

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MARIANA ANTÃO CAVALCANTI

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de peptidase de *Fusarium oxysporum* em *Pichia pastoris*

MARIANA ANTÃO CAVALCANTI

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de peptidase de *Fusarium oxysporum* em *Pichia pastoris*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 18/04/19. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cavalcanti, Mariana Antão

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de peptidase de *Fusarium oxysporum* em *Pichia pastoris*. Ribeirão Preto, 2019.

75p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Cabral, Hamilton.

1. Peptidase. 2. Expressão heteróloga. 3. Pichia pastoris.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Antão Cavalcanti

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de peptidase de *Fusarium oxysporum* em *Pichia pastoris*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Banca Examinadora

Prof. Dr	
Instituição:	
Prof. Dr.	
Instituição:	_Assinatura:
Prof. Dr.	
Instituição:	_Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ricardo Cavalcanti e Luciana Vallada Antão Cavalcanti por todos os ensinamentos, oportunidades, carinho e valores ao longo desses 30 anos. À minha irmã Julia Cavalcanti por todo o companheirismo e amor.

Ao meu namorado e amor da minha vida, Juliano Pizani, por todo incentivo, paciência e compreensão ao final dessa jornada.

A minha querida chefe e amiga Flávia Camargo, por ter sido minha grande mentora e por ter me dado a oportunidade de realizar essa pós-graduação.

Ao professor Dr. Hamilton Cabral, pela oportunidade e orientação.

À Nathália G. Rosa por toda ajuda e incentivo.

Ao Rafael Pedezzi por todo suporte e ensinamentos de Biologia Molecular.

À toda minha família, e em especial às minhas avós Maria Clara e Ana Maria pelo amor e carinho.

Ao meu avô Donato Cavalcanti (in memoriam) por ter me ensinado tanto. Sei que estaria torcendo por mim.

À minha amiga de faculdade e de vida Natália Pontes, por ter caminhado comigo ao longo dos 5 anos de graduação na FCFRP-USP e por ter permanecido ao meu lado nos momentos mais importantes.

À minha amiga Ana Paula Mattar que tanto me apoiou e torceu pela conclusão desse trabalho.

Às minhas queridas Mariana Secaf, Thaísa de Bortoli, Lívia Matsuda, Maysa de Castro por toda a amizade.

A todos os colegas e amigos da Ourofino, pelo companheirismo diário e força.

Ao Programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela possibilidade de execução desse trabalho.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

CAVALCANTI, M. A. Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de peptidase de *Fusarium oxysporum* em *Pichia pastoris*. 2019. 73f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

As peptidases são enzimas da classe das hidrolases que catalisam a quebra de ligações peptídicas de proteínas e peptídeos. Essas enzimas têm elevada relevância em aplicações industriais, sendo bastante utilizadas na produção de detergentes. Muitas enzimas são produzidas através da expressão heteróloga em P. pastoris, sistema de expressão heteróloga com propriedades vantajosas sobre outros sistemas. Diante da importância das enzimas em várias atividades biológicas e de suas possíveis aplicações na indústria, este trabalho teve como objetivo a obtenção de uma peptidase funcional de Fusarium oxysporum através da expressão heteróloga em sistema de P. pastoris. Este estudo realizou a clonagem gênica e produção de uma peptidase de F. oxysporum através de expressão heteróloga em P. pastoris. A peptidase em questão é uma subtilisina, que necessita da clivagem de sua pró-região inibitória para que exerça atividade. Desse modo optou-se por produzir a peptidase em sua forma madura recombinante (pMAD) como forma de obter a enzima funcional. Testou-se a expressão em Pichia pastoris de forma induzida, através do promotor pAOX1 e constitutiva, através do promotor pGAP, sendo que sua produção de forma constitutiva não foi possível. A peptidase produzida foi purificada por cromatografia de afinidade e apresentou atividade funcional evidenciada pela análise do efeito proteolítico. Além disso, a temperatura de 40 °C e o pH 8,0 foram identificados como condições ótimas para atividade enzimática. Diante dos resultados apresentados pode-se dizer que este estudo contribui muito para o conhecimento científico e para a indicação de uma potencial molécula a ser empregada no desenvolvimento de produtos industrializados.

Palavras-chave: Peptidase, Fusarium oxysporum, subtilisina, Pichia pastoris.

ABSTRACT

CAVALCANTI, M. A. Cloning, heterologous expression and functional characterization of *Fusarium oxysporum* peptidase in *Pichia pastoris*. 2019. 73f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Peptidases are enzymes of the class of hydrolases that catalyze the breakdown of peptide bonds of proteins and peptides. These enzymes have high relevance in industrial applications and are widely used in the production of detergents. Many enzymes are produced by heterologous expression in P. pastoris, a heterologous expression system with advantageous properties over other systems. In view of the importance of the enzymes in various biological activities and their possible applications in the industry, the objective of this work was to obtain a functional peptidase of Fusarium oxysporum through heterologous expression in P. pastoris system. The peptidase in question is a subtilisin, which requires the cleavage of its inhibitory pro-region to exert activity. Thereby it was chosen to produce the peptidase in its mature recombinant form (pMAD) as a way of obtaining the functional enzyme. The expression in Pichia pastoris was induced in an induced manner, through the pAOX1 and constitutive promoter, through the pGAP promoter, and its constitutive production was not possible This study carried out the genetic cloning and production of a peptidase of F. oxysporum through heterologous expression in P. pastoris. The recombinant mature peptidase (pMAD) was purified by affinity chromatography and showed functional activity evidenced by proteolytic effect analysis. In addition, the temperature of 40 °C and pH 8.0 were identified as optimum conditions for enzymatic activity. In view of the presented results it can be said that this study contributes much to the scientific knowledge and to the indication of a potential molecule to be used in the development of industrialized products.

Key words: Peptidase, Fusarium oxysporum, subtilisin, Pichia pastoris.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da hidrólise de uma ligação peptídica pela quimotripsina4
Figura 2. Estrutura tridimensional do complexo Subtilisina e Pró-peptideo6
Figura 3. Vetores utilizados para expressão de pMAD21
Figura 4. Sequência completa dos resíduos de aminoácidos da serine peptidase precursor de número de acesso AAC27316.229
Figura 5. Análise da presença de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos AAC27316.230
Figura 6. Análise da presença de potenciais sítios glicosilação na sequência de aminoácidos do precursor da peptidase
Figura 7. Amplificação dos insertos codificadores das PROREG, MAD e PREC32
Figura 8. Análise da restrição das construções <i>pJET</i> /PROREG, <i>pJET</i> /MAD e <i>pJET</i> /PREC
Figura 9. Análise da restrição das construções <i>pGAPZαA</i> /PREC, pGAP <i>Z</i> αA/MAD <i>e pGAPZαA</i> /PROREG35
Figura 10. Análise da restrição das construções <i>pPICZαA</i> /PREC, <i>pPICZαA</i> /MAD e <i>pPICZαA</i> /PROREG36
Figura 11. Análise dos vetores de expressão <i>pPICZαA</i> /MAD e <i>pGAPZαA</i> /MAD37
Figura 12. Foto representativa da coleta e manutenção das colônias de <i>P. pastoris</i>
Figura 13. Atividade proteolítica dos extratos secretados por clones de <i>P. pastoris</i> transformadas com as construções de promotor constitutivo39
Figura 14. Atividade proteolítica dos extratos secretados por clones de <i>P. pastoris</i> transformadas com as construções de promotor indutível
Figura 15. Análise da biomassa dos clones Col.1, Col.4 e Col.7 e da atividade proteolítica de seus produtos secretados
Figura 16. Gráfico dos perfis obtidos a partir da cromatografia de afinidade a meta imobilizado (IMAC)
Figura 17. Análise dos perfis proteicos dos sobrenadantes das culturas de clones de <i>P. pastoris</i> transformadas com pPICZαA/MAD43
Figura 18 Análise da hiomassa e da atividade proteolítica das culturas de Col 1 45

Figura 19. Análise dos perfis proteicos dos sobrenadantes das culturas do clone 1 de P. pastoris46	
Figura 20. Gráfico dos perfis cromatográficos obtidos a partir da cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)	
Figura 21. Análise da purificação de pMAD47	,
Figura 22. Análise da atividade proteolítica da pMAD purificada48	}
Figura 23. Análise das condições ótimas de pH e temperatura para a atividade proteolítica da pMAD purificada48	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de enzimas segundo a nomenclatura definida pela IUBMB3
Tabela 2. Vantagens e desvantagens de diferentes sistemas para expressão de proteínas recombinantes
Tabela 3. Algumas linhagens de <i>P. pastoris</i> utilizadas para expressão proteica13
Tabela 4. Promotores disponíveis para o sistema de expressão em linhagens de <i>P</i> pastoris16
Tabela 5. <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos insertos PREC, MAD e PROREG
Tabela 6. Tampões e respectivos pH avaliados27
Tabela 7. Sequências de aminoácidos empregadas nas análises <i>in silico</i> Identificação das massas moleculares (MM) e pontos isoelético teórico (PI)31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOX Álcool oxidase

BMGY Buffered glycerol-complex medium

BMMY Buffered methanol-complex medium

DNA Deoxyribonucleic acid

EC Enzyme Commission

FDA Food and Drug Administration

GAP Gliceroldeído 3-fosfato desidrogenase

GRAS Generally recognized as safe

IMAC Immobilized metal ion affinity chromatography

IUBMB International Union of Biochemistry and Molecular Biology

LB Luria-Bertani

NCBI National Center for Biotechnology Information

OFAT One factor at a time

PCR Polymerase chain reaction

ROS reactive oxygen species

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

YNB east Nitrogen Base

YPD Yeast Peptone Dextrose

pb pares de bases

LISTA DE SÍMBOLOS

- α Alfa
- β Beta
- Ω Ômega
- ® Registrado
- ™ Trademark

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	
1. INTRODUÇÃO	
1.1.Enzimas	
1.2. Peptidases	2
1.3. Subtilisinas	
1.4. Fusarium oxysporum	
1.6. Sistema de expressão em <i>P. pastoris</i>	
1.6.1. Linhagens	11
1.6.2. Expressão constitutiva e induzida	
1.7. Produtos no mercado	
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivos Gerais	
2.2. Objetivos Específicos	
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Seleção da peptidase	
3.2. Caracterização in silico da peptidase	
3.3. Clonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG	18
3.3.1. Amplificação dos insertos PREC, MAD e PROREG	10 19
3.3.3. Preparo de bactérias termocompetentes e transformação bacteriana	
3.3.4. Confirmação das clonagens	20
3.4. Subclonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG em vetor de expressão	
3.4.1. Reação de ligação e transformação bacteriana	
3.6. Expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i>	
3.6.1. Seleção dos clones transformados com a construção pGAPZαA/MAD	23
3.6.2. Seleção dos clones transformados com a construção <i>pPICZα</i> A/MAD	
3.7. Expressão heteróloga em larga escala por clones transformados com a const pPICZαA/MAD	
3.8. Determinação da Biomassa (g/L)	
3.9. Cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)	25
3.10. Atividade proteolítica com caseína	
3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	
3.13. Determinação da temperatura ótima para atividade da peptidase	
4. RESULTADOS	29
4.1. Seleção da peptidase	29
4.2. Caracterização in silico da sequência de aminoácidos	
4.3. Clonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG4.4. Subclonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG em vetor de expressão	
4.5. Obtenção de clones de <i>P. pastoris</i>	

4.6. Seleção dos clones de <i>P. pastoris</i> produtores da peptidase	38
4.7. Obtenção e purificação da peptidase madura	
4.8. Determinação de condições ótimas de pH e temperatura para atividade da pMAD	
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	5.4
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO

A biotecnologia pode ser amplamente definida como "o uso de organismos ou de seus produtos para fins comerciais". Assim, a biotecnologia (tradicional) tem sido praticada desde o início da história dos registros. A panificação, a fabricação de bebidas alcoólicas e a produção de alimentos foram os primeiros produtos da biotecnologia. Mas desenvolvimentos recentes em biologia molecular deram à biotecnologia novo significado, nova proeminência e novo potencial. Agora é a biotecnologia moderna que conquistou a atenção do público. A biotecnologia moderna pode ter um efeito dramático na economia e na sociedade mundiais (SAI et al., 2011).

A biotecnologia pode ter muitas aplicações e envolver muitos processos, dentre os vários existentes, podemos citar a engenharia genética. Esta engenharia baseia-se no processo de transferir genes individuais entre organismos ou modificar os genes de um organismo para remover ou adicionar uma característica ou característica desejada. A partir desta biotecnologia, podemos obter vários produtos para uma diversidade de propósitos (SAI *et al.*, 2011).

Muitos micro-organismos, como bactérias, actinomicetos, fungos e leveduras, produzem grupos de enzimas versáteis e atraentes com uma ampla variedade de estruturas e aplicações comerciais (DENG *et al.*, 2010; GODFREY & WEST, 1996).

A possibilidade da produção de enzimas por micro-organismos, e a bioengenharia de enzimas para produção heteróloga, levou ao estudo de uma peptidase nativa de *Fusarium oxysporum*, bem como a obtenção de uma quimera recombinante contendo essa peptidase juntamente com uma lipase (SIQUEIRA, 2017). Os resultados desse estudo demonstraram que tal enzima possui versatilidade em diferentes condições, além de elevada atividade proteolítica (SIQUEIRA, 2017). Diante dos fatos apresentados, este trabalho apresenta os estudos realizados para a produção de uma peptidase de *Fusarium oxysporum* através de expressão heteróloga em *P. pastoris* como forma de verificar se a produção da peptidase sem a lipase seria mais eficiente.

1.1. Enzimas

Enzimas são macromoléculas biológicas que atuam como catalisadoras de reações químicas. São essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, pois possibilitam que as reações fisiológicas ocorram mesmo quando em condições desfavoráveis ou improváveis no ambiente celular. Na ausência delas as reações ocorreriam a uma taxa muito baixa o que inviabilizaria alguns processos biológicos. O mecanismo de catálise de uma enzima ocorre em uma região da molécula chamada de sítio ativo, no qual o substrato se liga especificamente favorecendo energeticamente a reação química. (LEHNINGER et al., 2002).

As enzimas estão localizadas nos espaços intra ou extracelulares e são caracterizadas pela alta seletividade ao substrato e por não serem degradadas durante as reações nas quais atuam. Os níveis desses biocatalisadores são altamente regulados por mecanismos de modificações covalentes, ativação proteolítica e degradação, a fim de manter a dinâmica celular. Além disso, as enzimas podem se ligar a outras moléculas orgânicas ou não, as quais podem desencadear alterações alostéricas, promovendo a regulação da atividade enzimática. (HO & GIBALDI, 2013).

Enzimas são produzidas pelos organismos para atuarem como biocatalisadores das reações metabólicas essenciais. As enzimas de origem microbiana são de extrema importância econômica, devido ao baixo custo e facilidade de produção quando comparadas com as de origem animal e vegetal. Os principais microrganismos utilizados para essa finalidade são os fungos filamentosos, leveduras e bactérias (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), como forma de padronizar e unificar a nomenclatura da grande diversidade das enzimas, as dividiu em seis classes, segundo as reações que catalisam em: EC 1-oxidorredutases (catalisam reações de oxidorreduções); EC 2- transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); EC 3 - hidrolases (catalisam reações de hidrólise); EC 4 - liases (catalisam reações de quebra de ligações covalentes); EC 5 - isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isomérico) e EC 6 - ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma

ligação de alta energia) (SANT'ANNA JUNIOR, 2001). A tabela 1 traz exemplos de enzimas de cada uma das classes enzimáticas descritas.

Tabela 1. Classes de enzimas segundo a nomenclatura definida pela IUBMB com suas respectivas atividades e exemplos (adaptada de SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

Classe	Catalisam	Exemplos de enzimas
EC 1 - Oxidoredutases	Reações de oxidorreduções	Lactato desidrogenase, peroxidases, oxigenases
EC 2 - Transferases	Transferência de grupos de uma molécula a outra	alanina aminotransferase, hexoquinase, transaldolases
EC 3 - Hidrolases	Reações de hidrólise	Peptidases, lipases, fosfatases, amilases
EC 4 - Liases	Quebra de ligações	piruvato descarboxilase, fumarase
EC 5 - Isomerases	Mudança intramolecular para a formação de isômero	alanina racemase, fosfoglicoisomerase
EC 6 - Ligases	Ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia	• •

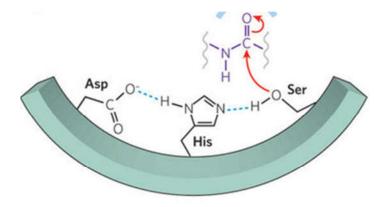
1.2. Peptidases

As peptidases são enzimas da classe das hidrolases que catalisam reações de quebra de ligações peptídicas de proteínas e peptídeos. O Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular recomenda a utilização do termo peptidase para se referir a essa subclasse, entretanto, o termo protease ainda é o mais utilizado, o termo enzimas proteolíticas também é encontrado (RAWLINGS, 2007).

As peptidases têm muitas funções fisiológicas como, por exemplo, na ativação de pré-formas zimogênicas de enzimas, coagulação sanguínea, lise de coágulos de sangue, processamento e transporte de proteínas secretadas através das membranas. Além disso, essas enzimas são altamente relevantes em aplicações industriais, sendo bastante utilizadas na produção de detergentes, por serem eficientes na remoção de manchas causadas por proteínas, através da degradação dessas moléculas, como por exemplo, em manchas de sangue (BRYAN, 2000).

A família de peptidase mais bem caracterizada e envolvida em diversos processos fisiológicos é a das serino peptidases, exemplificada pelas enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina, elastase e calicreína. A marca de seus sítios ativos é a tríade catalítica, composta pelos aminoácidos ácido aspártico (Asp-102), histidina (His-57) e serina (Ser-195) (Figura 1). A catálise ocorre via um estágio de transição intermediário durante os estágios de acilação e desacilação (KRAUT, 1977).

Figura 1. Esquema representativo da hidrólise de uma ligação peptídica pela quimotripsina. Nesta imagem é mostrada a tríade catalítica que envolve os aminoácidos ácido aspártico (Asp), histidina (His) e serina (Ser).



Fonte: Retirado de EREZ, E., FASS, D., & BIBI, E (2009).

As serino peptidases são divididas em superfamílias, sendo que o maior número de representantes se encontra nas superfamílias das *(chymo)trypsin-like* e *subtilisin-like* peptidases (SIEZEN; LEUNISSEN,1997).

O aumento da eficácia técnica e econômica na indústria veio na década de 1960, com o uso de enzimas bacterianas, de espécies do gênero *Bacillus* (especialmente *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis*), que eram peptidases alcalinas, representadas pelas subtilisinas, e a partir das quais foram desenhadas novas moléculas. Assim, na década de 1980, as subtilisinas se tornaram modelo de estudo de proteínas recombinantes e, excelentes candidatas para a produção a partir de engenharia genética (BRYAN, 2000). Foram as primeiras

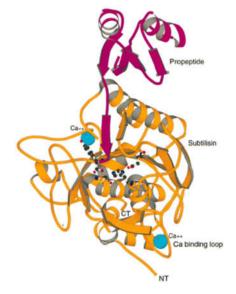
enzimas a serem manufaturadas a partir da biotecnologia, entrando no mercado nos anos 90, como *benchmarks* em várias aplicações (MAURER, 2004).

1.3. Subtilisinas

A superfamília das subtilisinas (S8) é amplamente encontrada em eubactérias, arqueobactérias, eucariotos e vírus (SIEZEN; LEUNISSEN,1997). Essas enzimas são caracterizadas pela posição diferente, dos aminoácidos ácido aspártico (Asp-32), histidina (His-64) e serina (Ser-221), componentes da tríade catalítica de seu sítio ativo em relação a outras serinopeptidases. (DODSON; WLODAWER, 1998).

Outras características são compartilhadas entre essas enzimas, como a estrutura semelhante, com o peptídeo sinal na região N-terminal, e adjacente a ele, uma pró-região, que também pode ser chamada de pró-peptídeo inibidor ou peptídeo de ativação (Figura 2). O peptídeo sinal e a pró-região devem ser removidos por mecanismos de catálise pós-traducionais, para que a forma madura da enzima tenha atividade (GAMBLE *et al.*, 2011).

Figura 2. Estrutura tridimensional do complexo Subtilisina e Pró-peptideo. Na estrutura cristalográfica obtida para esse complexo são mostradas, além da a subtilisina e do pró-peptídeo, a presença de íons Cálcio (Ca⁺⁺), importantes para a atividade enzimática, o CT (região carboxi-terminal) e o NT (amino-terminal).



Fonte: Retirado de Jain et al., 1998

Estudos demonstram que essa pró-região normalmente desempenha um papel crítico para o enovelamento (folding) correto do domínio catalítico maduro, atuando como uma chaperona e um inibidor temporário (GAMBLE et al., 2011; YABUTA et al., 2001; SUBBIAN et al., 2005) e a taxa de enovelamento da enzima sem a pró-região seria muito mais lenta do ponto de vista biológico (BRYAN, 2000). Além disso, a pró-região atua estabilizando o estado de transição que separa a forma nativa da enzima em sua conformação terciária ativa (SOHL et al., 1998).

1.4. Fusarium oxysporum

As espécies de fungo do gênero *Fusarium* são de grande importância na agricultura causando doenças nas plantas hospedeiras, o que impacta negativamente o produtor, levando à prejuízos econômicos. São amplamente disseminadas pelo solo e possuem alta diversidade genética, sendo difícil o controle de suas infecções (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A grande diversidade de enzimas desse patógeno pode ser explorada para sua produção biotecnológica, tornando esse fungo um candidato no uso industrial. Tais enzimas referem-se a lacases, quitinases, peptidases, lipases, quitina deacetilase, β-glicosidase, β-mananase, nitrilase, endoglucanase, xilanase e celulase (PESSÔA *et al.*, 2017).

Uma das espécies mais bem caracterizadas desse gênero é *Fusarium oxysporum*. Esta espécie é responsável por cerca de 60% das perdas na produção e também afeta a qualidade das frutas após a colheita. Entre as espécies vegetais hospedeiras desse microrganismo estão a cebola, alho-poró, alface, tomate, brássicas, aspargos, cucurbitáceas, pimentões, coentro, espinafre, manjericão, feijão, ervilha, morango, melancia e banana e também importantes culturas não alimentares, como cravo e narciso (MEDINA-ROMERO *et al.*, 2017; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Essa espécie tem grande importância do ponto de vista econômico e o conhecimento de seu genoma possibilita a bioengenharia de enzimas de interesse comercial e sua produção em bioprocessos. (MA *et al.*, 2010).

1.5. Expressão heteróloga de enzimas microbianas

Bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*), células de insetos e células de mamíferos são sistemas de expressão bem caracterizados e que têm sido utilizados para a produção em larga escala. Tais sistemas contam com eficientes vetores, que possuem além do gene de interesse, sequências promotoras e/ou regulatórias (FERNANDEZ; HOEFFLER,1999). Além destes, outros sistemas de expressão têm sido desenvolvidos e empregados, como as plantas e animais transgênicos (GOMES *et al.*, 2016).

Para a escolha do sistema mais vantajoso, devem ser considerados alguns aspectos como as características e funções da biomolécula, as aplicações e os recursos disponíveis para a produção. A tabela 2 mostra, de maneira simplificada, vantagens e desvantagens de diferentes sistemas de expressão. A expressão heteróloga possibilita a produção de enzimas em larga escala, bem como permite a inclusão de modificações genéticas. A escolha dos sistemas de expressão por espécies microbianas (a bactéria *E. coli* e a levedura *P. Pastoris*) é vantajosa por serem seguros e de fácil cultivo (GOMES *et al.*, 2016).

A taxa de produção das enzimas, rendimento, qualidade e funcionalidade são os fatores mais importantes a serem considerados quando as enzimas recombinantes são produzidas por expressão heteróloga. Assim, deve-se buscar formas de otimizar a produção e aumentar o rendimento. Para essa finalidade o que pode ser feito é encontrar um sistema de expressão que leve a um produto de maior qualidade e com uma maior taxa de produção, tornando o processo viável e lucrativo do ponto de vista industrial (LIU & KOKARE, 2017).

A produção de enzimas recombinantes em altos níveis depende de vários fatores e os mais relevantes são as características de crescimento celular do sistema escolhido, os níveis de expressão, o modo de expressão (em relação a ser secretado ou não), necessidade de modificações pós-traducionais, atividade biológica da proteína de interesse (LIU *et al.*, 2013).

A expressão em *E. coli* é fácil, rápida e barata, entretanto proteínas eucarióticas podem compor a formação de agregados insolúveis intracelulares (corpos de inclusão), sendo necessárias estratégias para solubilização desses agregados e *refolding*. Assim, muitas vezes o sistema de *P. pastoris* é preferido para esses tipos de biomoléculas (FERNANDEZ; HOEFFLER,1999).

Para que um microrganismo seja utilizado na produção de enzimas, o mesmo deve ser seguro do ponto de vista biológico e deve ser capaz de produzir e secretar a enzima em condições diversas de temperatura, pH, pressão osmótica e força iônica (SILVA *et al.*, 2013).

Desse modo é de extrema importância que se tenha conhecimento das características da proteína que será produzida para que a escolha do sistema de expressão seja adequado. No caso da produção de uma enzima, a qual conformação e a função estão fortemente relacionadas, é necessário um sistema de expressão que garanta um enovelamento (*folding*) correto (LIU & KOKARE, 2017; GOMES *et al.*, 2016).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens de diferentes sistemas para expressão de proteínas recombinantes (adaptado de GOMES *et al.*, 2016).

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Bactérias	Taxa de crescimento rápida Capacidade de fermentação contínua Fácil obtenção Econômica	Não possui maquinaria para remover introns das transcrições Gene estranho pode conter sequências sinais de terminação, resultando em interrupção prematura e perda de expressão gênica. Falta de modificações póstraducionais - glicosilação é incomum em bactérias Produção de proteínas na forma insolúvel (corpos de inclusão) Degradação de proteínas Acúmulo de endotoxinas
Leveduras	Crescimento rápido e meio de baixo custo Modificações pós- traducionais apropriadas Garantida segurança do sistema Livre de endotoxinas	Hiperglicosilação de proteínas Viés do códon Ineficiente em secretar as proteínas em meio de crescimento (retenção intracelular)
Células de insetos	Alto nível de expressão Modificações pós- traducionais apropriadas Seguro para vertebrados Excelente ferramenta para produção de glicoproteínas	Impossibilidade de expressão contínua Condições de cultura mais exigentes
Células de mamíferos	Dobramento proteico adequado Modificações pós- traducionais apropriadas Glicosilação adequada	Alto custo Tecnologia complicada Potencial contaminação com vírus animal
Planta transgênica	Fácil escalonamento a baixo custo Proteínas podem ser localizadas em diferentes órgãos em diferentes estágios de crescimento Alto rendimento	Níveis de expressão são dependentes do alvo Ensaios funcionais ainda precisam ser desenvolvidos
Animal transgênico	Dobramento proteico adequado Modificações pós- traducionais apropriadas Glicosilação adequada	Período de produção relativamente mais longo Baixo rendimento Maiores custos

1.6. Sistema de expressão em *P. pastoris*

P. pastoris é uma levedura metilotrófica que foi estabelecida, na década de 1980, como um sistema de expressão para a produção de enzimas e biofármacos (CREGG et al.,1985). A utilização de P. pastoris está relacionada com suas inúmeras vantagens, como a velocidade de crescimento, a possibilidade de utilização de meios de cultivo menos complexos e mais baratos, a capacidade de secreção de proteínas e a realização de algumas modificações pós-tradicionais importantes (GOMES et al., 2019). Além destas, outras vantagens deste sistema de expressão incluem: promotores fortemente indutíveis e métodos comercialmente disponíveis, cepas hospedeiras e vetores de expressão para manipulações genéticas (CREGG et al., 1993).

O método de transformação utilizado em *P. pastoris* ocorre por meio de integração cromossomal. Este método oferece mais vantagens como: estabilidade do cassete e expressão, geração de transformantes com múltiplas cópias, controle do sítio de integração e a capacidade de construir variados modos de integração (SREEKRISHNA *et al.*,1997). Em adição, as técnicas de manipulação são relativamente simples (KRAINER; DIETZSCH; HAJEK et al.,2012).

Quanto a vantagem de produção de proteínas recombinantes em larga escala, trabalhos mostram altos níveis de expressão de proteínas, atingindo valores de 12 g/L, como foi verificado para o fragmento C de proteína tetânica (CLARE, 1991; FISCHER, 1999).

Uma das principais vantagens desse sistema de expressão, como previamente descrito, é a habilidade de *P. pastoris* em secretar o produto de interesse no caldo de cultivo com baixos níveis de proteínas nativas, o que facilita processos posteriores, como o processamento e purificação (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Além disso, sua maquinaria celular de eucarioto permite a realização de modificações pós-traducionais, incluindo formação de pontes dissulfeto, glicosilação, enovelamento e processamento proteolítico, que são geralmente essenciais para a atividade biológica das proteínas (DAMASCENO *et al.*, 2012).

Fisiologicamente, *P. pastoris* prefere a via respiratória à via de fermentação para crescimento, o que não leva a produção de metabólitos tóxicos como etanol e ácido acético, quando comparado com outros microrganismos fermentadores (CEREGHINO *et al.*, 2002). Outros pontos que tornam esse sistema atrativo são: a

possibilidade de escalonamento, para atender demandas industriais (com adequação dos parâmetros de cultivo, como aeração e pH) e a facilidade de sua manipulação genética (incorporação de vetores com alta estabilidade) (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Além de ser um sistema seguro para aprovação pelas agências regulatórias para produção de vacinas e terapêuticos, pois é livre de contaminação por endotoxinas e vírus (FISCHER et al., 1999). O FDA reconhece Pichia pastoris como um microrganismo GRAS (Generally recognized as safe), ou seja, um microrganismo geralmente reconhecido como seguro (LI et al., 2007).

Cabe ainda ressaltar as considerações sobre as desvantagens desse sistema de expressão, que estão associadas, principalmente, aos vetores e promotores disponíveis. O uso do metanol como agente indutor é um ponto de desvantagem por ser uma substância tóxica e inflamável. Além disso, o metabolismo do metanol leva a formação de ROS (*reactive oxygen species*) que podem levar a uma diminuição na viabilidade celular (IDIRIS *et al.*, 2010). Em contrapartida a expressão constitutiva pode ser um limitante caso a proteína expressa seja tóxica (POTVIN *et al.*, 2012).

Outro inconveniente é a degradação proteolítica do produto ao passar pelas vias pós-secretórias levando a proteínas não funcionais (IDIRIS *et al.*, 2010). Em relação ao sistema de expressão *E. coli*, a expressão em *P. pastoris* é desvantajosa com relação ao custo e tempo de processo. Enquanto um processo em *E. coli* dura cerca de 8 horas, um processo em *Pichia pastoris* pode demorar mais de 100 horas. (POTVIN *et al.*, 2012).

1.6.1. Linhagens

Uma série de linhagens da levedura *P. pastoris* está disponível no mercado e a escolha deve ser feita conforme a necessidade de aplicação da proteína recombinante, e para tal, existem diversos genótipos disponíveis (DALY; HEARN, 2005). A tabela 3 mostra algumas linhagens, bem como os respectivos genótipos e propósitos de cada um delas.

As linhagens deficientes no gene responsável pela histidina desidrogenase (*his4*) permitem a seleção de clones, em meio com ausência de histidina, através da inserção de vetor que restaure o fenótipo His+ (DALY, HEARN, 2005).

Com relação à utilização de metanol, as linhagens podem ser 1) Mut⁺, com os genes para a álcool oxidase I (AOX1) e álcool oxidase 2 (AOX2) presentes e

funcionais; 2) Mut^s ("s" representa *slow*), com ruptura no gene *AOX1* e apenas *AOX2* funcional para o metabolismo do metanol, e desse modo, o crescimento é muito mais lento e 3) Mut⁻, com deleção de *AOX1* e *AOX2* impossibilitando o crescimento com metanol como fonte de carbono. O fenótipo Mut⁺ tem a desvantagem de necessitar de altas taxas de alimentação com metanol em larga escala, por esse motivo o fenótipo Mut ^s é muitas vezes escolhido para processos que necessitam ser escalonados. Por outro lado, o fenótipo Mut^s necessita de uma alimentação constante de metanol, para que sua concentração fique em torno de 0,8% (CHIRUVOLU *et al.*, 1997; CEREGHINO; CREGG, 2000).

1.6.2. Expressão constitutiva e induzida

Um outro fator importante que deve ser levado em consideração para expressão heteróloga é a escolha do promotor e os principais disponíveis para *Pichia pastoris* são *pAOX1*, *pGAP*. O primeiro promotor isolado de *P. pastoris* foi o promotor *AOX1* (*pAOX1*) e tem sido o mais divulgado e utilizado entre todos os promotores disponíveis para *P. pastoris* e a regulação gênica é controlada por dois mecanismos: repressão/desrepressão e indução (ELLIS *et al.*, 1985).

No processo de repressão/desrepressão, o *pAOX1* é fortemente reprimido quando as células crescem em glicose e na maioria das outras fontes de carbono, entretanto, a ausência de uma fonte de carbono repressora no meio não resulta em uma transcrição substancial do *AOX1*. Por esse motivo é fundamental o processo de indução, no qual a presença de metanol, como única fonte de carbono, é essencial para a indução de altos níveis de expressão do gene alvo (TSCHOPP *et al.*, 1987).

Assim, o bioprocesso em sistema heterólogo utilizando o *pAOX1* é dividido em duas etapas. A primeira etapa é a fase de produção de biomassa e a segunda etapa é a fase de indução da expressão da proteína recombinante (DIGAN *et al.*, 1989).

Durante a fase de crescimento celular para a produção de biomassa, o meio de cultura é suplementado com fonte de carbono, como o glicerol. Na segunda fase, o meio inicial é substituído por um meio contendo metanol como única fonte de carbono, para que ocorra a indução da expressão da proteína de interesse. Dada a sua importância, a concentração de metanol pode ser monitorada para garantir a indução e evitar toxicidade (HIGGINS; CREGG,1998).

Tabela 3. Algumas linhagens de *P. pastoris* utilizadas para expressão proteica. Informações retiradas do manual do distribuidor (Thermo Fischer Scientific).

Linhagem	Genótipo	Objetivo
X-33	Selvagem (WT)	Linhagem para expressão de proteínas recombinantes de vetores com resistência <i>Zeocin</i> TM como único marcador de seleção.
GS115	his4	Linhagem para expressão de proteínas recombinantes de vetores contendo gene <i>HIS4</i> ou o gene de resistência à <i>Zeocin</i> TM como marcadores de seleção.
KM71	his4, aox1:ARG4	Linhagem para expressão de proteínas recombinantes de vetores contendo o gene <i>HIS4</i> ou gene de resistência à <i>Zeocin</i> TM como marcadores de seleção para utilização de metanol como indutor da expressão.
SMD1168	his4, pepA	Linhagem deficiente em proteases para a expressão de proteínas recombinantes de vetores contendo o gene HIS4 ou gene de resistência à <i>Zeocin</i> TM como marcadores de seleção.
PichiaPink™ (strain 1)	ade2	Linhagem para expressão de proteínas recombinantes de vetores contendo gene <i>ADE2</i> como marcadores de seleção.
PichiaPink™ (strain 1)	ade2, pep4	Linhagem deficiente em peptidase A para expressão de proteínas recombinantes de vetores contendo gene <i>ADE2</i> como marcadores de seleção.
PichiaPink™ (strain 1)	ade2, prb1	Linhagem deficiente em peptidase B para expressão de proteínas recombinantes de vetores contendo gene <i>ADE2</i> como marcadores de seleção.
PichiaPink™ (strain 1)	ade2, prb1, pep4	Linhagem deficiente em peptidase A e B para expressão de proteínas recombinantes de vetores contendo gene <i>ADE</i> 2 como marcadores de seleção.

Além disso, há circunstâncias em que este promotor pode não ser adequado porque seu agente indutor - o metanol - é uma substância tóxica e inflamável e cuidados adicionais devem ser tomados em fermentações em larga escala. Nesse contexto, o desenvolvimento de promotores alternativos ao *pAOX1* é extremamente atraente, especialmente na fermentação em larga escala (ZHANG *et al.*, 2009).

O promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*pGAP*) é um forte promotor constitutivo, que tem sido utilizado para a expressão de muitas proteínas heterólogas, e para o qual já foi relatado um nível de produção semelhante ao promovido por *pAOX1*. O *pGAP* tem vantagens em relação ao *pAOX1* e que o torna mais adequado para a larga escala de produção, pois simplifica o bioprocesso de produção de proteínas recombinantes, uma vez que não é necessário o armazenamento e entrega de grandes volumes de metanol, além de diminuir o custo de produção dessas proteínas (ZHANG *et al.*, 2009).

Em contrapartida, o mesmo pode não ser adequado no caso da expressão de proteínas que sejam tóxicas a *P. pastoris* (CREGG *et al.*, 2000). Uma das grandes vantagens do *pAOX1* é o seu controle fino da expressão de genes cujos produtos podem ser tóxicos, levando o cultivo da levedura a condições repressivas de crescimento para evitar a seleção de cepas não expressivas (WATERHAM *et al.*, 1977).

Outros promotores induzíveis e constitutivos estão disponíveis e seus genes correspondentes, bem como seus mecanismos de regulação estão citados na tabela 4 (AHMAD *et al.*, 2014; CEREGHINO, 2000).

1.7. Produtos no mercado

Nos últimos anos muitos biofarmacêuticos produzidos em *P. pastoris* foram aprovados. O primeiro a ser aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) foi o *Kalbitor*® (ecallantide, Dyax, Cambridge, MA, USA) indicado para angiodema hereditário e lançado no mercado em 2009 (WALSH, 2010). Também entre os biofarmacêuticos aprovados estão a albumina sérica humana, insulina, IFN-α, vacina contra a Hepatite B, entre outros (GASSER *et al.*, 2013).

Muitas enzimas também são produzidas através da expressão heteróloga em *P. pastoris*, exemplos são: Fitase (Phytex, Sheridan, IN, USA) utilizada como aditivo alimentício animal; Tripsina (Roche Applied Science, Germany) utilizada para

digestão de proteínas; Nitrato redutase (The Nitrate Elimination Co., Lake Linden, MI, USA), usada em tratamento e análise de água; Fosfolipase C (Verenium, San Diego, CA, USA/DSM, The Netherlands); entre outras (AHMAD *et al.*, 2014).

1.8. Aplicações industriais das enzimas

Os setores que mais se beneficiam com a produção de enzimas, sejam elas nativas ou recombinantes, são os biofarmacêutico, agrícola e químico industrial. Os produtos relacionados vêm aumentando nos campos da medicina, diagnóstico, alimentos, nutrição, detergentes, couro, têxtil, papel e plástico (LIU *et a*l., 2013).

Em 2016, o mercado mundial faturou mais de 5 bilhões de dólares com a produção de enzimas e a perspectiva para 2024 é ainda maior. As grandes empresas controlam o mercado mundial de enzimas, através de parcerias e acordos que proporcionam um aumento na produção. Isso é possível devido a grande parcela desse mercado ser controlada por poucos produtores. Além disso, existe um forte investimento em atividades de pesquisa e desenvolvimento, marketing e vendas, e atividades de logística e cadeia de suprimentos (ENZYMES MARKET, 2017).

Diante dos fatos expostos, e reiterando a importância das enzimas em várias atividades biológicas, este trabalho apresenta os estudos realizados para a produção de uma peptidase de *Fusarium oxysporum* através de expressão heteróloga em *P. pastoris*. Ensaios preliminares foram realizados com a peptidase recombinante produzida em *Pichia pastoris* os quais buscavam a formulação de um meio de cultura que garantisse alto rendimento específico na produção da enzima. Entretanto a enzima apresentou ausência de atividade enzimática. A peptidase em questão é classificada como uma subtilase, que se encontra na forma de zimogênio ou pró-enzima, e desse modo, uma ativação é necessária para que a mesma exerça sua atividade biológica e seja um produto eficiente e economicamente viável para a indústria de detergentes.

Tabela 4. Promotores disponíveis para o sistema de expressão em linhagens de *P. pastoris* (Adaptado de AHMAD *et al.*, 2014 e CEREGHINO, 2000).

Gene correspondente	Regulação
Álcool oxidase 1	Induzível com metanol
Dihidroxiacetona sintase	Induzível com metanol
Formaldeído	Induzível com metanol ou
	metilamina
Isocitrato liase	Reprimido por glicose
	Induzível por metanol
	Indução através da falta de
-;	fosfato
Alcool desidrogenase	Reprimido por glicose e
	metanol, induzido por glicerol e
	etanol
Enolase	Reprimido por glicose e metanol
	e etanol, induzido por glicerol
Glicerol quinase	Reprimido por metanol, induzido
0	por glicose, glicerol e etanol
Gene correspondente	Regulação
aliceralde (de 2 feefete	Everenção constitutivo em
•	Expressão constitutiva em
	glicose, glicerol e metanol Expressão constitutiva em
	glicose e glicerol
•	Expressão constitutiva em
3-i osioglicerato quinase	glicose, glicerol e metanol
Glicosil fosatidil inositol-	Expressão constitutiva em
=	glicose, glicerol e metanol
•	Reprimido por glicerol, induzido
	em limitação de glicose
	Reprimido por glicerol, induzido
	em limitação de glicose
	Álcool oxidase 1 Dihidroxiacetona sintase

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral desse trabalho é a produção e obtenção de uma peptidase funcional de *Fusarium oxysporum* através da expressão heteróloga em sistema de *P. pastoris*.

2.2. Objetivos Específicos

- Clonagem dos insertos gênicos codificadores da proteína precursora (PREC), da peptidase madura (MAD) e de sua pró-região (PRO) nos vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA;
- Obter clones de expressão de *P. pastoris* e avaliar a produção da proteína recombinante por estes clones;
- Selecionar clones com maior produção da proteína recombinante;
- Purificar a peptidase recombinante por cromatografia de afinidade;
- Avaliar da atividade enzimática da peptidase obtida;
- Determinar o pH e a temperatura ótimos para atividade enzimática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção da peptidase

Para identificação e seleção de uma possível peptidase para aplicação industrial, trabalhos disponíveis na literatura foram encontrados e avaliados. A peptidase escolhida foi enzima codificada pelo gene *prt1* do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Di Pietro *et al.*, 2001). Após a determinação de uma possível candidata, a sequência de aminoácido foi coletada do banco de dados do no *NCBI* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.2. Caracterização in silico da peptidase

Com o objetivo de caracterizar parcialmente a proteína, análises *in silico* foram realizadas com base na sequência de aminoácido coletada do NCBI de número de acesso AAC27316.2. A sequência foi submetida a análises da presença de potenciais sítios glicosilação (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/ e http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) e de peptídeo sinal (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ e http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/).

3.3. Clonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG

A sequência de aminoácidos da proteína descrita como "serine peptidase precursor [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici]", depositada no GenBank (NCBI) com número de acesso AAC27316.2 foi utilizada para a síntese do gene sintético com ausência do peptídeo sinal. O gene sintético foi sintetizado com códons otimizados para expressão em P. pastoris (GenScript®). A estratégia inicial foi a clonagem do gene da enzima precursora (PREC). Posteriormente, foram desenvolvidas também a clonagem dos insertos da peptidase madura (MAD), ou seja, sem a sua pró-região. O inserto referente a pró-região (PROREG) também foi clonado com a finalidade de estudos comparativos.

3.3.1. Amplificação dos insertos PREC, MAD e PROREG

Para a amplificação dos insertos PREC, MAD e PROREG, utilizou-se como DNA molde o gene sintético para "serine peptidase precursor [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici]" e primers específicos para cada um dos insertos. Nos primers foram inseridas as sequências dos códons de iniciação (ATG) e de terminação (TGA) da tradução, as sequências dos sítios de restrição das enzimas Xhol e Xbal, e

a sequência dos nucleotídeos que codificam as histidinas da cauda na porção N-terminal da enzima (Tabela 5). As amplificações foram realizadas utilizando a enzima *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). As reações seguriam as recomendações do fabricante com desnaturação inicial a 94 °C por 2,5 minutos seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 55 °C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 min/kb. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado por *SYBR*® *Gold* (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 5. *Primers* utilizados para amplificação dos insertos PREC, MAD e PROREG.

Inserto	Primer Forward*	Primer reverse*
Proteína Precursora (PREC) – 1146 pb	5`-AAA <mark>CTCGAG</mark> AAAAGACATCATCAT CATCATCATAAATACATCGTTAAGAT GAAGAACGG-3`	5`-TTTTCTAGATCAGTGATGAATAG AAGAAGAGTTAGAACC-3`
Peptidase madura (MAD) – 912 pb	5`-AAACTCGAGAAAAGACATCATCAT CATCATCATATCTCTATCACTGCTAC TACTCAACAATCT-3`	5`-TTTTCTAGATCAGTGATGAATAG AAGAAGAGTTAGAACC-3`
Pró-região (PROREG) – 234 pb	5`-AAACTCGAGAAAAGACATCATCAT CATCATCATAAATACATCGTTAAGAT GAAGAACGG-3`	5`-TTTTCTAGATCAGTAAGCATCTT GCTCGATGTATTCA-3`

^{*}Sequências em vermelho indicam os sítios de restrição das enzimas *Xho*I e *Xba*I inseridas, respectivamente, nos *primers forward* e *reverse*.

3.3.2. Reação de ligação

O material amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Os fragmentos referentes aos insertos PREC de 1146 pb, MAD de 912 pb e PROREG de 234 pb foram recortados do gel e purificados com o kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), segundo recomendações do fabricante. A purificação dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. Após verificação dos fragmentos purificados, este foram quantificados e usados para ligação em vetor pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific), conforme protocolo do fabricante, e utilizado para transformação de bactéria E. coli DH10B termocompetentes.

3.3.3. Preparo de bactérias termocompetentes e transformação bacteriana

Uma colônia de *E. coli* DH10B foi crescida em 5 mL de meio LB sob agitação de 180 rpm, por 18 horas, a 37 °C. Essa cultura foi diluída em 300 mL de meio LB e crescida sob agitação de 180 rpm, a 37 °C, até atingir a DO_{600nm} de 0,5. A cultura

bacteriana foi resfriada em gelo por 15 minutos e centrifugada a $3.000 \times g$, durante 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 50 mL de água ultrapura gelada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 mL de solução gelada de CaCl $_2$ e incubadas no gelo por 20 minutos. Após centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente as células foram ressuspensas em 1 mL de solução gelada de CaCl $_2$ contendo 20% de glicerol, separadas em alíquotas de 100 μ L cada, para uso imediato. As reações de ligação foram adicionadas em 100 μ L de células e após 15 minutos submetidas ao choque térmico em banho-maria a 42 °C por 1 minuto. Posteriormente, as células foram incubadas em gelo, durante 2 minutos. Em seguida, as bactérias foram recuperadas com 1 mL de meio LB contendo Dextrose a 20 mM e MgCl $_2$ a 10 mM, e incubadas a 37 °C, sob agitação. Após 1 hora de incubação, as culturas foram centrifugadas a 3000 \times g, por 2 minutos à temperatura ambiente, ressuspensas em 100 μ L de meio LB e plaqueados em meio LB sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram mantidas em a 37 °C por 16 h.

3.3.4. Confirmação das clonagens

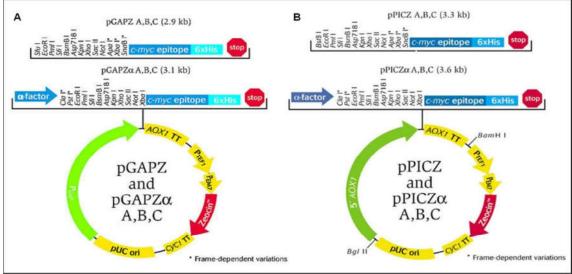
Algumas colônias obtidas foram selecionadas para a verificação da clonagem a partir da análise de restrição e visualização em gel de agarose 1% dos insertos e vetor. As colônias foram inoculadas em meio LB. Após 16 horas a 37 °C, 3 mL da cultura foram usados para extração de DNA plasmidial usando o kit "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems" (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram submetido as a restrição com as enzimas Xhol e Xbal e analisados em gel de agorose 1%. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram os fragmentos do vetor e dos insertos. Os vetores que continham os insertos foram enviados para a sequenciamento e verificação da correta sequência dos nucleotídeos.

3.4. Subclonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG em vetor de expressão

Após a confirmação de clonagem, seguiu-se com as etapas de construção dos plasmídeos de expressão. O sistema de expressão escolhido foi *P. pastoris*. Foram utilizados os vetores *pPICZαA* e *pGAPZαA* (Figura 3). Para tanto, as construções em *pEJ1.2/blunt* contendo os insertos PREC, MAD e PROREG foram submetidos a restrição com as enzimas *Xhol* e *Xbal* para liberação dos insertos.

Assim como os insertos, os vetores de expressão *pPICZαA* e *pGAPZαA* também foram digeridos com as mesmas enzimas para linearização e ligação dos insertos. Eletroforese em gel de agarose 0,8% foi realizada e os fragmentos referentes a cada inserto e vetor foram recortados e purificadas utilizando o kit "*Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System*" (Promega). Após a verificação dos fragmentos purificados, o material purificado foi quantificado em *NanoVue* (GE Healthcare Life Sciences), para a reação de ligação.

Figura 3. Vetores utilizados para expressão de pMAD. Nos vetores estão identificados os promotores em verde, o gene de resistência à Zeocin®. (A) Vetor pGAPZ ou $pGAPZ\alpha$ possui o promotor constitutivo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). (b) O vetor pPICZ e $pPICZ\alpha$ contém o promotor álcool oxidase 1 (AOX1), induzido por metanol. Os vetores que apresentam a letra grega α possuem o fator alfa para secreção do produto proteico.



3.4.1. Reação de ligação e transformação bacteriana

A reação foi realizada para uma quantidade de DNA final de 100 ng na proporção de 3:1 de inserto e vetor. Para a ligação, foi usado 1 U de T4 DNA Ligase (Fermentas) para volume final de 20 μL de reação. A reação ocorreu *overnight* a 4 °C, e posteriormente, o produto da ligação foi utilizado para transformação bacteriana, conforme descrito no ítem 3.3.3. Após crescimento das colônias em placa, foi possível selecionar algumas para a extração de DNA plasmidial com o uso do kit "*Wizard*® *Plus SV Minipreps DNA Purification Systems*" (Promega). Um teste

de restrição foi utilizado com as enzimas *Xho*I e *Xba*I para confirmar a inserção dos fragmentos correspondes a PREC, MAD e PROREG. A análise foi feita em gel de agarose 1%. Após a clonagem, o plasmídeo *pPICZα*A/MAD foi enviado para sequenciamento com *primers* 3' e 5' para AOX. O sequenciamento utilizando a técnica de Sanger foi realizado pelo Serviço de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da FCFRP/USP. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. As corridas são feitas utilizando polímero POP7 no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific). Verificada a correta inserção, foi possível seguir com as etapas de transformação em levedura *P. pastoris*.

3.5. Transformação de P. pastoris

Para obtenção de clones com expressão da proteína madura recombinante (rMAD), o vetor *pPICZα*A e *pGAPzαA* contendo o inserto MAD foram linearizados, purificados e usados para a transformação de P. pastoris KM71H (linhagem parental). A quantidade de 3 μg dos plasmídeos pPICZαA/MAD e pGAPzαA/MAD foram linearizados com as enzimas de restrição Pmel e XmaJI, respectivamente. O material foi purificado com o kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), e posteriormente, quantificado em NanoVue (GE healthcare). A linhagem de P. pastoris KM71H foi inoculada para obtenção de um pré-inóculo em tubo cônico de 50 mL contendo 5 mL de meio (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%). Esta cultura foi incubada em agitador orbital a 30 °C por 8 horas. Deste préinóculo foram retirados 50 µL e adicionados a 50 mL de YPD em frasco erlenmeyer de 250 mL, incubados a 30 °C sob agitação de 220 até se atingir uma densidade óptica a 600nm (D.O.600nm) entre 1,0 e 1,5. O frasco foi mantido em gelo por 10 minutos, e posteriormente, a cultura foi transferida para tubo cônico de 50 mL de centrifugada a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C. As células foram recuperadas e mantidas em gelo. Rapidamente, foram ressuspendidas em 10 mL de YPD contendo 2 mL de tampão HEPES 1M pH 7,0 e 250 µL de DTT 1M e incubadas a 30°C por 15 minutos. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação, conforme condições anteriores, e submetidas a duas lavagens com água gelada. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspendidas em 20 mL de sorbitol 1M gelado, centrifugadas e o sobrenadante foi eliminado. As células foi adicionado 1mL de sorbitol 1M gelado, que foi dividido em alíquotas de 100 μL. A cada 100 μL de células foram adicionados, separadamente, os DNAs previamente linearizado. Posteriormente, as amostras foram transferidas para cubetas de 2,0 mm e incubadas por 15 minutos no gelo e submetidas a eletroporação (1,5 kV, 25 μF e 200 Ω) usando Bio-Rad Gene Pulser®. Depois deste processo, as células foram recuperadas em 500 μL de sorbitol 1 M e 500 μL de YPD e incubadas a 30°C por 2 horas. Encerrado o tempo de incubação, as células foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura YPDS (YPD e Sorbitol 1 M) suplementadas com Zeocina® (Invitrogen) nas concentrações 100 μg/mL e 500 μg/mL. Transformantes de *P. pastoris* resistentes ao antibiótico foram selecionados para análise da expressão do produto protéico.

3.6. Expressão heteróloga em P. pastoris

3.6.1. Seleção dos clones transformados com a construção pGAPZαA/MAD

Clones isolados foram selecionados para análise da produção do produto proteico. Cada um dos clones foi cultivado em em tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura YPD e incubado a 30 °C, sob agitação de 220 rpm por 96 horas. Dois controles foram feitos, o primeiro sem levedura a fim de determinar se se a técnica foi realizada sem contaminações e o segundo com a linhagem parental *P. pastoris* KM71H. A cada 24 horas, alíquotas de 200 µL da cultura foram retiradas para a avaliação da expressão. A avaliação da expressão foi realizada através de SDS-PAGE 12% e por testes de atividade enzimática com o sobrenadante das culturas.

3.6.2. Seleção dos clones transformados com a construção pPICZαA/MAD

Clones isolados foram selecionados para análise da produção do produto proteico. Cada um dos clones foi cultivado em em tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, YNB 1,34%, biotina 4 x 10⁻⁵%, tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,0 e glicerol 1%), e incubado a 30 °C, sob agitação de 220 rpm até atingir D.O._{600nm} entre 2 e 6, aproximadamente 48 horas. Dois controles foram feitos, o primeiro sem levedura a fim de determinar se se a técnica foi realizada sem contaminações e o segundo com a linhagem parental *P. pastoris* KM71H. Após atingir a D.O._{600nm} desejada, as culturas foram centrifugadas

e as células foram recuperadas em 7 mL de meio de indução BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, YNB 1,34%, biotina 4 x 10⁻⁵%, tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,0 e Metanol 0,5%) e incubadas a 30 °C sob agitação de 220 rpm. A cada 24 horas foi adicionado metanol absoluto para a concentração final de 0,75% e retiradas alíquotas para avaliação da expressão.

3.7. Expressão heteróloga em larga escala por clones transformados com a construção *pPICZα*A/MAD

Clones foram incubados em tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura BMGY a 30 °C e 220 rpm por 24 horas. Esses 10 mL de cultura foram então transferidos para 500 mL de meio BMGY em erlenmeyer de 2,0 L de capacidade. As culturas foram mantidas a 30°C sob agitação de 220 rpm por 24 horas até atingir a D.O._{600nm} entre 2,0 e 6,0. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos em centrífuga com refrigeração *Hettich* ROTINA 420R. O meio de cultura foi removido e as células foram ressuspendidas em 100 mL de meio de cultura BMMY em erlenmeyer de 500 mL de capacidade e incubado nas mesmas condições anteriores de temperatura e agitação. A cada 24 horas foi adicionado metanol absoluto para a concentração final de 0,75% e retiradas alíquotas para avaliação da expressão. O cultivo foi mantido em meio BMMY por até 144 horas para análise da cinética da expressão.

3.8. Determinação da Biomassa (g/L)

Para a obtenção do peso seco da Biomassa foi realizada a técnica de filtração em papel de filtro. Para tal, determinado volume de cultivo foi submetido a filtração à vácuo em membrana de nitrocelulose, previamente pesadas. Em seguida, a membrana foi submetida a secagem, em estufa a 40 °C até se obter um peso constante. O cálculo do peso seco em g/L foi obtido através da seguinte equação matemática:

Biomassa (g/L) =
$$(m_{final} - m_{membrana})/V$$

Onde:

m_{final} = massa da membrana seca após filtração do cultivo (g)

m_{membrana} = massa da membrana seca (g)

V= volume do cultivo submetido a filtração (L)

3.9. Cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)

Para a obtenção da proteína recombinante, os sobrenadantes das culturas foram usados para a purificação. As amostras foram injetadas em coluna HisTrap HP 5 mL (GE Life Sciences) a qual é carregada com ions Ni²⁺ em uma matriz de SepharoseTM. O processo foi realizado no Akta Pure (GE Life Sciences), com monitoramento constante das amostras. Para os ensaios iniciais foram injetados 2 mL das amostras (sobrenadante do cultivo) em coluna previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (20 mM de Fosfato de sódio e 500 mM de NaCl, pH 7,4). Em seguida, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até os valores de absorbância 280 nm retornarem a linha de base. Após a estabilidade do valor de absorbância, o tampão de eluição (20 mM de Fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 500 mM de Imidazol, pH 7,4) foi injetado com gradientes de 0-100% com 10 volumes de coluna. O fluxo empregado em todo processo foi de 2 mL/min. Para a purificação de volumes maiores, as amostras foram diluídas, em iguais volumes, com de tampão de ligação. As amostras diluídas foram injetadas na coluna HisTap HP 5 mL (GE Life Sciences) previamente equilibrada com tampão de equilíbrio. Em seguida, o processo de lavagem e eluição seguiram as mesmas condições e processos descritos anteriormente.

3.10. Atividade proteolítica com caseína

A atividade proteolítica foi avaliada com o substrato caseína. Para o preparo do substrato foi feito um tampão fosfato monobásico de sódio a 50 mM com pH 6,5 o qual foi mantido em agitador magnético com aquecimento de 85 °C. Em seguida, a massa equivalente a 1% (m/v) de caseína bovina (Sigma) foi adicionada lentamente, sob agitação, até a formação de uma solução homogênea. O ensaio de peptidase foi realizado de acordo com o descrito por Sarath e colaboradores (1996), com algumas modificações. Para a reação, 500 μL do extrato proteico foram incubados com 500 μL de solução 1% (m/v) de caseína (pH 6,5). O tempo de reação foi determinado de acordo com cada amostra. A reação foi interrompida pela adição de 350 μL de solução 10% (m/v) de ácido tricloroacético e os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, a 20 °C por 15 min. A leitura do sobrenadante da reação foi realizada em 280 nm, em espectrofotômetro Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific). A Unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μM tirosina/min sob as condições de ensaio. Todas as reações enzimáticas

foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism version 5.00. Foi considerada como 100% de atividade enzimática o valor obtido para os extratos do controle negativo, ou seja, extrato obtido a partir da linhagem não transformada. Desse modo, o valor de 100% seria a atividade das peptidases nativas secretadas por *Pichia pastoris*, e valores superiores a 100% seriam relativos a peptidase recombinante expressa.

3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Todas as amostras submetidas a avaliação do perfil proteico foram aplicadas em gel de empilhamento 4% e fracionadas em gel desnaturante de polacrilamida 12%. As análises eletroforéticas foram realizadas em condições dissociantes (SDS-PAGE 12%), em sistema *Mini-Protean Tetra* (Bio-Rad Laboratories). As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,5, contendo SDS a 2,5% (m/v), 2-mercaptoetanol a 2,5% (v/v) e glicerol a 10% (v/v)], incubadas em banho-maria a 100 °C, por 5 minutos e aplicadas no gel. As cubas de eletroforese contendo o tampão Tris-glicina/SDS foram realizadas seguindo as condições de eletroforese recomendadas pelo fabricante com ajuste de voltagem para 120 V. Os géis foram corados com com Nitrato de Prata, seguindo protocolo descrito por CRESTE, et al., 2001.Para a obtenção das imagens, os géis foram lavados com água ultrapura e digitalizados no sistema GelDoc™ EZ Imager (BioRad Laboratories). As imagens foram tratadas utilizando o *software* Imagelab.

3.12. Determinação do pH ótimo para atividade da peptidase

Para essa análise, a atividade da peptidase foi analisada utilizando o substrato azocaseína. Para o preparo do substrato, a massa equivalente a 1% (m/v) de azocaseína (Sigma) foi adicionada lentamente, sob agitação, em diferentes tampões, previamente aquecido a 85°C, até a formação de uma solução homogênea. Foram utilizados os tampões, com seus respectivos pHs, conforme descrito na tabela 6. O ensaio de peptidase foi realizado de acordo com com o descrito por Sarath e colaboradores (1996), com algumas modificações. Para a reação, $40~\mu L$ do extrato proteico foram diluídos com $60~\mu L$ dos respetivos tampões, separadamente, e incubados com $300~\mu L$ de solução 1% (m/v) de azocaseína. A

reação foi incubada por 1 hora a 40 °C. A reação foi interrompida pela adição de 600 μL de solução 10% (m/v) de ácido tricloroacético e os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, a 20 °C por 15 min. O sobrenadante foi diluído em uma proporção de 1:1 com NaOH a 0,2 N, e então, foi realizada a leitura em 440 nm, em espectrofotômetro Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific). A Unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μM azocaseína/min sob as condições de ensaio. Os valores das absorbâncias foram analisados de modo relativo, sendo que em cada experimento, uma amostra deve ser considerada como 100%. Todas as reações enzimáticas foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism version 5.00. Para o cálculo de atividade o coeficiente de extinção molar da Azocaseína foi de 75520 M⁻¹.cm⁻¹.O cálculo de atividade está apresentado a seguir:

Atividade =
$$\Delta Abs \times 10^6 x V_{Total}$$

 $t_{(min)} \times 75520 x V_{enz}$

Onde:

Δ Abs = (Abs reação – Abs branco)

V_{Total} = Volume total da reação

 $t_{(min)}$ = Tempo de incubação

V_{enz} = Volume de extrato

Tabela 6. Tampões e respectivos pH avaliados.

pH	Tampão
5,0	100mM Acetato de sódio pH 5,0
6,0	100mM MES pH 6,0
7,0	100mM HEPES pH 7,0
8,0	100mM BICINE pH 8,0
9,0	100mM BICINE pH 9,0
10,0	100mM CAPS pH 10,0

3.13. Determinação da temperatura ótima para atividade da peptidase

Para a avaliação da temperatura ótima da atividade proteolítica da proteína recombinante, a reação foi preparada adicionando-se 40 μ L do extrato proteico e 360 μ L de solução 1% (m/v) de azocaseína preparada no pH ótimo da reação de acordo com ensaio descrito no item 3.12. A reação foi incubada por 1 hora em

diferentes temperaturas, para verificação do efeito da temperatura na atividade enzimática. As temperaturas de 30° C, 35° C, 40° C, 45° C, 50° C e 55° C foram testadas. A reação foi interrompida pela adição de $600~\mu$ L de solução 10% (m/v) de ácido tricloroacético e os tubos foram centrifugados a 10000~x~g, a $20~^{\circ}$ C por 15~min. O sobrenadante foi diluído em uma proporção de 1:1~com~NaOH~a~0,2~N, e então, foi realizada a leitura em 440~nm, em espectrofotômetro Genesys 10S, (Thermo Fisher Scientific). Os cálculos de atividade foram realizados conforme descrito no item 3.12.

4. **RESULTADOS**

4.1. Seleção da peptidase

Com o objetivo de se obter uma peptidase para a aplicação em indústria de detergentes, inicialmente, foi realizado um levantamento de dados da literatura para identificação de possíveis moléculas candidatas. A peptidase escolhida foi a enzima codificada pelo gene *prt1* do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* e caracterizada como *subtilisin-like*. A proteína precursora nativa possui 397 aminoácidos, sendo os primeiros 15 resíduos, equivalentes ao peptídeo sinal e sua massa molecular é de 41-kDa. A enzima madura apresenta massa molecular de 29-kDa e dois possíveis pontos de N-glicosilação (DI PIETRO *et al.*, 2001).

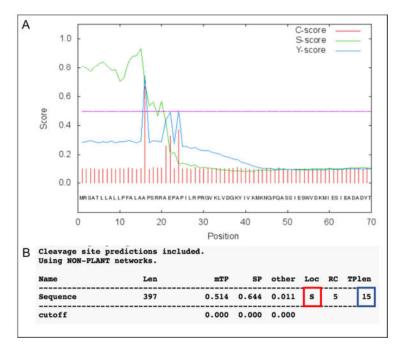
4.2. Caracterização in silico da sequência de aminoácidos

Para verificarmos e confirmarmos essas primeiras caracterizações, a sequência de aminoácidos dessa proteína foi coletada do banco de dados do NCBI. O número de acesso da sequência da proteína descrita como "serine peptidase precursor [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici]" é AAC27316.2 (Figura 4). Posteriormente, essa sequência foi submetida a análises de verificação da presença do peptídeo sinal. De acordo com a demostrado na figura 5, o resultado obtido mostra a presença de um peptídeo sinal referente aos 15 primeiros resíduos de aminoácidos da sequência através dos softwares SignalP e TargetP. Além do peptídeo sinal, o TargetP ainda predisse uma provável localização da proteína na via secretora da célula com mais de 64% de confiabilidade.

Figura 4. Sequência completa dos resíduos de aminoácidos da serine peptidase precursor de número de acesso AAC27316.2. Na sequência estão identificados o peptídeo sinal (amarelo) e a região precursora (verde).

MRSATLLALLPFALAAPSRRAEPAPILRPRGVKLVDGKYIVKMKNGFQASSIE
SWVDKMIESIEADADYTYSKGFGGFAASLKDDELNKLKHDPNVEYIEQDAYIS
ITATTQQSNAPWGIARVSSQSPGGSTYTYDNSAGEGTCAYVIDTGIDVDHPDF
DGRAKFLKNFAGGSDSDGQGHGTHVAGTIGSTTYGVAKKTSLFAVKVLGDDGS
GTNSAVIAGMDFVSGHAKDENCPKGVVVNMSLGGETSDAVNQAAKAIVDAGLF
LAVAAGNDGKDASGSSPASEESACTVGATTRDDTLAEYSNFGSVVDVLAPGTD
ILSTWPNGKTNTISGTSMASPHVAGLAAYFLGLGQKAEGLCDYIASKALDGVI
SNVPSGTVNKLINNGVGGSNSSSIHH

Figura 5. Análise da presença de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos AAC27316.2. (A) Análise da presença de peptídeo sinal no *software SiganIP*. A linha horizontal tracejada rosa determina o grau de confiabilidade do resultado. A linha vertical vermelha indica o sítio de clivagem. A linhas verde indica o peptídeo sinal. A linha azul é *score* da análise da combinação do sítio de clivagem mais o peptídeo sinal. (B) Análise da sublocalização celular da proteína no *software TargetP*. A caixa vermelha identifica a letra "s" de secreção e a caixa azul o sítio de clivagem do peptídeo sinal no resíduo 15.



Após a verificação da presença de peptídeo sinal, a sequência de aminoácidos, desprovida desse peptídeo foi submetida as análises do ponto isoelétrico e massa molecular no *software Compute pl/Mw*. As análises mostraram que a proteína precursora, madura e a pró-região apresentam, respectivamente, pontos isoelétricos teóricos que correspondem aos valores 4,89, 4,57 e 8,22. As massas moleculares foram de aproximadamente 39,28 kDa para a proteína precursora, 30,64 kDa para a proteína madura e 8,65 kDa para a pró-região (Tabela 7).

As sequências de resíduos de aminoácidos também foram submetidas a análises de glicosilação para verificação da presença de potencias sítios de N- e O-glicosilação, pois esse processo pós-traducional pode interferir na função da proteína e deve ser considerado para seleção do sistema de expressão. As análises foram realizadas a partir dos dados obtidos nos softwares *NetOGlyc* e *NetNGlyc*. De

acordo com os resultados gerados podemos verificar a presença de 1 potencial sítios de N-glicosilação, considerando o limite de confiabilidade apresentado no gráfico (Figura 6 A). Os potenciais sítios e O-glicosilação foram identificados nos resíduos de números 3, 99, 109, 110, 112 e 116 da sequência da proteína precursora, e, estavam acima do limite de confiabilidade do *software* (Figura 3B).

Tabela 7. Sequências de aminoácidos empregadas nas análises *in silico*. Identificação das massas moleculares (MM) e pontos isoelético teórico (PI).

Construção	Sequência de aminoácidos	MM / PI
PREC*	APSRRAEPAPILRPRGVKLVDGKYIVKMKNGFQASS	39,28 kDa
	IESWVDKMIESIEADADYTYSKGFGGFAASLKDDEL	e 4,89
	NKLKHDPNVEYIEQDAYISITATTQQSNAPWGIARV	
	SSQSPGGSTYTYDNSAGEGTCAYVIDTGIDVDHPDF	
	DGRAKFLKNFAGGSDSDGQGHGTHVAGTIGSTTYGV	
	AKKTSLFAVKVLGDDGSGTNSAVIAGMDFVSGHAKD	
	ENCPKGVVVNMSLGGETSDAVNQAAKAIVDAGLFLA	
	VAAGNDGKDASGSSPASEESACTVGATTRDDTLAEY	
	SNFGSVVDVLAPGTDILSTWPNGKTNTISGTSMASP	
	HVAGLAAYFLGLGQKAEGLCDYIASKALDGVISNVP	
	SGTVNKLINNGVGGSNSSSIHH	
MAD*	PNVEYIEQDAYISITATTQQSNAPWGIARVSSQSPG	30,64 kDa
	GSTYTYDNSAGEGTCAYVIDTGIDVDHPDFDGRAKF	e 4,57
	LKNFAGGSDSDGQGHGTHVAGTIGSTTYGVAKKTSL	,
	FAVKVLGDDGSGTNSAVIAGMDFVSGHAKDENCPKG	
	VVVNMSLGGETSDAVNQAAKAIVDAGLFLAVAAGND	
	GKDASGSSPASEESACTVGATTRDDTLAEYSNFGSV	
	VDVLAPGTDILSTWPNGKTNTISGTSMASPHVAGLA	
	AYFLGLGQKAEGLCDYIASKALDGVISNVPSGTVNK	
	LINNGVGGSNSSSIHH	
PROREG*	APSRRAEPAPILRPRGVKLVDGKYIVKMKNGFQASS	8,65 kDa
	IESWVDKMIESIEADADYTYSKGFGGFAASLKDDEL NKLKHD	e 8,22

^{*}PREC - Precursora da peptidase; MAD - Peptidase madura; PROREG - Pró-região

4.3. Clonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG

Os insertos que codificam a proteína precursora (PREC), a proteína madura (MAD) e a pró-região da proteína (PROREG) foram inicialmente amplificados e analisados a partir da presença e do tamanho dos fragmentos em gel de agarose. Conforme a figura 7, podemos verificar a amplificação dos três insertos. O inserto de PROREG corresponde aos fragmentos de 234 pb. O inserto MAD corresponde aos fragmentos de 912 pb. O inserto PREC corresponde aos fragmentos de 1146 pb.

Figura 6. Análise da presença de potenciais sítios glicosilação na sequência de aminoácidos do precursor da peptidase. (A). Gráfico gerado a partir das análises realizadas no software *NetOGlyc* para verificação de N-glicosilação. Linhas verticais verdes indicam os potenciais sítos de glicosilação (*Potential*). A linha horizontal vermelha indica o limite de confiabilidade (*Threshold*) (B). Sequência de aminoácidos indicando os resíduos com potenciais sítos de O-glicosilação (amarelo) dados pela análise do software *NetOGlyc*. A sequência em azul mostra a pró-região.

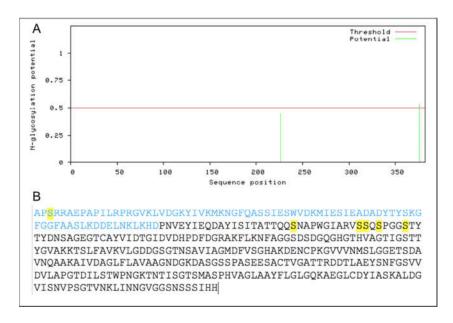
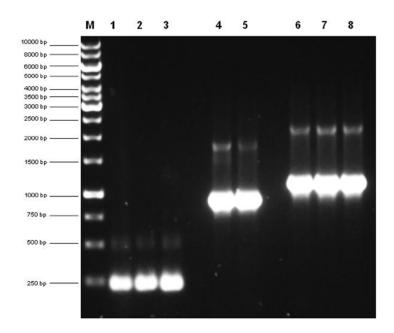
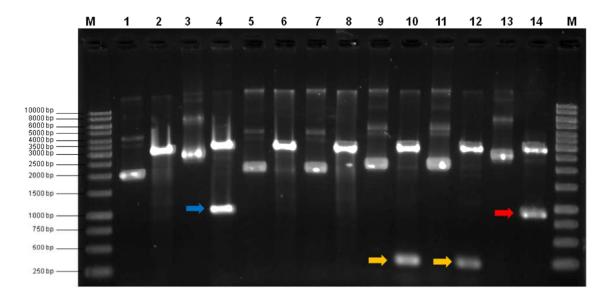


Figura 7. Amplificação dos insertos codificadores das PROREG, MAD e PREC. Gel de agarose 1% corado com *SYBR*® *gold* mostrando os produtos da PCR correspondentes aos insertos PROREG (amostras 1, 2 e 3), MAD (amostras 4 e 5) e PREC (amostras 6, 7 e 8). M indica o marcador *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.



Os insertos PROREG, MAD e PREC obtidos por PCR foram submetidos à clonagem em vetor pJET1.2/blunt. As construções pJET/PROREG, pJET/MAD e pJET/PREC foram usadas para transformação de E. coli DH10B. Colônias isoladas foram obtidas após o inóculo em meio seletivo para todas as construções em análise. Uma colônia da construção pJET/MAD e três colônias das construções pJET/PREC, pJET/PROREG foram coletadas e usadas para confirmação da clonagem a partir da identificação da liberação dos insertos MAD, PREC e PROREG, respectivamente. Após o isolamento dos plasmídeos, estes foram tratados com as enzimas de restrição Xbal e Xhol e analisados após eletroforese em gel de agarose. Dois dos clones obtidos, após a transformação com a construção pJET/PROREG, foram positivos para a presença do inserto, enquanto que apenas um clone de pJET/PREC e um de pJET/MAD foram positivos (Figura 8).

Figura 8. Análise da restrição das construções *pJET*/PROREG, *pJET*/MAD e *pJET*/PREC. Gel de agarose 1% corado com *SYBR® gold* mostrando os plasmídeos extraídos dos clones selecionados antes e após reação de restrição. As mostras 1, 3, 5 correspondem aos plasmídeos da construção pJET/PREC e as amostras 2, 4, 6 correspondem aos produtos da restrição desses plasmídeos, respectivamente. As mostras 7, 9, 11 correspondem aos plasmídeos da construção pJET/PROREG e as amostras 8, 10, 12 correspondem aos produtos da restrição desses plasmídeos, respectivamente. A amostra 13 corresponde a construção pJET/MAD, sendo a amostra 14 o produto da restrição desse plasmídeo. As setas indicam a liberação dos insertos PREC (azul), PROREG (amarela) e MAD (vermelha). M indica o marcador *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.



4.4. Subclonagem dos insertos PREC, MAD e PROREG em vetor de expressão

As construções obtidas pela clonagem de PREC, MAD e PROREG no vetor *pJET1.2/blunt*, como previamente descrito, tiveram seus insertos sequenciados para verificação da sequência de nucleotídeos. Após a confirmação das sequências de nucleotídeos corretas, estes insertos foram usados para a subclonagem em vetor de expressão.

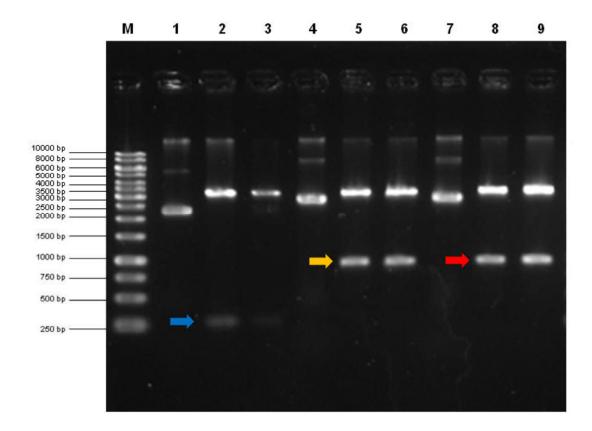
Para esse processo foram usados dois vetores de expressão em *Pichia pastoris*, sendo eles, os vetores *pGAPZαA*, para expressão constitutiva, e *pPICZαA*, para obtenção de uma expressão induzida a partir da adição de metanol. A Figura 3, apresentada no material e método, mostra os diferenças e similaridades entre esses vetores, bem como a presença dos sítios de restrição de *Xbal* e *Xhol* usados para a inserção dos fragmentos PREC, MAD e PROREG retirados de *pJET1.2/blunt* com as mesmas enzimas.

As construções *pJET/PREC*, *pJET/MAD* e *pJET/PROREG* e os vetores de expressão *pGAPZαA* e *pPICZαA* foram submetidos à restrição com as enzimas *Xbal* e *Xhol*. Todos os insertos liberados, bem como ambos os vetores linearizados foram analisados em gel de agarose, de onde foram removidos e purificados para a reação de ligação (dado não mostrado). Os produtos das ligações foram usados para transformação de *E. coli* DH10B para obtenção das construções dos plasmídeos de expressão *pGAPZαA/PREC*, *pGAPZαA/MAD*, *pGAPZαA/PROREG*, *pPICZαA/PREC*, *pPICZαA/PROREG*. As colônias obtidas, supostamente contendo as construções, foram coletadas para extração dos plasmídeos e verificação da presença ou ausência dos insertos PREC, MAD e PROREG a partir da análise dos produtos da reação de restrição com as enzimas *Xbal* e *Xhol*. A Figura 9 mostra a obtenção de clones positivos para a presença das construções *pGAPZαA/PREC*, *pGAPZαA/MAD* e *pGAPZαA/PROREG*, pois todos os plasmídeos testados apresentaram os insertos liberados.

As construções relativas ao vetor indutível *pPICZαA/PREC*, *pPICZαA/MAD* e *pPICZαA/PROREG* também apresentaram positividade a presença dos insertos após a análise da reação de restrição dos plasmídeos obtidos dos clones (Figura 10). Após análise do sequenciamento, identificou-se que a clonagem da peptidase madura ocorreu em correta fase de leitura. Diante dos resultados obtidos, pode-se

continuar com o desenvolvimento do trabalho e empregar as diferentes construções produzidas para transformação de *P. pastoris*.

Figura 9. Análise da restrição das construções *pGAPZαA*/PREC, pGAP*Z*αA/MAD e *pGAPZαA*/PROREG. Gel de agarose 1% corado com *SYBR*® *gold* mostrando os plasmídeos extraídos dos clones selecionados antes e após reação de restrição. As amostras identificadas como 1, 4, 7 correspondem aos plasmídeos fechados *pGAPZαA*/*PROREG*, *pGAPZαA*/*PREC* e *pGAPZαA*/*MAD*, respectivamente. As amostras identificadas como 2 e 3 são os produtos da restrição de *pGAPZαA*/*PROREG*, as identificadas como 5 e 6 são os produtos da restrição de *pGAPZαA*/*PREC* e as identificadas como 8 e 9 mostram os produtos da restrição de *pGAPZαA*/*MAD*. As setas indicam a liberação dos insertos PROREG (azul), PREC (amarela) e MAD (vermelha). M corresponde ao marcador *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.

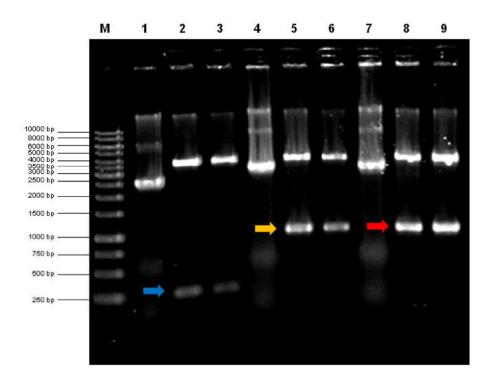


4.5. Obtenção de clones de *P. pastoris*

Com o intuito de otimizar o tempo de trabalho e viabilizar a conclusão do trabalho, optamos por prosseguir com as construções do inserto da proteína madura (MAD). Portanto, os vetores *pGAPZαA/MAD* e *pPICZαA/MAD* foram extraídos, linearizados e purificados para transformação de *P. pastoris* KM71H.

Os vetores obtidos e linearizados são mostrados na figura 11. As bandas entre 4000 e 5000 pb, correspondem as construções *pPICZαA/MAD* e *pGAPZαA/MAD* linearizadas. A construção *pPICZαA/MAD* possui tamanho de 4512 bp (3600 pb do vetor e 912 pb do inserto). A banda única no gel de agarose indica que o DNA foi completamente linearizado.

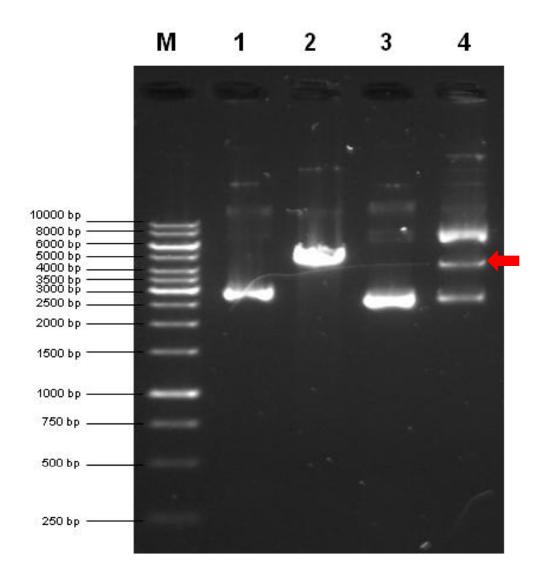
Figura 10. Análise da restrição das construções *pPICZαA*/PREC, *pPICZαA*/MAD e *pPICZαA*/PROREG. Gel de agarose 1% corado com *SYBR*® *gold* mostrando os plasmídeos extraídos dos clones selecionados antes e após reação de restrição. As amostras identificadas como 1, 4, 7 correspondem aos plasmídeos fechados *pPICZαA*/*PROREG*, *pPICZαA*/*PREC* e *pPICZαA*/MAD, respectivamente. As amostras identificadas como 2 e 3 são os produtos da restrição de *pPICZαA*/*PROREG*, as identificadas como 5 e 6 são os produtos da restrição de *pPICZαA*/*PREC* e as identificadas como 8 e 9 mostram os produtos da restrição de *pPICZαA*/MAD. As setas indicam a liberação dos insertos PROREG (azul), PREC (amarela) e MAD (vermelha). M corresponde ao marcador *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.



A construção pGAPZaA/MAD possui o tamanho de 4012 pb (3100 pb do vetor e 912 pb do inserto). Cabe ressaltar que as bandas a mais que aparecem na amostra, submetida a restrição, correspondem a digestão parcial do plasmídeo, mas como o fragmento linearizado foi posteriormente recortado e purificado para a

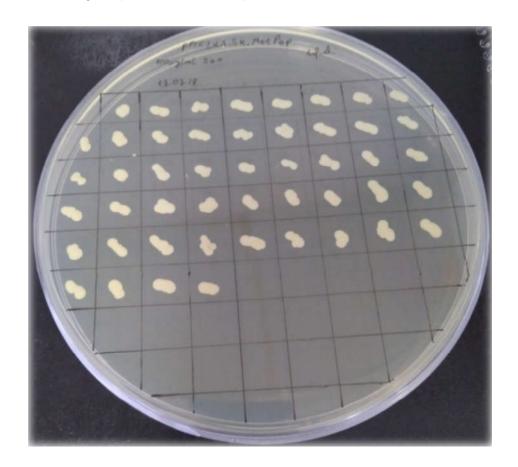
transformação, este resultado não interferiu nos passos subsequentes para obtenção de clones de expressão.

Figura 11. Análise dos vetores de expressão $pPICZ\alpha A/MAD$ e $pGAPZ\alpha A/MAD$. Gel de agarose 1% corado com SYBR® gold mostrando ambos os vetores circulares e linearizados. As amostras 1 e 3 correspondem, respectivamente, aos vetores $pPICZ\alpha A/MAD$ e $pGAPZ\alpha A/MAD$ antes da linerização. As amostras 2 e 4 correspondem aos vetores $pPICZ\alpha A/MAD$ e $pGAPZ\alpha A/MAD$ linearizados após o tratamento com as enzimas Pmel e XmaJI, respectivamente. A seta vermelha indica a parte do vetor $pGAPZ\alpha A/MAD$ que foi purificada do gel.M corresponde ao marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.



Os vetores linearizados foram usados para transformação de *P. pastoris*. Os clones foram selecionados em meio seletivo contendo *Zeocin*®. Para ambas construções (pGAPZαA/MAD, pPICZαA/MAD) foram coletadas 48 colônias para a continuidade dos experimentos. Portanto, podemos verificar a boa eficiência da transformação empregada. As colônias selecionadas foram cultivadas e mantidas em meio seletivo conforme representado na figura 12.

Figura 12. Foto representativa da coleta e manutenção das colônias de *P. pastoris*. Clones obtidos pela transformação com os vetores de expressão da proteína madura, construções *pGAPZαA/MAD* e *pPICZαA/MAD*.



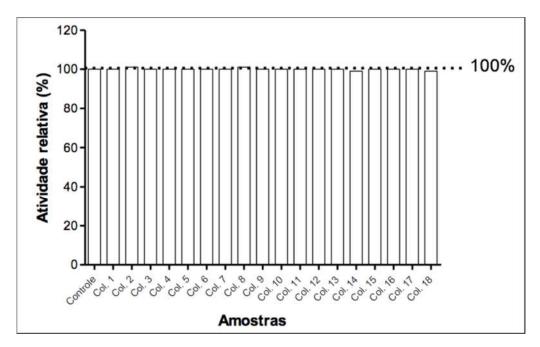
4.6. Seleção dos clones de *P. pastoris* produtores da peptidase

Tendo obtido diferentes e muitos clones, o próximo passo foi analisar a produção da proteína madura. Para identificarmos os clones de *P. pastoris* transformadas com a construção *pGAPZαA/MAD* (PpGAP_Mad), que eram

produtoras da peptidase, diferentes clones foram cultivados e o sobrenadante das culturas foi coletado e submetido a análise de sua atividade proteolítica.

No ensaio realizado com os sobrenadantes de culturas de 18 clones *P. pastoris*_Mad não se obteve a atividade enzimática esperada para os clones testados. Todas as linhagens usadas apresentaram uma atividade enzimática próxima a 100%, a mesma verificada para a linhagem parental controle (Figura 13). Novos ensaios foram conduzidos com as outras 30 colônias obtidas, mas nenhum dos clones foi identificado como um clone produtor de peptidase ativa. Portanto, não foi possível selecionar um clone com produção da peptidase madura.

Figura 13. Atividade proteolítica dos extratos secretados por clones de *P. pastoris* transformadas com as construções de promotor constitutivo. Os sobrenadantes de culturas de 18 clones de *P. pastoris* transformadas com o *pGAPZαA/MAD* foram coletados, após 96 horas, e empregados para avaliação da atividade enzimática. O controle do experimento foi realizado com o sobrenadante da cultura de *Pichia pastoris* KM71H parental (não transformada) submetida ao mesmo processo.

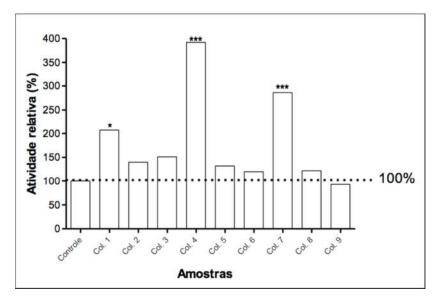


Para o ensaio realizado com os sobrenadantes de culturas de 9 clones de *P. pastoris* transformadas com a construção *pPICZαA/MAD* (PpPIC_Mad), foi possível observar a atividade enzimática aumentada em três clones, de forma significativa, quando comparada a atividade enzimática apresentada pelo sobrenadante da linhagem parental controle (Figura 14).

Os clones identificados como Col.1, Col.4 e Col.7, que se mostraram promissores na produção da peptidase, verificada de forma indireta pela atividade enzimática, foram novamente inoculadas para a obtenção da peptidase em maior escala. Os cultivos em meio de cultura BMMY foram avaliados em relação a quantidade de biomassa e atividade proteolítica a cada 24 horas.

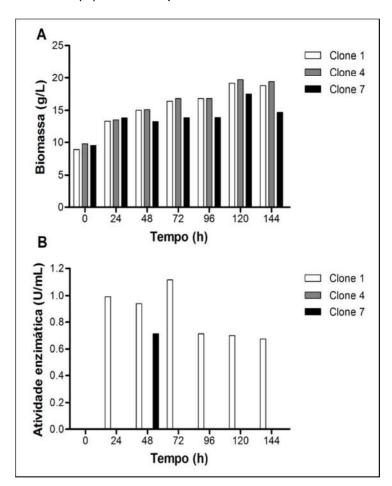
A análise da biomassa, realizada pela medida do peso seco, foi realizada durante todo o processo de cultivo dos diferentes clones a cada 24 horas. Este processo mediu de forma indireta o crescimento celular dos clones. Durante a fase de crescimento, que transcorreu por 24 horas, em meio de cultura BMGY, não foi observada diferença significativa na quantidade de biomassa entre os diferentes clones testado, pois todos apresentaram um peso seco de aproximadamente 3 g/L. Quando o peso seco foi avaliado, durante a fase de indução, ou seja, entre 0 e 144 horas, o Col.7 teve um crescimento inferior quando comparado aos Col.1 e Col.4, mas essa diferença não foi significativa. Os Col.1, Col.4 e Col.7 apresentaram os pesos secos com valores de 18,8 e 19,4 e 14,7 g/L após 144 horas de cultivo (Figura 15 A).

Figura 14. Atividade proteolítica dos extratos secretados por clones de *P. pastoris* transformadas com as construções de promotor indutível. Os sobrenadantes de culturas de 9 clones de *P. pastoris* transformadas com o *pPICZαA /MAD* foram coletados, após 96 horas, e empregados para avaliação da atividade enzimática. O controle do experimento foi realizado com o sobrenadante da cultura de *Pichia pastoris* KM71H parental (não transformada) submetida ao mesmo processo. Asterisco único indica p<0,05 e asterisco triplo indica p<0,01 em relação ao controle.



O teste de atividade enzimática foi realizado com o sobrenadante das culturas dos três clones a cada 24 horas de indução. O sobrenadante de Col.4 não demonstrou efeito proteolítico em nenhum dos tempos testados. O Col.7, apresentou atividade proteolítica somente no tempo de 48 horas depois da indução com metanol. O Col.1 apresentou atividade proteolítica em todos os tempos testados, sendo o no tempo de 72 horas a maior atividade enzimática observada (Figura 15 B). Este resultado determinou, indiretamente, a produção da peptidase pelo Col.1, e, portanto, este clone foi selecionado para a continuidade dos estudos.

Figura 15. Análise da biomassa dos clones Col.1, Col.4 e Col.7 e da atividade proteolítica de seus produtos secretados. Três cones de *P. pastoris*, obtidos pela transformação com *pPICZαA/MAD*, foram cultivados em meio BMGY por 24 horas, e posteriormente, foram induzidos com meio BMMY por 144 horas. (A) Determinação da biomassa da cultura. (B) Atividade proteolítica do sobrenadante da cultura.

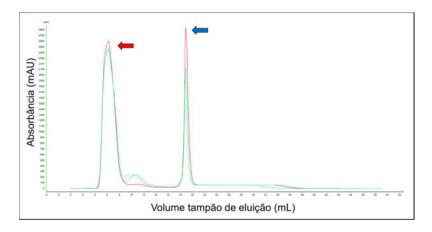


Apesar do Col.4 não apresentar atividade enzimática e Col.7 apresentar somente no tempo de 48 horas após a indução, estes clones também foram

avaliados quanto a produção da peptidase em estudo, pois esta proteína pode ser produzida mas não desempenhar sua função. Os sobrenadantes das três culturas com crescimento de 144 horas foram submetidos a IMAC para verificação da expressão da peptidase e obtenção da proteína purificada em coluna de níquel, pois a clonagem do inserto MAD foi realizado em fusão com o segmento de DNA que codifica na região N-terminal uma cauda de histidina (*HisTag*).

Os perfis cromatográficos das purificações das amostras dos três clones mostram a presença de dois picos de elevada absorbância condizentes com os momentos da injeção da amostra (primeiro pico) e da eluição das moléculas que ficaram ligadas à coluna de níquel (segundo pico). Estes dados sugerem a presença da proteína purificada, pois apresentou um único pico homogêneo (Figura 16).

Figura 16. Gráfico dos perfis obtidos a partir da cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). Dois mililitros dos sobrenadantes das culturas dos clones 1, 4 e 7 de *P. pastoris* transformada com *pPICZαA/MAD* e induzidas por 144 horas foram aplicadas na coluna de níquel. As linhas vermelha, verde e azul representam os sobrenadantes de Col.1, Col.4 e Col.7, respectivamente. A medida de absorbância está identificada no eixo Y em mAU. As setas vermelhas e azul correspondem aos momentos de injeção e eluição da amostra, respectivamente.

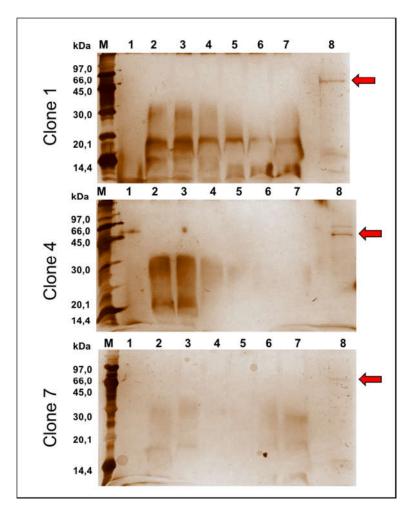


A partir destes resultados, antes de prosseguir com os experimentos, foi realizada a avaliação da presença da proteína no sobrenadante da cultura de todos os clones e em todos os tempos de coleta das amostras, durante o processo de indução, através da aplicação das diferentes amostras em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

Os perfis proteicos encontrados a partir da observação do SDS-PAGE indicam a presença de proteínas similares em todos os sobrenadantes,

diferenciando, em alguns tempos, na quantidade das moléculas. A figura 17 mostras maiores quantidades proteicas no sobrenadante das culturas do Col.1 que nos outros dois clones analisados, o que já era esperado, visto a maior atividade enzimática exercida por este sobrenadante (Figura 15 B).

Figura 17. Análise dos perfis proteicos dos sobrenadantes das culturas de clones de *P. pastoris* transformadas com pPICZαA/MAD. SDS-PAGE 12% corado com prata. A raia identificada como M mostra o marcador de peso molecular de proteínas *LMW GE*. Perfil proteico dos sobrenadantes das culturas de Col.1, Col.4 e Col.7 em diferentes tempos de indução. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem, respectivamente, as amostras coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas para todos os géis. As raias identificadas como 8 mostram os produtos da purificação por IMAC dos sobrenadantes das culturas de Col.1, Col.4 e Col.7 no tempo de 144 horas. As setas indicam a presença de uma proteína de aproximadamente 50 KDa.



Quando se analisa os produtos das purificações realizadas com os sobrenadantes dos três clones, todos apresentam uma proteína de massa molecular

de aproximadamente 50 kDa (Figura 17). Essa massa da peptidase não era a esperada, pois as análises *in silico* realizadas, mostraram que a proteína madura teria uma massa aproximada de 30 kDa (Tabela 7).

Estes resultados verificaram, que apesar da peptidase estar com tamanho diferente do tamanho teórico esperado na análise *in silico*, ela apresentou resultado enzimático condizente com sua função. Além disso essa proteína pode ter sofrido modificações pós-traducionais como glicosilação, também verificada pelas análises *in silico* em outros *softwares*.

Col.1 foi o clone de escolha para a produção da peptidase, pois os sobrenadantes de suas culturas apresentaram maior produção de proteínas, bem como, melhor atividade proteolítica no sobrenadante de suas culturas.

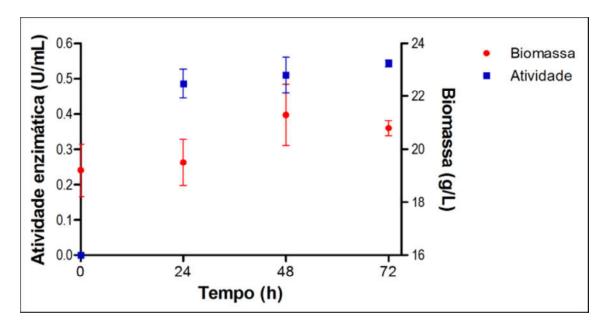
4.7. Obtenção e purificação da peptidase madura

O processo de produção de peptidase madura recombinante (pMAD) foi realizado a partir da indução de Col.1 por um período de 72 horas, pois de acordo com os dados analisados, a maior atividade enzimática obtida pelo sobrenadante da cultura deste clone foi neste tempo. Após a indução, o peso seco da cultura e a atividade proteolítica e perfil proteico do sobrenadante da cultura foram analisados.

A biomassa foi analisada nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas do processo de indução, e se manteve praticamente constante, com valores em torno de 20 g/L. Este resultado corrobora com os dados observados para a atividade enzimática encontrada com os sobrenadantes das respetivas culturas, onde também se manteve-se praticamente constante nos mesmos tempos avaliados. Estes resultados indicam que a expressão da peptidase funcional já ocorre nas primeiras 24 horas de indução sem um incremento significativo na sua produção em tempos superiores, o que está intrinsecamente relacionado com o balanço entre a produção e a degradação da peptidase ativa (Figura 18).

Com a finalidade de verificar indícios da presença da pMAD nos sobrenadantes das culturas analisadas quanto a atividade enzimática, os sobrenadantes foram aplicados em SDS-PAGE. De acordo com a figura 19 podemos verificar a presença de uma banda proteíca de massa molecular próxima a 30 kDa, o tamanho esperado para a pMAD conforme analises *in silico*.

Figura 18. Análise da biomassa e da atividade proteolítica das culturas de Col.1. O clone 1 de *P. pastoris* transformada com *pPICZαA/MAD* foi cultivado em meio de indução BMMY por 72 horas. A determinação da biomassa foi realizada nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, assim como a das atividades enzimáticas dos sobrenadantes das culturas.



Diante destes resultados promissores, seguimos para o processo de purificação de pMAD em coluna de níquel após aplicação dos sobrenadantes das culturas de 24, 48 e 72 horas. Como podemos verificar na figura 20, todos os sobrenadantes apresentaram um pico homogêneo durante o processo de eluição da amostra ligante da coluna, bem como, apresentaram um perfil de purificação bastante similar, diferenciando apenas nas quantidades do produto purificados.

As frações purificadas e as frações dos sobrenadantes das culturas, que passaram pela coluna (*flowthrough*) no processo de purificação, foram analisadas em SDS-PAGE para verificação da presença da pMAD purificada. A figura 21 mostra a presença de uma proteína de massa molecular próxima de 30 kDa nas frações eluídas da coluna, enquanto que nas frações do flowthrough, a presença dessa mólecula estava em quantidades bem inferiores. Além disso, nas frações purificadas, quase não se identifica moléculas contaminantes (Figura 21). Portanto, estes resultados possibilitaram a verificação da atividade proteolítica da pMAD isolada sob as condições de pH e temperatura.

Figura 19. Análise dos perfis proteicos dos sobrenadantes das culturas do clone 1 de *P. pastoris*. SDS-PAGE 12% corado com prata. As raias identificadas como M mostram o marcador de peso molecular de proteínas *LMW GE*. Perfil proteico dos sobrenadantes das culturas de Col.1 em diferentes tempos de indução. Os números 1-3 correspondem a 24 horas de indução (triplicata). Os números 4-6 correspondem a 48 horas de indução (triplicata). Os números 7-9 correspondem a 72 horas de indução (triplicata). A raia identificada como T0 mostra o perfil proteíco do sobrenadante da cultura de Col.1 antes da indução. As setas indicam a presença de uma proteína de aproximadamente 30 KDa.

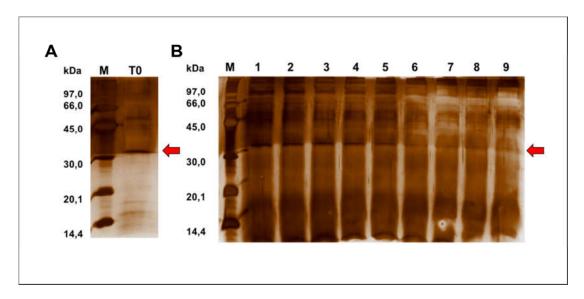


Figura 20. Gráfico dos perfis cromatográficos obtidos a partir da cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). Sobrenadantes das culturas do clone 1 de *P. pastoris* com diferentes tempos de indução. As linhas vermelha, verde e azul identificam os dados obtidos para os sobrenadantes das culturas de tempos de indução de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A medida de absorbância está identificada no eixo Y em mAU.

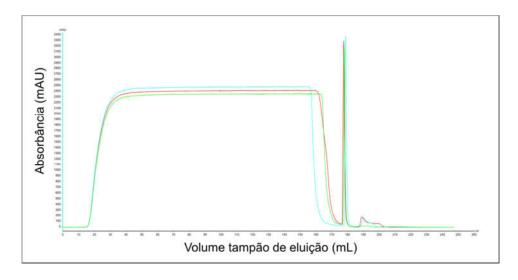
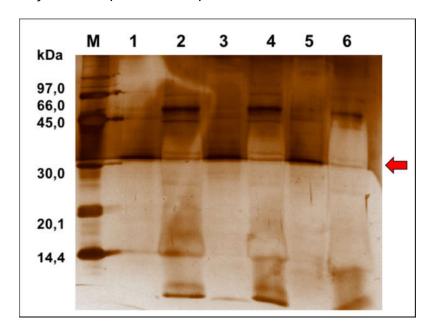


Figura 21. Análise da purificação de pMAD. SDS-PAGE 12% corado com prata contendo alíquotas das frações purificadas e flowthrough dos sobrenadantes das culturas de clones 1 de *P. pastoris* induzidas em diferentes tempos. A raia identificada como M mostra o marcador de peso molecular de proteínas *LMW GE*. As raias 1 e 2 correspondem, respectivamente, às frações purificada e flowthrough de tempo de 24 horas. As raias 3 e 4 correspondem, respectivamente, às frações purificada e flowthrough de tempo de 48 horas. As raias 5 e 6 correspondem, respectivamente, às frações purificada e flowthrough de tempo de 72 horas. A seta indica a presença de uma proteína de aproximadamente 30 KDa.



4.8. Determinação de condições ótimas de pH e temperatura para atividade da pMAD

A pMAD purificada foi inicialmente submetida a avaliação de sua atividade proteolítica em condições normais, conforme previamente padronizado, e mostrou atividade proteolítica (Figura 22). Subsequentemente, essa atividade enzimática foi estuda em diferentes condições de pH e temperatura. Para determinar o pH ótimo para atividade de pMAD, esta proteína foi empregada em reações contendo pHs entre os valores de 5,0 e 10,0. A pMAD apresentou melhor atividade proteolítica no pH 8,0 (Figura 23 A).

Para a identificação da melhor temperatura para o efeito proteolítico de pMAD, frações de uma mesma reação foram incubadas em temperaturas diferentes. Curiosamente, esta peptidase apresentou maior atividade na temperatura de 40 °C

(Figura 23 B). Cabe ainda ressaltar, que curiosamente, pMAD apresentou um efeito melhor em temperaturas superiores a 40 °C que a 35 °C.

Figura 22. Análise da atividade proteolítica da pMAD purificada. A atividade enzimática dos diferentes tempos está mostrada juntamente com a área do pico cromatográfico obtido nos processos de eluição de cada amostra. As análises foram determinadas com as frações purificadas dos sobrenadantes da cultura dos tempos de 24, 48 e 72 horas.

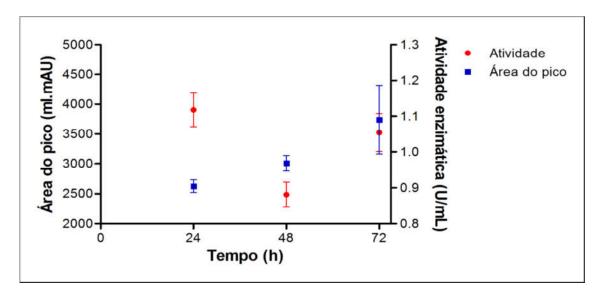
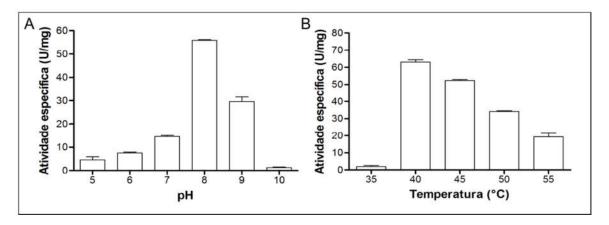


Figura 23. Análise das condições ótimas de pH e temperatura para a atividade proteolítica da pMAD purificada. A atividade da peptidase em diferentes pHs e temperatura foi analisada em ensaio com substrato de Azocaseína. (A) Efeito do pH na atividade específica. (B) Efeito da temperatura na atividade específica.



5. DISCUSSÃO

A importância da biotecnologia, bem como sua aplicabilidade são percebidas desde tempos antigos, como por exemplos na produção do pão, na fabricação de bebidas alcoólicas e na produção de diversos alimentos. Mas dados recentemente mostram a utilização de uma biotecnologia moderna com o um efeito dramático na economia e na sociedade mundiais (SAI et al., 2011). A partir desta biotecnologia, podemos obter vários produtos para uma diversidade de propósitos. As aplicações industriais para enzimas microbianas cresceram imensamente nos últimos anos. Os produtos relacionados vêm aumentando nos campos da medicina, diagnóstico, alimentos, nutrição, detergentes, couro, têxtil, papel e plástico (LIU et al., 2013). Vista a importância das enzimas em várias atividades biológicas, e a disponibilidade do uso de processos biotecnológicos de engenharia genética, este trabalho apresentou estudos preliminares de uma peptidase de Fusarium oxysporum através de expressão heteróloga em P. pastoris.

Com o objetivo de se obter uma peptidase para a aplicação em indústria de detergentes, uma peptidase do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, caracterizada como *subtilisin-like* (DI PIETRO, *et al.*, 2001), foi selecionada para o estudo. Essa proteína foi produzida, purificada e passou por avaliação de atividade enzimática, bem como, de identificação de seus pHs e temperatura ótimos. Mas para a sua produção, foram necessárias algumas análises *in silico* para a seleção do melhor e mais vantajoso sistema de expressão, pois conforme descrito por Gomes e colaboradores (2016), processos pós-traducionais, como a remoção de peptídeo sinal e glicosilações, devem ser considerados, pois interferem na atividade funcional da proteína, e dependendo do sistema de expressão utilizado, essas modificações podem não ocorrer.

A análise *in silico* realizada para a determinação de uma possível sequência de peptídeo sinal demonstrou que essa peptidase do fungo *F. oxysporum* possui um peptídeo sinal. Corroborando com esses dados, outra análise mostrou a possível localização dessa peptidase na via secretora da célula, pois as proteínas são direcionadas a via de secreção, principalmente, através do reconhecimento do peptídeo sinal. Além disso, essa sequência apresentou possíveis sítios de glicosilação, que podem estar envolvidos na atividade enzimática da peptidase.

Diante destes dados, o sistema de expressão em *P. pastoris* foi escolhido para a obtenção da proteína recombinante.

Outro aspecto que foi abordado por esse estudo foi a utilização de sequências de nucleotídeos para codificação de diferentes produtos proteicos, pois a subtilisina de *F. oxysporum* é produzida em sua forma nativa, como uma pró-enzima, que precisa ser ativada através de um mecanismo de remoção da pró-região inibitória. Por esse motivo, optou-se por produzir diferentes construções com o objetivo de entender o mecanismo de ativação enzimática e produzir uma peptidase funcional. O gene da peptidase foi sintetizado a partir da sequência de aminoácidos, e possibilitou a otimização de códons. Usando esse gene sintético, os insertos que codificam a proteína precursora (PREC), a proteína madura (MAD) e a pró-região da proteína (PROREG) foram amplificados e usados para a clonagem em dois vetores de expressão em *P. pastoris*.

Os vetores de expressão em *Pichia pastoris* empregados neste estudo foram o *pGAPZαA*, para expressão constitutiva, e *pPICZαA*, para obtenção de uma expressão induzida a partir da adição de metanol. Dois diferentes processos de expressão foram testados, pois existe vantagens e desvantagens para ambos os processos, como por exemplo, a possibilidade da expressão constitutiva de determinadas moléculas tóxicas provocar a morte do microrganismo, e por outro lado, a expressão a partir da indução por metanol ser mais lenta e menos produtiva (POTVIN *et al.*, 2012).

Apesar da obtenção de todas as construções propostas em vetores de expressão em *P. pastoris*, ou seja, os plasmídeos *pGAPZαA/PREC*, *pGAPZαA/MAD*, *pGAPZαA/PROREG*, *pPICZαA/PREC*, *pPICZαA/MAD* e *pPICZαA/PROREG*, somente as construções com o inserto para codificação da proteína madura foram utilizadas para os próximos passos. Esta decisão foi baseada na hipótese de iniciarmos os estudos com a proteína ativa, e depois empregarmos esforços, caso fosse necessário, nos demais produtos proteicos.

Vários clones de *P. pastoris* foram obtidos para ambas as construções *pGAPZαA/MAD* e *pPICZαA/MAD*. Neste momento de seleção dos clones com expressão da proteína recombinante, a produção foi avaliada de forma indireta, isto é, por meio da verificação da atividade enzimática de peptidase. Todos os clones da construção realizada para a expressão constitutiva, que foram testados, não

apresentaram atividade proteolítica. Este resultado foi diferente para os clones obtidos a partir da construção com vetor de expressão induzida com metanol, pois os sobrenadantes das culturas de três clones testados apresentaram atividade proteolítica.

Para esses sobrenadantes, os perfis cromatográficos foram analisados e apresentaram-se semelhantes e condizentes com a obtenção de uma proteína recombinante pela presença de um pico único durante o processo de eluição das moléculas ligadas a coluna de afinidade. Mas curiosamente, quando verificamos o perfil proteico em gel de poliacrilamida, não foi visualizado nenhuma proteína de massa molecular de 30 kDa, conforme esperado, mas outra com aproximadamente 50 kDa. Sabendo da possibilidade de glicosilação a mais de proteínas no sistema de *P. pastoris* (CEREGHINO & CREEG, 2000), aventamos a hipótese desse processo ter acontecido, mas independente dessa alteração, a proteína manteve sua função, que é o objetivo central desse trabalho.

A partir de outros processos de expressão para obtenção da proteína recombinante em larga escala foi verificado a mesma atividade enzimática, o mesmo perfil cromatográfico, e diferentemente, dos resultados do perfil proteico verificado anteriormente, foi verificada a presença de uma proteína de massa molecular de 30 kDa, condizente com os dados da literatura (DI PIETRO *et al.*, 2001) e com os dados obtidos nas análises *in silico* deste estudo.

Em adição aos resultados da atividade enzimática, a proteína recombinante, apesar de ativa, demonstrou pouca atividade durante os testes, talvez pela baixa quantidade utilizada. Portanto, novas formas de otimizar a função seria aumentar o rendimento da sua produção através de modificações dos componentes do meio de cultura utilizados e/ou quanto dos parâmetros de cultivo. Formulações de meios para cultivos celulares consistem em nutrientes, como fontes de carbono, peptonas, aminoácidos, extratos de carne e leveduras, minerais e vitaminas. Alguns componentes do meio podem ser críticos para o crescimento celular ou produtividade, outros podem ser tóxicos em certos níveis, e muitos outros podem estar envolvidos em interações complexas competindo ou na mesma via no interior das células. Tradicionalmente, os componentes do meio são selecionados individualmente (*one factor at a time* - OFAT) ou em combinações em experimentos em *Shaker* (CHANG & ZANDSTRA, 2004).

Algumas estratégias são utilizadas durante o cultivo do microrganismo, a fim de se aumentar o rendimento específico do produto que se deseja expressar. Além da otimização dos componentes nos meios de cultivo, ajustes nos parâmetros fermentativos, como aeração, pH e temperatura podem ser empregados para uma melhor produtividade (CEREGHINO *et al.*, 2002). A indução em temperaturas mais baixas, como 23 °C, pode facilitar a expressão da proteína na forma solúvel (LI *et al.*, 2001). A acidificação do meio (pH em torno de 5,0) e a adição de detergentes, como o Triton X-114 também podem auxiliar a solubilização de algumas proteínas (CEREGHINO *et al.*, 2002).

A utilização de outras fontes de carbono durante a fase de indução (*cofeeding*) tem sido uma estratégia adotada para melhorar a produtividade específica (FILES *et al.*, 2001). O sorbitol é uma alternativa para essa função, pois não reprime o promotor AOX1 e, desse modo, pode ser utilizado juntamente com o metanol durante a fase de indução, o que pode diminuir o tempo do processo (XIE *et al.*, 2005).

Uma outra alternativa, seria trabalhar a construção genética da proteína precursora, pois a expressão de proteases é indesejável durante o cultivo de microrganismos para a expressão heróloga de proteínas recombinantes, como verificado pela deleção dos genes *prb1* e *pep4* que codificam proteases em *P. pastoris*. Outro aspecto que deve ser considerado é a atividade de autoproteólise que a enzima poderia desempenhar e levar a própria degradação, como já verificado para outras proteínas (JOMAA *et al.*, 2009; EGERER *et al.*, 2007), ou pela degradação proteolítica do produto ao passar pelas vias pós-secretórias levando a proteínas não funcionais (IDIRIS *et al.*, 2010).

Ainda neste trabalho, foram determinadas as condições ótimas de temperatura e pH para atividade enzimática dessa peptidase recombinante obtida. Apesar de outros resultados serem necessários para uma melhor caracterização desta proteína, os resultados já apresentados contribuem muito para o conhecimento científico e para a indicação de uma potencial molécula a ser empregada no desenvolvimento de produtos industrializados que necessitam de uma peptidase.

Apesar de outros resultados serem necessários para uma melhor caracterização desta proteína, os resultados já apresentados contribuem muito para o conhecimento científico e para a indicação de uma potencial molécula a ser

empregada no desenvolvimento de produtos industrializados que necessitam de uma peptidase que funcionem em temperaturas mais altas.

6. CONCLUSÕES

Reiterando todos os resultados expostos, pode-se verificar que este trabalho alcançou os objetivos propostos, conforme discriminado abaixo:

- Desenvolveu-se a clonagem da peptidase em suas diferentes fases de proteína precursora (PREC), peptidase madura (MAD) e de sua pró-região (PRO) nos vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA;
- Obteve-se os clones e avaliou-se a produção da peptidase madura por P.
 pastoris transformadas com as construções pPICZαA/MAD e pGAPZαA/MAD;
- Selecionou-se os clones com melhor rendimento na produção da proteína recombinante madura (rMAD);
- Purificou-se a rMAD por cromatografia de afinidade;
- Avaliou-se a atividade enzimática da rMAD, bem como a determinação das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M., HIRZ, M., PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.98, n.12, p.5301-5317, 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.** v.72, p.248-254, 1976.

BRYAN, P.N. Protein engineering of subtilisin. **Biochem. Biophys. Acta.** v.1543, p.203–222, 2000.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol. Rev.** v.24, p.45–66, 2000.

CEREGHINO, G.P.L., *et al.* Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.13, p.329–332, 2002.

CHANG,K.H., ZANDSTRA,P.W. Quantitative screening of embryonic stem cell differentiation: endoderm formation as a model .**Biotechnol. Bioeng**. v.88, p.287–298, 2004.

CHIRUVOLU, V.; CREGG, J.M.; MEAGHER, M.M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. **Enz. Microb. Technol.** v.21, p.277-283,1997.

CLARE, J. J., RAYMENT, F. B., BALLANTINE, S. P., SREEKRISHNA, K.; ROMANOS, M. A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Biotechnol.** v.9, p.455–460, 1991.

CREGG, J.M.; BARRINGER, K.J.; HESSLER, A.Y.; MADDEN, K.R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Mol. Cell. Biol.** v.5 p.3376–3385, 1985.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. CRe-cent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnol.** v.11 p.905-910, 1993.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnol**. v.16: p.23-52, 2000.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Mol. Biol. Report.** v.19, p.299-306, 2001.

DAMASCENO,L.M., HUANG,C.J, BATT,C.A. Protein secretion in *Pichia pastoris* andadvances in protein production, **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 31–39.2012

DEAN R., VAN KAN J. A.; PRETORIUS Z. A.; HAMMOND-KOSACK K. E.; DI PIETRO A.; SPANU P. D.; RUDD J. J.; DICKMAN M.; KAHMANN R.; ELLIS J.;

- FOSTER G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol**. v.13, p.414–430, 2012.
- DEMAIN,A.L.; VAISHNAV,P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechno. Adv.** v.27, n.3, p.297-306, 2009.
- DIGAN, M. E.; LAIR, S. V.; BRIERLEY, R. A.; SIEGEL, R. S.; WILLIAMS, M. E.; ELLIS, S. B.; KELLARIS, P. A.; PROVOW, S. A.; CRAIG, W. S.; VELICELEBI G.; HARPOLD, M. M.; THILL, G. P. Continous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol.** v.7, p.160-164, 1989.
- DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineenring and production. **J. Mol. Recogn.** v.18, n.2, p.119-138, 2005.
- DENG, A.; WU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, G.; WEN, T. Purification and characterization of a surfac- tant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. **Bioresour. Technol.** v.101, p.7111–7117, 2010.
- DI PIETRO, A. *et al.* Molecular Characterization of a Subtilase from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum.* **Mol. Plant-microb. Inter.** v.14, n.5, p.653-662, 2001.
- DODSON, G.; WLODAWER, A. Catalytic triads and their relatives. **T. Biochem. Scien.** v.23, p.347–352,1998.
- ELLIS, S. B.; BRUST, P. F.; KOUTZ, P. J.; WATERS, A. F.; HARPOLD, M. M.; GINGERAS, T. R. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol. Cell. Biol.** v.5, n.5, p.1111–1121, 1985.
- Enzymes Market Size By Product. Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2017-2024, 2017. Disponível em: https://www.gminsights.com/industry-analysis/enzymes-market. Acessado em: 28/02/2019.
- EGERER, M.; GIESEMANN, T.; JANK, T.; FULLNER SATCHELL, K. J.; AKTORIES, K. Auto-catalytic Cleavage of *Clostridium difficile* Toxins A and B Depends on Cysteine Protease Activity. **J. Biol. Chem.** v.282, p.25314-25321, 2007. DOI: 10.1074/jbc.M703062200 originally published online June 25, 2007
- EREZ, E., FASS, D., & BIBI, E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. **Nature** 459, 371–378 (2009).
- FERNANDEZ, J.M.; HOEFFLER, J.P. Gene Expression Systems. Using nature for the art of expression. **Academic Press**. San Diego,1999.
- FILES, D., OGAWA, M., SCAMAN, C. H., BALDWIN, S A. A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. **Enz. Microb. Technol.** v.29, p.335–340, 2001.

- FISCHER, R.; DROSSARD, J.; EMANS, N.; COMMANDEUR, U.; HELLWIG, S. Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris* based production of single-chain antibody fragments. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v.30, p.117-120,1999.
- GAMBLE, M., KÜNZE, G., DODSON, E. J., WILSON, K. S., & JONES, D. D. Regulation of an intracellular subtilisin protease activity by a short propeptide sequence through an original combined dual mechanism. **Proc. Nat. Acad. Scien. USA**. v.108, n.9, p.3536–3541, 2011.
- GASSER, B.; *et al. Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. **Fut. Microbiol.** v.8, p.191-208, 2013.
- GODFREY, T.; WEST, S.I. Introduction to industrial enzymology. **Ind. Enzym.** Macmillan Press, London, pp. 1–8, 1996.
- GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S. M.; VEEREGOWDA, B. M.; BALAMURUGAN, V. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. **Adv. Anim. Vet. Sci.** v.4, n.7, p.346-356, 2016. DOI:Http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356
- HIGGINS, D. R., CREGG, J. M., Methods in Molecular Biology.1ed. Vol 103. **Humana Press-Totowa**. New Jersey. 270p. 1998.
- HO, R. J. Y.; GIBALDI, M. Enzymes. **Biotechnol. Biopharm. Transf. Prot. Gen. Drugs.** John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey. 2013.
- IDIRIS, A.; TOHDA, H.; KUMAGAI, H.; TAKEGAWA, K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production, **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v.86, p.403–417, 2010.
- JAIN, S. C.; SHINDE, U.; LI, Y.; INOUYE, M.; BERMAN, H. M. The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 A resolution. **J. Mol. Biol.** v.284, p.137-144, 1998.
- JOMAA, A., *et. al.* Characterization of the autocleavage process of the *Escherichia coli* HtrA protein: Implications for its physiological role. **J. Bacteriol**. v.19, n.6, p.1924-1932, 2009.
- KRAINER, F. W.; DIETZSCH, C.; HAJEK, T. *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microb. Cell. Fact.** v.11, p.22, 2012.
- KRAUT, J. Serine-peptidases structure and mechanism of catalysis. **Ann. Rev. Biochem.** v.46, p.331-358,1977.
- KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **J. Industr. Microbiol. Biothecn**. v.36, p.1435, 2009.

- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. Ed. Sarvier, São Paulo, 2002.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ed. Blackwell Publishing, Hoboken, 2006.
- LI, A.; XIONG, F.; LIN, Q.; D'ANJOU, M.; DAUGULIS, A. J.; YANG, D. S. C.; HEW, C. L. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in Pichia pastoris. **Protein Expr Purif** 21:438-445.2001
- LI, P. *et al.* Expression of recombinants proteins in *Pichia pastoris.* **App. Biochem. Biotechnol.** v.142, n.2, p.105-124, 2007.
- LIU L.; *et al.* How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. **Bioengin.** v.4, n.4, p.212-223, 2013.
- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. **Biotechnol. Microb. Enz.** Elsevier Inc. 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X.
- MA L. J.; *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v.464, p.367–373, 2010.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v.22 p.249-270, 2005.
- MAURER, KH. Detergent peptidases. Curr. Opin. Biotechn. v.15, p.330-334, 2004.
- MEDINA-ROMERO, Y. M.; ROQUE-FLORES, G.; MACÍAS-RUBALCAVA, M. L. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum*in cherry tomato fruits. **App. Microbiol. Biotechnol.** v.101, p. 8209, 2017.
- PESSÔA, M. G.; PAULINO, B. N.; MANO, M. C. R.; NERI-NUMA, I. A.; MOLINA, G.; PASTORE, G. M. *Fusarium* species a promising tool box for industrial biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 101, p. 3493-3511, 2017.
- POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess Engineering Aspects of Heterologous Protein Production in Pichia pastoris: a Review. **Biochem. Eng. J.** v.64, p.91-105, 2012.
- RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. An introduction to peptidases and merops database. **Industrial enzymes: Structure, function and applications**.2007,p161-179.
- SAI, Y. R. K. M.; SIVA KISHORE, N.; DATTATREYA, A.; ANAND, S. Y.; SRIDHARI, G. A. Review on Biotechnology and Its Commercial and Industrial Applications. J. Biotechnol Biomaterial. v.1, p.121-8, 2011. DOI:10.4172/2155-952X.1000121.

- SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p.351-362, 2001.
- SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: Beynon, R. J.; Bond, J. S. (eds). Proteolytic enzymes: a practical approach. University Press, Oxford, p.25-54,1996.
- SIEZEN, R. J.; LEUNISSEN, J. A. M. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine peptidases. **Prot. Scien.** v.6, p.501–523, 1997.
- SILVA, J. P. L; SOUZA, E. F.; PENHA, E. M.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S. C. Catálogo da Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia. EMBRAPA. ISSN 1516-8247, 2013.
- SIQUEIRA,A.C.R. Produção de peptidase e lipase nativas *por Fusarium oxysporum* e obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase expressa em *Pichia pastoris*.116f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2017
- SOHL, J. L.; JASWAL, S. S.; AGARD, D. A. Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state. **Nature**. v.395, n.6704, p.817-819, 1998.
- SUBBIAN E.; YABUTA Y.; SHINDE U.P. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: intrinsically unstructured propertide modulates stochastic activation of subtilisin. **J. Mol. Biol**. v.347, n.2, p.367-383, 2005.
- TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol**. v.5, p.1305-1308,1987.
- WANG, Z. *et al.* Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. **Biores. Technol.** v.101, p.1318-1323, 2010.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnol.** v.28, p.917–924, 2010.
- WATERHAM, H. R.; DIGAN, M. E.; KOUTZ, P. J.; LAIR, S. V.; CREGG, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**. v.186. p.37–44, 1997.
- XIE, J. L.; ZHOU, Q. W.; PENG, D.; GAN, R. B.; QIN, Y. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. **Enz. Microb. Technol.** v.36, p.210–216, 2005.

YABUTA, Y.; TAKAGI, H.; INOUYE, M.; SHINDE, U. Folding Pathway Mediated by an Intramolecular Chaperone: PROPEPTIDE RELEASE MODULATES ACTIVATION PRECISION OF PRO-SUBTILISINJ. **Biol. Chem.** v.276, p.44427, 2001.

ZHANG, A.; *et al.* Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Mol. Biol. Rep.** v.36, n.6, p.1611–1619, 2009.