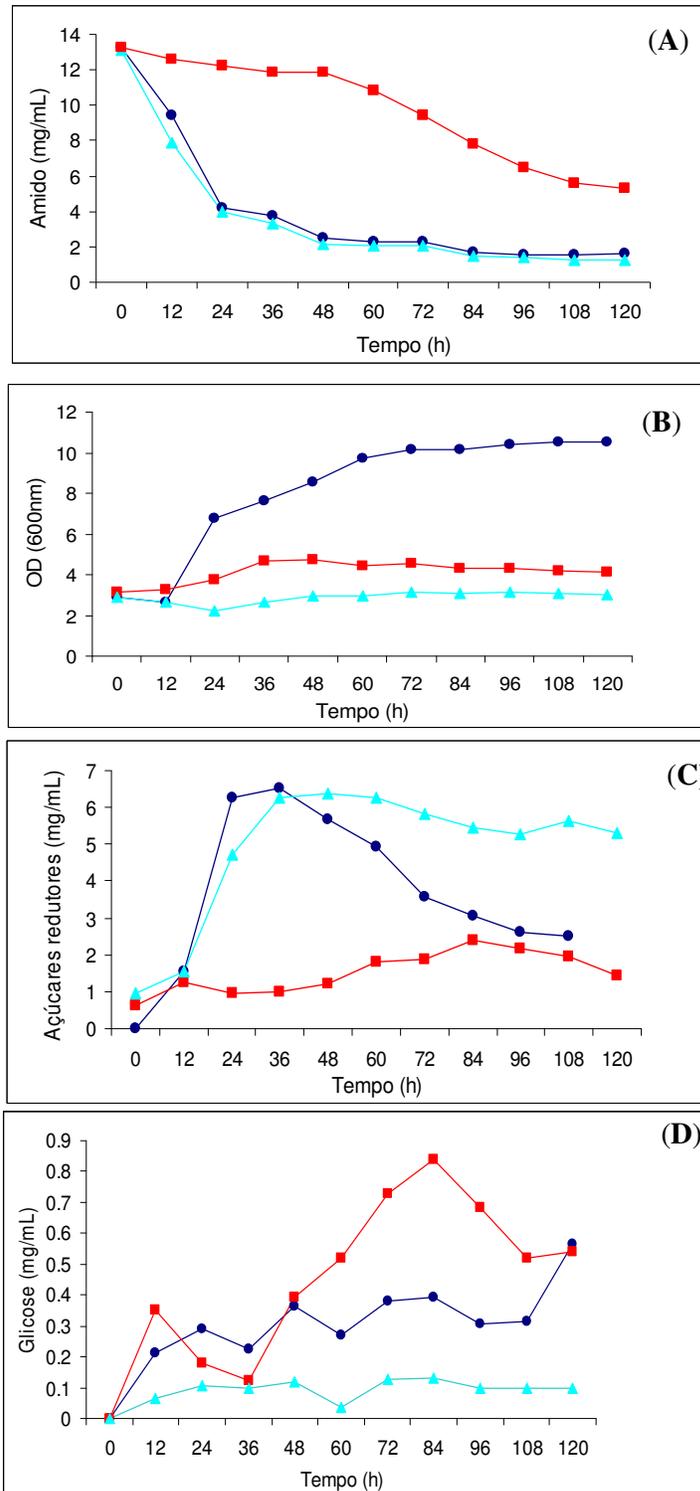


Figura 43. Análise da eficiência de utilização do amido por clones recombinantes de *S. cerevisiae* CENPK2. Clones de *S. cerevisiae* co-expressando a amilase e a glicoamilase (ScYEpAMY1 + YEpGA) (●), somente a glicoamilase (YEpGA) (■) e somente a amilase (YEpAMY1) (▲) foram crescidos em meio mínimo contendo amido com única fonte de carbono para dosagem da degradação de amido (A), crescimento celular (B), açúcares redutores (C) e glicose (D).

Além desses resultados foi realizado um ensaio qualitativo piloto utilizando um “fermentômetro” com o objetivo de verificar se o clone Sc YEpGA + YEpAMY1 era capaz de produzir etanol a partir de amido. Após 120 h de cultivo a quantidade de etanol produzida foi calculada estequiometricamente pela massa de dióxido de carbono liberada durante o processo fermentativo. Dados preliminares estimam-se que esse clone produziu cerca de 116 g/L de etanol a partir de amido. Estes resultados mostram que o clone Sc YEpGA + YEpAMY1 têm um grande potencial para produzir etanol a partir de amido como única fonte de carbono. No entanto, experimentos adicionais precisam ser realizados para verificar a produção de etanol desse clone em fermentadores.

Vários autores têm feito diferentes estratégias para construção de cepas de *S. cerevisiae* que sejam capazes de utilizar de forma mais eficiente o amido para a produção de etanol. Por exemplo, Steyn & Pretorius (1991) construíram uma cepa de *S. cerevisiae* contendo os genes da amilase de *Bacillus amiloliquefaciens* e da glicoamilase de *Saccharomyces cerevisiae* var. diastaticus que aumentou de forma sinérgica a degradação do amido quando crescida em meio contendo amido como única fonte de carbono. Moraes *et al.* (1995) construíram uma cepa de *S. cerevisiae* contendo no mesmo plasmídeo os genes da amilase de *Bacillus subtilis* e o gene da glicoamilase de *A. awamori*. O gene da amilase foi colocado sobre o controle do promotor *ADHI* enquanto o gene da glicoamilase sobre o controle do promotor *PGK*. Os autores relataram que essa levedura transformada era capaz de crescer em meio contendo amido como única fonte de carbono e usar os açúcares produzidos na degradação do amido para o crescimento celular. Janse & Pretorius (1995) construíram uma cepa de *S. cerevisiae* contendo os genes da amilase de *Bacillus amiloliquefaciens*, glicoamilase de *S. cerevisiae* var. diastaticus e pululanase de *Klebsiella pneumoniae*. Os genes da amilase e da glicoamilases foram colocados sobre o controle do promotor do microrganismo nativo enquanto que o gene da pululanase foi colocado sobre o controle do promotor *ADHI*. Esses autores afirmaram que a introdução do gene da pululanase resultou em 99% de assimilação do amido pela levedura recombinante. Murai *et al.* (1999) construíram uma cepa de *S. cerevisiae* expressando na superfície celular da levedura a amilase de *Bacillus stearothermophilus* e a glicoamilase de *Rhizopus oryzae*. Os autores observaram que a levedura transformada foi capaz de crescer em meio contendo amido como única fonte de carbono. Marin *et al.* (2001) construíram uma cepa industrial de *S. cerevisiae*

contendo o gene da amilase de *Schwanniomyces occidentalis* (SWA2). Essa cepa foi capaz de hidrolisar 95% do amido do meio em 35 horas de crescimento. Eksteen *et al.* (2003) expressaram a amilase de *Lipomyces kononenkoae* e a glicoamilase de *Saccharomycopsis* em *S. cerevisiae* sob o controle do promotor *PGK* e observaram que a levedura recombinante foi capaz de utilizar 80% do amido do meio. Ghang *et al.* (2007) construíram uma cepa de *S. cerevisiae* expressando os genes da amilase e da glicoamilase da levedura *Debaryomyces occidentalis* e mostraram que a levedura recombinante teve atividade de amilase e glicoamilase similar ao microrganismo nativo. Wong *et al.* (2007) relataram que uma cepa de *S. cerevisiae* recombinante expressando uma α -amilase mutante de cevada (AMY) e uma glicoamilase do cogumelo *lentinula edodes* tornou a levedura recombinante capaz de hidrolisar amido em uma taxa maior do que a *S. cerevisiae* expressando as enzimas separadamente.

De fato, o uso simultâneo de α -amilases e glicoamilases é uma prática comum nas indústrias, sobretudo na de etanol, como uma etapa preparatória para a utilização do amido na produção de xaropes de glicose e na produção de etanol (Van der Maarel *et al.*, 2002). Uma cepa de *S. cerevisiae* expressando amilase e glicoamilase simultaneamente poderia ser extremamente útil na indústria de etanol, pois ajudaria tanto na eliminação da etapa de sacarificação quanto na redução do custo que se tem com aplicação de enzimas exógenas.

CONCLUSÕES

- A maior produção amilolítica de *C. flavus* (~15 U/mL) se deu no meio de cultura contendo amido 2% e YNB 1,34%, sendo 24 horas o tempo ideal de crescimento celular e atividade enzimática;
- O gene *AMY1*, isolado de *C. flavus*, possui dois íntrons de tamanhos 46 e 37 pb com a versão genômica possuindo 1979 pb e cDNA 1896 pb, respectivamente;
- O cDNA correspondente ao gene da amilase de *C. flavus* (*AMY1*) foi expresso com sucesso em *S. cerevisiae* CENPK2 sendo relatado pela primeira vez na literatura a expressão de uma gene de *C. flavus* em *S. cerevisiae*;
- Amy1 apresenta 97% de identidade com a seqüência da AMY-CS2. No entanto, 13 diferenças em termos de resíduos de aminoácidos são observadas.
- As amilases nativa e recombinante foram purificadas com sucesso usando as colunas Q-Sepharose e Sephacryl obtendo um rendimento de purificação de 30% e 10%, respectivamente.
- A amilase nativa e recombinante quando tratadas com a enzima de N-deglicosilação PNGase F apresentaram a mesma massa molecular de 66 kDa, indicando que são glicosiladas;
- A amilase recombinante foi caracterizada bioquimicamente apresentando as seguintes características: pH ótimo de 5,5, temperatura ótima de 60°C, termoestabilidade a 55°C por 1h e K_m de 0,37 mg/mL;

- A amilase recombinante foi classificada como uma α -amilase típica após a análise dos produtos de hidrólise do amido, amilopectina, amilose, glicogênio e pululana em Cromatografia em Camada Delgada (TLC);
- Os genes da amilase de *C. flavus* (Amy1) e da glicoamilase de *A. awamori* (GA) foram co-expressos com sucesso em *S. cerevisiae* CENPK2.
- O clone Sc YEpAMY1 + YEpGA é capaz de crescer em meio contendo amido como única fonte de carbono melhor em relação aos clones expressando a amilase ou a glicoamilase separadamente, obtendo o crescimento máximo em 72 h de cultivo.
- Estudo preliminares usando “fermentômetros” indicam que o clone Sc YEpAMY1 + YEpGA é capaz de produzir 116g/L de etanol a partir de amido, no entanto, experimentos em fermentadores precisam ser realizados para a quantificação mais precisa da quantidade de etanol produzido.

PERSPECTIVAS

- Analisar a região promotora do gene *AMY1* a fim de que sejam estudados os mecanismos de regulação da transcrição desse gene;
- Produzir altos níveis da amilase nativa e da recombinante para estudos estruturais;
- Fazer mutações sítio-dirigida nos sítios de N-glicosilação da amilase recombinante e determinar o efeito dessas modificações na secreção e atividade enzimática;
- Fazer ensaios de O-deglicosilação nas amilases nativa e recombinante;
- Determinar o K_m da amilase nativa e da recombinante para amido, amilopectina, amilose e glicogênio;
- Otimizar as condições de cultivo do clone Sc YEpAMY1 + YEpGA visando à quantificação da produção de etanol a partir de amido;
- Clonar o gene da amilase de *C. flavus* e da glicoamilase de *A. awamori* por meio de integração no genoma de uma cepa industrial de *S. cerevisiae* e comparar os níveis de etanol produzido entre as cepas industrial e de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aehle W & Misset O (1999) Enzymes for industrial applications. In: Rehm, H.J., Reed, G., editors. *Biotechnology*, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH, 1999: 189-216.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-410.
- Antoni D, Zverlov VV & Schwarz WH (2007) Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (1): 23-35.
- Azevedo MO, Felipe MSS, Brigido MM, Maranhão AQ & Souza MT (2003) Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Brasília: Editora Universidade de Brasília.
- Bai FW, Anderson WA & Moo-Yong (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv* 26(1): 89-105.
- Ballschmiter M, Fütterer O & Liebl W (2006) Identification and characterization of a novel alkaline α -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol* 72 (3): 2206-11.
- Bernfeld P (1955) Amylases α and β . *Meth Enzymol* 1: 149-158.
- Bertoldo C & Antranikian G (2002) Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic Archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 6(2): 151-160.
- Bhella RS & Altosaar I (1985) Purification and some properties of the extracellular α -amylase from *Aspergillus awamori*. *Can J Microbiol* 31: 149-153.
- Blum H, Bier H & Gross H (1987) Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bradford MMA (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Brandão GO (1996) Expressão heteróloga do cDNA da Celobiohidrolase (cbhI.1) do fungo *Phanerochaete crhysosporium* em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- Buléon A, Colonna P, Planchot V & Ball S (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 23 (2): 85 – 112.
- Calsing RA (2005) O protocolo de Quioto e o Direito ao Desenvolvimento Sustentável. Disponível em <http://ftp.mct.gov.br/legis/consultoria_juridica/artigos/protocolo_quioto.htm> Acesso em: 26.1.08.
- Camacho K (2007) Montadoras batem recorde de produção, vendas e carro flex. Disponível em <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u302471.shtml>>. Acesso em: 22.1.08.
- Carlsen M & Nielsen J (2001) Influence of carbon source on α -amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57(3): 346-349.
- Chary SJ & Reddy SM (1985) Starch degrading enzymes of two species of *Fusarium*. *Folia Microbiol* 30(5): 452-457.
- Chen DC, Yang BC & Kuo TT (1992) One-Step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* 21(1): 83-84.
- Chung YC, Kobayashi T, Kanai H, Akiba T & Kudo T (1995) Purification and Properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. *Appl Environ Microbiol* 61(4):1502-1506.
- Cohen SN, Chang ACY & Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69(8): 2110-2114.

- Coutinho PM & Henrissat B (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. *Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation* (Ohmiya K, Hayashi K, Sakka K, Kobayashi Y, Karita S & Kimura T, eds), pp. 15–23. UniPublishers Company, Tokyo.
- Da Lage JL, Feller G & Janeček S (2004) Horizontal gene transfer from Eukarya to Bacteria and domain shuffling: the α -amylase model. *Cell Mol Life Sci* 61(1): 97-109.
- Dalmia BK & Nikolov ZL (1994) Characterization of a β -galactosidase fusion protein containing the starch-binding domain of *Aspergillus* glucoamylase. *Enzyme Microb Technol* 16: 18-23.
- De Mot R & Verachtert H (1986) Secretion of α -amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. *Can J Microbiol* 32: 47-51.
- De Mot R & Verachtert H (1987) Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamilase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. *Eur J Biochem* 164: 643-654.
- Demain AL, Newcomb M & Wu JH (2005) Cellulase, Clostridia and Ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (1): 124-154.
- Eksteen JM, Van Rensburg P, Cordero Otero RR & Pretorius IS (2003) Starch fermentation by recombinant *saccharomyces cerevisiae* strains expressing the alpha-amylase and glucoamylase genes from *lipomyces kononenkoae* and *saccharomycopsis fibuligera*. *Biotechnol Bioeng* 84(6):639-646.
- Errat JA, Douglas PE, Moranelli F & Seligy VL (1984) The induction of α -amylase by starch in *Aspergillus oryzae*: evidence for controlled mRNA expression. *Can J Biochem Cell Biol* 62(8): 678-90.

- Ertan F, Yagar H & Balkan B (2007) Optimization of alpha-amylase immobilization in calcium alginate beads. *Prep Biochem Biotechnol* 37(3): 195-204.
- Farrel AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'Hare M & Kammen DM (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* 311(5760): 506-508.
- Fernandez-Espinar MT, Pena JL, Pinaga F & Valles S (1994) Alpha-L-arabinofuranosidase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol lett* 115 (1):1007-12.
- Fogarty WM & Kelly CT (1980) Economic microbiology *In*: Rose, A.H, editor. *Microb enzym Bioconv* 5. London: Academic Press, pp.115-70.
- Fraenkel DG (1982) Carbohydrate metabolism *In* The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression, Strathern JN, Jones EW, Broach JR (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY; 1-37.
- Frandsen TP, Christensen T, Stoffer B, Lehmbeck J, Dupont C, Honzatko RB & Svensson B (1995) Mutational analysis of the roles in catalysis and substrate recognition of arginines 54 and 305, aspartic acid 309 and tryptophan 317 located at subsite 1 and 2 in glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 34(32): 10162-10169.
- Freer SN (1993) Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl Environ Microbiol* 1398-1402.
- Fungaro MHP & Junior WM (2002) Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos. Em: Melo IS, Inglis-Valadares, Nass LL, Valois ACC (Eds) (2002) Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 743p.
- Fuwa H (1954) A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J Biochem* 4: 583-603.

- Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri KM, Sukumar RK & Pandey A (2007) Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* (*in press*).
- Gellissen G & Hollenberg CP (1997) Applications of yeast in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene* 190(1): 87-97.
- Ghang DM, Yu Li, Lim MH, Ko HM, Im SY, Lee HB & Bai S (2007) Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and α -amylase genes from *Debaryomyces occidentalis*. *Biotechnol Lett* 29(8): 1203-1208.
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K & Andre B *et al* (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418(6896): 387–391.
- Glymph JL & Stutzenberger FJ (1977) Production, purification and characterization of α -amylase from *Thermomonospora curva*. *Appl Environ Microbiol* 34 (4): 391-397
- Goldenberg J (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science* 315: 808-810.
- Goldstein AL & McCusker JH (2001) Development of *Saccharomyces cerevisiae* as a model pathogen. A system for the genetic identification of gene products required for survival in the mammalian host environment. *Genetics* 159(2): 499-513.
- Gray KA, Zhao L & Emptage M (2006) Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol* 10: 141-146.
- Grootegoed JA, Lauwers AM & Heinen W (1973) Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. *Arch Mikrobiol* 90(3): 223-232
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK & Chauhan B (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Proc Biochem* 38: 1599-1616.

- Henrissat B & Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316: 695-696.
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280: 309-316.
- Herskowitz I, Rine J & Strathern J (1992) in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, eds. Jones, E. W., Pringle, J. R. & Broach, J. R. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY,2:583–657.
- Herzog AL (2007) O lado bom do aquecimento global. Disponível em <http://portalexame.abril.com.br/static/aberto/gbcc/edicoes_2007/m0144135.html> Acesso em: 21.1.08.
- Holland MJ & Holland JP (1978) Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 17: 4900–4907.
- Hoover R (2001) Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review *Carbohydr Polym* 45: 253-267
- Iefuji H, Chino M, Kato M & Iimura Y (1996) Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, cloning and sequencing. *Biochem J* 318: 989-996.
- Ilori MO, Amund OO & Omidui O (1997) Purification and Properties of an α -amylase produced by a cassava-fermenting strain of *Micrococcus luteus*. *Folia Microbiol* 42(5): 445-449.
- Imberty A, Chanzy H, Pérez S, Buléon A & Tran V (1988) The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *J Mol Biol* 201(2):365-378.

- Ingledeu WM (1987) *Schwanniomyces* – a potential superyeast? *Crit Rev Biotechnol* 5: 159-176.
- Inohara-Ochiai M, Nakayama T, Goto R, Nakao M, Ueda T & Shibano Y (1997) Altering Substrate Specificity of *Bacillus* sp. SAM1606 α -Glucosidase by Comparative Site-specific mutagenesis. *J Biol Chem* 272: 1601-1607.
- Ishikawa K, Matsui I, Honda K & Nakatani H (1992) Multi-functional roles of a histidine residue in human pancreatic α -amylase. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 286-291.
- Ishikawa K, Matsui I, Kobayashi S, Nakatani H & Honda K (1993) Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic alpha-amylase. *Biochemistry* 32: 6259-6265.
- Janeček S (1997) α -Amylase family: Molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol* 67: 67-97.
- Janeček S, Lévêque E & Haye B (1999) Close evolutionary relatedness of α -amylases from archaea and plants. *J Mol Evol* 48: 421–426.
- Janse BJ & Pretorius IS (1995) One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing alpha-amylase, glucoamylase and pullulanase. *Appl Microbiol Biotechnol* 42(6) 878-83.
- Jonhston M & Carlson M (1992) "Regulation of carbon and phosphate utilization" in *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces* Vol. 2, Gene Expression, pages 193-281, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kaneko A, Sudo S, Takaya SY, Tamura G, Ishikawa T, Oba TJ (1996) Molecular cloning and determination of nucleotide sequence of a gene encoding an acid stable α -amylase from *Aspergillus kawachii*. *J Ferment Bioeng* 81: 292-8.

- Kang HK, Lee JH, Kim D, Day DF, Robyt JF, Park KH & Moon TW (2004) Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* α -amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMS Microbiol Lett* 233: 53-64.
- Kang NY, Park JN, Chin JE, Lee HB, Im SY & Bai S (2003) Construction of an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene. *Biotechnol Lett* 25(21): 1847-1851.
- Khaw TS, Katakura Y, Koh J, Kondo A, Ueda M & Shioya S (2005) Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains for direct ethanol production from raw starch. *Appl Microbiol Biotechnol* 70(5): 573-579.
- Khoo SL, Amirul AA, Kamaruzanan M, Nazalan N & Azizan MN (1994) Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol (Praha)* 39 (5): 392-8.
- Kingsman SM & Kingsman AJ (1988) Genetic Engineering: an Introduction to Gene Analysis and Exploitation in Eukaryotes, Blackwell Scientific Publications.
- Kingsman SM, Kingsman AJ, Dobson MJ, Mellor J & Roberts NA (1985) Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Gen Eng Rev* 3:377- 416.
- Krishna C (2005) Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit Rev Biotechnol* 25(1-2): 1-30.
- Kuhn AN & Käufer NF (2003) Pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 42: 241-251.
- Kunamneni A, Permaul K & Singh S (2005) Amylase production in solid state fermentation by the thermophilus fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J Biosci Bioeng* 100(2) 168-171.

- Lachmund A, Urmann U, Minol K, Wirsén S & Ruttkowski E (1993) Regulation of α -amylase formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. *Curr Microbiol* 26: 47-51.
- Lacks SA & Springhorn SS (1980) Renaturation of enzymes after polyacrilamide gel eletrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J Biol Chem* 255:7467-7473.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lage J (2006) Gasolina terá menos álcool por "período longo". Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u105635.shtml>> Acesso em 26.1.08.
- Lee JT, Kanai H, Kobayashi T, Akiba T & Kudo T (1996) Cloning, nucleotide sequence, and hyperexpression of α -amylase gene from an archaeon, *Thermococcus profundus*. *J Ferment Bioeng* 82: 432-438.
- Lehninger AL, Nelson DL & Cox MM (2002) Princípios de bioquímica. 4a edição. Editora Savier, São Paulo. 975p.
- Leite RCC (2005) Biomassa, a esperança verde para poucos. Disponível em: <http://agenciact.mct.gov.br/index.php?action=/content/view&cod_objeto=23858> Acesso em: 26.1.08.
- Lemos JLS, Fontes MCA & Pereira NJ (2001) Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. *Appl Biochem Biotechnol* 91-93:681-689.
- Lemos CMY, Fuchs E, Gomes E & Da Silva R (2003) Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Edição n:º 31 – julho/ dezembro.

- Li H, Chi Z, Wang Z, Duan X, Ma L & Gao L (2007) Purification and characterization of extracellular amylase from marine yeast *Aureobasidium pullulans* Nd13 and its raw potato starch digestion. *Enz Microbiol Technol* 40: 1006-1012
- Lin LL, Chyau CC & Hsu WH (1998) Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotech App Biocheml* 28: 61-68.
- Lin Y & Tanaka S (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69 (6): 627-642.
- Liu R & Shen F (2008) Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresour Technol* 99: 847-854.
- Liu YH, Lu FP, Li Y, Yin XB, Wang Y & Gao C (2008) Characterisation of mutagenised acid-resistant alpha-amylase expressed in *Bacillus subtilis* WB600. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(1): 85-94
- Lo HF, Lin LL, Chiang WY, Chie MC, Hsu WH & Chang CT (2002) Deletion analysis of the C-terminal region of the α -amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23. *Arch Microbiol* 178(2):115–123.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira O, Baltimore D & Darnel JE (2001) *Molecular Cell Biology*. 4th ed. 415-417
- Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J *et al* (2005) Genome of the Basidiomycetous Yeast and Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307: 1321-1324.
- Lonsane BK & Ramesh MV (1990) Production of bacterial thermostable α -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *Adv Appl Microbiol* 35: 1-56

- MacGregor EA, Janecek S & Svensson B (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1549(1): 1-20.
- Machovič M & Janeček S (2006) Starch-binding domains in the post-genome era. *Cell Mol Life Sci* 63(23): 2710–2724.
- Machovič M & Janeček S (2006) The evolution of putative starch-binding domains. *FEBS Letters* 580(27): 6349-6356.
- Machovič M, Svensson B, MacGregor EA & Janeček S (2005) A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch binding domains from families CBM20 and CBM21. *FEBS J* 272(21): 5497–5513.
- Marco JL, Bataus LA, Valencia FF, Ulhoa CJ, Astolfi-Filho S & Felix CR (1996) Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* alpha-amylase produced by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 44 (6):746-52.
- Marín AD, Jiménez MA & Lobato F (2001) Construction of an efficient amylolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively derived from yeast. *FEMS Microbiol Lett* 201(2): 249-253.
- Marmo L (2007) EU strategies and policies on soil and waste management to offset green house gas emission. *Waste Manag (in press)*
- Mijts BN & Patel BKC (2002) Cloning, sequencing and expression of an α -amylase gene, *AmyA*, from the thermophilic halophile *Halothermotrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* 148: 2343-2349.
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31(3): 426-428.

Ministério da Ciência e da Tecnologia. Status atual das atividades de projeto do MDL no Brasil e no mundo. Disponível em <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/30317.html>> Acesso em: 21.1.2008.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Senadores dos EUA conhecem produção brasileira de etanol. Disponível em <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/noticia.php?area=1¬icia=6945>> Acesso em: 21.1.2008.

Moraes LMP, Astolfi-filho S & Oliver SG (1995) Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 43(6): 1067-1076.

Moraes LMP, Astolfi-filho S & Ulhoa CJ (1999) Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 15: 561-564.

Moranelli F, Yaguchi M, Calleja B & Nasim A (1987) Purification and characterization of the extracellular α -amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem Cell Biol* 65: 899 – 907.

Morkeberg R, Carlsen M & Neilsen J (1995) Induction and repression of α -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology* 141: 2449-2454.

Murai T, Ueda M, Shibasaki Y, Kamasawa N, Osumi M, Imanaka T & Tanaka A (1999) Development of an arming yeast strain for efficient utilization of starch by co-display of sequential amylolytic enzymes on the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol* 51(1): 65 -70.

- Murakami S, Nishimoto H, Toyama Y, Shimamoto E, Takenaka S, Kaulpiboon J, Prousoontorn M, Limpaseni T, Pongsawasdi P & Aoki K (2007) Purification and characterization of two alkaline, thermotolerant α -amylases from *Bacillus halodurans* 38C-2-1 and Expression of the cloned gene in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71 (10): 2393-2401.
- Myers AM, Morell MK, James MG & Ball SG (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122(4): 989-997.
- Nagarajan DR, Rajagopalan G & Krishnan C (2006) Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming alpha-amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103. *Appl Microbiol Biotechnol* 73(3): 591-597.
- Nieto A, Prieto JA & Sanz P (1999) Stable high-copy-number integration of *Aspergillus oryzae* α -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol Prog* 15(3): 459-466.
- Norouzian D, Akbarzadeh A, Scharer JM & Young MM (2006) Fungal glucoamylases. *Biotechnol Adv* 24(1): 80-85.
- Orellana C & Neto RB (2006) Brazil and Japan give fuel to ethanol market. *Nat Biotechnol* 24 (3): 232.
- Ostergaard S, Olsson L & Nielsen J (2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Molec Biol Rev* 64(1):34-50.
- Pandersen, H & Nielsen J (2000) The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 278-281.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D & Mohan R (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 31(2): 135-152.

- Parachin NS (2006) Atividade xilanolítica em *Cryptococcus flavus*: Perfil de xilanases secretadas, Clonagem e Expressão de um dos genes (cfXYN1) em *S. cerevisiae*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.
- Pereira SE (2002) Imobilização e caracterização de α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás.
- Portal Única (2007) Conab prevê maior produção de açúcar e álcool .Disponível em<<http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=UNICA%20em%20açã&SubSecao=cana-de-açúcar&SubSubSecao=banco%20de%20notícias&id=%20and%20id=1658>> Acesso em: 21.1.08
- Prieto JA, Bort BR, Martinez J, Randez-Gil F, Buesa C & Sanz P (1995) Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochem Cell Biol* 73: 41 – 49.
- Ragunathan R & Swaminathan K (2005) Growth and amylase production by *Aspergillus oryzae* during solid state fermentation using banana waste as substrate. *J Environ Biol* 26 (4): 653-656.
- Ramada MHS (2007) Purificação e caracterização da α -amilase de *Cryptococcus flavus* após crescimento em meio com tunicamicina. Monografia. Universidade Federal de Goiás.
- Ramesh HP & Tharanathan RN (2003) Carbohydrates: The renewable raw materials of high biotechnological value. *Crit Rev Biotechnol* 23(2): 149-73.
- Ramirez-Zavala B, Mercado-Flores Y, Hernandez-Rodriguez C & Villa-Tanaca L (2004) Purification and characterization of lysine aminopeptidase from *Kluyveromces marxianus*. *FEMS microbiol lett* 235: 369-75.
- Ratanakhanokchai K, Kaneko J, Kamio Y & Izaki K (1992) Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Appl Environ Microbiol* 58(8): 2490-2494.

RCSB PDB Protein Data Bank. An information Portal to Biological Macromolar Structures. Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=7TAA>> Acesso em: 22.1.08.

Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N & Sánchez S (2005) Microbial Starch-binding domain. *Curr Opin Microbiol* 8(3): 260-267.

Romanos MA, Scorer CA & Clare JJ (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review" *Yeast* 8:423-488.

Sambrook J & Russel DW (2001) Molecular cloning: A laboratory Manual 3^a Ed.

Sánchez OJ & Cardona CA (2007) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* (in press).

Sato F, Okuyama M, Nakai H, Mori H, Kimura A & Chiba S (2005) Glucoamylase originating from *Schwanniomyces occidentalis* is a typical alpha-glucosidase. *Biosci Biotechnology Biochem* 69 (10): 1905-1913.

Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, Frandsen TP, Mirgorodskaya E, Harrison M, Roepstorff P & Svensson B (2000) Glucoamylase: structure/function relationship and protein engineering. *Biochim Biophys Acta* 1543(2): 275 –293.

Saville BA, Huang C, Yacyshyn V & Desbarats A (2006) Properties and performance of glucoamylases for fuel ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol* 129-132: 180-194.

Saxena RK, Dutt K, Agarwal L & Nayyar P (2007) A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresour Technol* 98(2): 260-265.

- Shoji H, Sugimoto, T, Hosoi K, Shibata K, Tanabe M & Kawatsura K (2007) Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable α -amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* NBRC4308. *J Biosci Bioeng* 103 (2): 203-205.
- Søgaard M, Kadziola A, Haser R & Svensson B (1993b) Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley alpha-amylase 1. *J Biol Chem* 268: 22480-4
- Soni SK, Sandhu IK, Bath KS, Banerjee UC & Patnaik PR (1996) Extracellular amylase production by *Saccharomycopsis capsularis* and its evaluation for starch saccharification. *Folia Microbiol (Praha)* 41(3): 243-8.
- Spencer JFT & Spencer DM (1997) Yeasts in natural and artificial habitats. 1a edição. Editora Springer-Verlag, Berlim Heidelberg. 380 p
- Steyn AJC & Pretorius IS (1990) Expression and secretion of amylolytic enzymes by *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Varia* 5: 76-126
- Steyn AJC & Pretorius IS (1991) Co-expression of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase-encoding gene and a *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 100: 85-93.
- Steyn AJC, Marmur J & Pretorius IS (1996) Cloning mapping and characterization of a genomic copy of the *Lipomyces kononenkoae* α -amylase-encoding gene (LKA1) *Yeast* 12: 925-937.
- Streatfield SJ, Roberts CF (1993) Disruption of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK*) in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 23: 123-128.
- Swain MR & Ray RC (2007) Alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* CM3 in solid state fermentation using cassava fibrous residue. *J Basic Microbiol* 47(5): 417-425.

- Takase K (1992) Interaction of catalytic-site mutants of *Bacillus subtilis* alpha-amylase with substrates and acarbose. *Biochim Biophys Acta* 1122: 278-282.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-4680.
- Tsuyoshi N, Fudou R, Yamanaka S, Kozaki M, Tamano N, Thapa S & Tamang JP (2005) Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *Int J Food Microbiol* 99(2): 135-146.
- Tuite MF, Dobson MJ, Roberts NA, King RM, Burke DC, Kingsman SM & Kingsman AJ (1982) Regulated high-efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1: 603-608.
- Uguru G, Robb D & Sani A (1997) Purification, characterization and mutagenic enhancement of a thermoactive α -amylase from *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:273-279.
- Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H & Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol* 94(2): 137-155.
- Vihinen M & Mäntsälä P (1989) Microbial amylolytic enzymes. (1989). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 24(4): 329-418.
- Vihinen M, Ollikka P, Niskanen J, Meyer P, Suominen I, Karp M, Holm L, Knowles J & Mäntsälä P (1990) Site-directed mutagenesis of a thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. *J Biochem* 107: 267-272.

- Wanderley KJ, Torres FAG, Moraes LMP & Ulhoa CJ (2004) Biochemical characterization of α -amylase from yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol Lett*, 231(2): 165-169.
- Wilson JJ & Ingledew WM (1982) Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol* 44: 301-307.
- Wirsel W, Lachmund A, Wildhardt G & Ruttowski E (1989) Three α -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical introns-exon organization. *Mol Microbiol* 3: 3-14.
- Wong DW, Robertson GH, Lee CC & Wagschal K (2007) Synergistic action of recombinant alpha-amylase and glucoamylase on the hydrolysis of starch granules. *Protein J* 26(3) 159-64.
- Woolford JL (1989) Yeast pre-mRNA splicing. *Yeast* 5: 439-457.
- Yabuki M, Ono N, Hoshino K & Fukui S (1977) Rapid induction of α -amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 34(1): 1-6.
- Yáñez E, Carmona TA, Tiemblo M, Jimenez A & Fernández-Lobato M (1998) Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochem J* 329: 65-71.
- Zhang JW & Zeng RY (2007) Purification and Characterization of a Cold-Adapted alpha-Amylase Produced by *Nocardopsis* sp. 7326 Isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Mar Biotechnol* (in press).

ANEXO 1

Alinhamento entre os genes *AMY1* e *amy-CS2*

```

AMY1      1      - CFAMY5                               - CFSP5
amy-CS2   1      ATGGCTCCTGTCGCTCCCTAGCTGGGGCCCTGCTCGCCTCTCTAGGACTGGTCGCTGGCCTGTCTCCAGCCGAATGGCGAAGCCAGTCCATCTACCAGGTGGTCACCGA
AMY1      111     CCGCTTTGCGCTCGACAATGGCGGAAACTCGCCTTCTTGCTCGGGTCAAAGC SacI                               - CFAMYSEQ5
amy-CS2   111     CCGCTTTGCGCTCGACAATGGCGGCAACTCCCTTCTTGCTCAGGACAGACT SacI BamHI CF5
AMY1      221     TCCAGAACATGGGCTTCACCGCCATCTGGATCTCGCCCTGGTCAAGAACATCGACGGTGGCTCACCTAATGGCTACACGGCTGAC BamHI CF5
amy-CS2   221     TCCAGAACATGGGCTTCACCTGCCATTGGATCTCGCCCTAGTCAAGAACATCGATGGGGCTCGCCTAACGGATACACGCCCGAC BamHI CF5
AMY1      331     GCTCAGGACATCTACGAGATCAACCCACACTTCGGCGGAGCGTCAGGTCTGACCGACCTGTGAAACGCTTTGCACAACCGGGCATGTACTTGATGGTGGACGTTGTGCT
amy-CS2   331     GCTCAGGACATCTACGAGATCAACCCCACTTCGGCGGGGCGTCAGGCTGACCGACCTGTCAAACGCTTTGCATAGCCGAGGCATGTACTTGATGGTGGACGTCGCTGT
AMY1      441     CAACCATATGGCTACTACTGCGGCACCAATGGCGGATGCGGTCCCGCAACTCGTCAACTACGGATCGTTACGCTTTCAACAGCGAGTCATACTTCCACCCGTTCT
amy-CS2   441     CAACCCACATGGCTACTACTGCGGTACCGATGCGGATGCGGTCTGCAACTCGGTCAACTACGGATCGTTACGCTTTCAACAGCGAGTCATACTTCCACCCGTTCT
AMY1      551     GCGAGATCGATTACAACAACCGCACGACATCTCGACTGCTGGGAGGTTGACGAGATCGTGCCGCTCGTCACTCCGGACAGGAGACTCGGACGTCAGTCCATCTTC
amy-CS2   551     GCGAGATCGACTACAACAACCGCACGACATCTCGATTTGCTGGGAGGTTGACGAGATCGTGCCGCTCGTCACTCCGGACCGAGGACTCGGACGTCAGTCCATCTTC
AMY1      661     AACTCGTGGATCAGCAACTTGATCCAGACGTACAACATCGACGGCTCCGGATAGACTCGTCCAGCAGTCTGGCTCCTTCTTCCCGGGTTCAACCAGGCCGCGG
amy-CS2   661     AACTCGTGGATCAGCAACTTGATCCAGACGTACAACATTTGACGGCTCGCAATCGACTCGTCCAGCAGTCCGGCTCCTTCTTCCCGGGTTCAACCAGGCCGCGG
AMY1      771     CGGCATGTATATGGTCCGGAGGTTCTCAACCGCAACCCGCTACGCTGTCCTTACCAGCAGGCTGGCATGCCAGGTGTCCTCAACTACCCATgtgagcttctgctgc
amy-CS2   771     TGGCATGTACATGGTCCGGAGGTTCTTAAACCGCAGCCCGCTACGCTGTCCTTACCAGCAAGCTGGCATGCCGGGCTCCTCAACTACCCATgtgagcttctgctgc
AMY1      881     ggcagccgatgagactacagctcaaggtaagGTTCTTCTACATCAACATGCTTCCAGACCTCGTCTGGCAGCATGAGCCAGTCTCGTCCAGGAAATTCGGCCATGCA
amy-CS2   881     ggcagccgatgagactacagctcaaggtaagGTTTTCTACATTACCAATGCTTCCAGACCTCGTCCGGCAGCATGAGCCAGTCTCGTCCAGGTAATTCGGCCATGCA
- CFAMYSEQ3
AMY1      991     ATCTGACTGCTCGGACACAACGCTCTCGGAAGgtaagt---cttg-----cttggggactctagctcataa--gacagCTTCTTGGAGAACCAGGACAACCC
amy-CS2   991     GTCTGACTGCTCGGACACAACGCTCTTGGGAGgtaagttaactttcgatatacgggttctatgcccagtgctgatagtgcccagCTTCTTGGAGAACCAGGACAACCC
AMY1      1085    ACGCTTCCCCAGTCAGACGAAACGACCTAACCCGTGCTCAGAACCGGATCGCCTTACCATGCTGCAGGACGGTATCCCATCACCTACTACGGCCAGAGCAGCACCTGT
amy-CS2   1101    ACGTTTCCCCAGTCAAACGAGCGACCTCACTCGTGTCTCAGAACGCTATCGCCTTACCATGCTTCCAGGACGGTATCCCATCACCTACTACGGTCAGGAGCAGCACCTCT
- CF3
AMY1      1195    CCGGCTCTGGCGTCCCTTAAACCGAGAGGCGCTGTGGACGTCGGGCGGATACGACTCTCGTCCGCTGTACAAGATGATTACGACGCGTGAACCGCTGAGAACGCTC
amy-CS2   1211    CCGGCTCAGGCGTCCCTCTCAACCGAGAGGCACTGTGGACGTCGGGCGGATACGACACTCGTCCGCTGTACGAGATGATCACGACCGTGAACCGCTGAGGAGCGCTC
AMY1      1305    GCGATCAAGCAGAACGGCGGCTTTGTGACCTACAAGATCCAGTGCATACCGACTCGAACCATATCGTCAAGCAGGCGAACTCGGGCTACAGATTGTGCGGCT
amy-CS2   1321    GCGATCAAGCAGAACGGCGGCTTTGTGACCTACAAGATTCAGTGCATACCGACTCGAACCATATGTCACGCGCAAGGCGAACTCGGGCTACAGATTGTGCGGCT
AMY1      1415    CTACACCAACGTCGGCTCCGCTGGCGGCTTCAACCTTATCCCTCTCTCTCGTCCGAGACCGGTTCCAGGCTCTGAACCGGTCATGGAGCTCTGTCTGCACGCTGT
amy-CS2   1431    CTACACCAACGTCGGCTCCGCGGGTCTTTCGACCTTGTCAATCTCTCTCGTCCGAGACCGGTTCCAGGCTCCGAGCAGGCTGATGGAGCTCTGTCTGCACGCTGT
AMY1      1525    ACCATACTGCTAGTGACGGGAGCCTGTCACTCACCATGACTGGGGCTGCCCCGAGTCTTCTACAACGCCACGGCCCTGGCCGAGAGCAGTCTCTGCACAACCTACAGG
amy-CS2   1541    ACCATAACGGTACTGACGGTAGCCTATCTTCCACCATGACTGGGGCTGCCCCGAGTCTTCTACAACGCCACGGCCCTGGCCGAGAGCAGTCTCTGCACAACCTACAGG
AMY1      1635    ACGGCGACCCCGCGCTGGCGGCTGCTCCGCGGCACTGTGGTGTTCGACGCTATGTCCAGACGACGATACGGCCAGAGCGTCTATCGCGGTAACATCCCCAGCT
amy-CS2   1651    ACGGCGTCCCGCGCTGGCGGCTGCTCCGCGGTACTGTCTGTTCGACGCTCTACGTGACACAGTACGGCCAGAGCGTGGTCTATCGCGGCAACATCCCCAGCT
AMY1      1745    CGGCAACTGGAGCCCGGCAACGGCTTGAACCTCAACGCAAAACAGTACACGGCATCAGACCCCAAGTGGACCGGACCATCACCGGCTGCACCCGGTACCAGCTTCC
amy-CS2   1761    CGGCAACTGGAGTCCGGCAACGGCTTGAACCTCAACGCAAAACAGTACACGGCATCAAGCCCAAGTGGACCGGAAACCATCACCGGTTGGCCCCGGCACCGCTTCC
- CFAMY3
AMY1      1855    AGTGAAGCCCATCGTCTGTTACCAATGGTAATGACAACCTGGTACACTGGCAGCAACCGACGGCCACGACGGGTTCCGGCTGTAGCTCGCCCCGACGATATCGAGTTT
amy-CS2   1871    AGTGAAGCCCATCGTCTGTTACCAACGGTAATGACAACCTGGTACCCCGGCAACACGACGGCCACGACGGGTTCCGGCTGTAGCTCGCCCCGCGGACATCGAGTTT
AMY1      1965    ACGTGGTCTCTCTAG
amy-CS2   1981    ACGTGGTCTCTCTAG

```

Alinhamento entre os genes *AMY1* e *amy-CS2*. A posição dos *primers* usados para amplificar e sequenciar o gene *AMY1* estão representados por caixas em cinza. O sítio de *SacI* e *BamHI* usado para confirmação da clonagem do gene *AMY1* no YEp351PGK estão representados por caixas em verde e amarelo, respectivamente. Os introns estão representados por letras minúsculas em azul.

ANEXO 2

Seqüência de nucleotídeos de *AMY1* depositada no GenBank

LOCUS EU014874 1979 bp DNA linear PLN 25-FEB-2008
 DEFINITION *Cryptococcus flavus* alpha-amylase (AMY1) gene, complete cds.
 ACCESSION EU014874
 VERSION EU014874.1 GI:154354702
 KEYWORDS .
 SOURCE *Cryptococcus flavus*
 ORGANISM [Cryptococcus flavus](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
 Tremellomycetes; Tremellales; mitosporic Tremellales; *Cryptococcus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1979)
 AUTHORS Galdino,A.S., Ulhoa,C.J., Moraes,L.M.P., Prates,M.V., Bloch,C. Jr.
 and Torres,F.A.G.
 TITLE Cloning, molecular characterization and heterologous expression of
 AMY1, an alpha-amylase gene from *Cryptococcus flavus*
 JOURNAL FEMS Microbiol. Lett. 280 (2), 189-194 (2008)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1979)
 AUTHORS Galdino,A.S., Ulhoa,C.J., Moraes,L.M.P. and Torres,F.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-JUL-2007) Biologia Celular, Universidade de Brasilia,
 Campus Darcy Ribeiro, Brasilia, DF 70910-900, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1979
 /organism="Cryptococcus flavus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:[5416](#)"
[gene](#) <1..>1979
 /gene="AMY1"
[mRNA](#) join(<1..866,913..1023,1061..>1979)
 /gene="AMY1"
 /product="alpha-amylase"
[CDS](#) join(1..866,913..1023,1061..1979)
 /gene="AMY1"
 /EC_number="[3.2.1.1](#)"
 /codon_start=1
 /product="alpha-amylase"
 /protein_id="[ABS76467.1](#)"
 /db_xref="GI:154354703"
 /translation="MAPVRS LAGALLASLGLVAGLSPA EWRSQSIYQVVTDRFALDNG
 GNSPSCSQSELNLYCNGTFAGI IDKLDYIQNMGFTAIWISPVVKNIDGGSPNGYTPD
 GSAYHGYWAQDIYEINPHFGGASGLTDL SNALHNRGMYLMVDVVVNHMAYYCGTNGGC
 GPGNSVNYGSFTPFNSESYFHPFCEIDYNNRTSILDCWEGDEIVPLVDLRTEDSDVQS
 IFNSWISNLIQTYNIDGLRIDSLQQSGSFFFPGFNQAAGGMYMVGVEVFN GNPSYVCPY
 QQAGMPGVLNYPMFFYITNAFQTSSGMSQLAQGISAMQSDCSDTTLG SFLENQDNP
 RFPSQTNDLTRAQNAIAFTMLQDGIPITYYGQEQHLSGSGVPLNREALWTSGGYDSSS
 PLYKMITTVNQLRTLAIKQNGGFVYKIQVPYTD SNHIVTRKGN SGYQIVGVYTNVGS
 AGASSTLSLSSSETGFQASEPVMDVLSCTLYHTGSDGSLSF TMTGGLPRVFNATALA
 ESSLCTTYTTATPPP GGCSAGTVVFDVYVQTQYQSVVIAGNIPQLGNWSPANGLNLN
 ANQYTASSPKWTGTITGVAPGTT FQWKPIVVTNGNDN WYTGSNQQATTGSACSSPATD
 IEFWSS"

ORIGIN

1 atggctcctg tccgctocct agctggggcc ctgctcgcct ctctaggact ggtcgctggc
61 ctgtctccag ccgaatggcg aagccagtc atctaccagg tcgtcaccca ccgctttgcg
121 ctcgacaatg gcgaaactc gccttcttgc tcgggtcaaa gcgagctcaa cctctactgc
181 aatggcacct ttgcaggcat catcgacaag ctggactata tccagaacat gggcttcacc
241 gccatctgga tctcgcccgt ggtcaagaac atcgacggtg gctcacctaa tggctacacg
301 cctgacggat ccgcttacca cggctactgg gctcaggaca tctacgagat caaccacac
361 ttcgccggag cgtcaggctc gaccgacctg tcgaacgctt tgcacaaccg gggcatgtac
421 ttgatggtgg acgttgctgt caaccatatt gcgtactact gcggcaccaa tggcggtatg
481 ggtcccggca actcgggtcaa ctacggatcg ttacagcctt tcaacagcga gtcatacttc
541 caccggttct gcgagatcga ttacaacaac cgcacgagca tcctcgaact ctgggagggt
601 gacgagatcg tgccgctcgt cgacctccgg acagaggact cggacgtgca gtccatcttc
661 aactcgtgga tcagcaactt gatccagacg tacaacatcg acggcctccg gatagactcg
721 ctccagcagt ctggctcctt cttcttcccg gggttcaacc aggcgcgggg cggcatgtat
781 atggtcggcg aggtcttcaa cggcaaccgg tcctacgtct gcccttacca gcaggctggc
841 atgccaggtg tcctcaacta ccctatgtga gtcttgctgc ggcagccgat gagactacag
901 ctacaggcta aggttcttct acatcaccaa tgccttccag acctcgtctg gcagcatgag
961 ccagtcgct caggaattt cggccatgca atctgactgc tcggacaaa cgtcctcgg
1021 aagtaagtc ttgcttgggg gactctagct cataagacag cttcttggag aaccaggaca
1081 acccagcctt cccagtcag acgaacgacc taaccgctgc tcagaacgag atcgccttca
1141 ccattgctga ggacggtatc cccatcacct actacggcca agagcagcac ctgtccggct
1201 ctggcgtccc ccttaaccga gaggcgtgt ggacgctggg cggatacgac tcctcgtcgc
1261 cgctgtacaa gatgattacg acggtgaacc agctgagaac gctcgcgatc aagcagaacg
1321 gcggctttgt gacctacaag atccagggtgc catacaccga ctcgaacct atcgtcacgc
1381 gcaagggcaa ctcggtgtac cagattgtcg gcgtctacac caacgctggc tccgctggcg
1441 cgtcttcaac cttatccctc tcttcgctcg agaccgggtt ccaggcctct gaaccggtca
1501 tggacgtcct gtctcgcacg ctgtaccata ctggtagtga cgggagcctg tcattcacca
1561 tgactggcgg cctgcccga gtcttctaca acgcccggc cctggccgag agcagctctt
1621 gcacaacctc cacgacggcg accccgcgc ctggcggctg ctccgcccgg actggtggtg
1681 tcgacgtcta tgtccagacg cagtacggcc agagcgtcgt catcgcgggt aacatcccc
1741 agctcggcaa ctggagcccg cgaacggct tgaacctcaa cgcaaaccag tacacggcat
1801 cgagcccaa gtggaccggg accatcaccg gcgtcgcacc cggtagcag ttccagtgg
1861 agcccatcgt cgttaccat ggtaatgaca actggtacac tggcagcaac cagcaggcca
1921 cgacgggttc ggctgtagc tcgcccgcga ccgatatcga gtttacgtgg tcctcctag

//

ANEXO 3

Artigo Científico Publicado

Cloning, molecular characterization and heterologous expression of *AMY1*, an α -amylase gene from *Cryptococcus flavus*

Alexsandro S. Galdino¹, Cirano J. Ulhoa², Lídia Maria P. Moraes¹, Maura V. Prates³, Carlos Bloch Jr³ & Fernando A.G. Torres¹

¹Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; ²Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil; and ³Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil

Correspondence: Fernando Torres, Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil 70910-900. Tel.: +55 61 3307 2423; fax: +55 61 3349 8411; e-mail: ftorres@unb.br

Received 11 October 2007; accepted 14 December 2007.
First published online February 2008.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.01059.x

Editor: Diethard Mattanovich

Keywords

Cryptococcus flavus; α -amylase; heterologous expression; *Saccharomyces cerevisiae*.

Introduction

α -Amylases (EC 3.2.1.1) are endo-glycosyl hydrolases that randomly cleave the α -1,4-glycosidic bonds present in starch. This reaction generates linear and branched oligosaccharides of various lengths. The α -amylase family consists of several enzymes that share common characteristics, such as a parallel (α/β)₈ barrel structure and the catalytic mechanism (Van der Maarel *et al.*, 2002). They also contain four highly conserved regions comprising the catalytic centre, the substrate and Ca²⁺-binding sites (Janeček, 1997; MacGregor *et al.*, 2001). Only *c.* 10% of the known amylases are capable of binding and degrading raw starch and these enzymes possess a distinct sequence-structural module called a starch-binding domain (SBD) (Machovič & Janeček, 2006).

α -Amylases are among the most important industrial enzymes, with many applications in starch processing, brewing, alcohol production, textile and other industries (Gupta *et al.*, 2003). Industrial processes for hydrolysis of starch to glucose rely on inorganic or enzymatic catalysis. The use of enzymes is preferred as it offers a number of

Abstract

A *Cryptococcus flavus* gene (*AMY1*) encoding an extracellular α -amylase has been cloned. The nucleotide sequence of the cDNA revealed an ORF of 1896 bp encoding for a 631 amino acid polypeptide with high sequence identity with a homologous protein isolated from *Cryptococcus* sp. S-2. The presence of four conserved signature regions, (I) ¹⁴⁴DVVVNH¹⁴⁹, (II) ²³⁵GLRIDSLQ²⁴³, (III) ²⁶³GEVFN²⁶⁷, (IV) ³²⁷FLENQD³³², placed the enzyme in the GH13 α -amylase family. Furthermore, sequence comparison suggests that the *C. flavus* α -amylase has a C-terminal starch-binding domain characteristic of the CBM20 family. *AMY1* was successfully expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The time course of amylase secretion in *S. cerevisiae* resulted in a maximal extracellular amyolytic activity (3.93 U mL⁻¹) at 60 h of incubation. The recombinant protein had an apparent molecular mass similar to the native enzyme (*c.* 67 kDa), part of which was due to N-glycosylation.

advantages, including improved yields and cost savings (Satyanarayana *et al.*, 2004). Enzyme hydrolysis also allows greater control over the specificity of the reaction and the stability of the generated products. The enzymes used in the industrial conversion of starch are estimated to account for 10–15% of the total world enzyme market (Satyanarayana *et al.*, 2004).

Yeast species such as *Schwanniomyces occidentalis*, *Lipomyces kononenkoae* and *Streptomyces fibuligera* are known to produce highly active extracellular α -amylases and glucoamylases (Steyn & Pretorius, 1990). During the course of screening for amyolytic yeasts in the Brazilian biodiversity, a species classified as *Cryptococcus flavus* was isolated and its secreted amylase was biochemically characterized (Wanderley *et al.*, 2004). The purified α -amylase (hereafter called Amy1) exhibited important properties for biotechnological applications such as a low *K_m* (0.0056 mg mL⁻¹) for soluble starch, high stability at pH 5.5 and optimal temperature at 50 °C. These features prompted the authors to explore the use of Amy1 in biotechnological processes such as starch conversion for the production of ethanol.

Although *C. flavus* is able to metabolize starch, it cannot produce high yields of ethanol and may be pathogenic to humans. On the other hand, the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is widely used for the industrial production of ethanol and has the Generally Regarded as Safe (GRAS) status. However, *S. cerevisiae* cannot degrade starch to fermentable sugars unless an external source of amylase is provided or the yeast is genetically modified to express these enzymes (Steyn & Pretorius, 1990).

The present study describes the isolation of an α -amylase gene (*AMY1*) from the yeast *C. flavus*. This gene was successfully expressed in *S. cerevisiae*, showing that this system may be used in starch-conversion processes using Amy1 as a source of α -amylase activity.

Materials and methods

Strains and plasmids

The *C. flavus* strain used in this work was maintained at the Molecular Biology Laboratory (Universidade de Brasília, Brazil). *Escherichia coli* strain DH5 α and plasmid pGEM-T[®] (Promega) were used for general DNA manipulations. Plasmid YEp351PGK (Moraes et al., 1995) was used to express *AMY1* in *S. cerevisiae* CENPK2 (*MaTa/* α , *ura3-52/ura3-52*, *leu2-3,112*, *trp1-289/trp1-289*, *his3-1/his3-1*).

Culture conditions

Cryptococcus flavus was cultured at 25 °C in YPD (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) or synthetic starch medium (SSM: 0.67% YNB, 2% starch). For heterologous expression in *S. cerevisiae*, synthetic dextrose (SD) minimal medium containing 0.67% yeast nitrogen base (YNB), 2% glucose, 50 mM acetate buffer pH 5.5 and the appropriate amino acid supplements was used. SDA medium (0.67% YNB, 1% starch, 2% glucose, 50 mM acetate buffer, pH 5.5, 2% agar and appropriate amino acid supplements) was used for plate detection of amylolytic activity. Luria–Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.3) containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin was used for selection and growth of bacterial transformants.

Protein sequencing and molecular biology techniques

After growing *C. flavus* on SSM media for 60 h at 25 °C, α -amylase was purified from culture supernatants as described previously (Wanderley et al., 2004). The internal fragments were produced by proteolytic digestion using immobilized bovine trypsin (Pierce) in a solution of ammonium bicarbonate, pH 7.8. The mixture of amylase/immobilized trypsin was incubated at 37 °C for 4 h in an orbital shaker. The supernatant was collected after centrifugation

and directly spotted onto a matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) plate with a saturated matrix solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. Peptide sequences of the native secreted enzyme were identified by monoisotopic mass analyses and sequenced using MS/MS data produced by past source decay (PSD) and collision induced dissociation (CID) fragmentation experiments obtained on a MALDI TOF-TOF Ultraflex[®] II spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica). All DNA manipulations were carried out as described in Sambrook & Russel (2001). Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs and Promega and used as instructed by the suppliers. All plasmid DNA was prepared with the QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Cloning of *AMY1*

Based on the sequence of amy-CS2, the *Cryptococcus* sp. S-2 α -amylase gene described by Iefuji et al. (1996), primers CF5 and CF3 were designed (Table 1), which were used in a PCR reaction containing 20 ng of *C. flavus* genomic DNA, 10 pmol of each primer, dNTPs at 2.5 mM and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Cenbiot, Brazil) in a final reaction volume of 50 μL . The system was submitted to 30 amplification cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1.5 min and a final elongation cycle (5 min for 72 °C). A c. 0.9-kb amplicon was cloned into the pGEM-T[®] vector and sequenced. Because the cloned fragment showed high sequence identity to amy-CS2, primers CFAMY5 and CFAMY3 were designed (Table 1) to clone the entire genomic coding region (c. 2.0 kb) by PCR using *Tgo* DNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals) and the following conditions: 35 amplification cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 60 s, 72 °C for 2 min, followed by a final elongation cycle (72 °C for 7 min). A reverse transcriptase (RT)-PCR procedure was used to clone the c. 1.9-kb *AMY1* cDNA. Briefly, total RNA from *C. flavus* cells grown in SSM was isolated using the TRizol[®] method (Invitrogen) and cDNA was synthesized using the SuperScript[®] III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) following the supplier's recommendations. PCR was carried out with *Tgo* DNA polymerase using primers CFAMY5 and CFAMY3 as described above. The nucleotide sequence for *AMY1* was deposited at GenBank under accession number EU014874.

Table 1. Primers used in this work

Primer	Sequence (5' → 3')	RS*
CF5	GCTTACCACGGTTACTGG	–
CF3	CCACAGTGCCTCTCGGT	–
CFAMY5	<u>AGATCT</u> ACCATGGCTCCTGTCCGCTCCCTAG	Bgl II
CFAMY3	<u>AGATCT</u> CTAGGAGGACCACGTAACTC	Bgl II

*RS, restriction site (underlined).

DNA sequencing, protein and gene analysis *in silico*

DNA sequencing was performed using the MegaBACE[®] Dye Terminator procedure (GE Healthcare) and reactions were analysed in a MegaBACE[®] 1000 automatic DNA sequencer (GE Healthcare). The web interface at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to conduct the search for sequence similarity via BLAST tools (Altschul *et al.*, 1990). Putative N-glycosylation sites were predicted using the NetNglyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNglyc/>). The Compute Pi/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) was used for protein molecular mass calculations. Sequence alignments were performed using CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

Heterologous expression and amylase production

In order to express *AMY1* in *S. cerevisiae*, the cDNA was amplified by RT-PCR using primers CFAMY5 and CFA-MY3, which introduce Bgl II sites at amplicon ends (Table 1). The cloned cDNA was digested with Bgl II, and the *c.* 1.9-kb fragment was isolated and cloned into the yeast expression vector YEp351 PGK linearized with the same enzyme. The resulting vector was named YEpAMY1. *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2 was transformed as reported previously (Chen *et al.*, 1992). Transformants expressing α -amylase were selected by the production of hydrolysis haloes after 72 h of incubation at 30 °C in SSM and stained with iodine vapour as described by Moraes *et al.* (1995). A colony of *S. cerevisiae* harbouring YEpAMY1 was precultured in SD medium and 2 mL of this culture was transferred to a 1-L conical flask containing 200 mL of the same medium. Cells were incubated at 30 °C on a rotatory shaker at 200 r.p.m., and cell growth was monitored at 600 nm. At different time intervals, 5 mL samples were collected and centrifuged at 5000 g for 10 min and the supernatant was used for further analysis. α -Amylase activity was determined by monitoring starch hydrolysis as described by Moraes *et al.* (1995). One unit of amylase activity was defined as the amount of enzyme necessary to hydrolyse 0.1 mg of starch per minute. Protein deglycosylation was performed with PNGase F (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions.

Electrophoresis and enzymatic activities in gel

The apparent molecular mass of the recombinant enzyme was determined in a 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Proteins were visualized after silver staining as described by Blum *et al.* (1987). Molecular mass markers

were as follows: β -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactate dehydrogenase (35 kDa), REase Bsp981 (25 kDa), β -lactoglobulin (18.4 kDa) and lysozyme (14.4 kDa) (Fermentas Life Sciences). Activity gels were prepared as described by Wanderley *et al.* (2004). Briefly, after samples were resolved on a 12% SDS-PAGE, the gel was washed with distilled water, incubated with 50 mM sodium acetate (pH 5.5) for 60 min and then incubated at 4 °C for 12 h in a solution containing 0.5% starch (in 50 mM sodium acetate, pH 5.5). After this incubation period, the gel was further incubated at 37 °C for 2 h and bands displaying amylase activity were detected after staining with iodine solution (1% I₂ in 0.5 M KI).

Results and discussion

Isolation of the *AMY1* gene

A secreted α -amylase from *C. flavus* was purified from culture supernatants and sequence analysis of two tryptic fragments revealed 100% identity to positions 21–38 and 420–433 of AMY-CS2, the α -amylase isolated from *Cryptococcus* sp. S-2 (Iefuji *et al.*, 1996). Because the two proteins shared high sequence identity, primers were designed based on the sequence from amy-CS2 and an *c.* 2.0-kb amplicon corresponding to the genomic version of *AMY1* was obtained. *AMY1* contains two introns at positions 867–912 and 1024–1060. These introns begin with GT(G/A)AGT and end with AG, which are general intron signatures. The first intron in *AMY1* is of a size equal to the first intron present in amy-CS2 (46 bp) while the second intron (37 bp) is 16 bp smaller. The *AMY1* cDNA was cloned by RT-PCR using mRNA isolated from cells grown in the presence of starch. The cDNA sequence showed the highest identities with the *Cryptococcus* sp. S-2 and *Aspergillus niger* α -amylase genes: 92% and 89%, respectively. The deduced protein, Amy1, has 631 amino acid residues and its sequence exhibits homology to α -amylases from *Cryptococcus* sp. S-2 (97%), *Aspergillus terreus* (46%), *Aspergillus fumigatus* (45%), *Aspergillus clavatus* (44%) and *Aspergillus kawachii* (44%). Sequence comparison with other amylases places Amy1 in the GH13 family because it has the four conserved signature regions (I, II, III, IV) present at positions 144–149, 235–243, 263–267 and 327–332 and the highly conserved catalytic residues Asp-239, Glu-264 and Asp-332 present in regions II, III and IV, respectively (Fig. 1). Furthermore, the five amino acid residues His-149, Asp-239, Glu-264, Gln-331 and Asp-332 in Amy1 correspond to residues His-122, Asp-206, Glu-230, His-296 and Asp-297 in Taka-amylase (Janeček, 1997). Asp-206, Glu-230 and Asp-297 were found to play a role in catalysis while His-122, His-210 and His-296 have been shown to be involved in substrate recognition in the active site in mammalian pancreatic α -amylases (Ishikawa *et al.*,

Source	Region I		Region II		Region III		Region IV	
Bacteria								
Bacli	129	DVVINH	256	GFRIDAVKH	289	AEYWQ	352	FVDNHD
Bacsu	138	DAVINH	213	GFRFDAAKH	248	GEILQ	305	WVESH
Ecoli	101	DVVVNH	231	GFRIDAVKH	264	AEYWS	327	LVANHD
Archaea								
Pyrfu	132	DVVINH	219	GWRFDYVKG	246	GEYWD	309	FVANHD
Pyrsp	133	DIVINH	220	AWRFDYVKG	247	GEYWD	310	FVANHD
Thchy	129	DIVINH	216	AWRFDYVKG	244	GEYWD	306	FVANHD
Eucarya								
Aspor	138	DVVANH	223	GLRIDTVKH	250	GEVLD	313	FVENHD
Crysp	144	DVVVNH	235	GLRIDSLQQ	263	GEVFN	327	FLENQD
Cryfl	144	DVVVNH	235	GLRIDSLQQ	263	GEVFN	327	FLENQD
BarHIG	101	DIVINH	200	GWRFDFAKG	226	AEIWT	308	FVDNHD
<i>Consensus</i>		DvViNH		gFRfD vK		*gEyw		fvdnhD*

Fig. 1. Multiple sequence alignment of the conserved signature regions (I, II, III and IV) of α -amylases from several organisms. The figure compares amino acids of Bacli (*Bacillus liqueniformis* strain ATCC 27811, accession no. P06278), Bacsu (*Bacillus subtilis*, accession no. P00691), Ecoli (*Escherichia coli* strain JA11, accession no. P26612), Pyrfu (*Pyrococcus furiosus* strain DSM 3638, accession no. U96622), Pyrsp (*Pyrococcus* sp strain KOD1, accession no. D83793), Thchy (*Thermococcus hydrothermalis* strain AL662, accession no. AF068255), Aspor (*Aspergillus oryzae*, accession no. P10529), Crysp (*Cryptococcus* sp, accession no. D83540), Cryfl (this study, *Cryptococcus flavus*, accession no. EU014874) and BarHIG [*Hordeum vulgare* (barley), accession no. P04063]. The three proposed catalytic residues are marked by asterisks. A residue is written in the consensus sequence (*consensus*) if it is present in more than half of the α -amylases.

1992, 1993) and in the transition state stabilization, but not directly in catalysis of barley α -amylase (Sogaard *et al.*, 1993b). Interestingly, regions II and IV in Amy1 contain uncharged Gln (Gln-241 and Gln-331) in place of the highly conserved His residues (His-210 and His-296 in Taka-amylase A, respectively). A similar substitution was also observed in region II of the *Lipomyces kononenkoae* α -amylase (Kang *et al.*, 2004). Janeček *et al.* (1999) observed that a glycine replacing the histidine at the end of region II was a general feature of archaeal as well as plant α -amylases. It has been proposed that in *Thermococcus profundus*, these residues may be involved in the catalytic mechanism (Lee *et al.*, 1996). The histidine residue of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase that is equivalent to His-210 in Taka-amylase may control the specificity and thermal stability of the enzyme (Vihinen *et al.*, 1990). A similar function has been reported for the same residue in the enzyme from *Bacillus subtilis* (Takase, 1994). In CGTases, histidine residues are probably responsible for both cycling and amylolytic activities (Mattsson *et al.*, 1995). However, activity as well as substrate specificity of these enzymes could be modified by mutation of nonessential amino acid residues adjacent to or near the catalytic residues (Takase, 1992; Inohara-Ochiai *et al.*, 1997).

Iefuji *et al.* (1996) proposed that the C-terminal region of AMY-CS2 is implicated in raw starch binding. The SBD is usually a distinct sequence-structural module that improves the efficiency of an amylolytic enzyme, allowing it to bind and digest raw and granular starch (Svensson *et al.*, 1982; Goto *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 2002). Most

carbohydrate-binding modules (CBMs) have been classified into seven CBM families: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41 and CBM45 (Coutinho & Henriessat, 1999; Machovič & Janeček, 2006). The CBM20 family is the best-studied one; in this family, all real SBD modules are positioned C-terminally with regard to the catalytic domain (Machovič *et al.*, 2005). Because of the high sequence identity between Amy1 and AMY-CS2, these amylases should be placed in the CBM20 family.

Heterologous expression of Amy1 in *S. cerevisiae*

The AMY1 cDNA was cloned into YEp351PGK, which allows constitutive expression of foreign genes under the control of the yeast PGK1 promoter. The resulting plasmid, YEpAMY1, was used to transform the *S. cerevisiae* CENPK2 strain and successful α -amylase expression was observed after the formation of distinct hydrolysis haloes around colonies (Fig. 2a–d). No starch hydrolysis halo was observed in either untransformed cells or cells transformed with YEp351PGK (Fig. 2e and f). The time course of growth and secreted amylase production by a selected *S. cerevisiae* transformant during batch culture is shown in Fig. 3. The extracellular amylolytic activity increased during growth and reached a maximal value (3.93 U mL^{-1}) at 60 h of incubation (Fig. 3a). Cell growth was equivalent to that of the clone transformed with the vector alone (data not shown), indicating that the amylase production did not impair cell growth, and resulted in constitutive and cumulative production of α -amylase. Amylolytic activity was

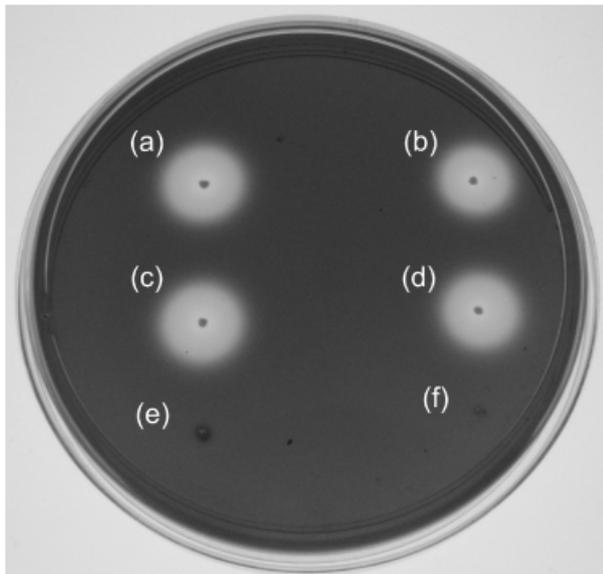


Fig. 2. Amylolytic activity of yeast transformants in plate assays. *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2 was transformed with the indicated plasmids and plated in SDA medium. After 72 h of growth at 30 °C, the plate was stained with iodine vapour. *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2 colonies transformed with YEpAMY1 (a, b, c and d); YEp351 PGK (e) and untransformed cells (f).

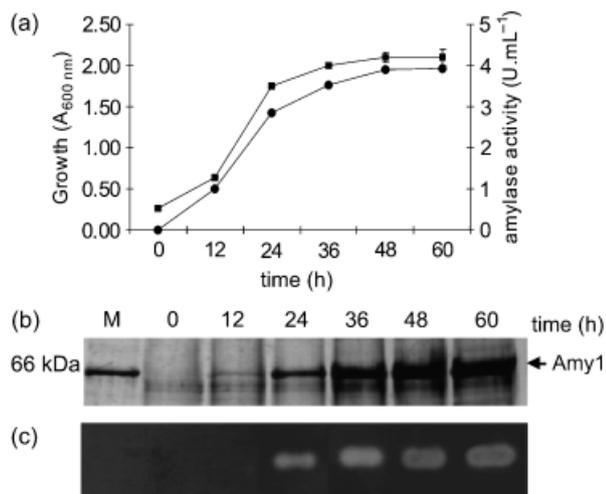


Fig. 3. Kinetics of Amy1 production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2 grown in liquid SD medium. (a) Growth curve (■) and amylase activity (●) of a clone expressing *AMY1*. SDS-PAGE (b) and zymogram (c) analysis of supernatants from different time courses. M, molecular mass marker.

correlated to a single band with an apparent molecular mass of *c.* 67 kDa, which is similar to that from the native enzyme (Fig. 3b and c). After deglycosylation with PNGase F, which removes the glycan portion of N-glycoproteins, both native and recombinant enzymes showed a molecular mass of

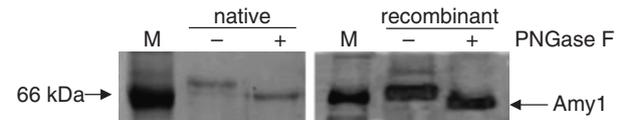


Fig. 4. N-Glycosylation state of Amy1. Twelve per cent SDS-PAGE analysis of native and recombinant Amy1 with or without treatment with PNGase F. M, molecular mass marker.

c. 66 kDa, which is in good agreement with the predicted size of the mature protein (65 865 Da) (Fig. 4a and b). Three potential N-glycosylation sites were identified in Amy1 (⁶¹NGT, ¹⁹⁰NRT and ²⁶⁹NPS) but more experimental data are needed to confirm the precise location of these sites. Although Amy1 has 97% sequence identity with AMY-CS2, the latter could only be efficiently secreted in yeast when its C-terminal was deleted (Iefuji *et al.*, 1996). The only striking differences in the C-terminal region of both enzymes are three substitutions at positions 606 (Pro → Thr), 608 (Asn → Ser) and 623 (Ala → Thr). It is unclear whether these substitutions alone are enough to promote efficient secretion of Amy1 in *S. cerevisiae*.

This work represents the first report of the cloning and secretion of a *C. flavus* α -amylase gene in *S. cerevisiae*. The successful expression of Amy1 in yeast shows that this enzyme may be used in biotechnological processes. In fact, work is under way to add a glucoamylase gene to system, which should enable the resulting strain to ferment starch to ethanol directly.

Acknowledgements

This project was supported by FAP/DE, CNPq and CAPES (Brazil). The authors are indebted to Hugo Costa Paes for manuscript revision.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Blum H, Bier H & Gross H (1987) Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99.
- Chen DC, Yang BC & Kuo TT (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* **21**: 83–84.
- Chen L, Coutinho PM, Nikolov Z & Ford C (1995) Deletion analysis of the starch-binding domain of *Aspergillus* glucoamylase. *Protein Eng* **8**: 1049–1055.
- Coutinho PM & Henrissat B (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. *Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation* (Ohmiya K, Hayashi K, Sakka K, Kobayashi Y, Karita S & Kimura T, eds), pp. 15–23. Uni Publishers Company, Tokyo.

- Goto M, Seminaru T, Fukukawa K & Hayashida S (1994) Analysis of the raw starch-binding domain by mutation of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3926–3930.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswam VK & Chauhan B (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* **38**: 1599–1616.
- Iefuji H, Chino M, Kato M & Imura Y (1996) Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, cloning and sequencing. *Biochem J* **318**: 989–996.
- Inohara-Ochiai M, Nakayama T, Goto R, Nakao M, Ueda T & Shibano Y (1997) Altering substrate specificity of *Bacillus* sp. SAM1606 α -glucosidase by comparative site-specific mutagenesis. *J Biol Chem* **272**: 1601–1607.
- Ishikawa K, Matsui I, Honda K & Nakatani H (1992) Multi-functional roles of a histidine residue in human pancreatic α -amylase. *Biochim Biophys Res Commun* **183**: 286–291.
- Ishikawa K, Matsui I, Kobayashi S, Nakatani H & Honda K (1993) Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic alpha-amylase. *Biochemistry* **32**: 6259–6265.
- Janeček S (1997) α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol* **67**: 67–97.
- Janeček S, Lévêque E & Haye B (1999) Close evolutionary relatedness of α -amylases from archaea and plants. *J Mol Evol* **48**: 421–426.
- Kang HK, Lee JH, Kim D, Day DE, Robyt JE, Park KH & Moon TW (2004) Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* α -amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 53–64.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lee JT, Kanai H, Kobayashi T, Akiba T & Kudo T (1996) Cloning, nucleotide sequence, and hyperexpression of α -amylase gene from an archaeon, *Thermococcus profundus*. *J Ferment Bioeng* **82**: 432–438.
- Lo HF, Lin LL, Chiang WY, Chie MC, Hsu WH & Chang CT (2002) Deletion analysis of the C-terminal region of the α -amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23. *Arch Microbiol* **178**: 115–123.
- MacGregor EA, Janeček S & Svensson B (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1549**: 1–20.
- Machovič M & Janeček S (2006) Starch-binding domains in the post-genome era. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2710–2724.
- Machovič M, Svensson B, MacGregor EA & Janeček S (2005) A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21. *FEBS J* **272**: 5497–5513.
- Mattsson P, Battchikova N, Sippola K & Korpela T (1995) The role of histidine residues in the catalytic act of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*. *Biochim Biophys Acta* **1247**: 97–103.
- Moraes LMP, Astolfi-filho S & Oliver SG (1995) Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 1067–1076.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Satyanarayana T, Noorwez SM, Kumar S, Rao JLUM, Ezhilvannan M & Kaur P (2004) Development of an ideal starch saccharification process using amylolytic enzymes from thermophiles. *Biochem Soc Trans* **32**: 276–278.
- Søgaard M, Kadziola A, Haser R & Svensson B (1993b) Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley alpha-amylase 1. *J Biol Chem* **268**: 22480–22484.
- Steyn AJC & Pretorius IS (1990) Expression and secretion of amylolytic enzymes by *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Varia* **5**: 76–126.
- Svensson B, Pedersen TG, Svendsen IB, Sakai T & Ottesen M (1982) Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res Commun* **47**: 55–69.
- Takase K (1992) Interaction of catalytic-site mutants of *Bacillus subtilis* alpha-amylase with substrates and acarbose. *Biochim Biophys Acta* **1122**: 278–282.
- Takase K (1994) Site-directed mutagenesis reveals critical importance of the catalytic site in the binding of alpha-amylase by wheat proteinaceous inhibitor. *Biochemistry* **33**: 7925–7930.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H & Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol* **94**: 137–155.
- Vihinen M, Ollikka P, Niskanen J, Meyer P, Suominen I, Karp M, Holm L, Knowles J & Mäntsälä P (1990) Site-directed mutagenesis of a thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. *J Biochem* **107**: 267–272.
- Wanderley KJ, Torres FAG, Moraes LMP & Ulhoa CJ (2004) Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol Lett* **231**: 165–169.

ANEXO 4

Artigo Científico em fase de submissão

1 Purification and characterization of a *Cryptococcus flavus*

2 α -amylase produced by *Saccharomyces cerevisiae*

3
4
5 Alexsandro Galdino ^a, Roberto Silva ^b, Lídia Moraes ^a, Fernando Torres ^a,

6 Cirano Ulhoa ^{b*}

7
8
9
10 ^a *Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil.*

11 ^b *Laboratório de Enzimologia, Departamento de Ciências Fisiológicas (ICB, Universidade*

12 *Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.*

13
14
15
16 * Corresponding author. Tel.: +55 (62) 3521-1494

17 Fax: +55 (61) 3349-8411.

18 *Email address:* ulhoa@icb.ufg.br (C.J Ulhoa)

1 **Abstract**

2

3 A *Cryptococcus flavus* gene encoding an extracellular α -amylase (*AMY1*) was cloned and
4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* cells. The extracellular recombinant amylase (Amy1) was
5 purified from the culture to homogeneity by two steps using chromatography on a Q-Sepharose
6 fast flow column and then chromatography on a Sephacryl S-200 HR column. The enzyme was
7 purified 3.79-fold with a yield of 10.3% of the total activity. The purified enzyme exhibited an
8 apparent molecular mass of 67 kDa as estimated by SDS-PAGE analysis. Enzyme activity was
9 optimal at pH 5.5 at 60°C. The enzyme retained 50% of the activity after incubation at 60 °C for
10 60 min and was active by NH_4^+ . On the other hand, Cu^{+2} and Hg^{+2} inhibited the enzyme. The K_m
11 value for the pure enzyme was 0.37 mg.ml^{-1} with soluble starch as the substrate. TLC analysis
12 revealed that this enzyme is a typical endo- amylase where the major end products of starch,
13 amylase, amylopectin and glycogen were oligosaccharides from several sizes.

14

15 Keywords: α -amylase; Purification; *Cryptococcus flavus*

16

17

18

19

20

21

22

23

24