UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Expressão recombinante e caracterização funcional da β -amilase de banana
produzida em *Pichia pastoris*

Geovana Sagrado Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora:
Prof^a. Titular Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F383e Ferreira, Geovana Sagrado
Expressão recombinante e caracterização funcional da β -amilase
de banana produzida em *Pichia pastoris* / Geovana Sagrado
Ferreira. -- São Paulo, 2013.
59p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana

1. Banana : Bioquímica dos alimentos 2. Biologia molecular
I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.

641.3477 CDD

Geovana Sagrado Ferreira

Expressão recombinante e caracterização funcional da β -amilase de banana
produzida em *Pichia pastoris*

Comissão Julgadora da Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em
Ciência dos Alimentos

Professora Titular Beatriz Rosana Cordenunsi
Orientadora / Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2013.

**“Porque eu sou do tamanho daquilo que sinto, que vejo e que faço,
e não do tamanho que as pessoas me enxergam.”**

(Carlos Drummond de Andrade)

Aos meus pais, com amor!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Beatriz Rosana Cordenunsi, por todo apoio, paciência, confiança, incentivo e por me deixar fazer parte do seu grupo de pesquisa desde a iniciação científica.

Ao Prof. João Roberto Nascimento, pelos ensinamentos, pela atenção e por me acompanhar nesse trabalho com valiosas sugestões.

Ao programa de pós graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ao Instituto de Química, ao Centro de Estudos do Genoma Humano e a ESALQ (Departamento de Genética – Prof. Carlos Labate), por cederem o uso das dependências dos laboratórios.

Ao Instituto Butantã, especialmente ao Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada por colocar a disposição a área experimental e o laboratório, com auxílio da Dra. Amanda Francine Asega e Edson Takeshi.

A todos os alunos, Juliana, Renata, Gabriela, Fernanda, Sabrina, Claudinéia, Roberta, Victor, Talita, Maria Fernanda, Laís, Bruna, Vanessa, Ana Cláudia, Marcelo, Florence e Lorenzo. As técnicas, Márcia, Tânia e Lúcia e aos professores, João Paulo, Eduardo e Neuza muito obrigada pela amizade e ajuda concedida durante estes anos. Aos funcionários da limpeza, da manutenção, das secretarias e da biblioteca, obrigada por todo o apoio e atenção.

Obrigada pela eficiência, conhecimento, competência e dedicação de todos os envolvidos nesse projeto.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão à bolsa, e a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro ao laboratório.

Aos meus pais, por ser minha maior referência e estarem sempre presentes em minha vida de forma indispensável. A minha família, com gratidão, pelo carinho, paciência e por minha formação. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos, com afeto, pelas palavras de incentivo, pelo companheirismo, momentos de descontração e torcida.

A Deus, por minha vida, saúde, sabedoria e por me dar força para seguir em frente nos momentos difíceis.

A todos que me apoiaram, me compreenderam e que de alguma forma contribuíram para o enriquecimento deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

FERREIRA, G. S. Expressão recombinante e caracterização funcional da β -amilase de banana produzida em *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, p. 59, 2013.

Um dos eventos mais importantes durante o amadurecimento da banana é a degradação do amido, concomitante com o acúmulo de açúcares solúveis. Várias enzimas, que supostamente atuam na degradação do amido, já tiveram sua atividade/proteína específica detectadas nesta fase na banana. Entre elas a α -amilase, a β -amilase, as amido-fosforilases, as α -glicosidases e as isoamilases. A síntese do amido e, normalmente, sua degradação, ocorrem dentro do amiloplasto, que possui duas membranas a serem transpostas antes do acesso ao grânulo de amido ou aos produtos da ação de outras enzimas. Uma das isoformas da β -amilase em banana possui um peptídeo de transporte predito em sua sequência, necessário para transpor estas membranas e entrar no amiloplasto. Uma maneira de contornar a dificuldade em estabelecer a real importância de cada enzima na degradação do amido é isolar os grânulos e as enzimas e submetê-lo à atividade sequencial das enzimas supostamente responsáveis pela degradação. O ideal é utilizar a enzima endógena, mas o processo de purificação de enzimas em frutos é demorado e nem sempre bom em termos de pureza, quantidade e atividade. Estudos baseados na expressão heteróloga de genes da β -amilase permitiriam melhor compreender os mecanismos de atuação dessa enzima presente na polpa da banana. Assim, foram feitos ensaios de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* na tentativa de produzir essa enzima em quantidade suficiente para purificação, aplicação nos grânulos de amido e produção de anticorpos policlonais. Foram testadas várias condições de indução da proteína, tais como aeração, temperatura, pH, concentração de metanol e tempo de indução, bem como a montagem de uma nova construção gênica com tag de histidina no vetor de expressão pPICZ α A com confirmação do fenótipo dos transformantes positivos. Porém, a obtenção de β -amilase recombinante com atividade não foi bem sucedida, necessitando talvez de alterações nesses padrões de indução.

Palavras-chave: banana, β -amilase, expressão heteróloga, amido, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

FERREIRA, G. S. Recombinant expression and functional characterization of β -amylase of banana produced in *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, p. 59, 2013.

One of the most important events that occurs during ripening of banana is the starch degradation concomitantly with the accumulation of soluble sugars. Several enzymes, known by acting on starch degradation, had their activity and/or specific protein detected at this stage of banana. These include the α -amylase, the β -amylase, the starch-phosphorylases, the α -glucosidase and the isoamilases. The synthesis and starch degradation occur inside of the amyloplast that contain two membranes which has to be reach before accessing the starch granule or the products of the other enzymes. One of the isoforms of β -amylase in bananas has a transit peptide predicted in the sequence, required to access the amyloplast. To establish the real importance of each enzyme in the starch degradation it is necessary to isolate the granules and enzymes and submit them to the sequential activity to confirm the supposed degradation. The idea is to use the endogenous enzyme, but the process of purification of the enzyme in fruits demands a lot of time and the results of purity, quantity and activity are not guaranteed. Studies based on heterologous expression of the β -amylase genes allow us to understand the mechanisms of action of this enzyme present in the pulp of banana. Thus, tests were carried out with heterologous expression in *Pichia pastoris* in order to produce this enzyme in sufficient quantity to purification, and then, applied on starch granules and produce a polyclonal antibody. We tested different conditions of protein induction such as aeration, temperature, pH, methanol concentration and induction time, as well as the new genic construction with the histidine tag with an expression vector pPICZ α A confirming the phenotype of positive transformants. However, recombinant β -amylase with activity was not obtained successfully, necessitating changes in these patterns of induction.

Keywords: banana, β -amylase, heterologous expression, starch, *Pichia pastoris*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Degradação do amido	12
1.2. Degradação do amido da banana	14
1.3. β -amilase	16
1.4. A provável ação plastidial da β -amilase de banana	19
1.5. Expressão heteróloga	21
1.5.1. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão de proteínas heterólogas	23
1.5.1.1. Metabolismo do metanol	24
1.5.1.2. Linhagens de <i>Pichia pastoris</i> e vetores de expressão	25
1.5.1.3. Fenótipos da levedura e integração no genoma de <i>P. pastoris</i>	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Material vegetal	31
4.2. Métodos	31
4.2.1. Extração de RNA e síntese do DNA complementar ao RNAm (cDNA)	31
4.2.2. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucleicos	31
4.2.3. Produção de β -amilase recombinante em <i>Pichia pastoris</i>	31
4.2.3.1. Clonagem e construção pPICZ α A:BMV	32
4.2.4. Preparação das células de <i>Pichia pastoris</i>	33
4.2.5. Transformação em <i>Pichia pastoris</i> via eletroporação	34
4.2.6. Seleção em placas	34
4.2.7. Análise do fenótipo dos transformantes positivos	34
4.2.8. Crescimento de células de <i>P. pastoris</i> transformadas, com indução da expressão via EasySelect™ <i>Pichia</i> Expression Kit (K1740-01 - Invitrogen)	35
4.2.9. Precipitação das proteínas com sulfato de amônio	35
4.2.10. Quantificação proteica e ensaio de atividade com substrato específico	36
4.2.11. Ensaio de atividade em gel nativo	36
4.2.12. SDS-PAGE	37
4.2.13. Western e Dot blot	37
4.2.14. Lise celular e purificação de proteínas	38
4.2.15. Preparo de amostra para identificação por espectrometria de massas	38

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Preparo da construção pPICZ α A:BMV	41
5.1.2. Análise dos transformantes positivos em <i>E. coli</i>	43
5.2. Clonagem e expressão em sistema eucarioto <i>P. pastoris</i>	44
5.2.1. Crescimento de células transformadas e indução da expressão	46
5.3. Análise do perfil de proteínas e medida de atividade	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

Banana são monocotiledôneas que pertencem à família *Musaceae*. Dentro da classificação tradicional dos frutos entre climatéricos e não climatéricos, baseada na produção de etileno e respiração, a banana está inserida no primeiro grupo, que são frutos caracterizados por uma produção autocatalítica de etileno concomitante com um aumento na produção de CO₂ durante o amadurecimento. Nesta fase, ocorre uma série de reações químicas, transformações bioquímicas, fisiológicas e organolépticas que tornam o fruto apto para o consumo (GOMEZ *et al.*, 1999; MOTA *et al.*, 1997; SEYMOUR *et al.*, 1993).

Dentre os principais eventos que ocorrem nesta etapa, um dos mais importantes é a degradação do amido, acumulado durante o desenvolvimento do fruto, concomitante com o acúmulo de açúcares solúveis. O amido representa de 14 a 30% do peso fresco do fruto verde, que é rapidamente degradado durante o amadurecimento do fruto para menos de 1%, dependendo da cultivar. A degradação do amido nesta fase é a primeira etapa do adoçamento do fruto, com a síntese e acúmulo de açúcares solúveis, principalmente sacarose. O teor total de açúcares solúveis aumenta de 1-2% da fase verde para 12-22% dependendo da cultivar (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; MOTA *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2011).

O amadurecimento do fruto está associado a um metabolismo complexo altamente coordenado e geneticamente programado onde, além do etileno, hormônios como o ácido indol-3 acético e o ácido giberélico, também podem atuar como reguladores do metabolismo do amido em bananas, resultando em alterações na atividade das enzimas e na expressão ou supressão de genes específicos que estão envolvidos nestas transformações. O evento do amadurecimento ocasiona modificações na composição e estrutura dos frutos, além de requerer a síntese de novas enzimas (PERONI, 2007; PURGATTO *et al.*, 2001; SEYMOUR *et al.*, 1993).

O amido é um homopolissacarídeo de D-glicose depositado no cloroplasto das folhas e no amiloplasto de órgãos de reserva das plantas superiores como, por exemplo, tubérculos e raízes (batata e mandioca), tornando-se a principal forma de estoque de carbono. Esse amido é compactado em grânulos complexos com estrutura interna bem organizada. Sua forma, tamanho e grau de cristalinidade (15 a 45%) podem variar de acordo com a origem botânica e estágio de desenvolvimento

do vegetal (APPENROTH *et al.*, 2011; PERONI-OKITA *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 1997; TETLOW, 2006).

As características físico-químicas e funcionais do amido estão relacionadas à estrutura do grânulo, que é composto por dois polímeros de glicose diferentes, amilose e amilopectina, em proporções em torno de 20:80. Tanto a amilose quanto a amilopectina podem ser encontradas em estado cristalino e amorfo assumindo diferentes conformações, mas é a amilopectina quem confere a cristalinidade ao grânulo de amido (SIMÃO *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 1997; VIEIRA, 2006).

A amilose (Figura 1 A) é uma molécula constituída basicamente de cadeias lineares formadas por unidades de α -D-glicose ligadas nos carbonos 1 e 4, com algum grau de ramificação nos carbonos 1 e 6 [$\alpha(1-6)$]. Apresenta uma estrutura helicoidal que é proporcionada pelo arranjo das ligações glicosídicas na configuração α , que permite a complexação da amilose com moléculas apolares como o iodo, formando um composto de coloração azul. A amilopectina (Figura 1 B e Figura 2) é um polímero altamente ramificado, formado por várias cadeias curtas de unidades de D-glicose ligadas em $\alpha(1-4)$. A molécula consiste de uma única cadeia redutora, conhecida como cadeia C. Suas ramificações são interligadas por ligações glicosídicas em $\alpha(1-6)$ totalizando até 6% das ligações, sendo conhecidas como cadeias A e B. Devido ao fato de ter pequenas cadeias helicoidais laterais na sua conformação em [$\alpha(1-4)$], a amilopectina em presença de iodo apresenta coloração avermelhada (HOOVER, 2001; PERONI, 2007; SOARES, 2009).

Figura 1. Fração de uma molécula de amilose (A) e amilopectina (B), com destaque para as ligações $[\alpha(1-4)]$ e $[\alpha(1-6)]$.

Fonte: Soares (2009) adaptado de MYERS *et al.*, 2000.

Figura 2. Três tipos de cadeias presentes na estrutura ramificada da amilopectina. Cadeias A, B e C.

Fonte: Adaptado de MANNERS, 1989.

Os grânulos de amidos podem ser classificados como sendo do tipo A, B e C. Os do tipo A são os encontrados principalmente em cereais, geralmente constituídos por baixos teores de fósforo, cadeias curtas de amilopectina e alta cristalinidade. Amidos do tipo B incluem os encontrados nos tubérculos, com elevados níveis de fosfato, cadeias longas de amilopectina e altos teores de amilose. A teoria vigente é que os amidos do tipo C, encontrados em leguminosas e em banana, são uma

combinação dos tipos A e B (BULÉON *et al.*, 1998; KOSSMANN e LLOYD, 2000; SOARES *et al.*, 2011).

A susceptibilidade do grânulo de amido à ação enzimática é dependente de alguns fatores como, por exemplo, o grau de cristalinidade. Esta apresenta um papel fundamental na arquitetura do grânulo e nas propriedades físico-químicas. Parece existir correlação entre o grau de cristalinidade do amido e a distribuição de comprimento de cadeia da amilopectina, sendo a amilose um fator determinante na integridade e estrutura do grânulo (PERONI-OKITA *et al.*, 2010; SIMÃO *et al.*, 2008 SOARES *et al.*, 2011).

Além dessas duas macromoléculas, outros compostos podem estar presentes no grânulo de amido em pequenas quantidades, como, por exemplo, água, lipídeos, cinzas, proteínas e minerais, exercendo influência nas suas propriedades físicas e químicas. Os constituintes mais abundantes e tecnologicamente mais importantes são os lipídeos e as proteínas. Os lipídeos são responsáveis pela fixação de cor, pelo desenvolvimento de aromas e, normalmente, estão complexados dentro da matriz da amilose. As proteínas, presentes em quantidades menores que 0,6%, possuem duas classificações: proteínas de reserva (superfície do grânulo) e proteínas associadas ao grânulo de amido (superfície ou interior do grânulo de amido). Na segunda classificação, as proteínas podem ainda estar associadas à síntese e/ou a degradação do amido exibindo atividade enzimática. Exemplos mais importantes de ambas as proteínas são as isoformas da amido-sintase. Dentre os minerais, presentes em quantidades menores que 0,4%, o fósforo é o mais relevante. Os grupos fosfatos encontram-se ligados à molécula de amilopectina (BALDWIN, 2001; PERONI, 2007; SOARES, 2009).

1.1. Degradação do amido

As enzimas que podem estar envolvidas no processo de degradação do amido, hoje conhecidas, são: (1) a α -amilase (EC 3.2.1.1) que possui atividade endoamilolítica hidrolisando aleatoriamente as ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ da amilose e amilopectina, produzindo uma mistura de oligossacarídeos, maltose, glicose e dextrinas; (2) a β -amilase (EC 3.2.1.2, α -1,4-D-glucano maltohidrolase), que possui atividade exoamilolítica, atua hidrolisando somente a penúltima ligação glicosídica [$\alpha(1-4)$] a partir das extremidades não-redutoras dos glicanos lineares, liberando moléculas de β -maltose; (3) as amido-fosforilases (EC 2.4.1.1), que

catalisam a fosforólise do resíduo de glicose do terminal não-redutor de $\alpha(1-4)$ -glicanos, na presença de ortofosfato, liberando glicose-1-fosfato (Glic-1P); (4) as enzimas desramificadoras que atuam nas ligações $\alpha(1-6)$ das moléculas de amilose e amilopectina; (5) as Glucano-água-diquinases (GWD - EC 2.7.9.4) e as Fosfoglicano-água-diquinases (PWD - EC 2.7.9.5) que atuam na fosforilação dos carbonos 6 e 3, respectivamente, das moléculas de D-glicose da amilopectina, dando acesso as enzimas hidrolíticas às estruturas dos grânulos de amido. A fosforilação do amido é essencial para que outras enzimas como exoamilases e enzimas desramificadoras atuem, indicando a importância da via fosforolítica durante o processo de mobilização do amido (BECK e ZEIGLER, 1989; BIERHALS *et al.*, 2004; KÖTTING *et al.*, 2010; MOTA *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Os processos de degradação do amido mais estudados são os que envolvem a degradação do amido transitório presente nas folhas, por exemplo, e a degradação do amido de reserva durante a germinação de cereais (APPENROTH *et al.*, 2011). No primeiro, o amido é sintetizado durante o dia, e degradado à noite, sendo o ciclo claro-escuro um fator importante (ZEEMAN *et al.*, 2007). No segundo, em resposta a um sinal hormonal, as células da aleurona secretam as enzimas responsáveis pela degradação de amido e iniciam esse processo (BECK e ZIEGLER, 1989). Nos modelos de degradação do amido transitório, a β -amilase junto com a isoamilase (enzima desramificadora) e a GWD seriam as enzimas mais importantes na via principal de degradação, tendo a α -amilase uma ação secundária (ZEEMAN *et al.*, 2007). Já na germinação de cereais, a α -amilase é a principal enzima envolvida na degradação do amido (BECK e ZIEGLER, 1989). Embora a reserva de amido de frutos seja significativa e tenha relação com a síntese de açúcares e adoçamento do fruto, ainda não existe uma proposta de modelo de sua degradação.

As vias metabólicas envolvidas na síntese de amido são bastante conhecidas (SMITH *et al.*, 1997), mas os processos envolvidos na sua degradação ainda não são totalmente claros. Pelo fato da conversão amido-sacarose poder envolver mais de uma via metabólica com atuações distintas de várias enzimas e diversas isoformas capazes de degradar amido, existe uma dificuldade na identificação e na determinação da relevância de cada uma delas nesse processo (ARÊAS e LAJOLO, 1981; CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; SMITH *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2011). A partir da elucidação da estrutura química e física do grânulo de amido aliada à atividade das enzimas que o degradam juntamente com o perfil de proteínas

associadas a esse grânulo pode-se obter subsídios para o entendimento do metabolismo amido-sacarose na banana (PERONI, 2007; PERONI-OKITA *et al.*, 2010). Sabe-se que esse amido sofre exo-corrosão com degradação sucessiva das camadas externas, mas ainda não existem informações suficientes para propor uma via metabólica que atue na degradação do amido da banana (PERONI-OKITA *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2011).

1.2. Degradação do amido da banana

Estudos anteriores mostraram, tanto pela medida da atividade *in vitro*, quanto pela presença da proteína específica, que diferentes enzimas estão presentes na polpa da banana durante o seu amadurecimento e poderiam atuar de forma coordenada neste processo. Entre elas as α -amilases (VIEIRA JUNIOR *et al.*, 2006), a β -amilase (PURGATTO *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2006), as amido-fosforilases (MOTA *et al.*, 2002; MAINARDI *et al.*, 2006), as α -glicosidases (VIEIRA, 2006) e as isoamilases (BIERHALS *et al.*, 2004).

Em cereais, a α -amilase promove alterações marcantes ao iniciar o ataque ao grânulo de amido, além de fornecer ou aumentar a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas (BECK e ZIEGLER, 1989; SARIKAYA *et al.*, 2000). Em folhas, ela pode participar da degradação do amido transitório, mas parece não ser fundamental já que, na sua ausência, ocorre a degradação do amido (ZEEMAN *et al.*, 2007). Entretanto, em mutantes de *Arabidopsis* com falta de duas isoformas das desramificadoras, a α -amilase (AMY3) é induzida e é responsável por realizar a quebra das ramificações de malto-oligossacarídeos da superfície dos grânulos de amido (ZEEMAN *et al.*, 2010). Também já foi visto que na ausência concomitante das três enzimas: AMY3, desramificadora isoamilase 3 (ISA3) e dextrinase limite (LDA), a degradação do amido não acontece (STREB *et al.*, 2012). Em condições normais, essa enzima não exerce papel fundamental na degradação do amido transitório, talvez por não estar diretamente envolvida nesse processo ou por outras enzimas compensarem a sua ausência, porém, quando outras enzimas que degradam o amido não estão presentes, a α -amilase parece participar do processo (ZEEMAN *et al.*, 2010; STREB *et al.*, 2012).

Além da forma solúvel na polpa da banana, onde a β -amilase degrada glicanos lineares solúveis produzidos por outras enzimas, foram detectadas as enzimas α -amilases e β -amilase, associadas aos grânulos de amido em diferentes

graus do amadurecimento da banana, inclusive antes do amadurecimento quando nenhum grau de degradação era visível. Quando ligada ao grânulo, a β -amilase pode participar efetivamente de sua degradação, mas para que isso ocorra é necessário que a enzima esteja localizada no plastídio (NASCIMENTO *et al.*, 2006; PERONI-OKITA *et al.*, 2010).

Tanto a degradação de amido como a expressão da β -amilase são fortemente afetadas por hormônios vegetais em bananas. A expressão e a atividade da β -amilase parecem ser dependentes do etileno, ou de algum evento que dependa desse hormônio produzido durante o climatério, uma vez que frutos de banana tratados com 1-metilciclopropeno (1-MCP), um bloqueador da ação do etileno, tiveram tanto a taxa de degradação de amido quanto a atividade da β -amilase reduzidas. Bananas expostas ao etileno exógeno apresentaram um aumento da expressão do gene da β -amilase, o qual foi concomitante ao aumento da degradação do amido nos frutos tratados (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Também já foi observada uma diminuição da transcrição e da atividade de β -amilase em amostras de fatias de bananas tratadas com auxina, sendo que essa diminuição apresentou correlação direta com a redução na taxa da degradação do amido nas amostras tratadas (PURGATTO *et al.*, 2001).

Além disso, a expressão da β -amilase é sensível a alterações como o ciclo circadiano, o estresse salino e baixas temperaturas. Essa regulação permite que a planta ajuste sua taxa de degradação de amido ao longo do dia. A maltose, o produto da ação da β -amilase, consegue proteger a planta nessas situações e, sendo assim, o gene dessa enzima é induzido pela própria maltose quando essas plantas são expostas ao frio (LU e SHARKEY, 2006).

As amido-fosforilases catalisam de maneira reversível a transferência de moléculas de glicose atuando tanto no sentido de síntese quanto na degradação do amido. Duas formas dessa enzima podem ser encontradas em plantas superiores, sendo que uma está localizada no plastídio e a outra no citosol, diferindo em estrutura e especificidade pelo substrato (MOTA *et al.*, 2002; PERONI, 2007; SOARES, 2009).

As α -glicosidases (E.C.3.2.1.10) liberam α -D-glicose a partir do terminal $\alpha(1,4)$ da cadeia glicosídica. Acredita-se que sua principal função seja a de degradar produtos provenientes da ação direta de outras enzimas no grânulo de amido, podendo agir tanto em glicanos de cadeia curta (maltotriose e maltose) como em

polímeros de glicose (maltodextrina). Entretanto, as α -glicosidases não devem ser descartadas na degradação do amido, já que também podem atuar sobre glicanos maiores como amilose e amilopectina (LU e SHARKEY, 2006; VIEIRA, 2006).

As enzimas desramificadoras (isoamilase) tornam-se importantes no processo de degradação do amido e síntese de açúcares solúveis, por terem capacidade de hidrolisar ligações $\alpha(1-6)$, inacessíveis às outras enzimas envolvidas no processo. Essa atuação é um fator relevante para que a hidrólise do grânulo possa ocorrer de modo eficiente (PERONI, 2007; SOARES, 2009). Bierhals *et al.* (2004), determinaram que a enzima desramificadora que atua na degradação do amido da banana é a isoamilase, que atua na β -dextrina limite.

1.3. β -amilase

A β -amilase é membro da família 14 das glicosil hidrolases e sua família pode ser dividida em quatro classes distintas. Plantas superiores podem conter um ou mais genes de cada classe codificando para um grande número de β -amilases no genoma dessas plantas (ZEEMAN *et al.*, 2010).

Em *Arabidopsis*, por exemplo, existem nove genes de β -amilase (BAM 1-9) sendo que quatro deles (BAM 1-4) estão localizados no cloroplasto, atuando diretamente na mobilização do amido transitório. Eles apresentam segmentos que atuam como peptídeo de trânsito, que transporta a enzima até os cloroplastos ou amiloplastos. A BAM2 não tem função atribuída já que sua proteína recombinante apresenta baixa atividade específica em comparação com as isoformas BAM 1 e 3, que são enzimas ativas (ZEEMAN *et al.*, 2010). Mutantes de *Arabidopsis* com deleção do gene da BAM3 acumulam mais amido e apresentam menor quantidade de maltose quando comparados com as plantas selvagens, já os mutantes da BAM1 apresentam níveis normais de acúmulo de amido. A análise desses mutantes parece indicar a BAM3 como a maior responsável pela degradação do amido (SMITH, 2012; STREB *et al.*, 2012).

A BAM4 é incomum devido ao fato de seu sítio ativo apresentar substituições de resíduos de aminoácidos de outras β -amilases e sua proteína recombinante não possuir atividade de β -amilase (ZEEMAN *et al.*, 2010). A BAM4 modula a atividade das β -amilases ativas por facilitar a ação catalítica através de interações com outras enzimas atuantes na degradação do amido como a GWD e a isoamilase (FULTON *et al.*, 2008). A GWD recombinante de *Arabidopsis* estimula a atividade hidrolítica

das BAM 1 e 3 e isso foi intensificado com a presença da isoamilase recombinante de batata (EDNER *et al.*, 2007).

Outros membros da classe de BAMs, incluindo a BAM9 (recombinante sem atividade enzimática) e proteínas de outras espécies além da *Arabidopsis*, possuem substituições nos sítios ativos. As isoformas necessitam de peptídeo de trânsito plastidial para ultrapassar a membrana do plastídio e ter acesso ao grânulo do amido, mas nem todas apresentam esse peptídeo predito em sua sequência. A isoforma BAM5 contribui por uma grande parte da atividade de β -amilase em folhas de *Arabidopsis*, onde também foi observado que a maltose produzida por essa enzima no cloroplasto é exportada para o citosol (ZEEMAN *et al.*, 2010). Muitas isoformas da β -amilase contribuem para a degradação do amido, mas suas funções ainda não são completamente esclarecidas (SMITH, 2012). A β -amilase de banana apresenta semelhanças tanto com a BAM4, uma forma cloroplástica não-catalítica de β -amilase de *Arabidopsis* quanto com a BAM9, com localização extra-cloroplastidial (ASTORINO FILHO, 2008; NASCIMENTO, 2010).

Em folhas de batata e de *Arabidopsis*, foram identificadas isoformas de β -amilase com peptídeos de endereçamento específico para plastídeos, além de demonstrar que estas enzimas são capazes de ser endereçadas para o interior dos cloroplastos. É atribuída a essas isoformas, a degradação do amido transitório acumulado nos cloroplastos, até a formação de maltose, principal fonte de carbono exportada através da membrana do plastídeo para o citosol, sendo este aporte de maltose, utilizado como fonte de carbono durante o período noturno (FULTON *et al.*, 2008). Além disso, estudos envolvendo a deleção de genes de β -amilase, resultaram em plantas com fenótipo de acúmulo de amido nas folhas, tanto em *Arabidopsis* (KAPLAN e GUY, 2005) como em batata (SCHEIDIG *et al.*, 2002). Essas evidências confirmam que a β -amilase pode exercer controle significativo sobre a principal via de degradação do amido em folhas. Isso difere do que se conhece sobre o sistema de mobilização do amido em sementes, onde a principal enzima é a α -amilase.

A β -amilase pode atuar em malto-oligossacarídeos, sendo o mais curto deles a maltotetraose, não atuando na extremidade não redutora de uma cadeia de glicano que transporta um grupo fosfato. Ou seja, existe a necessidade de desfosforilação durante a degradação do amido devido os requisitos de substrato dessa enzima, que se refere à ausência de grupo fosfato próximo à extremidade não redutora, por onde se inicia sua atuação. A enzima desproporcionadora (D-enzima;

[$\alpha(1-4)$]-glucano-4- α -glucanotransferase; EC: 2.4.1.25), metaboliza a maltotriose formada durante a degradação do amido, gerando glicose e glicanos mais longos através da transferência de um grupo maltosil de maltotriose para outro glicano onde a β -amilase e as amido-fosforilases podem voltar a agir, facilitando a degradação. Plantas de *Arabidopsis* mutantes para a falta da forma plastidial da D-enzima, apresentaram fenótipo de acúmulo de malto-oligossacarídeos, mas não de maltose, ou seja, a enzima desproporcionadora, gera substratos com tamanhos de cadeia apropriados à ação dessas enzimas. (LU e SHARKEY, 2006; ZEEMAN *et al.*, 2010).

A β -amilase participa do processo de mobilização do amido durante a germinação das sementes de cereais. Esta é acumulada durante o processo de desenvolvimento das sementes de cevada e permanece ligada aos grânulos de amido, sendo considerada a isoforma específica do endosperma. Essa isoforma é ausente em sementes de arroz, sua síntese ocorre na camada de aleurona durante a germinação. Existe também uma isoforma presente em órgãos vegetativos como folhas e raízes (ZIEGLER, 1999). Em maçãs e em tubérculos de batata em desenvolvimento, a enzima apresenta padrão similar de localização, sendo encontrada predominantemente ao redor dos grânulos de amido no interior dos amiloplastos (DAPENG e YONGZHANG, 2002).

Os trabalhos de caracterização genômica resultaram na clonagem do gene maBMY, de β -amilase de banana (Genbank: **GU809238.1**), com sequência de 2.588 pares de bases (pb) e três íntrons. O cDNA derivado desse gene apresentou 133 bases na extremidade 5' não traduzida, 221 bases na extremidade 3' não traduzida, uma fase aberta de leitura com 1.599 pb, que codifica para uma proteína de 532 aminoácidos, três éxons que se estendem sobre os 2.588 pb da sequência genômica e dois íntrons de 549 pb e 83 pb. A estrutura éxon-íntron do gene maBMY é similar aos genes BMY 3 e 9 de *Arabidopsis*. A sequência da proteína maBMY possui um peptídeo de trânsito (67 resíduos - porção amino terminal), dois domínios catalíticos Glu¹⁸⁶ e Glu³⁸⁰ comuns a outras β -amilases e a proteína madura tem peso molecular de 50,87 kDa e ponto isoelétrico (pI) 5,71 (ASTORINO FILHO, 2008; NASCIMENTO, 2010). Geralmente são monômeros, relativamente estáveis em meios ácidos com pH acima de 3,6 tendo como pH ótimo para atividade entre 4 e 6. Os grupos sulfidrilas (SH) podem estar envolvidos com a regulação da atividade β -amilásica e o tratamento com cisteína (composto sulfidrílico) aumenta sua atividade (BASSINELLO, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

1.4. A provável ação plastidial da β -amilase de banana

A correlação entre a atividade *in vitro* de uma enzima de um dado tecido e sua real importância em uma via metabólica nem sempre é clara ou direta. A detecção da atividade da α -amilase solúvel em polpa de banana não pode ser tomada como evidência de que ela está diretamente envolvida na degradação do amido da banana, por exemplo. No caso de substratos que estão contidos em organelas que permanecem íntegras durante o processo, é preciso considerar que a enzima deve possuir aparato (peptídeo de trânsito) que permita o seu ingresso nesta organela. A síntese do amido e, normalmente, sua degradação, ocorrem dentro do amiloplasto, que possui duas membranas a serem transpostas antes do acesso ao grânulo de amido ou aos produtos da ação de outras enzimas. Em *Arabidopsis*, já foi visto que a β -amilase possui várias isoformas sem o peptídeo de trânsito predito em sua sequência o que impossibilitaria pensar em uma atuação direta destas isoformas da enzima no processo de degradação do amido (SMITH *et al.*, 2005). No entanto, a banana teve somente uma isoforma da β -amilase detectada e que possui o peptídeo de trânsito, tendo sido demonstrado experimentalmente que esse peptídeo é funcional, ou seja, capaz de dirigir a proteína para dentro do plastídio (ASTORINO FILHO, 2008). Outro fato em favor da ação da β -amilase de banana dentro do amiloplasto é a presença de um transportador de maltose, necessário no caso do dissacarídeo ser produzido dentro da organela. Um fragmento similar ao *Mex1*, transportador de maltose de *Arabidopsis*, já foi clonado e sequenciado em polpa de banana (PURGATTO, dados não publicados). Estes resultados mostram que a β -amilase parece ser importante no processo de degradação do amido da banana, mas ainda não são suficientes para comprovar o papel fisiológico da enzima neste processo (ASTORINO FILHO, 2008). Para isso, seria preciso isolar a enzima (β -amilase) da banana e mimetizar *in vitro* o processo de degradação *in vivo*, submetendo grânulos de amido de banana a sua atividade.

Reimann *et al.*, (2002, 2004 e 2007), isolaram amido de turions (*Spirodela polyrhiza*), e o expuseram à proteína da α -amilase extraída e parcialmente purificada de turions. Plantas de turions adaptadas ao escuro, para evitar a fosforilação do amido pela GWD, foram submetidas continuamente à luz vermelha para induzir a degradação do amido de reserva. A luz vermelha teve a função de induzir a GWD a se autofosforilar e iniciar sua atividade de fosforilar os grânulos de amido do turion. Os resultados mostraram que a irradiação resultou em fosforilação dos grânulos de

amido, acompanhado por mudanças na capacidade do grânulo de se ligar à α -amilase endógena, bem como em mudanças nos níveis de degradação dos grânulos. A fosforilação é crucial para a ligação com outras enzimas, inclusive para a α -amilase que pode se ligar ao grânulo independente da fosforilação, mas com alterações no perfil de degradação. Também observaram que uma vez iniciada a degradação do amido, a α -amilase foi solubilizada, sugerindo que a enzima pode ser necessária apenas durante a fase inicial da degradação do amido.

Dessa forma, o sistema de degradação de amido em turions, se assemelha ao de degradação de amido transitório em folhas, como *Arabidopsis*. Porém, foi visto que quando a α -amilase apresenta um papel dominante nessa degradação, o sistema passa a ser semelhante ao de degradação de amido de cereais. Sendo assim, os turions teriam uma mistura dos dois sistemas de degradação, apresentando um sistema único de degradação de amido em plantas (APPENROTH *et al.*, 2011).

Uma abordagem similar pode ser utilizada para melhor estimar a contribuição da β -amilase na degradação do amido da banana, e são vários os indícios de que essa enzima é importante neste processo. No entanto, apesar do gene de β -amilase, isolado de banana, codificar um produto que apresenta características sugestivas de que é funcional, como, por exemplo, a similaridade com outras β -amilases e a presença de um peptídeo de trânsito capaz de guiar a proteína para plastídios, ainda não foi demonstrado inequivocamente que ele apresenta atividade β -amilolítica sobre as cadeias do amido. Desse modo, seria importante confirmar a atividade biológica catalítica dessa proteína, e também seu efeito sobre a amilose, a amilopectina e sobre os grânulos de amidos íntegros, em associação a outras enzimas, ou não. Apesar da experiência adquirida no isolamento dos grânulos de amido de modo que eles possam ser utilizados num experimento deste tipo, a obtenção da enzima pura é, em geral, um problema.

Os resultados obtidos com a utilização de enzimas comerciais, de fungos, como faz a maior parte dos trabalhos publicados na área, são muito limitados e não fornecem pistas de como a degradação ocorre *in vivo* (BASSINELLO, 2002; SARIKAYA *et al.*, 2000). O ideal seria utilizar a enzima endógena. Porém, purificar a enzima a partir da polpa da banana se torna inviável, já que esse fruto contém menos de 1% de proteínas e as que são supostamente ligadas à degradação do amido, perfazem uma fração muito pequena neste total. O processo de purificação

desta proteína, já tentado de diferentes maneiras anteriormente no nosso laboratório, é muito demorado, não produz enzima pura suficiente e nem com atividade específica suficiente para os testes que nos propomos a fazer (BENDAZOLLI *et al.*, 1994; CORDENUNSI, 1989; NASCIMENTO *et al.*, 1997).

Sendo assim, a obtenção e purificação da enzima por expressão heteróloga, a partir da sequência da β -amilase de banana já estabelecida, se torna uma alternativa. Com a proteína assim produzida também seria possível gerar anticorpos policlonais, úteis na identificação da própria enzima em extratos e no tecido da banana.

A produção heteróloga tem muitas vantagens, mas a obtenção de proteínas recombinantes com atividade enzimática nem sempre é possível, pois a atividade depende de vários fatores, sendo um dos mais importantes a conformação nativa da proteína e a dependência de modificações pós-tradução. Nesse sentido, a expressão em sistema heterólogo utilizando células de *Pichia pastoris*, pode ser uma alternativa interessante, pois o uso de células de um microrganismo eucariótico resulta em condições de expressão mais similares às que acontecem na célula vegetal (DALY e HEARN, 2005).

1.5. Expressão heteróloga

A expressão de proteínas heterólogas em microrganismos que utilizam recombinação genética ainda é o ponto alto no desenvolvimento e exploração da biotecnologia moderna já que algumas proteínas, enzimas e peptídeos são encontrados em quantidades limitadas em sua fonte natural. Sendo assim, a expressão heteróloga em outras células hospedeiras tem sido empregada para potencializar a obtenção desses produtos de interesse biotecnológico. Diversos sistemas de células hospedeiras para a expressão de genes recombinantes foram desenvolvidos, sendo que todos apresentam vantagens e desvantagens. Dentre eles, os geralmente usados são os procariotos, como as bactérias e os eucariotos, como as leveduras, que são mais eficientes (DO CARMO, 2010; YIN *et al.*, 2007).

Os sistemas procariotos de expressão são em princípio úteis por produzir proteínas recombinantes que se diferenciam das produzidas em seu metabolismo. Porém, em muitos casos, as proteínas eucarióticas sintetizadas por bactérias são instáveis, não possuem atividade biológica e podem ser contaminadas com toxinas bacterianas (DO CARMO, 2010). A *Escherichia coli* é um sistema de expressão

procariótico amplamente utilizado, devido a sua taxa de crescimento rápido e a capacidade de fermentação contínua. Porém ficou limitada a determinados tipos de proteínas pelo fato de não poder ser aplicada em casos de modificações pós-tradução (glicosilação, acilação de ácidos graxos, fosforilação e formação de pontes dissulfeto), ou seja, para obter uma expressão bem sucedida por esse sistema, as características conformacionais e funcionais da proteína devem ser levadas em consideração. Pode também gerar imunogenicidade e afetar a estabilidade da proteína por manter sua metionina amino-terminal. As modificações podem afetar a bioatividade, a função, estrutura, solubilidade, estabilidade, a resistência à protease, meia-vida, e a compartimentalização das proteínas funcionais (BÖER *et al.*, 2007; DALY e HEARN, 2005; YIN *et al.*, 2007). Além disso, a renaturação das proteínas citoplasmáticas pode resultar na liberação de ácidos nucleicos, agentes pirogênicos, endotoxinas ou lipopolissacarídeos que podem limitar as aplicações biológicas ou médicas dos produtos expressos. As proteases altamente concentradas do meio intracelular também podem alterar algumas das características do produto final, o que proíbe a expressão de algumas proteínas bioativas em *E. coli*. Para evitar estes e outros problemas na obtenção de produtos como proteínas, enzimas e hormônios, sistemas eucariotos de expressão heteróloga utilizando leveduras foram desenvolvidos e são mais atrativos quanto a sua eficiência na elaboração final dos produtos expressos e secretados (DO CARMO, 2010; YIN *et al.*, 2007).

Os microrganismos eucariotos são bons modelos para expressão heteróloga por combinar sua facilidade de manipulação genética e rápido crescimento, assim como os sistemas procariotos, porém possuem a capacidade de secretar e realizar modificações pós-traducionais nas proteínas, além de apresentar altos níveis de expressão. Nos primeiros sistemas de expressão heteróloga com eucariotos, foi usada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido ao amplo conhecimento sobre sua genética e fisiologia. Além disso, apresenta eficiência econômica e atende aos regulamentos de biossegurança para aplicações em seres humanos. Levando em conta estas vantagens e a possibilidade de se modificar as vias metabólicas a fim de aumentar o rendimento da produção, muitos genes heterólogos foram expressos neste organismo para diversas finalidades como, por exemplo, insulina e vacina da hepatite B. Apesar disso, algumas limitações foram encontradas como, por exemplo, a hiperglicosilação e a modificação das cadeias de carboidratos das proteínas, as tornando potencialmente alergênicas. Na tentativa de superar estas inconveniências,

outros sistemas foram testados, como o de espécies metilotróficas e dimórficas, por exemplo, *Pichia pastoris* e *Yarrowia lipolytica*, respectivamente (BÖER *et al.*, 2007; DALY e HEARN, 2005; DO CARMO, 2010; GELLISSEN *et al.*, 2005).

Um sistema de expressão ótimo só pode ser selecionado se a produtividade, a bioatividade, objetivo, e as características físico-químicas da proteína de interesse forem levados em consideração, juntamente com o custo, comodidade e segurança do próprio sistema. Existe uma grande quantidade de sistemas que podem ser usados na expressão de proteínas, sendo assim, não há um modelo único que seja ideal a todas as proteínas (BÖER *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2007).

1.5.1. *Pichia pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido a mais utilizada como um hospedeiro celular para expressão de proteínas recombinantes devido ao fato de apresentar facilidade de manipulação genética e poder produzir células em quantidades elevadas. Trata-se de um eucarioto capaz de secretar altos níveis de proteínas recombinantes fazendo as modificações necessárias no polipeptídeo nascente, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico. Esse sistema supera o de expressão em *Escherichia coli* para produção de proteínas heterólogas principalmente quando a proteína de interesse não possui metionina amino-terminal, apresenta múltiplas pontes dissulfeto, pontes de fosforilação, ou pontes de glicosilação. O procarioto não tem capacidade de realizar essas modificações, podendo alterar a função das proteínas recombinantes (BÖER *et al.*, 2007; DALY e HEARN, 2005; DO CARMO, 2010).

Para obtenção de maiores quantidades de proteína para estudos funcionais, fisiológicos ou estruturais, o sistema de *P. pastoris* é um complemento útil a outros sistemas de células hospedeiras de expressão, também por sua capacidade de gerar vetores de expressão com múltiplas cópias de inserção do gene estranho. Para uso experimental em investigações de engenharia de proteínas, onde a autenticidade da proteína recombinante é essencial para decifrar o comportamento a nível molecular assim como a interação dessa proteína recombinante com as moléculas que ocorrem naturalmente, tais como receptores químicos, biológicos e substratos, a *P. pastoris* se torna um dos melhores sistemas conhecidos para expressão de proteínas na forma solúvel assim como seus recombinantes (DALY e HEARN, 2005; LI *et al.*, 2007).

A produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* apresenta várias vantagens sobre outros sistemas de expressão procariotos e eucariotos, como: taxa de crescimento rápido em conjunto com a facilidade de fermentação, níveis elevados de produtividade com conversão de 30 a 40% do seu peso em proteínas, eliminação de contaminação por endotoxina e bacteriófago, vetores de expressão bem caracterizados que facilitam a manipulação genética, ausência de patogenicidade e imunogenicidade humana, já que não apresenta tantas modificações nas cadeias de carboidratos como a *S. cerevisiae*, diversas modificações pós-traducionais que incluem dobramento do polipeptídeo, glicosilação, metilação, acilação, e direcionamento para os compartimentos subcelulares, não interferindo nos processos de enovelamento e dobramento finais da proteína madura. Além disso, essa levedura utiliza metanol como indutor de expressão do gene heterólogo. Isso se deve ao fato de que, por ser uma levedura metilotrófica, a *P. pastoris* pode usar o metanol como única fonte de carbono e energia reduzindo os custos de produção heteróloga (BÖER *et al.*, 2007; CEREGHINO e CREGG, 2000; CREGG *et al.*, 1993; DO CARMO, 2010; LI *et al.*, 2007).

Os sistemas de expressão em *P. pastoris* podem produzir proteínas heterólogas em grandes quantidades tanto intracelularmente como secretadas ao meio de cultura, sem a necessidade da utilização das próprias células de levedura. Devido ao fato desta levedura secretar poucas proteínas nativas, a purificação no sobrenadante da cultura é facilitada. Alguns exemplos de proteínas produzidas em *P. pastoris* são: fator de necrose tumoral, superóxido dismutase, antígeno de superfície da hepatite B, entre outras produzidas intracelularmente, albumina do soro humano, invertase, lisozima bovina e humana, entre outras proteínas secretadas. (CREGG *et al.*, 1993; YIN *et al.*, 2007).

1.5.1.1. Metabolismo do metanol

Leveduras capazes de utilizar metanol como única fonte de carbono, são definidas como metilotróficas. Os elevados níveis de expressão de *P. pastoris* estão relacionados ao forte promotor induzível e regulado por metanol, usado para transcrever genes heterólogos, derivado do gene da proteína álcool oxidase 1 (AOX1), que é superexpressa e chega a 30% das proteínas totais intracelulares. Em *P. pastoris*, existem dois genes para enzima álcool oxidase (AOX), AOX1 e AOX2. Quando induzidos, o promotor do gene AOX1 apresenta mais força do que seu

similar AOX2. Por isso, embora os produtos destes genes sejam bastante similares quanto suas sequências e funções, mais de 95% da atividade enzimática da álcool oxidase é atribuída a expressão do gene AOX1 em presença de metanol. (CREGG *et al.*, 1993; DE PAULA, 2006).

Com metanol agindo como indutor, a via metabólica se inicia com a oxidação do metanol para formar formaldeído e peróxido de hidrogênio, reação que é catalisada pela enzima álcool oxidase (AOX) presente na organela peroxissomo, onde também está presente a enzima catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio que apresenta toxicidade para a célula em água e oxigênio. O formaldeído produzido será a base para a obtenção de energia para o crescimento da levedura e é metabolizado no citoplasma até a formação de dióxido de carbono por duas desidrogenases citoplasmáticas. As enzimas necessárias para o metabolismo do metanol estão presentes em níveis substanciais apenas quando as células são cultivadas em metanol (CEREHINO e CREGG, 2000; GELLISSEN *et al.*, 2005; GONÇALVES, 2009).

1.5.1.2. Linhagens de *Pichia pastoris* e vetores de expressão

Algumas linhagens mutantes de *P. pastoris* são derivadas do organismo do tipo selvagem NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria IL), devido à eficácia da levedura metilotrófica como sistema de expressão (GELLISSEN *et al.*, 2005; LI, *et al.*, 2007).

As linhagens foram desenvolvidas com mutações auxotróficas, com ausência do gene que codifica a histidina desidrogenase (*his4*), por isso, requerem a suplementação com histidina para crescimento com seleção de transformantes através da habilidade de crescimento em meio sem histidina como, por exemplo, a GS115, GS190 e GS200. Algumas proteínas estranhas secretadas por essa levedura são instáveis no meio de cultivo devido a uma rápida degradação por proteases. Para minimizar esse problema, foram desenvolvidas linhagens que não possuem genes que codificam algumas proteases, garantindo melhor qualidade do produto secretado, que são as linhagens deficientes em proteases sendo as mais comuns, SMD1163, SMD1165, SMD1168 e a KM71. Contudo, a viabilidade destas linhagens é comprometida, apresentando um crescimento mais lento e ainda mais difícil de serem transformadas em relação às linhagens selvagens. Além da GS115, as linhagens KM71 e SMD1168 não possuem o gene que codifica a *his4*. Também

existem mutantes com os genes da enzima álcool oxidase alterados, determinando fenótipos diferenciados quanto à assimilação de metanol. Outras linhagens foram projetadas para expressar genes de proteínas específicas integrados no genoma da hospedeira e podem ser utilizados como controle de expressão extra ou intracelular (CEREGHINO e CREGG, 2000; DALY e HEARN, 2005; DE PAULA, 2006; DO CARMO, 2010; LI, *et al.*, 2007).

Existem muitos vetores comerciais que podem ser utilizados para expressar proteínas em *P. pastoris*. Os vetores de expressão são geralmente integrativos, os quais possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene AOX1, entre essas sequências está o local de múltipla clonagem para inserção da sequência codificante heteróloga, além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada a do gene histidinol desidrogenase (*his4*). Alguns vetores do sistema de expressão possibilitam a secreção de proteínas heterólogas através de uma sequência sinal introduzida logo depois da região promotora. Entre as sequências de secreções mais utilizadas há o peptídeo sinal do fator α (α -MF) de *S. cerevisiae*, mas podem ser substituídas por sequências sinais da proteína nativa a ser expressa (CEREGHINO e CREGG, 2000; DE PAULA, 2006; DO CARMO, 2010; GONÇALVES, 2009).

Os vetores de expressão em *P. pastoris* da primeira geração, foram o pHIL-D2 e o pPIC9, sendo que o último possui como sinal de secreção o peptídeo sinal do fator α . Estes vetores possuem o gene funcional *his4* e resistência a ampicilina. Posteriormente, um gene que confere resistência a canamicina foi adicionado a estes vetores de expressão, dando origem ao pPIC9K (resistente a ambos antibióticos). Porém, apresentam dificuldades para clonagem *in vitro*, em virtude do tamanho do vetor (9,0 a 9,3 Kb) e também resultam em transformantes com baixa estabilidade genética. Atualmente os vetores que vêm sendo mais utilizados para expressão em *P. pastoris* são os pPICZ α , que possuem seleção por zeocina e o peptídeo sinal do fator α como sinal de secreção, além de possuir o promotor AOX1 e região terminadora de transcrição do gene AOX1. Outra grande vantagem é o tamanho desses vetores que varia de 3,3 a 3,6 Kb. Todos esses são vetores bifuncionais, já que podem ser utilizados tanto em leveduras quanto em *E. coli*. (DALY e HEARN, 2005).

O mapa do vetor de expressão de escolha está ilustrado na Figura 3. Dentre os elementos constituintes mais importantes, destacam-se o tamanho (3593 pb), o

promotor *AOX1* que promove a transcrição do gene de interesse, o sinal de secreção fator- α que dirige a secreção da proteína expressa para o sobrenadante, codificação de seis histidinas, o gene de seleção por Zeocina e o fragmento 3' *AOX1* de terminação da transcrição.

Figura 3. Mapa do vetor pPICZ α A.

Fonte: EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

1.5.1.3. Fenótipos da levedura e integração no genoma de *P. pastoris*

A forma com a qual o cassete de expressão se integra no genoma de *P. pastoris* possibilita caracterizar três fenótipos diferentes, que variam em relação à sua capacidade de metabolizar o metanol. Tais fenótipos são o Mut⁺ (*Methanol Utilization Plus*), nos quais as linhagens hospedeiras, como a GS115 e a SMD1168, apresentam os genes *AOX1* e *AOX2* funcionais no seu genoma e possuem crescimento que aproxima daquele apresentado pela levedura selvagem, o fenótipo Mut^S (*Methanol Utilization Slow*), dependente da fraca transcrição do gene *AOX2* uma vez que possui o gene *AOX1* não funcional, como a KM71, e por fim o fenótipo Mut⁻ (*Methanol Utilization Minus*), como a MC100-3, que possui os dois genes *AOX* inativos impossibilitando a metabolização de metanol, e a levedura não cresce na carência de outros nutrientes. Cepas com genes *AOX* excluídos (Mut^S e Mut⁻), às

vezes podem ser melhores produtores de proteínas estranhas do que as cepas selvagens (Mut⁺). Todas essas cepas, incluindo a de fenótipo Mut⁻, são capazes de induzir a expressão em níveis elevados a partir do promotor AOX1 (DO CARMO, 2010; LI *et al.*, 2007).

A expressão de qualquer gene estranho em *P. pastoris* requer três passos: (1) a inserção do gene num vetor de expressão, (2) introdução do vetor de expressão no genoma da *P. pastoris*, e (3) o potencial de expressão das cepas para o produto do gene estranho. Os mecanismos pelos quais ocorrem a integração e transformação em *P. pastoris* podem ser feitos por adição ou por substituição gênica (CEREGHINO e CREGG, 2000; CREGG *et al.*, 1993).

A recombinação homóloga para a inserção dos vetores pode ocorrer no locus *his4* ou no locus AOX1. Na integração por adição, uma linhagem mutante auxotrófica é transformada com vetores circulares ou linearizados em uma única marca de seleção, no locus *his4* ou no promotor AOX1. Recombinações homólogas entre sequências compartilhadas pelo vetor linearizado e pelo genoma da hospedeira resultam na integração de 50 a 80% das vezes por um evento de crossover simples, podendo ocorrer também transformantes de cópias múltiplas. Em adições no locus *his4*, quando leveduras de fenótipo Mut⁺ são transformadas com vetores linearizados na região *HIS4* o fenótipo não é alterado. Já a inserção por adição utilizando AOX pode ocorrer por recombinações entre as regiões AOX do vetor com sequências de homologia do genoma de *P. pastoris*, não inativando o gene AOX1, resultando em fenótipo Mut⁺ (DO CARMO, 2010).

Na integração por substituição gênica, o gene AOX1 é deletado e substituído pela ocorrência de duplo crossover no locus AOX1. Aproximadamente 10-20% dos eventos de transformação são resultado de um evento de substituição do gene em que o gene AOX1 é suprimido e substituído pelo cassete de expressão e o gene marcador, com transformantes de cópias únicas. Este rompimento do gene AOX1 obriga estas cepas a utilizarem o gene AOX2 transcricionalmente mais fraco para o crescimento em metanol, e, como resultado, estas cepas têm um fenótipo Mut^S (CEREGHINO e CREGG, 2000).

A *P. pastoris* é transformada por integração do cassete de expressão no locus específico para gerar transformantes geneticamente estáveis e algumas proteínas expressam melhor em um tipo de fenótipo do que em outro (DALY e HEARN, 2005; DE PAULA, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Os frutos apresentam uma reserva de amido que é mobilizada em um evento único, representado pelo climatério, de modo análogo ao que ocorre em sementes durante a germinação, e diferente daquele do amido transitório presente nas folhas. Apesar disso, parece existir maior similaridade entre o processo de degradação do amido na polpa de banana com o modelo dos tecidos fotossintetizantes, do que com o de cereais.

As amilases parecem ser críticas no processo de conversão amido-sacarose, indicando a via amilolítica de degradação como principal na mobilização do amido. O estudo das implicações do metabolismo amido-sacarose para o manejo pós-colheita em bananas, incluindo algumas enzimas envolvidas e a identificação de um gene que parece ser determinante para degradação do amido, permite a intervenção ou maior controle sobre esses processos.

Pela provável semelhança entre as vias de degradação do amido em frutos, um melhor entendimento desse processo em bananas pode fornecer informações sobre a utilização do amido como substrato para a síntese de açúcares solúveis não só nesse modelo de estudo, mas também em outras frutíferas.

O estudo da β -amilase de banana pode contribuir para o esclarecimento de uma etapa importante no metabolismo do amido e acúmulo de açúcares solúveis na polpa do fruto. Embora essa enzima pareça ter destaque na degradação do amido, os dados existentes ainda não são suficientes para comprovar o papel fisiológico dessa enzima durante o amadurecimento do fruto. Por isso, a caracterização do produto desse gene, a partir da expressão da proteína β -amilase recombinante em sistema heterólogo se torna muito importante.

A escolha de um sistema eucariótico eficiente possibilita a obtenção de proteínas recombinantes, como a β -amilase, com ação catalítica, por serem capazes de realizar modificações necessárias para a conformação ideal da proteína. Dessa forma, foi utilizado o sistema eucariótico *Pichia pastoris* na tentativa de obter essa proteína recombinante, tendo como finalidade, tanto a produção de anticorpos policlonais quanto a realização de testes posteriores com o amido isolado do fruto, análise da sua hidrólise e dos produtos formados.

3. OBJETIVOS

Obtenção e caracterização funcional da forma recombinante da β -amilase de banana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foram utilizadas polpas de bananas maduras (*Musa acuminata* AAA, cv. Nanicão) aos 17 dias após colheita. Os frutos foram armazenados em câmaras a 18 °C para amadurecimento natural. Durante o processo de amadurecimento, amostras representativas desta etapa foram coletadas das polpas dos frutos, cortadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C.

4.2. Métodos

4.2.1. Extração de RNA e síntese do DNA complementar ao RNAm (cDNA)

Fatias dos frutos congelados foram triturados em N₂ líquido e a extração do RNA total foi realizada a partir de 100 mg de polpa baseando-se no método *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA com *Improm-II™ Reverse Transcription System* (Promega).

4.2.2. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucléicos

O RNA total extraído foi quantificado espectrofotometricamente pela determinação da absorbância a 260 nm e avaliado quanto à sua pureza pela razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. A qualidade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 25S e 18S quando analisado em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão 1X TAE (Tris-acetato/EDTA), pH 8 conduzida sob voltagem constante (80 V) e visualizados por meio de coloração com *SYBR® Safe DNA Stain* (Invitrogen) sob luz ultravioleta.

4.2.3. Produção de β-amilase recombinante em *Pichia pastoris*

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar a sequência da β-amilase foram construídos contendo adaptadores com sítios únicos de restrição das enzimas KpnI e NotI, indicados em negrito nos oligonucleotídeos:

BMYP_{KpnI} 5'- AGAGAG**GTACCA**AGGATAAGGCCGGTCCG -3'

BMYN_{NotI} 5'- AGAGAG**GCGGCCGCT**GTCTGACTGCAGCTCTCGGTCATT -3'

O cDNA utilizado como molde para a reação de polimerase em cadeia (PCR) foi obtido a partir de amostra de bananas maduras. As cinco reações consistiram de 0,3 μ M de oligonucleotídeos, 1,5 mM de $MgSO_4$, 0,08 mM de dNTPs, 1 μ L de cDNA molde 17 dpc, e 1 unidade de *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen®) em 50 μ L de volume de reação. As condições utilizadas para a PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos consistindo de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, pareamento a 60 °C por 10 segundos, extensão a 70 °C por 30 segundos e mantidos a 4 °C ao final da reação. Os fragmentos obtidos com aproximadamente 1.500 pb pela PCR foram purificados com *Nucleo Spin® Extract II Kit* (Macherey-Nagel).

4.2.3.1. Clonagem e construção pPICZ α A:BMV

Para a construção pPICZ α A:BMV, o fragmento e o vetor pPICZ α A foram digeridos com as enzimas de restrição NotI e KpnI (*Fast Digest* – Fermentas), nessa ordem. Após essa etapa, as amostras foram separadas em gel de agarose e as bandas foram cortadas e purificadas com *Nucleo Spin Extract II Kit* (Macherey-Nagel). O fragmento BMV foi ligado ao vetor pPICZ α A nas proporções molares 1:1 e 3:1 (vetor:fragmento), utilizando 1 unidade de *T4 DNA Ligase* (Fermentas) em 10 μ L de volume de reação por uma noite a 16 °C. A mistura de ligação foi utilizada para transformação química de *E. coli* competentes (*TOP 10 F'* – Invitrogen), conforme recomendações dos fornecedores. Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio de cultura Luria-Bertani (LB) *low salt* suplementado com 25 μ g.mL⁻¹ de zeocina como agente de seleção mantidos por uma noite a 37 °C. O meio de cultura LB *low salt* consistiu de extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e triptona 1% com pH ajustado para 7,5 com NaOH.

As colônias crescidas na proporção molar 3:1 em meio LB *low salt*/agar suplementado com 25 μ g.mL⁻¹ de zeocina foram submetidas à PCR utilizando-se os oligonucleotídeos BMVKpnI e BMVNotI para a verificação das colônias positivamente transformadas (fragmento da β -amilase – BMV – ligado ao vetor).

Foram selecionados cinco transformantes positivos após a clivagem dos vetores pelas enzimas flanqueadoras do inserto KpnI e NotI com a presença de bandas correspondentes ao tamanho esperado da amplificação do fragmento (1,3 Kb) quando comparadas com o padrão *Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* (Fermentas), através da análise da eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em

tampão 1X TAE, pH 8 conduzida sob voltagem constante (80 V) e visualizadas por meio de coloração com *SYBR Safe DNA Stain* (Invitrogen) sob luz ultravioleta.

Uma alíquota do inóculo dessas colônias foi retirada para o estoque em 30% de glicerol e outra para a extração de DNA plasmidial através do *miniprep* (*GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit* – Fermentas), para posterior sequenciamento com os oligonucleotídeos 5'AOX (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') e 3'AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). As identidades das sequências presentes nas construções purificadas foram confirmadas após o sequenciamento dos vetores, realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (<http://genoma.ib.usp.br/>). Para isso, foi utilizado o *ABI 3730 DNA Analyser* – *Life Technologies* – *Applied Biosystems*. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (código 4337456) e as sequências foram analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando o *Base Caller KB*. Cada reação de sequenciamento era composta de 5 µL de vetor na concentração ideal (5Kb = 125 ng/µL) acrescidos de 2,5 µL de primer a 5 µM (em uma reação o 3' e em outra o 5'), com total de 7,5 µL. Quanto maior o vetor (vetor + inserto) maior a concentração necessária. As condições utilizadas foram: desnaturação inicial com rampa térmica até 96 °C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos consistindo de desnaturação com rampa térmica até 96 °C por 10 segundos, pareamento com rampa térmica até 50 °C por 5 segundos e de extensão com rampa térmica até 60 °C por 4 minutos e mantidos a 4 °C ao final da reação.

A colônia positivamente transformada foi utilizada como inóculo em 5 mL de meio LB *low salt* suplementado com 30 µg.mL⁻¹ de zeocina mantido em agitador orbital a 37 °C com 100 rpm por 18 horas. Após centrifugação a 6.000 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi utilizado para a extração de DNA plasmidial utilizando o *Midiprep – Qiagen Plasmid Midi Kit* (25). Os vetores (10 µg) foram linearizados com a enzima de restrição PmeI (MssI, Fermentas) com incubação a 37 °C por 35 minutos, inativação a 65 °C por 15 minutos, mantidos a 4 °C e purificados utilizando-se o *Nucleo Spin Extract II Kit* (Macherey-Nagel).

4.2.4. Preparação das células de *Pichia pastoris*

O preparo da pré-cultura de células consistiu de meio YPD e células de *Pichia pastoris* da cepa GS 115 (fenótipo Mut⁺, his⁻), incubados a 30 °C com agitação de

250 rpm por 24 horas. A partir desta pré-cultura foram preparados volumes maiores (200 mL) contendo meio YPD sem zeocina e uma alíquota da pré-cultura (500 μ L), consistindo na cultura de célula propriamente dita, que foi incubada a 30 °C até atingir densidade ótica (OD)_{600nm} de 1,5. A composição do meio YPD foi: extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%.

4.2.5. Transformação em *Pichia pastoris* via eletroporação

A cultura de células foi resfriada em gelo por 10 minutos, transferida para tubos de centrifuga previamente resfriados e submetida à centrifugação a 1.500 *g* por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado três vezes com água, previamente autoclavada e resfriada, e novamente centrifugado por 1.500 *g* por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 10 mL de sorbitol 1 M previamente autoclavado e resfriado; em seguida a mistura foi centrifugada a 1.500 *g* por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi retomado em 1 mL de sorbitol 1 M. As células de *P. pastoris* (100 μ L) foram transformadas com 7 μ g de vetor linearizado por eletroporação (*Bio Rad Gene Pulser*) empregando-se as seguintes condições: 1500 V, 200 Ω e 25 μ F. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M e o volume total foi transferido para novo tubo, e submetido à incubação a 30 °C sem agitação, por uma hora. Após este período foi adicionado o meio YPD e incubou-se novamente a 30 °C, com agitação de 200 rpm, por uma hora.

4.2.6. Seleção em placas

Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio YPDS/Agar suplementadas com 100 μ g.mL⁻¹ e 500 μ g.mL⁻¹ de zeocina utilizada como agente de seleção. O meio YPDS/Agar consistiu de: extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1 M e ágar 2%. Após três dias, as colônias crescidas em meio YPDS/agar foram submetidas à PCR utilizando-se os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX para a verificação das colônias positivamente transformadas.

4.2.7. Análise do fenótipo dos transformantes positivos

A cepa GS115 tem o fenótipo (His⁻/Mut⁺) podendo adquirir um fenótipo diferente depois de transformada. Por isso, os transformantes positivos foram

plaqueados juntamente com os controles GS115/pPICZ/lacZ (His⁻/Mut⁺) e GS115/HSA (His⁺/Mut^S) e em placas espelho contendo metanol e dextrose para avaliação do seu fenótipo.

As placas foram mantidas a 29 °C e o crescimento dos transformantes positivos foram comparados com os controles em 24 e 48 horas. Os meios de cultura continham YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$ e histidina 0,004%, sendo um deles acrescido de 0,5% de metanol (MMH) e o outro 2% de dextrose (MDH).

4.2.8. Crescimento de células de *P. pastoris* transformadas, com indução da expressão via EasySelect™ Pichia Expression Kit (K1740-01 - Invitrogen)

Foram adicionados 10 µL de zeocina em meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose). O meio suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de zeocina foi dividido em tubos de 5 mL (cultura líquida), onde o vetor vazio (pPICZαA) e alguns transformantes positivos (vetor pPICZαA:BMV) foram selecionados, inoculados e incubados a 29 °C a 250 rpm até que ocorresse turvação. Após essa etapa foi adicionado 1,5 mL da cultura líquida em um erlenmeyer contendo 80 mL do meio BMGY (*buffered complex glycerol medium*) seguido de incubação para gerar biomassa até que a OD_{600nm} atingisse valores maiores que 2.0. As células foram centrifugadas a 1.350 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi retomado em 40 mL de meio BMMY (*buffered complex methanol medium*) seguido de incubação a 29 °C e 220 rpm por 4 dias para indução da expressão. A cada 24 horas foi adicionado metanol a uma concentração final de 2% para manutenção das condições e da indução.

O meio BMGY consistiu de extrato de levedura 1%; peptona 2%; 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7; YNB (*yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids*) 1,34% com adição de 20 g de sulfato de amônio; biotina $4 \times 10^{-5}\%$ e glicerol 1%. O meio BMMY consistiu de extrato de levedura 1%; peptona 2%; 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7; YNB (*yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids*) 1,34% com adição de 20 g de sulfato de amônio; biotina $4 \times 10^{-5}\%$ e metanol 0,5%.

4.2.9. Precipitação das proteínas com sulfato de amônio

As células foram centrifugadas a 1.150 g por 10 minutos a 4 °C, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado de sulfato de amônio a 80% de

saturação para precipitação das proteínas, com agitação sob refrigeração até completa solubilização e mantido em repouso por 2 horas sob refrigeração. A proteína foi coletada por centrifugação a 8.000 *g* por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi retomado em aproximadamente 500 µL de tampão Hepes-KOH 50 mM, pH 7 contendo cisteína 20 mM, EDTA 20 mM e benzamidina 1 mM e o extrato protéico foi dialisado contra o mesmo tampão para remoção de resíduos de sais.

4.2.10. Quantificação proteica e ensaio de atividade com substrato específico

O conteúdo de proteína total foi estimado pelo método de Bradford (1976) com o reagente *Protein Assay* (Bio Rad), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA – Sigma) como padrão. Uma alíquota de 20 µL de amostra foi adicionada a 140 µL de água e 40 µL do reagente para dosar a proteína.

Para a quantificação da atividade enzimática de β -amilase foi utilizado o método descrito por McCleary & Codd (1989) no qual é utilizado o reagente Betamyl que contém *p*-nitrofenil-maltopentaosídeo (PNPG5) como substrato para a β -amilase e *p*-nitrofenol (PNP) foi utilizado como padrão. A reação acontece na presença de glicosidases liberando *p*-nitrofenil, que desenvolve coloração amarela em condição alcalina possibilitando a leitura a 410 nm. O extrato enzimático (20 µL) foi incubado com 20 µL de reagente a 30 °C por (15, 30, 60, 90 e 120 minutos). A reação foi interrompida e a cor desenvolvida pela adição de 160 µL de Tris 1% (m/v) e a absorbância foi medida a 410 nm.

4.2.11. Ensaio de atividade em gel nativo

A atividade de β -amilase foi ensaiada aplicando-se as proteínas em géis de 7,5%, 8% e 12% de poliacrilamida (30:0,8) contendo amido de batata hidrolisado para eletroforese (0,1%, Sigma – S4501/5000) em tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3. O amido foi previamente gelatinizado por fervura para posterior incorporação ao gel de poliacrilamida. Foram utilizados géis de 0,75 mm e 1,5 mm de espessura, montados em cuba vertical de eletroforese modelo *Mini-Protean* (Bio-Rad). A separação das proteínas foi conduzida sob voltagem constante (200 V) a 4 °C. Após a separação, os géis foram lavados com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7 contendo MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM e DTT (ditiotreitól) 1 mM duas vezes por 15 minutos cada, e incubados por uma noite a temperatura ambiente no mesmo tampão

com leve agitação. A atividade hidrolítica foi identificada após coloração com solução aquosa de iodo (I_2 13 mM / KI 40 mM) – Lugol (L6146 – Sigma).

4.2.12. SDS-PAGE

As proteínas expressas pela levedura foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, empregando-se um sistema descontínuo, baseado no método descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis de 8% ou 12% de acrilamida (30:0,8) em tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M pH 8,3 contendo 0,1% de SDS – dodecil sulfato de sódio (p/v). Os géis com 0,75 mm ou 1,5 mm de espessura foram montados em cuba vertical de eletroforese modelo *Mini-Protean* (Bio-Rad). Como marcador de massa molecular foi utilizado o *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas, 10 a 170 kDa). A separação foi conduzida sob voltagem constante (200 V) por aproximadamente 1 hora. Os géis foram corados com prata, utilizando-se um conjunto de reagentes fornecidos pela Bio-Rad (*Bio-Rad Silver Stain Plus Kit*) ou com solução de Comassie (*Comassie Brilliant Blue G-250* 0,1%, ácido acético 10% e etanol 40%), e descorados para revelação das bandas com solução descoradora (etanol 5% e ácido acético 7,5%).

4.2.13. Western e Dot blot

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Amersham Hybond™ ECL™ - GE Health Care*) em tampão Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e metanol 20%. A voltagem utilizada para a transferência foi de 30 V por aproximadamente 16 horas a 4 °C. Após a transferência, a membrana foi corada com *Ponceau*, descorada com água e bloqueada com 10 mL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM, 5% de leite em pó desnatado (Molico) (p/v) com incubação por 1 hora a temperatura ambiente e agitação moderada. Após a lavagem com PBS, a membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo primário monoclonal *Penta His Antibody* (1:2000) (Qiagen) em PBS/Tween-20 a 0,05 %. Em seguida a membrana foi incubada com os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (1:1000), marcados com peroxidase, por 1 hora. Os complexos antígeno-anticorpo foram detectados pela incubação da membrana com 10 mL de solução Tris-HCl 0,05 M, pH 9,5, NaCl 0,15 M e metanol 0,3% na presença de 5 µL de H_2O_2 30%, contendo o substrato 4-chloro-

1-naphthol 2,9 mM (Sigma). Foi feito também Western Blotting com substrato cromogênico, utilizando anticorpo conjugado com peroxidase (HRP), onde após o bloqueio da membrana com leite, o anticorpo já foi adicionado (1:5000) e revelado com TMB (substrato cromogênico). Também foi realizada a técnica de *Dot Blot* utilizando como controle uma proteína recombinante conhecida, aplicada diretamente na membrana, assim como as amostras. Essa membrana foi corada com *Pounceau* e após ser descorada em água, foi bloqueada com leite 5 % e o mesmo anticorpo conjugado (HRP) foi utilizado com o substrato cromogênico (TMB).

4.2.14. Lise celular e purificação de proteínas

Os sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão LEW (Lysis-Equilibration-Wash), utilizando 5 µL de tampão para cada mg de sedimento obtido do cultivo, acrescido de 1 mg/ml de lisozima. A lise celular foi realizada em desmembrador sônico Vibra Cell com 10 ciclos a 30 W por 15 segundos com 15 segundos de intervalo. O lisado foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C.

A purificação da β-amilase foi realizada em coluna Protino[®] Ni-TED 2000 (Macharey-Nagel), conforme recomendações do fabricante. Tanto o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio e dialisado, quanto o sobrenadante do lisado celular, foram aplicados em colunas diferentes e a eluição foi feita com 2 lavagens de 4 mL cada com tampão de eluição (contendo imidazol 250 mM). A pureza e a massa molecular aparente foram determinadas por eletroforese em SDS-PAGE.

4.2.15. Preparo de amostra para identificação por espectrometria de massas

As bandas com massa molecular semelhante ao da β-amilase, observadas em SDS-PAGE, foram recortadas e submetidas à digestão tripsínica *in gel*. Os fragmentos gerados foram analisados por cromatografia líquida, acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) em um espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo – Tempo de Vôo com fonte de ionização *nanospray* (Q-ToF Ultima, Waters). Essas bandas foram mantidas em solução descorante (50% metanol e 5% ácido acético) por 30 minutos (2 vezes). As bandas foram desidratadas com acetonitrila por 5 minutos (2 vezes) e após remoção do volume, a acetonitrila foi evaporada em concentrador a vácuo (speed vac). A redução foi feita com a adição de solução de 10 mM de DTT por 30 minutos. Após remoção da solução, foi realizada a alquilação adicionando-se uma solução de 50 mM de IAA

(iodoacetamida) por 30 minutos. Após a remoção da solução, os géis foram lavados com 100 mM de bicarbonato de amônio por 10 minutos. Esta solução foi removida e os géis foram novamente desidratados com acetonitrila por 5 minutos a temperatura ambiente. Após remoção do volume, a acetonitrila foi evaporada em concentrador a vácuo e ao resíduo foi adicionada uma solução de tripsina (20 ng/μl em 50 mM de bicarbonato de amônio) por 30 minutos em banho de gelo. Após remoção do excesso da solução por pipetagem, adicionou-se 50 mM de bicarbonato de amônio e manteve-se a 37°C por uma noite. A extração dos peptídeos gerados pela digestão tripsínica foi feita pela adição de 5% de ácido fórmico à solução anterior, com incubação de 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi reservado. Ao precipitado foi adicionado 5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila e incubado por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi reunido ao sobrenadante da etapa anterior. Esta etapa foi repetida por mais uma vez. A amostra foi evaporada em concentrador a vácuo e ressuspensa em 0,1% de ácido fórmico.

A solução contendo os peptídeos foi aplicada e analisada pelo programa do cromatógrafo *nanoAcquity* (Waters). Foi utilizado o banco de dados de proteínas do SwissProt (banco baixado em 29 de março de 2012) no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – Instituto Butantan (*Mascot Server* versão 2.2). Os parâmetros de busca utilizados foram: 1 clivagem perdida pela tripsina; resíduos de cisteína carbamidometilados (escolhidos como modificação fixa) e resíduos de metionina oxidados (escolhidos como modificação variável), com tolerância de massas de 0.3 Da para MS e 0.3 Da para MS/MS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão heteróloga da β -amilase de banana em *Pichia pastoris*, cepa GS115, foi feita a partir da inserção “*in frame*” do gene que codifica essa proteína no vetor pPICZ α A, que além de ser mais adequado para produção de genes pequenos, contém o fator alfa que sinaliza para a secreção da proteína para o meio de cultura, o que facilita a sua posterior purificação.

Em etapas anteriores, foram feitos testes de expressão e indução utilizando construções já existentes, tanto com a inserção do gene da β -amilase (GS115_pPICZ α A:BMV13) na levedura *Pichia pastoris*, quanto sem a inserção desse gene (GS115_pPICZ α A:vetorvazio), para efeito de comparação. Nos extratos assim obtidos foram testadas diferentes metodologias de purificação da proteína relativa à β -amilase, diferentes métodos de determinação de atividade, tanto com substrato específico (Betamyl) para a enzima *in vitro*, quanto pela visualização de proteínas com atividade através de géis nativos adicionados de substrato não específico como o amido. Além disso, as bandas proteicas reveladas em SDS-PAGE com massa molecular compatíveis com a enzima, foram sequenciadas.

As induções foram realizadas diversas vezes, mas mesmo com a alteração de alguns parâmetros não foi possível chegar a um resultado positivo em relação à produção e purificação da enzima de interesse com atividade, já que no sequenciamento foram detectadas diversas proteínas, mas nenhuma referente à β -amilase.

Foram testadas diferentes metodologias de purificação e nenhuma foi efetiva. O vetor pPICZ α A contém um *tag* de polihistidina que facilita a purificação da proteína com resinas metálicas por ligação a cátions bivalentes como o Níquel (Ni²⁺). Entretanto, o processo usado para a obtenção da construção, retirou esse *tag* pela presença do *stop codon* na sequência do gene inserido, dificultando sua purificação. Sendo assim, optou-se por realizar uma nova construção com cauda de histidina. Essa nova tentativa de indução e expressão da β -amilase em *Pichia pastoris* teve como objetivo obter clones capazes de expressar a proteína recombinante com atividade enzimática.

A seguir serão descritos somente os experimentos em que foram obtidos os resultados mais promissores dessa nova etapa.

5.1. Preparo da construção pPICZαA:BMY

Os oligonucleotídeos que foram utilizados nas PCRs para amplificar a sequência da β-amilase, delimitam uma sequência de aproximadamente 1.500 pb e contêm adaptadores com sítios únicos de restrição das enzimas KpnI e NotI, indicados em negrito:

BMYKpnI 5'- AGAGAG**GTACCA**AGGATAAGGCCGGTCCG -3'

BMYNotI 5'- AGAGAG**GCGGCCGCT**GTCTGACTGCAGCTCTCGGTCATT -3'

Esses oligonucleotídeos foram utilizados em duas reações de PCR com 35 ciclos. Cada reação partiu de 0,5 µg de cDNA molde obtido de banana madura com 1 unidade de enzima de baixa fidelidade *Taq polimerase* (Invitrogen). Após a PCR, foi feito um gel de agarose 1% para verificar se houve amplificação (Figura 4).

Figura 4. Gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen) para eletroforese com tampão TAE (tris-acetato/EDTA) 1 X, sob condições de corrida de 80 V e 400 mA por 22 minutos. Amplificação de cDNA (destacada com a seta) com oligonucleotídeos específicos para β-amilase em PCR com *Taq polimerase* em comparação com o padrão *Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas). Fragmento com aproximadamente 1.500 pb (altura da banda indicada com a seta no padrão).

A amplificação ocorreu na altura esperada e, por isso, o mesmo cDNA e os oligonucleotídeos foram utilizados em cinco reações de PCR com uma polimerase de alta fidelidade KOD Hot Start DNA polymerase. Essa polimerase diminui a formação de produtos não específicos, já que polimerases de alta fidelidade são capazes de corrigir erros introduzidos na síntese de DNA com mais eficiência do que as polimerases de baixa fidelidade.

Após a PCR com 25 ciclos, as cinco reações foram aplicadas em um gel de agarose 1% para visualizar o produto da reação (Figura 5).

Figura 5. Gel de agarose 1% corado com *SYBR® Safe DNA Stain* (Invitrogen) para eletroforese com tampão TAE (tris-acetato/EDTA) 1 X, sob condições de corrida de 80 V e 400 mA por 30 minutos. Amplificação de cDNA (destacada com a seta) com oligonucleotídeos específicos para β -amilase em PCR com *KOD Hot Start DNA polymerase* em comparação com o padrão *Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas). Fragmento com aproximadamente 1.500 pb.

Os fragmentos obtidos através da amplificação do gene possivelmente correspondente à β -amilase, com aproximadamente 1.500 pb, foram purificados com *Nucleo Spin® Extract II Kit*.

Após a purificação, esses fragmentos e o vetor pPICZ α -A (102 ng/ μ L) foram digeridos com as enzimas de restrição NotI e KpnI, nessa ordem. Essas enzimas geram extremidades coesivas tanto no vetor quanto no fragmento, possibilitando a inserção desse fragmento no vetor através da ação da enzima T4 DNA ligase.

Foram feitas 5 reações contendo 0,2 μ g de fragmento por reação e 2 reações contendo 1 μ g de vetor por reação. Após essa etapa, as amostras foram separadas em gel de agarose 1% e as bandas foram novamente cortadas e purificadas com o *Nucleo Spin® Extract II Kit* para a realização da reação de ligação.

O fragmento BMY foi ligado ao vetor pPICZ α -A nas proporções molares 1:1 e 3:1, utilizando 1 unidade de T4 DNA ligase em 10 μ l de volume de reação por uma noite a 16 °C. A quantidade aplicada foi dependente de suas concentrações: 16,65 ng/ μ L e 59,38 ng/ μ L, respectivamente.

A proporção molar foi estimada levando em consideração a concentração do vetor (300 ng), o tamanho do fragmento (1,3 kb), o tamanho do vetor (3,6 kb) e a razão molar esperada (1:1 ou 3:1). Então, para a razão 1:1 foi adicionado 110 ng de inserto e para a razão 3:1 foi aplicado 320 ng de inserto na mistura de reação.

A reação de ligação foi utilizada para transformação química (choque térmico) de *E. coli* competentes (TOP 10 F') e os meios de cultura foram suplementados com antibiótico zeocina como agente de seleção em concentração final de 25 μ g/mL.

5.1.2. Análise dos transformantes positivos em *E. coli*

Em ambas as proporções molares testadas (1:1 e 3:1) houve crescimento, com maior quantidade na de 3:1. Os controles negativos (célula competente não transformada e células competentes com reação de ligação sem fragmento, apenas com T4 *ligase* e vetor digerido) e o positivo (célula competente com vetor fechado) apresentaram o resultado esperado: crescimento no controle positivo e ausência de crescimento nos controles negativos. O controle positivo indicou que as células estavam competentes podendo ser transformadas. Os negativos indicam que não ocorreu contaminação cruzada nem ligações inespecíficas, já que não houve transformação dessas células, ou seja, sem a presença do fragmento, não ocorre a inserção do vetor, que é quem proporciona a resistência à zeocina e permite o crescimento, fazendo a seleção. As células são transformadas com o vetor fechado, então, o vetor digerido não foi capaz disso, como mostrou o controle negativo, onde mesmo com a T4 *ligase*, este não se fecha, evitando um resultado falso positivo.

Nas transformações e nos plaqueamentos foi utilizado meio de cultura *low salt* pH 7,5 (meio LB), já que concentrações de sal acima de 90 mM e meios ácidos ou muito básicos não permitem a seleção dos transformantes por inativar o antibiótico.

Além da seleção em placa, também foi feito um *colony screening* por PCR com *Taq polimerase* e oligonucleotídeos específicos do gene inserido (BMYKpnl e BMYNotI), das colônias que cresceram na placa de proporção 3:1 para verificar quais colônias foram positivamente transformadas (Figura 6).

Figura 6. Gel de agarose 1% corado com SYBR® *Safe DNA Stain* (Invitrogen) para eletroforese com tampão TAE (tris-acetato/EDTA) 1 X, sob condições de corrida de 80 V e 400 mA por 30 minutos. *Colony screening* com oligonucleotídeos específicos para β -amilase em PCR (1 ao 17) com *Taq polimerase* de colônias de *E. coli* positivamente transformadas (amplificação destacada) em comparação com o (A) padrão *Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas) e (B) controle positivo – vetor fechado. Fragmento com aproximadamente 1.500 pb.

Foram observados fragmentos de DNA amplificados na altura esperada quando comparados com o padrão aplicado, relativos ao fragmento inserido. Das 17 colônias testadas, 8 foram positivas: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 15 e 16.

Foi feita a extração de DNA plasmidial através do *miniprep*, das colônias 5, 6, 7, 8 e 16, seguido da quantificação das construções para posterior sequenciamento.

5: 124,975 ng/μL

6: 90,442 ng/μL

7: 152,507 ng/μL

8: 109,232 ng/μL

16: 88,048 ng/μL

As colônias foram submetidas à PCR com os oligonucleotídeos 5'AOX (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') e 3'AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') para a confirmação das identidades das sequências presentes nas construções purificadas das colônias positivamente transformadas.

Através da análise dos eletroferogramas dessas 5 colônias, 3 ficaram com o sequenciamento correspondente ao gene inserido, sendo que a melhor delas, talvez por estar mais concentrada, foi a colônia 7, utilizada no decorrer das análises.

5.2. Clonagem e expressão em sistema eucarioto *P. pastoris*

O precipitado bacteriano foi utilizado para a extração de DNA plasmidial através do *midiprep*. As construções (10 μg) foram linearizados com a enzima de restrição PmeI (MssI) e purificados com o *Nucleo Spin® Extract II Kit*. A integração da construção linearizada ocorre por recombinação homóloga entre as regiões 5' e 3' do gene da AOX1 do genoma da levedura. O promotor que regula a produção da enzima AOX1 é utilizado para promover a expressão heteróloga neste sistema.

As células de *P. pastoris* foram transformadas por eletroporação resultando no crescimento de colônias em meio seletivo (100 μg/mL e 500 μg/mL de zeocina). Após três dias de incubação, as colônias crescidas foram submetidas à PCR com *Taq polimerase* utilizando os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX para a verificação das colônias positivamente transformadas (Figura 7), fragmento com 2.000 pb.

Figura 7. Gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen) para eletroforese com tampão TAE (tris-acetato/EDTA) 1 X, sob condições de corrida de 80 V e 400 mA por 30 minutos. *Colony screening* da placa I (esquerda) e placa II (direita) com oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX em PCR (1 a 8) com *Taq polimerase* de colônias de *Pichia pastoris* positivamente transformadas (amplificação destacada) em comparação com o (A) padrão *Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas). Fragmento com aproximadamente 2.000 pb. Seleção com 500 µg/mL de zeocina.

Das 16 colônias testadas (2 placas - 500 µg/mL), a confirmação da integração da construção ocorreu em 10 delas (Placa I: 1, 2, 3 e 8 / Placa II: 1, 2, 3, 6, 7 e 8).

Essas cepas recombinantes podem apresentar dois fenótipos diferentes. A levedura *P. pastoris* é metilotrófica, ou seja, é capaz de utilizar metanol como fonte de carbono. A velocidade do consumo de metanol pode variar de acordo com seu fenótipo, que pode ser Mut^S ou Mut⁺, que denominam uma metabolização lenta ou rápida do metanol, respectivamente. Além disso, trata-se de uma levedura que necessita da adição do aminoácido histidina no meio de cultura quando for His⁻, e quando for His⁺, a presença de histidina nesse meio se torna indiferente, já que é capaz de produzir esse aminoácido. Sua cepa GS115 tem o fenótipo (His⁻/Mut⁺) podendo adquirir um fenótipo diferente depois de transformada. Por isso, os transformantes positivos foram plaqueados juntamente com os controles GS115/HSA (His⁺/Mut^S) e GS115/pPICZ/lacZ (His⁻/Mut⁺) em placas espelho contendo metanol e dextrose para análise do seu fenótipo. As placas foram mantidas a 29 °C e o crescimento foi analisado em 24 e 48 horas (Figura 8).

Figura 8. Placas de MDH (2% dextrose) e MMH (0,5% metanol), ambas com histidina e incubadas a 29 °C com crescimento de 48 hrs. Controles GS115/HSA ($\text{His}^+/\text{Mut}^S$) e GS115/pPICZ/lacZ ($\text{His}^-/\text{Mut}^+$) em destaque e colônias positivamente transformadas (Placa I: 1, 2, 3 e 8 / Placa II: 1, 2, 3, 6, 7 e 8).

Os transformantes apresentaram um perfil de crescimento semelhante ao controle GS115/HSA, ou seja, maior crescimento em MDH do que em MMH, característico dos Mut^S (lenta metabolização do metanol). Sendo assim, o fenótipo dos transformantes positivos testados foi estipulado como $\text{His}^-/\text{Mut}^S$.

Um fenótipo pode ser favorável à produção da proteína em relação ao outro, já que a quantidade de metanol utilizada vai depender da metabolização realizada por cada fenótipo, afetando assim a expressão. A concentração final de metanol adicionada pode variar de 1 a 3% por dia de indução, sendo recomendado 1% para cepas com fenótipo Mut^S e até 3% para Mut^+ (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit K1740-01 - Invitrogen).

5.2.1. Crescimento de células transformadas e indução da expressão

Considerando que as colônias foram selecionadas em placas YPDS / zeocina, e que apenas as transformadas (confirmadas por PCR) são capazes de crescer neste meio, algumas colônias transformadas (com a construção pPICZαA:BMV e com o vetor vazio) foram selecionadas para o seu crescimento em meio de cultura BMGY e indução da expressão em meio de cultura BMMY. Após quatro dias de indução, o meio de cultura foi centrifugado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato

de amônio 80% para a precipitação das proteínas. As proteínas foram retomadas em tampão Hepes-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo cisteína 20 mM, EDTA 20 mM e benzamidina 1 mM e o extrato proteico foi dialisado contra o mesmo tampão.

Além do vetor vazio (GS115_pPICZαA:VV), as colônias transformadas de GS115 selecionadas para indução da expressão foram, a 3 da placa I (pPICZαA:BMV3I) e as 3 (pPICZαA:BMV3), 6 (pPICZαA:BMV6), 7 (pPICZαA:BMV7) e 8 (pPICZαA:BMV8) da placa II.

O vetor vazio foi utilizado como controle tanto com as análises feitas com as proteínas do sobrenadante, precipitadas com sulfato de amônio e dialisadas, quanto com as proteínas dos sedimentos celulares obtidas por lise celular. Porém, após a tentativa de purificação em coluna de níquel, não foi obtida nenhuma banda na altura esperada nem para as proteínas dos sedimentos celulares, nem para as do sobrenadante.

A seguir serão descritos somente os experimentos em que foram obtidos os melhores resultados com as proteínas precipitadas do sobrenadante, em diferentes induções realizadas ao longo do desenvolvimento do projeto, já que o fator alfa presente na construção sinaliza para o meio de cultura, sem acompanhar a proteína no momento em que ela é secretada para fora da célula.

5.3. Análise do perfil de proteínas e medida de atividade

Utilizando o extrato proteico obtido da indução da expressão (com 1,5% de metanol) dos transformantes BMV3I, BMV3, BMV6, BMV7, BMV8 e vetor vazio, foram feitos géis de SDS-PAGE corados com prata e Comassie (Figura 9).

Figura 9. Gel de SDS-PAGE, 8% acrilamida, 0,75 mm corado com prata (esquerda) e com Comassie (direita). As amostras foram aplicadas em ambos na mesma ordem: (1) padrão PageRuler™ Prestained Protein Ladder (170 kDa); (2) vetor vazio; (3) BMY3I; (4) BMY3; (5) BMY6; (6) BMY7 e (7) BMY8. Todas com aproximadamente 5 µg de proteína aplicada no poço do gel. Altura do padrão (5 µL) relativo ao tamanho da β-amilase de banana (~55 kDa) destacado com a seta.

Apesar do perfil de proteínas ser diferente quando comparado ao vetor vazio no gel de SDS-PAGE, não houve diferença entre as transformadas e o vetor vazio em relação as proteínas totais (quantificado por Bradford), sugerindo que a *Pichia* pode não ter sido induzida, talvez pela concentração de metanol utilizada. O teste de atividade com substrato específico não apresentou atividade específica da enzima. Além disso, as proteínas do sobrenadante também não foram identificadas nem por Western blot (gel com 10 µg de proteína), nem por Dot blot, ambos com anticorpo anti-histidina (anti-his) e revelados com substrato cromogênico.

Sendo assim, foi feita outra indução da expressão dos transformantes BMY6, BMY7, BMY8 e vetor vazio, na tentativa de obter a proteína de interesse (β-amilase). Algumas alterações foram feitas visando melhorias nas condições e nos parâmetros de indução desses transformantes como, por exemplo, aeração do meio e a concentração de metanol.

Os extratos proteicos obtidos da indução da expressão (com 2% de metanol) desses transformantes foram analisados quanto ao teor de proteína total e atividade com substrato específico. Os dados referentes à quantificação de proteína por Bradford estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantificação de proteína total dos extratos proteicos após a diálise.

Amostra	Volume total (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg/volume total)
Vetor vazio	2,5	0,298	0,745
BMV6	5	0,478	2,389
BMV7	5,5	0,421	2,318
BMV8	3	0,362	1,085

Essa diferença na produção de proteínas (vetor vazio com menor quantidade) indica que as células foram induzidas nessas condições de aeração, concentração de metanol (2%) e tempo de indução (quatro dias). Porém, no ensaio de atividade com substrato específico não foi encontrada atividade de β -amilase.

Para testar novamente a atividade desse extrato proteico, essas amostras foram concentradas em Amicon (membrana de 10 kDa). No gel nativo com 1% de amido como substrato, foi possível ver que existem bandas proteicas com atividade hidrolítica, mas por se tratar de um substrato inespecífico, nesse gel todas as hidrolases podem atuar, incluindo as produzidas pela própria *Pichia*, sem descartar a ação da β -amilase e suas isoformas. Devido ao fato de a afinidade dessas enzimas em relação ao amido serem diferentes, as bandas de cada uma delas apresentariam alturas distintas no gel. Porém, tanto no gel nativo, quanto em placa com substrato específico, não foi encontrada atividade relativa à β -amilase.

Essas quatro amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE, e as proteínas foram reveladas com Comassie. O *tag* de histidina presente na construção, contribui com 2,5 kDa no tamanho da proteína, na Figura 10 é possível observar bandas proteicas próximas a altura do padrão de 55 kDa, esperado para a β -amilase de banana.

Figura 10. Gel de SDS-PAGE, 8% acrilamida, 0,75 mm revelado com Comassie. Amostras aplicadas: marcador Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen - 200 kDa); vetor vazio; BMY7; BMY8 e BMY6. Todas com 20 µg de proteína aplicada no poço do gel. Altura do padrão relativo ao tamanho da β -amilase de banana (55 kDa) em destaque. Bandas proteicas recortadas, destacada com a seta.

Foi feito um western blot com anticorpo monoclonal anti-histidina e nenhuma marcação foi feita. As bandas proteicas reveladas pelo Comassie e destacadas com a seta na Figura 10 foram recortadas e sua identidade foi obtida por espectrometria de massas por terem se diferenciado das bandas apresentadas no vetor vazio. Essas bandas tiveram o corante removido, foram reduzidas e alquiladas, digeridas com tripsina e seus peptídeos foram extraídos do gel para o sobrenadante. Após o término desse protocolo, as amostras foram sequenciadas.

O resultado do sequenciamento não confirmou a identidade da banda relativa à β -amilase. Devido ao fato de não ter nenhum resultado confirmatório para essa proteína, não foi possível realizar as análises com os grânulos de amido de banana e a produção de anticorpos policlonais.

As tentativas de obtenção da proteína recombinante relativa à β -amilase de banana por expressão heteróloga, incluíram alterações de metodologia como pH, aeração, temperatura e concentração de metanol para indução da expressão.

Essas mudanças foram feitas até que a indução da expressão ocorresse em parâmetros ideais descritos pelo *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (K1740-01 – Invitrogen). Os meios de cultura escolhidos são tamponados, evitando a variação de pH que pode ser prejudicial a manutenção da atividade da proteína produzida, além disso, eles aumentam a estabilidade da proteína secretada (construções com fator α) prevenindo ou diminuindo sua proteólise. Agitação de 250-300 rpm com temperatura de 30 °C (sem exceder). A aeração do meio não é tão crítica para gerar biomassa, mas é o parâmetro mais importante para uma expressão eficiente durante a indução

com metanol. A confirmação do fenótipo também é importante para adequar, por exemplo, o tempo de indução e a quantidade de metanol utilizada, evitando que este seja tóxico para as células, variando o tempo e as concentrações entre Mut^S e Mut⁺, já que esse indutor também afeta a expressão de proteínas por *Pichia pastoris*, induzindo ou não as células.

As variações que esses parâmetros podem causar puderam ser sugeridas entre os dois experimentos descritos, com mudança na concentração de metanol e na aeração, onde houve a indução (diferença no teor de proteínas totais em relação ao vetor vazio) em comparação com o não induzido, mesmo teor de proteínas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um gene de β -amilase foi clonado em vetor de expressão pPICZ α A e alguns clones positivos de *Pichia pastoris* (cepa GS115) foram selecionados para a indução e produção da proteína heteróloga em modelo eucarioto. Foram feitos testes com alteração de algumas condições de indução como, a aeração, a concentração de metanol (1,5% e 2%) e o tempo de indução. Os melhores resultados foram obtidos em pH 6, com adição de metanol a concentração final de 2% por 4 dias com temperatura entre 29 e 30 °C, com aeração constante em frascos apropriados. Apesar de não ter sido obtido nenhum resultado positivo referente à proteína de interesse com atividade, a levedura foi induzida nas condições especificadas, apresentando alteração na quantidade de proteína total quando comparada ao controle (vetor vazio). Sendo assim, novos ensaios podem ser feitos com modificação nos parâmetros de indução em busca de condições ideais de produção, na tentativa de obter uma resposta positiva quanto à expressão dessa proteína, uma vez que os resultados encontrados após a alteração de algumas das condições de cultivo indicam que a expressão da proteína depende da combinação desses fatores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPENROTH, K. J.; KERESZTES, A.; KRZYSZTOFOWICZ, E.; GABRYS, H. Light-induced degradation of *Spirodela polyrhiza* studied by electron microscopy. *Plant Cell Physiology*. v. 52 (2), p. 384-391, 2011.
- ARÊAS, J. A. G.; LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: I – the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. *J. Food Biochemistry*. v. 5, p.19-37, 1981.
- ASTORINO FILHO, R. Caracterização funcional do gene maBMY que codifica para uma β -amilase endereçada aos plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, p. 97, 2008.
- BALDWIN, P. M. Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review. *Starch/Starke*, v. 53, p. 475-503, 2001.
- BASSINELLO, P. Z. Estudo e caracterização parcial de amilases de banana (*Musa acuminata* cv. Nanicão). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2002.
- BECK, E. e ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 40, p. 95-117, 1989.
- BENDAZOLLI, W. S.; NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F. M. Purificação parcial da sacarose sintase de banana em diferentes estágios de desenvolvimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 14, n. 1, p. 55-63, 1994.
- BIERHALS, J. D.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O. Activity, cloning, and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 7412 –7418, 2004.
- BÖER, E.; STEINBORN, G.; KUNZE, G.; GELLISSEN, G. Yeast expression platforms. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. v. 77, p. 513-523, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein dye-binding. *Anual Biochem*, v. 72, p. 248-54, 1976.

- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, p. 45-66, 2000.
- CORDENUNSI, B. R. Síntese de sacarose no amadurecimento da banana. Envolvimento da sacarose sintetase e sacarose fosfato sintetase. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1989.
- CORDENUNSI, B. R. e LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, p. 347-351, 1995.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio / Technology*, v. 11, p. 905-910, 1993.
- DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production (Review). *Journal of Molecular Recognition*, v. 18, p. 119-138, 2005.
- DAPENG, Z.; YONGZHANG, W. β -amylase in developing apple fruits: activities, amounts and subcellular localization. *SCIENCE IN CHINA (Series C)*, v. 45, n. 4, p. 429-440, 2002.
- DE PAULA, J. N. L. M. O uso potencial do inibidor de α -amilase de trigo 0.53 no controle de bruquídeos. Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia Molecular. Dissertação de Mestrado, 2006.
- DO CARMO, E. J. Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Programa de pós-graduação em genética, conservação e biologia evolutiva. Dissertação de mestrado, 2010.
- EDNER, C.; LI, J.; ALBRECHT, T.; MAHLOW, S.; HEJAZI, M.; HUSSAIN, H.; KAPLAN, F.; GUY, C.; SMITH, S. M.; STEUP, M.; RITTE, G. Glucan, Water Dikinase Activity Stimulates Breakdown of Starch Granules by Plastidial β -Amylases. *Plant Physiology*, v. 145, p. 17-28, 2007.

- FULTON, D. C.; STETTLER, M.; METTLER, T.; VAUGHAN, C. K.; LI, J.; FRANCISCO, P.; GIL, M.; REINHOLD, H.; EICKE, S.; MESSERLI, G.; DORKEN, G.; HALLIDAY, K.; SMITH, A. M.; SMITH, S. M.; ZEEMAN, S. β -AMYLASE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active β -Amylases in Arabidopsis Chloroplasts. *The Plant Cell*, v. 20, p. 1040-1058, 2008.
- GELLISSEN, G.; KUNZE, G.; GAILLARDIN, C.; CREGG, J. M.; BERARDI, E.; VEENHUIS, M.; KLEI I, V. D.; New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – a comparison. *FEMS Yeast Res*, v. 5, p. 1079-1096, 2005.
- GOMEZ, M. L. P. A.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. Cv. Solo): influência da radiação gama. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, v.19, n. 2, 1999.
- GONÇALVES, M. C. M. Clonagem e expressão do gene da glicoproteína s1 do vírus da bronquite infecciosa em *pichia pastoris*, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, dissertação de mestrado, 2009.
- HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers* v. 45, p. 253-267, 2001.
- KAPLAN, F.; GUY, C. RNA interference of Arabidopsis beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *The Plant Journal*, v. 44, p. 730-743, 2005.
- KOSSMANN, J.; LLOYD, J. Understanding and Influencing Starch Biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 19(3), p. 171-266, 2000.
- KÖTTING, O.; KOSSMANN, J.; ZEEMAN, S. C.; LLOYD, J. R. Regulation of Starch metabolism: the age of enlightenment?, *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, p. 321-329, 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

- LI, J. H.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL B. G. Starch from hull-less barley: Ultrastructure and Distribution of Granule-Bound Proteins. *Cereal Chemistry*, v. 80, p. 524-532, 2003.
- LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GAO, X. G.; HANGOVAN, K.; SUZARA, V. V.; DÜZGÜNES, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 142, p. 105-124, 2007.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R. e GÓMEZ-LIM, M. A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort Science*, v. 27, p. 440-442, 1992.
- LU, Y. e SHARKEY, T. D. The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment*, v. 29, p. 353-366, 2006.
- MAINARDI, J. A.; PURGATTO, E.; VIEIRA, A.; BASTOS, W. A.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of [$\alpha(1-4)$] glucan-phosphorylase during banana ripening. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 7294-7299, 2006.
- MANNERS, D. J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, v. 11, p. 87-112, 1989.
- MCCLEARY, B. V., CODD, R. Measurement of β -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. *Journal of Cereal Science*, v.9, p. 17-33, 1989.
- MYERS, A. M.; MORELL, M. K.; JAMES, M. G.; BALL, S. G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*, v.122, p. 989-997, 2000.
- MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; PURGATTO, E.; ROSSETO, M. R. M.; LAJOLO, F. M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta*, v. 216, p. 325-333, 2002.
- MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Composição em carboidratos de alguns cultivares de banana (*Musa ssp.*) durante o amadurecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, p. 94 -97, 1997.

- NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F.M. Partial purification and characterization of sucrose-phosphate synthase from preclimacteric and climacteric bananas. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 1103-1107, 1997.
- NASCIMENTO, J. R. O.; VIEIRA JR, A.; BASSINELLO, P. Z.; CORDENUNSI, B. R.; MAINARDI, J. A.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M. β -amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biology and Technology*, v. 40, p. 41-47, 2006.
- NASCIMENTO, J. R. O. Caracterização de enzimas e genes expressos durante o amadurecimento de frutos: uma abordagem para o acesso às bases moleculares da qualidade. Concurso de Livre-Docência, Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.
- PERONI, F. H. G. Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, p. 152, 2007.
- PERONI-OKITA, F. H. G.; SIMÃO, R. A.; CARDOSO, M. B.; SOARES, C. A.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. In vivo degradation of banana starch: structural characterization of the degradation process. *Carbohydrate Polymers*, v. 81, p. 291-299, 2010.
- PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, v. 212, p. 823-828, 2001.
- REIMANN, R.; RITTE, G.; STEUP, M.; APPENROTH, K. Association of α -amilase and the R1 protein with starch granules precedes the initiation of net starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Physiol. Plant.*, v.114, p.2-12, 2002.
- REIMANN, R., HIPPLER, M., MACHELETT, B., APPENROTH, K. J. Light induces phosphorylation of glucan water dikinase which precedes starch degradation in turions of the duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Physiologia Plantarum*, v. 135, p. 121-128, 2004.
- REIMANN, R.; ZIEGLER, P.; APPENROTH, K. J. The binding of α -amylase to starch plays a decisive role in the initiation of storage starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Physiologia Plantarum*, v. 129, p. 334-341, 2007.

- SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 711-715, 2000.
- SCHEIDIG, A.; FRÖHLICH, A.; SCHULSE, S.; LLOYD, J. R.; KOSSMANN, J. Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *The Plant Journal*, v. 30(5), p. 581-591, 2002.
- SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. EDS. *Biochemistry of Fruit ripening*. London: Chapman & Hall, p. 454, 1993.
- SIMÃO, R. A.; SILVA, A. P. F. B.; PERONI, F. H. G.; NASCIMENTO, J. R. O.; LOURO, R. P.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Mango Starch Degradation. I. A Microscopic View of the Granule during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 7410-7415, 2008.
- SMITH, A. M.; DENYER, K.; MARTIN, C. The Synthesis of Starch Granule. *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biology*, v. 48, p. 67-87, 1997.
- SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M. Starch degradation. *Annual Review Plant Biology*, v. 56, p. 73-98, 2005.
- SMITH, A. M. Starch in the Arabidopsis plant. *Starch/Stärke*, v. 64, p. 421-434, 2012.
- SOARES, C. A. Avaliação comparativa de características estruturais do amido e enzimas relacionadas à sua degradação em cultivares de banana com padrão distinto do modelo representado pela cultivar Nanicão. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, p. 109, 2009.
- SOARES, C. A.; PERONI-OKITA, F. H. G.; CARDOSO, M. B.; SHITAKUBO, R.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Plantain and Banana Starches: Granule Structural Characteristics Explain the Differences in Their Starch Degradation Patterns. *J. Agr. Food Chem*, v. 59, p. 6672–6681, 2011.
- STREB, S.; EICKE, S.; ZEEMAN, S. C. The Simultaneous Abolition of Three Starch Hydrolases Blocks Transient Starch Breakdown in Arabidopsis. *J. Biol. Chem*, v. 287, p. 41745-41756, 2012.
- TETLOW, I. J. Understanding Storage Starch Biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Canadian Journal of Botanical*, v.84, p. 1167- 1185, 2006.

- VIEIRA, D. P. Atividade e expressão gênica da [α (1-4)] glicosidase durante o amadurecimento da banana (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, p. 78, 2006.
- VIEIRA JUNIOR, A.; NASCIMENTO J. R. O.; LAJOLO F. M. Molecular cloning and characterization of an alpha-amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. J Agr Food Chem, v.54, p.8222-8228, 2006.
- YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G.; Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. Journal of Biotechnology, v. 127, p. 335-347, 2007.
- ZEEMAN, S. C.; DELATTE, T.; MESSERLI, G.; UMHANG, M.; STETTLER, M.; METTLER, T.; STREB S.; REINHOLD, H.; KOTTING, O. Review: Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms, Functional Plant Biology, v. 34, p. 465–473, 2007.
- ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A. M. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants, Annual Review of Plant Biology, v. 61, p. 209-234, 2010.
- ZIEGLER, P. Cereal Beta-Amylases. The Plant Journal, v. 29, p. 195-204, 1999.