Fábio Silva de Carvalho

**Clonagem de α -amilase em *S. cerevisiae*
por δ -integração e caracterização
parcial dos clones**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2012

Fábio Silva de Carvalho

**Clonagem de α -amilase em *S. cerevisiae*
por δ -integração e caracterização
parcial dos clones**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração - Biotecnologia

Orientadora - Dra. Elisabete José Vicente

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Carvalho, Fabio Silva de.

Clonagem de α -amilase em *S. cerevisiae* por δ -integração e caracterização parcial dos clones / Fabio Silva de Carvalho. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Elisabete Jose Vicente.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Expressão de genes heterólogos em leveduras.

Versão do título para o inglês: Cloning of α -amylase in *S. cerevisiae* by δ -integration and partial characterization of clones.

Descritores: 1. Enzima amilolítica 2. Genética microbiana 3. Etanol 4. Amy E 5. Amy Et I. Vicente, Elisabete Jose II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0183/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fabio Silva de Carvalho.

Título da Dissertação: Clonagem de α -amilase em *S. cerevisiae* por δ -
integração e caracterização parcial dos clones.

Orientador(a): Elisabete Jose Vicente.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., 2012,

☒ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: JULIANA RACOWSKI
Instituição: FACULDADE DE TECNOLOGIA, TERMO MECANICA

Examinador(a): Nome completo: JUAZ BEAZ DE FARIA
Instituição: ICB - USP (Apo. Gen. F. de)

Presidente: Nome completo: Elisabete Jose Vicente
Instituição: ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: icb@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 405/10 referente ao projeto intitulado: *“Construção e caracterização de leveduras recombinantes com capacidade de fermentar substratos amiláceos”* sob a responsabilidade de **Fábio Silva de Carvalho**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 28 de junho de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Elisabete José Vicente pela oportunidade, confiança e orientação profissional e pessoal.

À professora Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg pelo apoio e colaboração científica.

Aos meus colegas do laboratório - Ana Cristina, Belisa, Carol, Claudionor, Cleide, Ciça, Diogo, Felipe, Jéssica, Ilana, Oeber, Poliana, Ronaldo e Thais pela colaboração, pelas risadas e por tudo que compartilhamos ao longo deste período.

À Raquel, por toda a orientação e acompanhamento.

À Leninha, Kazui e Norma pelo auxílio e apoio técnico necessário.

Aos secretários do Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IB/ICB/IPT, pela compreensão e ajuda.

Aos funcionários da biblioteca do ICB/USP pela atenção e correções.

À minha querida família, por me ensinarem valores verdadeiramente importantes, pelo apoio em cada etapa, pelo amor demonstrado, pelo encorajamento.

À minha amada e paciente noiva, Andréa, que esteve sempre me encorajando, me apoiando e demonstrando plena confiança em mim, pelo seu amor, companheirismo e compreensão.

*"Se a educação sozinha não transforma a sociedade,
sem ela, tampouco, a sociedade muda."*
Paulo Freire

RESUMO

Carvalho FS. Clonagem de α -amilase em *S. cerevisiae* por δ -integração e caracterização parcial dos clones. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Neste trabalho, o gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* foi clonado em *S. cerevisiae*, por δ -integração. Foram construídos dois vetores - 1) o gene truncado da α -amilase de *B. subtilis* (*amyEt*) com a sequência sinal própria, sob regulação do promotor e terminador *ADH1* (δ AmyEt δ); 2) o gene da α -amilase completo de *B. subtilis* (*amyE*), com a sequência sinal MF α de *S. cerevisiae*, sob a regulação do promotor e terminador *PGK* (δ AmyE δ). Esses vetores foram empregados na transformação genética de linhagens *S. cerevisiae*, em co-transformação com o plasmídeo pAJ50, que permite a seleção positiva. Os clones transformantes cultivados em meio YPDA sólido (0,5% amido) produziram halos de amilólise de diferentes tamanhos. Os que receberam o gene da α -amilase completo sob a regulação de PGK (δ AmyE δ) apresentaram os melhores resultados para a hidrólise de amido. Nenhum clone teve o crescimento prejudicado em relação à linhagem controle selvagem. Estes resultados indicam que os novos vetores apresentam bons potenciais para emprego na construção de linhagens industriais de *S. cerevisiae*.

Palavras chave - α -amilase, *amyE*, *amyEt*, Transformação de levedura por δ -integração, Amido, Biotecnologia, Produção de etanol, Biomassa.

ABSTRACT

Carvalho FS. Cloning of α -amylase in *S. cerevisiae* by δ -integration and partial characterization of clones. [Master Thesis (Biotechnology)]. São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

At the present work, the α -amylase gene from *Bacillus subtilis* was cloned in *S. cerevisiae* by δ -integration. We constructed two vectors - 1) the truncated α -amylase gene of *B. subtilis* (*amyEt*) with its own signal sequence, under the regulation of the *ADH1* promoter and terminator of *S. cerevisiae* (δ AmyEt δ), 2) the complete α -amylase gene of *B. subtilis* (*amyE*), with the signal sequence of MF α of *S. cerevisiae* under the regulation of *PGK* promoter and terminator (δ AmyE δ). These vectors were used for genetic transformation of *S. cerevisiae* strains, in co-transformation with pAJ50 plasmid that allows positive selection. The transformant clones grown on solid medium YPDA (0.5% starch) produced amilolise halos of different sizes. Those which received the complete α -amylase gene under the regulation of *PGK* (δ AmyE δ) showed the best results for starch hydrolysis. None of the clones had its growth capacity altered when compared to the wild type. These results indicate that these vectors have good potentials for being employed on the transformation of *S. cerevisiae* industrial strains.

Keywords - α -amylase, *amyE*, *amyEt*, Yeast transformation by δ -integration, Starch, Biotechnology, Ethanol production, Biomass.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Plasmídeos empregados nas etapas de construção dos vetores de transformação.....	32
Figura 1 - Estrutura molecular da amilose e amilopectina.....	21
Figura 2 - Rotas tecnológicas para a produção de etanol.....	22
Figura 3 - Diferentes enzimas empregadas no processo de degradação do amido.....	23
Figura 4 - Amplificação por reação de PCR do fragmento de DNA “SS + AmyE”.....	39
Figura 5 - Amplificação por reação de PCR do cassete de expressão <i>PGK-AmyE-PGK</i>.....	40
Figura 6 - Fluxograma das etapas envolvidas na construção do vetor de integração AmyEtδ.....	46
Figura 7 - Digestão do plasmídeo pAA3 com a endonuclease <i>Bam</i> HI.....	46
Figura 8 - Construção do plasmídeo pGEM-δAmyEtδ.....	47
Figura 9 - Transformantes da ligação pGEM-TEasyδ com o cassete da α-amilase digeridos digestão com <i>Bam</i> HI.....	48
Figura 10 - Digestão do plasmídeo pGEM- δAmyEtδ com <i>Not</i> I.....	49
Figura 11 - Fluxograma das etapas envolvidas na construção do vetor de integração δAmyEδ.....	50
Figura 12 - Construção do plasmídeo pPIC9K-AmyE e amplificação do fragmento de DNA “SS-AmyE”.....	51
Figura 13 - Clonagem do fragmento “SS-AmyE” vetor pGEM-T.....	52
Figura 14 - Estratégia de construção do vetor pMA-AmyE.....	53
Figura 15 - Transformantes obtidos com a mistura de ligação pMA91 e “SS + AmyE” após digestão com <i>Eco</i> RI.....	54
Figura 16 - PCR confirmatório da construção pMA-AmyE.....	55
Figura 17 - Digestão dos plasmídeos TOPO-AmyE e pGEM-TEasyδ com <i>Bam</i> HI.....	56
Figura 18 - Estratégia de construção do vetor pGEM- δPGK-Amyδ.....	56
Figura 19 - Confirmação da construção do vetor pGEM- δPGK-Amyδ.....	57
Figura 20 - Plasmídeo pGEM-Teasyδ digerido com <i>Not</i> I	58

Figura 21 - Leveduras recombinantes transformadas com o plasmídeo pMA-AmyE expressando α-amilase..... 59

Figura 22 - Clones recombinantes das linhagens de levedura YPH250 e YPH252 expressando α-amilase..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Eficiência de transformação das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* com o plasmídeo pAJ50..... 59

Tabela 2 - Eficiência e frequência de transformação das linhagens de *S. cerevisiae* com o vetor δ AmyEt δ 60

Tabela 3 - Eficiência e frequência de transformação das linhagens de *S. cerevisiae* com o vetor δ AmyE δ 60

Tabela 4 - Diâmetro das colônias e dos halos de amilolise e relação R (diâmetros do halo ao quadrado dividido pelo diâmetro da colônia ao quadrado) dos clones recombinantes obtidos com o vetor δ AmyEt δ 62

Tabela 5 - Diâmetro das colônias e dos halos de amilolise e relação R (diâmetros do halo ao quadrado dividido pelo diâmetro da colônia ao quadrado) dos clones recombinantes obtidos com o vetor δ AmyE δ 62

ABREVIATURAS

Abs -	Absorbância
Amp® -	Resistência à ampicilina
EDTA -	Ácido etileno diamino tetracético
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs -	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dATPs -	DesoxiAdenosina Trifosfatada
dCTPs -	DesoxiCitidina Trifosfatada
dGTPs -	DesoxiGuanosina Trifosfatada
dTTPs -	DesoxiTmidina Trifosfatada
IPTG -	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
X-GAL -	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo
pb -	Pares de base
PCR -	Reação de polimerase em cadeia
ADH1 -	Gene codificador da álcool desidrogenase de <i>S. cerevisiae</i>
PGK -	Gene codificador da enzima 3-fosfoglicerato quinase
URA3 -	Gene selvagem codificador da orotidina-5-fosfato descarboxilase (ODCase), enzima envolvida na síntese de novo ribonucleotídeos pirimidínicos, em <i>S. cerevisiae</i>
TRP1 -	Gene selvagem codificador da fosforibosil-antranilato isomerase, enzima que catalisa o terceiro passo da via de biosíntese de triptofano, em <i>S. cerevisiae</i>
HIS3 -	Gene selvagem codificador da histidinalmidazoleglicerol-fosfatase desidratase, enzima que catalisa o sexto passo da via de biosíntese de histidina, em <i>S. cerevisiae</i>
U -	Unidades
LiAc -	Acetato de lítio
LTR -	Long Terminal Repeat
rpm -	Rotação por minuto

mRNA -	Ácido ribonucléico mensageiro
<i>MATa</i> -	<i>locus</i> de tipo de acasalamento a
<i>MATα</i> -	<i>locus</i> de tipo de acasalamento α
mL -	Mililitro
nm -	Nanômetros
μg -	Micrograma
μL -	Microlitro
λ -	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O Bioetanol e sua produção no Brasil	19
1.2 Produção de etanol a partir de substratos amiláceos	20
1.3 Enzimas amilolíticas	23
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.5 Transformação genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.6 Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por δ -integração	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Linhagens de bactéria <i>E. coli</i>	31
4.2 Linhagens de levedura	31
4.3 Plasmídeos	31
4.4 Meios de Cultura para o cultivo de bactérias	31
4.5 Meios de Cultura para o cultivo de leveduras	33
4.6 Soluções	34
4.6.1 Soluções para extração e purificação de DNA	34
4.6.2 Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose	35
4.6.3 Agentes antimicrobianos	35
4.6.4 Solução de amido	35
4.7 Extração e purificação de DNA plasmidial bacteriano	36
4.8 Tratamento de DNA plasmidial com enzimas de restrição	36
4.9 Análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose	37
4.10 Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose	37
4.11 Desfosforilação de fragmentos de DNA	37

4.12 Ligação de fragmentos de DNA.....	37
4.13 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polimerase Chain Reaction”).....	38
4.13.1 Amplificação do gene <i>AmyE</i> junto à sequência sinal de secreção do fator- α de <i>S. cerevisiae</i>	38
4.13.2 Amplificação do cassete de expressão PGK- <i>AmyE</i> -PGK.....	39
4.14 Transformação genética.....	40
4.14.1 Da bactéria <i>E. coli</i>	40
4.14.1.1 Preparo de células competentes.....	40
4.14.1.2 Transformação.....	41
4.14.2 Transformação genética de levedura <i>S. cerevisiae</i>	41
4.15 Cálculo da eficiência e da frequência de transformação e co-transformação gênica.....	42
4.15.1 Eficiência de transformação do plasmídeo pAJ50.....	42
4.15.2 Eficiência de transformação dos fragmentos de DNA $\delta AmyEt\delta$ e $\delta AmyE\delta$	42
4.15.3 Frequência de co-transformação dos fragmentos de DNA $\delta AmyEt\delta$ e $\delta AmyE\delta$	42
4.16 Análise qualitativa da expressão e secreção da amilase.....	42
4.17 Análise quantitativa da α-amilase excretada pelos clones recombinantes.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Construção do vetor de transformação $\delta AmyA\delta$.....	45
5.2 Construção do vetor de transformação $\delta AmyE\delta$.....	49
5.2.1 Obtenção da sequência sinal de secreção do fator- α de <i>S. cerevisiae</i>	50
5.2.2 Construção do vetor pMA- <i>AmyE</i>	53
5.2.3 Construção do vetor pGEM- $\delta AmyE\delta$	5
5.3 Transformação genética de Levedura.....	58
5.3.1 Transformação com o plasmídeo pMA- <i>AmyE</i>	58
5.3.2 Transformação com os vetores $\delta AmyA\delta$ e $\delta AmyE\delta$	59

5.4 Análise qualitativa da expressão e secreção da amilase.....	60
5.5 Análise da curva de crescimento dos transformantes.....	62
5.6 Análise da atividade amilolítica dos clones recombinantes.....	63
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Bioetanol e sua produção no Brasil

O bioetanol é o etanol produzido a partir de biomassa pelo processo de fermentação a partir de diversas fontes de carbono, como: sacarose (cana-de-açúcar, beterraba), materiais amiláceos hidrolisados (mandioca, batata, arroz, trigo); ou, como se pretende para o futuro, materiais lignocelulósicos hidrolisados (resíduos industriais ou agrícolas, madeira) (Gray et al., 2006).

No Brasil esse combustível é empregado em motores de combustão interna com ignição por centelha (ciclo Otto), de duas formas: em mistura à gasolina, sendo determinada pelo governo federal a margem de 20 – 25% de etanol; ou, como etanol hidratado, utilizado em motores próprios para esse combustível ou em motores flexfuel (BNDES, 2008).

Na última década o bioetanol tem tomado espaço de destaque no mercado mundial de combustíveis, isso ocorre em virtude de dois fatores principais: 1) a instabilidade geopolítica das principais regiões onde é extraída grande parte o petróleo para a produção de combustíveis fósseis; e, 2) a preocupação com o desenvolvimento de fontes energéticas renováveis e mais limpas, reduzindo a emissão de poluentes na atmosfera.

São diversas as vantagens do uso do etanol quando comparado aos combustíveis convencionais: a utilização de fontes renováveis como substrato; menor índice de emissão de gases nocivos ao meio ambiente; o fato de ser biodegradável, possuir maior octanagem (resistência à compressão sem entrar em combustão) que a gasolina, e de produzir menos fumaça e gerar menos resíduos provenientes da queima (Demain et al., 2005).

Segundo Gonçalves (2005) o Brasil alcançou custos muito reduzidos de produção no setor canavieiro, tanto em relação ao açúcar quanto ao álcool, participando competitivamente do mercado internacional. Isso se deve, principalmente, ao desenvolvimento do programa Proálcool, implementado em 1975, pelo decreto nº 76.593, com o objetivo de estimular a produção de álcool para o suprimento do mercado interno e externo.

Além disso, há a perspectiva de que nos próximos anos a exportação de etanol alcance um patamar bem elevado, isso porque muitos países; como, por exemplo, o

Japão; buscando se adequar às exigências do protocolo de Kioto, decidiu adicionar etanol ao combustível convencional. Para atender a futura demanda de bioetanol, apenas com o uso da cana-de-açúcar, o Brasil necessitará ampliar muito o cultivo da planta, porém, essa ampliação possui algumas barreiras. A inviabilidade de invadir áreas de preservação ou substituir outros cultivos; e o fato dessa ser uma planta sazonal e requerer solo muito rico para seu crescimento, impossibilita o cultivo em todos os nichos agrícolas brasileiros (Moraes et al. 1995).

Uma das alternativas para elevar a produção do bioetanol é a diversificação da matéria prima empregada no processo de fermentação alcoólica, sendo a mandioca (*Manhot esculenta*) um dos substratos mais promissores no Brasil. O uso dessa raiz possibilitaria a expansão da produção de etanol da região sudeste do país, para as regiões norte e nordeste. Além disso, sabe-se que o cultivo da mandioca apresenta algumas vantagens quando comparado ao da cana-de-açúcar, como por exemplo - maior rusticidade, menor exigência climática, capacidade de produção durante quase todo o ano, além do fato das raízes poderem ser armazenadas.

O uso da mandioca como substrato para a produção de etanol já foi considerado em primeiro plano, junto à cana-de-açúcar, no início do programa Proálcool. No entanto, a instalação de algumas indústrias para a produção de álcool a partir da mandioca em regiões não tradicionais, ou em fim de ciclo de pólo mandioqueiro, contribuiu para que este empreendimento no passado se tornasse inviável (Farrel et al., 2006).

Em 2005, o Centro de Apoio de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília (CDT) realizou um estudo de viabilidade técnica, econômica e comercial comparando a produção de etanol a partir da mandioca e da cana-de-açúcar. Nesse foi verificado que a implementação de microdestilarias para a produção de etanol de amido é uma alternativa viável e seu produto é altamente competitivo com o produzido a partir da cana-de-açúcar (EVETEC, 2005).

1.2 Produção de etanol a partir de substratos amiláceos

O amido está amplamente distribuído na natureza, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante nos vegetais, nos quais é armazenado como produto final do processo de fotossíntese, além disso, representa a principal fonte de energia para os organismos heterótrofos. Trata-se de um carboidrato composto por carbono, hidrogênio e oxigênio na proporção 6:10:5 ($C_6H_{10}O_5$)_n. É formado por unidades de D-glicose, ligadas entre si pelos carbonos C1 e C4 e por ramificações conectadas pelos

carbonos C1 e C6, ambas denominadas ligações glicosídicas do tipo alfa (Lehninger, 2002). Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear constituído por mais de 6.000 resíduos de glicose ligados por ligação α -1,4. A amilopectina é um polímero altamente ramificado no qual as cadeias lineares de resíduos α -1,4 estão interligadas por ligações α -1,6 a cada 24 a 30 resíduos de glicose. Uma molécula de amilopectina completa contém em média 2×10^6 resíduos de glicose, sendo essa uma das maiores moléculas presentes na natureza. A estrutura e o tamanho de ambas moléculas variam de acordo com a origem botânica do amido (Nigam e Singh, 1995; Tester e Qi, 2004). Na Figura 1 é apresentada uma representação gráfica da estrutura das moléculas amilose e amilopectina.

Figura 1 – Estrutura molecular da amilose e amilopectina.

Fonte: Lehninger (2002).

Um levantamento realizado em 2008 aponta o amido como principal substrato empregado na produção de etanol combustível, responsável por 53% de todo o etanol produzido mundialmente, com destaque para o etanol proveniente do milho, principal substrato utilizado pelos Estados Unidos, que lideram a produção mundial de etanol (BNDES, 2008).

No entanto, a utilização do amido de milho para a produção de etanol enfrenta algumas barreiras, sendo uma delas o alto valor agregado aos produtos derivados do milho, muitas vezes maiores que o próprio valor do etanol.

Além disso, como o amido não pode ser diretamente fermentado pela levedura *S. cerevisiae*, a produção de etanol a partir desse substrato depende da aplicação de um pré-tratamento, para a obtenção de açúcares simples como a glicose e a maltose. A hidrólise do amido pode ocorrer por via química, empregando-se ácidos, calor e pressão, ou por via enzimática, que apresenta vantagens em relação ao custo e à geração de poluentes, quando comparada aos procedimentos anteriores. Os processos de produção industrial de etanol a partir de biomassa amilácea, em sua maioria nos EUA, emprega a hidrólise enzimática (Figura 2).

Figura 2 - Rotas tecnológicas para a produção de etanol

Fonte: BNDES (2008)

1.3 Enzimas amilolíticas

Enzimas amilolíticas, ou amilases, são enzimas capazes de hidrolisar moléculas de amido e substratos relacionados, resultando em diversos oligossacarídeos de tamanhos variados. Para que ocorra a quebra completa do amido, são necessárias várias enzimas com diferentes sítios de ação (Bertoldo e Antranikain, 2002) (Figura 3).

Figura 3 – Diferentes enzimas empregadas no processo de degradação do amido

Esquema representando a ação das principais enzimas amilolíticas (•) extremidade redutora; (o) extremidade não redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido. Modificado de: Bertoldo e Antranikain (2002).

De acordo com o mecanismo de ação, as amilases podem ser classificadas como endo-amilases e exo-amilases. As endoamilases são enzimas que clivam ao acaso as ligações internas das cadeias de amilose a amilopectina, sendo conhecidas como enzimas liqueficientes. Já, as exo-amilases catalisam reações de hidrólise a partir da

extremidade não redutora da cadeia de amido, atuando na sacarificação do amido. São exemplos de endo-amilases: α -amilases, CGTases e pululanases. Dentre as exo-amilases temos: β -amilases, glicoamilases e α -glicosidases.

Na hidrólise enzimática para a produção de etanol, as principais enzimas empregadas são a α -amilase, e a glicoamilase (Van der Maarel et al., 2002). A α -amilase é responsável pelo processo de liquefação, clivando as ligações α -1,4 no interior das moléculas de amido, o que torna o meio menos viscoso. A glicoamilase é responsável pelo processo de sacarificação, clivando as ligações α -1,4 de amido solúvel, atuando sobre os resíduos externos de glicose da amilose e amilopectina, e ainda hidrolisa lentamente ligações α -1,6 do amido (Norouzian et al., 2006).

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular, ascomiceto, que se reproduz de forma vegetativa por brotamento e pode alterar seu ciclo de vida, com fase sexuada e fase vegetativa (Boekhout et al., 1996). Na fase vegetativa, células haplóides (n) ou diplóides (2n) podem ser mantidas em condições de laboratório, sem alteração da ploidia, dividindo-se por mitose indefinidamente e originando novas células através de brotamento (Wickner, 1991). *S. cerevisiae* é um microrganismo anaeróbico facultativo capaz de realizar fermentação alcoólica em microaerobiose, ou em presença de oxigênio, quando o meio contém grande concentração de sacarose e/ou glicose (Kingsman e Kingsman, 1988).

S. cerevisiae é reconhecida pelo FDA americano ("Food and Drug Administration Department", USA) como um organismo GRAS ("Generally Recognised As Safe"), sendo amplamente utilizada na indústria alimentícia, por não oferecer riscos de contaminação por substâncias tóxicas ou alergênicas, como aquelas, normalmente, presentes em bactérias.

De um modo geral, as leveduras, por serem organismos unicelulares, apresentam as mesmas facilidades de manipulação e crescimento que as bactérias; e são largamente empregadas como sistema hospedeiro de genes heterólogos ou na superexpressão de genes homólogos.

S. cerevisiae é, sem dúvida, a levedura mais estudada em todos os aspectos científicos e, também, a que vem sendo mais frequentemente e amplamente empregada

nos processos industriais, sendo o principal organismo empregado no processo de fermentação para produção do etanol combustível.

1.5 Transformação genética de *Saccharomyces cerevisiae*

Em geral, o termo transformação genética está relacionado à entrada de fragmentos de DNA no interior de células procarióticas e eucarióticas, acarretando mudanças em seus fenótipos (Gietz e Woods, 2001). Os primeiros protocolos de transformação genética da levedura *S. cerevisiae* foram publicados em 1978 (Beggs, 1978; Hinnen et al., 1978). A partir dessa data esse organismo tem sido largamente empregado como sistema hospedeiro de genes heterólogos (Romanos et al., 1992).

Um sistema de transformação genética depende basicamente de três fatores: 1) um método eficiente para introduzir a molécula de DNA exógeno na célula hospedeira; 2) um vetor que seja capaz de permanecer na célula, garantindo a manutenção do DNA no microrganismo hospedeiro; e, 3) um sistema de seleção dos transformantes (Wery et al., 1999).

Desde o primeiro método de transformação genética de levedura, empregando esferoblastos (células sem parede celular) incubados junto ao DNA exógeno (Hinnen et al., 1978), muitos outros foram desenvolvidos, como: utilizando células intactas de levedura tratadas com sais de lítio e incubadas na presença de DNA (Ito et al., 1983); utilizando pérolas de vidro (Costanza e Fox, 1988) e eletroporação (Becker e Guarente, 1991).

Para a transformação genética de *S. cerevisiae* foram construídos plasmídeos com características variadas, que podem ser classificados da seguinte forma: YIp, YE_p, YRp, YC_p, YL_p e YAC (Botstein e Davis, 1982; Ausubel et al., 1992; Griffiths et al., 1993).

- Plasmídeos integrativos (YIp): não se replicam autonomamente na célula, pois não possuem origem de replicação. Estes plasmídeos mantêm-se na levedura apenas após integração ao comossomo das células, em uma ou poucas cópias por célula. A eficiência de transformação é baixa, em média de 1 a 10 transformantes/μg de DNA plasmidial. No entanto, é considerado um dos tipos de plasmídeos mais estáveis, sofrendo apenas 0,1% de perda por geração (Rose e Broach, 1991; Ausubel et al., 1992).

Em *S. cerevisiae* a integração ocorre por recombinação homóloga entre as sequências cromossomais e plasmidiais, quando empregado plasmídeos integrativos; no entanto, pode ocorrer itegração, em baixíssima frequência, com plasmídeos de replicação autônoma (Rothstein, 1991).

A integração de um plasmídeo no cromossomo da levedura pode ocorrer de duas maneiras:

1 – integração por adição – quando há um único evento de recombinação ou “crossing over”, assim o plasmídeo integrado fica flanqueado por repetições diretas da região homóloga (Hinnem et al., 1978; Botstein e Davis, 1982).

2 – integração por substituição – nesse caso ocorrem dois eventos de recombinação, ocasionando a substituição de um sequência cromossomal pela sequência homóloga correspondente no plasmídeo, não havendo integração do plasmídeo inteiro (Or Weaver et al., 1992).

- Plasmídeos epissômicos (YEp): possuem origem de replicação do plasmídeo 2 μ m natural de levedura *S. cerevisiae*. Apresentam alta eficiência de transformação, na ordem de 10^4 a 10^5 transformantes/ μ g de DNA plasmidial, mantendo-se em, aproximadamente, 30 cópias por célula. Os transformantes são pouco estáveis, ocorrendo perda mitótica do plasmídeo na ordem de 1% por geração, em meio não seletivo (Rose e Broach, 1991; Ausubel et al., 1992).

- Plasmídeos replicativos (YRp): replicam-se autonomamente na célula de levedura devido à presença de fragmentos de DNA cromossomais denominados ARS (sequências de replicação autônoma), que funcionam como origem de replicação. A eficiência de transformação destes plasmídeos é da ordem de 10^3 a 10^4 transformantes/ μ g de DNA plasmidial e estão presentes de 1 a 20 cópias por célula. Os transformantes são extremamente instáveis, devido à sua ineficiência de transmissão às células filhas. Quando os clones recombinantes são cultivados em meio completo, apresentam uma perda do plasmídeo superior a 1% por geração e, mesmo em meio mínimo, condição onde é imposta elevada pressão seletiva, o plasmídeo é perdido em alta frequência (Botstein e Davis, 1982; Ausubel et al., 1992; Romanos et al., 1992; Miller e Kowalski, 1993).

- Plasmídeos centroméricos (YCp): possuem um fragmento de DNA correspondente à região centromérica do cromossomo de *S. cerevisiae* (sequência *CEN*). Essa região permite o movimento ordenado dos cromossomos durante as divisões celulares. Assim, emprega-se a adição dessa região a plasmídeos epissômicos ou replicativos, a fim de reduzir sua instabilidade. A perda em meio não seletivo é menor

que 1% por geração. A eficiência de transformação está por volta de 10^3 a 10^4 transformantes/ μ g de DNA plasmidial (Rose e Broach, 1991; Ausubel et al., 1992).

- Plasmídeos lineares (YLp): suas extremidades são formadas por sequências ricas em Guanina, que atuam como telômeros, permitindo ao plasmídeo se replicar como uma molécula linear. Apesar de apresentarem alto número de cópias por célula, são instáveis (Ausubel et al., 1992).

- Cromossomos artificiais (YAC): são segmentos de DNA lineares, de várias kilobases de tamanho, com origem de replicação, centrômeros e telômeros. Podem ser utilizados para clonagem de grandes fragmentos de DNA, permanecendo como réplicas de DNA genômico na célula. Devido ao seu tamanho, a eficiência de transformação é reduzida; no entanto, os transformantes são relativamente estáveis (Burke e Olson, 1991).

1.6 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* por δ -integração

Há mais de 30 anos os retrotransposons de *S. cerevisiae* vêm sendo estudados. Estes são distribuídos em cinco famílias específicas denominadas *Ty1* a *Ty5*, sendo que as mais estudadas são *Ty1* e *Ty2* que compartilham diversas características (Cameron et al., 1979).

Com o sequenciamento completo do genoma de *S. cerevisiae* em 1996 (Gouffreau et al., 1996), foi possível verificar a presença de 217 cópias do transposon *Ty1*, das quais 32 são completas; e, 34 cópias do transposon *Ty2*, sendo que 13 destas são elementos completos (Kim et al., 1998; Plant et al., 2000). Estes transposons são ladeados por longas sequências terminais ("long terminal repeats"- LTR) que, no caso dessas duas famílias, são denominadas sequências δ . Como essas sequências são cicatrizes em regiões onde um transposon esteve inserido e depois se excisou, é possível verificar a existência de aproximadamente 420 cópias no genoma de *S. cerevisiae*, tornando este um alvo promissor para a inserção de genes heterólogos.

Estes elementos já foram usados como alvos de inserção de informações genéticas clonadas em linhagens *S. cerevisiae* haplóides de coleções de cultura (Cho et al. 1999; Kim et al., 2001; Guerra et al., 2006).

Nosso grupo de pesquisas demonstrou que a δ -integração também pode ser empregada, com sucesso, para a transformação genética de linhagens *S. cerevisiae* industriais. Empregando-se o vetor de transformação pGEM-TEasy δ , foram obtidos

transformantes estáveis de linhagens de levedura de laboratório e linhagens selvagens empregadas em usinas sucroalcooleiras, como PE-2. Estes clones recombinantes apresentaram várias cópias do cassete de expressão da glicoamilase inseridas no genoma e os transformantes demonstraram-se estáveis ao longo de mais de 200 gerações (Guerra et al., 2006).

No sistema de δ -integração empregado em nosso laboratório, os transformantes são obtidos empregando-se a técnica da co-transformação, com o fragmento de DNA linear do cassete de expressão desejado (flanqueado por sequências do elemento delta) e um plasmídeo instável, para permitir a seleção dos clones por complementação gênica ou resistência a G418. A seleção dos transformantes de interesse é realizada em duas etapas: 1) Pré-seleção positiva daqueles que receberam o plasmídeo (por exemplo Leu^+ ou G418^R); e, 2) Dentre os transformantes pré-selecionados, seleção daqueles que receberam o fragmento com o cassete de expressão desejado (por exemplo Amilase^+). Assim, após a obtenção dos clones que contém o gene de interesse inserido, as células são cultivadas sem pressão seletiva a fim de perderem o plasmídeo, possibilitando que essa linhagem seja hospedeira para um novo evento de transformação genética (Guerra et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil tem um importante papel no mercado mundial de etanol combustível, sendo o maior detentor da tecnologia de sua produção a partir da cana-de-açúcar e, atualmente, o segundo maior produtor deste combustível. Com o crescimento desse mercado e as perspectivas de aumento de exportação, torna-se interessante a diversificação da matéria prima empregada como substrato para a produção do etanol. Uma alternativa é o uso do amido nesse processo.

Como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não apresenta a capacidade de converter diretamente amido a etanol, faz-se necessária a aplicação de duas etapas para a conversão do amido em açúcares fermentáveis, a liquefação com a enzima α -amilase e a sacarificação com a glicoamilase (Nakamura, 1997).

Segundo Verma et al. (2000) o emprego de enzimas amilolíticas de origem bacteriana e fúngica para a sacarificação do amido eleva consideravelmente o custo do processo de produção do etanol. Com isso, a construção de leveduras recombinantes capazes de converter o amido em etanol, tem sido alvo de diversos trabalhos (Astolfi Filho et al., 1986; Randez-Gil e Sanz, 1993; Janse e Pretorius, 1995; Moraes et al., 1995; Nakamura et al., 1997; Knox et al., 2004; Shigechi, 2004). No entanto, alguns fatores, como a linhagem de levedura empregada e o tipo de vetor de transformação construído, inviabilizam o uso dessas construções em escala industrial.

Ainda visando a produção de etanol a partir de substratos amiláceos, é de grande importância a construção de linhagens de leveduras *S. cerevisiae* recombinantes que expressem ambas as enzimas glicoamilase e α -amilase. No entanto, é importante que os novos vetores de transformação construídos possam ser eficazmente empregados em linhagens de leveduras industriais, mantendo-se estáveis durante a utilização nas dornas de fermentação.

Considerando que em trabalho anterior realizado em nosso laboratório foi construído o vetor δ -Glico- δ , que permite a construção de linhagens *S. cerevisiae* recombinantes que expressam e excretam a glicoamilase (Guerra et al., 2006), neste trabalho buscou-se a construção de vetores (δ -Amy- δ) e a obtenção de clones transformantes de *S. cerevisiae* por δ -integração, que expressam e excretam α -amilase.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a construção de linhagens recombinantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que expressassem o gene da α -amilase integrado aos seus genomas.

3.1 Objetivos específicos

- Construir os vetores para serem empregados na transformação genética por δ integração contendo o gene da α -amilase na forma truncada (*AmyEt*) e na forma completa (*AmyE*);
- Empregar os novos vetores δ AmyEt δ e δ AmyE δ na transformação genética de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* laboratoriais;
- Analisar os níveis de degradação de amido adquiridos pelas linhagens recombinantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de bactéria *E. coli*

A linhagem as bactéria *E. coli* hospedeira utilizada no trabalho é de origem laboratorial e encontra-se estocada no Banco de Linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

♦ *Escherichia coli* DH5 α - *supE44*; Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15); *hsdR17 recA1*; *endA1*; *gyrA96*; *thi-1*; *relA1* (Hanahan, 1983).

4.2 Linhagens de levedura

Todas as linhagens utilizadas no trabalho encontram-se estocadas no Banco de Linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

♦ *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 - *MAT α* , *ura3-52*, *lys2-801^{amber}*, *ade2-101^{ochre}*, *trp1- Δ 1*, *his3- Δ 200*, *leu2- Δ 1*, *CAN1* (Sikorski; Hieter, 1989).

♦ *Saccharomyces cerevisiae* YPH252 - *MAT α* , *ura3-52*, *lys2-801^{amber}*, *ade2-101^{ochre}*, *trp1- Δ 1*, *his3- Δ 200*, *leu2- Δ 1*, *CAN1* (Sikorski; Hieter, 1989).

4.3 Plasmídeos

Durante as etapas de construção dos vetores de transformação foram utilizados os plasmídeos comerciais, plasmídeos construídos em trabalhos anteriores e plasmídeos construídos neste trabalho (Quadro 1).

4.4 Meios de Cultura para o cultivo de bactérias

Para o cultivo da bactéria *E. coli* DH5 α foram empregados meios LB ou SOC. Utilizou-se para o preparo dos meios de cultivo os produtos do fabricante Difco ou Sigma. A preparação do meio sólido foi idêntica ao do meio líquido, acrescido de 2% de ágar-ágar Difco. Após o preparo dos meios líquidos e sólidos, estes foram esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 min. Quando necessário, adicionou-se, ao meio,

solução de ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. As culturas bacterianas em meio sólido foram incubadas em estufa, a 37 °C. Os cultivos em meio líquido foram realizados com aeração em “shaker”, a 150 rpm, na mesma temperatura.

Quadro 1 - Plasmídeos empregados nas etapas de construção dos vetores de transformação

Plasmídeo	Descrição	Referência
pCR [®] 2.1-TOPO	Plasmídeo comercial para clonagem de produto de PCR.	Invitrogen [®]
pGEM-T	Plasmídeo comercial para clonagem de produto de PCR.	Promega [®]
pGEM-TEasy	Plasmídeo comercial para clonagem de produto de PCR.	Promega [®]
pPIC9K	Plasmídeo de expressão e secreção em <i>P. pastoris</i> .	Invitrogen [®]
pAJ50	(2µm, <i>LEU2</i> , G428 ^R).	Jimenez e Davis, 1980
pMA91	Plasmídeo episomal para transformação de <i>S. cerevisiae</i> (<i>LEU2</i>) possuindo o promotor forte e constitutivo <i>PGK</i> e o terminador de transcrição <i>PGK</i> .	Mellor et al., 1983
pAA3	Plasmídeo com o gene truncado da α-amilase de <i>B. subtilis</i> (<i>amyE</i>) com a própria sequência sinal sob regulação do promotor <i>ADH1</i>	Moraes et al., 1995
pGEM-TEasy-δ	Plasmídeo pGEM-TEasy com adição do elemento δ.	Guerra et al., 2006
pTPA	Plasmídeo pCR [®] 4-TOPO com gene completo da α-amilase de <i>B. subtilis</i> D2 (<i>amyE</i>).	Müller, 2008
pGEM-δAmyEδ	Plasmídeo pGEM-TEasy-δ com o gene truncado da α-amilase truncado (<i>amyE</i>) sob regulação do promotor <i>ADH1</i> .	Construído neste trabalho
pPIC9K-AmyE	Plasmídeo pPIC9K com o gene completo da α-amilase de <i>B. subtilis</i> D2 (<i>amyE</i>).	Construído neste trabalho
pGEM-T AmyE	Plasmídeo pGEM-T com o gene completo da α-amilase de <i>B. subtilis</i> D2 (<i>amyE</i>)	Construído neste trabalho
pMA91-AmyE	Plasmídeo pMA91 com o gene completo da α-amilase de <i>B. subtilis</i> (<i>amyE</i>).	Construído neste trabalho
TOPO-AmyE	Plasmídeo pCR [®] 2.1-TOPO com o gene completo da α-amilase de <i>B. subtilis</i> (<i>amyE</i>), sob regulação do promotor <i>PGK</i> .	Construído neste trabalho
pGEM-δAmyEδ	Plasmídeo pGEM-TEasy-δ com o gene completo da α-amilase (<i>amyE</i>) sob regulação do promotor <i>PGK</i> .	Construído neste trabalho

Meio completo (Luria Bertani) – **LB** -

- 1% triptona (Difco),
- 1% cloreto de sódio (Sigma),
- 0,5% extrato de levedura (Difco).

Meio de recuperação – **SOC** -

- 2% de triptona (Difco),
- 0,5% extrato de levedura (Difco),
- 10 mM cloreto de magnésio (Sigma),
- 10 mM sulfato de magnésio (Sigma),
- 20 mM glicose (Difco).

4.5 Meios de Cultura para o cultivo de leveduras

Para o cultivo de levedura foram utilizados meio completo (YPD) ou meio mínimo (SD) suplementado com aminoácidos e bases nitrogenadas. Todos os produtos utilizados para o preparo dos meios de cultivo são do fabricante Difco ou Sigma. A preparação dos meios sólidos foi idêntica aos dos meios líquidos, acrescidos de 2% de ágar-ágar Difco. Após o preparo os meios sólidos, estes foram esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 min. Os cultivos em meio sólido foram realizados em estufa 28 °C; os cultivos em meio líquido foram realizados com aeração em “shaker” a 150rpm, na mesma temperatura.

Meio completo – **YPD** -

- 1% extrato de levedura (Difco),
- 2% peptona (Difco),
- 2% glicose (Difco).

Meio completo acrescido de amido – **YPDA** -

- Meio YPD,
- 0,5% amido (Sigma) (ou 1% no experimento para a curva de consumo).

Meio mínimo – **SD** -

- 0,67% YNB (Yeast Nitrogen Base - Difco) sem aminoácidos,
- 2% Glicose (Difco).

Meio mínimo acrescido de amido – **SDA** -

- Meio SD,
- 0,5% Amido (Sigma).

Meio mínimo acrescido com base nitrogenada e aminoácidos – **SD-THUAL**

Refere-se ao meio mínimo SD, acrescido com a base nitrogenada Uracila (concentração final no meio 40 µg/mL) e dos 4 aminoácidos: L-Triptofano, L-Histidina, L-Adenina e L-Lisina na concentração final de 40 µg/mL, cada).

A esterilização dos aminoácidos e das bases nitrogenadas foi realizada por filtração em membrana da marca Millipore de poro 0,22 µm e foram adicionadas aos meios somente quando estes estavam na temperatura máxima de 40 °C.

4.6 Soluções

Para o preparo de soluções foram utilizados reagentes de pureza analítica e de procedência dos fabricantes Sigma, Merk ou Gibco-BRL. Todas as soluções foram preparadas conforme descrito por Sambrook e Russel (2001), exceto quando indicado. As soluções foram esterilizadas em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 min e, quando necessário, foram filtradas em membrana da marca Millipore de poro 0,22 µm.

4.6.1 Soluções para extração e purificação de DNA

Solução I

- 25 mM Tris-HCl (pH 8,0),
- 10 mM EDTA,
- 50 mM glicose.

Solução II

- 0,2 M NaOH,
- 1% SDS.

Solução III

- 3 M Acetato de potássio,
- 2 M Ácido acético (pH 4,8).

Solução clorofórmio – álcool isoamílico

- 24 volumes de clorofórmio para 1 volume de álcool isoamílico.

Solução fenol clorofórmio

- 1 volume de fenol para 1 volume de clorofórmio.

Solução Clorofórmio – Álcool Isoamílico

- 24 volumes de clorofórmio para 1 volume de álcool isoamílico.

Solução Tampão de eluição (TE)

- Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM

Após o preparo a solução foi esterelizada por autoclavação.

4.6.2 Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose

Solução corante “Stop Mix”

- Azul de bromofenol 0,5%; glicerol 50%, 100 mM EDTA (pH 8,0)

Solução Tampão TBE (10X)

- 0,89 mM Tris; 0,89 mM ácido bórico e 0,2 mM EDTA

Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose - TBE 0.5X - (Tampão TBE 10X diluído 20X)

Solução de brometo de etídio

- 5 mg de brometo de etídio em 50 mL de água bidestilada.

4.6.3 Agentes antimicrobianos

- Ampicilina - 100 µg/mL ampicilina dissolvida assepticamente em água esterilizada (solução estoque). Adicionado ao meio LB na concentração final de 100 µg/mL.

4.6.4 Solução de amido

- Amido 5% - A mistura de 5g de Amido em 100 mL de água destilada foi fervida e, em seguida, esterelizada por autoclavação.

4.7 Extração e purificação de DNA plasmidial bacteriano

A extração de plasmídeos de clones recombinantes derivados de *E. coli* DH5 α foram realizadas a partir de um inóculo de 5 mL de meio LB contendo ampicilina (concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$), cultivados a 37 °C, durante 16 horas, com agitação em “shaker”, a 100 rpm. A cultura foi centrifugada em tubos de microcentrífuga do tipo “Eppendorf” de 1,5 mL, a 4.500 g, por 2 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o excesso retirado com uma pipeta de ponteira fina. O sedimento foi suspenso em 300 μL de Solução I, com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, foram adicionados 300 μL de solução II, e incubou-se por 5 minutos, a temperatura ambiente. Adicionou-se 300 μL de solução III, e incubou-se o tubo por 10 minutos, no gelo. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado por 15 minutos, a 10.000 g, a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 750 μL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (solução 24 -1). A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada, por 2 minutos, a 4.500 g, a temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada e a esta foram adicionados 700 μL de álcool isopropílico (isopropanol). A suspensão foi misturada por inversão e incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após esse tempo, a solução foi centrifugada a 10.000 g, por 20 minutos, a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 70%, a 4°C e seco a vácuo, durante 10 minutos. O resíduo seco foi resuspenso em 50 μL de água bidestilada estéril e tratado com RNase A (Sigma) na concentração de 10 mg/mL, por 30 minutos, a 37°C. Para análise, o material foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose A (Bio Basic Inc.) Sigma 0,8%.

4.8 Tratamento de DNA plasmidial com enzimas de restrição

As digestões de DNA com enzimas de restrição foram realizadas com volumes finais entre 10, 20 e 100 μL , utilizando, o tampão de reação e as condições de incubação recomendados pelo fabricante da enzima. Foram utilizadas entre 1 a 2 U de enzimas, para cada μg de DNA. Os tempos de incubação variaram entre 2 a 5 horas e, ocasionalmente, toda a noite. As enzimas de restrição utilizadas foram do fabricante Fermentas[®].

4.9 Análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose

As análises dos perfis de migração dos fragmentos de DNA foram realizadas em gel de agarose 0,8%, submetidos a corridas eletroforéticas. Os géis de agarose 0,8% foram preparados com tampão TBE 0,5X e brometo de etídio (10 mg/mL).

As amostras de DNA, misturadas com a solução de tampão de amostra, foram aplicadas em gel e, em seguida, a corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida TBE 0,5X, conforme descrito em Sambrook e Russell (2001). A visualização das bandas e a fotodocumentação foram realizadas empregando-se transluminador contendo lâmpada ultravioleta, e o aparelho “Eagle-eye” da “Stratagene”, modelo “Eagle Eye II”.

4.10 Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

Em vários casos, após ser submetido à corrida em gel de agarose, o fragmento de DNA presente na banda correspondente ao perfil de migração desejado foi recortado e transferido para um tubo de microcentrífuga de 2 mL. Para purificação dos fragmentos de DNA desejados utilizou-se o “Kit Illustra™ GFX™” da GE®. Foram seguidas as recomendações do fornecedor.

4.11 Desfosforilação de fragmentos de DNA

A retirada dos resíduos de fosfato das extremidades 5' dos fragmentos de DNA foi realizada com a finalidade de evitar a religação da molécula, e foi realizada empregando-se o tratamento com a enzima fosfatase alcalina (“Calf Intestinal Alkaline Phosphatase” – CIAP). Foram seguidas as recomendações de incubação indicadas pelo fabricante da enzima em uso (Fermentas®).

4.12 Ligações entre fragmentos de DNA

Para ligação de fragmentos de DNA foi utilizada a enzima DNA Ligase do fago T4 que catalisa a ligação fosfodiéster entre a terminação 5'– fosfato e a terminação 3'– hidroxí das fitas de DNA, promovendo a recircularização de plasmídeo, bem como a ligação entre fragmentos de DNA.

As concentrações de DNA (vetor/inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento. Normalmente, a quantidade de inserto foi de duas a três vezes a quantidade de vetor, em proporções de número de moléculas.

O sistema de ligação foi montado da seguinte maneira - à suspensão com os DNAs a serem ligados (vetor + inserto), foram adicionados 1/10 do volume final de tampão de ligase 10X, 1 µL da enzima DNA ligase do fago T4 (5 U/µl) e água bidestilada estéril para completar o volume desejado. Procurou-se evitar que o volume final excedesse a 10 µl. O tempo de incubação foi determinado de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen®) considerando o tipo de ligação - entre pontas coesivas, foi incubado por 16 horas, a temperatura ambiente; e, entre pontas cegas, a 14 °C, por 16 h.

4.13 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polimerase Chain Reaction”)

Alguns dos fragmentos de DNA neste trabalho foram obtidos por amplificação por PCR seguindo-se as especificações dos fabricantes dos produtos utilizados e de Sambrook e Russel (2001).

4.13.1 Amplificação do gene *amyE* junto com a sequência sinal de secreção do fator- α de *S. cerevisiae*

Para obtenção do fragmento de DNA “SS + α -amilase” (gene codificador da α -amilase de *B. subtilis* D2 (*amyE*) possuindo à montante a sequência sinal de secreção do fator- α de *S. cerevisiae*) foi empregado como molde o plasmídeo pPIC9K-AmyE (Figura 4); e, os seguintes oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir das sequências conhecidas do plasmídeo pPIC9K e do gene *amyE*, sintetizados pela Bioneer®:

Forward 1 - 5'..TTCGAAGGATCCAAACGATGAGA..3'; e,

Reverso 1 - 5'..GCAGGATCCATTCTACAGCAGAAGTGGAAAGATATATGG..3'.

A reação foi realizada nas seguintes condições: 40 ng de DNA, tampão 1X, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µM de cada iniciador, 1,5 U de High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas®), e água deionizada esterilizada em quantidade suficiente para um volume total de 50 µL.

O programa de PCR utilizado em termociclador C1000™ (Biorad) foi composto pelos seguintes passos: desnaturação inicial a 95 °C, por 5 minutos; ciclo de 32 vezes

composto por: um passo de desnaturação a 95 °C, por 1 minuto; anelamento dos iniciadores com temperatura a 56°C, por 40 segundos; e, um passo de extensão das fitas a 72 °C, por 2 minutos; e um passo de extensão final a 72 °C, por 10 minutos.

Figura 4 - Amplificação por reação de PCR do fragmento de DNA “SS + AmyE”

Ilustração da amplificação por reação de PCR do fragmento de DNA “SS + AmyE” (1754 pb) a partir do plasmídeo pPIC9K-AmyE (Construído neste trabalho).

4.13.2 Amplificação do cassete de expressão PPGK-AmyE-TPGK

Para obtenção do cassete de expressão “PPGK-AmyE-TPGK” (gene *amyE* sob regulação do promotor e do terminador de transcrição *PGK*) foi empregado como molde o plasmídeo pMA91-AmyE (Figura 5); e, os seguintes oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Bioneer®; e, desenhados a partir das sequências conhecidas do promotor e do terminador de transcrição *PGK*:

Forward 2 - 5'.. CGGGATCCCGAAGCTTTCTAACTGATCTATCCAAA ..3'; e,

Reverso 2 - 5'.. CGGGATCCCGAAGCTTTAACGAACGCAGAATT..3'.

A reação foi realizada nas mesmas condições citadas no item anterior e o programa de PCR utilizado em termociclador C1000™ (Biorad) foi composto pelos seguintes passos: desnaturação inicial a 95 °C, por 5 minutos; ciclo de 32 vezes composto de: um passo de desnaturação a 95 °C, por 1 minuto; anelamento dos

iniciadores com temperatura a 56 °C, por 40 segundos; e, um passo de extensão das fitas a 72 °C, por 4 minutos; e um passo de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Figura 5 - Amplificação por reação de PCR do cassete de expressão *PGK-AmyE-PGK*

Ilustração da amplificação por reação de PCR do cassete de expressão *PGK-AmyE-PGK* (3605 pb) a partir do plasmídeo pMA91-AmyE (construído neste trabalho).

4.14 Transformação genética

4.14.1 Da bactéria *E. coli*

4.14.1.1. Preparo de células competentes

A partir de uma cultura da bactéria *E. coli* DH5 α crescida em meio LB por 16 horas, 1 mL foi retirado e inoculado em 100 mL de meio LB, e realizada a incubação, a 37 °C, com agitação em “shaker”, a 110 rpm, até atingir uma Absorbância (600 nm) em torno de 0.5-0.6. A suspensão foi coletada em tubos de centrifuga, incubada no gelo por cerca de 15 a 30 minutos e centrifugada a 4.500 g, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspense em 100 mL de água destilada estéril, a 4 °C. As células foram centrifugadas como descrito na etapa anterior. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 50 mL de água destilada estéril a 4 °C e centrifugada novamente. As células foram ressuspensas em 2 mL de glicerol a 10%,

a 4 °C e centrifugadas pela última vez nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas num volume final de 300 µL em glicerol 10%, a 4 °C (concentração de $1-3 \times 10^{10}$ células/mL). A suspensão de células foi coletada em microtubos do tipo “Eppendorf” de 1,5 mL, em alíquotas de 40 µL que foram armazenadas a temperatura de -70 °C.

4.14.1.2. Transformação

As células de bactéria, preparadas como descrito no item anterior, foram retiradas do freezer -70 °C e, imediatamente, incubadas em gelo picado até o seu descongelamento. Cerca de 40 µL da suspensão de células foram colocados em microtubos do tipo “Eppendorf” gelados e foi adicionado 1 µL de DNA plasmidial. A mistura célula/DNA foi transferida para a cubeta a 4 °C e esta inserida no eletroporador “Gene-Pulser” da BioRad que foi calibrado de acordo com a cubeta utilizada. Em seguida, o pulso foi aplicado nas condições estabelecidas (voltagem - 2,5 kv, capacitor - 25 µF, resistor - 200 Ω e constância do tempo de 4,6 a 4,8 seg.). Imediatamente após o pulso, as cubetas foram removidas da câmara de aplicação do pulso e foi adicionado às células 1 mL de meio SOC. A suspensão foi então transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37 °C, em “Shaker” com agitação de 150 rpm, por 1 hora. Após esse tempo de incubação, visando a expressão do gene de resistência presente no plasmídeo, a suspensão bacteriana foi semeada em placas contendo meio sólido seletivo LB – Amp (item 3.4), e estas foram incubadas em estufa a 37 °C, por 16-24 horas.

4.14.2 Transformação genética de levedura *S. cerevisiae*

Os vetores e sistema de transformação genética aqui utilizados foram os seguintes - vetor de transformação pAJ50; e, sistema de transformação composto pelo vetor de transformação pAJ50 juntamente com um dos fragmentos de DNA - δ AmyE δ ou δ AmyEt δ . Empregou-se o método de transformação de células intactas com acetato de lítio (Gietz, et al., 1992), com atualizações do método obtidas na Internet, no site [http - //www.umanitoba.ca/faculties/medicine](http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine). As células de leveduras foram cultivadas em 30 mL de YPD até o início da fase exponencial de crescimento (Absorbância a 600 nm). As células foram transformadas com um plasmídeo controle positivo e, como controle negativo foi empregado uma mistura de transformação sem DNA. Para a seleção dos clones transformantes, as misturas de transformação foram semeadas sobre meio sólido

SD-THUAL (item 3.5), distribuído em placas de Petri, quando os transformantes foram selecionados por complementação gênica para o fenótipo Leu^+ .

4.15 Cálculo da eficiência e da frequência de transformação e co-transformação gênica

4.15.1 Eficiência de transformação do plasmídeo pAJ50

Esse valor foi calculado pela relação entre o número total de transformantes Leu^+ e a quantidade (em μg) do plasmídeo pAJ50 empregado em cada transformação.

4.15.2 Eficiência de transformação dos fragmentos de DNA $\delta\text{AmyEt}\delta$ e $\delta\text{AmyE}\delta$

Esse valor foi calculado pela relação do número total de transformantes produtores de halos de amilolise dentre os transformantes Leu^+ pré-selecionados e a quantidade (em μg) do fragmento $\delta\text{AmyEt}\delta$ ou $\delta\text{AmyE}\delta$ empregado em cada transformação.

4.15.3 Frequência de co-transformação dos fragmentos de DNA $\delta\text{AmyEt}\delta$ e $\delta\text{AmyE}\delta$

A frequência de co-transformação dos fragmentos $\delta\text{AmyEt}\delta$ e $\delta\text{AmyE}\delta$ foi calculada pela relação do número total de co-transformantes obtidos (número total de colônias amilolíticas) e o número de transformantes totais Leu^+ obtidos com o plasmídeo pAJ50.

4.16 Análise qualitativa da expressão e secreção da amilase

As colônias de leveduras recombinantes foram analisadas, qualitativamente, quanto à produção de amilase pela observação visual de halos de amilolise produzidos após o crescimento em meio sólido com 0,5 % de amido (YPDA) por 96h, a 28 °C. Para a melhor visualização dos halos de amilolise, posteriormente à incubação em estufa, as placas foram incubadas por 48 h, a 4 °C. Foram, então, abertas e emborcadas sobre outra placa contendo cristais de iodo sublimado, sendo as colônias expostas ao vapor de iodo o tempo suficiente para que o meio de cultura se tornasse corado (Astolfi Filho et al., 1986). Os clones que expressaram e excretaram a amilase apresentaram atividade amilolítica que foi evidenciada pela formação de halos claros em torno das colônias.

4.17 Curva de crescimento

A velocidade de crescimento de linhagens de levedura transformadas com os fragmentos de DNA $\delta\text{AmyEt}\delta$ (YPH252/AmyEt) e $\delta\text{AmyE}\delta$ (YPH252/AmyE) foram comparadas com as das linhagens YPH250 e YPH252 não transformadas. Para isso partiu-se de culturas contendo $2,0 \times 10^5$ células/mL em 25 mL de meio completo contendo amido (YPDA 1%), e foi realizada a incubação a 28 °C, com agitação a 150 rpm em "shaker".

Foram retirados pontos para leitura a cada 12 horas, durante 96 horas. Determinou-se a concentração de células na cultura, por leitura de Absorbância (600 nm). A leitura foi feita sem diluição ou com diluição de 10 ou 20 vezes, de acordo com a fase de crescimento das culturas, de forma que a absorbância fosse menor que 1.

4.18 Dosagem da atividade enzimática

A quantificação da enzima α -amilase expressa e excretada pelos clones recombinantes foi realizada baseando-se no método de detecção da quantidade de amido degradado ou do amido residual presente no sobrenadante da cultura (Chen et al., 1993; Kim et al., 1998; Camargo, 2000). Para esse fim, determinou-se inicialmente a quantidade de células presentes em culturas crescidas em meio líquido YPDA, durante 24 horas, a 28 °C, com agitação, empregando-se a contagem das células em câmara de Neubauer. Em seguida, partiu-se de culturas contendo $2,0 \times 10^5$ células/mL em 25 mL de meio completo contendo amido (YPDA 1%), sendo realizada a incubação a 28 °C, com agitação a 150 rpm em "shaker", por 96 horas, com amostras retiradas e analisadas a cada 12 horas.

Após centrifugação de 1 mL de cada uma das culturas, 100 μL do sobrenadante foram adicionados a 5 mL de solução de I_2 preparada imediatamente antes de sua utilização (100 μL de solução de I_2 em 100 mL de HCl 50 mM, para uma concentração final de 0,1 %). A solução de I_2 foi armazenada a temperatura ambiente, em frasco escuro. Para este ensaio foram empregados dois controles: 1) substituindo-se os 100 μL do sobrenadante por 100 μL de meio de cultura YPA, para obter o valor de leitura referente à quantidade do amido inicial contido no meio de cultura; 2) 100 μL da solução de I_2 diluída em HCl, para zerar a leitura do aparelho.

As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro U-2000 da Hitachi, na Absorbância de 600 nm. Cada leitura obtida no aparelho foi convertida em concentração

de amido residual presente no sobrenadante, empregando-se a curva de calibração das leituras em função da concentração de amido (mg de amido/mL de sobrenadante), previamente realizada (ANEXO 1). Considerando que, inicialmente, o meio de cultura continha 1% de amido, ou seja, 10 mg de amido/mL de meio, a relação de amido inicial e amido restante no sobrenadante foi calculada de acordo com a fórmula abaixo, onde X representa a concentração do amido residual, determinada pela relação entre o valor verificado em leitura de Abs_{600} , e os valores obtidos na curva de calibração (ANEXO 1).

Para determinar a quantidade de amido degradado no meio, utilizou-se a seguinte fórmula: $Y = 10 \text{ mg/mL de meio} - X \text{ mg/mL de meio}$, onde: X = amido detectado no meio de cultura; e, Y = Amido degradado do meio de cultura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a construção de vetores de transformação integrativos, que se mantenham estáveis no genoma de leveduras *S. cerevisiae*, mesmo daquelas empregadas no processo de produção do bioetanol. Para isso, utilizou-se o sistema de δ -integração, empregando-se o plasmídeo pGEM-TEasy δ , desenvolvido anteriormente em nosso laboratório (Guerra et al., 2006).

Dessa forma, foram realizadas as construções de dois vetores de transformação genética de *S. cerevisiae*, ambos possuindo o gene da α -amilase (*amyE*) de *Bacillus subtilis* variedade D2: 1) o vetor δ AmyEt δ , que possui o gene da α -amilase na forma truncada, regulado pelo promotor do gene da álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*, *ADH1*; e, 2) o vetor δ AmyE δ , que contém o gene da α -amilase na forma completa, regulado pelo promotor forte e constitutivo do gene da fosfoglicerato quinase de *S. cerevisiae*, *PGK*.

5.1 Construção do vetor de transformação δ AmyEt δ

Na primeira etapa do projeto buscou-se um plasmídeo portador do gene da α -amilase no banco de plasmídeos do laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sendo selecionado o plasmídeo pAA3 (Moraes, 1995), o qual contém o gene da α -amilase de *B. subtilis* D2, porém na forma truncada, aqui denominado *amyEt*. No estudo realizado por Marco et al. (1996) foi verificado que esse gene codifica uma proteína cujos 171 aminoácidos da região carboxiterminal foram substituídos por 33 aminoácidos residuais ausentes na proteína nativa.

O fluxograma presente na Figura 6 ilustra os passos envolvidos na construção do vetor de integração δ AmyEt δ , os quais serão em seguida detalhados.

O cassete de expressão contendo o gene da α -amilase, a sequência do peptídeo sinal própria, de *B. subtilis*, e o promotor e terminador *ADH1* foi isolado a partir da digestão do plasmídeo pAA3 (Moraes et al., 1995) com a enzima de restrição *Bam* HI (Figura 7). Esse fragmento (pADH1–SS–AmyE t–tADH1), de 4.250 pb, foi isolado, purificado e clonado no vetor de integração pGEM-TEasy δ (Guerra et al., 2006), previamente digerido com a mesma endonuclease (Figura 8).

Figura 6 - Etapas envolvidas na construção do vetor de integração AmyEtδ

Figura 7 - Digestão do plasmídeo pAA3 com a endonuclease Bam HI

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese - 1) 1Kb DNA Ladder Fermentas; 2, 3 e 4) plasmídeo pAA3 digerido com *Bam* HI apresentando a banda de 4,2Kb a ser eluída, referente ao cassette da α-amilase.

A mistura de ligação do pGEM-TEasy δ , previamente digerido com *Bam* HI e do cassete de expressão da α -amilase, ladeado pelos sítios de *Bam* HI, foi utilizada na transformação genética da bactéria *E. coli* DH5 α sendo obtidos 127 transformantes resistentes a ampicilina (Amp^R). Os DNAs plasmidiais de 9 transformantes selecionados ao acaso foram isolados e digeridos com *Bam* HI, em seguida, os fragmentos de DNA foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose e analisados.

Figura 8 - Construção do plasmídeo pGEM- δ AmyEt δ

O novo plasmídeo construído, denominado pGEM- δ AmyEt δ , quando digerido com a enzima *Bam* HI, produz dois fragmentos de DNA - um de 3,3 Kb, referente ao plasmídeo pGEM-TEasy δ ; e, outro de 4,2 Kb, referente ao cassete da α -amilase. A análise de restrição permitiu a seleção de 5 clones que apresentaram estes fragmentos (clones 1, 2, 3, 5 e 9) (Figura 9). O clone 5 foi selecionado para a continuação do trabalho.

Figura 9 - Transformantes da ligação pGEM-TEasy δ com o cassete da α -amilase digeridos digestão com *Bam* HI

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese - 1-9) Transformantes da ligação pGEM-TEasy δ e o cassete da α -amilase após digestão com *Bam* HI; 10) 1Kb DNA Ladder Fermentas.

Após ser confirmada a construção do plasmídeo pGEM- δ AmyEt δ , o mesmo foi digerido com a enzima *Not* I, produzindo dois fragmentos de DNA - um com 3,0 Kb, referente ao plasmídeo pGEM-TEasy (sem a sequência delta); e, outro com aproximadamente 4,5 Kb, correspondente ao vetor de integração δ AmyEt δ (cassete de expressão da α -amilase ladeado pela sequência delta). O fragmento de DNA de 4,5 Kb foi isolado, purificado e estocado a -20 °C, para subsequente utilização na transformação genética de leveduras (Figura 10 A e B).

Müllher (2008).

O fluxograma a seguir ilustra, de forma resumida, as etapas envolvidas na construção do vetor de integração δ AmyE δ , constituído pelo gene da α -amilase sob regulação do promotor *PGK*, ladeado pela sequência δ de integração (Figura 11). Estas etapas estão detalhadas nos tópicos seguintes.

Figura 11 - Fluxograma das etapas envolvidas na construção do vetor de integração δ AmyE δ

5.2.1 Obtenção da sequência sinal de secreção do fator- α de *S. cerevisiae*

O gene da α -amilase de *B. subtilis* variedade D₂ (*amyE*, 1468 pb) foi isolado a partir da digestão do plasmídeo pTPA (Müller, 2008) com as endonucleases *Eco* RI e *Not* I. Para se obter a sequência sinal de secreção do fator- α de levedura, o gene *amyE* foi inserido no vetor comercial pPIC9K previamente digerido com as enzimas *Eco* RI e *Not* I gerando um novo plasmídeo, designado pPIC9K-AmyE (Figura 12).

Figura 12 - Construção do plasmídeo pPIC9K-AmyE e amplificação do fragmento de DNA "SS-AmyE"

O plasmídeo pPIC9K-AmyE foi utilizado como molde para a amplificação do fragmento de DNA "SS + α -amilase", ladeado por sítios da enzima de restrição *Bam* HI, utilizando-se os oligonucleotídeos indicados em Material e Métodos (5.6) (Figura 13A).

O produto de PCR, “SS-AmyE”, foi inserido no plasmídeo pGEM-T, originando o novo plasmídeo pGEM-T-AmyE (Figura 13C). Em seguida, essa mistura de ligação foi utilizada na transformação genética de células *E. coli* DH5 α , as quais foram semeadas em meio seletivo acrescido de IPTG e X-Gal, possibilitando a visualização de 16 prováveis clones recombinantes de interesse (colônias brancas). Para a confirmação do sucesso da clonagem os DNAs plasmidiais dos transformantes foram isolados, purificados e digeridos com *Bam* HI. Em seguida, os fragmentos de DNA foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose e analisados. O padrão de migração de DNA em gel da agarose confirmou o sucesso da construção desejada, sendo visualizadas as bandas de 3,0Kb e 1,7Kb referentes ao plasmídeo pGEM-T e ao fragmento de DNA “SS-AmyE”, respectivamente (Figura 13B).

Figura 13 - Clonagem do fragmento “SS-AmyE” no vetor pGEM-T

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese - A) Amplificação do fragmento “SS-AmyE” a partir do plasmídeo pPIC9K-AmyE - 1- Ladder 1Kb; 2 e 3- produtos de PCR “SS-AmyE”; 4- controle negativo da PCR. B) Fragmento “SS-AmyE” isolado do plasmídeo pGEM-T-AmyE e eluído do gel de agarose - 1- Ladder 1Kb; 2 e 3- DNA “SS-AmyE”; 4- plasmídeo pMA91 digerido com *Bgl*II.

5.2.2 Construção do vetor pMA-AmyE

O fragmento de DNA “SS-AmyE” de 1739pb foi isolado do plasmídeo pGEM-T-AmyE por digestão com a enzima *Bam* HI, eluído do gel de agarose, purificado e inserido no sítio *Bgl* II do plasmídeo pMA91, entre as sequências do promotor e do terminador de transcrição do gene da fosfoglicerato quinase, *PGK* (Figura 14).

Figura 14 – Estratégia de construção do vetor pMA-AmyE

A mistura de ligação pMA91 e o fragmento de DNA “SS-AmyE” foi empregada na transformação genética de células *E. coli* DH5 α . Foram obtidos 154 transformantes Amp^R, dos quais 24 foram selecionados para análise de restrição. Para isso, os DNAs

plasmidiais dos clones transformantes foram isolados, purificados e digeridos com *Eco* RI e, em seguida os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Os DNAs de apenas 7 clones transformantes apresentaram padrões de migração diferentes do plasmídeo pMA91, utilizado como controle (Figura 15).

Figura 15 - Transformantes obtidos com a mistura de ligação pMA91 e “SS + AmyE” após digestão com *Eco* RI

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese - A e B) 1-24 - DNAs plasmidiais de clones transformantes obtidos com a mistura de ligação pMA91 e “SS + AmyE” após digestão com *Eco* RI (círculos em vermelho destacam os clones com perfis eletroforéticos diferentes do plasmídeo pMA91 empregado como vetor de clonagem); L - 1Kb DNA Ladder Fermentas; P - DNA plasmidial não digerido isolado do transformante 1; C- - Plasmídeo pMA91 digerido com *Eco* RI (controle).

Em seguida, a presença do fragmento de DNA “SS + AmyE” foi confirmada empregando-se amplificação por PCR com os oligonucleotídeos “BamPGK” (Material e métodos, item 5.6) e como DNA molde os plasmídeos isolados dos clones recombinantes. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e analisados. Assim, foram confirmados 3 clones pMA-AmyE, por apresentarem

produtos de PCR de aproximadamente 3,7kb, correspondente à soma do fragmento “SS + AmyE” (~1,7kb) com o promotor *PGK* (~1,8kb) (Figura 16).

Figura 16 - PCR confirmatório da construção pMA-AmyE

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese. PCR confirmatório da construção pMA-AmyE. Produtos amplificados empregando-se primers que anelam na região do promotor *PGK* e como molde plasmídeos recombinantes isolados. Canaletas 1 a 3 - plasmídeos recombinantes isolados dos clones pMA-AmyE (3,4Kb); 4 - DNA amplificado a partir do plasmídeo pMA91 (1,8kb); L - 1Kb DNA Ladder Fermentas.

Além da associação do gene da α -amilase à sequência do promotor e terminador *PGK*, a construção do vetor pMA-AmyE permitiu a confirmação da função do gene, ao ser empregado na transformação de leveduras de laboratório.

5.2.3 Construção do vetor pGEM- δ AmyE δ

O fragmento de DNA contendo a sequência “SS-AmyE” e o promotor e terminador *PGK*, foi amplificado por PCR a partir do vetor pMA-AmyE, recebendo sítios de *Bam* HI nas extremidades. O produto de PCR foi inserido no vetor comercial pCR[®] 2.1-TOPO[®] e a mistura de ligação destes utilizada na transformação genética de bactérias *E. coli* DH5 α . Dentre os 86 clones transformantes Amp^R, o DNA plasmidial de 24 foram selecionados para análise de restrição com a enzima *Bam* HI. Em seguida, os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. O novo plasmídeo, denominado TOPO-AmyE, quando digerido por *Bam* HI, resulta em dois fragmentos - um de 3,9Kb, correspondente ao pCR[®] 2.1-TOPO[®]; e, outro de 3,6Kb, correspondente ao cassete de expressão e secreção pPGK–SS–AmyE–tPGK (Figura 17A). O cassete de expressão e secreção AmyE foi obtido pela digestão do plasmídeo

TOPO-AmyE com a enzima *Bam* HI, este fragmento de 3605pb foi isolado, purificado e inserido no vetor de integração pGEM-TEasyδ previamente linearizado com *Bam* HI (Figuras 17B e 18).

Figura 17 - Digestão dos plasmídeos TOPO-AmyE e pGEM-TEasyδ com *Bam* HI

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese. A) Digestão do plasmídeo TOPO-AmyE com *Bam* HI isolados dos clones: 1- clone 6; 2- clone 7; 3- clone 24; 4- Ladder 1Kb Fermentas. B) Quantificação do inserto “AmyE+PGK” e do plasmídeo pGEM-TEasyδ : 1- Ladder 1Kb; 2 e 3- Produto de PCR “AmyE+PGK”; 4 a 6- Marcadores de concentração de DNA, λDNA (50ng, 100ng e 200ng) 7- pGEM-TEasyδ digerido com *Bam* HI.

Figura 18 - Estratégia de construção do vetor pGEM- δPGK-Amyδ

A mistura de ligação pGEM-TEasy δ e cassete de expressão “AmyE” foi utilizada na transformação genética de células *E. coli* DH5 α , sendo obtidos 42 transformantes Amp^R, dos quais 10 foram submetidos à análise. Para tanto, o DNA plasmidial dos transformantes foi isolado e digerido com *Bam* HI, em seguida os fragmentos de DNA foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose e analisados. Apenas o clone número 6 apresentou as duas bandas esperadas, correspondentes ao plasmídeo pGEM-TEasy δ (3.348 pb) e ao cassete AmyE (3.605 pb) (Figura 19).

Figura 19 - Confirmação da construção do vetor pGEM- δ PGK-Amy δ

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese. Confirmação da construção do vetor pGEM- δ PGK-Amy δ : L- DNA Ladder 1Kb; 1 ao 12- DNAs plasmidiais dos clones transformantes digeridos com *Bam* HI. O plasmídeo recombinante desejado apresenta dois tamanhos de fragmentos de DNA (3,3Kb e 3,6Kb).

Após ser confirmada a construção do plasmídeo pGEM- δ PGK-Amy δ , o mesmo foi digerido com a enzima *Not* I e os fragmentos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose. Foram observados dois fragmentos de DNA - um com 3,0 Kb, correspondente ao plasmídeo pGEM-TEasy (sem a sequência delta); e, outro com aproximadamente 3,9 Kb, correspondente ao vetor de integração δ PGK-Amy δ (cassete de expressão da α -amilase, sob regulação do promotor *PGK*, ladeado pela

sequência delta) (Figura 20). O fragmento correspondente ao vetor de integração δ PGK-Amy δ foi isolado, purificado e estocado a -20 °C, para subsequente utilização na transformação genética de levedura.

Figura 20 - Plasmídeo pGEM-Teasy δ digerido com *Not* I

Perfis de migração em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese - 1- plasmídeo pGEM-Teasy δ digerido com *Not* I; 2- plasmídeo pGEM- δ PGK-Amy δ digerido com *Not* I.

5.3 Transformação genética de Levedura

5.3.1 Transformação com o plasmídeo pMA-AmyE

Duas linhagens da levedura *S. cerevisiae* foram utilizadas como hospedeiras de transformação - YPH250 e YPH252. Primeiramente empregou-se o plasmídeo pMA-AmyE na transformação dessas linhagens, para confirmar a função do gene. A seleção dos transformantes foi feita por complementação gênica do fenótipo Leu⁺.

Foram obtidos 32 clones com capacidade amilolítica na linhagem YPH250 e 97 clones na linhagem YPH252 (Figura 21).

Figura 21 - Leveduras recombinantes transformadas com o plasmídeo pMA-AmyE

Linhagens recombinantes transformadas com o plasmídeo pMA-AmyE expressando α-amilase, semeadas em meio YPDA 0,5% corado por vapor de iodo após 96h de cultivo a 28 °C - A) clones recombinantes YPH250/pMA-AmyE 1...24. B) clones recombinantes YPH252/pMA-AmyE 1...24. C) 24 clones recombinantes YPH252/pMA-AmyE 25...48.

5.3.2 Transformação com os vetores δ AmyEt δ e δ AmyE δ

Após a função do cassete de expressão “pPGK-SS-amyE-tPGK” ter sido confirmada seguiram-se as transformações utilizando os vetores de transformação δ AmyEt δ e δ AmyE δ .

Para a obtenção dos clones recombinantes foi empregada a técnica de co-transformação. Nesta técnica é empregado juntamente com o vetor que se deseja integrar no genoma (δ AmyEt δ e δ AmyE δ) o plasmídeo pAJ50, que permite a seleção dos transformantes por complementação gênica do fenótipo Leu⁺.

Assim foram realizadas duas etapas de seleção. Na primeira, os transformantes foram selecionados por complementação gênica em meio mínimo sem leucina (SD-THUAL) (fenótipo Leu⁺) (Tabela 1).

Tabela 1 - Eficiência de transformação das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* com o plasmídeo pAJ50

Linhagem	Vetor de integração utilizado	Concentração de pAJ50 (µg)	Nº aproximado de transformantes obtidos	Eficiência de Transformação (nº transf./µg DNA)
YPH250	δ AmyEt δ	3	300	100
YPH252	δ AmyEt δ	3	480	160
YPH250	δ AmyE δ	3	195	65
YPH252	δ AmyE δ	3	344	114,6

Na segunda etapa, os transformantes Leu⁺ foram semeados em meio sólido contendo 0,5% de amido (YPDA) e incubados por 96h, a 28 °C e por mais 48h, a 4 °C. Em seguida, as colônias foram submetidas ao vapor de iodo. Os clones que receberam o vetor de transformação δ ADH1-Amy δ e δ PGK-Amy δ foram identificados pela formação de halos de amilólise ao redor das colônias. O número de clones obtidos é apresentado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Eficiência e frequência de transformação das linhagens de *S. cerevisiae* com o vetor δ AmyEt δ

Linhagem	Nº total de clones obtidos	Concentração de DNA (µg)	Eficiência de Transformação (nº transf./µg DNA)	Frequência de co-transformação (%) (nº de co-transf. / nº transf. totais Leu ⁺)
YPH250	4	6	0,66	1,33
YPH252	2	6	0,33	0,41

Tabela 3 - Eficiência e frequência de transformação das linhagens de *S. cerevisiae* com o vetor δ AmyE δ

Linhagem	Nº total de clones obtidos	Concentração de DNA (µg)	Eficiência de Transformação (nº transf./µg DNA)	Frequência de co-transformação (%) (nº de co-transf. / nº transf. totais Leu ⁺)
YPH250	0	6	0	0
YPH252	6	6	1,0	1,74

5.4 Análise qualitativa da expressão e secreção da amilase

Os clones recombinantes foram semeados em meio sólido com 0,5 % de amido (YPDA), e expostos ao vapor de iodo, revelando halos de amilólise de diferentes tamanhos ao redor de cada clone (Figura 22A e B).

Foram medidos os diâmetros das colônias recombinantes e os respectivos diâmetros dos halos de amilólise para determinar a relação entre essas duas medidas, a fim de comparar o nível de expressão da enzima pelos diferentes clones recombinantes. A linhagem não transformada YPH252 foi usada como controle negativo, uma vez que não expressa o gene da α -amilase de *B. subtilis*. As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados obtidos da relação R (dh^2/dc^2) dos clones recombinantes obtidos com os vetores $\delta AmyEt\delta$ e $\delta AmyE\delta$, resultantes da análise apresentada na Figura 22.

Figura 22 - Clones recombinantes das linhagens de levedura YPH250 e YPH252 expressando α -amilase

Placas de petri contendo meio sólido YPDA no qual foram cultivados os clones recombinantes das linhagens de levedura YPH250 e YPH252 expressando α -amilase recombinante após exposição ao vapor de iodo - **A)** Clones recombinantes obtidos com o vetor $\delta AmyEt\delta$: 1) e 2) com a linhagem YPH250; e, 3 - 6) com a linhagem YPH252; C-) Linhagem YPH252 não transformada. **B)** Clones recombinantes obtidos com o vetor $\delta AmyE\delta$ com a linhagem YPH252, C-) Linhagem YPH252 não transformada.

Tabela 4 - Diâmetro das colônias e dos halos de amilolise e relação R (diâmetros do halo ao quadrado dividido pelo diâmetro da colônia ao quadrado) dos clones recombinantes obtidos com o vetor δ AmyEt δ

Clone	Nome	Diâmetro das colônias (dc) (mm)	Diâmetro dos halos de amilolise (dh) (mm)	R (dh ² /dc ²)
1	YPH250/AmyEt 1	9	22	5,98
2	YPH250/AmyEt 2	8	12	2,25
3	YPH252/AmyEt 1	7	7	1,0
4	YPH252/AmyEt 2	7	29	17,16
5	YPH252/AmyEt 3	9	9	1,0
6	YPH252/AmyEt 4	5	12	5,76
C-	YPH252	7	7	1,0

Tabela 5 - Diâmetro das colônias e dos halos de amilolise e relação R (diâmetros do halo ao quadrado dividido pelo diâmetro da colônia ao quadrado) dos clones recombinantes obtidos com o vetor δ AmyE δ

Clone	Nome	Diâmetro das colônias (dc) (mm)	Diâmetro dos halos de amilolise (dh) (mm)	R (dh ² /dc ²)
1	YPH252/AmyE 1	7	30	18,37
2	YPH252/AmyE 2	7	19	7,37
3	YPH252/AmyE 3	8	20	6,25
4	YPH252/AmyE 4	8	22	7,56
5	YPH252/AmyE 5	8	25	9,77
6	YPH252/AmyE 6	8	36	20,25
C-	YPH252	7	7	1,0

5.5 Análise da curva de crescimento dos transformantes

Os clones recombinantes “YPH252/AmyEt 2”, “YPH252/AmyE 6”, e as leveduras YPH252 e YPH250 foram crescidos em meio completo YPD por 96 horas e analisados

quanto à Absorbância a 600 nm em intervalos de 6 horas nos dois primeiros pontos e 12 horas nos demais. A curva de crescimento representada na Figura 23 apresenta os resultados obtidos.

Figura 23 – Crescimento dos clones recombinantes em comparação às linhagens selvagens

Curva de crescimento em meio YPDA (2% glicose) das linhagens YPH250 (controle) em azul, YPH252 (controle) em vermelho, YPH252/AmyEt em verde e YPH252/AmyE em roxo, cultivada a 28 °C, com aeração em "shaker", por 96 horas.

Não foi verificada diferença relevante na taxa de crescimento em meio completo com glicose YPD para as linhagens recombinantes em relação às linhagens não transformadas, demonstrando que a inserção do gene heterólogo no cromossomo destas linhagens não alterou o mecanismo de reprodução dessas células, ou pelo menos não realizou alteração significativa.

5.6 Análise da atividade amilolítica dos clones recombinantes

A atividade da α -amilase produzida pelos clones recombinantes de levedura foi determinada pela análise da capacidade de degradação do amido durante o crescimento, por 4 dias (96 horas) em meio YPDA. Durante as análises, as amostras

foram retiradas das mesmas culturas também empregadas para a determinação da curva de crescimento.

Foram selecionados dois pontos de leitura, um em 12 horas e outro em 60 horas, para comparar os níveis de expressão e secreção da α -amilase recombinante produzida pelos clones recombinantes YPH252/AmyEt e YPH252/AmyE, e pela linhagem YPH252 não transformada (Figura 24).

Figura 24 – Quantificação do amido degradado em função do tempo pelos clones recombinantes YPH252/AmyEt e YPH252/AmyE e pela linhagem YPH252 não transformada

Quantidade de amido degradado em meio de cultura YPDA (1%) pela linhagem YPH252 não transformada e pelos clones recombinantes YPH252/AmyEt e YPH252/AmyE, após 12 e 60 horas de cultivo com agitação em “shaker” a 28°C. São apresentados os valores médios e desvio padrão.

Como a curva de calibração do método (ANEXO 01) apresentou uma faixa de valores irregulares, entre as concentrações de amido de 10 mg/mL à 8 mg/mL, esses valores não foram considerados na Figura 24. Assim, os dois pontos selecionados para a comparação referem-se ao primeiro ponto no qual uma das amostras ultrapassou a faixa de 2 mg/ml de amido consumido e o seguinte ponto referente ao momento em que uma das amostras apresentou 100 % de hidrólise do amido.

Verifica-se que o clone YPH252/AmyE foi mais eficiente em produzir e secretar α -amilase recombinante, uma vez que em 12 horas de cultivo já havia degradado 3,7 mg/ml de amido, enquanto o clone YPH252/AmyEt ainda não havia alcançado 2,0 mg/mL de amido degradado; e, em 60 horas o primeiro já havia consumido todo o amido presente inicialmente no meio de cultura, enquanto o segundo apenas 7,2 mg/mL. Essa diferença na eficiência pode ser conseqüente dos seguintes fatores: 1) O número de cópias do gene da α -amilase integrados ao genoma de cada levedura não é o mesmo, sendo assim a levedura mais eficiente pode também estar apresentando um maior número de cópias desse gene; 2) O gene da α -amilase empregado na construção do vetor δ AmyEt δ está na forma truncada, faltando-lhe exatamente a região responsável pela ligação ao substrato, o que pode estar reduzindo a atividade da enzima expressa; e, 3) O emprego de promotores distintos nas duas construções. Apesar de ambos promotores, *ADHI* e *PGK*, serem considerados constitutivos, a presença de glicose no meio de cultura pode elevar, de forma distinta, de 3 a 10 vezes seus níveis de expressão (Jonhston e Carlson, 1992).

6 CONCLUSÃO

- A construção do plasmídeo pMA-AmyE permitiu a confirmação da funcionalidade do gene *amyE*, pela transformação direta de linhagens *S. cerevisiae* de laboratório;

- Os vetores de integração δ AmyEt δ e δ AmyE δ foram construídos com sucesso;

- A produção e secreção de α -amilase recombinante foram confirmadas pela formação de halos de amilólise ao redor das colônias de todos os clones recombinantes cultivados em meio sólido contendo amido;

- Os diferentes tamanhos de halos de amilólise observados dentre os clones recombinantes obtidos por δ -integração com δ AmyEt δ ou δ AmyE δ , indica que há diferença nos níveis de secreção de α -amilase e aponta para a diferença no número de cópias do cassete de expressão integradas ao genoma de cada clone recombinante;

- As linhagens *S. cerevisiae* recombinantes não apresentaram diferença significativa quanto ao crescimento em meio contendo glicose quando em comparação às linhagens não transformadas;

- O clone obtido a partir da construção com a α -amilase na forma completa (δ AmyE δ) sob regulação do promotor *PGK* apresentou maior eficiência na degradação do amido que aquele obtido a partir da α -amilase truncada (δ AmyEt δ) sob regulação do promotor *ADHI*. A fim de inferir qual ou quais das diferenças entre essas construções possibilita essa diferença na eficiência fazem-se necessários novos estudos para comparar as duas formas da amilase, empregando-se: o mesmo promotor, os mesmos genes repórteres, e realizar a quantificação do número de cópias inseridas no genoma de cada clone recombinante.

- Apesar da baixa eficiência de transformação observada durante a utilização dos vetores integrativos construídos em relação ao plasmídeo episossomal, os clones obtidos a partir desses vetores apresentam grande estabilidade, mesmo quando cultivados em meio seletivo. Isto possibilita, em trabalhos futuros, a obtenção de clones *S. cerevisiae*

recombinantes derivados de linhagens selvagens e/ou industriais, com múltiplas cópias do gene da α -amilase de *B. subtilis* integradas aos seus genomas.

REFERÊNCIAS

- Astolfi Filho S, Galembeck EV, Faria JB, Schenberg-Frascino AC. Stable yeast transformant that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic c-DNA. *Bio-Technology*. 1986; 4: p. 311-5.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology*. Harvard: Medical School; 1992. Cap. 13.
- Beggs JD. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*. 1978; 275: p. 104-108.
- Becker DM, Guarente, L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol*. 1991; 194: p. 182-186.
- Bertoldo C, Artrainikain G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic Archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol*. 2002; 6(2):151-60.
- BNDES. Bioetanol de cana-de-açúcar - energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro - BNDES; 2008: 314 p.
- Boekhout T, Kurtzman CP. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. K. Wolfe (ed) *Nonconventional Yeast in Biotechnology*; 1996: p. 1-99.
- Botstein D, Davis RW. Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. In: Strathern JN, Jones EW, Brown JR. *The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. p-607-637.
- Burke DT, Olson MV. Preparation of clone libraries in yeast artificial-chromosome vectors. *Methods Enzymol*. 1991; 194: p. 251-70.
- Camargo ME. Sistema para transformação de leveduras industriais e detecção de atividade recombinogênica. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2000.
- Cameron JR, Loh EY, Davis RW. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*. 1979; 4: p. 739-51.
- Chen DC, Yang BC, Chow CW, Kuo TT. α -amylase as a marker for evolution the stability of the recombinant yeast in long term cultivation. *Biotechnol*, 1993; 29:329-334.
- Cho KM, Yoo YJ, Kang HS. δ -integration of endo/exoglucanase and β -glucosidase genes into yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enz Microb Technol*. 1999; 25: p. 23-30.
- Costanza MC, Fox TD. Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics*. 1988; 120: p. 667-670.

Demain AL, Newcomb M, Wu JHD. Cellulase, clostridia and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; 69 (1): p. 124-54.

EVETEC (Estudo de viabilidade técnica, econômica e comercial). Centro de apoio e desenvolvimento tecnológico da Universidade de Brasília. 2005. 143p.

Farrel AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'Hare M, Kammen DM. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science.* 2006; 311, p. 506-8.

Gietz RD, Jean StA, Woods R, Schiestl RH. Improved method for hiGh efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: p.1425.

Gietz RD, Woods RA. Genetic transformation of yeast. *Bio Techniques.* 2001; 30: p. 816-831.

Gonçalves DB. Mar de Canal, Deserto Verde? - dilemas do desenvolvimento sustentável na produção canavieira paulista. [tese]. São Carlos - UFSCAR/CCET; 2005. 256p.

Goffeau A, Barrel BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. Life with 6000 genes. *Science.* 1996; 274: p. 546-67.

Gray KA, Zhao L, Emptage M. Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol.* 2006; 10: p. 141-146.

Griffith AJF, Miller JH, Suzuki DT, Levontin, RC, Gelbart WM. An introduction of genetics analysis. 7. ed. Lord: WH freeman; 1993; v. 5, cap.13.

Guerra OG, Rubio IG, Silva Filho CG, Bertoni RA, Santos Govea RC, Vicente EJ. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *J Microbiol Methods.* 2006 Dec; 67(3): p. 437-45.

Hanahan D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983; 166: p. 557-580.

Hinnen A, Hick JB, Fink GR. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75: p. 1929-1933.

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cell treated with álcali cations. *J Bacteriol.* 1983; 153: p. 163-168.

Janse BJH, Petrorius IS. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing K-amylase, glucoamylase and pullulanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995; 42: p. 878-83.

Jimenez A, Davis J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature.* 1980; 287: 869-71.

Jonhston M.; Carlson M. Regulation of carbon and phosphate utilization. *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces.* 1992; 2: p. 193-281, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF. Transposable elements and genome organization - a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.* 1998; 5: p 464-78.

Kim MD, Rhee SK, Seo JH. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration. *J Biotechnol.* 2001; 85: p. 41-8.

Kingsman SM, Kingsman AJ, Mellor, J. The production of mammalian proteins in *Sacharomyces cerevisiae*. *Tibtech.* 1987; 5:53-7.

Knox AM, Preez JC, Kilian SG. Starch fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fubuligera*. *Enzyme Microb Technol.* 2004; 34: p. 453-60.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica. 4ªed. São Paulo: Ed. Savier; 2002. 975p.

Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Tuite MF, Emtage JS, White S, et al. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1983; 24: p. 1-4.

Miller CH, Kowalski D. Cis-acting components in the replication origin from ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: p. 5360-5369.

Moraes LMP, Astolfi-Filho S, Oliver SO. Development of yeast strains for the efficient utilization of starch - evaluation of constructs that Express alpha-amylase and glucoamylase separately or as a functional fusion protein. *Appl. Microbiol. Biotech.* 1995; 43(6): p. 1067-76.

Müller G. Clonagem e expressão do gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* variedade D2 na levedura *Pichia pastoris* [dissertação]. Manaus - Universidade Federal do Amazonas, Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia; 2008. 168p.

Nakamura Y, Kobayashi F, Ohnaga M, Sawada T. Alcohol fermentation o starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. *Boetchnol Bioengineer.* 1997; 53: p. 21-5.

Nigam, P; Singh, D. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995; 17: p. 770-778.

Norouzian D, Akbarzadeh A, Scharer JM, Young MM. Fungal glucoamylases. *Biotechnol Adv.* 2006; 24 (1): p. 80-5.

Orr-weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ. Genetic application of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods Enzymol.* 1983;101:228-230.

Plant EP, Goodwin TJD, Poulter RTM. Tca5, a Ty5-like retrotransposon from *Candida albicans*. *Yeast.* 2000; 16: p. 1509–18.

Randez-Gil F, Sanz P. Expression of *Aspergillus oryzae* K-amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993; 112: p. 119-24.

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast a review. *Yeast*. 1992;8: p. 423-488.

Rose MD, Broach JR. Cloning genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol*. 1991;194: p. 195-230.

Rothstein RJ. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol*. 1991;194: p. 281-301.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning - a laboratory manual*. New York - Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3v.

Shigechi H, Koh J, Fujita Y, Matsumoto T, Bito Y, Ueda M, et al. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -Amylase. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70 (8): p. 5037-40.

Sikorski SR, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1989; 122: p. 19-27.

Tester RF, Qi JKX. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 2004; 39: p. 151-165.

Van der Maarel MJE, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol*. 2002; 94(2):137-55.

Verma G, Nigam, P., Singh, D., Chaudhary, K. Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeast and *Saccharomyces cerevisiae* 21, *Bioresource Technology*, v. 72, 2000: p. 261-266.

Wery J, Verdoes JC, Van Ooien AJJ. Genetics of non- *Saccharomyces* industrial yeasts. In: Demain AL, Davies JL. *Manual of Industrial Microbiology*. Washington: ASM Press, 1999. p.447-59.

Wickner RB. Methods in classical genetics. In - *Saccharomyces*. *Biotechnology Handbooks*. New York - Plenum press; 1991: p. 101-45.

ANEXO 1

Curva de calibração da correspondência entre a concentração de amido no meio e a leitura de Abs₆₀₀.