

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA MAYARA KLOSTER

ESTUDOS DE EXPRESSÃO DA LIPASE DE METAGENÔMICA LipC12 EM *Pichia pastoris*

CURITIBA

2021

FERNANDA MAYARA KLOSTER

ESTUDOS DE EXPRESSÃO DA LIPASE DE METAGENÔMICA LipC12 EM *Pichia*  
*pastoris*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nadia Krieger  
Coorientador: Dr.<sup>a</sup> Janaina Marques de Almeida

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Kloster, Fernanda Mayara

Estudos de expressão da lipase de metagenômica LipC12 em *Pichia pastoris*. / Fernanda Mayara Kloster. – Curitiba, 2021.

87 p.: il.

Orientadora: Nadia Krieger.

Coorientadora: Janaina Marques de Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Lipase. 2. Metagenômica. 3. Expressão gênica. 4. *Pichia pastoris*. I. Título. II. Krieger, Nadia. III. Almeida, Janaina Marques de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (22. ed.) 572.757



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA MAYARA KLOSTER** intitulada: **ESTUDOS DE EXPRESSÃO DA LIPASE DE METAGENÔMICA LipC12 EM *Pichia pastoris***, sob orientação da Profa. Dra. NADIA KRIEGER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Outubro de 2021.

Assinatura Eletrônica

28/10/2021 10:44:39.0

NADIA KRIEGER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/10/2021 11:45:04.0

WANDERSON DUARTE DA ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/11/2021 21:19:05.0

VIVIANE PAULA MARTINI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 122824

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 122824

*Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Preciso agradecer primeiramente aos meus pais, Marta e Pedro, por não somente terem me dado a vida, mas também me ensinado a vivê-la. Sem vocês, eu não estaria onde estou hoje. Vocês foram mais que somente meus pais, foram meus mestres, me ensinando a como ser uma pessoa melhor a cada dia, foram meus amigos, sempre ouvindo minhas queixas, me aconselhando, e comemorando comigo a cada nova vitória. Vocês nunca disseram não para minhas escolhas (por mais absurdas e malucas que fossem), e sempre me apoiaram, sempre. Nenhuma palavra, nunca, jamais, será suficiente para expressar meu orgulho e minha gratidão. Eu amo vocês, vocês são o motivo pelo qual eu nunca desisti.

Agradeço ao meu irmão, Felipe, por sempre mandar fotos dos nossos gatos e trazer um pouco de paz e alegria em meio ao caos. Você é incrível, nunca duvide disso.

Ao amor da minha vida: Welton. Você esteve nessa jornada comigo desde a graduação, minha alma gêmea, que o Divino permitiu que nos encontrássemos nessa vida, e permanecêssemos juntos. Sempre me levantando quando eu caía, me incentivando quando eu queria desistir, e sempre aturando meus surtos, nunca deixou de fazer eu me sentir a mulher mais amada desse mundo. Meu parceiro, meu amigo, meu marido (não oficialmente, *ainda*), meu amor. Eu te amo tanto, que mal cabe no peito. Vencemos mais uma, juntos!

Agradeço a minha orientadora Nadia Krieger, pela oportunidade de trabalho e orientação.

Um agradecimento especial a minha coorientadora Dr.<sup>a</sup> Janaina Marques de Almeida, por toda orientação e paciência comigo (e os puxões de orelha), não somente no laboratório, mas também via troca de mensagens, sempre tão disposta a ajudar e ensinar. Você é demais.

Aos meus colegas de laboratório: Robson, sempre tão paciente e solícito a ajudar e ensinar; Gleydison, Leonardo e Gabriela, pela ajuda no laboratório e os altos papos e fofocas que tínhamos (hahaha); Gustavo, pelas bancadas e armário (salvou a nossa organização). Rafaela, que mesmo com pouco tempo no laboratório me ajudou nos experimentos. E aos demais colegas, que ajudaram de alguma forma (mesmo que fosse não me atrapalhando).

As minhas amigas, Lana e Bea, pelos conselhos, conversas, loucuras, e aturando meus surtos e desabafos. Obrigada por voltarem para minha vida. Amo vocês <3

Aos nossos queridos Dona Irene e Seu Ipólito, que nos acolheram como filhos nessa jornada, fazendo que nos sentíssemos em um lar, mesmo tão longe da nossa família de sangue. Vocês são nossos avós de coração. Jamais conseguirei agradecer pelo carinho que vocês tiveram comigo e com o Welton. Eu adoro vocês!

Ao programa de Bioquímica, pela oportunidade de trabalho.

À CNPq pelo apoio financeiro.

Quando o modelo de vida leva a um esgotamento, é fundamental questionar se vale a pena continuar no mesmo caminho.

- *Mario Sergio Cortella*

## RESUMO

O uso da levedura metilotrófica *Pichia pastoris* como hospedeiro heterólogo apresenta várias vantagens com relação a *Escherichia coli*, já que esta levedura é capaz de contornar problemas comumente encontrados na expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*, como a falta de modificações pós-traducionais, formação de corpos de inclusão e baixa expressão, no caso de algumas proteínas. Além disso, em *P. pastoris* há a possibilidade da secreção das proteínas, o que proporciona uma redução do número de etapas do processo de purificação da proteína. Visando aumentar os níveis de expressão e diminuir as etapas de purificação e recuperação da proteína, foram realizados estudos de clonagem e expressão da lipase LipC12, obtida por prospecção metagenômica, em *P. pastoris*. Na primeira etapa do trabalho, foi feita a clonagem do gene *lipC12* no vetor de expressão pGAPZ $\alpha$  através da clonagem em *E. coli*, obtendo-se assim o plasmídeo pLipC12N $\alpha$ . Na segunda etapa, foi realizada a clonagem e expressão deste plasmídeo em *P. pastoris*, seguidas da seleção de colônias com múltiplas cópias através do cultivo sequencial em concentrações crescentes de zeocina. Em seguida, foi feita a determinação qualitativa da atividade de hidrólise das colônias selecionadas em placas de Petri ágar-tributirina, sendo que o clone com maior halo de hidrólise foi selecionado para expressão de LipC12. Para a expressão em cultivos submersos, foram estudados o tempo de cultivo e a temperatura. Além desses dois parâmetros, foi feita a expressão de LipC12 em meio de cultivo tamponado para evitar valores básicos de pH, que, nos ensaios anteriores de expressão, variaram entre 9,0 e 11,0. A fração extracelular livre de células foi analisada quanto à atividade através da medida do diâmetro do halo de hidrólise em placas ágar-tributirina, sendo que o maior halo de hidrólise, de 2,4 cm, foi obtido em 48 h, a 30 °C. LipC12 presente no extrato extracelular foi então purificada e apresentou  $6,1 \pm 0,1$  U mg<sup>-1</sup> de atividade contra palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP). Em todos os ensaios, LipC12 expressa em *P. pastoris* apresentou baixa atividade quando comparada com LipC12 expressa em *E. coli*, indicando a necessidade da otimização da expressão da lipase.

Palavras-chave: Lipases; metagenômica, *Pichia pastoris*, expressão heteróloga.

## ABSTRACT

The use of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a heterologous host has several advantages over *Escherichia coli*, as this yeast can overcome problems commonly found in the expression of heterologous proteins in *E. coli*, such as the lack of post-translational modifications, formation inclusion bodies and low expression, in the case of some proteins. Furthermore, in *P. pastoris* expression occurs extracellularly, which provides a reduction in the number of steps in the protein purification process. Aiming to increase expression levels and decrease protein purification and recovery steps, cloning and expression studies of LipC12 lipase, obtained by metagenomic prospecting, were carried out in *P. pastoris*. In the first stage of the work, the lipC12 gene was cloned into the pGAPZ $\alpha$  expression vector through cloning in *E. coli*, thus obtaining the plasmid pLipC12N $\alpha$ . In the second step, the cloning and expression of this plasmid in *P. pastoris* was performed, followed by the selection of colonies with multiple copies through sequential cultivation in increasing concentrations of zeocin. Then, the qualitative determination of the hydrolysis activity of the selected colonies was made in tributyrin-agar Petri dishes and the clone with the largest hydrolysis halo was selected for expression of LipC12. For expression in submerged cultures, cultivation time and temperature were studied. In addition to these two parameters, LipC12 was expressed in a buffered culture medium to avoid basic pH values, which, in previous expression assays, ranged between 9.0 and 11.0. The cell-free extracellular fraction was analyzed for activity by measuring the diameter of the hydrolysis halo on tributyrin agar plates, with the largest hydrolysis halo, 2.4 cm, being obtained in 48 h at 30 °C. LipC12 present in the extracellular extract was then purified and showed  $6.1 \pm 0.1$  U mg<sup>-1</sup> activity against *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP). In all assays, LipC12 expressed in *P. pastoris* had a low activity when compared to LipC12 expressed in *E. coli*, indicating the need for to optimize the expression of the lipase.

Keywords: Lipases, metagenomic, *Pichia pastoris*, heterologous expression.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE E CONFORMAÇÃO EM FITAS DE LIPASE EM CONFORMAÇÃO $\alpha/\beta$ -HIDROLASE.....	17
FIGURA 2 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE LipC12.....	25
FIGURA 3 – EVENTOS DE INSERÇÃO DO PLASMÍDEO NO GENOMA DE <i>Pichia pastoris</i> .....	37
FIGURA 4 – SÍTIO DE CLIVAGEM PARA SECREÇÃO DA PROTEÍNA HOMÓLOGA DO VETOR pGAPZ $\alpha$ LINEAR.....	39
FIGURA 5 – ESQUEMA GERAL DA CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE CLONES DE LipC12 PARA EXPRESSÃO EM <i>Pichia pastoris</i> .....	41
FIGURA 6 – PLASMÍDEO pGAPZ $\alpha$ CONTENDO O INSERTO DE LipC12 LINEARIZADO PELA ENZIMA BspHI.....	47
FIGURA 7 – ESQUEMA DE CULTIVOS SEQUENCIAIS EM PLACAS DE PETRI COM ZEOCINA PARA SELEÇÃO DE CLONES COM MÚLTIPLAS CÓPIAS.....	49
FIGURA 8 – GEL DE AGAROSE DA PCR DAS CONSTRUÇÕES DO GENE DA LIPASE LipC12.....	54
FIGURA 9 – GEL DE AGAROSE PARA VISUALIZAÇÃO DE POSSÍVEIS PLASMÍDEOS pGAPZ $\alpha$ CONTENDO O GENE DE LipC12 COM His-tag NA EXTREMIDADE N-terminal.....	57
FIGURA 10 – GEL DE AGAROSE PARA A RESTRIÇÃO DE LIBERAÇÃO DO INSERTO DO PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$ .....	58
FIGURA 11 – CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DOS CLONES DE LipC12 DE CÓPIA ÚNICA.....	59
FIGURA 12 – CULTIVO DOS CLONES DE CÓPIA ÚNICA CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$ EM PLACA DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA.....	60
FIGURA 13 – SEGUNDO CULTIVO DE CLONES CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$ EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ZEOCINA PARA SELEÇÃO DE CLONES COM MÚLTIPLAS CÓPIAS.....	61
FIGURA 14 – CULTIVO DOS CLONES MÚLTIPLAS CÓPIAS CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$ EM PLACA DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA.....	62

FIGURA 15 – CULTIVO DOS CLONES MÚLTIPLAS CÓPIAS CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$ EM PLACA DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA.....	63
FIGURA 16 – CINÉTICA DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS DOS CLONES DE LipC12 CÓPIA ÚNICA E MÚLTIPLAS CÓPIAS.....	64
FIGURA 17 – ELETROFORESE SDS-PAGE DA FRAÇÃO EXTRACELULAR DOS DIFERENTES CLONES CONTENDO PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$ EXPRESSOS EM <i>Pichia pastoris</i> .....	65
FIGURA 18 – ELETROFORESE SDS-PAGE DA FRAÇÃO INTRACELULAR DA EXPRESSÃO CLONE <i>MULTI33</i> .....	66
FIGURA 19 – CINÉTICA DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS DO CLONE DE LipC12 <i>MULTI33</i> EXPRESSO A 24 °C.....	67
FIGURA 20 – FORMAÇÃO DE HALO DE HIDRÓLISE EM PLACAS DE PETRI CONTENDO ÁGAR-TRIBUTIRINA DA FRAÇÃO EXTRACELULAR DO CLONE <i>MULTI33</i> EXPRESSO A 24 °C E 30 °C.....	68
FIGURA 21 – ELETROFORESE SDS-PAGE DE LipC12 PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	70
FIGURA 22 – FORMAÇÃO DE HALO DE HIDRÓLISE EM PLACAS DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA DA FRAÇÃO EXTRACELULAR E FRAÇÃO PURIFICADA DO CLONE <i>MULTI33</i> EXPRESSO EM TAMPÃO FOSFATO.....	71

#### LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE

FIGURA 1 – PLACAS DE PETRI CONTENDO MEIO LA DAS TRANSFORMAÇÕES REALIZADAS EM <i>Escherichia coli</i> DAS CONSTRUÇÕES II E III.....	86
FIGURA 2 – ELETROFORESE SDS-PAGE DAS FRAÇÕES INTRACELULARES DO CONTROLE E CLONE <i>MULTI33</i> EXPRESSOS A 30 °C POR 48 H.....	86
FIGURA 3 – PLACAS DE PETRI COM MEIO LA DOS CONTROLES REALIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO I DE LipC12 PARA A CLONAGEM EM <i>Escherichia coli</i> .....	87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FAMÍLIA I DE LIPASES VERDADEIRAS.....	20
TABELA 2 – OUTRAS FAMÍLIAS DE LIPASES DE ACORDO COM HITCH E CLAVEL (2019).....	22
TABELA 3 – LIPASES DE ORIGEM BACTERIANA EXPRESSAS EM <i>Pichia pastoris</i> .....	31
TABELA 4 – CONSTRUÇÕES E SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>lipC12</i> .....	43
TABELA 5 – DESCRIÇÃO DAS REAÇÕES DE TRANSFORMAÇÃO FEITAS EM <i>Escherichia coli</i> .....	46

## LISTA DE SIGLAS

D.O.	– Densidade ótica
LA	– Meio de cultivo Luria Bertani ágar
LB	– Meio de cultivo Luria Bertani
<i>lipC12</i>	– Gene da lipase LipC12
pb	– pares de bases
<i>p</i> NPP	– palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
rpm	– Rotações por minuto
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
YEPD	– Meio de cultivo com extrato de levedura, peptona e dextrose
YPD	– Meio de cultivo com extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar
YPDS	– Meio de cultivo com extrato de levedura, peptona, dextrose e sorbitol

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	OBJETIVOS .....	15
1.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	LIPASES.....	16
2.1.1	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LIPASES.....	16
2.1.2	FAMÍLIAS DE LIPASES .....	18
2.2	A LIPASE LipC12 .....	22
2.3	SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE LIPASES.....	27
2.4	<i>Pichia pastoris</i> COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	29
2.4.1	VETOR DE EXPRESSÃO pGAPZ $\alpha$ .....	38
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
3.1	MATERIAIS .....	40
3.1.1	MEIOS DE CULTIVO.....	40
3.1.2	ENZIMAS E <i>PRIMERS</i> .....	40
3.1.3	VETOR, GENE E CEPAS.....	41
3.2	MÉTODOS .....	41
3.2.1	PROPAGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS pGAPZ $\alpha$ E pET28a(+) CONTENDO O GENE lipC12 .....	42
3.2.2	OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES .....	42
3.2.3	CLONAGEM NO VETOR pGAPZ $\alpha$ .....	44
3.2.4	PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>Pichia pastoris</i> .....	47
3.2.5	LINEARIZAÇÃO DO VETOR pGAPZ $\alpha$ CONTENDO O GENE lipC12 .....	47
3.2.6	TRANSFORMAÇÃO EM <i>Pichia pastoris</i> .....	48
3.2.7	EXPRESSÃO EM <i>Pichia pastoris</i> .....	50
3.2.8	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE .....	51

3.2.9	PURIFICAÇÃO DA LIPASE POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE .....	51
3.2.10	ELETROFORESE SDS-PAGE .....	51
3.2.11	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA .....	52
3.2.12	ENSAIOS DE ATIVIDADE .....	52
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
4.1	EFEITO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO NA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES .....	54
4.2	CLONAGEM EM <i>Escherichia coli</i> .....	55
4.3	CLONAGEM E EXPRESSÃO EM <i>Pichia pastoris</i> .....	58
4.4	EXPRESSÃO DOS CLONES COM CÓPIA ÚNICA EM <i>Pichia pastoris</i> .....	59
4.5	CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE CLONES COM MÚLTIPLAS CÓPIAS EM <i>Pichia pastoris</i> .....	61
4.6	EXPRESSÃO DOS CLONES COM MÚLTIPLAS CÓPIAS EM <i>Pichia pastoris</i> .....	62
4.7	ANÁLISE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR SDS-PAGE .....	64
4.8	EFEITO DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DE LipC12 A PARTIR DO CLONE <i>MULTI33</i> .....	67
4.9	PURIFICAÇÃO DO SOBRENADANTE DE EXPRESSÃO E DOSAGEM DE ATIVIDADE .....	69
4.10	EFEITO DO pH NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE LipC12 EXPRESSA A PARTIR DO CLONE <i>MULTI33</i> .....	70
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
6	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>73</b>
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>74</b>
8	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases que tem como principal função catalisar a hidrólise de triglicerídios (JAEGER et al., 1999). Muito utilizadas industrialmente, elas apresentam destaque por aceitarem uma variada gama de substratos e catalisarem diferentes tipos de reações, tanto em meio aquoso como em meios aquo-restritos. Portanto, a demanda industrial por lipases com atividade e estabilidade têm sido crescente.

A expressão de lipases em hospedeiros heterólogos é uma técnica aplicada para se obter lipases recombinantes com elevada atividade e maior pureza em relação às obtidas a partir de microrganismos selvagens. Nesta técnica, o hospedeiro para expressão pode influenciar diretamente nas características da lipase produzida, principalmente se necessitarem modificações pós-traducionais para o seu correto enovelamento.

Na expressão heteróloga de enzimas, geralmente é usada a bactéria *Escherichia coli*. No entanto, para a expressão de diversas lipases em *E. coli* já foram relatados problemas, como o baixo nível de expressão, a formação de corpos de inclusão, e a necessidade de diversas etapas de purificação para a recuperação das lipases, pois a enzima, na maioria dos casos, não é secretada. A expressão em *P. pastoris* é uma alternativa para superar estes problemas, uma vez que esta levedura pode realizar modificações pós-traducionais por ser um eucarioto e apresentar um sistema completo de endomembranas, além de expressar a proteína recombinante extracelularmente e em grande quantidade. Em *P. pastoris* também é possível realizar a inserção de várias cópias do plasmídeo de clonagem para permitir a superexpressão da lipase, a coexpressão de chaperonas de enovelamento e a coexpressão com vetores de diferentes promotores.

Devido a essas vantagens, neste trabalho foi realizada a clonagem da lipase LipC12 em *P. pastoris* utilizando o vetor de expressão pGAPZ $\alpha$ , visando a secreção da lipase diretamente no meio de cultivo, para posterior comparação dos resultados obtidos com os de trabalhos anteriores da expressão da LipC12 em *E. coli*.

## 1.1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar a expressão da lipase LipC12 em *Pichia pastoris*.

### 1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar o gene *lipc12* no vetor de expressão pGAPZ $\alpha$  para expressar a lipase LipC12 extracelularmente em *P. pastoris*;
- Estudar os parâmetros para a otimização da expressão de LipC12 em *P. pastoris*, avaliando-se os efeitos da temperatura, pH e do tempo de incubação;
- Purificar e caracterizar a lipase LipC12 expressa em *P. pastoris*;
- Comparar os estudos de expressão e a atividade de hidrólise de LipC12 expressa em *P. pastoris* com os resultados obtidos para LipC12 expressa em *Escherichia coli*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LIPASES

A maior parte das enzimas utilizadas industrialmente (mais de 75%) são hidrolases (PRAKASH et al., 2013). Dentre essas enzimas, as lipases (EC 3.1.1.3) representam cerca de um quinto do mercado global de enzimas, estando em terceiro lugar no *ranking* de enzimas mais comercializadas, atrás somente das proteases e carboidrases (BORRELLI e TRONO, 2015). Devido às suas propriedades únicas, as lipases apresentam aplicações em vários setores industriais, como na produção de biodiesel e resolução de racematos para produção de fármacos quirais, na biorremediação e agricultura, na indústria de cosméticos, têxtil, papel e alimentos (ANDUALEMA e GESSESSE, 2012). As lipases atuam em ligações éster, catalisando reações de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio aquo-restritos (JAEGER et al., 1999; GUPTA et al., 2004).

Dentre as lipases preferíveis para o uso industrial, as de origem microbiana têm se destacado por serem mais úteis que aquelas de origem animal e vegetal, devido à sua versatilidade, maior rendimento, e ao fato de poderem ser produzidas regularmente devido à ausência de flutuações sazonais (HASAN et al., 2006). Além disso, as estruturas tridimensionais de diversas lipases microbianas já foram reveladas por cristalografia, como a da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NARDINI et al., 2000), *Bacillus subtilis* (POUDEROYEN et al., 2001) e *Burkholderia glumae* (PAUWELS et al., 2006), facilitando o estudo de novas lipases e o desenho de estratégias para o melhoramento de suas propriedades (JAEGER e EGGERT, 2002).

#### 2.1.1 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LIPASES

As lipases fazem parte da família das  $\alpha/\beta$ -hidrolases, em que a estrutura consiste em um núcleo de folhas- $\beta$  envolto por  $\alpha$ -hélices, sendo que as folhas  $\beta_3$  a  $\beta_8$  são conectadas pelas  $\alpha$ -hélices (FIGURA 1). As  $\alpha/\beta$ -hidrolases apresentam uma tríade catalítica composta por três grupos funcionais, sendo eles uma serina (Ser) nucleofílica, um resíduo de histidina (His) e um resíduo de aminoácido com caráter ácido, que pode ser um resíduo de asparagina (Asp) ou glutamina (Glu). Uma característica interessante das lipases é que a serina catalítica faz parte de um

pentapeptídeo altamente conservado, composto por GluXSerXGlu, em que o X representa qualquer outro aminoácido (JAEGER et al., 1999; POUDEROYEN et al., 2001; BAUER et al., 2020). A serina catalítica se projeta, formando uma estrutura conhecida como *cotovelo nucleofílico*, que parece ser um pré-requisito para a atividade enzimática (OLLIS et al., 1992).

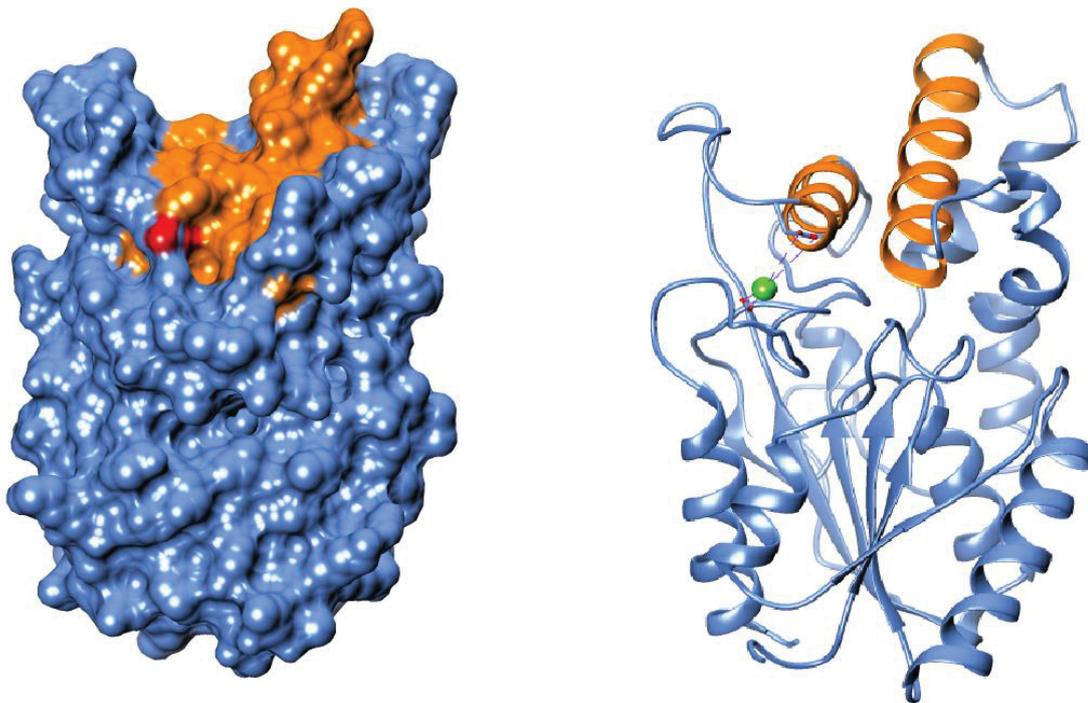


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE E CONFORMAÇÃO EM FITAS DE LIPASE EM CONFORMAÇÃO  $\alpha/\beta$ -HIDROLASE

LEGENDA: À esquerda está o modelo com representação de superfície e à direita o modelo em fitas em conformação  $\alpha/\beta$ -hidrolase. Em laranja está representada a *lid*. O sítio de  $\text{Ca}^{2+}$  está representado com uma esfera verde. Modelo gerado utilizando o programa CHIMERA 1.15 (PETTERSEN et al., 2004) (PDB: 6CL4).

FONTE: A Autora (2021).

Em torno de 40% das proteínas conhecidas, incluindo muitas lipases, apresentam a necessidade de cofatores metálicos (LOVELL et al., 2003), que são responsáveis por diferentes funções, como a manutenção da estrutura tridimensional até a catálise enzimática (HARDING, 2004). Lipases geralmente apresentam um sítio de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , cuja presença pode desempenhar um papel importante na sua termoestabilidade (PAPALEO e INVERNIZZI, 2011).

As lipases podem apresentar estruturas adicionais, como a *lid*, que é um domínio móvel que cobre o sítio ativo quando a lipase está em sua conformação fechada (BAUER et al., 2020). Em presença de substratos hidrofóbicos, a *lid* se move, expondo o sítio ativo para que fique acessível ao substrato, sendo este fenômeno denominado *ativação interfacial*. No entanto, nem todas as lipases apresentam *lid* ou sofrem ativação interfacial (JAEGER et al., 1999; POUDEROYEN et al., 2001; BAUER et al., 2020). As lipases podem ser classificadas com base em seu domínio *lid* em três grupos: as lipases sem *lid*; lipases com *lid* compostas por um *loop* ou uma  $\alpha$ -hélice, que são as mono e diacilglicerol lipases; e lipases com a *lid* composta por duas ou mais  $\alpha$ -hélices, sendo estas as que possuem maior termoestabilidade (KHAN et al., 2017).

### 2.1.2 FAMÍLIAS DE LIPASES BACTERIANAS

Apesar de as lipases apresentarem estruturas tridimensionais semelhantes entre si, possuem baixa homologia de sequência (JAEGER et al., 1999), e por isso, são classificadas em diversas famílias e subfamílias. Inicialmente, lipases foram classificadas em 8 famílias e 6 subfamílias com base em sua homologia de sequência de aminoácidos e características estruturais (ARPIGNY e JAEGER, 1999). Posteriormente, com a identificação de mais enzimas lipolíticas que não se encaixavam nessa classificação, mais famílias e subfamílias foram acrescentadas, sendo que a mais atual conta com 35 famílias, onde a família I é dividida em 11 subfamílias (HITCH e CLAVEL, 2019).

A nova classificação abrange, além de lipases, esterases, carboxilesterases, aciltransferases, PHA-depolimerases, carbamato hidrolases, fosfolipases e homoserina transacetilases (HITCH e CLAVEL, 2019). Estas enzimas foram classificadas de acordo com a sua sequência de aminoácidos, sendo que as enzimas já classificadas foram reclassificadas de acordo com sua similaridade. Foram então consideradas da mesma família aquelas que possuem mais que 60% de identidade entre si. As enzimas pertencentes à mesma família também foram analisadas de acordo com suas propriedades bioquímicas e comparadas para identificar a consistência das informações.

A família I é composta por lipases verdadeiras (TABELA 1), que hidrolisam triglicerídeos de cadeia longa, sendo a família de lipases a mais abundante. As lipases da subfamília I.1 e I.2 foram classificadas pela sua semelhança com as lipases de *Pseudomonas aeruginosa* (PaLip) e *Burkholderia glumae*, respectivamente, sendo que as lipases da subfamília I.2 possuem duas fitas- $\beta$  antiparalelas em sua superfície, que lhes confere maior massa molecular quando comparada com as lipases da família I.1 (ARPIGNY e JAEGER, 1999; KOVACIC et al., 2019). Diversas lipases da subfamília I.1 e I.2 apresentam resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto e a maioria apresenta a necessidade de uma proteína auxiliar para o seu correto enovelamento, denominada *Lif* (*lipase specific foldase*) (JAEGER et al., 1994). No organismo original, o gene da *Lif* se encontra no mesmo operon do gene da lipase, sendo que depois de expressa a *Lif* fica ancorada na membrana interna da célula e participa do sistema de secreção tipo II, ou Sec II, encontrado em algumas famílias de bactérias. Nesse sistema, a lipase é produzida no interior da célula com uma sequência N-terminal (peptídeo sinal) e então passa pela membrana interna da célula, translocando-se para o periplasma. Após a passagem pela membrana interna, a lipase perde o seu peptídeo sinal e entra em contato com sua *Lif* cognata, que realiza o enovelamento correto da lipase em sua forma ativa (ROSENAU e JAEGER, 2000; ROSENAU et al., 2004; GREEN e MECSAS, 2016).

A subfamília I.8 (KOVACIC et al., 2019) é composta por lipases que têm semelhança com lipases putativas de cepas psicrófilas marinhas, sendo que as lipases dessa subfamília apresentam no lugar do pentapeptídeo conservado (GX SXG) o motivo LGG(F/L/Y)STG em torno da serina catalítica. Já as subfamílias I.9, I.10 e I.11 são compostas por uma única lipase cada, todas isoladas por prospecção metagenômica, pois não apresentaram mais de 60% de similaridade com nenhuma outra lipase já classificada (HITCH e CLAVEL, 2019).

Depois da atualização que reclassificou as famílias de enzimas lipolíticas, apenas algumas das famílias foram consideradas de lipases (TABELA 2) de acordo com suas características bioquímicas (KOVACIC et al., 2019; HITCH e CLAVEL, 2019).

TABELA 1 – FAMÍLIA I DE LIPASES VERDADEIRAS.

(CONTINUA)

SUB FAMÍLIA	ENZIMA/ORGANISMO DE ORIGEM	MASSA MOLECULAR	PENTAPEPTÍDEO CONSERVADO	CARACTERÍSTICAS GERAIS
I.1	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. mendocina</i> ; <i>P. fluorescens</i> C9; <i>P. fragi</i> ; <i>P. wisconsinensis</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> ; <i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>V. harveyi</i> ; <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>Rhodoferrax ferrireducens</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Dehalococcoides</i> sp. VS	30~32 kDa	GXSXG	Secretadas pelo mecanismo tipo II; diversas lipases precisam de <i>Lif</i> ; sítio de Ca <sup>2+</sup> e presença de <i>lid</i> ;
I.2	<i>B. glumae</i> ; <i>B. cepacia</i> ; <i>B. cenocepacia</i> ; <i>B. multivorans</i> ; <i>B. thailandensis</i> ; <i>Chromobacterium viscosum</i> ; <i>P. luteola</i> ; <i>P. KWI-56</i>	33 kDa	GXSXG	Secretadas pelo mecanismo tipo II; diversas lipases precisam <i>Lif</i> ; sítio de Ca <sup>2+</sup> e presença de <i>lid</i> ; 2 fitas-β antiparalelas na superfície
I.3	<i>P. fluorescens</i> SIK W1; <i>P. fluorescens</i> PfO1; <i>P. fluorescens</i> ; <i>Pseudomonas</i> sp. 7323; <i>P. entomophila</i> ; <i>Serratia proteamaculans</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>metagenômica</i> (A7J993); <i>Psychrobacter</i> sp. PR-Wf-1; <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	50~65 kDa	GXSXG	Secretadas pelo mecanismo tipo I; possuem peptídeo sinal na região C-terminal que faz a mediação do transporte da enzima para o meio extracelular; sítio de Ca <sup>2+</sup>
I.4	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>Bacillus</i> sp; NK13; <i>B. megaterium</i> ; <i>B. clausii</i>	20 kDa	AXSXG	São as menores lipases classificadas; sem <i>lid</i> e sítio de Ca <sup>2+</sup> ; não apresentam resíduos de cisteína
I.5	<i>B. stearothermophilus</i> ; <i>B. thermocatenulatus</i> ; <i>Geobacillus thermoleovorans</i> ; <i>G. zalihae</i> ; <i>Bacillus</i> sp. L2; <i>Geobacillus</i> sp. SF1; <i>G. kaustophilus</i> ; <i>G. thermocatenulatus</i> ; <i>G. stearothermophilus</i>	46 kDa	AXSXG	Apresentam apenas uma pequena sequência similar de 15% com as lipases da família I.4; sítios de ligação de zinco (termoestabilidade)
I.6	<i>Staphylococcus hyicus</i> ; <i>S. simulans</i> ; <i>S. xylosus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. haemolyticus</i> ; <i>S. warneri</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Propionibacterium acnes</i> ; <i>Streptomyces cinnamomeus</i>	46 kDa	GXSXG	São expressas como pré-pró-proteínas (75 kDa); apresentam N-terminal longo (em torno de 200 aminoácidos);
I.7	<i>Streptomyces cinnamomeus</i> ; <i>Propionibacterium acnes</i> ; <i>Janibacter</i> sp. HTCC2649	29,2 kDa 36,4 kDa 34,1 kDa	GXSXG	50% de semelhança com as lipases da subfamília I.2;

TABELA 1 – FAMÍLIA I DE LIPASES VERDADEIRAS.

(CONCLUSÃO)

SUB FAMÍLIA	ENZIMA/ORGANISMO DE ORIGEM	MASSA MOLECULAR	PENTAPEPTÍDEO CONSERVADO	CARACTERÍSTICAS GERAIS
I.8	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> ; <i>Hahella chejuensis</i> ; <i>Colwellia psychrerythraea</i> ; <i>P. tunicata</i>	51 kDa	LGG(F/L/Y)STG	Associadas à membrana externa; semelhança com lipases putativas de cepas psicrófilas marinhas;
I.9	LipG (metagenômica)	-	GHSLG	Lipase de origem bacteriana, mas não possui similaridade com nenhuma outra lipase;
I.10	RlipE1 (metagenômica)	-	GLSMG	Lipase de origem bacteriana, mas não possui similaridade com nenhuma outra lipase;
I.11	MPLaG (metagenômica)	~61 kDa	GHSLG	Atividade contra triacilgliceróis de cadeia longa; considerada uma fosfolipase

FONTE: A Autora (2021)

TABELA 2 – OUTRAS FAMÍLIAS DE LIPASES DE ACORDO COM HITCH E CLAVEL (2019).

FAMÍLIA	ENZIMA/ORGANISMO DE ORIGEM	MASSA MOLECULAR	CLASSIFICADA POR
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i> ; <i>Streptomyces albus</i> , <i>Moraxella</i> sp.; <i>Kinecoccus radiotolerans</i> ; <i>Clavinacter michiganensis</i> ; <i>Thermobifida fusca</i> .	32~35 kDa	Arpigny e Jaeger (1999)
XII	LipEH166 (metagenômica)	42 kDa	Hitch e Clavel (2019)
XVI	LipSM54; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Xanthomonas campestris</i> ; <i>Saccharothrix</i> <i>espanaensis</i>	55 kDa	Kovacic et al. (2019)
XVII	LipJ2 ( <i>Janibacter</i> sp.)	44 kDa	Kovacic et al. (2019)
XIX	LipSm ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Psi-1)	40,7 kDa	Kovacic et al. (2019)
XXI	Enzima FnL ( <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17- B1)	~30 kDa	Hitch e Clavel (2019)
XXIII	LipA (metagenômica)	32 kDa	Hitch e Clavel (2019)
XXV	EM3L4 (metagenômica)	~37 kDa	Hitch e Clavel (2019)
XXVIII	LipR ( <i>Rhodococcus</i> sp. CR-53)	43 kDa	Hitch e Clavel (2019)
XXIX	EstGX1 (metagenômica)	22,4 kDa	Hitch e Clavel (2019)
XXXII	Est9x (metagenômica)	32 kDa	Hitch e Clavel (2019)

FONTE: A Autora (2021).

## 2.2 A LIPASE LipC12

Ao longo dos anos, vem ocorrendo uma crescente busca por novas lipases que possam competir com as comerciais. Várias lipases têm sido obtidas através do isolamento de microrganismos (ALMEIDA et al., 2020). Porém, devido a inúmeros fatores que podem impedir e atrapalhar o cultivo desses microrganismos – como o pH, nutrientes e interdependência de espécies – apenas cerca de 1% das espécies bacterianas encontradas em amostras de solo podem ser cultivadas em laboratório (TORSVIK et al., 1996; VARTOUKIAN et al., 2010).

Uma forma mais eficaz de explorar a microbiota do solo em busca de enzimas promissoras é através da metagenômica. Essa técnica consiste na obtenção de amostras do ambiente, seguida pelo isolamento do DNA metagenômico para a clonagem, e expressão em hospedeiro bacteriano. Após a construção de uma

biblioteca metagenômica, os clones passam por um *screening* funcional ou sequencial para a seleção e isolamento do gene de interesse (HANDELSMAN et al., 1998). Diversos ambientes já tiveram seu conteúdo metagenômico estudado, desde amostras do solo, ambientes aquáticos, até microbiomas associados a eucariotos (FERRER et al., 2015).

Dentre os diversos ambientes analisados, as enzimas com atividade lipolítica são as mais abundantes. Até 2015, cerca de 68% dos 6038 clones distribuídos em 256 bibliotecas de metagenômica eram de lipases e esterases (FERRER et al., 2015). Em 2017, Berini e colaboradores observaram que 48% das enzimas de 338 bibliotecas de metagenômica – do período de 2014 até 2017 – eram lipases e esterases (BERINI et al., 2017). Mais recentemente, Almeida et al. (2020) encontraram mais 14 lipases e 3 esterases de metagenômica em trabalhos publicados no período de 2017 até 2019.

Utilizando a abordagem metagenômica, Glogauer et al. (2011) produziram uma biblioteca metagenômica a partir de solo contaminado com gordura animal (SCGA), disponível no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, que possui 500.000 clones. A partir dessa biblioteca metagenômica foi realizado um *screening* funcional para seleção de lipases. A estratégia utilizada envolveu o uso placas de Petri contendo o meio LA (Luria Bertani ágar) suplementado com tributirina, tricaprilina e trioleína, para a seleção de clones com atividade pelo halo de hidrólise. Primeiro, foram selecionados 2661 clones que tiveram atividade contra tributirina. Dentre eles, 127 clones foram selecionados em placas contendo 1% (v/v) de tricaprilina. Por fim, para selecionar lipases verdadeiras, os clones foram selecionados em placas com 1% (v/v) de trioleína, resultando em 32 clones com atividade, dentre os quais o gene *lipC12* foi selecionado como aquele que possuía o maior halo de hidrólise (GLOGAUER et al., 2011).

O gene *lipC12* foi clonado no vetor pET-28a(+) e expresso com a His-tag na região N-terminal em *E. coli* BL21(DE3), apresentando massa molecular de 33,4 kDa. A análise de sequência mostrou que LipC12 pertence à família I.1 (GLOGAUER et al., 2011). Originalmente, esta lipase apresentou 72% de similaridade com a lipase de *Yersinia enterocolitica* subsp. *polarctica* Y11 e *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081, mas, em uma pesquisa mais recente na plataforma NCBI utilizando a ferramenta BLAST (04/09/2021), LipC12 apresentou similaridade de mais de 90% com lipases de *Cedecea davisae* (98%), *C. neteri* (92%) e *C. lapagei* (91%).

Além disso, LipC12 não apresentou o gene da *Lif* em seu operon, indicando ser uma lipase independente de foldase.

LipC12 foi cristalizada e teve sua estrutura tridimensional elucidada. As lipases com maior identidade com LipC12 foram utilizadas para realizar a superposição e alinhamentos estruturais: *Proteus mirabilis* (4GW3) com 54% de identidade, *Pseudomonas aeruginosa* (1EX9) com 47% de identidade, *Burkholderia glumae* (2ES4) e *Burkholderia cepacia* (1YS1) com 41% de identidade. LipC12 apresenta seu núcleo (resíduos 4-108 e 163-293) em típica conformação  $\alpha/\beta$ -hidrolase (FIGURA 2). Os resíduos de Asp238, His260 e Ser83 formam a tríade catalítica, na qual a serina faz parte do pentapeptídeo conservado. Os resíduos Asp217 e Asp262 formam o sítio de ligação ao cálcio, conservado nas lipases das subfamílias I.1 e I.2 (GLOGAUER et al., 2011; MARTINI et al., 2019). Além disso, LipC12 possui uma *lid* (resíduos 109-162) composta por quatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  e  $\alpha_8$ ) e apresenta somente um resíduo de cisteína (Cys89), portanto não faz ponte dissulfeto (MARTINI et al., 2019).

No mesmo trabalho de isolamento de LipC12, Glogauer et al (2011) fizeram caracterização de LipC12 livre em meio aquoso. LipC12 revelou alta atividade contra tributirina (2187 U mg<sup>-1</sup>), gordura de porco (1767 U mg<sup>-1</sup>) e azeite de oliva (1722 U mg<sup>-1</sup>) e apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH (6,0–11,0) com atividade residual de 90% após 24 h de incubação, com atividade máxima a 30 °C em incubação por 1 h, e não teve sua estabilidade afetada até 50 °C.

Em estudos de imobilização realizados por Madalozzo et al. (2015), LipC12 foi imobilizada por adsorção hidrofóbica no suporte Accurel MP-1000 e por ligação covalente na resina acrílica comercial Immobead 150 e aplicada na síntese de oleato de etila em *n*-hexano. A imobilização de LipC12 foi melhor em Immobead 150 do que em Accurel MP-1000, com 95% de conversão do ácido oleico em 4 h. O uso do extrato bruto de LipC12 em vez da enzima purificada para imobilização, mostrou um resultado melhor de conversão quando comparado com a enzima purificada, com conversão de 98% em apenas 1 h, além de manter 96% de conversão quando reutilizada por dez vezes. Nas mesmas condições, o preparado imobilizado com a enzima purificada perdeu atividade ao longo dos ciclos (74% de conversão no décimo ciclo). Segundo Madalozzo et al. (2015), a possibilidade de imobilização da lipase a partir do extrato bruto, além de evitar custos com etapas adicionais de purificação, também diminui as perdas de atividade que podem ocorrer durante a purificação da enzima.

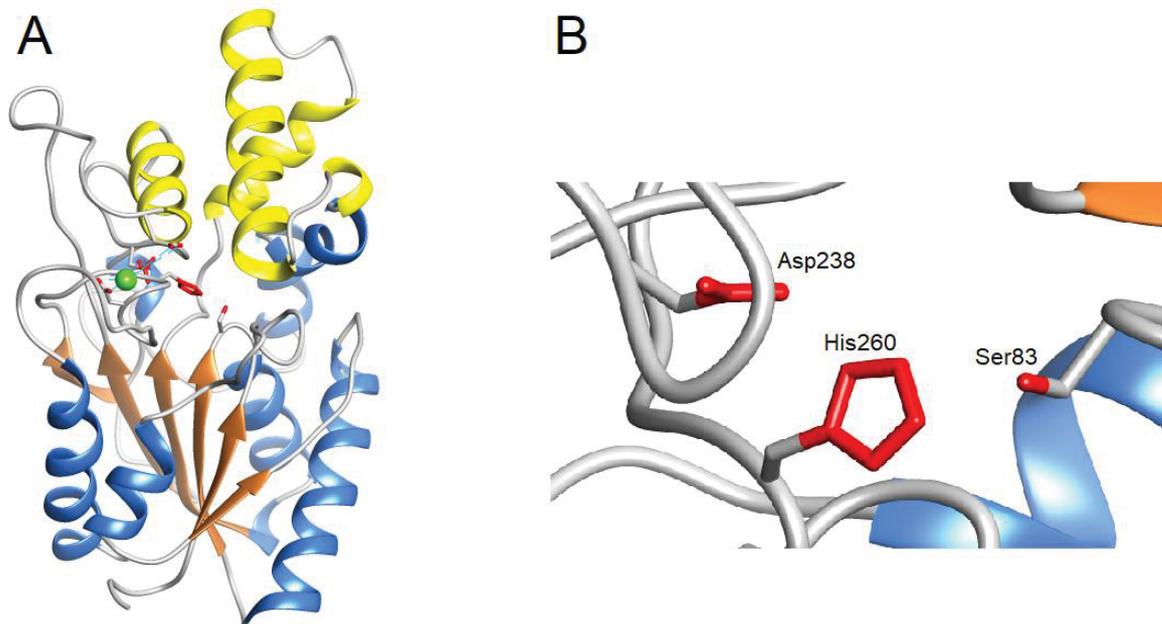


FIGURA 2 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE LipC12

LEGENDA: A) Em amarelo está a *lid*, o sítio de Ca<sup>2+</sup> está representado com uma esfera verde. B) Os resíduos da tríade catalítica estão representados em vermelho (Asp238, His260 e Ser83). Modelo gerado utilizando o programa CHIMERA 1.15 (PETTERSEN et al., 2004).

FONTE: A Autora (2021).

Em trabalho posterior, Madalozzo et al (2016) mostraram que o mesmo preparado imobilizado de LipC12 em Immobead 150 pode ser utilizado com sucesso na síntese de ésteres de aroma e na produção de lipídios estruturados, principalmente devido ao fato de LipC12 ser *sn*-1,3-regiosseletiva. Na síntese de ésteres de aroma, LipC12 apresentou melhor desempenho na síntese de butil-caprilato, com conversão de 62% em 6 h, e na síntese do propil-caprilato, com 72% de conversão em 72 h. Além disso, a lipase imobilizada produziu um triglicerídeo estruturado do tipo MLM (glicerol esterificado nas posições 1 e 3 com ácidos graxos de cadeia média e na posição 2 com ácido graxo de cadeia longa) catalisando a acidólise do azeite de oliva com ácido caprílico, contendo 23% de ácido caprílico após 72 h, nas posições *sn*-1 e *sn*-3 (MADALOZZO et al., 2016).

Neste ponto dos trabalhos com LipC12, havia indícios que a cauda His poderia influenciar na imobilização e nas propriedades da enzima imobilizada. Devido a isso, Almeida et al. (2018) analisaram a influência da His-tag na atividade de hidrólise e de esterificação de LipC12 livre e imobilizada em Immobead 150. Os autores relataram

que a presença da His-tag diminui a atividade de hidrólise, tanto da forma livre quanto da imobilizada da LipC12, quando testada em azeite de oliva. A atividade da enzima livre, determinada no extrato bruto, foi de  $1938 \pm 82 \text{ U mg}^{-1}$  sem a His-tag, e com a His-tag,  $1469 \pm 63 \text{ U mg}^{-1}$ . Após a purificação, a enzima apresentou atividade de  $2555 \pm 17 \text{ U mg}^{-1}$  com a His-tag, que aumentou para  $4590 \pm 101 \text{ U mg}^{-1}$  após a remoção da His-tag. Quando imobilizada, a enzima sem His-tag apresentou atividade  $421 \pm 24 \text{ U g}^{-1}$  de suporte, enquanto a enzima imobilizada com a His-tag teve atividade de  $303 \pm 21 \text{ U mg}^{-1}$  no suporte. No entanto, na presença de solventes polares, a atividade de hidrólise e estabilidade de LipC12 foram favorecidas pela presença da His-tag, provavelmente porque a His-tag, que é altamente flexível e pode interferir nos movimentos da *lid* quando se encontra em meio aquoso, perdeu esta flexibilidade. Já a presença de His-tag melhorou a atividade de esterificação da enzima. Esses estudos mostram que, dependendo do meio reacional e da reação, a remoção da His-tag pode ser vantajosa (ALMEIDA et al., 2018).

A estabilidade, atividade e regiosseletividade de LipC12 foram testadas por Alnoch et al. (2016) com a enzima imobilizada em suportes alquil-aldeído produzidos a partir da agarose como base matriz. A superfície do suporte, rica em grupos hidroxila, foi tratada com epícloridrina para formação de grupos epóxi e grupo diol. Em seguida, diferentes preparados enzimáticos foram produzidos (*C8-aldeído/LipC12*, *C12-aldeído/LipC12* e *C18-aldeído/LipC12*), tratando-se os grupos epóxi com agentes hidrofóbicos bifuncionais (octano-, dodecano- e octadecano-tiol) de maneira a ter suportes contendo grupos com diferentes graus de hidrofobicidade. Nestes suportes, primeiro ocorre a imobilização da enzima por adsorção hidrofóbica que favorece sua forma aberta, depois, os grupos aldeído reagem com as cadeias laterais de lisina da enzima, fixando assim a lipase no suporte por ligação covalente. A atividade foi determinada utilizando o *p*-nitrofenil proprionato (*p*NPP) como substrato. O preparado enzimático *C12-aldeído/LipC12* demonstrou ser o melhor, com atividade 3,5 vezes maior que os demais, sendo 5000 vezes mais estável que a enzima livre. Além disso, a imobilização tornou LipC12 estável em altas temperaturas, com atividade ótima a 70 °C. A regiosseletividade do catalisador foi testada na hidrólise do tri-*O*-acetil-D-glucal, obtendo-se 81% de conversão em C-3-monoacetilado, com um rendimento de 69% em valores de pH 5,0 e 4 °C.

### 2.3 SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE LIPASES

A expressão de lipases pode ser feita tanto por organismos procariotos quanto por eucariotos, sendo que a maioria dos trabalhos (mais de 50%) usa o procarioto *Escherichia coli*, e a levedura *Pichia pastoris*, que representa em torno de 35%. Também são usados, mas em menor proporção, *Saccharomyces cerevisiae* (7,5%), *Aspergillus spp.* (2,9%), *Bacillus subtilis* (2,3%) e *Yarrowia lipolytica* (menos de 1%) (BORRELLI e TRONO, 2015).

*E. coli* representa a maior parte dos trabalhos de expressão, não somente de lipases, mas também de outras enzimas, devido às suas características vantajosas como hospedeiro heterólogo. É uma bactéria gram-negativa, de rápido crescimento, e que não exige meios de cultivo complexos para isso (YIN et al., 2007; BILL, 2014); é um organismo capaz de produzir grandes quantidades de proteína, e já teve seu genoma sequenciado, tornando possível o seu aprimoramento como hospedeiro heterólogo, além de possuir diversas opções de cepas e vetores, o que viabiliza o desenho de estratégias para a expressão dos mais diversos tipos de proteínas (MAKRIDES, 1996). Porém, *E. coli* ainda apresenta problemas de expressão heteróloga, pois é incapaz de realizar modificações pós-traducionais por não apresentar um sistema de endomembranas, o que causa o acúmulo de proteínas mal enoveladas no citoplasma ou periplasma da bactéria (GOLDBERG, 2003). O acúmulo de proteínas mal enoveladas ativa o mecanismo de defesa de *E. coli* para que seja feito o enovelamento ou degradação das proteínas. No entanto, quando a capacidade do organismo em enovelar e degradar as proteínas é excedida, ocorre a formação dos corpos de inclusão, que podem, novamente, ficar no citoplasma ou no periplasma, ou em ambos (BETTON et al., 1998; GOLDBERG, 2003). Quando há formação de corpos de inclusão, as proteínas ficam na fração insolúvel do extrato bruto, perdendo parcial ou totalmente a atividade (HARTLEY e KANE, 1986), e em alguns casos ainda há a necessidade de realizarem-se etapas adicionais de enovelamento, que nem sempre são obtidas com sucesso (DALY e HEARN, 2005; ZHANG et al., 2018). No entanto, o aumento de número de etapas de purificação aumenta os custos de produção industrial da enzima (AKBARI et al., 2010). Como alternativa, a bactéria *B. subtilis* pode ser utilizada, apresentando algumas vantagens com relação à *E. coli*.

Até 2007, a produção comercial de proteínas por *B. subtilis* representava cerca de 60% do mercado, especialmente devido à sua capacidade de secretar proteínas

(FU et al., 2007), dispensando a etapa de extração da enzima do meio intracelular, reduzindo o número de etapas de purificação (YIN et al., 2007), além de ser uma bactéria GRAS (*generally recognized as safe*), não patogênica, e, assim como *E. coli*, já teve seu genoma sequenciado. *B. subtilis* também é capaz de crescer em alta densidade celular e apresenta baixo custo de produção, tornando-se um hospedeiro alternativo para *E. coli*. No entanto, estirpes do gênero *Bacillus* apresentam inúmeros reguladores de expressão que podem afetar sua maquinaria, assim como suas funções pós-transcricionais para secreção, que frequentemente prejudicam a expressão de proteínas heterólogas originadas de organismos gram-negativos e eucariotos (FU et al., 2007).

A expressão de lipases em organismos eucariotos, como as leveduras, apresenta vantagens com relação aos procaríotos. Além de leveduras serem capazes de crescer em meios igualmente baratos, apresentam organelas que são responsáveis por um sistema complexo de enovelamento de proteínas, como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, enovelando corretamente proteínas que precisam de modificações pós-traducionais (DALY e HEARN, 2005).

Uma das leveduras comumente utilizadas é *S. cerevisiae*, que, por ter seu genoma e metabolismo bem elucidados, tornou-se um modelo de estudos na busca de melhorias para a expressão de proteínas heterólogas em leveduras (BILL, 2014; FERNÁNDEZ et al., 2019). Além disso, é um organismo seguro para produção de enzimas para aplicações humanas e é economicamente viável (YIN et al., 2007). No entanto, o rendimento das proteínas neste organismo é apenas de 1 a 5% do total de proteínas do meio, e o organismo pode reter as proteínas no espaço periplasmático, além de algumas proteínas heterólogas podem sofrer uma hiperglicosilação (BUCKHOLZ e GLEESON, 1991). Já a levedura *Yarrowia lipolytica* tem se tornado um hospedeiro cada vez mais popular para a expressão em altos níveis de proteínas heterólogas, sendo vantajosa para a secreção de proteínas heterólogas com grande massa molecular através da via de translocação e em fermentações com alta densidade celular (LIU et al., 2013). Em contrapartida, *Y. lipolytica* tem alta termolabilidade e pode expressar muitas enzimas proteolíticas no meio de cultivo (BRÍGIDA et al., 2014). Não é um organismo patogênico, no entanto, pode se tornar um fungo oportunista patógeno em indivíduos com sistema imunológico comprometido, o que pode se tornar um problema em laboratórios e processos

industriais (LIU et al., 2013). Apesar disso, leveduras podem crescer rapidamente até altas densidades celulares e o nível celular é facilmente controlado com a simples manipulação do meio de cultivo, secretando proteínas heterólogas em altas quantidades (YIN et al., 2007). Outra levedura que tem ganhado cada vez mais destaque como sistema de expressão por suas vantagens é a levedura *Pichia pastoris*.

#### 2.4 *Pichia pastoris* COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

*P. pastoris* é uma levedura metilotrófica que tem se tornado um dos hospedeiros heterólogos cada vez mais utilizados para a expressão de proteínas heterólogas. Desde as primeiras cepas isoladas por Alexandre Guilliermond (1920) na França, e Herman Phaff (1956) na Califórnia, *P. pastoris* tem sido utilizada como hospedeiro para a expressão de diversas proteínas de várias origens. Uma busca na base de dados *Web of Science* utilizando os termos “*expression in Pichia pastoris*” (03/08/2021) mostrou 6947 artigos publicados entre 1987 e 2021.

A primeira cepa de *P. pastoris* isolada por Alexandre Guilliermond foi inicialmente denominada *Zygosaccharomyces pastori* (GUILLIERMOND, 1920). Mais tarde, na década de 1950, as novas cepas isoladas na Califórnia (USA), juntamente com a cepa francesa, foram nomeadas *Pichia pastoris* (PHAFF et al., 1956). Em 1995, o gênero *Komagataella* foi criado (YAMADA et al., 1995) e mais tarde as cepas foram renomeadas como *Komagataella pastoris* (cepa francesa) e *K. phaffi* (cepa americana) (KURTZMAN, 2009). Recentemente, estas espécies foram reclassificadas em *K. pastoris*, *K. phaffi* e *K. pseudopastoris*, sendo que as cepas GS115 e X-33 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), utilizadas para clonagem e expressão heteróloga, pertencem à espécie *K. phaffi* (LOVE et al., 2016). No entanto, apesar da reclassificação, o nome *P. pastoris* ainda é comumente utilizado nos trabalhos e abrange todas as cepas.

*P. pastoris* é capaz de expressar proteínas de diversas origens, como de vírus, bactérias, fungos, animais, plantas e seres humanos (YIN et al., 2007). Dentre a variedade de proteínas expressas, a produção de lipases através desse hospedeiro tem demonstrado ser vantajosa. Refinando-se a busca na *Web of Science* utilizando

os termos “lipases, *Pichia pastoris*, expression” (03/08/2021), mais de 400 artigos foram encontrados, que vão desde 1997 até 2021. Dentre as lipases já expressas em *P. pastoris* estão as de origem fúngica, como as de *Candida sp.* (BRUNEL et al., 2004; FERRER et al., 2009; LI et al., 2016; WAHYUNI et al., 2016) e de *Rhizopus sp.* (SALAH, 2010; WU et al., 2011; YANG et al., 2015; CÁMARA et al., 2016; WANG et al., 2020); de origem bacteriana (TABELA 3), como as de *Bacillus sp.* (QUYEN et al., 2003; RAMCHURAN et al., 2006; SHAHIDAN et al., 2011; GOODARZI et al., 2014), *Pseudomonas sp.* (JIANG et al., 2006; LIU et al., 2017; RAOUFI e GARGARI, 2018), e de origem metagenômica (ZHENG et al., 2012; 2013; SIMATUPANG et al., 2019; FURQAN e AKHMALOKA, 2020).

Visto a grande aplicabilidade industrial das lipases, se faz necessária a otimização de processos para produzir essas enzimas em escala industrial (SABRI et al., 2009; RAOUFI e GARGARI, 2018), e por isso, *P. pastoris* se tornou um hospedeiro viável para a produção de lipases. A principal vantagem de expressar lipases em *P. pastoris* é a capacidade que esse organismo tem em secretar proteínas heterólogas em grandes quantidades e corretamente enoveladas em um meio que possui baixa secreção de proteínas endógenas (ROMANOS, 1995). Além disso, as proteínas secretadas e solúveis podem ser recuperadas através da centrifugação para separar o sobrenadante do cultivo celular, e as proteínas do sobrenadante podem ser purificadas através da ultrafiltração, precipitação e por processos cromatográficos, como a cromatografia de afinidade (LI et al., 2007). Um exemplo é a expressão das lipases BTL2 e L2 de *Bacillus* em *P. pastoris* (TABELA 3), que diminuiu o número de etapas de purificação quando comparada com a expressão em *E. coli*, tendo sido obtido as lipases relativamente puras e em altos níveis diretamente no meio de cultivo, sem nenhum passo adicional de purificação, ou com etapas simples e economicamente viáveis (QUYEN et al., 2003; SABRI et al., 2009).

TABELA 3 - LIPASES DE ORIGEM BACTERIANA EXPRESSAS EM *Pichia pastoris*.

LIPASE	ORIGEM	CEPA/VETOR	ATIVIDADE (CADEIA DO SUBSTRATO)	CONDIÇÕES ÓTIMAS		kDa	OUTRAS CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
				pH	T (°C)			
			23000 U mg <sup>-1</sup> (C4)	7,5	65	43	Não houve a necessidade de etapas de purificação; Estabilidade contra detergentes foi maior que em <i>E. coli</i>	Quyen et al. (2003)
		GS115/pPICZα	10000 U mg <sup>-1</sup> (C4)	8,5	60	40,8	Deleção da hélice α5 aumentou a atividade contra diferentes substratos, valores de pH e temperatura	Goodarzi et al. (2014)
BTL2	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>		14000 U mL <sup>-1</sup> (C4)	8,0	60	43	Substituição da Phe17 por uma Ala; Melhorou a estabilidade e atividade frente a diversos substratos, íons metálicos, solventes orgânicos, valores de pH e detergentes	Karimi et al. (2014)
		GS115	5 U (C4)	-	40	43	Criação de uma biblioteca de clones combinando diferentes sequências de promotor, sinal de secreção e proteína de ancoragem para seleção da melhor combinação	Yamada et al. (2016)
			43,4 U mg <sup>-1</sup> (C12)				Maior termoestabilidade e estabilidade ao pH comparada com expressa em <i>P. fluorescens</i> B52	
LipB52	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B52	KM71/pPIC9K	94 e 91 U g <sup>-1</sup> (C10)	8,0	40	68	Construção de dois plasmídeos (KM71-pLHJ047 e KM71-pLHJ048) com diferentes sinais de secreção (fator α e FLO); Expressas na superfície celular; Maior estabilidade comparada à expressa em <i>S. cerevisiae</i>	Jiang et al. (2005; 2008)

(CONTINUA)

TABELA 3 - LIPASES DE ORIGEM BACTERIANA EXPRESSAS EM *Pichia pastoris*.

LIPASE	ORIGEM	CEPA/VETOR	ATIVIDADE (CADEIA DO SUBSTRATO)	CONDIÇÕES ÓTIMAS		kDa	OUTRAS CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
				pH	T (°C)			
LBB2	<i>Bacillus halodurans</i>	SMD1168H/ pPICZα	14000 U L <sup>-1</sup> (C4)	9,0	37	30	Origem alcalofílica; Em <i>E. coli</i> formava corpos de inclusão	Ramchuran et al., (2006)
LipJ02	<i>Pseudomonas sp.</i>	KM71/pPIC9K	42,6 U mg <sup>-1</sup> (C12)	8,0	30	~52	LipJ02 apresentou maior estabilidade em ampla faixa de pH (5,0-10,0) comparada com LipJ03	Jiang et al. (2006)
LipJ03			45,5 U mg <sup>-1</sup> (C12)		35			
SILipA	<i>Serratia liquefaciens</i> S33 DB-1	GS115/pPICZα	16 U mL <sup>-1</sup> (C18)	7,5	25	68	Primeiro trabalho reportando clonagem e expressão de uma lipase de <i>S. liquefaciens</i>	Yao et al. (2008)
LipS221	<i>Streptomyces fradiae</i> var. k11	GS115/pPIC9K	569 U mg <sup>-1</sup> (C16)	9,8	55	28,5	Expressa em <i>E. coli</i> teve 0,24 U mg <sup>-1</sup> , sem banda detectável em SDS-PAGE	Zhang et al. (2008)
L2	<i>Bacillus sp.</i>	GS115/pPICZα	458 U mg <sup>-1</sup> (óleo de oliva)	8,0	70	44,5	A atividade é melhorada na presença de Ca <sup>2+</sup> ; Diminuição dos passos da purificação	Sabri et al. (2009)
Lip3A	metagenômica	GS115/pPIC9K	3,4 U mL <sup>-1</sup> (C16)	8,0	40	31	Primeiro estudo que investiga a diversidade de genes de lipase em solo de geleira	Zhang et al. (2009)
LipXD			0,6 U mL <sup>-1</sup> (C16)		37	33		
LipA	<i>P. fluorescens</i> 26-2	GS115/pPIC9K	20 U mL <sup>-1</sup> (óleo de oliva)	9,0	50	63	Maior atividade expressa com o fenótipo Mut <sup>+</sup> ; Aplicada na síntese do biodiesel (conversão de 83,8%)	Yang et al. (2009)
L2	<i>Bacillus sp.</i>	GS115/pGAPZα	36 U mL <sup>-1</sup> (óleo de oliva)	7,5	70	44,5	Melaço de cana de açúcar (≤ 3%) foi usado na expressão da lipase L2; Concentrações ≤ 3% de glicose foram melhores na expressão	Shahidan et al. (2011)

(CONTINUAÇÃO)

TABELA 3 - LIPASES DE ORIGEM BACTERIANA EXPRESSAS EM *Pichia pastoris*.

LIPASE	ORIGEM	CEPA/VETOR	ATIVIDADE (CADEIA DO SUBSTRATO)	CONDIÇÕES ÓTIMAS		kDa	OUTRAS CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
				pH	T (°C)			
LipZ03	metagenômica	KM71/pZ651	507 U mg <sup>-1</sup> (azeite)	9,0	50	65	Atividade aumentada com adição de Ca <sup>2+</sup> e Mg <sup>2+</sup> ; Na síntese de biodiesel alcançou conversão de 74% em 36 h	Zheng et al. (2012)
LipZ01	metagenômica	GS115/pZ651	42 U mg <sup>-1</sup> (óleo de oliva)	8,0	45	50	Estável sob condições alcalinas (7,0-10,0) e entre 35 e 60 °C; Ca <sup>2+</sup> e Mn <sup>2+</sup> melhoram a atividade	Zheng et al. (2013)
ARL	<i>Acinetobacter radiorisistens</i> CMC-1	GS115/pPICZα	180 U mL <sup>-1</sup> (C8)	9,0	55	55	O acréscimo de aminoácidos entre o fator α e o gene da lipase melhorou a atividade, mas não interferiu na temperatura ou pH	Zhao et al. (2013)
MAS1	<i>Streptomyces</i> sp.	X-33/pGAPZα	2 U mL <sup>-1</sup> (C8)	7,0	40	29	Caracterizada pela primeira vez uma lipase termoestável da família I.7	Yuan et al. (2016)
		X-33/pPICZα	<sup>a</sup> 440 U mL <sup>-1</sup> <sup>b</sup> 220 U mL <sup>-1</sup> (C8)	6,0 <sup>a</sup>	22 <sup>b</sup>		Atividade testada em diferentes valores de pH <sup>a</sup> e temperatura <sup>b</sup> de expressão; Coexpressa com diferentes chaperonas	Lan et al. (2016)
PFIip1b	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	KM71/pPIC9K	336 U mg <sup>-1</sup> (C8)	8,0	70	32	Atividade dependente de Ca <sup>2+</sup>	Liu et al. (2017)
LipA	<i>P. aeruginosa</i>	X-33/pPICZα	85 U mg <sup>-1</sup> (C16)	-	37	32,7	LipA é dependente de <i>Lif</i> , e foi expressa com sucesso, sem a foldase, na superfície da célula	Raoufi e Gargari (2018)
RLipase	<i>Proteus</i> sp. SWL	GS115/pPIC9K	130 U mg <sup>-1</sup> (C12)	8,0	40	~32	Nível de expressão em <i>E. coli</i> foi baixo	Y. Wang et al. (2018)
ITB1.1	metagenômica	pPICZα	3 U mg <sup>-1</sup> (C16)	8,0	70	50	Expressas em <i>E. coli</i> apresentaram atividade baixa, 0,56 U mg <sup>-1</sup> (ITB1.1) e 0,0037 U mg <sup>-1</sup> (LK3)	Simatupang et al. (2019)
LK3			0,3 U mg <sup>-1</sup> (C12)	8,0	50	32		

(CONTINUAÇÃO)

TABELA 3 - LIPASES DE ORIGEM BACTERIANA EXPRESSAS EM *Pichia pastoris*.

LIPASE	ORIGEM	CEPA/VETOR	ATIVIDADE (CADEIA DO SUBSTRATO)	CONDIÇÕES ÓTIMAS		kDa	OUTRAS CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
				pH	T (°C)			
Lk1	metagenômica	GS115/pPICZα	1,8 U mg <sup>-1</sup> (C12)	8,0	60	35,5	Lk1 foi expressa como corpos de inclusão e teve apenas 0,0035 U mg <sup>-1</sup> de atividade quando expressa em <i>E. coli</i>	Furqan e Akhmaloka (2020)
LipEMP 48-D	<i>Micrococcus luteus</i>	KM71/pPIC9K	145 U mg <sup>-1</sup> (óleo de oliva)	5,0	40	~40	O nível de expressão e atividade foram menores em <i>E. coli</i>	Adina et al. (2021)

LEGENDA: A pesquisa inicial foi realizada na base de dados *Web of Science* (03/08/2021), utilizando as palavras-chave: LIPASES; *Pichia pastoris*; EXPRESSION. Depois, foi realizada a seleção dos artigos de expressão de lipases bacterianas em *P. pastoris* manualmente.

FONTE: A Autora (2021).

(CONCLUSÃO)

A eficiência na produção de proteínas heterólogas também se deve ao fato que *P. pastoris* possui um sistema de secreção capaz de realizar diversas modificações pós-traducionais de maneira mais eficiente que outros hospedeiros (ZAHRL et al., 2017), como o enovelamento correto das proteínas, glicosilação, metilação, acilação e formação de pontes dissulfeto (CREGG et al., 2000; CEREGHINO e CREGG, 2000; LI et al., 2007; AHMAD et al., 2014). As modificações pós-traducionais realizadas por *P. pastoris* podem melhorar as características das proteínas. Como exemplo (TABELA 3), a lipase LipB52 teve a termoestabilidade e estabilidade em pH melhoradas após a expressão em *P. pastoris*, possivelmente devido à glicosilação da lipase (JIANG et al., 2005). Lipases que são expressas em *E. coli* de forma inativa e em corpos de inclusão podem ser secretadas de forma ativa, corretamente enoveladas e em altos níveis diretamente no meio de cultivo de *P. pastoris*, como observado para as lipases LBB2 (*Bacillus halodurans*) e LipEMP48-D (*Micrococcus luteus*) (RAMCHURAN et al., 2006; ADINA et al., 2021) (TABELA 3).

A expressão de lipases em *P. pastoris* pode ser realizada utilizando promotores constitutivos ou de indução. Dentre os promotores mais comumente utilizados estão o promotor AOX, em que a expressão é induzida por metanol, e o promotor GAP, regulado pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e que expressa constitutivamente a proteína de interesse (WATERHAM et al., 1997). A grande parte das lipases de origem bacteriana é expressa utilizando o promotor AOX (TABELA 3). Diversos vetores atuam sob esse promotor (pPICZ, pPIC9K, pZ651), os quais são fortemente regulados pelo metanol. Esse promotor funciona pelo mecanismo de repressão/indução, dependente de uma fonte de carbono, ou seja, na presença de glicose ou glicerol a expressão é totalmente reprimida, enquanto na presença do metanol, a expressão é induzida ao máximo (TSCHOPP et al., 1987). No entanto, o uso do metanol pode ser perigoso, por se tratar de um produto tóxico e altamente inflamável, tornando-se inviável para a produção industrial (CEREGHINO e CREGG, 2000; DALY e HEARN, 2005). Além disso, ainda há a necessidade da troca de meio de cultivo durante a produção (JIANG et al., 2005).

O uso do vetor pGAPZ, que atua sob o promotor GAP, pode ser uma substituição viável, pois além de expressar continuamente a proteína de interesse em qualquer fonte de carbono, o tempo de cultivo diminui quando comparado com o do promotor AOX. Na produção da lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica*, o uso do promotor

GAP apresentou um aumento em 23% no nível de expressão em relação ao promotor AOX, além do tempo de produção ter sido reduzido de 160 h no promotor AOX, para 80 h no promotor GAP (WANG et al., 2012). Por não haver a necessidade de mudança da fonte de carbono, o processo de produção é otimizado, tornando o promotor GAP viável para uso em escala industrial (CEREGHINO e CREGG, 2000; AHMAD et al., 2014).

Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a expressão de lipases com o promotor GAP, como glicose ou glicerol, e também fontes alternativas, como o melaço de cana de açúcar não tratado utilizado para a expressão da lipase L2 de *Bacillus sp* (TABELA 3), e seu uso foi economicamente viável para a produção industrial da lipase L2 (SHAHIDAN et al., 2011).

Uma das estratégias para aumentar a expressão de lipases é a obtenção de clones que possuem várias cópias do plasmídeo inseridas no genoma da mesma cepa (ROBERT et al., 2019; PARK et al., 2019; NIETO-TAYPE et al., 2020). Na clonagem em *P. pastoris*, a inserção dos vetores de expressão em seu genoma ocorre através da recombinação homóloga, em que o vetor de expressão contém regiões que são homólogas ao genoma da levedura, podendo-se integrar várias cópias do mesmo plasmídeo, obtendo-se clones com múltiplas cópias do mesmo promotor. Além disso, há a possibilidade de realizar a coexpressão com diferentes plasmídeos que agem sob o mesmo promotor ou realizar a inserção de plasmídeos que agem sob diferentes promotores (DALY e HEARN, 2005). O plasmídeo linear é inserido no genoma de *P. pastoris*, podendo ocorrer apenas um evento de inserção, tendo-se assim clones de cópia única, ou múltiplos eventos de inserção, obtendo-se então clones com múltiplas cópias do plasmídeo (FIGURA 3).

Geralmente, o número de cópias impacta diretamente na produtividade da lipase (VASSILEVA et al., 2001; ROBERT et al., 2019), no entanto, isso não pode ser considerado um critério para a seleção dos clones (CLARE et al., 1991; HENRY et al., 1997; LABORDE et al., 2004), já que a dosagem alta do gene pode resultar em competição e limitação de alguns fatores de transcrição e também pode ocorrer o acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático, gerando estresse na maquinaria de expressão (RESINA et al., 2005; BOLLOK et al., 2009; CAI et al., 2017).

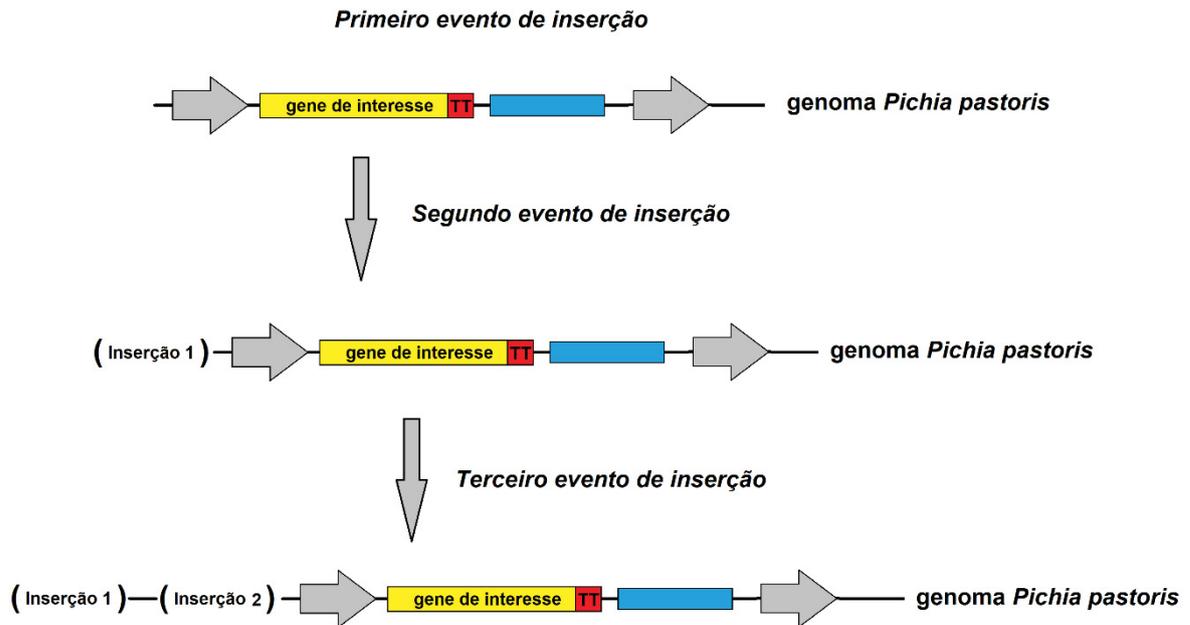


FIGURA 3 – EVENTOS DE INSERÇÃO DO PLASMÍDEO NO GENOMA DE *Pichia pastoris*

LEGENDA: Retângulos amarelos: gene da proteína homóloga. Quadrado vermelho “TT”: fator de terminação da leitura de transcrição da proteína. Retângulos azuis: gene que codifica a resistência ao antibiótico.

FONTE: A Autora (2021).

Uma maneira de evitar o estresse da maquinaria de expressão é a coexpressão de chaperonas, pois aumenta a disponibilidade de chaperonas para auxiliar no enovelamento das proteínas, consequentemente aumentando a produção de lipases, ou ainda, através da superexpressão de fatores de transcrição, que são responsáveis por induzir genes que codificam chaperonas e enzimas envolvidas nas vias de enovelamento e secreção (GASSER et al., 2008; RESINA et al., 2009; SAMUEL et al., 2013; CAI et al., 2017; JIAO et al., 2018; DE WAELE et al., 2018; LI et al., 2019).

Em 2013, Sha e colaboradores realizaram a coexpressão da lipase r27RCL de *Rhizopus chinensis* e das proteínas PDI (*protein disulfide isomerase*) e ERO1 (*oxidoreductase*). Os autores observaram que a expressão da lipase juntamente com ambas as chaperonas resultou em um aumento significativo nos níveis de expressão, e a lipase alcançou a atividade máxima de 370 U mL<sup>-1</sup> em 96 h. Isso também foi observado para a lipase MAS1 de *Streptomyces sp.* (TABELA 3) expressa juntamente com a proteína PDI em *P. pastoris*, gerando um aumento na expressão e atividade da lipase diretamente do meio de cultivo (440 U mL<sup>-1</sup> em 144 h) (LAN et al., 2016).

Assim como é possível a inserção de mais de um plasmídeo com diferentes genes em *P. pastoris*, há também trabalhos que usaram promotores constitutivos e induzíveis na mesma cepa com o gene da mesma proteína para aumentar a produção e atividade enzimática (WU et al., 2003; WILLIAMS et al., 2008; SHEN et al., 2012). He e colaboradores (2015) combinaram o uso do promotor GAP (constitutivo) e AOX (indução) para aumentar a produção da lipase de *Rhizomucor miehei* (RML). Primeiramente, os autores expressaram a proteína constitutivamente (GAP) por 24 h, e em seguida, adicionaram metanol no meio para impulsionar a expressão (AOX). Após a seleção de um clone de múltiplas cópias e a expressão da lipase, os autores obtiveram uma lipase ativa com sua atividade triplicada ( $140 \text{ U mL}^{-1}$ ) quando comparada com a atividade da lipase expressa separadamente sob esses promotores. Após a otimização da expressão, foi alcançado até  $175 \text{ U mL}^{-1}$  (120 h) de atividade da lipase diretamente no meio de cultivo.

Como *P. pastoris* é capaz de realizar modificações pós-traducionais, expressar quantidades altas de proteína no meio de cultivo e facilitar os processos de recuperação de proteína, esse hospedeiro foi escolhido para a expressão da lipase LipC12, que, em trabalhos anteriores, havia sido expressa em *E. coli* (GLOGAUER et al., 2011; MARTINI et al., 2012; MADALOZZO et al., 2015, 2016; ALMEIDA et al., 2018; MARTINI et al., 2019)

#### 2.4.1 VETOR DE EXPRESSÃO pGAPZ $\alpha$

Os vetores pGAPZ $\alpha$  (A, B e C) possuem o fator  $\alpha$  de secreção de *S. cerevisiae*, que é reconhecido por *P. pastoris* como um sinal para que a proteína seja secretada. A proteína é transcrita com o fator  $\alpha$ , e após a sua passagem pela membrana externa ocorre a clivagem desse fator no sítio Kex2 (FIGURA 4). Além disso, os vetores possuem o gene *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus ble* gene), que codifica uma proteína de 13,7 kDa que se liga ao antibiótico zeocina e inibe sua atividade de clivagem da fita do DNA (DROCOURT et al., 1990; CALMELS et al., 1991), conferindo ao hospedeiro resistência ao antibiótico. Em *P. pastoris*, geralmente clones com uma cópia do plasmídeo conferem resistência a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina (SARRAMEGNA et al., 2002) e clones com múltiplas cópias oferecem resistência a 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



FIGURA 4 – SÍTIO DE CLIVAGEM PARA SECREÇÃO DA PROTEÍNA HOMÓLOGA DO VETOR pGAPZ $\alpha$  LINEAR

LEGENDA: Seta roxa: fator  $\alpha$  de secreção para *P. pastoris*. Seta vermelha indica o local de clivagem Kex2 do fator  $\alpha$  quando a proteína é secretada. Quadrado vermelho “TT”: sinal de terminação de leitura do gene homólogo.

FONTE: A Autora (2021).

O número de cópias inserido no genoma de *P. pastoris* pode variar de uma proteína para outra. Por exemplo, Vassileva et al. (2001) analisaram o número de clones do plasmídeo contendo o gene do antígeno da hepatite B a partir da análise por *Southern Blot*. Os autores observaram que os clones crescidos em  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de antibiótico geralmente tinham uma cópia do plasmídeo, enquanto os transformantes crescidos em  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina apresentaram duas, três e quatro cópias do plasmídeo, respectivamente. Sarramegna et al. (2002) encontraram que os transformantes da proteína receptora de opioides humano, crescidos em  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina apresentaram de 15 a 20 cópias, enquanto que Kuo et al. (2015) encontraram clones com duas, três e quatro cópias do gene da lipase Lip2 de *C. rugosa* que eram capazes de crescer tanto em  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina quanto em  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina.

As regiões variáveis que diferenciam os vetores A, B e C estão localizadas entre o fator  $\alpha$  e o sítio de clonagem. O vetor B apresenta um sítio de restrição da enzima PstI, que não está presente no vetor A, e o vetor C apresenta um sítio de restrição da enzima ClaI no lugar do sítio da PstI do vetor B. Essas diferenças foram projetadas para facilitar a integração do gene em fase de leitura com o fator  $\alpha$ . Neste trabalho foi utilizado o vetor pGAPZ $\alpha$ (B), que é linearizado no promotor GAP e é inserido dentro do genoma de *P. pastoris* via recombinação homóloga do promotor GAP, presente no plasmídeo pGAPZ $\alpha$ , com o sítio do gene GAP da levedura (Manual de usuário, Invitrogen, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química, ambos na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 MEIOS DE CULTIVO

Para *E. coli*, foi utilizado o meio de cultivo LA *Low Salt* (Luria Bertani Ágar *Low Salt*; 10 g L<sup>-1</sup> triptona, 5 g L<sup>-1</sup> NaCl e 5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 15 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico) e LB *Low Salt* (Luria Bertani *Low Salt*; 10 g L<sup>-1</sup> triptona, 5 g L<sup>-1</sup> NaCl e 5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura).

Para *P. pastoris*, foram utilizados os meios YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose); YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, 2% ágar bacteriológico); YPDS (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, 2% ágar bacteriológico, 1 M Sorbitol); YEPD com tampão fosfato 100 mM, pH 6,0 (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, 132 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, 868 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M); Ágar-tributirina (5 g L<sup>-1</sup> de peptona, 3 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 13 g L<sup>-1</sup> ágar bacteriológico e 1 mL L<sup>-1</sup> tributirina).

##### 3.1.2 ENZIMAS E PRIMERS

As enzimas utilizadas para a clonagem foram NotI, KpnI, PaeI (BspHI) para restrição, T4 Ligase para reação de ligação, e Taq DNA Polimerase para as reações de PCR (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). O antibiótico utilizado foi a zeocina (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). O marcador de massa molecular utilizado nos géis de agarose foi 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) e para SDS-PAGE foi da GE Healthcare (Buckinghamshire, UK, Inglaterra). Os *primers* foram adquiridos da empresa Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brasil).

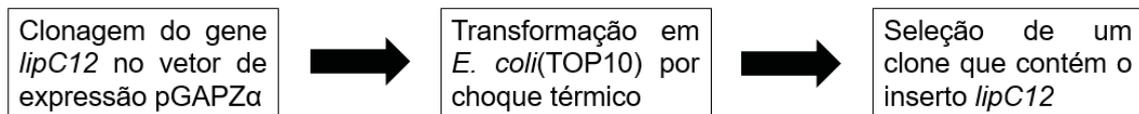
### 3.1.3 VETOR, GENE E CEPAS

O vetor pGAPZ $\alpha$ (B) e a estirpe de *P. pastoris* (GS115) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Wanderson Duarte Da Rocha, do Laboratório de Genômica Funcional de Protozoários (GFP). O gene *lipC12* foi obtido a partir do vetor pET-28a(+), previamente clonado e expresso em *E. coli* por Glogauer (2011) e Almeida (2019). A cepa de *E. coli* (TOP10) utilizada nos experimentos foi obtida a partir de estoques do laboratório.

## 3.2 MÉTODOS

A primeira etapa do trabalho foi a obtenção de um clone positivo através da clonagem em *E. coli* (TOP10), para posterior clonagem e expressão em *P. pastoris*. As duas etapas de clonagem e seleção de clones está resumida na Figura 5.

### ETAPA 1: CLONAGEM EM *Escherichia coli*



### ETAPA 2: CLONAGEM EM *Pichia pastoris*

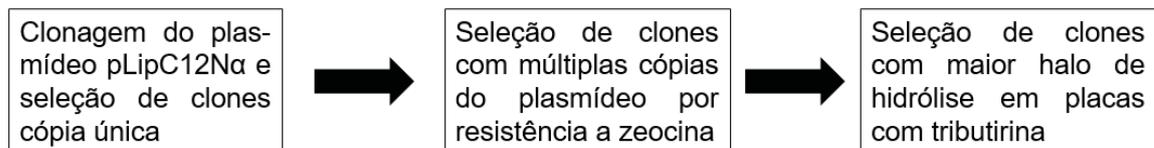


FIGURA 5 – ESQUEMA GERAL DA CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE CLONES DE LipC12 PARA EXPRESSÃO EM *Pichia pastoris*

LEGENDA: Na ETAPA 1 é realizada a clonagem em *E. coli* para obtenção de um plasmídeo que possui o inserto da LipC12, denominado pLipC12N $\alpha$ , que na ETAPA 2 foi clonado em *P. pastoris* para seleção de clones positivos e para, posteriormente, realizar os testes de expressão e atividade.

FONTE: A Autora (2021).

Na primeira etapa do trabalho, foi realizada a clonagem do gene de LipC12 dentro do plasmídeo pGAPZ $\alpha$ , e então, a reação de ligação foi inserida em *E. coli* (TOP10) para seleção de um transformante e posterior propagação do clone positivo. Depois de seleção do clone, este foi linearizado e inserido em *P. pastoris* para obtenção de clones com cópia única e múltiplas cópias do plasmídeo. Os clones foram selecionados por tamanho de halo de hidrólise em placas ágar-tributirina para posterior realização de expressão e análises de atividade.

### 3.2.1 PROPAGAÇÃO DOS PLASMÍDEOS pGAPZ $\alpha$ E pET28a(+) CONTENDO O GENE *lipC12*

O vetor pGAPZ $\alpha$  foi inserido em *E. coli* (TOP10) quimiocompetente por transformação em choque térmico segundo Hanahan (1983), adicionando-se 1  $\mu$ L do plasmídeo a 50  $\mu$ L de *E. coli* (TOP10), misturando-se gentilmente e deixando-se incubar por 5 min em banho de gelo. Depois, as células foram levadas em banho-maria a 42 °C por 45 s, e imediatamente após, incubadas por mais 2 min em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB e incubadas por 1 h a 37 °C para recuperação das células. Em seguida, foi realizado o espalhamento das células em placas de Petri com meio LA contendo o antibiótico zeocina (25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) para seleção de colônias. Então, as colônias foram selecionadas e cultivadas em meio líquido para a propagação dos plasmídeos e seguida de extração do DNA plasmidial por lise alcalina, seguindo o protocolo de Sambrook et al., 1989, obtendo-se assim plasmídeos pGAPZ $\alpha$  para clonagem.

As células de *E. coli* (TOP10) contendo o plasmídeo pET28a(+) com o gene *lipC12* foram crescidos em meio LB contendo canamicina (50  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>) para posterior realização da extração plasmidial com o auxílio do kit comercial Monarch Plasmid Miniprep (New England, BioLabs, UK).

### 3.2.2 OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

Para a realização deste trabalho foram planejadas 3 diferentes construções para a clonagem da LipC12 (TABELA 4), com o intuito de alterar a posição da tag de afinidade (His-tag). Na construção I (LipC12 com His-tag N-terminal), a His-tag foi

amplificada junto com o gene a partir do pET-28a(+). Na construção II (LipC12 com His-tag C-terminal), a His-tag é a do próprio vetor pGAPZ $\alpha$ , e na construção III (LipC12 sem His-tag) foi amplificada sem a His-tag a partir do vetor pET-28a(+).

TABELA 4 – CONSTRUÇÕES E SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *lipC12*

	CONSTRUÇÃO	SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i>
I	<i>lipC12_N-terminal_foward</i>	5' GCGGTACCCGACCATGGGCAGCAGC 3'
	<i>lipC12_N-terminal_reverse</i>	5' GTGCGGGCCGCAAGCTTGTGCGACGG 3'
II	<i>lipC12_C-terminal_foward</i>	5' CGGGTACCTCTTGATGTCAGCTTCATC C 3'
	<i>lipC12_C-terminal_reverse</i>	5' CGGCGGGCCGCGCAGCCCTTTGCTTTTGAG 3'
III	<i>lipC12_sem His_foward</i>	5' CGGGTACCTCTTGATGTCAGCTTCATC C 3'
	<i>lipC12_sem His_reverse</i>	5' GTGCGGGCCGCAAGCTTGTGCGACGG 3'

LEGENDA: Destacado com o sublinhado: sítio da enzima KpnI nos *primers foward*, e da enzima NotI nos *primers reverse*.

Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Snapgene (GSL Biotech) e foram verificados para a possível formação de grampos, temperatura de anelamento e auto complementaridade com o programa OligoCalc Northwestern (KIBBE, 2007). Durante o desenho dos *primers*, foi adicionado o sítio de restrição da enzima KpnI nos *primers foward* das construções I, II e III, pois o sítio de restrição desta enzima não está presente no vetor pET28a(+) e era necessário para a clonagem do gene no vetor pGAPZ $\alpha$ . Depois, foram adicionados pares de bases (pb) para que o gene ficasse em fase de leitura com o fator  $\alpha$  nos *primers foward* das três construções. Para a construção I foram adicionados dois pb antes do sítio de restrição, e três pb depois do sítio de restrição. Para as construções II e III, foi adicionado um pb depois do sítio de restrição. Além disso, foi adicionado o sítio de restrição da enzima NotI do *primer reverse* da construção II, e foi retirado o STOP códon presente no final do gene *lipC12*, para que durante a tradução do gene, a lipase fosse expressa com a His-tag presente no vetor pGAPZ $\alpha$ .

Em seguida, com o auxílio dos *primers* descritos na Tabela 4 e utilizando como DNA molde o plasmídeo pET28a(+) contendo o gene *lipC12*, foram realizadas várias

reações de PCR em termociclador (Applied Biosystems® Veriti® 96-Well, Waltham, MA USA), utilizando 1 µL da enzima Taq DNA Polimerase, para cada 2 µL de DNA molde, 2,5 µL de tampão 10x, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol L<sup>-1</sup>), 1 µL de dNTP (5 µM), 1 µL de cada *primer*, completando-se com 14,5 µL de água deionizada para um volume de reação total de 25 µL. As condições para a PCR foram de 35 ciclos de: 95 °C por 30 s (desnaturação do DNA); 55 °C até 75 °C por 20 s (anelamento dos *primers*); 72 °C por 1:30 min (extensão da fita do DNA) e 72 °C por 5 min para ação da enzima Taq DNA polimerase. Na reação padrão, é indicado 1 µL de DNA molde para cada 1 µL da enzima Taq DNA Polimerase, mas para estas reações, foi utilizado o dobro de DNA molde, sendo testadas 5 temperaturas de anelamento diferentes: 55, 60, 65, 70 e 75 °C. A confirmação da amplificação dos genes se deu por visualização em gel de agarose.

### 3.2.3 CLONAGEM NO VETOR pGAPZα

O gene e o plasmídeo foram submetidos, separadamente, às reações de restrição. Com a enzima KpnI, as reações foram feitas da seguinte forma: para o gene, foram adicionados 10 µL do DNA amplificado, 2 µL do tampão da enzima (Anza™ 10X Buffer), 0,5 µL de KpnI, completando-se com 7,5 µL de água deionizada estéril, para volume de reação total de 20 µL; para o plasmídeo, foi feita uma reação de volume total de 50 µL, adicionando-se 20 µL de pGAPZα, 5 µL do tampão da enzima (Anza™ 10X Buffer), 0,5 µL de KpnI, completando-se com 24,5 µL de água deionizada estéril. Ambas as reações foram incubadas por 2 h a 37 °C. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose. O gel foi corado com brometo de etídio e submetido à visualização em luz UV. As bandas correspondentes ao gene e ao plasmídeo foram removidas do gel com o auxílio de uma lâmina estéril, colocadas em tubos Eppendorf para a extração do DNA do gel de agarose com o kit Monarch DNA Gel Extraction (New England, BioLabs, Ipswich, UK).

Depois da extração, o gene e o plasmídeo foram submetidos a uma nova reação de restrição com a enzima NotI: para o gene, foram adicionados 10 µL do DNA amplificado, 2 µL do tampão da enzima (10X Buffer Orange), 1 µL de NotI, completando-se com 7 µL de água deionizada estéril, para volume de reação total de 20 µL; para o plasmídeo, foi feita uma reação de volume total de 50 µL, adicionando-

se 20  $\mu\text{L}$  de pGAPZ $\alpha$ , 5  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima (10X Buffer Orange), 1  $\mu\text{L}$  de NotI, completando-se com 24  $\mu\text{L}$  de água deionizada estéril. Ambas as reações foram incubadas por 16 h a 37 °C. O DNA foi novamente extraído do gel de agarose com o auxílio do kit de extração de gel Monarch DNA Gel Extraction (New England, BioLabs, Ipswich, UK). Para verificar se o vetor foi digerido com as enzimas, foi feita uma corrida em gel de agarose após cada reação de restrição e após cada extração do gel de agarose. Por fim, o gene e o plasmídeo foram submetidos às reações de ligação.

Com o plasmídeo pGAPZ $\alpha$  e o gene tratados com as enzimas de restrição, foi realizada a ligação do gene de LipC12 ao vetor pGAPZ $\alpha$  adicionando-se 1  $\mu\text{L}$  do vetor, 10  $\mu\text{L}$  do gene, 1  $\mu\text{L}$  de tampão T4 Ligase e 0,5  $\mu\text{L}$  de T4 Ligase. Para a reação de controle, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de água ao invés do gene, sendo ambas as reações incubadas por 2 h a 24 °C. Depois de 2 h, as reações foram transformadas em *E. coli* (TOP10) por choque térmico (descrito em 3.2.1.) e as células foram espalhadas em placas de Petri com meio LA contendo zeocina (25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubadas a 37 °C por 12 h, para seleção de colônias dos transformantes. A fim de verificar a viabilidade celular, resistência do vetor ao antibiótico e a eficiência das enzimas, foram realizados controles como descrito na Tabela 5.

A reação de transformação do controle 1 foi realizada como descrito no item 3.2.1. Para o controle 2, uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  do plasmídeo já linearizado pelas duas enzimas KpnI e NotI foi utilizada para realizar a transformação em *E. coli* (TOP10), sem realizar a reação de ligação. Para a realização da transformação de controle 3, a reação de ligação foi realizada utilizando-se os plasmídeos já digeridos com sua respectiva enzima como descrito no item anterior: para o vetor tratado com a enzima KpnI, foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  do vetor linearizado, 1  $\mu\text{L}$  de tampão T4 Ligase, 0,5  $\mu\text{L}$  de T4 Ligase e completando-se com 7,5  $\mu\text{L}$  de água deionizada estéril. A reação foi incubada por 2 h a 37 °C e, então, os plasmídeos inseridos em *E. coli* (TOP10) por choque térmico. Para o vetor tratado com a enzima NotI, foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do vetor linearizado, 1  $\mu\text{L}$  de tampão T4 Ligase e 0,5 de T4 Ligase e completando-se com 6,5  $\mu\text{L}$  de água deionizada estéril. A reação foi incubada por 16 h a 37 °C, e então, os plasmídeos foram inseridos em *E. coli* (TOP10) por choque térmico. Para a reação 4, foi feita como descrito para a reação 3, porém, os vetores digeridos foram transformados sem realizar a reação de ligação. Todas as reações foram espalhadas

em placas de Petri com meio LA contendo zeocina ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 12 h, para posterior análise.

TABELA 5 - DESCRIÇÃO DAS REAÇÕES DE TRANSFORMAÇÃO FEITAS EM *Escherichia coli*

CONTROLES		DESCRIÇÃO	
1	<i>pGAPZα circular</i>	Vetor circular, sem digestão	Verificar a viabilidade celular e a resistência do vetor ao antibiótico
I		Digerido com NotI e KpnI	
2	<i>pGAPZα digerido</i>	Digerido com KpnI	Verificar a eficiência das enzimas de restrição
III		Digerido com NotI	
3	<i>pGAPZα digerido e religado com T4 ligase</i>	Digerido com NotI e KpnI e religado	Verificar se há complementaridade entre as enzimas de restrição
II		Digerido com KpnI	Verificar a eficiência da enzima T4 ligase
III		Digerido com NotI	
4	<i>Transformação de todos os componentes do sistema de ligação: pGAPZα com o gene da LipC12_his-tag_N-terminal</i>	Plaqueados 10 uL da transformação Plaqueados 100 uL da transformação	Concentrações sugeridas no manual de clonagem em <i>Pichia pastoris</i> para seleção de colônias

FONTE: A Autora (2021).

Para análise dos transformantes, 20 colônias foram selecionadas aleatoriamente, inoculadas em meio LB e incubadas por 16 h a  $37^\circ\text{C}$ , com agitação de 120 rpm. Em seguida, foram submetidas à extração do DNA plasmidial por miniprep, segundo Sambrook et al. (1989). As amostras que apresentaram padrão de bandas diferentes em gel de agarose foram submetidas a reações de restrição com as enzimas NotI e KpnI (2  $\mu\text{L}$  da amostra de miniprep, 2  $\mu\text{L}$  de tampão, 0,4  $\mu\text{L}$  da enzima, completando-se com 15,6  $\mu\text{L}$  de água deionizada estéril) para liberar o inserto do vetor e confirmar a clonagem por visualização das bandas em gel de agarose.

Antes de iniciar a clonagem em *P. pastoris*, os plasmídeos confirmados como aqueles que continham o gene *lipC12* foram submetidos a uma nova reação de transformação para propagação do plasmídeo e multiplicação dos clones (descrito em 3.2.1), bem como foi feito o estoque em glicerol 50% (v/v) dos clones positivos.

### 3.2.4 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Pichia pastoris*

Para a preparação das células de *P. pastoris* competentes para eletroporação, foi inoculada uma colônia em 5 mL de YEPD em um frasco de 50 mL, seguindo-se incubação por 12 h a 30 °C, com agitação de 250 rpm. Esse inóculo foi diluído em 500 mL de YEPD em um frasco de 2 L, e crescido por 14 h a 30 °C, com agitação de 180 rpm, até atingir a D.O.<sub>600</sub> de 1,3 a 1,5. As células então foram centrifugadas a 1500×g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 500 mL de água deionizada estéril gelada e centrifugado novamente. As células então foram suspensas em 250 mL de água deionizada estéril gelada e a mistura foi centrifugada. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 20 mL de sorbitol 1 M gelado, e centrifugadas novamente. Por último, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado, para um volume final aproximado de 1,5 mL. As células foram mantidas no gelo e usadas no mesmo dia.

### 3.2.5 LINEARIZAÇÃO DO VETOR pGAPZα CONTENDO O GENE *lipC12*

Para a transformação em *P. pastoris*, foi realizada a reação de restrição do plasmídeo pGAPZα já clonado com o gene *lipC12*, adicionando-se 20 µL do plasmídeo, 5 µL do tampão da enzima (10X Buffer Orange), 1 µL de PglI (BspHI), completando-se com 7 µL de água deionizada estéril. A enzima PglI lineariza o vetor na região do promotor GAP (FIGURA 6).

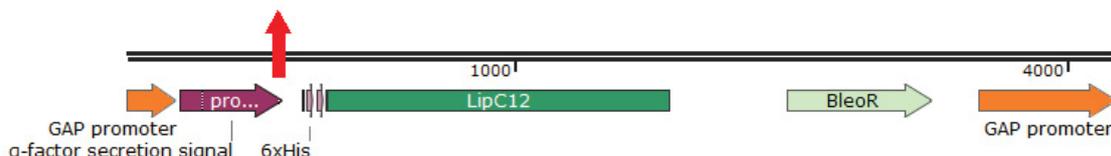


FIGURA 6 – PLASMÍDEO pGAPZα CONTENDO O INSERTO DE LipC12 LINEARIZADO PELA ENZIMA BspHI

LEGENDA: Seta laranja: região homóloga (promotor GAP) do plasmídeo com o genoma de *P. pastoris*. Seta em roxo: região do fator α de secreção. Seta vermelha: sítio de clivagem do fator α (Kex2) para secreção da lipase. Seta verde “BleoR”: região que codifica a proteína que confere resistência à zeocina. Imagem retirada do programa SnapGene (GSL Biotech).

FONTE: A Autora (2021).

Para confirmação da linearização do plasmídeo, foi realizada uma corrida em gel de agarose e em seguida, foi realizada a purificação do DNA através da extração do DNA do gel de agarose com o kit de extração de DNA Monarch DNA Gel Extraction (New England, BioLabs, Ipswich, UK). O plasmídeo purificado foi então analisado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) e diluído para uma concentração final entre 5 e 10 µg.

### 3.2.6 TRANSFORMAÇÃO EM *Pichia pastoris*

O plasmídeo pGAPZα contendo o inserto de LipC12 e linearizado (~5-10 µL) foi misturado a 80 µL das células competentes previamente preparadas, sendo o material transferido para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm em banho de gelo. As células foram incubadas no gelo por 5 min, e em seguida, o plasmídeo linearizado foi inserido em *P. pastoris* através de eletroporação de acordo com os parâmetros para leveduras: 25 µF, 2000 V, 200 Ohm e 15 kV (Bio-Rad Gene Pulser II, Hercules, CA, EUA). Imediatamente após, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 mol L<sup>-1</sup> gelado e as células foram transferidas para um tubo estéril de 15 mL e incubadas por 2 h a 30 °C, sem agitação.

Para a obtenção de clones de cópia única, as células de *P. pastoris* eletroporadas foram espalhadas em placas YPDS contendo 100 µg mL<sup>-1</sup> de zeocina, e incubadas por 4 dias a 30 °C. Após o cultivo, 14 colônias foram selecionadas aleatoriamente e foram inoculadas em 2 mL de meio YEPD com 100 µg mL<sup>-1</sup> de zeocina e incubadas por 16 h a 30 °C com agitação de 250 rpm. Após o período de incubação, o crescimento celular foi analisado visualmente pela turbidez. Em seguida, os clones que apresentaram crescimento celular foram espalhados em placas de Petri com meio YPD contendo 100 µg mL<sup>-1</sup> de zeocina e incubados novamente por 16 h a 30 °C.

Para a obtenção de clones com múltiplas cópias, adotou-se a estratégia de repiques e cultivos sequenciais em presença de concentrações crescentes de zeocina (FIGURA 7). As células eletroporadas foram diretamente espalhadas em placas de Petri com YPDS contendo 500 µg mL<sup>-1</sup>, 1000 µg mL<sup>-1</sup> e 2000 µg mL<sup>-1</sup> de zeocina e incubadas por 6 dias a 30 °C. Após o período de incubação, as colônias que apresentaram crescimento foram selecionadas e repicadas em placas novamente,

cada uma em sua respectiva concentração de antibiótico e incubadas por 16 h a 30 °C. Após esse tempo, as colônias crescidas foram novamente repicadas em suas respectivas concentrações de zeocina. Além disso, as colônias crescidas em 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram repicadas em placas contendo 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina; e as colônias crescidas em 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram repicadas em 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina (FIGURA 7).

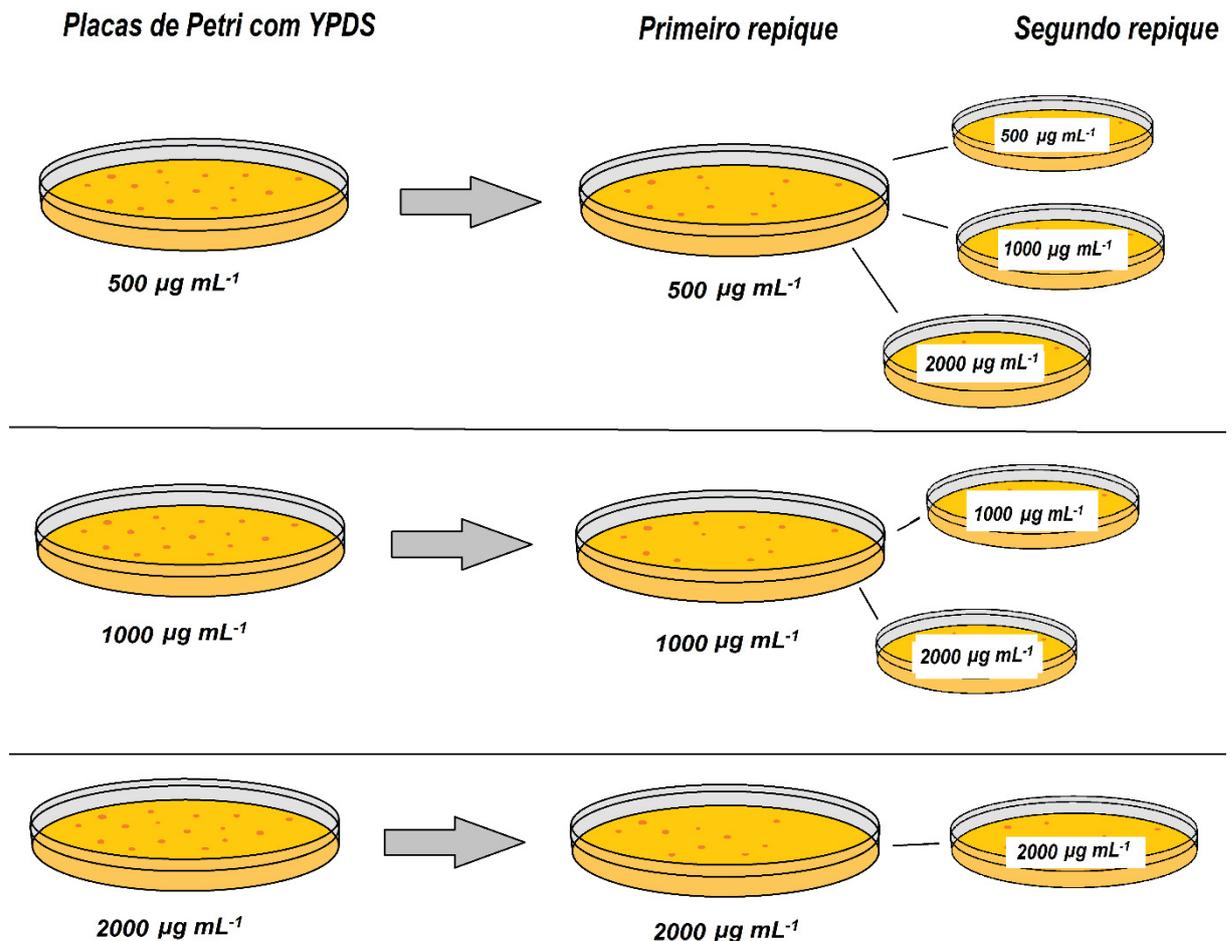


FIGURA 7 – ESQUEMA DE CULTIVOS SEQUENCIAIS EM PLACAS DE PETRI COM ZEOCINA PARA SELEÇÃO DE CLONES COM MULTIPLAS CÓPIAS

LEGENDA: As células eletroporadas foram recuperadas em placas com YPDS com concentrações crescentes de zeocina (500, 1000 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Primeiro repique: as colônias formadas foram repicadas em placas novas de YPD em suas respectivas concentrações de antibiótico. Segundo repique: as colônias formadas foram novamente repicadas em novas placas de YPD em suas respectivas concentrações de antibiótico e em concentrações maiores.

FONTE: A Autora (2021).

Através de placas de Petri contendo extrato de levedura, peptona, ágar e suplementadas com 1% (v/v) de tributirina (ANDERSON, 1939), foi realizada uma

triagem das colônias sobreviventes aos repiques consecutivos através da medição do diâmetro dos halos com régua (JIANG et al., 2005, 2008). Aqueles que apresentaram o maior halo foram selecionados para os testes de expressão. Após a expressão, com as amostras da fração extracelular dos cultivos de expressão, 10 µL foram adicionados em poços perfurados no ágar e o diâmetro total do halo foi medido com régua.

### 3.2.7 EXPRESSÃO EM *Pichia pastoris*

Após a seleção dos clones positivos, uma única colônia foi inoculada em 10 mL de YEPD e crescida a 30 °C por 12 h com agitação de 250 rpm. Em seguida, 0,1 mL desta cultura foi inoculado em 50 mL de YEPD em um Erlenmeyer de 250 mL, incubando-se a 30 °C, com agitação de 250 rpm. A cada 24 h foi retirada uma alíquota de 1 mL e centrifugada a 12100×g em microcentrífuga (MiniSpin, Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil) por 5 min. As células e a fração extracelular foram coletadas separadamente, e a fração extracelular teve sua atividade imediatamente analisada pelo método espectrofotométrico, usando palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) como substrato.

As alíquotas da expressão dos clones foram submetidas à quantificação de proteína (BRADFORD, 1976) e à eletroforese em gel SDS-PAGE (3.2.10). A fim de testar a melhor temperatura, os clones positivos foram expressos em meio YEPD, a 24 °C e 30 °C por até 96 h, realizando-se a retirada das alíquotas a cada 24 h. As alíquotas das expressões foram novamente analisadas pelo método de Bradford (1976).

Em seguida, as alíquotas das expressões nas temperaturas de 24 °C e 30 °C e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 h) foram avaliadas qualitativamente para atividade pela formação de halo de hidrólise. Após a seleção do clone com maior halo de hidrólise, este foi expresso em meio tampão fosfato 100 mM, pH 6,0 com incubação por 48 h a 30 °C. Em seguida, a enzima foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (3.2.9.). A determinação da atividade das frações purificadas foi feita pelo método espectrofotométrico, usando palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) como substrato (3.2.12).

### 3.2.8 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Após a expressão da lipase, a amostra foi centrifugada a  $1500\times g$  por 20 min e a fração extracelular foi separada das células. A fração extracelular contendo a lipase foi dialisada por 12 h (Tris-HCl 50 mM pH 7,0,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, NaCl 500 mM, glicerol 10% (v/v)) para ajustar o pH para purificação por cromatografia de afinidade e depois de dialisada adicionou-se o surfactante Igepal 630-CA 0,25% à amostra para melhorar a solubilidade da enzima.

As células foram ressuspendidas em 20 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, glicerol 10% (v/v)) e lisadas por ultrassom em banho de gelo (15 ciclos de pulsos de 15 s, com intervalos de 15 s) em um sonicador (Sonicator® XL 2020 – Heat Systems-Ultrasonics Inc., NY, USA). Em seguida, a fração com as células rompidas, denominada extrato bruto intracelular, foi centrifugada a  $1500\times g$  por 10 min para separação da fração solúvel (sem resto celular) e fração insolúvel (com resto celular), que foi descartada.

### 3.2.9 PURIFICAÇÃO DA LIPASE POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE

A purificação da lipase foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HiTrap Chelating HP 5 mL (GE Life Sciences, Uppsala, SWE) equipada com bomba peristáltica. O sobrenadante contendo a lipase foi injetado na coluna previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (tampão de diálise, 3.2.7.). Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de ligação (Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  2mM, imidazol 20 mM e glicerol 10% (v/v)), e eluída com tampão gradiente de imidazol (Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, imidazol 50, 100, 300, 500 mM e glicerol 10% (v/v)). As frações purificadas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

### 3.2.10 ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) foi realizada utilizando o método descrito por Laemmli, 1970, usando o gel de empilhamento de 5% (m/v) e o gel de separação de 12% (m/v) (acrilamida 40%, bisacrilamida 1,6%).

Para análise das amostras, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da amostra e 10  $\mu\text{L}$  do tampão de amostra, com aquecimento a 100 °C por 20 min, aplicando-se 10  $\mu\text{L}$  da

mistura em cada poço. A corrida foi realizada em um equipamento Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), por 1:20 h a 180 V. Em seguida, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 (0,05% (m/v)) e revelado com uma mistura de metanol:ácido acético:água (5:1:4 (v/v)). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -La (14,4 kDa) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK, Inglaterra).

### 3.2.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Para determinar a quantidade de proteínas nas amostras purificadas, foi utilizado o método de Bradford (1976). Cada amostra foi preparada em Eppendorf de 2 mL, adicionando-se 60  $\mu$ L de amostra, 40  $\mu$ L de NaCl e 1 mL do reagente Bradford (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). A mistura então foi agitada e incubada por 20 min à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, a amostra preparada foi transferida para a cubeta de vidro e a absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). O cálculo da concentração de proteínas foi feito a partir de curva de calibração com soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

### 3.2.12 ENSAIOS DE ATIVIDADE

A atividade lipolítica nas frações obtidas da expressão foi medida pela hidrólise palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), que se baseia na hidrólise do substrato pela enzima em meio aquoso contendo como surfactante Triton X-100 (WINKLER e STUCKMANN, 1979). A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, é seguida pela leitura das amostras em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1  $\mu$ mol  $\text{min}^{-1}$  de *p*NP. Os ensaios foram feitos em cubeta de 1 mL, adicionando-se 810  $\mu$ L de água destilada, 50  $\mu$ L de solução A ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  20 mmol  $\text{L}^{-1}$ , Triton X-100 (PA) 6% (v/v), Tris-HCl pH 7,5 1 mol  $\text{L}^{-1}$ , completando-se com água destilada) e 50  $\mu$ L de solução B (20 mmol  $\text{L}^{-1}$  de *p*NPP em isopropanol:acetonitrila (*i*-PrOH:MeCN, 4:1, v/v)) e homogeneizando-se após a adição de cada componente. Para a remoção da turbidez, a mistura foi aquecida em banho-

maria a 60 °C por 25 s ou até que a mistura ficasse transparente. Todas as soluções foram ambientadas a 37 °C para medição de atividade.

Para a dosagem de atividade pelo método titulométrico (STUER, JAEGER e WINKLER, 1986) foi utilizado um titulador automático tipo pHStat (Metrohm 718 Stat Titrino, Suíça). A reação é baseada na liberação de ácidos graxos durante a reação de hidrólise de triglicerídeos catalisada pela lipase e na titulação com NaOH. Para a medição de atividade de LipC12, foi utilizada a tributirina como substrato. A emulsão foi preparada misturando-se goma arábica (3%, m/v), CaCl<sub>2</sub> (2 mmol·L<sup>-1</sup>), tampão Tris-HCl (2,5 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,25) e NaCl (150 mmol·L<sup>-1</sup>) (TISS et al., 2001) e em seguida foi agitada durante 1 h em agitador mecânico. Um determinado volume de solução enzimática, dependente do tipo de ensaio, foi adicionado a 20 mL da emulsão, sob agitação magnética (300 rpm) no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado) a 37 °C, e a reação foi seguida durante 5 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a produção de 1 μmol/min de ácidos graxos nas condições do ensaio.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO NA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

Para a clonagem de LipC12, foram estudadas três construções (TABELA 4, 3.2.2, pág. 43), com His-tag na extremidade N-terminal (1000 pb) (I), C-terminal (903 pb) (II) e sem His-tag (937 pb) (III). Testaram-se cinco temperaturas de anelamento diferentes (55, 60, 65, 70 e 75 °C) para todas as construções e o dobro de DNA molde em relação ao utilizado na reação padrão (20 µL). A confirmação da amplificação dos genes se deu por visualização em gel de agarose (FIGURA 8).

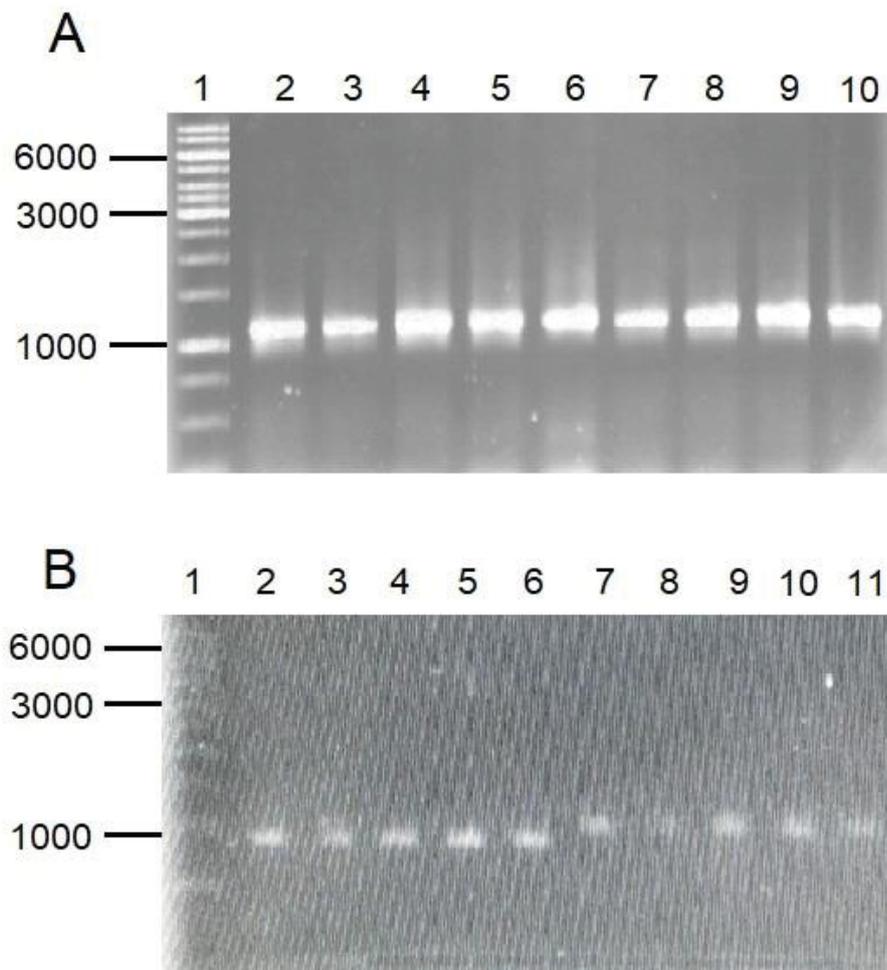


FIGURA 8 – GEL DE AGAROSE DA PCR DAS CONSTRUÇÕES DO GENE DA LIPASE LipC12

LEGENDA: A) Amplificação da construção I (LipC12 com His-tag N-terminal, 1000 pb) Linhas 2 e 3: 55 °C; 4 e 5: 60 °C; 6 e 7: 65 °C; 8 e 9: 70 °C; 10: 75 °C. B) Amplificação da construção III (LipC12 sem His-tag, 937 pb). Linha 2: 55 °C; 3: 60 °C; 4: 65 °C; 5: 70 °C; 6: 75 °C. Construção II (LipC12 com His-tag C-terminal, 903 pb) Linha 7: 55 °C; 8: 60 °C; 9: 65 °C; 10: 70 °C; 11: 75 °C. A linha 1 em A e B são os marcadores (1kb).

Para as três construções, as bandas do gel da Figura 8 A e B mostram que o DNA foi corretamente amplificado, apresentando-se na altura prevista para cada gene amplificado. As temperaturas de anelamento ideais para cada *primer* são indicadas pelo fabricante (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil). Para a construção I, o efeito da temperatura é sutil, apresentando bandas mais nítidas e mais espessas a partir da linha 4 (60 °C), indicando que temperaturas acima de 60 °C proporcionam melhor efeito no anelamento, visto que a temperatura ideal prevista para os *primers* desta construção fica entre 68 e 70 °C. Para a construção II, as temperaturas de 65 e 70 °C (linhas 9 e 10, respectivamente) amplificaram melhor, sendo que a temperatura ideal prevista para os *primers* fica entre 62 e 70 °C. Da mesma forma, para a construção III, as bandas mais nítidas foram as linhas 4, 5 e 6, cujo anelamento foi feito nas temperaturas de 65 °C, 70 e 75 °C, respectivamente, sendo as temperaturas de anelamento ideais previstas para esses *primers* entre 60 e 70 °C.

Após a obtenção do DNA, foram realizadas as reações de restrição e ligação, como descrito no item 3.2.3, para posterior clonagem em *E. coli* (TOP10).

#### 4.2 CLONAGEM EM *Escherichia coli*

As três construções foram clonadas em *E. coli* (TOP10). Entretanto, para as construções II e III não foram obtidos clones positivos. Na placa do controle (plasmídeo linear) ocorreu o crescimento de diversas colônias (APÊNDICE, FIGURA 1), sendo que não era o esperado, pois o plasmídeo deveria estar linear. Isso possivelmente aconteceu porque o vetor não foi totalmente digerido pelas enzimas de restrição. Os plasmídeos podem ter sido digeridos somente com uma enzima, sendo religados pela T4 Ligase, ou plasmídeos circulares não digeridos podem ter sido transformados. Para verificar se havia algum plasmídeo com o inserto de interesse nas colônias crescidas em meio LA, foi realizada a extração plasmidial de 20 colônias selecionadas das placas, incluindo as colônias da placa controle. Em seguida, 2 µL dos plasmídeos extraídos das colônias transformantes foram adicionados a pequenas reações de restrição com as enzimas NotI e KpnI para verificar a liberação do gene de interesse. No entanto, nenhuma banda correspondente ao gene foi observada. Não foi obtido sucesso na clonagem das construções II (LipC12 com His-tag C-terminal) e III (LipC12 sem His-tag).

Os controles descritos da Tabela 5 (3.2.3, pág. 46) foram realizados para a construção I (LipC12 com His-tag N-terminal), a fim de analisar e evitar os problemas ocorridos nas clonagens anteriores que impediram a obtenção de um clone para as construções II e III. A partir destes clones, foi observado que as células quimiocompetentes de *E. coli* (TOP10) e o antibiótico estavam viáveis, pois ocorreu o crescimento de várias pequenas colônias isoladas nas placas de Petri (APÊNDICE, FIGURA 3). As enzimas de restrição digeriram de forma eficiente o plasmídeo pGAPZ $\alpha$ , apresentando cinco colônias para a enzima KpnI, e sete colônias para a enzima NotI, enquanto o plasmídeo linearizado por ambas as enzimas teve o crescimento de apenas quatro colônias. A enzima T4 Ligase mostrou eficiência ao religar o plasmídeo tratado com apenas uma das enzimas de restrição – que possui as extremidades coesivas – apresentando crescimento celular semelhante as células contendo o plasmídeo pGAPZ $\alpha$  circular. Como sugerido pelo manual de expressão em *P. pastoris* (Manual de usuário, Invitrogen, 2010), foram espalhadas em placas de Petri 10  $\mu$ L e 100  $\mu$ L das células transformadas de *E. coli*. Após o período de incubação, a placa com 10  $\mu$ L apresentou colônias maiores, mais isoladas e em menor quantidade quando comparadas com as da placa de 100  $\mu$ L.

Como foram obtidos os resultados esperados em todos os controles, foi realizada a seleção de clones positivos a partir da placa da placa com 10  $\mu$ L de células transformadas. Desta placa, 14 colônias foram selecionadas aleatoriamente para realização da extração plasmidial pelo método de lise alcalina. A fim de analisar os clones, as amostras dos plasmídeos foram analisadas em gel de agarose.

Dentre os clones selecionados, um dos plasmídeos apresentou padrão de bandas diferente (FIGURA 9A, Linha 4), e por isso, uma reação de restrição foi realizada para linearização do plasmídeo a fim de verificar a presença do gene *lipC12*. Os plasmídeos foram primeiramente linearizados com a enzima NotI. As amostras foram analisadas novamente em gel de agarose e a amostra da linha 5' (FIGURA 9B) apresentou uma banda correspondente à aproximadamente 4000 pb, provavelmente de um clone positivo, uma vez que o plasmídeo contendo o gene *lipC12* com His-tag na extremidade N-terminal possui 4122 pb.

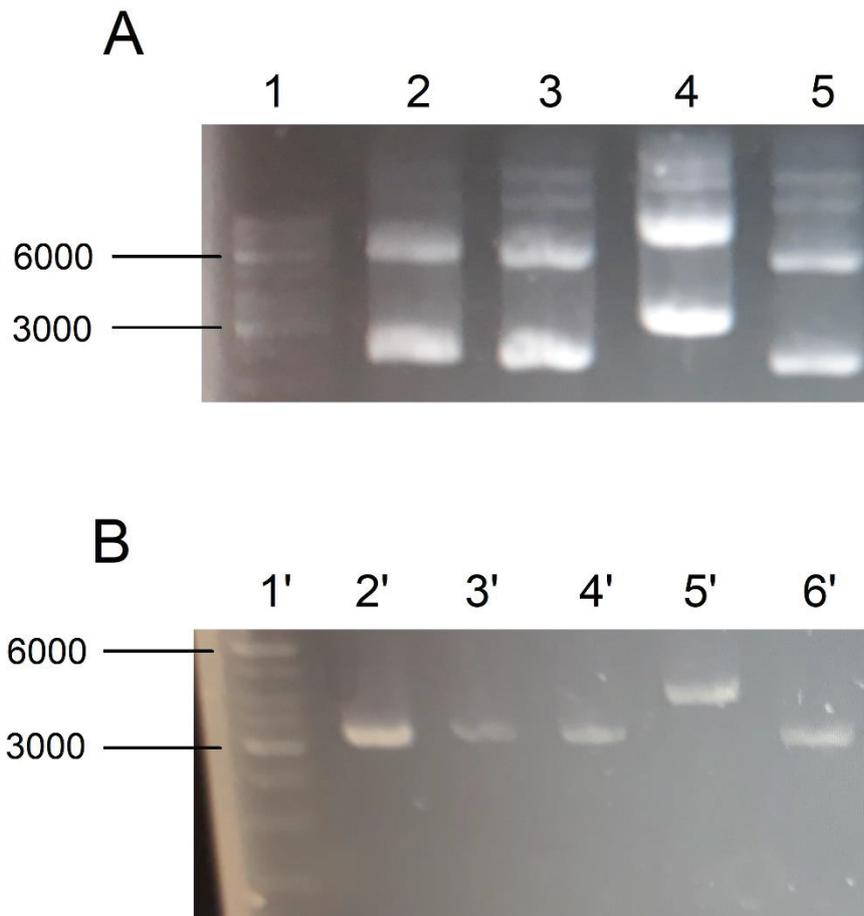


FIGURA 9 – GEL DE AGAROSE PARA VISUALIZAÇÃO DE POSSÍVEIS PLASMÍDEOS pGAPZ $\alpha$  CONTENDO O GENE DE LipC12 COM His-tag NA EXTREMIDADE N-terminal

LEGENDA: Gel de agarose (1%) A) Linhas 2, 3 e 5: vetores sem o inserto. 4: clone positivo. B) Plasmídeos linearizados com a enzima NotI. Linha 2': vetor pGAPZ $\alpha$  vazio; 3', 4' e 6': plasmídeos sem inserto, 5': plasmídeo com inserto de LipC12. Linhas 1 e 1': marcador (1 kb).

Os clones foram, então, submetidos a uma nova reação de restrição para liberação do gene, dessa vez com a enzima KpnI, certificando-se novamente que o gene se apresentava ligado ao plasmídeo. As amostras foram submetidas a uma nova corrida em gel de agarose. A reação de restrição do plasmídeo positivo apresentou duas bandas: uma próxima ao marcador de 3000 pb, correspondente ao pGAPZ $\alpha$  linearizado, e outra próxima ao marcador de 1000 pb, correspondente ao gene *lipC12* (FIGURA 10). Dessa forma, esse plasmídeo foi selecionado para a clonagem em *P. pastoris* e foi denominado pLipC12N $\alpha$ .

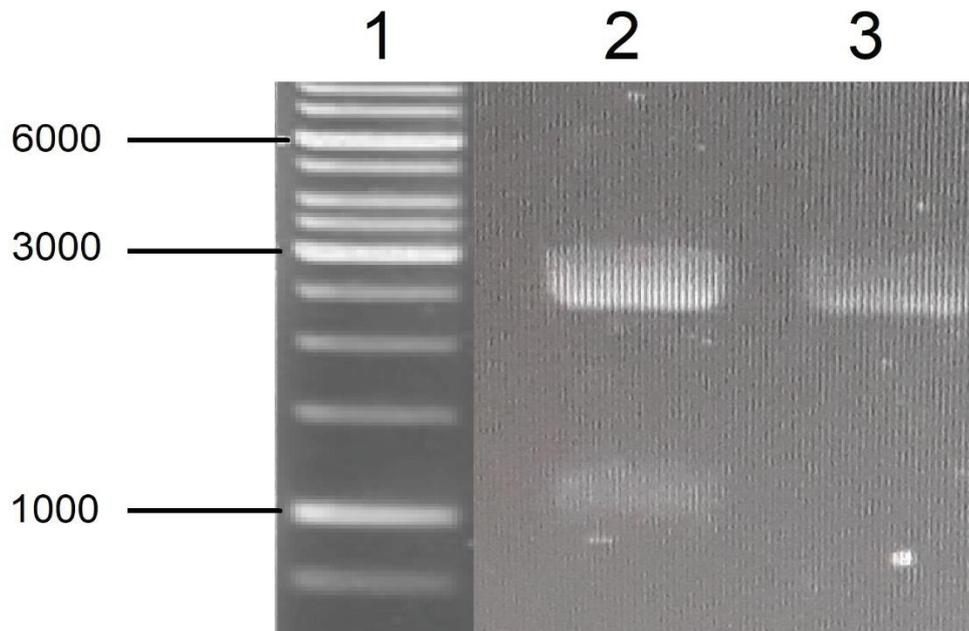


FIGURA 10 – GEL DE AGAROSE PARA A RESTRIÇÃO DE LIBERAÇÃO DO INSERTO DO PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$

LEGENDA: Gel de agarose 1% com o plasmídeo pLipC12N $\alpha$  tratado com NotI e KpnI para visualização do gene *lipC12* e confirmação de clone positivo. Linha 1: Marcador 1 kB; 2: plasmídeo pLipC12N $\alpha$  tratado com as duas enzimas apresentando a banda do vetor linearizado pGAPZ $\alpha$  na altura de aproximadamente 3000 pb, e a banda do gene *lipC12* com aproximadamente 1000 pb; 3: vetor linearizado pGAPZ $\alpha$ .

#### 4.3 CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *Pichia pastoris*

Nos cultivos sucessivos em placas de Petri contendo zeocina, inicialmente 14 colônias foram selecionadas aleatoriamente, das quais sete apresentaram visualmente crescimento celular em cultivo submerso, e destas, após novo cultivo em placas de Petri, apenas três apresentaram formação de colônias.

A ausência de crescimento dos clones durante as etapas de cultivos sucessivos em presença de antibiótico indica que pode ter ocorrido a perda do plasmídeo durante os eventos de replicação celular (PRIMROSE e EHRLICH, 1981). Durante o cultivo, células sem o plasmídeo aparecem, coexistindo e competindo com aquelas que possuem o plasmídeo e como o crescimento de células com plasmídeo é menor devido ao acréscimo de carga metabólica ao hospedeiro, isso pode acarretar na perda das células que possuem o gene de interesse (ZHANG et al., 1996; FRIEHS, 2004). Por isso, a purificação dos clones, realizada com cultivos sucessivos na presença de

zeocina, é uma etapa essencial, já que nas etapas de expressão não é feito o uso de antibiótico.

#### 4.4 EXPRESSÃO DOS CLONES COM CÓPIA ÚNICA EM *Pichia pastoris*

Os três clones que apresentaram crescimento na etapa anterior foram expressos em *P. pastoris* por 96 h e a cada 24 h uma alíquota de 1 mL foi retirada para análise dos níveis de expressão. Um controle foi realizado com *P. pastoris* sem a inserção de plasmídeo. Os clones foram denominados *uni4*, *uni5* e *uni6*. A quantidade de proteína expressa foi analisada pelo método de Bradford (FIGURA 11).

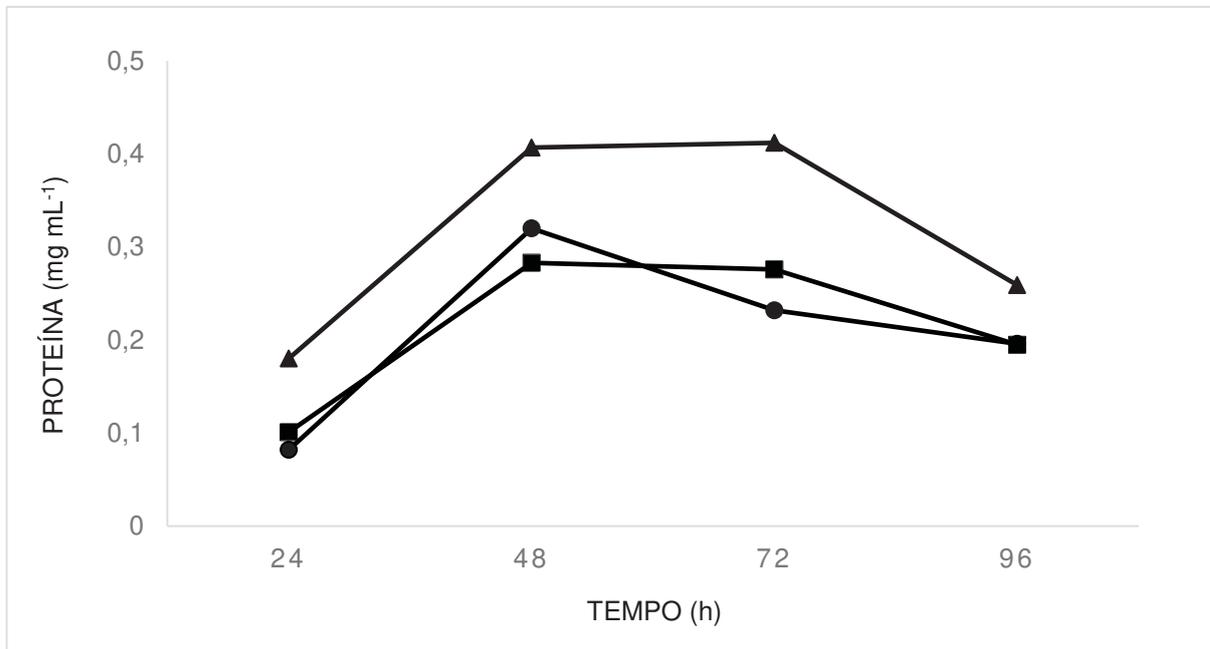


FIGURA 11 – CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DOS CLONES DE LipC12 DE CÓPIA ÚNICA

LEGENDA: Resultado da quantificação de proteínas das alíquotas retiradas a cada 24 h da fração extracelular da expressão dos três clones em *P. pastoris*. Clone *uni4*: ●; *uni5*: ■; *uni6*: ▲.

O controle em todas as alíquotas apresentou valores abaixo de 0,04 mg mL<sup>-1</sup>, já nos clones contendo o plasmídeo pLipC12Nα, os valores foram acima de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. Com 48 h, os níveis de secreção de proteínas foram maiores, com 0,3 mg mL<sup>-1</sup> para o clone *uni4*, 0,2 mg mL<sup>-1</sup> para o clone *uni5* e 0,4 mg mL<sup>-1</sup> para o clone *uni6*. O decréscimo nos níveis de produção de proteína depois de 48 h pode ser causado pela ação de proteases extracelulares, ou proteases intracelulares que foram liberadas no

meio de cultivo após a lise celular provavelmente causada pela diminuição da viabilidade celular devido ao decréscimo de nutrientes disponíveis no meio de cultivo (KANG et al., 2000; ZHANG et al., 2007; LAN et al., 2016).

Em todas as alíquotas do meio de cultivo da expressão dos clones *uni4*, *uni5* e *uni6* não foi detectada atividade pelos métodos de hidrólise do pNPP (espectrofotométrico) e de hidrólise da tributirina (titulométrico, em pH-Stat). É provável que a baixa concentração de proteínas mostrada na Figura 11 (máximo de  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) não tenha sido suficiente para a detecção de atividade por estes métodos.

Assim sendo, para verificar se LipC12 estava sendo expressa, foi realizado o cultivo dos clones em placas de Petri suplementadas com tributirina. Todos os clones contendo o plasmídeo pLipC12N $\alpha$  apresentaram halo de hidrólise, com o diâmetro do halo de  $0,95 \pm 0,12 \text{ cm}$ , confirmando a existência de atividade, enquanto o clone-controle, *P. pastoris* sem inserto, não apresentou halo de hidrólise (FIGURA 12).

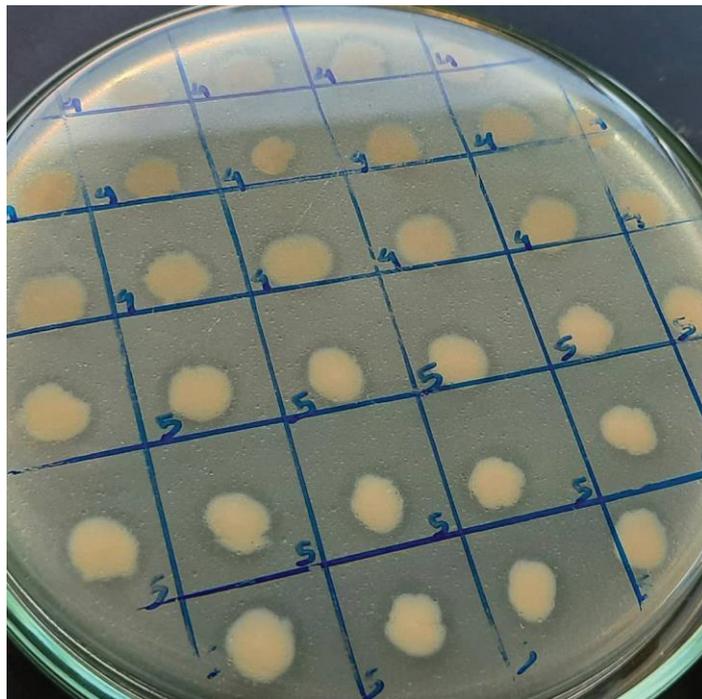


FIGURA 12 – CULTIVO DOS CLONES DE CÓPIA ÚNICA CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$  EM PLACA DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA

LEGENDA: Placas de Petri com meio ágar-tributirina (1%). As colônias selecionadas aleatoriamente foram repicadas a partir de placas contendo  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina, e incubadas por 5 dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Devido aos baixos valores de expressão e de atividade, foi realizada uma nova eletroporação para obtenção de clones com múltiplas cópias do plasmídeo pLipC12N $\alpha$ .

#### 4.5 CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE CLONES COM MÚLTIPLAS CÓPIAS EM *Pichia pastoris*

O plasmídeo pLipC12N $\alpha$  foi utilizado para a obtenção de clones com múltiplas cópias. Os eventos de inserção de múltiplas cópias do plasmídeo no genoma de *P. pastoris* ocorre de forma espontânea, sendo que para a seleção de um clone com múltiplas cópias, as células eletroporadas foram diretamente espalhadas em placas de Petri contendo concentrações crescentes de zeocina.

Após o período de incubação das placas com meio YPDS contendo zeocina, as colônias crescidas foram selecionadas e repicadas em novas placas contendo YPD com suas respectivas concentrações de antibiótico, e para o segundo repique, as colônias resistentes foram inoculadas em novas placas YPD contendo suas respectivas concentrações de zeocina e em concentrações crescentes, como descrito em métodos (3.2.6., pág. 49, FIGURA 7). As colônias resistentes ao segundo cultivo estão apresentadas na Figura 13.

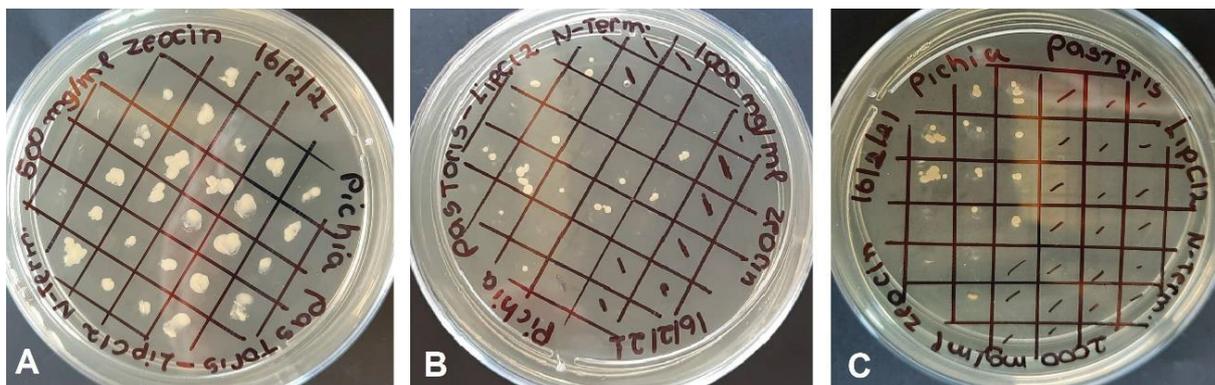


FIGURA 13 – SEGUNDO CULTIVO DE CLONES CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$  EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ZEOCINA PARA SELEÇÃO DE CLONES COM MÚLTIPLAS CÓPIAS

LEGENDA: Placas YPD contendo zeocina do segundo repique de seleção de colônias, incubadas por um dia, a 30 °C. A) Colônias resistentes a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina. B) Colônias resistentes a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina. C) Colônias resistentes a 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina.

É possível observar que diversos quadrantes não apresentaram crescimento celular no segundo repique, tanto nas mesmas concentrações, quanto em concentrações maiores de zeocina. Ao todo, após os repiques, restaram 26 clones crescidos em  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 17 clones crescidos em  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 14 clones crescidos em  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina.

#### 4.6 EXPRESSÃO DOS CLONES COM MÚLTIPLAS CÓPIAS EM *Pichia pastoris*

Após a obtenção dos clones de múltiplas cópias (26 de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 17 de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 14 de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina), foi realizado, primeiramente, o cultivo destes em placas suplementadas com tributirina para determinação qualitativa da atividade (FIGURA 14). Os clones resistentes a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina apresentaram diâmetro do halo de  $1,02 \pm 0,1 \text{ cm}$ , os clones resistentes a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$   $1,16 \pm 0,1 \text{ cm}$  e os clones resistentes a  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$   $1,14 \pm 0,12 \text{ cm}$  de diâmetro do halo.

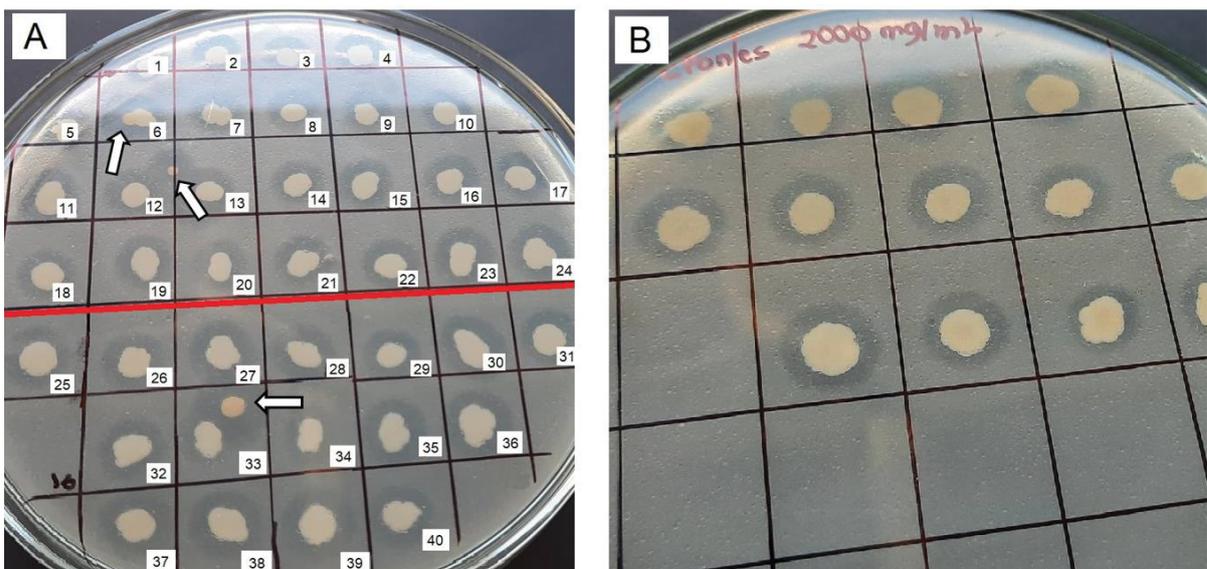


FIGURA 14 – CULTIVO DOS CLONES MÚLTIPLAS CÓPIAS CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12n $\alpha$  EM PLACAS DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA.

LEGENDA: **A)** Clones resistentes a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (quadrante 1 ao 24) e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (quadrante 25 ao 40) **B)** Clones resistentes a  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Dentre os transformantes, três colônias, indicadas na Figura 14A pelas setas, apresentaram os maiores halos, sendo os clones 6 e 12 resistentes a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com aproximadamente  $0,7 \text{ cm}$  de diâmetro, e o clone 33, resistente a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,

que apresentou 1,3 cm de diâmetro. Esses três clones foram então selecionados e repicados em uma nova placa suplementada com tributirina, juntamente com os clones resistentes a  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que foram selecionados posteriormente de acordo com o diâmetro do halo (FIGURA 15). Além disso, os clones 6, 12 e 33 foram repicados em meio YEPD contendo zeocina – cada um em sua concentração respectiva indicada na placa – para verificar se não poderiam ser contaminantes, pois os clones 12 e 33 apresentaram crescimento fora dos quadrantes e com uma coloração diferente. O clone 33 é um clone resistente a  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina e provavelmente contém o maior número de cópias do plasmídeo.

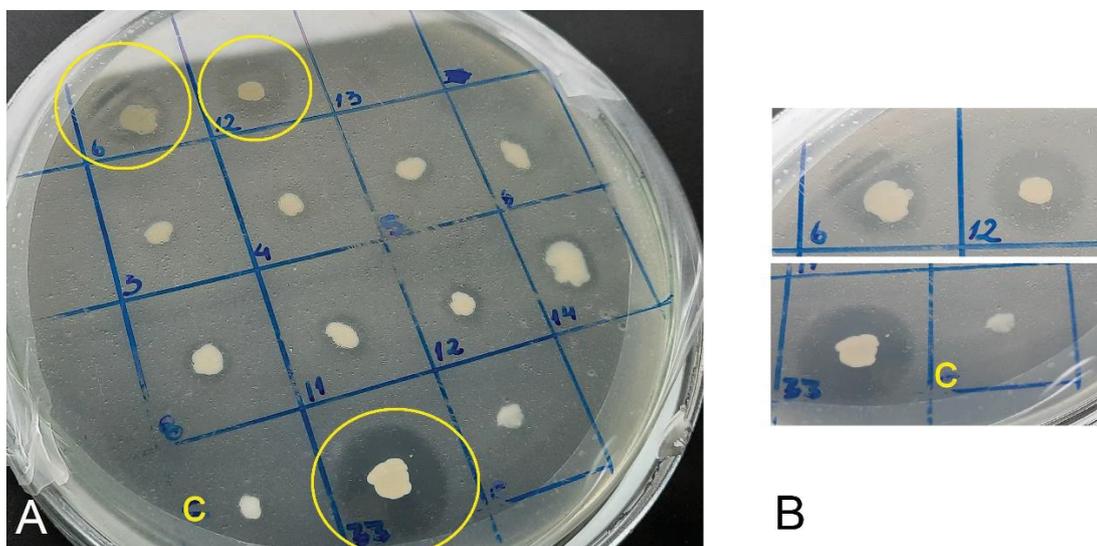


FIGURA 15 – CULTIVO DOS CLONES MÚLTIPLAS CÓPIAS CONTENDO O PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$  EM PLACA DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA

LEGENDA: Repique dos clones que apresentaram maior halo nas placas da Figura 15. Destacados pelo círculo em amarelo são os clones 6, 12 e 33 que apresentaram maiores halos. A letra C em amarelo nas fotos indica o controle.

Os clones 6, 12 e 33 foram então expressos em meio YEPD por 72 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (FIGURA 16) e foram denominados *multi6*, *multi12* e *multi33*. Os dois primeiros apresentaram um teor de proteínas de, respectivamente,  $0,14 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,42 \text{ mg mL}^{-1}$  em 72 h de cultivo. Em contrapartida, o clone *multi33* apresentou o maior nível de secreção de proteínas:  $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$  em 72 h). Apesar da quantidade de proteínas secretada do clone *multi33* ser maior do que a dos outros clones, ainda não foi possível detectar atividade no sobrenadante de cultura deste clone pelo método de hidrólise de pNPP.

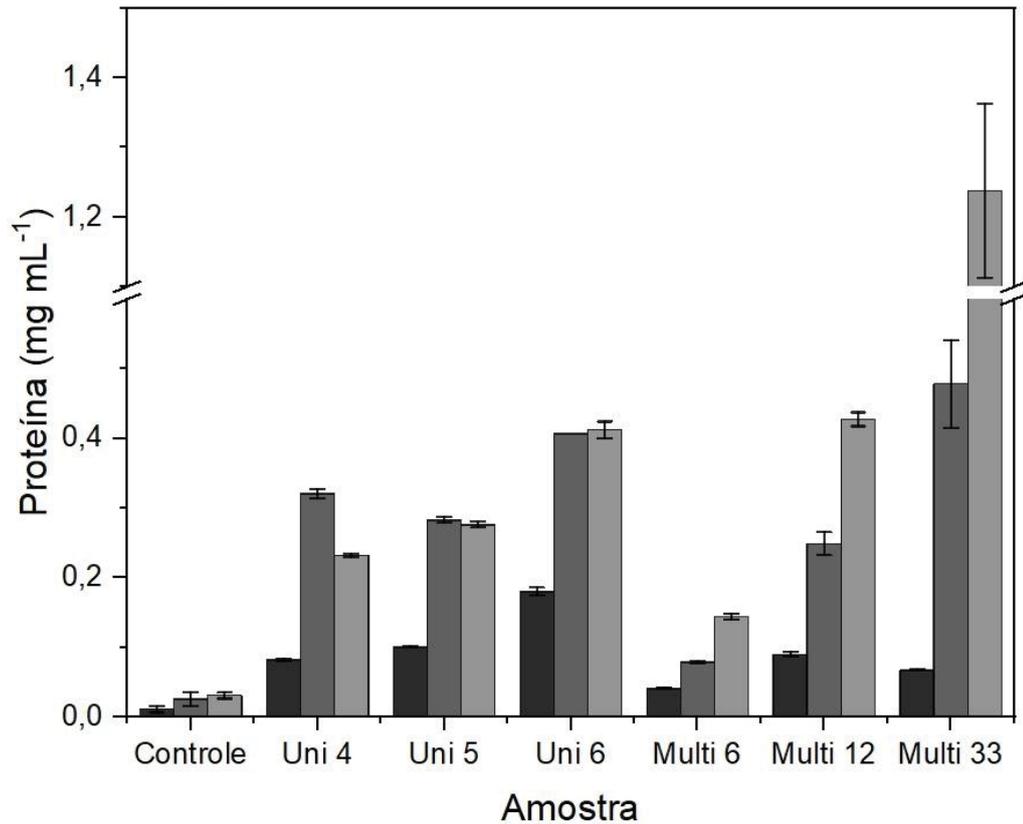


FIGURA 16 – CINÉTICA DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS DOS CLONES DE LipC12 CÓPIA ÚNICA E MÚLTIPLAS CÓPIAS

LEGENDA: Resultado da quantificação de proteínas das alíquotas retiradas a cada 24 h da fração extracelular da expressão dos clones de cópia única *uni4*, *uni5* e *uni6* e dos clones de múltiplas cópias *multi6*, *multi12* e *multi33*, a 30 °C por 72 h. As barras pretas indicam 24 h de expressão; barras cinza-escuro 48 h; barras cinza-claros: 72 h.

#### 4.7 ANÁLISE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR SDS-PAGE

As amostras do sobrenadante da expressão dos clones *uni6*, *multi6*, *multi12* e *multi33* foram analisadas por SDS-PAGE. O clone *multi6* não apresentou banda visível no gel em ambos os tempos de cultivo (FIGURA 17 A, B – Linhas 2 e 2'), provavelmente devido à baixa concentração de proteína encontrada no sobrenadante para este clone (FIGURA 16). A banda de proteína do sobrenadante da expressão do clone *multi33* foi a que apresentou a melhor visualização no gel com 72 h de expressão (FIGURA 17 B – Linha 4'), o que está de acordo com a maior concentração de proteína encontrada para este clone (FIGURA 16).

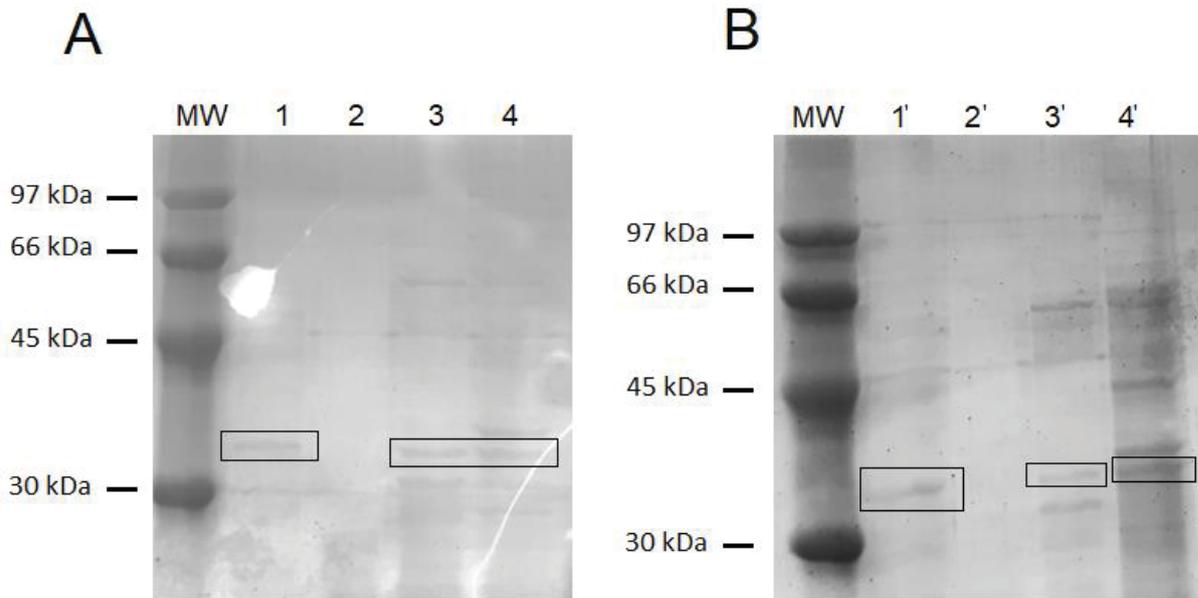


FIGURA 17 – ELETROFORESE SDS-PAGE DA FRAÇÃO EXTRACELULAR DA EXPRESSÃO DOS DIFERENTES CLONES CONTENDO PLASMÍDEO pLipC12N $\alpha$  EXPRESSOS EM *Pichia pastoris*

LEGENDA: A) Amostras dos sobrenadantes com 48 h de expressão. B) Amostras dos sobrenadantes com 72 h de expressão. Linhas: 1 e 1') clone *uni6*; 2 e 2') clone *multi6*; 3 e 3') clone *multi12*; 4 e 4') clone *multi33*. Os retângulos indicam a banda da lipase LipC12. MW: marcador de peso molecular.

Para obtenção e análise do extrato bruto intracelular, células da expressão do clone *multi33* e o do controle (*P. pastoris* sem o plasmídeo) foram sonicadas e o material foi submetido à centrifugação. Foram obtidas duas frações: a fração solúvel (sem restos celulares) e a fração insolúvel (restos celulares), que foi descartada. As frações foram analisadas por SDS-PAGE (FIGURA 18).

Quando expressa em *E. coli* com a His-tag na região N-terminal, LipC12 apresenta peso molecular de 33,4 kDa (GLOGAUER et al, 2011). A mesma sequência de aminoácidos foi clonada no vetor pGAPZ $\alpha$ , mas quando a proteína é expressa por *P. pastoris*, ela apresenta o fator  $\alpha$ , que é eliminado durante a secreção e que lhe confere um peso adicional de 9,3 kDa. Portanto, antes de passar pela maquinaria de secreção, LipC12 apresenta massa molecular teórico de 44,7 kDa (calculada pelo ExPASy Server). Quando secretada, ocorre a clivagem no sítio Kex2 (FIGURA 6, 4.2.5., pág. 35), diminuindo a massa molecular teórica para 35,5 kDa (calculada pelo ExPASy Server), que é semelhante ao da proteína expressa em *E. coli*.

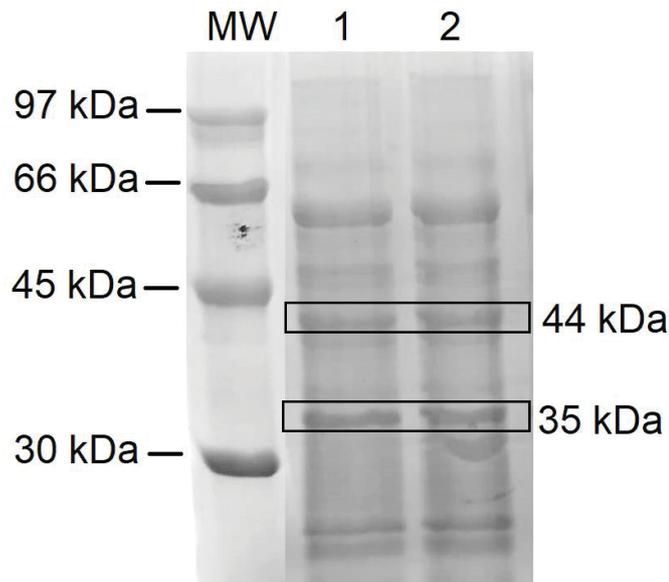


FIGURA 18 – ELETROFORESE SDS-PAGE DA FRAÇÃO INTRACELULAR DA EXPRESSÃO CLONE *MULTI33*

LEGENDA: Linha 1: Células da expressão do clone *multi33* que foram lisadas para rompimento celular (extrato bruto); 2: Extrato bruto centrifugado para remoção dos restos celulares. As possíveis bandas de LipC12 estão indicadas pelos retângulos, sendo a provável banda da LipC12 antes de ser secretada, obtida no material intracelular, com aproximadamente 44 kDa, e a provável banda após a secreção com aproximadamente 35 kDa.

Como se esperava, a amostra do sobrenadante extracelular do controle (*P. pastoris* sem inserto) não apresentou bandas. A presença de bandas de LipC12 com 35,5 kDa, presentes na amostra do sobrenadante intracelular pode ser devido à presença residual de sobrenadante extracelular.

Muitos fatores podem influenciar na expressão de proteínas heterólogas, sendo um dos mais importantes a temperatura de incubação e o pH do meio de cultivo. Em *E. coli*, a expressão de LipC12 ocorre através da indução por IPTG a 20 °C, e em *P. pastoris* a expressão ocorre constitutivamente a 30 °C. Além disso, o pH do meio de expressão por um longo tempo (entre 9 e 10, por 48 h) pode influenciar no correto enovelamento da lipase. Diferentes proteínas heterólogas apresentam necessidade de pH diferente para seu correto enovelamento e o pH ideal pode inativar as proteases (ZHANG et al., 2007). Assim como o pH, a temperatura pode influenciar diretamente na produção e expressão de lipases ativas. A temperatura ideal do crescimento de *P. pastoris* é de 30 °C, visto que acima de 32 °C pode ocorrer a morte celular e prejudicar a expressão das proteínas (ZHANG et al., 2007). Temperaturas mais baixas podem

levar à diminuição da morte celular, o que também diminuiria a presença de proteases no meio de cultivo, além de poder proporcionar melhor enovelamento e estabilidade para a lipase (HONG et al., 2002).

Por isso, para a expressão do clone *multi33*, que apresentou maior halo de hidrólise em tributirina e maiores níveis de secreção de proteínas, foram estudados os efeitos da temperatura e do pH.

#### 4.8 EFEITO DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DE LipC12 A PARTIR DO CLONE *MULTI33*

O clone de múltiplas cópias *multi33* foi expresso a 24 °C (FIGURA 19) para comparação com resultados anteriores, nos quais foi utilizada a temperatura de 30 °C. A 24 °C, o clone apresentou secreção ligeiramente menor de LipC12 em 96 h, (1,1 mg mL<sup>-1</sup>), quando comparada com a expressão a 30 °C, que em 72 h já apresentou 1,2 mg mL<sup>-1</sup>.

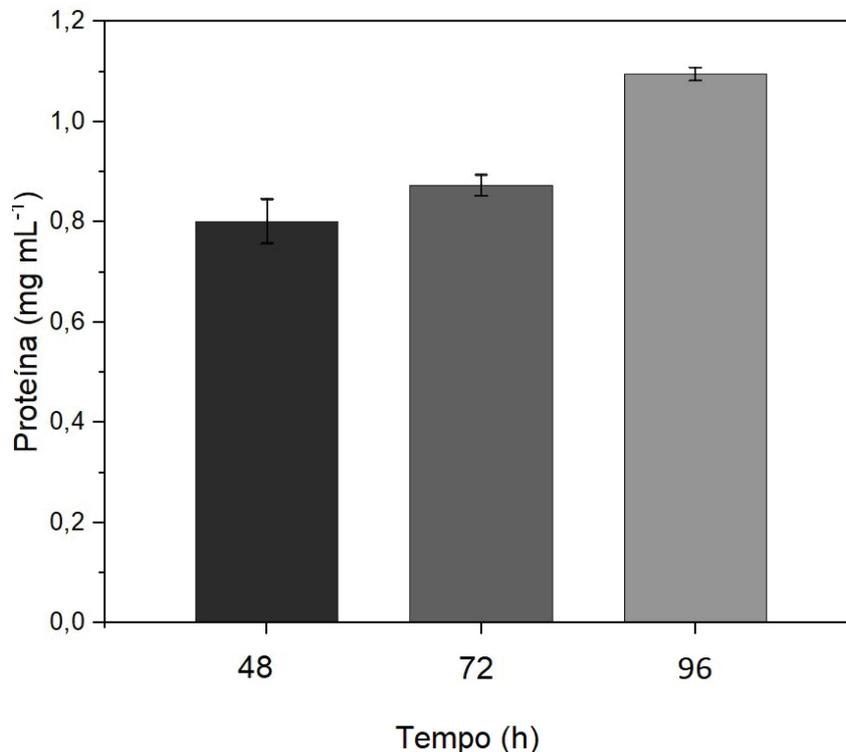


FIGURA 19 – CINÉTICA DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS DO CLONE DE LipC12 *MULTI33* EXPRESSO A 24 °C

LEGENDA: Resultado da quantificação de proteínas das alíquotas retiradas a cada 24 h da fração extracelular da expressão do clone *multi33* a 24 °C por 96 h.

Diferentemente das expressões anteriores, em que a partir de 48 ou 72 h ocorre o decréscimo na secreção de proteínas, ao expressar o clone *multi33* a 24 °C, o nível de secreção aumentou até 96 h. A diminuição da temperatura pode promover o melhor enovelamento das proteínas pela redução de sua síntese, o que diminui a resposta de estresse do retículo endoplasmático e aumenta a viabilidade celular (ZHONG et al., 2014).

Os sobrenadantes extracelulares dos cultivos a 24 °C foram submetidos à dosagem de atividade enzimática pelo método do *p*NPP, porém não houve atividade. Para verificar se as amostras das expressões de LipC12 realmente não apresentavam atividade, a fração extracelular das expressões dos clones *uni6*, *multi6*, *multi12*, *multi33* expressos a 30 °C, e o clone *multi33* expresso a 24 °C, em todos os tempos de cultivo, foram inoculados em uma placa de Petri suplementada com tributirina (FIGURA 20).

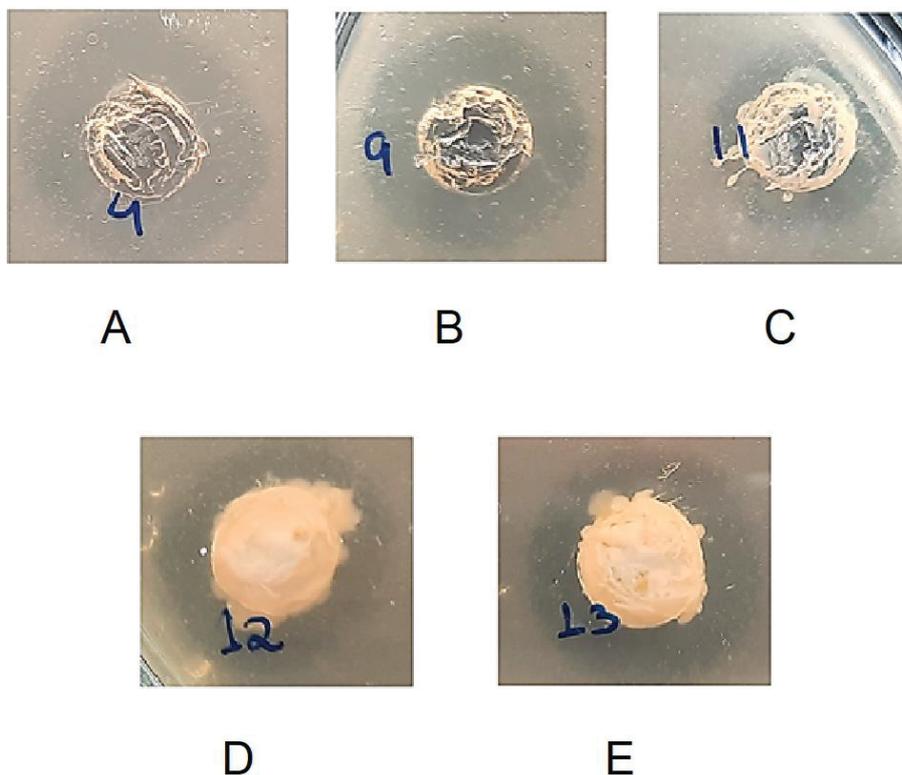


FIGURA 20 – FORMAÇÃO DE HALO DE HIDRÓLISE EM PLACAS DE PETRI CONTENDO ÁGAR-TRIBUTIRINA DA FRAÇÃO EXTRACELULAR DO CLONE *MULTI33* EXPRESSO A 24 E 30 °C

LEGENDA: Foram inoculados 10 µL de cada amostra nos poços cavados no ágar, e incubados por 4 dias a 30 °C. A) a 30 °C, 48 h. B) 30 °C, 72 h. C) 24 °C, 48 h. D) 24 °C, 96 h. E) 24 °C, 72 h.

Os clones *multi6* e *multi12* não apresentaram halos nas placas com tributirina, enquanto o clone *uni6* apresentou halo visível de 1,5 cm de diâmetro da expressão a 72 h. A ausência de formação de halo após a expressão pode ter ocorrido pelo enovelamento incorreto da proteína pelas condições de expressão não serem as ideais para a lipase.

Em contrapartida, o clone *multi33* apresentou halo em todos os tempos e temperaturas de expressão, mostrando maior halo quando a proteína foi expressa a 30 °C (FIGURA 20 A, B). Além disso, apesar de os níveis de proteína secretados terem sido maiores em 72 h a 30 °C, o maior halo teve 2,4 cm de diâmetro com 48 h de expressão a 30 °C, e 1,8 cm de diâmetro com 72 h de expressão (FIGURA 20 A, b). Isso indica que *P. pastoris* pode estar secretando outras proteínas além de LipC12, o que aumentou consideravelmente os teores de proteína, ou que, apesar de a levedura estar secretando mais LipC12, elas não estavam corretamente enoveladas.

#### 4.9 PURIFICAÇÃO DO SOBRENADANTE DE EXPRESSÃO E DOSAGEM DE ATIVIDADE

Aproximadamente 40 mL do sobrenadante extracelular do meio de expressão do clone *multi33* foram dialisados para troca de meio e ajuste de pH, e em seguida, a amostra foi purificada por cromatografia de afinidade em 5 mL de tampão de purificação. Após a purificação, LipC12 ficou na fração de 300 mM do gradiente de imidazol (FIGURA 21). A fração purificada e concentrada apresentou 0,015 mg mL<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade específica de hidrólise pelo método do *p*NPP, determinada com 500 µL da fração purificada da enzima foi de  $6,1 \pm 0,1$  U mg<sup>-1</sup>. Entretanto, não foi detectada atividade em pH-Stat pelo método titulométrico com tributirina como substrato, mesmo utilizando-se 2 mL de amostra purificada, provavelmente pelo baixo teor de proteína no meio.

Apesar de não ter apresentado atividade quando testada diretamente do sobrenadante da expressão, LipC12 mostrou atividade contra *p*NPP apenas após a purificação, apesar de baixa quando comparada a lipase expressa em *E. coli*, que tem atividade de 196 U mg<sup>-1</sup>. Isso provavelmente ocorreu porque a enzima purificada estava em pH ideal (7,5).

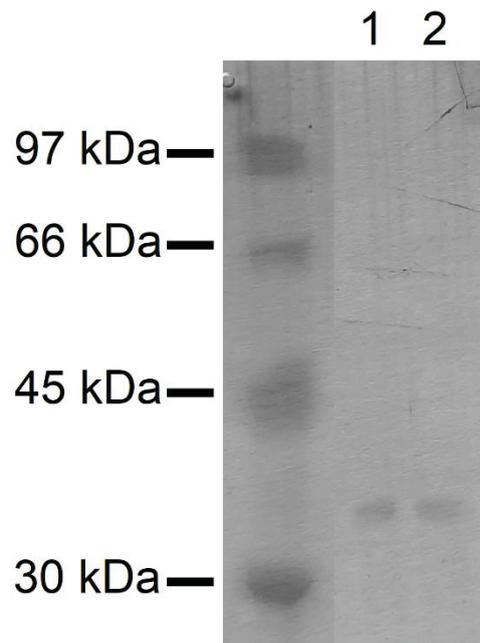


FIGURA 21 – ELETROFORESE SDS-PAGE DE LipC12 PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

LEGENDA: Colunas 1 e 2: fração de 300 mM do gradiente de imidazol da purificação de LipC12 por cromatografia de afinidade, apresentando banda na altura aproximada de 35 kDa. MW: marcador de peso molecular.

#### 4.10 EFEITO DO pH NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE LipC12 EXPRESSA A PARTIR DO CLONE *MULTI33*

O clone *multi33* foi expresso em meio YEPD com tampão fosfato, de maneira que o pH do meio permaneceu em 7,5 a 30 °C por 48 h. Neste tempo, o teor de proteínas foi de 0,270 mg mL<sup>-1</sup>. A atividade foi medida diretamente no sobrenadante da expressão, sem purificação. Em pH-Stat a amostra não apresentou atividade, mesmo quando foram utilizados 5 mL da amostra e também não apresentou atividade significativa na hidrólise do pNPP.

A amostra do sobrenadante da expressão do clone *multi33* foi então purificada. A LipC12 purificada apresentou um teor de proteínas baixo, de 0,001 mg mL<sup>-1</sup> e 3,87 ± 0,07 U mg<sup>-1</sup> de atividade usando 200 uL de amostra, em uma reação de 5 min. Para comparação da atividade com o halo de hidrólise, o sobrenadante e amostra purificada foram inoculados em placas de Petri com tributirina e incubados por 5 dias a 30 °C (FIGURA 22).

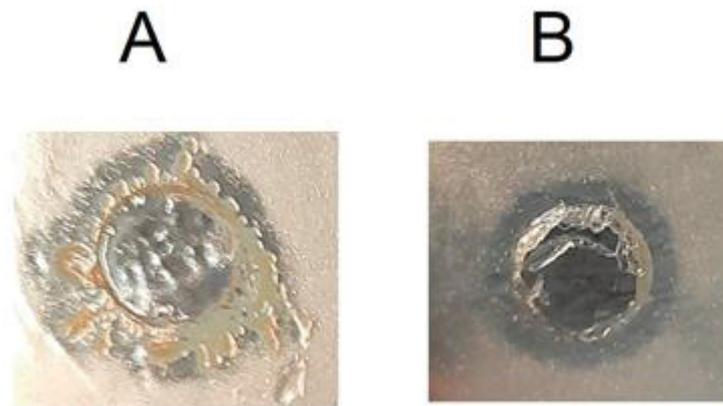


FIGURA 22 – FORMAÇÃO DE HALO DE HIDRÓLISE EM PLACAS DE PETRI COM ÁGAR-TRIBUTIRINA DA FRAÇÃO EXTRACELULAR E DA FRAÇÃO PURIFICADA DO SOBRENADANTE DO CLONE *MULTI33* EXPRESSO EM TAMPÃO FOSFATO

LEGENDA: Foram inoculados 10  $\mu$ L das frações extracelular e da lipase purificada em poços cavados no ágar. A) Fração extracelular. A presença de colônias se deu provavelmente pela presença de células na fração que não foram totalmente separadas durante a centrifugação. B) Fração eluída em 300 mM de imidazol de LipC12 purificada por cromatografia de afinidade. Placas incubadas por 5 dias a 30 °C.

É possível perceber que a expressão de LipC12 em meio tamponante afetou negativamente a atividade da LipC12, pois a atividade de hidrólise contra *p*NPP foi menor (3,87 U  $\text{mg}^{-1}$ ) quando comparada com a da lipase expressa em meio YEPD sem tamponamento (6,1 U  $\text{mg}^{-1}$ ). Além disso, fração extracelular apresentou halo de hidrólise em placa de Petri de aproximadamente 1,5 cm, enquanto a LipC12 purificada teve halo de apenas 1,0 cm de diâmetro, comparando-se com a LipC12 expressa em meio YEPD, em que a fração extracelular apresentou 2,4 cm de diâmetro.

Quando LipC12 foi expressa em *E. coli* (GLOGAUER et al., 2011), para a enzima purificada por cromatografia de afinidade, foi observada elevada atividade de hidrólise contra substratos naturais: tributirina (2187 U  $\text{mg}^{-1}$ ), gordura de porco (1767 U  $\text{mg}^{-1}$ ), azeite de oliva (1722 U  $\text{mg}^{-1}$ ), tripropionina (344 U  $\text{mg}^{-1}$ ), óleo de mamona (215 U  $\text{mg}^{-1}$ ) e triacetina (28 U  $\text{mg}^{-1}$ ), e em *p*NPP teve atividade de 196,5 U  $\text{mg}^{-1}$ , diferentemente de LipC12 expressa em *P. pastoris* conforme mostraram os resultados deste trabalho, os quais demonstram que há a necessidade de etapas de otimização para melhorar a produção de LipC12.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi realizada a clonagem e o estudo da expressão da lipase LipC12 em *P. pastoris*, utilizando a construção I (LipC12 com His-tag N-terminal). A partir dos experimentos realizados, pode-se concluir que o gene foi clonado corretamente e em fase de leitura com o fator  $\alpha$  de secreção do vetor pGAPZ $\alpha$ , pois a lipase estava sendo secretada pela levedura *P. pastoris*, apesar de não ter sido possível realizar o sequenciamento do plasmídeo pLipC12N $\alpha$ . Além disso, foi obtido um clone de *P. pastoris* com múltiplas cópias do plasmídeo pLipC12N $\alpha$ , sendo este resistente à maior concentração de zeocina (2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o que secretou mais proteína com relação aos outros clones.

Com relação aos estudos de expressão em cultivos submersos, foi obtida uma lipase ativa com 48 h de incubação a 30 °C, sendo que LipC12 só apresentou atividade de hidrólise em *p*NPP após a purificação por cromatografia de afinidade, com  $6,1 \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$ . Apesar de LipC12 ter apresentado halo de hidrólise em placas ágar-tributirina, não houve atividade no extrato bruto extracelular de expressão quando a atividade foi determinada pelos métodos de *p*NPP e titulométrico.

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados preliminares e mostraram que a atividade de LipC12 expressa em *P. pastoris* não é comparável às atividades encontradas em trabalhos anteriores para a enzima expressa em *E. coli* e sugerem que estudos mais aprofundados devem ser feitos para a otimização das condições de expressão de LipC12.

## 6 PERSPECTIVAS

Visando melhorar a expressão da LipC12 em *P. pastoris*, sugere-se como trabalhos futuros:

- Repetir dos ensaios de expressão e atividade para confirmar os resultados apresentados neste trabalho;
- Aumentar a escala de expressão e otimizar a expressão da LipC12, testando-se outras temperaturas (entre 20 e 30 °C), concentrações de glicose (entre 1% e 3%), pH do meio de cultivo (7,0-10,0), meio de expressão (YNB) e tempo de incubação;
- Testar as outras construções desenhadas neste trabalho (LipC12 com His-tag C-terminal e LipC12 sem His-tag), visto que a presença da His-tag pode afetar a atividade da LipC12;
- Expressar LipC12 utilizando o vetor pPICZ $\alpha$ , que permite a expressão por indução por metanol;
- Realizar a caracterização aprofundada de LipC12 expressa em *P. pastoris* para proporcionar a efetiva comparação com os resultados da expressão em *E. coli*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADINA, S. R.; SUWANTO, A.; MERYANDINI, A.; PUSPITASARI, E. Expression of novel acidic lipase from *Micrococcus luteus* in *Pichia pastoris* and its application in transesterification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 2021.
- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- AKBARI, N.; KHAJEH, K.; GHAEMI, N.; SALEMI, Z. Efficient refolding of recombinant lipase from *Escherichia coli* inclusion bodies by response surface methodology. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 2, p. 254–259, 2010.
- ALMEIDA, J. M.; ALNOCH, R. C.; SOUZA, E. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Metagenomics: Is it a powerful tool to obtain lipases for application in biocatalysis? **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 2, p. 140320, 2020.
- ALMEIDA, J. M.; MOURE, V. R.; MÜLLER-SANTOS, M.; et al. Tailoring recombinant lipases: Keeping the His-Tag favors esterification reactions, removing it favors hydrolysis reactions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- ALNOCH, R. C.; DE MELO, R. R.; PALOMO, J. M.; et al. New tailor-made alkyl-aldehyde bifunctional supports for lipase immobilization. **Catalysts**, v. 6, n. 12, 2016.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: Review. **Biotechnology**, 2012.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, n. 1, p. 177–183, 1999.
- BAUER, T. L.; BUCHHOLZ, P. C. F.; PLEISS, J. The modular structure of  $\alpha/\beta$ -hydrolases. **FEBS Journal**, v. 287, n. 5, p. 1035–1053, 2020.
- BERINI, F.; CASCIELLO, C.; MARCONE, G. L.; MARINELLI, F. Metagenomics: Novel enzymes from non-culturable microbes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 21, 2017.
- BETTON, J. M.; SASSOON, N.; HOFNUNG, M.; LAURENT, M. Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 15, p. 8897–8902, 1998.
- BILL, R. M. Playing catch-up with *Escherichia coli*: Using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAR, p. 1–5, 2014.
- BOLLOK, M.; RESINA, D.; VALERO, F.; FERRER, P. Recent Patents on the *Pichia Pastoris* Expression System: Expanding the Toolbox for Recombinant Protein Production. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 192–201, 2009.

BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRÍGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 148–158, 2014.

BRUNEL, L.; NEUGNOT, V.; LANDUCCI, L.; et al. High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 111, n. 1, p. 41–50, 2004.

BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. A. G. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Nature Biotechnology**, v. 9, p. 1067–1071, 1991.

CAI, H.; ZHANG, T.; ZHAO, M.; et al. Coexpression of lipase isozymes for enhanced expression in *Pichia pastoris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 335–342, 2017.

CALMELS, T.; PARRICHE, M.; BURAND, H.; TIRABY, G. High Efficiency Transformation of *Tolypocladium geodes* Conidiospores to Phleomycin Resistance. **Current Genetics**, v. 20, p. 309–314, 1991.

CÁMARA, E.; ALBIOL, J.; FERRER, P. Droplet digital PCR-aided screening and characterization of *Pichia pastoris* multiple gene copy strains. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, p. 1542–1551, 2016.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

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

CONTESINI, F. J.; DAVANÇO, M. G.; BORIN, G. P.; VANEGAS K. G.; CIRINO J. P. G.; de MELO R. R.; MORTENSEN, U. H; HILDÉN K.; CAMPOS, D. R.; CARVALHO, P. O. Advances in Recombinant Lipases : Application in the Pharmaceutical Industry. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1032, 2020.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119–138, 2005.

DE WAELE, S.; VANDENBERGHE, I.; LAUKENS, B.; PLANCKAERT, S., VERWEIRE, S.; VAN BOGAERT, I. N. A.; SOETAERT, W.; DEVREESE, B.; CIESIELSKA, K. Optimized expression of the *Starmerella bombicola* lactone esterase in *Pichia pastoris* through temperature adaptation, codon-optimization and co-expression with HAC1. **Protein Expression and Purification**, v. 143, n. September 2017, p. 62–70, 2018. Elsevier.

DROCOURT, D.; CALMELS, T. P. G.; REYNES, J. P.; BARON, M.; TIRABY, G. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* Gene for Transformation of Lower and Higher Eukaryotes to Phleomycin Resistance. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 4009, 1990.

FERNÁNDEZ, F. J.; GÓMEZ, S.; VEGA, M. C. High-throughput protein production in yeast. **Methods in Molecular Biology**, v. 2025, p. 69–91, 2019.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; BARGIELA, R.; et al. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: Current status and future trends. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 22–34, 2015.

FERRER, P.; ALARCÓN, M.; RAMÓN, R.; DOLORS BENAIGES, M.; VALERO, F. Recombinant *Candida rugosa* LIP2 expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 3, p. 271–277, 2009.

FRIEHS, K. Plasmid copy number and plasmid stability. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v 86, p. 47-82, 2004.

FU, L. L.; XU, Z. R.; LI, W. F.; et al. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 1–12, 2007.

GASSER, B.; SALOHEIMO, M.; RINAS, U.; DRAGOSITS, M.; RODRÍGUEZ-CARMONA, E.; BAUMANN, K.; GIULIANI, M.; PARRILLI, E.; BRANDUARDI, P.; LANG, C.; PORRO, D.; FERRER, P.; TUTINO, M. L.; MATTANOVICH, D.; VILLAVERDE, A. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 1–18, 2008.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G. H.; MÜLLER-SANTOS, M.; MONTEIRO R. A.; MITCHELL, D. A.; de SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, BioMed Central Ltd, v. 10, n. 1, p. 54, 2011.

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, p. 895-899, 2003.

GOODARZI, N.; KARKHANE, A. A.; MIRLOHI, A.; TABANDEH, F.; TORKTAS I.; AMINZADEH, S.; YAKHCHALI, B.; SHAMSARA, M.; GHAFOURI M. A-S. Protein Engineering of *Bacillus thermocatenuatus* Lipase via Deletion of the  $\alpha 5$  Helix. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 339–351, 2014.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. **Microbiol Spectrum**, 4(1):VMBF-0012-2015. p. 1–19, 2016.

GUILLIERMOND, A. *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espèce de levures copulation hétérogamique. **Bulletin de la Société Mycologique de France**, v. 36, p. 203–211, 1920.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v. 5, n. 10, 1998.

HARDING, M. M. The architecture of metal coordination groups in proteins. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, International Union of Crystallography, v. 60, n. 5, p. 849–859, 2004..

HARTLEY, O. L.; KANE, J. F. Recovery and Reactivation of Recombinant Proteins *Escherichia coli*. **Biochemical society transactions**, v. 16, p. 101–102, 1986.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HE, D.; LUO, W.; WANG, Z.; LV, P.; YUAN, Z. Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of *Rhizomucor miehei* lipase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1175–1182, 2015. Springer Berlin Heidelberg.

HENRY, A.; MASTERS, C. L.; BEYREUTHER, K.; CAPPAL, R. Expression of human amyloid precursor protein ectodomains in *Pichia pastoris*: Analysis of culture conditions, purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 10, n. 2, p. 283–291, 1997.

HITCH, T. C. A.; CLAVEL, T. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. **PeerJ**, v. 2019, n. 7, 2019.

J.A. ANDERSON. The use of tributyrin agar in dairy bacteriology. **Ber. 3. Int. Mikrobiol. Kongress**, v. 3, p. 726–728, 1939.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON C.; van HEUVEL M.;

- MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.
- JIANG, Z.; GAO, B.; REN, R.; et al. Efficient display of active lipase LipB52 with a *Pichia pastoris* cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1–7, 2008.
- JIANG, Z.; WANG, H.; MA, Y.; WEI, D. Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 327–332, 2006.
- JIANG, Z.; ZHENG, Y.; LUO, Y.; et al. Cloning and expression of a novel lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Molecular Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 95–101, 2005a.
- JIAO, L.; ZHOU, Q.; SU, Z.; XU, L.; YAN, Y. Protein Expression and Purification High-level extracellular production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* via a strategy combining optimization of gene-copy number with coexpression of ERAD-related proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 147, p. 1–12, 2018.
- KANG, H. A.; CHOI, E.-S.; HONG, W.-K.; KIM, J.-Y.; KO, S.-M.; SOHN, J.-H.; RHEE, S. K. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p. 575–582, 2000.
- KARIMI, E.; KARKHANE, A. A.; YAKHCHALI, B.; SHAMSARA, M.; AMINZADEH, S.; TORKTAZ, I.; HOSSEINI, M.; SAFARI, Z. Study of the effect of F17A mutation on characteristics of *Bacillus thermocatenuatus* lipase expressed in *Pichia pastoris* using in silico and experimental methods. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, p. 264-273, 2014.
- KHAN, F. I.; LAN, D.; DURRANI, R.; HUAN, W.; ZHAO, Z.; WANG, Y. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 1-13, 2017.
- KIBBE, W. A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. **Nucleic Acids Research**, 35 (webserver issue): May 25, 2007.
- KOVACIC, F.; BABIC, N.; KRAUSS, U.; JAEGER, K. **Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria**. 2019.
- KUO, T. C.; SHAW, J. F.; LEE, G. C. Improvement in the secretory expression of recombinant *Candida rugosa* lipase in *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, Elsevier Ltd., v. 50, n. 12, p. 2137–2143, 2015.
- KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435–1438, 2009.
- LABORDE, C.; CHEMARDIN, P.; BIGEY, F.; COMBARNOUS, Y.; MOULIN, G.; BOZE, H. Overexpression of ovine leptin in *Pichia pastoris*: Physiological yeast response to leptin production and characterization of the recombinant hormone. **Yeast**, v. 21, n. 3, p. 249–263, 2004.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAN, D.; QU, M.; YANG, B.; WANG, Y. Enhancing production of lipase MAS1 from marine *Streptomyces sp.* strain in *Pichia pastoris* by chaperones co-expression. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 62–67, 2016.
- LI, L.; ZHANG, S.; WU, W.; GUANA, W.; DENG, Z.; QIAO, H. Enhancing thermostability of *Yarrowia lipolytica* lipase 2 through engineering multiple disulfide bonds and mitigating reduced lipase production associated with disulfide bonds. **Enzyme and Microbial Technology**, Elsevier, v. 126, n. March, p. 41–49, 2019.
- LI, PINGZUO; ANUMANTHAN, A.; GAO, X.-G.; ILANGO VAN K.; SUZARA, V. V.; DÜZGÜNEŞ N.; RENGOPALAKRISHNAN, V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 142, p. 105–124, 2007.
- LI, X.; LIU, Z.; WANG, G.; PAN, D.; JIAO L.; YAN, Y. Overexpression of *Candida rugosa* lipase Lip1 via combined strategies in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 82, p. 115–124, 2016.
- LIU, L.; YANG, H.; SHIN, H. D.; CHEN, R. R.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. **Bioengineered**, 2013.
- LIU, W.; LI, M.; YAN, Y. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and used for biodiesel production. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- LOVE, K. R.; SHAH, K. A.; WHITTAKER, C. A.; WU, J.; BARTLETT, M. C.; MA, D.; LEESON, R. L.; PRIEST, M.; BOROWSKY, J.; YOUNG, S. K.; LOVE, J. C. Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2016. BMC Genomics.
- LOVELL, T.; HIMO, F.; HAN, W. G.; NOODLEMAN, L. Density functional methods applied to metalloenzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 238–239, p. 211–232, 2003.
- MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; de SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; GLOGAUER, A.; ZANINE M. G.; MITCHELL D. A.; KRIEGER, N. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 45–51, 2015.
- MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; de SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; ZANIN M. G.; MITCHELL D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of flavor esters and structured lipids by a new immobilized lipase, LipC12, obtained from metagenomics. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. August, p. 294–300, 2016.
- MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, 1996.

- MARTINI, V. P.; GLOGAUER, A.; IULEK, J.; SOUZA E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of LipC12, a true lipase isolated through a metagenomics approach. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystalization Communications**, International Union of Crystallography, v. 68, n. 2, p. 175–177, 2012.
- MARTINI, V. P.; KRIEGER, N.; GLOGAUER, A.; SOUZA, E. M.; IULEK, J. Structure solution and analyses of the first true lipase obtained from metagenomics indicate potential for increased thermostability. **New Biotechnology**, v. 53, n. June, p. 65–72, 2019. Elsevier.
- NARDINI, M.; LANG, D. A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31219–31225, 2000.
- NIETO-TAYPE, M. A.; GARRIGÓS-MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-FARRANDO, M.; VALERO, F.; GARCIA-ORTEGA, X.; MONTESINOS-SEGUÍ, J. L. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 315–327, 2020.
- NURUL FURQAN, B. R.; AKHMALOKA. Heterologous expression and characterization of thermostable lipase (Lk1) in *Pichia pastoris* GS115. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101448, 2020.
- OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B. W.; FROLOW, F.; SYBILLE, F. M.; HAREL, M.; REMINGTON, J. S.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.
- PAPALEO, E.; INVERNIZZI, G. Conformational plasticity of the calcium-binding pocket in the *Burkholderia glumae* lipase: Remodeling induced by mutation of calcium coordinating residues. **Biopolymers**, v. 95, n. 2, p. 117–126, 2011.
- PARK, Y. K.; VANDERMIES, M.; SOUDIER, P.; TELEK, S.; THOMAS, S.; NICAUD, J. M.; FICKERS, P. Efficient expression vectors and host strain for the production of recombinant proteins by *Yarrowia lipolytica* in process conditions. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.
- PAUWELS, K.; LUSTIG, A.; WYNS, L.; TOMMASSEN, J.; SAVVIDES, S. N.; VAN GELDER, P. Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 13, n. 4, p. 374–375, 2006.
- PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E.; UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; SHIFRINE, M. The taxonomy of yeasts isolated from

*Drosophila* in the Yosemite region of California. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 22, n. 1, p. 145–161, 1956.

VAN POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 1, p. 215–226, 2001.

PRAKASH, D.; NAWANI, N.; PRAKASH, M.; M., BODAS, M.; MANDAL, A.; KHETMALAS, M.; KAPADNIS, B. *Actinomycetes*: A repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

PRIMROSE, S. B.; EHRLICH, S. D. Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability. **Plasmid**, v. 6, n. 2, p. 193–201, 1981.

QUYEN, D. T.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R. D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 1, p. 102–110, 2003.

RAMCHURAN, S. O.; VARGAS, V. A.; HATTI-KAUL, R.; KARLSSON, E. N. Production of a lipolytic enzyme originating from *Bacillus halodurans* LBB2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, p. 463–472, 2006.

RAOUFI, Z.; GARGARI, S. L. M. Biodiesel production from microalgae oil by lipase from *Pseudomonas aeruginosa* displayed on yeast cell surface. **Biochemical Engineering Journal**, v. 140, p. 1–8, 2018.

RESINA, D.; COS, O.; FERRER, P.; VALERO, F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 6, p. 760–767, 2005.

RESINA, D.; MAURER, M.; COS, O.; ARNAU, C.; CARNICER, M.; MARX, H.; GASSER, B.; VALERO, F.; MATTANOVICH, D.; FERRER, P. Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 396–403, 2009.

ROBERT, J. M.; BETANCUR, M. O.; MACHADO, A. C. O.; ARRUDA, A.; REIS, V. C. B.; ALMEIDA, R. V.; TORRES, F. A. G.; ALEGRE, P. F.; VALERO, F.; FREIRE, D. M. G. Increase of *Candida antarctica* lipase B production under PGK promoter in *Pichia pastoris*: effect of multicopies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 405–413, 2019.

ROBERT, J. M.; LATTARI, F. S.; MACHADO, A. C.; de CASTRO, A. M.; ALMEIDA, R. V.; TORRES, F. A. G.; VALERO, F.; FREIRE, D. M. G. Production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 123–131, 2017.

- ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 527–533, 1995.
- ROSENAU, F.; JAEGER, K. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**, v. 82, p. 1023-1032, 2000.
- ROSENAU, F.; TOMMASSEN, J.; JAEGER, K. E. Lipase-specific foldases. **ChemBioChem**, v. 5, n. 2, p. 152–161, 2004.
- SABRI, S.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; LEOW, T. C.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. Secretory expression and characterization of a highly Ca<sup>2+</sup>-activated thermostable L2 lipase. **Protein Expression and Purification**, v. 68, n. 2, p. 161–166, 2009.
- SALAH, R. BEN. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: Purification and characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 577–577, 2010.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAMUEL, P.; PRASANNA VADHANA, A. K.; KAMATCHI, R.; ANTONY, A.; MEENAKSHISUNDARAM, S. Effect of molecular chaperones on the expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 10, p. 615–620, 2013.
- SARRAMEGNA, V.; DEMANGE, P.; MILON, A.; TALMONT, F. Optimizing functional versus total expression of the human mu-opioid receptor in *Pichia pastoris*. **Protein Express. Purif.**, v. 24, p. 212–220, 2002.
- SHA, C.; YU, X. W.; ZHANG, M.; XU, Y. Efficient secretion of lipase r27RCL in *Pichia pastoris* by enhancing the disulfide bond formation pathway in the endoplasmic reticulum. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 11, p. 1241–1249, 2013.
- SHAHIDAN, N. H.; RAHMAN, R. N. Z. A.; LEOW, T. C.; ROSFARIZAN, M.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. The effect of carbon sources on the expression level of thermostable L2 lipase in *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 62, p. 13528–13535, 2011.
- SHEN, Q.; WU, M.; WANG, H. BIN; NARANMANDURA, H.; CHEN, S. Q. The effect of gene copy number and coexpression of chaperone on production of albumin fusion proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 763–772, 2012.
- SIMATUPANG, D. F.; WIDHIASTUTY, M. P.; MADAYANTI, F.; AKHMALOKA. Subcloning and heterologous expression of thermostable lipases ITB1.1 and LK3 from local isolate bacteria through *Pichia pastoris* and its lipolytic activity. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 125, 2019.

- SOROKIN, D. Y.; JONES, B. E. Improved method for direct screening of true lipase-producing microorganisms with particular emphasis on alkaline conditions. **Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 125–130, 2009.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n. 3, p. 1070–1074, 1986.
- TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of gum Arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36–43, 2001.
- TORSVIK, V.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 3–4, p. 170–178, 1996.
- TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. High-level secretion of glycosylated invehiasse in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Bio/Technology**, v. 5, n. 12, p. 1305–1308, 1987.
- User Manual pGAPZ A, B, and C pGAPZ $\alpha$  A, B, and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. **Invitrogen**. Catalog nos. V200-20 and V205-20, 2010
- VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 1–7, 2010.
- VASSILEVA, A.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 21–35, 2001.
- WAHYUNI, F. D.; FUAD, A. M.; SUHARSONO. Constitutive expression of *Candida antarctica* lipase B (CALB) in *Pichia pastoris* using pGAPZ $\alpha$  vector. **Annales Bogorieneses**, v. 20, n. 1, p. 29–36, 2016.
- WANG, R.; WANG, S.; XU, Y.; YU, X. Enhancing the thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase by rational design and MD simulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 1189–1200, 2020.
- WANG, X.; SUN, Y.; KE, F.; Zhao, H.; Liu, T.; Xu, L.; Liu, Y.; Yan, Y. Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 5, p. 1355–1367, 2012.
- WANG, Y.; LUO, D.; ZHAO, Y.; TIAN, S.; DENG, W.; LI, C.; MA, L. High-level expression and characterization of solvent-tolerant lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 1, p. 23–29, 2018.
- WATERHAM, H. R.; DIGAN, M. E.; KOUTZ, P. J.; LAIR, S. V.; CREGG, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 37–44, 1997.
- WILLIAMS, K. E.; JIANG, J.; JU, J.; OLSEN, D. R. Novel strategies for increased

copy number and expression of recombinant human gelatin in *Pichia pastoris* with two antibiotic markers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 1, p. 31–34, 2008.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663–670, 1979.

WU, D.; YU, X. W.; WANG, T. C.; WANG, R.; XU, Y. High yield *Rhizopus chinensis* prolipase production in *Pichia pastoris*: Impact of methanol concentration. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 2, p. 305–311, 2011.

WU, J. M.; LIN, J. C.; CHIENG, L. L.; LEE, C. K.; HSU, T. A. Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 4, p. 453–459, 2003.

YAMADA, R.; KIMOTO, Y.; OGINO, H. Combinatorial library strategy for strong overexpression of the lipase from *Geobacillus thermocatenulatus* on the cell surface of yeast *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 113, p. 7–11, 2016.

YAMADA, Y.; MATSUDA, M.; MAEDA, K.; MIKATA, K. The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (*Saccharomycetaceae*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 439–444, 1995.

YANG, J.; ZHANG, B.; YAN, Y. Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 2, p. 355–365, 2009.

YANG, M.; YU, X. W.; ZHENG, H.; SHA, C.; ZHAO, C.; QIAN, M.; XU, Y. Role of N-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of *Rhizopus chinensis* lipase expressed in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2015.

YAO, H.; YU, S.; ZHANG, L.; ZUO, K.; LING, H.; ZHANG, F.; TANG, K. Isolation of a novel lipase gene from *Serratia liquefaciens* S33 DB-1, functional expression in *Pichia pastoris* and its properties. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 99–107, 2008.

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**, 2007.

YUAN, D.; LAN, D.; XIN, R.; YANG, B.; WANG, Y. Screening and characterization of a thermostable lipase from marine *Streptomyces* sp. strain W007. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 41–50, 2016.

ZAHRL, R. J.; PEÑA, D. A.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v.

17, n. 7, p. 1–31, 2017.

ZHANG, W.; LU, J.; ZHANG, S.; et al. Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: Expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2018.

ZHANG, Y.; LIU, R.; WU, X. The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 553–560, 2007.

ZHANG, Y.; MENG, K.; WANG, Y.; LUO, H.; YANG, P.; SHI, P.; WU, N.; FAN, Y.; LI, J.; YAO, B. A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 4, p. 346–352, 2008.

ZHANG, Y.; PENGJUN, S.; WANLI, L.; KUN, M.; YINGGUO, B.; GUOZENG, W.; ZHICHUN, Z.; BIN, Y. Lipase diversity in glacier soil based on analysis of metagenomic DNA fragments and cell culture. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 888–897, 2009.

ZHANG, Z.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 4, p. 401–435, 1996.

ZHAO, X.; XIE, W.; LIN, Y.; ZHENG, S.; HAN, S. Combined strategies for improving the heterologous expression of an alkaline lipase from *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 in *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1317–1323, 2013.

ZHENG, J.; LIU, C.; LIU, L.; JIN, Q. Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 197–204, 2013.

ZHENG, J.; LIU, L.; LIU, C.; JIN, Q. Molecular cloning and heterologous expression of a true lipase in *Pichia pastoris* isolated via a metagenomic approach. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 300–311, 2012.

ZHONG, Y.; YANG, L.; GUO, Y.; FANG, F.; WANG, D.; LI, R.; JIANG, M.; KANG, W.; MA, J.; SUN, J.; XIAO, W. High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

## 8 APÊNDICE

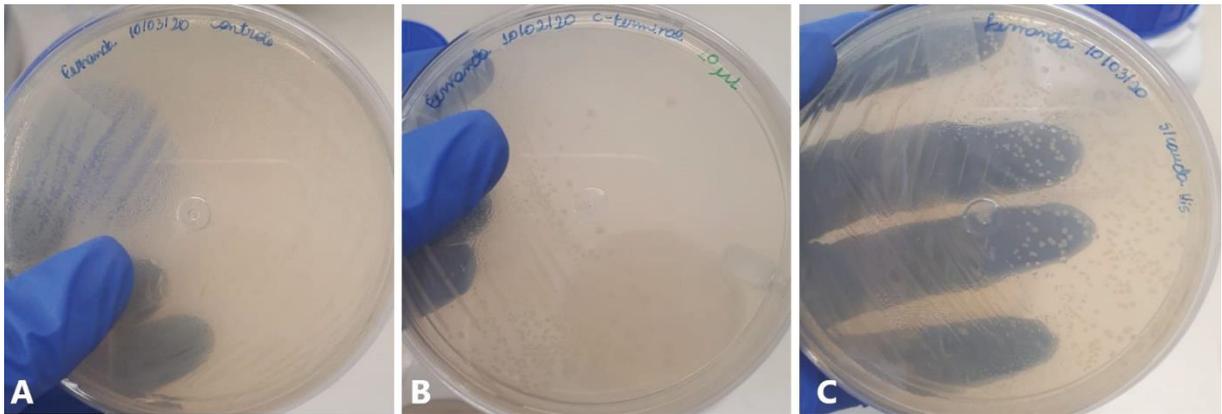


FIGURA 1 – PLACAS DE PETRI CONTENDO MEIO LA DAS TRANSFORMAÇÕES REALIZADAS EM *Escherichia coli* DAS CONSTRUÇÕES II (LipC12 com His-tag C-terminal) E III (LipC12 sem His-tag)

LEGENDA: Placas de Petri contendo meio LA com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina incubadas por 16 h a  $37^\circ\text{C}$  das reações de ligação inseridas em *E. coli* (TOP10) por choque térmico. A) Reação de controle padrão contendo apenas o plasmídeo digerido com as enzimas de restrição. B) Ligação da construção II. C) Ligação da construção III.

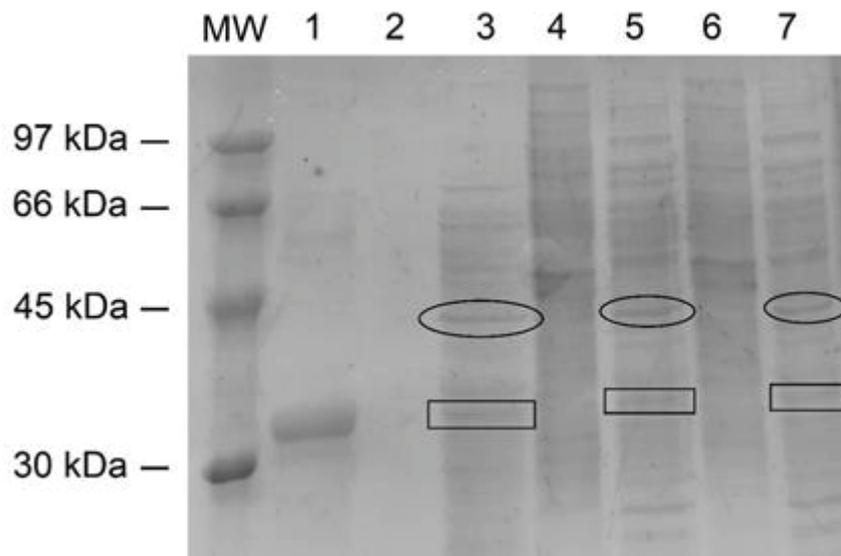


FIGURA 2 – ELETROFORESE SDS-PAGE DAS FRAÇÕES INTRACELULARES DO CONTROLE E CLONE *MULTI33* EXPRESSO A  $30^\circ\text{C}$  POR 48 h

LEGENDA: 1) LipC12 expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade. 2) Fração extracelular da expressão do controle. 3) Fração extracelular da expressão do clone *multi33*. 4) Extrato bruto da fração intracelular do controle. 5) Extrato bruto da fração intracelular do clone *multi33*. 6) Fração sem restos celulares da porção intracelular do controle. 7) Fração sem restos celulares da fração intracelular do clone *multi33*. Círculo: provável banda de LipC12 antes da clivagem do fator  $\alpha$ , com aproximadamente 45 kDa; Retângulo: provável banda de LipC12 após a secreção, com aproximadamente 35 kDa. MW indica o marcador molecular.

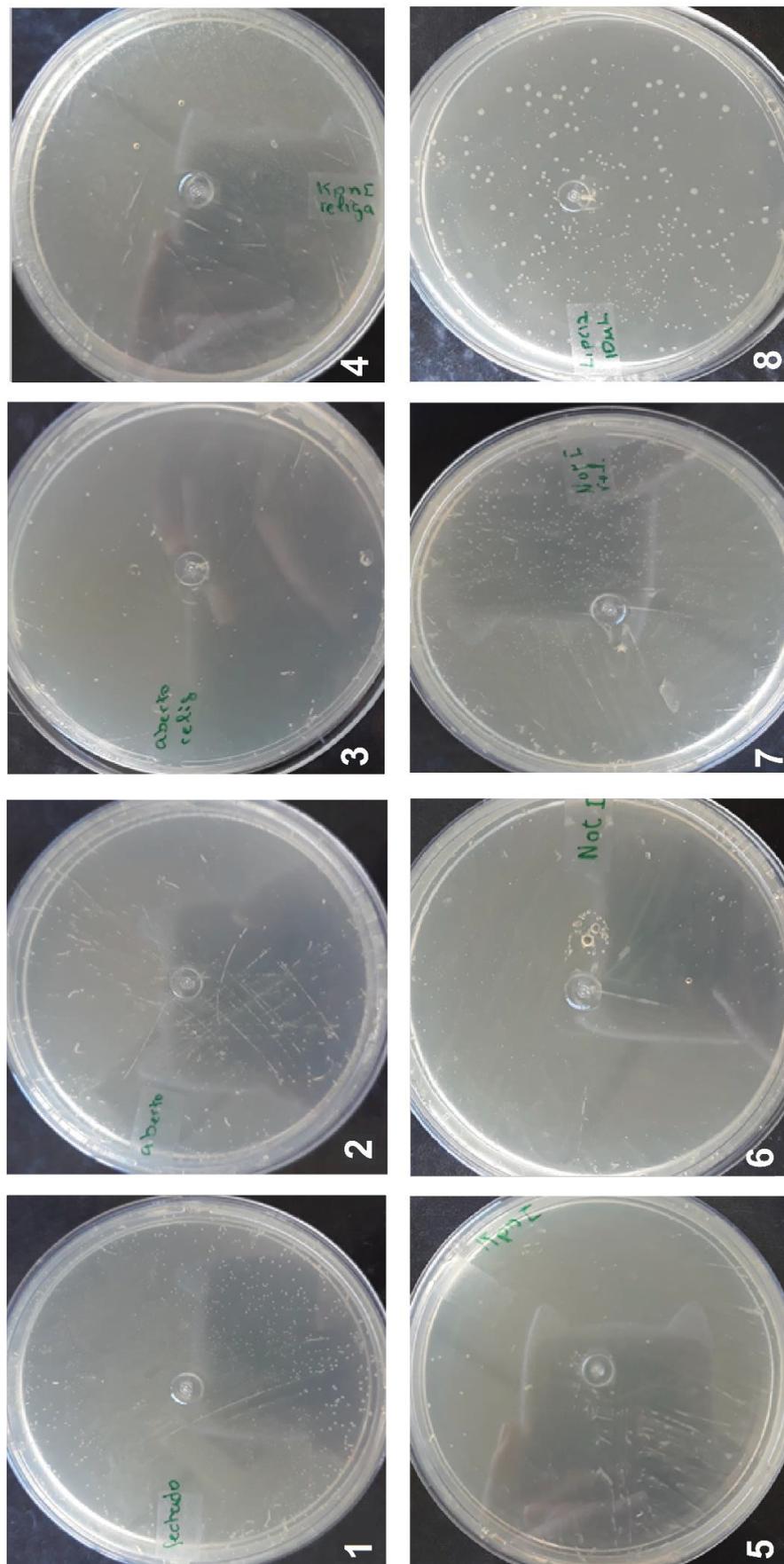


FIGURA 3 – PLACAS DE PETRI COM MEIO LA DOS CONTROLES REALIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DE LipC12 PARA A CLONAGEM EM *Escherichia coli*

LEGENDA: Placas de Petri contendo LA com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina, incubadas por 16 h a  $30^\circ\text{C}$ . Os controles foram realizados como descrito em métodos, na Tabela 4 (4.2.3, pág. 32). 1) pGAPZ $\alpha$  circular, sem digestão; 2) pGAPZ $\alpha$  digerido com NotI e KpnI; 3) pGAPZ $\alpha$  digerido com NotI e KpnI e religado pela T4 Ligase; 4) pGAPZ $\alpha$  digerido com KpnI e religado pela T4 Ligase; 5) pGAPZ $\alpha$  digerido com KpnI; 6) pGAPZ $\alpha$  digerido com NotI; 7) pGAPZ $\alpha$  digerido com NotI e religado pela T4 Ligase; 8) LipC12 com His-tag N-terminal ligados pela T4 Ligase.