



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**β -FRUTOFURANOSIDASES EM COLEÓPTEROS:
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E PRODUÇÃO
HETERÓLOGA DE UMA β -FRUTOFURANOSIDASE DE
Sphenophorus levis.**

SÃO CARLOS

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**β -FRUTOFURANOSIDASES EM COLEÓPTEROS:
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E PRODUÇÃO
HETERÓLOGA DE UMA β -FRUTOFURANOSIDASE DE
Sphenophorus levis.**

Rafael Peduzzi

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte do requisito para a obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – Área de Concentração em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

SÃO CARLOS

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

P371fc Peduzzi, Rafael.
β-frutofuranosidases em coleópteros : caracterização funcional e produção heteróloga de uma β-frutofuranosidase de *Sphenophorus levis* / Rafael Peduzzi. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Coleóptero. 2. *Sphenophorus levis*. 3. B-frutofuranosidase. 4. Expressão heteróloga. 5. Enzimas digestivas. I. Título.

CDD: 595.76 (20ª)

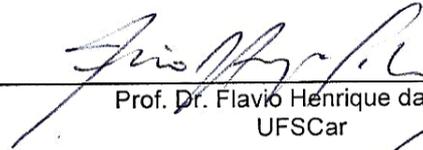


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

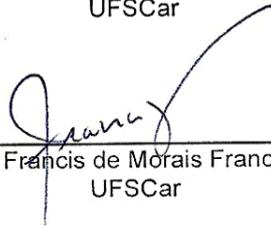
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

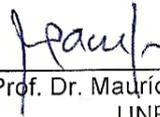
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rafael Peduzzi, realizada em 27/02/2015:



Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva
UFSCar



Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes
UFSCar



Prof. Dr. Mauricio Bacci Júnior
UNESP

**Dedico esse trabalho à minha família,
alicerce sólido onde edifico minha vida.**

"Seja a mudança que você deseja ver no mundo."

Autor: Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelo dom de uma vida repleta de felicidades.

Agradeço a todos os membros da minha família, por me passarem bons exemplos e, principalmente, o apoio necessário aos momentos difíceis. À minha namorada, Bruna S. Archangelo, pelo amor e auxílio, principalmente na fase final desse mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Flávio Henrique Silva, que desde o meu ingresso na Universidade tem me ensinado como o caminho da ciência é bonito e entusiasmante. Tenho certeza que pude me desenvolver, não só profissionalmente, mas também como pessoa tendo o professor Flávio como orientador.

Agradeço à Professora Dr^a Andrea Soares da Costa Fuentes pela generosa ajuda durante todo o curso deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Fernando Pereira de Paula Fonseca pela oportunidade de realização deste trabalho e, principalmente, pela grandiosa ajuda na idealização e desenvolvimento experimental do mesmo.

Agradeço ao Prof. Dr. Walter R. Terra, Dr. Luciano T. Kishi, e Célio D. S. Júnior pela colaboração e auxílio na produção de experimentos chave para o bom desenvolvimento do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e à Coordenação do PPGGEV pela infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho. A todos os colegas e professores do departamento de Genética e Evolução, pela boa convivência nesses anos.

Agradeço aos amigos, Gabriel B. de Andrade, Bruno S. Lima, Leonardo T. Rosa, Darlan G. Nakayama Augusto F. Balula e Danilo E Evangelista pelo companheirismo e amizade.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular: Adelita, Ana Lígia, Daniela, Danyelle, Elizabeth, Felipe, Gabriela, Mariana, Marina, Natália, Rafael Taíse, e Vanessa.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

O coleóptero *Sphenophorus levis* é uma importante praga da cana-de-açúcar, para o qual ainda não existe um método de controle adequado. Considerando a importância da cultura canavieira no Brasil, maior produtor e exportador de açúcar e segundo maior produtor de etanol no mundo, um estudo transcriptômico das larvas do inseto foi realizado anteriormente a este trabalho para a identificação do seu arsenal digestivo. Dentre as prováveis enzimas digestivas, foram identificadas sequências que codificam uma enzima da classe das β -frutofuranosidases. O sequenciamento do clone de cDNA foi totalizado e verificou-se a presença de sinal de poliadenilação e cauda poli-A característica de eucariotos, bem como uma região codificadora para um provável peptídeo sinal para secreção da enzima. A comparação da sequência proteica deduzida com o banco de dados do NCBI aponta maior similaridade com invertases bacterianas. A amplificação do gene da β -frutofuranosidase de *S. levis* (*Sl- β -fruct*) por PCR a partir de DNA genômico, livre de contaminação bacteriana, sugere que *S. levis* realmente codifica uma β -frutofuranosidase. Comparando-se sequências de aminoácidos de β -frutofuranosidases de coleópteros, observam-se regiões conservadas entre membros da família Curculionidae. O ensaio bioquímico das glicosidases intestinais de *S. levis* mostrou que existem provavelmente duas β -frutofuranosidases responsáveis pela digestão de sacarose. Portanto, o inseto pode apresentar uma isoforma da *Sl- β -fruct* ou se beneficiar de uma invertase produzida pela própria microbiota. As análises de expressão via PCR quantitativo em tempo real revelaram que o gene é expresso em intestino médio, nas fases de alimentação do inseto, característica de uma enzima digestiva. As análises filogenéticas indicaram que *Sl- β -fruct* é similar a outras β -frutofuranosidases de lepidópteros e coleópteros, mas se apresenta mais próxima das enzimas bacterianas. Essa proximidade se dá a grupos distintos de bactérias, quando comparada com enzimas de lepidópteros, levando-nos a propor um evento de transferência horizontal independente do que ocorreu em lepidópteros. A fase aberta de leitura (ORF) codificadora da enzima, excluindo o peptídeo sinal, foi clonada no plasmídeo pPICZ α -A para sua produção heteróloga em *Pichia pastoris*. A enzima produzida (r*Sl- β -fruc*) apresentou-se glicosilada, com massa molecular aproximada de 65 kDa. Os ensaios de especificidade ao substrato confirmaram que a enzima é uma β -frutofuranosidase. A r*Sl- β -fruc* apresentou pH de maior atividade próximo a 5,0 e temperatura de atividade máxima próxima a 50 °C. Os ensaios de termoestabilidade e resistência térmica sugerem uma baixa capacidade térmica para r*Sl- β -fruc*, que se desnatura com facilidade. Os sais Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e MgCl₂ provocam inibição da r*Sl- β -fruc* na concentração de 1 mM. As constantes cinéticas estimadas para a r*Sl- β -fruct* foram $K_m = 20,02$ mM, $V_{max} = 105,7$ μ M.s⁻¹ e $k_{cat} = 520,9$ s⁻¹. O presente estudo expande o conceito da ocorrência de β -frutofuranosidases em coleópteros. Apesar dos poucos relatos desse gene no reino animal, é possível afirmar que a β -frutofuranosidase é importante e vem sendo mantida entre algumas espécies de lepidópteros e coleópteros. Tratando-se das potencialidades que a r*Sl- β -fruct* apresenta para uma aplicação industrial, observa-se um potencial positivo caso haja melhorias em sua estabilidade térmica.

Palavras-chave: *Sphenophorus levis*, β -frutofuranosidase, expressão heteróloga, enzima digestiva

Abstract

The sugar cane represents one of the most important agricultural segments in Brazil, which is the largest producer and exporter of sugar in the world as well the second largest ethanol producer. The *Sphenophorus levis* (Curculionidae) is an important sugarcane pest which lacks effective methods of control. The larvae of this insect feed the sugar cane plant decreasing productivity and causing the plant death. In view of identify the insect digestive arsenal enzymes, a transcriptome study was previously performed from *S. levis* larvae. Thereby, an invertase (β -fructofuranosidases class) coding sequence was identified and characterized. Considering the scarcity of functional studies on insect β -fructofuranosidases and their apparent non-occurrence among coleopterans, the aim of the present study was to investigate the occurrence and characterize the β -fructofuranosidase transcript identified. To validate that the β -fructofuranosidase sequence (herein denominated *Sl- β -fruct*) is indeed encoded by the *S. levis* genome, PCRs were performed using genomic DNA extracted from the larval fat body as well as DNA from the midgut with microbial content. Amplification of *Sl- β -fruct* gene using larval fat body DNA indicated its presence in the insect's genomic DNA. Quantitative PCR (qRT-PCR) analyses indicated that the production of mRNA only occurs in the midgut and reaches the greatest expression level in 30-day-old larvae, which is the expected pattern for digestive enzymes. Chromatography of glycosidases from *S. levis* midguts showed two enzymes acting as β -fructofuranosidase, indicating the presence of a *Sl- β -fruct* isoform or a β -fructofuranosidase from insect intestinal microbiota. Moreover, it was found that α -glucosidases do not act on sucrose hydrolysis. Phylogenetic analyses indicated this enzyme to be similar to enzymes found in other coleopteran and lepidopteran β -fructofuranosidases, but also closely similar to bacterial enzymes, suggesting potential horizontal gene transfer. Despite this, the enzyme seems to be restricted to different groups of bacteria, which suggests distinct origin events. The *Sl- β -fruct* gene was cloned in *Pichia pastoris* to produce the recombinant enzyme (rSl- β -fruct). Molecular weight of the recombinant protein was about 64 kDa, indicating possible glycosylation, since the theoretical weight was 54.8 kDa. The substrate specificity test revealed that rSl- β -fruct hydrolyzes sucrose and raffinose, but not melibiose or maltose, thereby confirming invertase activity. The pH curve revealed greatest activity at pH 5.0, demonstrating rSl- β -fruct to be an acidic β -fructofuranosidase. The enzymatic characterization was done and the optimum temperature was 50 °C, thermal resistance at 36 °C and pH maximum resistance at 6.0. The Michaelis-Menten curve showed $K_m=20.02 \mu\text{M}$, $K_{cat}=520.9 \text{ s}^{-1}$ and $V_{max}=105.7 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$. 5 mM of SDS and MgCl_2 cause inhibition of rSl- β -fruct activity. The present study expands the concept of the occurrence of β -fructofuranosidase in insects. Despite the few descriptions of this gene in the animal kingdom, it is possible to state that β -fructofuranosidase is crucial to the establishment of some insects throughout their evolutionary history, especially members of the Lepidoptera and Coleoptera clades. Considering the rSl- β -fruct potential to industrial application, they are promising if the thermal properties are improved.

Keywords: *Sphenophorus levis*, β -fructofuranosidase, recombinant expression, digestive enzyme.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da <i>Sl-β-fruct</i> , calculados a partir da curva de Michaelis-Menten. Software utilizado GraphPad Prism 6.0.	56
Tabela suplementar 1: Tabela comparativa de diferentes parâmetros cinéticos e pHs de atuação para invertases de procariotos, eucariotos e eucariotos superiores.	69
Tabela suplementar 2: Correlação entre os organismos utilizados na análise filogenética e seus códigos	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Caracterização da sequência completa do clone que dá origem à <i>Sl-β-fruct.</i> . 14	14
Figura 2: Amplificação do gene <i>Sl-β-fruct</i> a partir do DNA genômico. 15	15
Figura 3: Alinhamento entre β -frutofuranosidases de coleópteros..... 17	17
Figura 4: Cromatografia de glicosidases do intestino médio de <i>S. levis</i> 18	18
Figura 5: Análise filogenética de <i>Sl-β-fruct</i> 20	20
Figura 6: Análise de expressão da <i>Sl-β-fruct</i> por RT-PCRq em diferentes tecidos 21	21
Figura 7: Análise de expressão em diferentes fases de desenvolvimento. 22	22
Figura 8: Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPICZ α -A..... 31	31
Figura 9: Amplificação do cDNA da <i>Sl-β-fruct</i> 42	42
Figura 10: Identificação de clones recombinantes em pPICZ α -A..... 43	43
Figura 11: Produto do PCR de colônia de levedura.. 44	44
Figura 12: Ensaio de expressão da rSl- β -fruct 45	45
Figura 13: Purificação da rSl- β -fruct..... 46	46
Figura 14: Teste de glicosilação. 47	47
Figura 15: Teste de especificidade ao substrato. 48	48
Figura 16: Curva de progresso. 49	49
Figura 17: Curva de pH. 50	50
Figura 18: Curva de temperatura 51	51
Figura 19: Curva de estabilidade em função da variação de pH. 52	52
Figura 20: Curva de estabilidade em função da variação de temperatura. 53	53
Figura 21: Curva de resistência térmica 54	54
Figura 22: Influência de íons (1 mM) na atividade de rSl- β -fruct..... 55	55
Figura 23: Influência de íons (50 mM) na atividade de rSl- β -fruct. 55	55
Figura 24: Curva de Michaelis-Menten..... 56	56

SUMÁRIO

Introdução ao tema	1
Capítulo 1: β -frutofuranosidases em coleópteros	2
1. Introdução.....	2
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivos gerais	4
2.2. Objetivos específicos	5
3. Materiais e Métodos	6
3.1. Caracterização do transcrito.....	6
3.2. Confirmação da presença do gene no genoma de <i>S. levis</i>	6
3.3. Presença de β -frutofuranosidases no genoma de outros coleópteros.....	8
3.4. Ensaio de atividade glicosidásica no intestino de <i>S. levis</i>	9
3.5. Evolução molecular	10
3.6. Análise da expressão gênica	11
3.6.1. Dissecção do <i>S. levis</i>	11
3.6.2. Extração de RNA e produção de cDNA.....	11
3.6.3. Ensaio de PCR em tempo real	13
4. Resultados.....	14
4.1. Caracterização do transcrito.....	14
4.2. Confirmação da presença do gene no genoma de <i>S. levis</i>	15
4.3. Presença de β -frutofuranosidases no genoma de outros coleópteros.....	16
4.4. Ensaio de atividade glicosidásica no intestino de <i>S. levis</i>	18
4.5. Evolução molecular	19
4.6. Análise da expressão do transcrito de <i>Sl-β-fruct</i>	20
5. Discussão	22
Capítulo 2: Produção recombinante e caracterização bioquímica da rSl- β -fruct	27
1. Introdução.....	27
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivos gerais	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Expressão heteróloga	29
3.1.1. O organismo <i>Pichia pastoris</i> e o vetor pPICZ α -A	29

3.1.2.	Clonagem.....	30
3.1.3.	Transformação de <i>Pichia pastoris</i>	33
3.1.4.	Expressão e purificação de <i>Sl-β-fruct</i>	35
3.2.	Atividade enzimática	37
3.2.1.	Especificidade ao substrato	37
3.2.2.	Curva de progresso	38
3.2.3.	Influência do pH.....	39
3.2.4.	Influência da temperatura	39
3.2.5.	Estabilidade ao pH.....	39
3.2.6.	Estabilidade à temperatura.....	40
3.2.7.	Termorresistência	40
3.2.8.	Influência de íons.....	41
3.2.9.	Parâmetros cinéticos	41
4.	Resultados.....	42
4.1.	Expressão heteróloga	42
4.1.1.	Expressão e purificação de rSl-β-fruct	42
4.2.	Atividade enzimática	47
4.2.1.	Especificidade ao substrato	47
4.2.2.	Curva de progresso	48
4.2.3.	Influência do pH.....	49
4.2.4.	Influência da temperatura	50
4.2.5.	Estabilidade ao pH.....	51
4.2.6.	Estabilidade à temperatura.....	52
4.2.7.	Termorresistência	53
4.2.8.	Influência de íons.....	54
4.2.9.	Parâmetros cinéticos	56
5.	Discussão.....	57
	Considerações finais.....	60
	Referências	61
	Material suplementar	69
	Anexo	71

Introdução ao tema

O *Sphenophorus levis* é um coleóptero pertencente à família Curculionidae, com tamanho entre 8 e 14 mm. Esse inseto é uma praga da cultura de cana-de-açúcar e os prejuízos econômicos gerados pelas suas larvas, que se alimentam do rizoma e colmos da planta, são decorrentes de perdas na produtividade agrícola, que variam de 20 a 30 toneladas de cana-de-açúcar por hectare/ano nas áreas infestadas (CTC, 2010). Apesar da importância dessa praga, refletida nos prejuízos gerados, ainda não existe um método de controle eficientemente aplicado às culturas no campo.

Considerando a importância econômica desse inseto e a dificuldade encontrada para seu controle eficiente, a utilização de abordagens moleculares torna-se uma alternativa promissora (Gatehouse et al., 1993; Jouanin et al., 2000). Para o desenvolvimento de métodos de controle em nível molecular, é importante o conhecimento do arsenal de enzimas (principalmente as digestivas) produzidas pelo organismo. Neste sentido, uma biblioteca de cDNA foi previamente construída em nosso laboratório a partir do tubo intestinal, corpo gorduroso e hemolinfa de larvas de *S. levis* com idade próxima a 30 dias de vida. Este estudo visou à identificação de genes e seus produtos que possam servir como alvo para o controle do inseto, abordando fundamentalmente seu processo digestivo, considerando que o intestino constitui uma interface direta entre o inseto e o ambiente (Terra e Ferreira, 2011). A descrição do transcriptoma das larvas de *S. levis* é feita na tese de doutorado do aluno Fernando Fonseca Pereira de Paula (Fonseca F. P. P., 2012).

Dentre as glicosil-hidrolases identificadas na biblioteca, uma sequência que codifica uma provável β -frutofuranosidase nos chamou a atenção, devido a sua restrita

ocorrência entre os insetos, assim como, a potencialidade de sua produção para processos industriais. Além disso, foram levantadas questões como qual seria a origem evolutiva desse gene e qual sua função na fisiologia do *S. levis*. Pesquisamos nos bancos de dados por β -frutofuranosidases de outros coleópteros e verificamos que a história evolutiva dessa enzima pode ser complexa. Produzimos a enzima de forma recombinante e a caracterizamos para se determinar o seu potencial de aplicação industrial, principalmente na indústria de açúcar invertido.

O presente trabalho é apresentado em dois capítulos para que assim possa ser lido de maneira mais organizada. O primeiro capítulo trata da demonstração, utilizando *S. levis* e informações de banco de dados, de que existem β -frutofuranosidases em coleópteros e estas provavelmente são provenientes de eventos de transferência horizontal por bactérias. Além disso, demonstra-se que a enzima de *S. levis* tem função digestiva e atua na hidrólise de sacarose. O segundo capítulo trata da expressão heteróloga da enzima em *Pichia pastoris*; demonstração, por meio de teste de especificidade ao substrato, de que a enzima é uma β -frutofuranosidase e caracterização enzimática, tendo em vista a comparação da mesma com outras invertases de micro organismos e a possibilidade de aplicação industrial.

Capítulo 1: β -frutofuranosidases em coleópteros

1. Introdução

As β -frutofuranosidases ou invertases (EC 3.2.1.26) catalizam a hidrólise de sacarose em frutose e glicose e foram primeiramente purificadas de leveduras, na segunda metade do século 19 (O'Sullivan e Tompson, 1890). As α -glicosidases (EC

3.2.1.20) também realizam a catálise da hidrólise de sacarose e são encontradas comumente entre os animais, incluindo o intestino de insetos. A diferença entre elas está no mecanismo de hidrólise, pois as β -frutofuranosidases são específicas para a porção β -frutosil, enquanto as α -glicosidases são específicas para a região α -glicosil do substrato (Terra e Ferreira, 1994).

As β -frutofuranosidases são descritas em grande quantidade em micro organismos, mas não eram conhecidas no reino animal até recentemente, quando foram encontradas em lepidópteros (Santos e Terra, 1986; Sumida et al., 1994; Carneiro et al., 2004). Os primeiros relatos de transcritos codificando β -frutofuranosidases em animais foram em uma biblioteca de cDNA intestinal de larvas de *Helicoverpa armigera* (Pauchet et al., 2008), bem como em *Bombyx mori*, no qual a enzima foi caracterizada e imunolocalizada no intestino médio e glândulas de seda da larva (Daimon et al., 2008). Posteriormente, outras β -frutofuranosidases foram encontradas no transcriptoma das larvas de *Manduca sexta* (Pauchet et al., 2010). Esses dados indicam que as β -frutofuranosidases são comuns entre espécies de lepidópteros. Os primeiros relatos de β -frutofuranosidase em coleópteros foram ocorrer posteriormente, com o *draft* do genoma de *Dendroctonus ponderosae* (Keeling et al., 2013) e com a descrição desta enzima em um trabalho gerado a partir de genoma e transcriptoma de *Agrilus planipennis* (Zhao et al., 2014).

Alguns estudos anteriores relatam a atividade de invertase em espécies de coleópteros (Hirashima et al., 1989; Devi e Singh, 2011), mas não houve uma definição clara se a atividade encontrada provinha do arsenal digestivo do inseto ou de sua microbiota. Além disso, nenhum ensaio específico para β -frutofuranosidase foi realizado, ou seja, a degradação de sacarose pode estar sendo catalizada por α -

glicosidasas. *Tribolium castaneum* foi o primeiro coleóptero a ter o genoma completamente sequenciado e anotado. Esse estudo verificou que não há genes que codificam β -frutofuranosidasas no genoma do mesmo (Richards et al., 2008). Sendo assim, pode-se supor que apenas algumas famílias ou espécies da Ordem coleoptera possuem genes que codificam β -frutofuranosidasas. Esse fato é discutido em trabalhos com *M. sexta*, *D. ponderosae* e *A. planipennis*, os quais mostram evidências de eventos independentes de transferência horizontal desses genes em pontos ainda não definidos dentro da história evolutiva dos insetos (Pauchet et al., 2010; Keeling et al., 2013 e Zhao et al., 2014).

Considerando a escassez de estudos funcionais em β -frutofuranosidasas de insetos e as poucas informações em coleópteros, o objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência e caracterizar um transcrito de β -frutofuranosidase identificado em biblioteca de cDNA de larvas do bicudo-da-cana, *S. levis*. O presente estudo relata uma nova β -frutofuranosidase identificada em coleóptero, expressa no intestino médio das larvas de *S. levis* como enzima digestiva. Além disso, levanta a hipótese de que a enzima estudada não é a única β -frutofuranosidase atuante na digestão de sacarose em *S. levis*. Nossos resultados trazem mais informação para o estudo da origem evolucionária de β -frutofuranosidasas, abrindo caminho para hipóteses sobre esta enzima em insetos.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O estudo transcriptômico mostrou que possivelmente o DNA de *S. levis* codifica uma β -frutofuranosidase. Portanto, o objetivo do trabalho, nesse capítulo, foi

caracterizar esse transcrito, demonstrar que ele é codificado pelo genoma do inseto e gerar informações da função e importância desse gene para a biologia de *S. levis*. Considerando que ainda há poucos relatos de β -frutofuranosidases em animais, objetivamos também fazer correlações evolutivas que deem indícios da história desse gene, principalmente em lepidópteros e coleópteros.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Sequenciar completamente e caracterizar um clone (*MBL_S._levis_libr_022F06*), codificando para uma β -frutofuranosidase, encontrado em biblioteca de cDNA de *S. levis*.
- Verificar (via PCR) se o gene *Sl- β -fruct* é codificado pelo genoma do inseto.
- Analisar a sequência de aminoácidos de β -frutofuranosidases de *S. levis* e outros coleópteros para procurar padrões conservados entre eles.
- Verificar, via cromatografia das glicosidases intestinais do *S. levis*, se a digestão de sacarose é realizada por β -frutofuranosidases ou α -glicosidases.
- Realizar análises filogenéticas da *Sl- β -fruct* para levantar hipóteses que expliquem a baixa ocorrência de β -frutofuranosidases em animais.
- Analisar a expressão do gene estudado em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento de *S. levis*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização do transcrito

O clone *MBL_S._levis_libr_022F06*, isolado da biblioteca de cDNA de larvas do *Sphenophorus levis* (Fonseca F. P. P., 2012), foi completamente sequenciado com o uso do equipamento MegaBACE 1000 Flex, com o kit DYEnamic ET Terminator sequencing kit (GE Healthcare) e *primers* específicos para o vetor pDNOR222; M13-Forward (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), M13-Reverse (5'-AGCGGATAACAATTCACAC-3') e um *primer* interno específico do clone (*Sl- β -fruct-RT-F*, descrito a seguir). A sequência foi depositada no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com o número de acesso KJ934794. O programa BioEdit v7.0.5.3 (Hall, 1999) foi usado para a montagem das sequência do clone e obtenção de todo o transcrito da *Sl- β -fruct*. A predição de glicosilação da enzima foi realizada com o servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>). A predição de peptideo sinal foi realizada com o servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) e a fase aberta de leitura (ORF) foi comparada com sequências homólogas por similaridade a partir do GenBank usando BlastX e BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Os alinhamentos múltiplos foram construídos com o uso do ClustalW (Thompson et al., 1994) no BioEdit.

3.2. Confirmação da presença do gene no genoma de *S. levis*

Para provar que a sequência *Sl- β -fruct* encontrada na biblioteca de cDNA é realmente codificada pelo genoma de *S. levis*, Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram realizadas utilizando-se DNA genômico extraído do corpo gorduroso,

teoricamente livre de micro organismos contaminantes, e também DNA extraído do intestino com conteúdo microbiano.

Aproximadamente 200 mg de corpo gorduroso e intestino total foram tratados com 0.32 mg/mL de proteinase K e a extração de DNA foi realizada com UltraPure™ fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v) (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A extração de DNA do corpo gorduroso foi feita em condições assépticas para evitar contaminação bacteriana externa.

Ambas as preparações de DNA foram testadas contra contaminação bacteriana por PCR usando *primers* específicos para o gene bacteriano da região 16S do RNA ribossomal (338F-5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' and 1492R-5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). A reação foi conduzida com Taq DNA polymerase (Fermentas) com desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 34 ciclos a 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 10 min. Esse teste é importante para provar que o DNA extraído do corpo gorduroso está livre de contaminação microbiana.

Os *primers* específicos descritos na próxima sessão (SI- β -fruct_F and SI- β -fruct_R) foram usados para amplificar a sequência genômica completa da *SI- β -fruct*. Nessa reação, utilizou-se a enzima Elongase® (Life Technologies) com desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 34 ciclos a 94 °C por 40 s, 52 °C por 45 s, 72 °C por 3 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min. A enzima Elongase® foi utilizada, pois há a possibilidade de ocorrência de íntrons, o que poderia aumentar consideravelmente o tamanho do *amplicon*.

3.3. Presença de β -frutofuranosidases no genoma de outros coleópteros

Os relatos de β -frutofuranosidases em coleópteros são poucos, mas suficientes para se afirmar que alguns representantes dessa Ordem possuem essa enzima ativa no processo digestivo. Muitos projetos estão sendo desenvolvidos com transcriptomas e genomas de coleópteros, entretanto, a geração de dados segue em uma velocidade superior à anotação. Esse fato culmina em possíveis sequências de β -frutofuranosidases depositadas no GenBank como *unknown*. Uma busca foi realizada no GenBank com o objetivo de encontrar essas sequências e compará-las com as já anotadas, para se traçar um perfil de motivos conservados em coleópteros que possa servir de parâmetro para análises posteriores, tanto filogenéticas quanto ecológicas, relacionando o tipo de enzima com o nicho apresentado por cada besouro.

Foram feitas buscas por homologia à sequência da *Sl- β -fruct* no banco de dados “Sequence Read Archive” (SRA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) usando Blast contra genomas e transcriptomas de coleópteros. Os arquivos com similaridade mínima de 45 e *e-value* de 0.001 foram selecionados. A montagem das sequências encontradas no banco SRA foi realizada com o programa Velvet/Oases (Zerbino and Birney, 2008). Os clusters com possível homologia foram anotados tendo o banco CaZy (Carbohydrate Active Enzymes) como referência.

Outras buscas foram realizadas por blastp e tblastn utilizando os bancos de dados “non redundant protein sequences” (nr); “protein data bank” (Pdb); “Transcriptome shotgun assembly” (TSA); “Whole genome shotgun contigs” (wgs) e “nucleotide collection” (nr/nt).

As sequências encontradas foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994) para se identificar regiões conservadas em coleópteros.

3.4. Ensaio de atividade glicosidásica no intestino de *S. levis*

O processo de dissecação dos insetos ocorreu como descrito no ítem 3.6.1. Os intestinos, juntamente com o conteúdo intestinal, foram agrupados em *pool* de seis insetos. Estes passaram por centrifugação por 15 min. a 13000 g. Os sobrenadantes de intestinos médios homogeneizados foram adicionados a uma coluna Hitrap Q (GE Healthcare, USA), equilibrada com trietanolamina a 20 mM, pH 7.5. As frações foram eluídas com o mesmo tampão contendo de 0 a 1 M de NaCl em um gradiente linear. As frações com atividade de sacarase foram coletadas e adicionadas a uma coluna de *desalting* Hitrap. O eluato foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q (GE Healthcare, USA) com taxa de vazão a 1 mL/min e coleta das frações com 0.4 mL. Após passar 10 mL de tampão piperazina a 20 mM, pH 6, a eluição foi realizada com gradiente linear de NaCl variando de 0 a 0.5 M. As frações foram diluídas adequadamente, de acordo com a quantidade de cada enzima no intestino e sensibilidade do teste enzimático, para se fazer a atividade perante sacarose, rafinose, p-nitrofenil α -glicosídeo (pNP α Gli) e p-nitrofenil α -galactosídeo (pNP α Gal).

A atividade perante sacarose, rafinose, pNP α Gli e pNP α Gal foi determinada com 7 mM de cada substrato em tampão citrato-fosfato de sódio 100 mM, pH 6. Para sacarose foi realizado o método desenvolvido por Dalhqvist (1968), o qual se utiliza de glicose oxidase para determinar a quantidade de glicose liberada na reação. O agente colorimétrico é o O-dianisídeo, que se oxida em contato com H₂O₂ e peroxidase e resulta em um produto com cor. H₂SO₄ foi adicionado à solução para torná-la mais estável. O comprimento de onda para detecção em espectrofotômetro é 540 nm. Para

rafinose foi utilizado o método de mensuração de grupos redutores, com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Noelting e Bernfeld, 1948), com detecção no comprimento de onda de 540 nm; e para pNP α Gli e pNP α Gal seguimos a metodologia desenvolvida por Terra et al. (1979), o qual se baseia na quantidade de p-nitrofenol liberada pela quebra da ligação com os açúcares. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 400 nm.

3.5. Evolução molecular

A análise filogenética foi conduzida com sequências de β -frutofuranosidase (tabela suplementar 2) de diferentes fontes encontradas no GenBank (NCBI): fungos, plantas, bactérias e insetos. β -frutofuranosidases de outros coleópteros foram utilizadas a partir do estudo feito na seção 2.3, com modificações. Para determinar o melhor modelo para explicar as diferenças na divergência de tempo e derivações da composição das sequências, 45 modelos disponíveis no software “JModel” (Posada, 2008) foram testados começando com alinhamento completo de proteínas construído com Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O melhor modelo foi selecionado por dois critérios estatísticos: Informativo Bayesiano (Chen e Gopalakrishnan, 1998; Stafylakis et al., 2009) e Informativo de Akaike (Akaike, 1974; Posada e Buckley, 2004). O modelo escolhido foi distribuição gama pelo modelo de LG com cinco parâmetros (Le e Gascuel, 2008), permitindo sítios invariáveis e frequências discretas (+G+F+I). A filogenia foi reconstruída usando-se o método de máxima verossimelhança (maximum likelihood, ML), com uma árvore inicial obtida usando o algoritmo NNI. O apoio estatístico do nó foi validado por 1000 pseudo replicatas da construção da árvore. (Galperin e Fernández-Suárez, 2012; Maddison et al., 2007; NCBI-GenBank; Rokas et al., 2003). As análises evolutivas foram feitas usando o programa MEGA 6.03 (Tamura

et al., 2013). As análises filogenéticas foram realizadas com a colaboração do colega Célio Dias Santos Júnior, mestrando do nosso grupo de pesquisa.

3.6. Análise da expressão gênica

3.6.1. Dissecção do *S. levis*

Os indivíduos foram cedidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba-SP. Os ovos, larvas de 10 dias, larvas de 20 dias, larvas de 30 dias, pré-pupas, pupas e adultos foram utilizados inteiros, com exceção das larvas de 30 dias, que também sofreram dissecção em carcaça, cabeça, intestino médio, intestino posterior, corpo gorduroso e hemolinfa. Elas foram mantidas em gelo por 5 minutos para imobilização. Com auxílio de um microscópio estereoscópico, bisturi e pinças *RNase free*, foram dissecadas em tampão PBS, pH 7,0. Primeiramente a cabeça foi separada do restante dos tecidos, o intestino foi cuidadosamente separado da carcaça e corpo gorduroso. O intestino foi então separado em anterior, médio e posterior. Todo o conteúdo intestinal foi cuidadosamente retirado por lavagens com tampão PBS pH 7,0. A carcaça foi dissecada na região ventral. A gordura foi cuidadosamente retirada da carcaça por raspagem e lavagens com tampão PBS pH 7,0. As amostras, individualizadas em microtubos de 1,5 mL, foram armazenadas em freezer a -80 °C.

3.6.2. Extração de RNA e produção de cDNA

Para a extração de RNA total, 100 mg de cada amostra (de um *pool* de 5 indivíduos) foram macerados em cadinhos com nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos tipo Eppendorf e as amostras foram tratadas com TRIzol® Reagent (Life Technologies), na proporção de 5 µL de Trizol para cada miligrama de

tecido (5:1). A esta mistura foi adicionado clorofórmio na proporção de 1:1. As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex e incubadas por 12 minutos a 25 °C. O material foi centrifugado por 5 minutos a 4 °C e 12000 x g e a fase aquosa foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Após a transferência realizou-se uma nova extração com clorofórmio (1:1). Em seguida, o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com adição de isopropanol gelado (0.7 volumes). Após incubar por 10 minutos a 25 °C, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g a 4 °C. Posteriormente, o pellet foi lavado com etanol 75% gelado, seco em temperatura ambiente e as amostras foram ressuspensas em água tratada com DEPC.

Os RNAs foram quantificados em equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A análise de qualidade foi também avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram consideradas de boa qualidade quando apresentaram as relações 260/280 nm e 260/230 nm entre 1.8 e 2.0. A eletroforese em gel de agarose possibilitou a verificação tanto das bandas de RNA ribossomal quanto do grau de degradação das amostras.

As amostras selecionadas passaram por um tratamento com DNase I RNase Free (Invitrogen), em uma reação contendo 1 unidade de enzima para cada 3 µg de RNA total, incubando por 15 minutos à temperatura ambiente e inativando em seguida a 65 °C por 5 minutos.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Improm II Reverse Transcription System (Promega), segundo as recomendações do fabricante, 600 ng de RNA por reação e 0,5 µM de Oligo dT (x15) em um volume final de 20 µl.

3.6.3. Ensaio de PCR em tempo real

Os *primers* utilizados para as análises de RT-PCRq foram desenhados utilizando o programa Primer 3 versão 4.0 (www.frodo.wi.mit.edu/primer3), com parâmetros específicos para RT-PCRq: conteúdo de GC de 45 a 55%, T_m variando de 58 a 61 °C, de modo que amplificassem um fragmento de aproximadamente 100-150 pb (Giulietti et al., 2001). O par de *primers* selecionado a partir desses parâmetros foi:

SI-β-fruct-RT-F: CAAAAGGTTGGATGAATGACC

Amplicon: 167pb

SI-β-fruct-RT-R: TGGAGACAGTGCTATGGGAAG

Para o cálculo da eficiência de cada par de *primers*, diluições seriadas do cDNA: 1x, 0,5x, 0,25x e 0,125x foram utilizadas, variando o tempo e a temperatura de hibridização. Os parâmetros de seleção foram: eficiência maior que 95%; *slope* entre -3,0 e 3,6 e R² > 98%.

As análises via RT-PCR quantitativo para avaliar a expressão diferencial foram realizadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). As medidas foram tomadas em triplicatas e os desvios padrões foram indicados com barras de erros nos gráficos. Para todas as reações foram adicionados controles negativos (reações utilizando apenas o RNA, antes da síntese do cDNA). O gene constitutivo que codifica a enzima GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como calibrador. Os ensaios seguiram com a montagem de uma placa contendo cDNA referente a diferentes fases de desenvolvimento do inseto (ovo, larva de 10 dias, larva de 20 dias, larva de 30 dias, pré-pupa, pupa e adulto) e outra com cDNA referente a diferentes tecidos de larvas de 30 dias (carcaça, cabeça, intestino médio, intestino posterior, corpo gorduroso e hemolinfa). A concentração de *primers* adequada foi 0,4

μM e a diluição de cDNA foi 0,5x (Aproximadamente 500 ng por reação). As reações foram realizadas com 5 μL de Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen) e 0,4 μM de cada *primer* em um volume final de 10 μL . O equipamento utilizado foi o Pixo Real-Time PCR System (Illumina).

4. Resultados

4.1. Caracterização do transcrito

Após o sequenciamento do clone identificado na biblioteca de cDNA de *Sphenophorus levis*, todo o CDS que codifica uma β -fructofuranosidase foi caracterizado (Figura 1).

```

atcaaaataagacacacaattatttcccagaatgaataaaaataccgatactgatctgcctcttaataccgatccattgcataggagaaaacattagctggg
M N K I P I L I C L L I P I H C I G E N I S W
atccaaaatttctctcttgcctctccaaaaggttggatgaatgacccaaatgggctcagtttctttgatgggtattaccacgccttttaccacactatcc
Y P K F H L A P P K G W M N D P N G L S F F D G Y Y H A F Y Q H Y P
tgataaacacagagtgaggactcatgcatggggtcagcgcagaaagcatcaacatgtagactgggaacatcttcccatagcactgtctccatcaatacca
D K P E W G L M H W G H A R S I N M L D W E H L P I A L S P S I P
gaagatcatcgatggaatcttctctggatcagcagtagtaaatgatgggaatttgactttgatgtatacaggagtcagtgaaatcaacacatcaagcac
E D I D G I F S G S A V V N D G N L T L M Y T G V S G N S T H Q A
aatgcatagcatacggatctgacggcatttaatttataaaaagttggagttgtattgaagaagacgggaacgacttaaaactcagagatccaaaactctg
Q C I A Y G S D G I N F K K V G V V L K K D G N D L N F R D P K L W
gaaacaagatgattcttggtttggtagttggttccaaaacatacaataatcgaggtgaagttctgtttagctcccctgatttatattcttgggac
K Q D D S W F V V V G S K T Y N N R G E V L L Y S S P D L Y S W D
tatcaaggtgttttggctcaagctgacaagaattggggatataatggggaatgtccggattttttactttaaatgaaagcaaatattgattataatc
Y Q G V L A Q A D K N L G Y M W E C P D F F T L N G K Q I L I N
cacaaggaatctcagctaaaggttatgattacttaaaacttatatcagacaggggtatttttgggtgcttgggaaccaggttaagagatcaaaatgagaa
P Q G I S A K G Y D Y L N L Y Q T G Y F V G A W E P G K E Y Q I E K
aggttttcgcaaatgaccatggctcatgatttctatgcgtcacaacatcttctgctcctgatggacgacgaatcttgattgcttgggtggacatgtgg
G F R E I D H G H D F Y A S Q T F L A P D G R R I L I A W L D M W
gaatccgagtttctgaacaaagatgaagcatgggctggaatgtttacggttgcctccgcaactcacgttatctgaatgtggtgacttgcacaaatcgaccaa
E S E F P E Q S E A W A G M F T L P R E L T L S E C G D L Q I R P
tcagagaagttcaagataaacgcccagctataccaataaacattctcctttatttgggtgataataaatttatataaacgctgaaagacgccccagg
I R E V Q D K R R A I P I N H S P L F V D N K F I Y I T L K D A P G
acacgaagtataattagaatttgataaacaccacaaaaatgcaacagtat acggagcaaaaaatgggtgatgcagatcatggtttcaacgtttacgtcgac
H E V Y L E F D K H H K N A T V Y G A K M G D A D H G F N V Y V D
gtaagagctggctcgtctatttctggaagaagctatgtcaattttaaataatctcgaagaagtagtaggaattgaaaattgatctaaaacagccgattagtt
V R A G R L F L E R S Y V N F N I S K S S R N L K I D L K Q P I S
tgatataatttggatagttcatcagtcgaagattcgtcaataatggatttgggttcttaagcagtcgaatttatccaacagacaaagacagagaatt
L D I F V D S S S V E V F V N N G F G V L S S R I Y P T D K D R E L
agttgtttattcagatcaaaattgttaaaactaaatcgtacaaaatctggagaatttggatgaattattattatatttttaagttactattaaagtgc
V V Y S L S K L L K L N T Y K I W R I C E #
aattatattgctatacaaaataaaaatttctaaattcttcaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 1: Sequência completa do cDNA codificante da β -frutofuranosidase de *S. levis*. As regiões não traduzidas (UTRs 5'e 3') são indicadas em cinza. O sinal de poliadenilação e cauda poli-A estão sublinhadas. Pequenos retângulos destacam aminoácidos conservados entre β -frutofuranosidases, sendo os presentes na catálise de Glicosil Hidrolase 32 representados em preto. Os aminoácidos sublinhados representam o peptídeo sinal predito. As setas indicam as regiões dos oligonucleotídeos usados na clonagem e análise de expressão.

A predição de um peptídeo sinal para secreção protéica na região 5' da fase aberta de leitura é um indicativo de que o gene *Sl-β-fruct* codifica uma proteína que sofre secreção. Na região não traduzida da porção 3' foi encontrado um sítio de poliadenilação (AAUAAA) seguido de uma cauda poli-A, marcas características de RNA mensageiro de eucariotos. Foram observados 5 sítios de N-glicosilação na região traduzida da sequência, o que indica que a proteína nativa pode ter um peso molecular maior que o predito na análise *in silico*, 54,8 kDa. Os aminoácidos que caracterizam uma glicosil hidrolase da família 32 estão presentes na sequência da *Sl-β-fruct*.

4.2. Confirmação da presença do gene no genoma de *S. levis*.

Considerando a possibilidade de contaminação microbiana no estudo transcriptômico, uma PCR foi realizada para determinar se o gene *Sl-β-fruct* é realmente do genoma de *S. levis* ou proveniente de DNA contaminante.

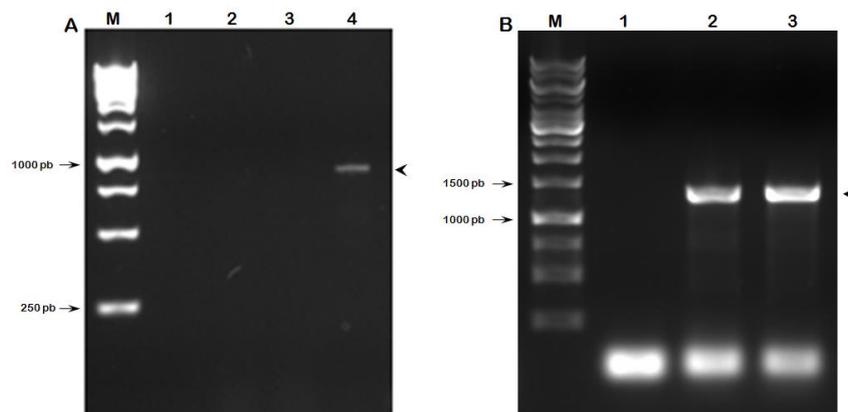


Figura 2: Amplificação do gene *Sl-β-fruct* a partir do DNA genômico extraído do corpo gorduroso de *Sphenophorus levis*. A: teste de contaminação bacteriana. M: marcador molecular GeneRuler (Thermo scientific); 1: controle negativo de reação, reação sem DNA; 2: tentativa de amplificação da região 16S do material extraído do corpo gorduroso do inseto; 3: tentativa de amplificação da região 16S do material extraído do corpo gorduroso do inseto; 4: amplificação positiva da região 16S do material extraído do tubo intestinal do inseto com aproximadamente 1000 bp; B: Amplificação de *Sl-β-fruct*. M: marcador molecular GeneRuler (Thermo scientific); 1: controle negativo de reação, reação sem DNA, 2: amplificação positiva do gene *Sl-β-fruct* a partir do material extraído do corpo gorduroso do inseto, com tamanho próximo de 1434 bp; 3: amplificação positiva do gene *Sl-β-fruct* a partir do material extraído do tubo intestinal do inseto.

Apenas a reação contendo DNA intestinal gerou amplificação positiva do gene 16S rRNA, o que confirma a ausência de contaminantes no DNA extraído do corpo gorduroso (Fig. 2A). A amplificação de todo o gene *Sl- β -fruct* a partir do intestino e corpo gorduroso apresentou aproximadamente 1400 pb (Fig. 2B), sugerindo que as sequências são provenientes do genoma e não possuem intron, visto que a região codificadora também apresenta 1434 pb.

4.3. Presença de β -frutofuranosidases no genoma de outros coleópteros

A busca por sequências de β -frutofuranosidases em outros coleópteros resultou em outras nove sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Os insetos são *Anoplophora glabripennis* (Cerambycidae), *Rhynchophorus ferrugineus* (Curculionidae), *Agrilus planipennis* (Buprestidae), *Sithophilus oryzae* (Curculionidae), *Dendroctonus ponderosae* (Curculionidae) e *Dendroctonus frontalis* (Curculionidae). *D. ponderosae*, *D. frontalis* e *A. planipennis* possuem duas sequências cada um de β -frutofuranosidases. O depósito dessas sequências foi realizado de maneira automática por outros grupos de pesquisa e algumas não aparecem anotadas como β -frutofuranosidases.

Um alinhamento foi realizado entre as sequências encontradas de coleópteros e outras sequências já caracterizadas de lepidópteros, himenópteros e bactérias (figura 3). Apesar das sequências de *D. frontalis* não estarem completas, pode-se observar que duas das três regiões catalíticas estão presentes, portanto, espera-se que a sequência completa codifique uma β -frutofuranosidase. Observamos algumas regiões conservadas entre alguns coleópteros, mas não há uma assinatura específica de besouros.

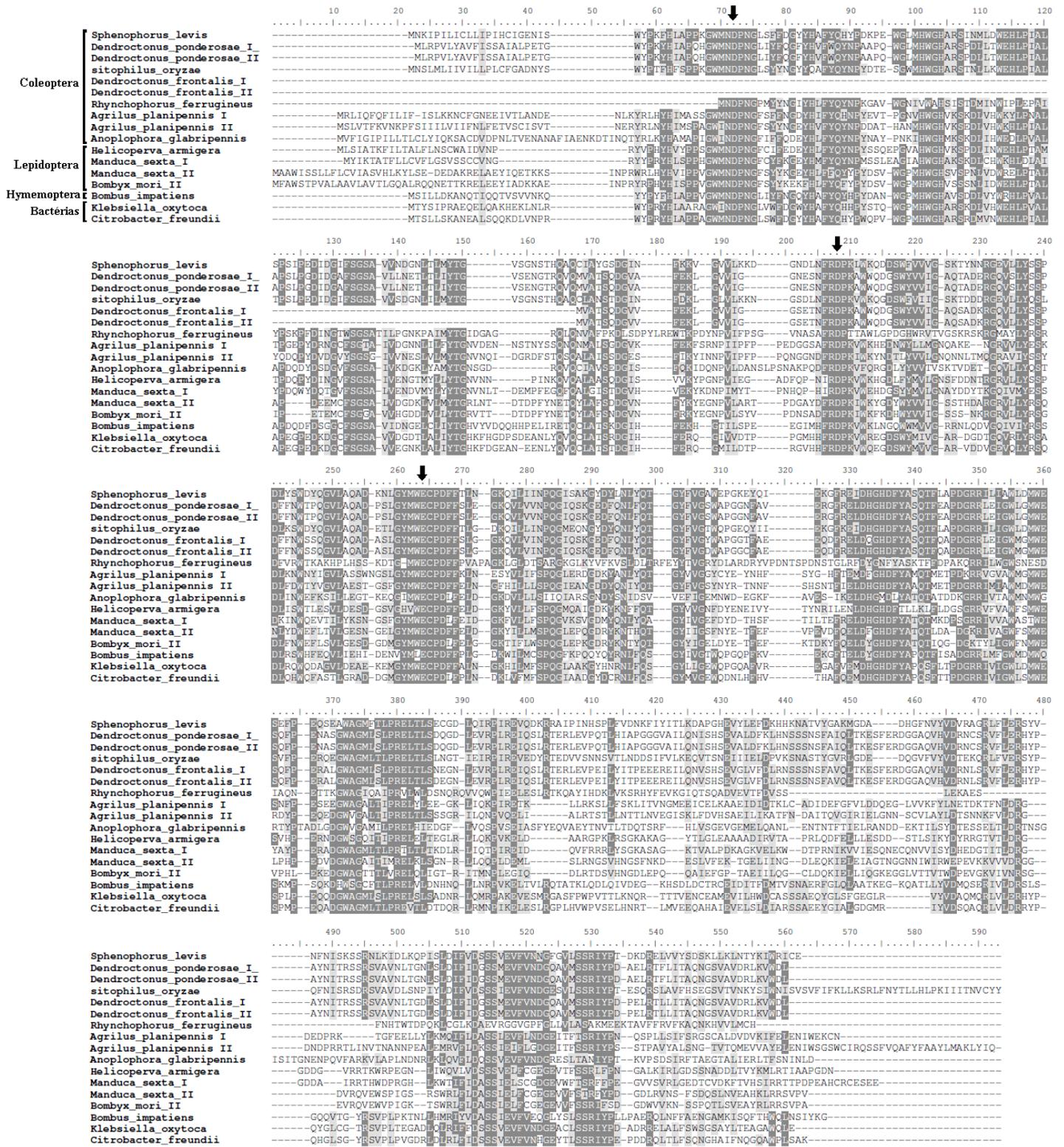


Figura 3: Alinhamento entre β -frutofuranosidases de coleópteros, lepidópteros e bactérias. As setas representam os aminoácidos conservados na região do sítio catalítico. Os retângulos representam aminoácidos conservados entre besouros Curculionidae, com exceção de *R. ferrugineus*.

4.4. Ensaio de atividade glicosidásica no intestino de *S. levis*.

A cromatografia das glicosidasas do intestino de *S. levis* foi realizada para determinar se a *Sl- β -frut* substitui as α -glicosidasas na digestão de sacarose ou se há um sinergismo entre elas.

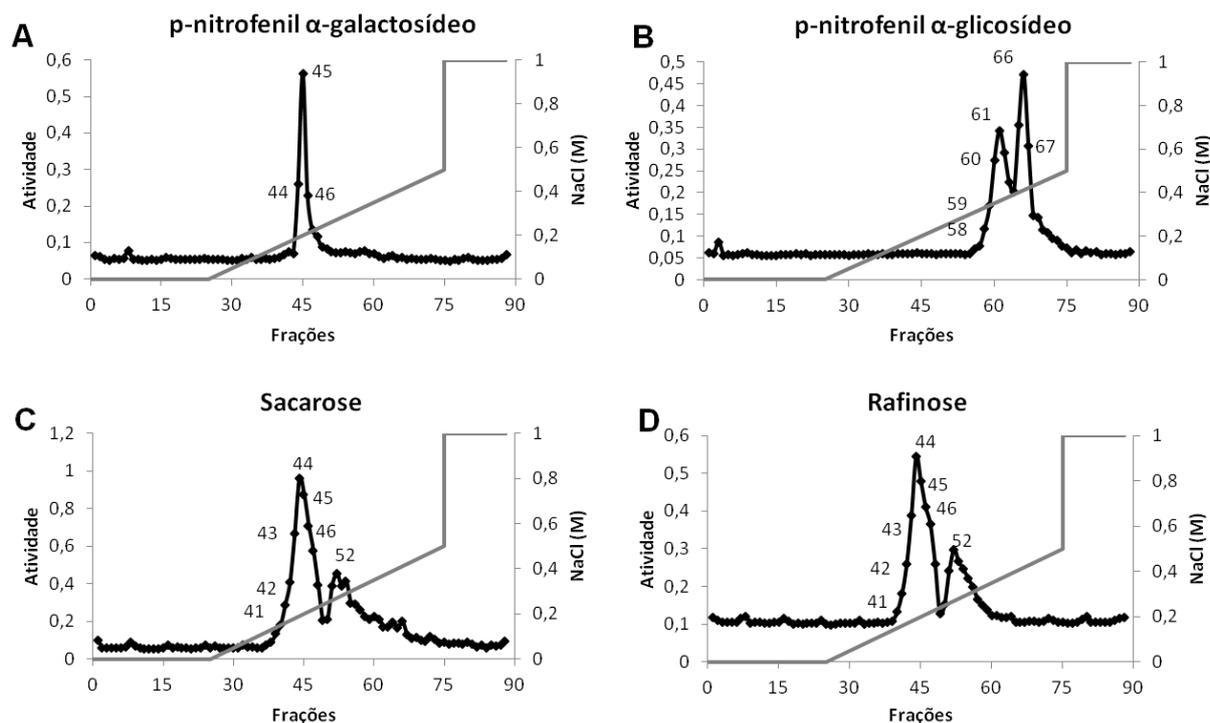


Figura 4: Cromatografia de glicosidasas do intestino médio de *S. levis*: Frações ativas em sacarose recolhidas de uma coluna Hitrap Q após passarem por dessalting foram aplicadas em uma coluna Mono Q. A: O número das frações está representado no eixo x, a atividade enzimática perante pNP α Gal é demonstrada no eixo y da esquerda e a concentração de NaCl usado na cromatografia está ao lado direito; B: a atividade perante pNP α Gli é representada no eixo y da esquerda. As α -glicosidasas foram eluídas nas frações de 61 a 66; C: a atividade perante sacarose é representada no eixo y da esquerda; D: a atividade perante rafinose é representada no eixo y da esquerda. C e D mostram duas β -frutofuranosidasas eluídas nos picos 41 a 52.

A presença de β -frutofuranosidase é revelada com picos de atividade perante os substratos rafinose e sacarose. Os resultados revelaram atividade de α -galactosidase na fração 45 (Figura 4 A), dois picos de atividade de α -glicosidase nas frações 61 e 66 (Figura 4 B) e dois picos de atividade β -frutofuranosídica nas frações 44 e 52 (Figura 4 C e D). Como a atividade de degradação de sacarose foi encontrada apenas nas frações 44 e 52 e as α -glicosidasas estão em diferentes frações, podemos deduzir que as α -

glicosidasas não contribuem na digestão de sacarose, cabendo essa função apenas às β -frutofuranosidasas.

4.5. Evolução molecular

A análise filogenética agrupou a sequência de *Sitophilus orizae* com um alto suporte no nó (*bootstrap* de 100), formando um clado com o gênero *Dendroctonus*. Foi observado que essas β -frutofuranosidasas são mais próximas de bactérias do que outros insetos (figura 5). Há uma grande segregação dos *clusters* de bactéria e também uma clade dividida com sequências de inseto no cluster bacteriano. Além disso, a sequência de *Bombus impatiens* foi observada como *out group* de bactérias Gram negativas. As β -frutofuranosidasas de coleópteros são similares a diferentes grupos de bactérias Gram negativas que estão distribuídas pelo intestino médio de coleópteros, como *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* e *Citrobacter sp.* (Rinke *et. al.*, 2011). Portanto, os resultados sugerem uma história complexa para essa proteína. A análise de reticulação dessas sequências foi realizada eliminando todos os gaps, regiões não informativas e regiões constantes, com distâncias corrigidas usando o método PhyML pelo modelo WAG com pInvar de 0,027 e distribuição gamma com 1.167 parâmetros (obtido no modelo de análise descrito acima). Essa análise (figura 5) revelou uma ordem complexa com uma forte malha de reticulação, evidenciando sua separação de outros insetos e um provável evento recente. Esses eventos de reticulação e incongruências topológicas sugerem um arranjo complexo para esses genes e uma pressão seletiva que altera os valores adaptativos. Sugerimos que essa configuração gênica foi adquirida pelos insetos a partir de eventos independentes de transferência horizontal. Esses fatos referem-se a uma origem recombinacional ou envolvem uma aproximação entre esses organismos, tomando essa enzima como referência.

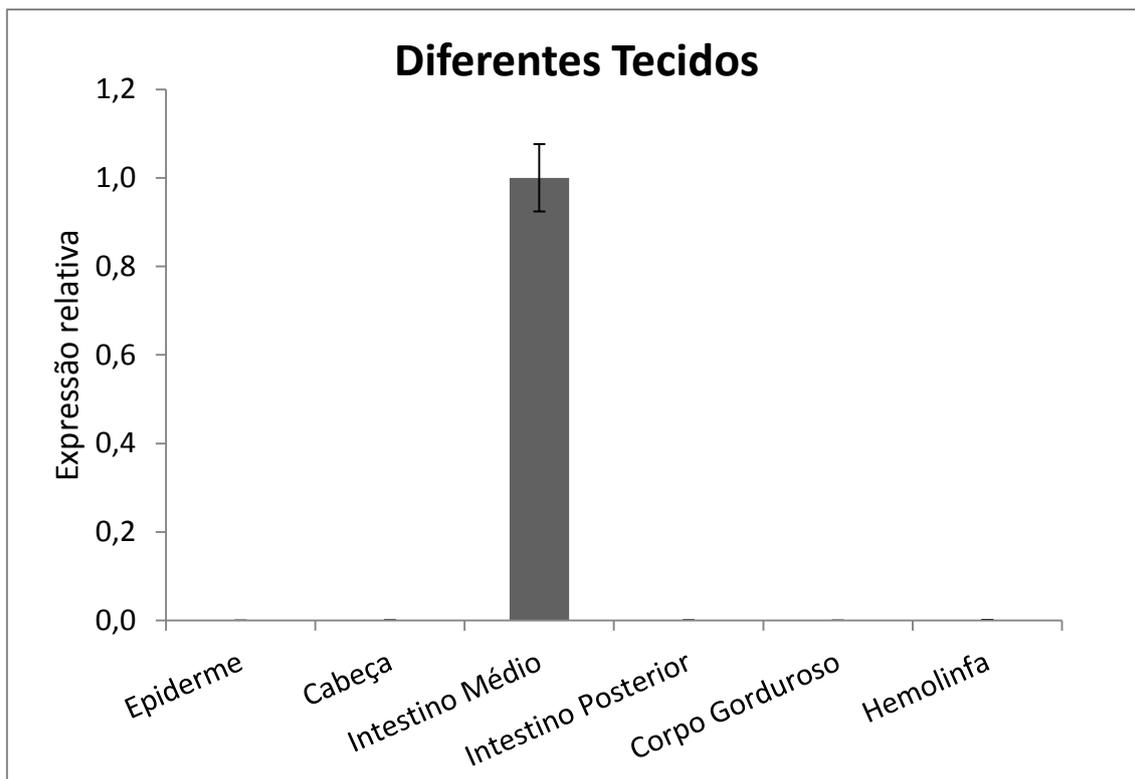


Figura 6: Análise de expressão da *Sl-β-fruct* por qRT-PCR em diferentes tecidos do *Sphenophorus levis*. Os transcritos foram identificados predominantemente no intestino médio, como esperado para uma enzima digestiva.

A análise de expressão do gene *Sl-β-fruct* em diferentes tecidos mostrou que ele é expresso fundamentalmente no intestino médio, o que reforça a proposta de atuação da enzima nos processos digestivos do *S. levis*.

A análise da expressão do gene da *Sl-β-fruct* durante as diferentes fases de desenvolvimento está demonstrada na figura 7. Nas fases em que o inseto se alimenta da cana-de-açúcar, o gene é mais expresso, enquanto nas fases de ovo, pré-pupa e pupa, quando a alimentação é nula (ou quase nula em pré-pupas), há uma queda brusca de expressão ou nenhuma expressão.

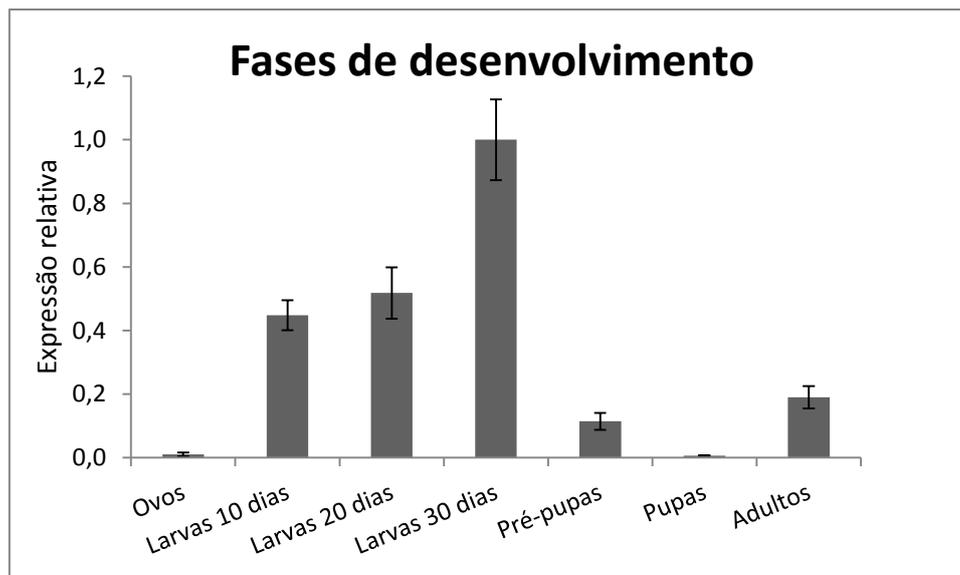


Figura 7: Análise de expressão da *SI-β-fruct* por RT-PCRq em diferentes fases de desenvolvimento do inseto. Níveis maiores de expressão gênica estão relacionados às fases em que o inseto se alimenta.

5. Discussão

Um estudo transcriptômico deu origem ao atual trabalho, que objetiva descrever uma β -frutofuranosidase de *S. levis*. A caracterização completa do clone resultante do transcriptoma revelou uma ORF codificadora de uma enzima com aminoácidos conservados em membros das glicosil hidrolases da família 32 (GH 32). O Asp-20 da β -frutofuranosidase de *S. levis*, equivalente a Asp-23 de levedura, deve agir como um nucleófilo catalítico (Reddy e Maley, 1990). A Glu-191 de *SI-β-fruct*, equivalente a Glu-204 em levedura, e provavelmente age como doador de próton para o oxigênio glicosídico da sacarose (Reddy e Maley, 1990). A Arg-152 e Asp-153 em *S. levis* no motivo conservado “RD”, equivalente a Arg-138 e Asp-139 em *Thermotoga maritima*, podem ligar a grupos hidroxila do substrato e então possuem importante papel no reconhecimento do substrato (Alberto et al., 2004). A análise *in silico* da sequência *SI-β-fruct* sugere fortemente que esta é pertencente ao grupo das GH 32, o qual é representado principalmente por β -frutofuranosidases.

A sequência do cDNA de *Sl- β -fruct* apresenta características eucarióticas, como presença de sinal de poliadenilação e sequência poli-A, o que corrobora a hipótese de que o material sequenciado é proveniente do genoma do *S. levis*. Em contrapartida, alinhamentos realizados contra bancos de dados revelam maior similaridade entre *Sl- β -fruct* e β -frutofuranosidases de bactérias do que entre *Sl- β -fruct* e enzimas de lepidópteros, o que poderia indicar contaminação no transcriptoma que revelou esta sequência. Os testes realizados para confirmar a presença da *Sl- β -fruct* no genoma de *S. levis* mostraram que em uma amostra de DNA do inseto, livre de contaminação bacteriana, foi possível amplificar a sequência da *Sl- β -fruct*, o que dá fortes indícios de que o gene é realmente do inseto. O experimento revelou também a ausência de íntrons no DNA estudado.

O tamanho da sequência da *Sl- β -fruct* é conservado entre β -frutofuranosidases de procariotos e eucariotos. A ausência de íntrons sugere uma proximidade com β -frutofuranosidases bacterianas, o que dá suporte para a hipótese de transferência horizontal levantada com os resultados das análises filogenéticas. Recentemente, os genomas de *D. ponderosae* e *A. planipennis* foram analisados e β -frutofuranosidases foram descritas como sendo produto de transferência horizontal a partir de bactérias (Keeling et al., 2013 e Zhao et al., 2014). Foi observado também que em ambos os casos houve ausência de íntrons, assim como ocorre em *S. levis*.

Considerando as análises feitas com β -frutofuranosidases de outros coleópteros, observa-se que não há regiões conservadas exclusivamente entre eles. Os únicos padrões encontrados são de Curculionidae, com exceção de *R. ferrugineus*, que é Curculionidae mas não apresenta as mesmas regiões conservadas de *S. levis*, *D. ponderosae*, *D. frontalis* e *S. oryzae*. Os outros dois besouros *A. glabripennis* e *A.*

planipennis são Cerambycidae e Buprestidae respectivamente e não apresentaram regiões conservadas além das que já ocorrem em invertases de micro organismos. Esse fato mostra que não há como estabelecer padrões para β -frutofuranosidases de coleópteros. A grande divergência de sequências pode ser reflexo de possíveis eventos de transferência horizontal independentes entre algumas dessas espécies. O trabalho realizado com *A. planipennis* gerou indícios de que a aquisição do gene ocorreu de maneira independente de *D. ponderosae*; provavelmente um ancestral comum aos Curculionidae recebeu o gene em um evento, enquanto um ancestral dos Buprestidae recebeu outro gene em um evento não relacionado (Zhao et al., 2014). Essa hipótese ainda não explica a divergência encontrada na sequência de *R. ferrugineus*. Nesse caso, mais sequências deveriam ser encontradas para se ter subsídios suficientes e então explicar a evolução da β -frutofuranosidase nos Coleópteros.

O perfil de expressão da *Sl- β -fruct* apresenta um padrão encontrado em outras enzimas digestivas do *S. levis*. Fonseca e colaboradores (2011) encontraram o mesmo perfil de expressão em uma catepsina-L, posteriormente visualizada por imunolocalização no lúmen do intestino médio de *S. levis*. Outras enzimas do inseto com potencial digestivo são estudadas por nosso grupo de pesquisa e também apresentam o mesmo perfil de expressão, tanto tecidual quanto temporal. Em *A. planipennis*, uma das β -frutofuranosidases estudadas (*AplaScrB-2*) mostra um perfil de expressão tecidual muito próximo do encontrado em *S. levis*, portanto, também deve possuir papel digestivo neste inseto (Zhao et al., 2014).

Embora α -glicosidases (EC 3.2.1.48) sejam mais comuns que β -frutofuranosidases na digestão de insetos (Terra e Ferreira, 1994), existem estudos que relatam atividade β -frutofuranosídica em coleópteros (Chinnery, 1971; Scrivener et al., 1997). Além disso,

Scrivener e colaboradores (1997) verificaram que as α -glicosidases de *Psacotheta hilaris* não agem na digestão de sacarose e quem realiza essa tarefa devem ser as β -frutofuranosidases. Resultado semelhante foi encontrado também no presente estudo. Além disso, dois picos para β -frutofuranosidase foram observados. Um deve representar a *Sl- β -fruct*, enquanto o outro pode ser uma isoforma do próprio inseto ou uma invertase microbiana, uma vez que o conteúdo intestinal foi ensaiado junto nesse experimento. Em nossos estudos transcriptômicos não encontramos dois transcritos diferentes para β -frutofuranosidase, mas *D. ponderosae* e *A. planipennis* possuem duas formas de β -frutofuranosidase em seus genomas (Keeling et al., 2013 e Zhao et al., 2014). Além dos coleópteros, lepidópteros como *Bombyx mori*, *Diatraea saccharalis* e *Manduca sexta* também apresentam mais de uma forma de β -frutofuranosidase (Daimon et al., 2008; Carneiro et al., 2004; Pauchet et al., 2008). Sendo assim, é provável que *S. levis* possua uma outra forma de β -frutofuranosidase, ainda inacessível pelas análises realizadas até o momento.

A ocorrência de um gene codificador de β -frutofuranosidase no genoma de *B. mori* é relacionada com a presença de alcaloides sintetizados por amoreiras, os quais mimetizam açúcares e atuam como inibidores específicos de α -glicosidases (Daimon et al., 2008). Uma vez que flavonoides isolados do melão de cana atuam como inibidores de α -glicosidases e α -amilases *in vitro* (Holt et al., 2003), a presença de β -frutofuranosidase em *S. levis* pode ser resultado de uma adaptação vantajosa. Além disso, a cana-de-açúcar melhorada chega a atingir 18,1% de sacarose em massa (Papini-Terzi et al., 2009), o que poderia favorecer a presença do gene da β -frutofuranosidase no genoma do inseto.

A árvore filogenética revelou que as β -frutofuranosidases de coleópteros e lepidópteros são próximas a invertases bacterianas. Entretanto, cada uma é associada com um grupo diferente de bactéria. β -frutofuranosidases de lepidópteros foram descritas como fruto de transferência horizontal (Pauchet et al., 2008, 2010; Daimon et al., 2008). É possível que outro evento independente tenha ocorrido e as invertases de coleópteros e lepidópteros tenham diferentes origens evolucionárias a partir de diferentes tipos de bactéria. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar tal hipótese.

Capítulo 2: Produção recombinante e caracterização bioquímica da rSI- β -fruct

1. Introdução

As β -frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) catalisam a hidrólise de sacarose a glicose e frutose, possuem uma grande especificidade ao substrato e foram as primeiras enzimas estudadas (Wallis, et al., 1997). Foram isoladas na segunda metade do século XIX e a denominação invertase se dá pelo fato delas gerarem açúcar invertido como produto de reação, ou seja, D-glicose destrógira e D-frutose levógira (O'Sullivan e Tompson, 1890). Possuem vasta aplicação na indústria de alimentos, principalmente na produção de açúcar invertido.

O açúcar invertido pode ser obtido por meio da hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida é o método mais usado nas indústrias, no entanto, gera resíduos ácidos e subprodutos tóxicos, enquanto o processo enzimático para a hidrólise da sacarose é considerado um processo limpo. Além disso, a hidrólise enzimática catalisada pela invertase tem alta eficiência, o que resulta em um produto qualidade superior, em função do baixo teor de subprodutos gerados (Marquez, 2007). Porém, o processo enzimático de produção de açúcar invertido requer altas temperaturas, por um longo período de tempo. Essas condições são dificilmente suportadas por enzimas, que se desnaturam, obrigando a indústria a adquirir uma grande quantidade do biocatalizador para completar o processo, o que encarece muito o processo produtivo. Sendo assim, a escolha mais vantajosa acaba sendo o processo de hidrólise ácida (Marquez, 2007).

As larvas de *S. levis* possuem um tamanho próximo de 11 mm. Realizar a purificação de uma β -frutofuranosidase desse inseto seria um processo laborioso.

Portanto, optou-se pela expressão heteróloga, visto que a caracterização da sequência da *Sl- β -fruct* já estava completa e nosso grupo de pesquisa possui ampla experiência nessa área. Assim, seria possível realizar a caracterização da enzima para então julgar se a mesma possui algum potencial de aplicação industrial. O presente trabalho apresenta um panorama geral de atividade da enzima, diante de diferentes condições físico-químicas, que possibilita que sejam feitas comparações de desempenho com outras β -fructofuranosidases já caracterizadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Com a sequência da *Sl- β -fruct* já caracterizada e a potencialidade de aplicação industrial para a enzima, nosso objetivo foi produzir a enzima de maneira heteróloga e realizar sua caracterização para gerar informações que permitam uma discussão sobre as reais possibilidades de aplicação biotecnológica. Além disso, a utilização de substratos específicos permitiu comprovar que a enzima trata-se realmente de uma β -fructofuronidase.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a clonagem da *Sl- β -fruct*, expressão heteróloga em *Pichia pastoris* e purificação da proteína recombinante.
- Verificar, por meio da especificidade ao substrato, se a enzima estudada é uma β -fructofuronidase.
- Identificar a influência de pH e temperatura sobre a atividade da rSl- β -fruct.
- Verificar a estabilidade da rSl- β -fruct diante de diferentes temperaturas e pHs.

- Observar a resistência térmica da enzima
- Determinar quais íons, dentre os testados, apresentam influência sobre a atividade da rSl- β -fruct.
- Realizar a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima estudada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Expressão heteróloga

3.1.1. O organismo *Pichia pastoris* e o vetor pPICZ α -A

A levedura *Pichia pastoris* foi o organismo escolhido para a expressão heteróloga da proteína recombinante, pois se trata de um sistema eucariótico, capaz de realizar modificações pós-traducionais e que vem sendo utilizado com sucesso em nosso laboratório para a expressão de proteínas heterólogas em níveis satisfatórios de produção. *P. pastoris* é capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono devido à presença da enzima álcool oxidase (AOX), que catalisa a oxidação de metanol a peróxido de hidrogênio e formaldeído. Essa enzima possui baixa afinidade por oxigênio molecular, o que obriga o organismo a ter uma alta taxa de expressão da mesma como estratégia compensatória. A levedura possui dois genes, AOX1 e AOX2. O gene AOX1 dá origem à maior parte das proteínas e o seu silenciamento gera organismos com crescimento lento em presença de metanol - fenótipo denominado Mut^s - pois a levedura utiliza apenas AOX2.

O vetor de expressão escolhido para transformar as células de *P. pastoris* foi o pPICZ α -A (Invitrogen), que possibilita a ligação do gene de interesse sob regulação do promotor do gene AOX1. Sendo assim, quando o vetor é integrado no genoma de uma

levedura com o gene AOX1 não funcional – cepa KM71H, por exemplo - a mesma produz grande quantidade da proteína recombinante, desde que possua metanol como única fonte de carbono. O vetor escolhido possui uma sequência de nucleotídeos capaz de codificar um peptídeo sinal eficiente para *P. pastoris* (fator α). O organismo *P. pastoris* é capaz de realizar modificações pós traducionais, como N-glicosilação e O-glicosilação, de acordo com os sinais de glicosilação que a proteína venha a ter, característica importante visto que algumas proteínas necessitam dessas modificações para se ativarem plenamente.

3.1.2. Clonagem

As enzimas escolhidas para a clonagem foram *Xho*-I e *Xba*-I para evitar ao máximo a tradução do sítio múltiplo de clonagem na porção N-terminal da proteína. Entretanto, de acordo com o mapa do pPICZ α -A (figura 8), isso resultaria em uma proteína sem o sinal de clivagem para a protease *Kex*-II, que atua na clivagem do Fator- α , no retículo endoplasmático da levedura. Isso nos levou a adicionar a sequência que codifica os aminoácidos de reconhecimento (lisina e arginina) no *primer forward*. Com o objetivo de evitar a região que daria origem ao epítopo *c-myc*, foi desenhada uma sequência que codifica seis histidinas no *primer reverse*, adicionada de um códon de terminação (TGA), projetando a estratégia de purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade ao Níquel.

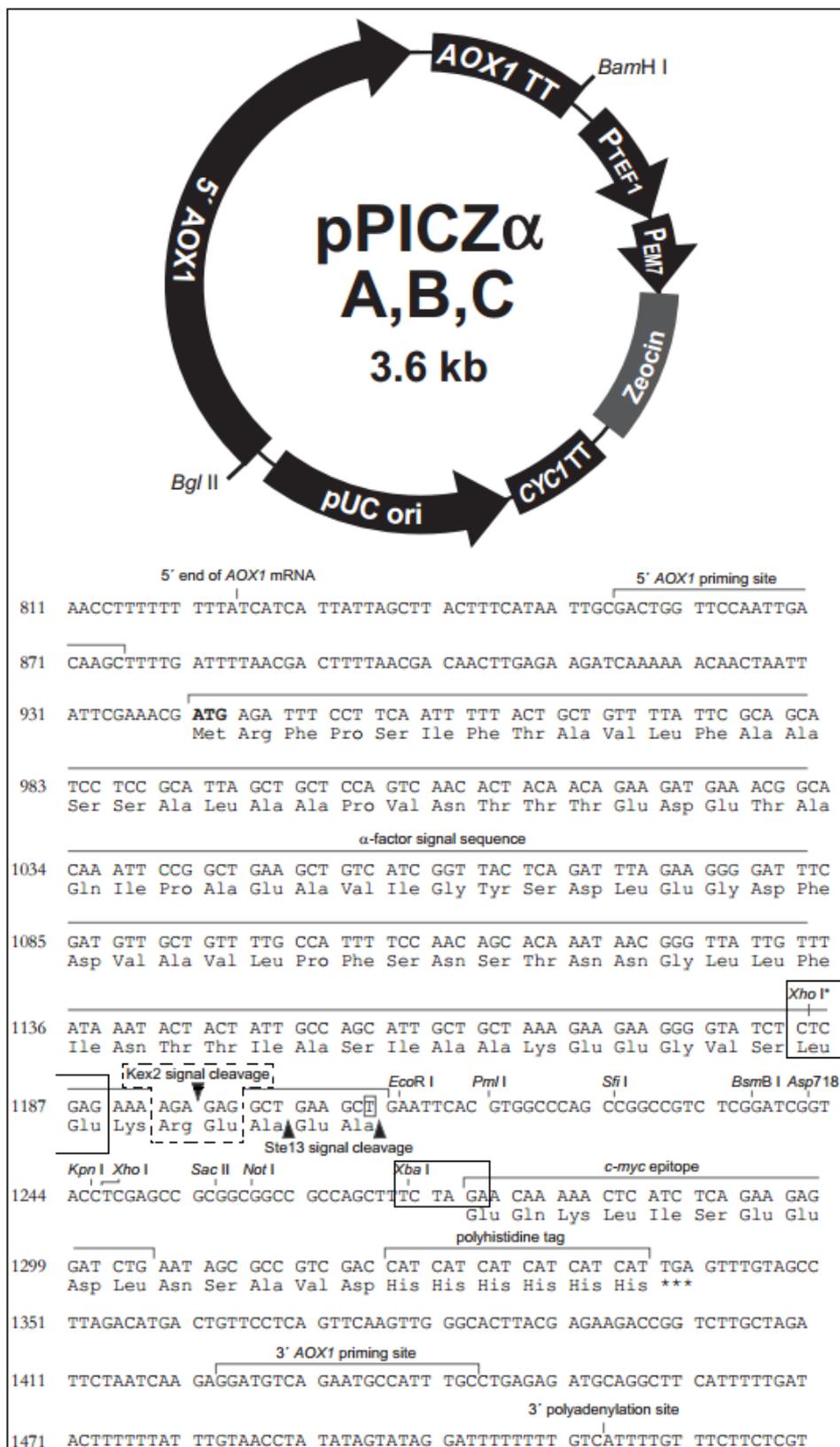


Figura 8: Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPICZ α -A. Destaque em retângulos pretos para os sítios de restrição das enzimas *Xho* I e *Xba* I, utilizadas na clonagem. Destaque em linha tracejada para o sinal de clivagem da enzima Kex2, perdido na restrição. (Adaptado de: EasySelectTMPichia Expression Kit, Invitrogen).

Os *primers* desenhados para a clonagem também foram adicionados de três nucleotídeos na extremidade 5' de cada *primer*, que serviram como facilitadores para a ancoragem das enzimas de restrição na digestão do produto de PCR. Suas sequências são indicadas:

SI- β -fruct_F: 5'-AAACTCGAGAAAAGAGAAAACATTAGCTGGTATCC-3'

SI- β -fruct_his_R:

5'-TTTCTAGATCAATGATGATGATGATGATGTTTCACAAATTCTCCA
GATTTTGTACG-3'.

Foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase utilizando a enzima *Taq High Fidelity* (Invitrogen) para replicação *in vitro* do DNA alvo, tendo como molde o clone da biblioteca de cDNA (*MBL_S._levis_libr_022F06*). Após a amplificação, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % e purificados com o Kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega). Considerando que as enzimas reagem com distintas concentrações ideais do tampão TangoTM (Fermentas), iniciou-se a digestão com 2 U da enzima *Xba*-I em uma concentração final de tampão igual a 1 x e 1 μ g de DNA por 16 h em banho à 37 °C. Seguiu-se com a adição de *Xho*-I, 2 U e uma adequação da reação para concentração final de tampão igual a 2 x, tendo como alvos o DNA amplificado e o vetor pPICZ α -A, em reações separadas. Essa segunda etapa prosseguiu por mais 8 h em banho a 37 °C. Em seguida, as enzimas foram inativadas por aquecimento a 80 °C por 20 minutos.

Os produtos das reações foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 0,8 % e as bandas referentes ao tamanho das amostras foram recuperadas com auxílio

do Kit “Wizard SVGel and PCR Clean-up System” (Promega). A reação de ligação foi elaborada respeitando a proporção de 3:1 entre moléculas de inserto e plasmídeo. 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) foi adicionada em uma reação de volume final de 20 μ L, com 46 ng de vetor e 54 ng de inserto. A reação foi incubada à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida foi realizada uma transformação química em células de *E. coli* linhagem DH5 α . Para tanto, utilizou-se 10 μ L da reação de ligação adicionados em 200 μ L de células químicamente competentes, seguido da incubação por 90 segundos a 42 °C e 1 minuto em gelo; posteriormente adicionou-se 800 μ L de meio LB-Broth e incubou-se a 37 °C, 300 rpm durante 45 min banho úmido. Foram plaqueados 50 μ L da mistura em placas contendo 15 mL de meio LB-Broth agar *low salt* e 25 μ g/mL de antibiótico Zeocina. As placas foram incubadas por 20 horas a 37 °C e as colônias isoladas foram analisadas por PCR de colônia para a confirmação da presença do gene alvo integrado no vetor de expressão. O vetor contendo o gene de interesse foi denominado pPICZ α -Sl- β -fruct.

3.1.3. Transformação de *Pichia pastoris*

Com o intuito de se obter células de *P. pastoris* recombinantes para plasmídeo contendo o gene da *Sl- β -fruct* foram produzidas células competentes da cepa KM71H segundo o manual “EasySelectTM PichiaExpression kit” (Invitrogen). O procedimento é baseado no crescimento prévio das células até que elas atinjam a fase logarítmica de crescimento celular, posterior transferência das células em meio nutriente adicionado de HEPES, um tampão que mantém o pH fisiológico e DTT, que evita a formação de pontes de sulfeto intra e extracelularmente. Finalmente foram feitas lavagens nas células com água gelada para transferência das mesmas para uma solução de Sorbitol 1 M.

A transformação das células competentes foi realizada a partir do pPICZ α -SI- β -fruct purificado e previamente linearizado com a enzima de restrição *Pme*-I (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 1 μ g de vetor linearizado foi adicionado em 40 μ L de células competentes. Após a homogeneização, as células foram incubadas em gelo por 5 min e eletroporadas em cubetas de 0,2 cm a 1,5 Kv, 25 μ F e 200 Ω . Adicionou-se 1 mL de sorbitol 1 M, e incubou-se a 30 °C por 2 h sem agitação.

Posteriormente, as células crescidas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPDS acrescidos de 100 μ g/mL e 500 μ g/mL de Zeocina.

As placas foram incubadas por 72 h e então as colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram confirmadas por PCR de colônia.

Após a verificação de leveduras recombinantes por PCR de colônia, 19 delas foram escolhidas para a realização de um *screening* em busca de uma colônia com expressão superior. Para tanto, o procedimento foi conduzido em placa de 24 poços (5mL), segundo método descrito por Boettner *et al.* (2002), com modificações. O experimento contou com dois controles negativos: o primeiro foi ausência de levedura em um dos poços, para comprovar a experimentação em condições assépticas. O segundo foi a inoculação da levedura transformada com plasmídeo de expressão isento do gene alvo, para posterior comparação no padrão de bandas no SDS-PAGE da expressão. Foi realizado ainda um controle positivo com uma levedura já caracterizada no laboratório para validação das condições corretas para produção de proteínas.

A primeira fase do *screening* contou com o crescimento de uma massa celular de cada colônia selecionada em 3 mL de meio complexo com glicerol tamponado,

chamado BMGY, (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 1,34 % YNB, 4×10^{-5} % de Biotina, 100 mM fosfato de potássio (pH 6,0) 1 % de glicerol), por 48 h, a 30 °C e 250 rpm (D.O₆₀₀ entre 2 e 6).

Posteriormente, foi realizada a troca de meio de cultivo por 2 mL de meio complexo com metanol tamponado, chamado BMMY, (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 1,34 % YNB, 4×10^{-5} % de Biotina, 100 mM fosfato de potássio pH 6,0, 0,5% de metanol), incubando a 30 °C e 250 rpm. Em intervalos de 24 h, até 144 h, foi adicionado metanol absoluto a uma concentração final de 0,75 % ao mesmo tempo em que foram retiradas alíquotas da indução para avaliação da expressão. Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação (1500 g 5 minutos.) e analisados em SDS-PAGE 12 %.

Além da análise de expressão por SDS-PAGE, foi realizado um teste de atividade enzimática por uma reação contendo sacarose (100 mM), tampão fosfato de sódio (10 mM pH 7,0) e sobrenadante da indução. Após 10 minutos de reação a 30 °C, a solução de DNS foi adicionada com posterior aquecimento por 10 minutos e refrigeração por mais 5 minutos, para viabilizar a quantificação colorimétrica dos açúcares redutores. As leveduras transformadas que mostraram maior produção das proteínas recombinantes foram selecionadas para o processo de indução em maior escala.

3.1.4. Expressão e purificação de *Sl-β-fruct*

O clone que apresentou maior atividade no screening inicial foi selecionado para a expressão em maior escala. Sendo assim, foi feito um pré-inóculo de 10 mL de BMGY com adição de uma massa celular a partir da cultura em meio sólido por 24

horas à 30 °C sob agitação de 250 rpm. Posteriormente, o pré-inóculo foi adicionado em 500 mL de BMGY e mantido sob agitação de 250 rpm a 30 °C, durante 24 horas. Em seguida, foi realizada uma centrifugação, 1500 g por 5 minutos, para a troca de meio de cultivo. A fração do *pellet* foi ressuspensa em 100 mL do meio BMMY para a indução da expressão proteica.

Para a indução da proteína recombinante, o metanol foi adicionado para uma concentração final de 0,75 %, a cada 24 horas, durante 7 dias. Ao fim do processo, a fração celular foi separada do meio de cultivo por centrifugação a 1500 g por 5 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore) e purificado.

A purificação por cromatografia de afinidade foi conduzida em coluna de resina de sílica carregada com 5 mL de Níquel (His-Link, Promega), na qual as proteínas ficam aderidas pela cauda de histidina por afinidade química. Para a coleta das proteínas, lavou-se a coluna com soluções tampão de concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM), o qual compete com as histidinas pelo Níquel, liberando a proteína recombinante na forma purificada. Após coleta, as amostras foram analisadas em SDS PAGE 12 %, por onde se selecionou para diálise as frações que apresentaram a proteína purificada. Foram utilizadas membranas de diálise (PIERCE 3,500 MWCO) em tampão PBS pH 7,4 (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM) em uma proporção solução proteica/ tampão de 1:1000 (V/V). O processo foi realizado sob agitação leve a 4 °C durante 18 horas.

As proteínas dialisadas foram armazenadas em tubos falcon a 4 °C, depois de filtradas em membrana 0,45 µm (Millipore) sob condições assépticas. O conteúdo protéico das frações dialisadas foi quantificado com uso do kit BCA (Thermo Scientific), segundo instruções do fabricante. Esse método é baseado na combinação da

redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} realizada por proteínas em meio alcalino (método do Biureto) com um método de detecção de Cu^{1+} de forma colorimétrica, o Ácido Bichinchonínico (Smith et al, 1985). A coloração é resultante da quelação de duas moléculas de BCA com um íon de cobre e permite a quantificação das proteínas por detecção em espectrofotômetro ($\lambda = 562 \text{ nm}$).

Para se verificar se houve glicosilação da enzima recombinante, foram realizados testes com N e O glicosidases. As enzimas utilizadas foram as N-glicosidases Endo-H e PNGase-F e a O-glicosidase Endo- α -N-Acetylgalactosaminidase (ENAG), todas produzidas pela New England Biolabs. As amostras de *Sl- β -fruct* foram fervidas por 10 min. na presença de tampão desnaturante (1x), adicionadas na solução de reação contendo tampão específico de cada enzima (1x), 2,5 U de enzima e volume final de 20 μL . A enzima ENAG pode ser complementada por uma neuraminidase, que cliva ácido N-acetilneuramínico presente em casos de O-glicosilação. As reações foram incubada a 37 °C por 1 h e posteriormente foram aplicadas em um SDS-PAGE 12 % para verificação dos resultados.

3.2. Atividade enzimática

3.2.1. Especificidade ao substrato

Como visto no capítulo 1, existem duas classes de enzimas capazes de catalisar a hidrólise de sacarose, as α -glicosidases e as β -frutosidases. A melhor maneira para se diferenciar essas enzimas é medir a atividade delas diante de açúcares, como rafinose, maltose e melibiose. A rafinose é um trissacarídeo composto por galactose, frutose e glicose, ou seja, possui resíduos β -frutosil e α -glicosil. Sendo assim, β -frutosidases e α -glicosidases são capazes de catalisar sua hidrólise. A maltose é um dímero de glicose e

não possui resíduos β -frutossil, apenas α -glucosil. A melibiose é um dissacarídeo composto por glicose e galactose e também possui apenas resíduos α -glicosil, ou seja, as β -frutosidases não são capazes de catalisar a hidrólise dessas moléculas, enquanto as α -glicosidases têm essa capacidade. Sendo assim, pode-se caracterizar uma enzima como β -frutosidase quando a mesma tem a capacidade de catalisar a hidrólise de sacarose e rafinose, mas não possui atividade contra maltose e melibiose.

Considerando isso, foi realizado um teste de atividade com a enzima produzida e purificada. Foram incubados um (1) μ g de enzima purificada, 10 mM de tampão fosfato de sódio e 100 mM de cada substrato (sacarose, rafinose, maltose e melibiose incluídos separadamente) a 30 °C por 10 min, em um volume final de 50 μ L. Passado o tempo de reação, seguiu-se com a adição de 100 μ L de DNS (dobro do volume de reação), aquecimento durante 10 min. e refrigeração até temperatura ambiente. Como controle negativo foram utilizadas soluções com cada substrato, visto que a maltose e a melibiose já possuem extremidades reductoras e reagem com DNS. Foi realizada uma diluição de 1:7 e posterior leitura em espectrofotômetro VICTOR™X5/2030 Multilabel Reader - PerkinElmer com $\gamma = 540$ nm.

3.2.2. Curva de progresso

O primeiro passo dado para a determinação da eficiência enzimática foi a construção de uma curva de progresso. As condições de reação foram primariamente escolhidas a partir do que foi utilizado por Daimon e colaboradores (2008), no ensaio de uma β -frutofuranosidase de *Bombyx mori*. Portanto, foram utilizados 1 μ g de enzima, 100 mM de sacarose e 10 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0. A reação foi incubada a 30 °C e 10 alíquotas foram retiradas em tempos de reação diferentes, até completar 23 minutos de reação. Ao retirar cada alíquota, DNS foi adicionado para

interromper a reação. Os procedimentos de leitura das reações seguem como descrito no item 2.2.1.

3.2.3. Influência do pH

Com o objetivo determinar em qual pH a *Sl- β -fruct* atua com maior eficiência, 1 μ g de enzima purificada e 100 mM de sacarose foram utilizados para a reação adicionada de tampões Citrato de sódio (pH 3,5 e 4,5), Fosfato de sódio (pH 5,5; 6,5 e 7,5) e Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0) na concentração de 10 mM. As amostras foram incubadas a 30 °C por 10 minutos, seguindo-se da adição de DNS e aquecimento para quantificação dos açúcares redutores presentes em solução. Como controle negativo foram utilizadas soluções com cada pH, com substituição da enzima por água. A leitura foi realizada como descrito no item 2.2.1.

3.2.4. Influência da temperatura

Conhecendo o pH de maior atividade da enzima, uma curva foi plotada com diferentes temperaturas de reação, mantendo-se as proporções de 1 μ g de *Sl- β -fruct* purificada, 10 mM de tampão Citrato de sódio pH 5,0 e 100 mM de sacarose. As temperaturas variaram de 11 a 70,5 °C e o experimento foi conduzido em termociclador com função gradiente de temperatura. A leitura foi realizada como descrito no item 2.2.1.

3.2.5. Estabilidade ao pH

A curva de estabilidade ao pH foi realizada com o objetivo de se determinar em quais condições hidrogeniônicas a enzima se mantém mais estável. Para tanto, foram produzidas soluções contendo a enzima em 12 diferentes pHs, de 2,43 a 9,11. Cada

solução foi incubada a 4 °C durante uma hora. Em seguida foi realizada uma reação enzimática com 1 µg de enzima, 100 mM de sacarose, 100 mM de tampão citrato-fosfato de sódio, pH 5,0. A reação prosseguiu por 10 min. incubada a 50 °C. DNS foi adicionado e os procedimentos de leitura das reações seguiram como descrito no item 2.2.1.

3.2.6. Estabilidade à temperatura

A curva de estabilidade à temperatura pode revelar até qual temperatura de armazenamento a enzima é capaz de suportar sem perder a capacidade catalítica. Para isso, 15 diferentes temperaturas foram testadas, de 4 a 60,6 °C. As alíquotas foram incubadas por uma hora nessas temperaturas e posteriormente foram ensaiadas a 50 °C por 10 min. A reação foi realizada com 1 µg de enzima, 100 mM de sacarose e 100 mM de tampão citrato-fosfato de sódio, pH 5,0. Os procedimentos de leitura das reações seguiram como descrito no item 2.2.1.

3.2.7. Termorresistência

A análise de termorresistência foi realizada para definir em qual temperatura a enzima pode ser armazenada quando está em solução aquosa. Para tanto, alíquotas de enzima foram preparadas e incubadas a 10, 20 e 30 °C. A atividade enzimática foi medida de tempos em tempos durante 336 h. A reação enzimática foi realizada com 1 µg de enzima, 100 mM de sacarose e tampão citrato-fosfato de sódio, pH 5,0. Os procedimentos de leitura das reações seguiram como descrito no item 2.2.1.

3.2.8. Influência de íons

Em muitos casos, íons afetam as enzimas, tanto melhorando quanto piorando a atividade catalítica. Assim sendo, testes de atividade enzimática foram realizados em soluções contendo diferentes sais: CaCl_2 , CoCl_2 , LiCl , MgCl_2 , NH_4Cl_2 , ZnCl_2 , CuSO_4 , MnCl_2 e SDS. As concentrações de 1 e 50 mM foram testadas para cada íon. As reações foram realizadas com 1 μg de enzima, 100 mM de sacarose e 100 mM de tampão citrato-fosfato de sódio, pH 5,0 contendo o íon solubilizado na concentração adequada. Os procedimentos de leitura das reações seguem como descrito no item 2.2.1.

3.2.9. Parâmetros cinéticos

Para o estabelecimento dos parâmetros cinéticos da enzima estudada, realizou-se um gradiente de concentrações crescentes de sacarose, com variação de 10 a 400 mM. A reação foi estabelecida segundo os resultados de temperatura e pHs de maior atividade enzimática. Uma curva padrão foi estabelecida utilizando o produto da reação, glicose, para correlacionar a absorbância gerada com a quantidade de produto em solução. Todas as reações foram realizadas em triplicata, sempre mantendo a substituição da enzima por água como um controle negativo. A leitura foi realizada como descrito no item 2.2.1. Os dados foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism 6.0.

4. Resultados

4.1. Expressão heteróloga

4.1.1. Expressão e purificação de rSl- β -fruct

A amplificação do gene da *Sl- β -fruct*, com *primers* específicos, está indicada na figura 9. Observa-se uma amplificação específica, com o tamanho esperado de aproximadamente 1500pb além de banda de massa molecular maior, provavelmente resultante da amplificação do próprio *amplicon* que hibridiza nele mesmo na extremidade e funciona como *primer*, a partir da extremidade, formando um fragmento com o dobro do tamanho. A banda de aproximadamente 1500 pb foi purificada do gel para que a reação de restrição pudesse seguir sem problemas posteriores.

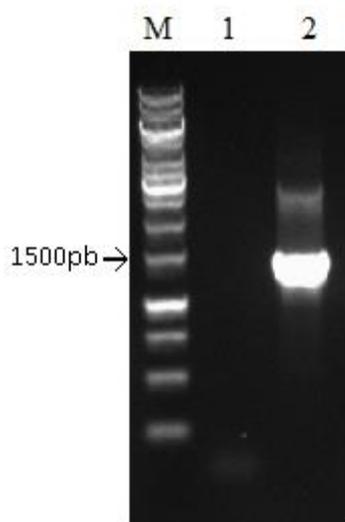


Figura 9: Gel de agarose 1 % da amplificação do cDNA da *Sl- β -fruct* a partir do *MBL_S._levis_libr_022F06*. M: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Fermentas); 1: controle negativo; 2: amostra amplificada.

Após a restrição do fragmento purificado e também do plasmídeo, estes foram ligados e realizou-se uma transformação em células de *E. coli*, linhagem DH5 α . A

confirmação dos clones foi realizada por PCR das colônias geradas. O resultado das reações pode ser observado a seguir.

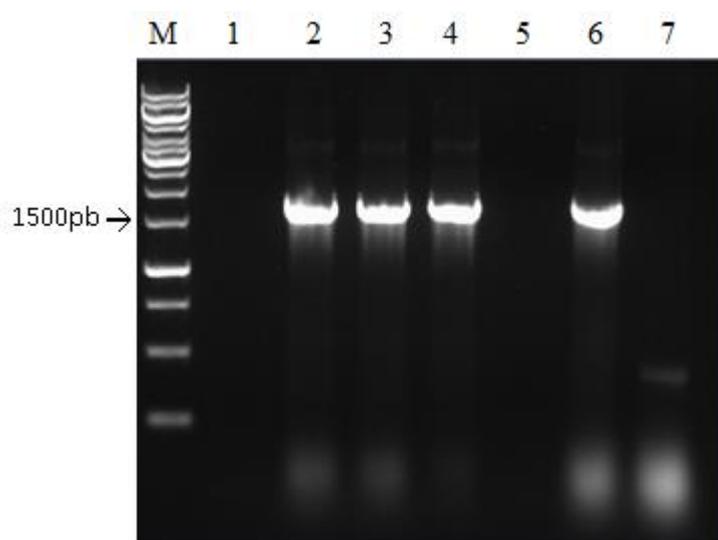


Figura 10: Gel de agarose 1 % mostrando a identificação de clones recombinantes em pPICZ α -A. Eletroforese em gel de agarose 1%, resultado da PCR de colônia. M: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Fermentas); 1: controle negativo; 2, 3, 4: amostra recombinante; 5: amostra não recombinante; 6: amostra recombinante; 7: amostra sem inserto.

Os *primers* utilizados se hibridizam no vetor de expressão pPICZ α -A, nas regiões do promotor AOX 5' e AOX 3'. Sendo assim, as amostras recombinantes (2, 3, 4 e 6) apresentaram tamanho aproximado do amplicom igual a 1850 pb, enquanto a amostra sem inserto (7) gerou um fragmento de aproximadamente 400 pb. Resultado esperado, visto que a distância das regiões de hibridização dos *primers* somam 400 pb dos pontos de clonagem escolhidos no sítio múltiplo de clonagem do pPICZ α -A. Considerando que amostras recombinantes foram encontradas, seguiu-se para a confirmação da clonagem em correta fase aberta de leitura por sequenciamento das extremidades de clonagem.

Após o sequenciamento do clone recombinante e confirmação da correta ligação do inserto em fase no plasmídeo pPICZ α -A, prosseguimos para a linearização do vetor e

posterior transformação no organismo *Pichia pastoris*. As colônias foram visualizadas após 72 horas de crescimento em estufa a 30°C e então foram submetidas à PCR de colônia (figura 11) com o objetivo de se encontrar colônias recombinantes.

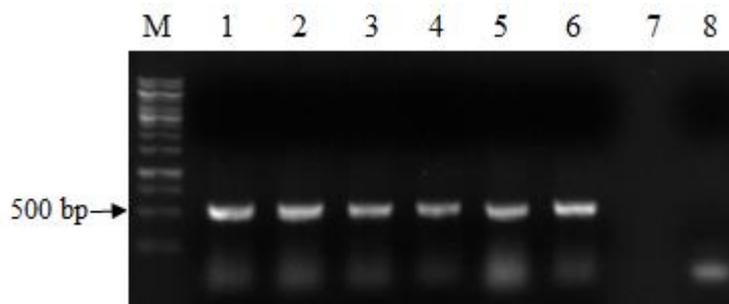


Figura 11: Gel de agarose mostrando a identificação de leveduras recombinantes. M: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Fermentas); 1 a 6: Amplificação positiva que confirma a presença do DNA de interesse no organismo *P. pastoris*. 7: Amostra não amplificada; *P. pastoris* não recombinante. 8: controle negativo de reação.

Os *primers* utilizados para essa reação foram AOX 5' e SI- β -fruct-RT-R, com *amplicon* esperado de aproximadamente 590 pb, como observado nas amostras positivas. Objetivando a identificação de transformantes hiperprodutores da proteína recombinante, colônias positivas que cresceram em meio contendo concentração elevada, 500 μ g/mL do antibiótico zeocina, foram utilizadas para a seleção dos transformantes multicópias.

Para os ensaios de expressão da rSI- β -fruct, alíquotas foram retiradas a cada 24h de indução, as quais podem ser visualizadas na figura 12, relativa ao SDS-PAGE 12%.

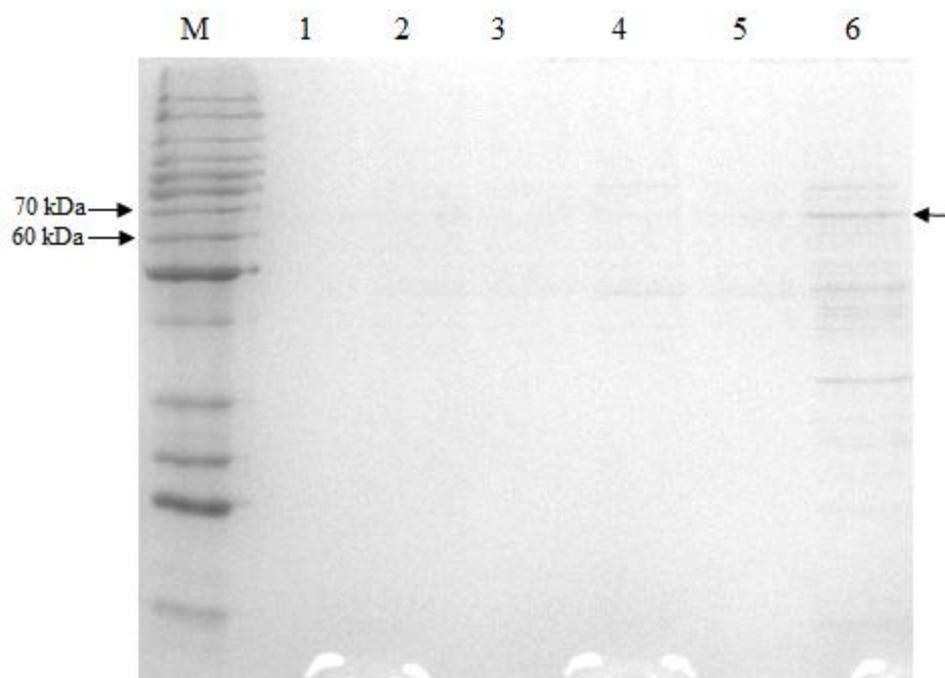


Figura 12: Ensaio de expressão da rSI- β -fruct em *P. pastoris*. SDS-PAGE 12% mostrando em M: marcador de peso molecular BenchMark (Invitrogen); 1: Amostra não induzida; 2: Amostra após 24h de indução; 3: Amostra após 48h de indução; 4: Amostra após 72h de indução; 5: Amostra após 96h de indução; 6: Amostra após 120h de indução. A seta preta indica a proteína recombinante.

A análise de expressão revela que só é possível observar a banda correspondente à rSI- β -fruct após 120 h de indução. A proteína aparece com massa molecular superior à prevista, dando um indicativo de que está glicosilada.

A purificação da rSI- β -fruct foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna contendo Níquel. A figura 13 mostra as frações de purificação, a partir de 75 mM de concentração de imidazol, ponto no qual a proteína começou a ser eluída da coluna em sua forma purificada. O rendimento da expressão foi de 26 mg de proteína purificada por litro de indução.

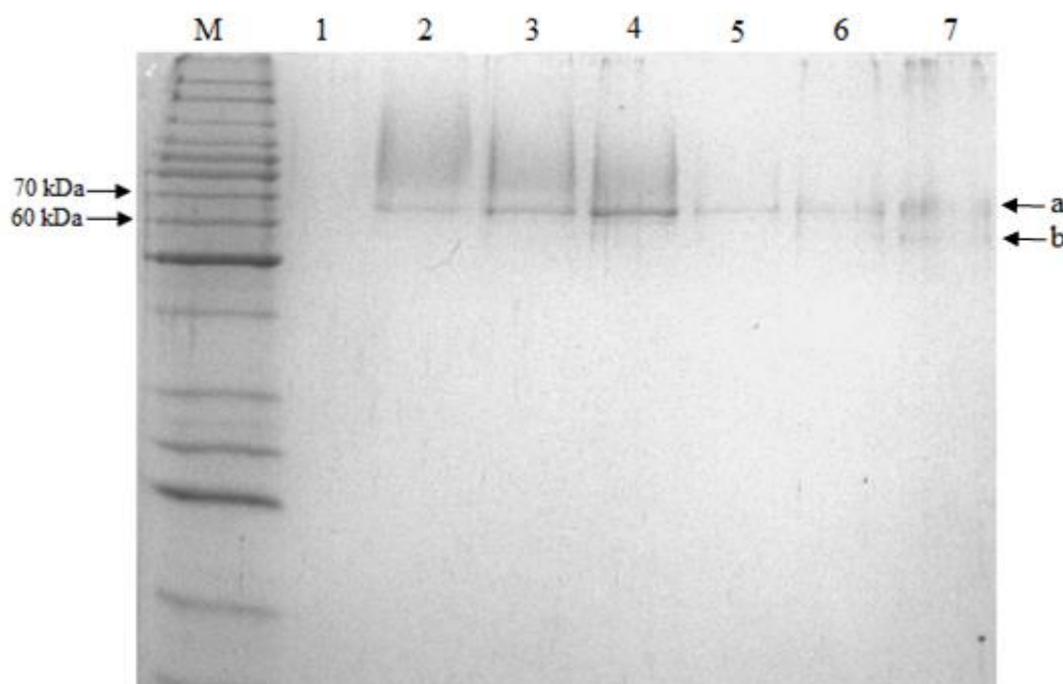


Figura 13: Análise da purificação da rSl- β -fruct por cromatografia de afinidade ao níquel. SDS-PAGE 12% mostrando em M: marcador de peso molecular BenchMark (Invitrogen); 1: primeira amostra eluída com 75 mM de imidazol; 2: segunda amostra eluída com 75 mM de imidazol; 3: primeira amostra eluída com 100 mM de imidazol; 4: segunda amostra eluída com 100 mM de imidazol; 5: primeira amostra eluída com 250 mM de imidazol; 6: segunda amostra eluída com 250 mM de imidazol; 7: terceira amostra eluída com 250 mM de imidazol. A “seta a” indica a proteína possivelmente glicosilada e a “seta b” indica a proteína não glicosilada.

A proteína purificada aparece com massa molecular de aproximadamente 65 kDa, 10 kDa a mais que a massa prevista. Esse resultado indica que a proteína foi glicosilada pela levedura, evento esperado em virtude da presença de sítios de N-glicosilação na sequência de aminoácidos da rSl- β -fruct. Nas duas últimas frações da purificação são visualizadas duas bandas de proteína, uma delas com massa aproximada de 65 kDa e outra próxima a 54,8 kDa. Sugere-se então que a levedura produz a rSl- β -fruct tanto na sua forma glicosilada quanto na forma não glicosilada.

Considerando essa diferença, um teste de glicosilação foi realizado para determinar se a banda de 65 kDa representa a proteína de 54,8 kDa glicosilada. De fato, havia glicosilação do tipo N e a N-glicosidase que funcionou melhor foi a Endo-H (New England Biolabs). Os resultados do tratamento podem ser observados na figura 14.

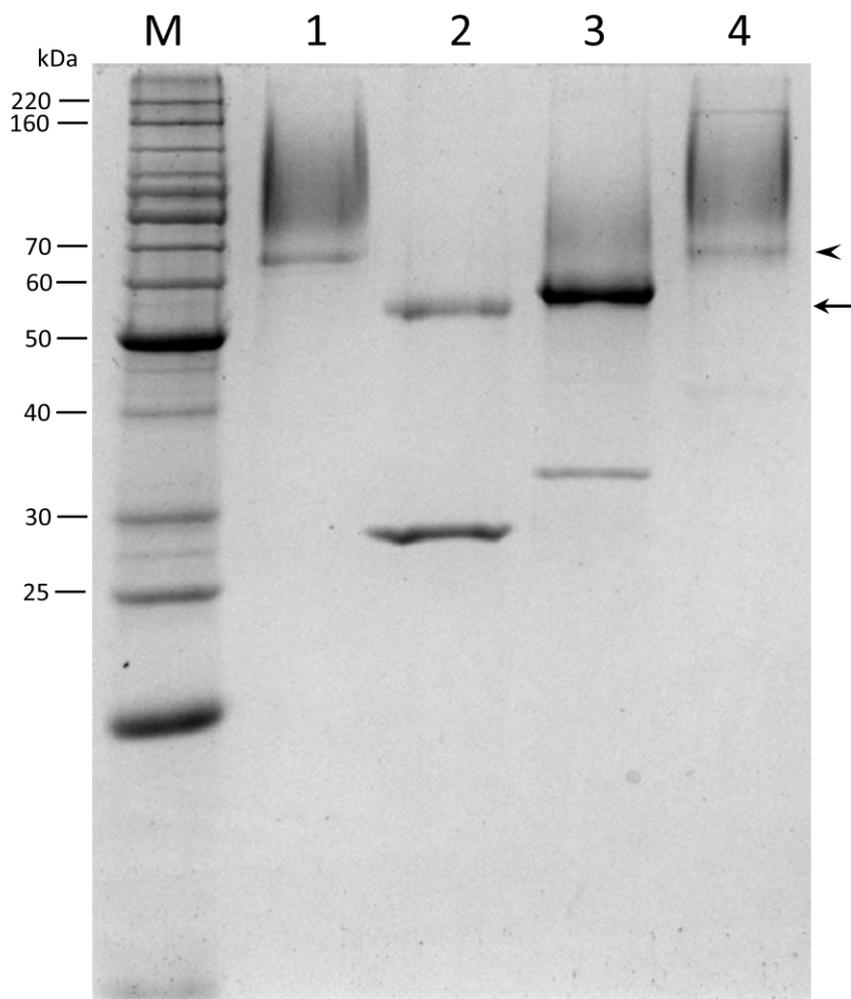


Figura 14: SDS-PAGE mostrando o teste de glicosilação da enzima produzida em *P. pastoris*: M: marcador de peso molecular Bench Mark (Invitrogen); 1: rSI- β -fruct sem tratamento; 2: rSI- β -fruct tratada com N-glicosidase Endo-H (New England Biolabs). A seta preta mostra a rSI- β -fruct deglicosilada, com 54.8 kDa. A Endo-H aparece no SDS-PAGE com 29 kDa; 3: rSI- β -fruct tratada com N-glicosidase PNGase-F (New England Biolabs). A seta preta mostra a deglicosilação parcial da rSI- β -fruct. A PNGase-F aparece no SDS-PAGE com 36 kDa; 4: rSI- β -fruct tratada com O-glicosidase Endo- α -N-Acetilgalactosaminidase, ENAG, (New England Biolabs). A cabeça de seta mostra que não houve deglicosilação da rSI- β -fruct. A ENAG aparece no SDS-PAGE com aproximadamente 150 kDa.

4.2. Atividade enzimática

4.2.1. Especificidade ao substrato

O ensaio enzimático com a utilização de diferentes substratos demonstrou que a rSI- β -fruct é capaz de hidrolisar sacarose e rafinose, mas não é capaz de clivar maltose e

melibiose. Esse resultado está em perfeito acordo com as características de uma β -frutofuranosidase (Terra e Ferreira., 2011).

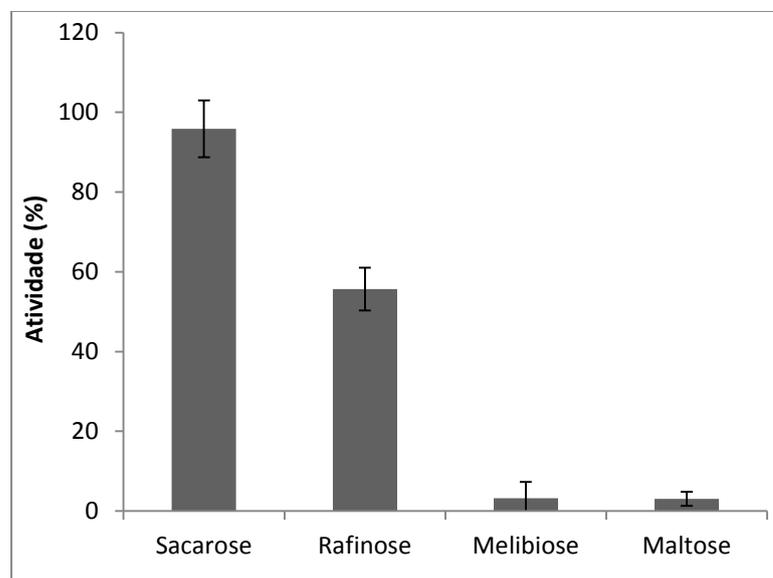


Figura 15: Teste de especificidade ao substrato. Eixo Y: Mensuração da atividade enzimática em porcentagem; Eixo X: diferentes substratos testados. Atividade positiva diante de sacarose e rafinose. Atividade negativa diante de melibiose e maltose

4.2.2. Curva de progresso

A curva de progresso demonstra a mudança de ordem da reação a partir dos 1040 segundos de reação (figura 16). Assim sendo, ao escolher um tempo anterior à mudança de ordem da reação, foi determinado que o tempo de reação nas condições apresentadas fosse 600 segundos.

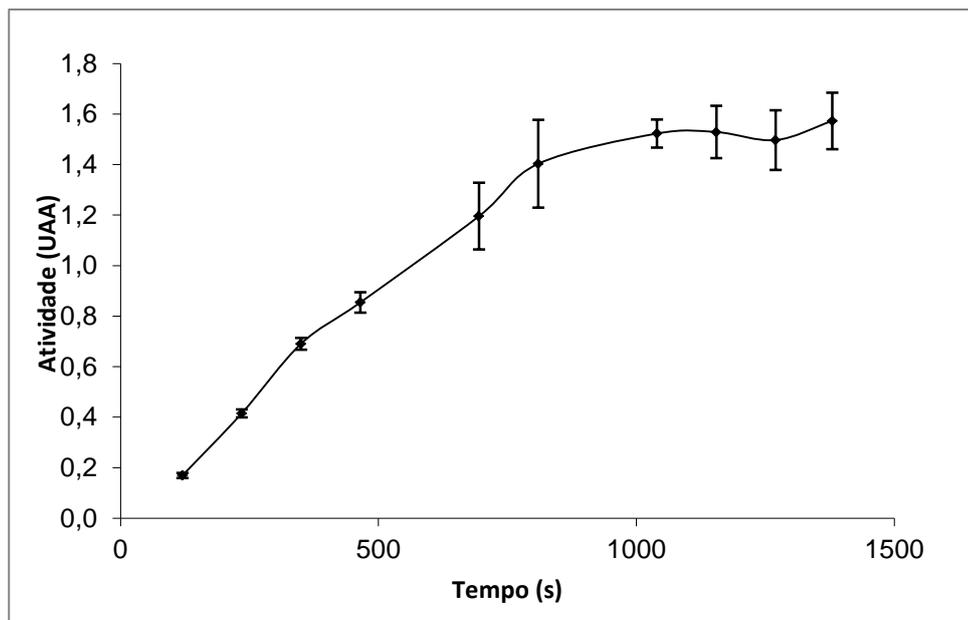


Figura 16: Curva de progresso. Atividade enzimática conta sacarose representada em unidades arbitrárias de absorbância (UAA).

4.2.3. Influência do pH

Nos testes de atividade da rSI- β -fruct variando o pH de 2,5 até 9,0 (figura 17), foi identificado que no pH 5,0 a enzima tem atividade máxima. Portanto, a rSI- β -fruct possui caráter ácido.

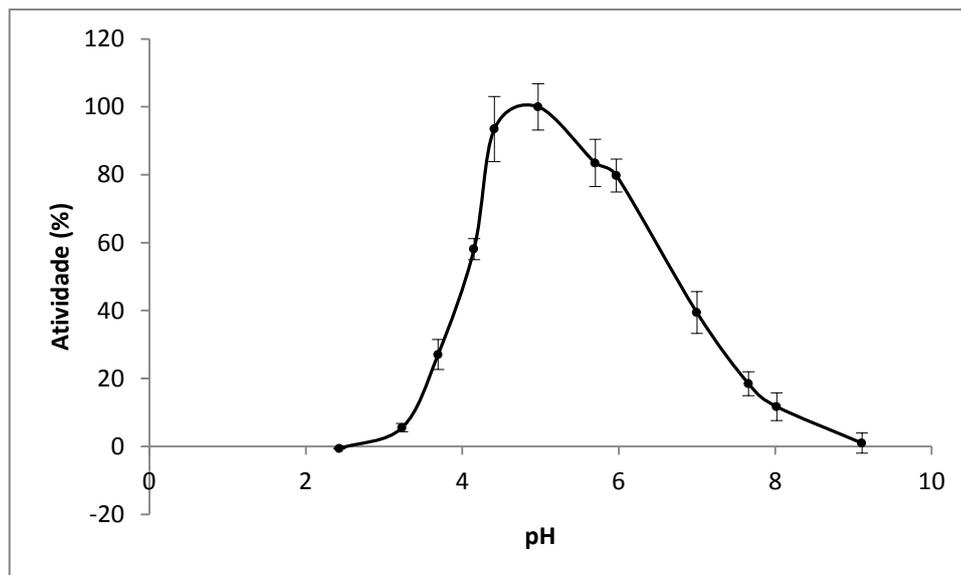


Figura 17: Curva de atividade enzimática em sacarose da *rSI-β-fruct* em função da variação de pH. Eixo Y: Mensuração da atividade enzimática em porcentagem; Eixo X: Quantidade crescente de pH. Variação de 2,5 a 9,0. A maior atividade da *rSI-β-fruct* foi detectada no pH 5,0.

4.2.4. Influência da temperatura

Nos ensaios realizados variando a temperatura de reação, foi detectado que em 50 °C a enzima apresenta maior atividade (figura 18). No entanto, nessa temperatura elevada, a meia vida da enzima pode ser reduzida, provavelmente em função da desnaturação térmica.

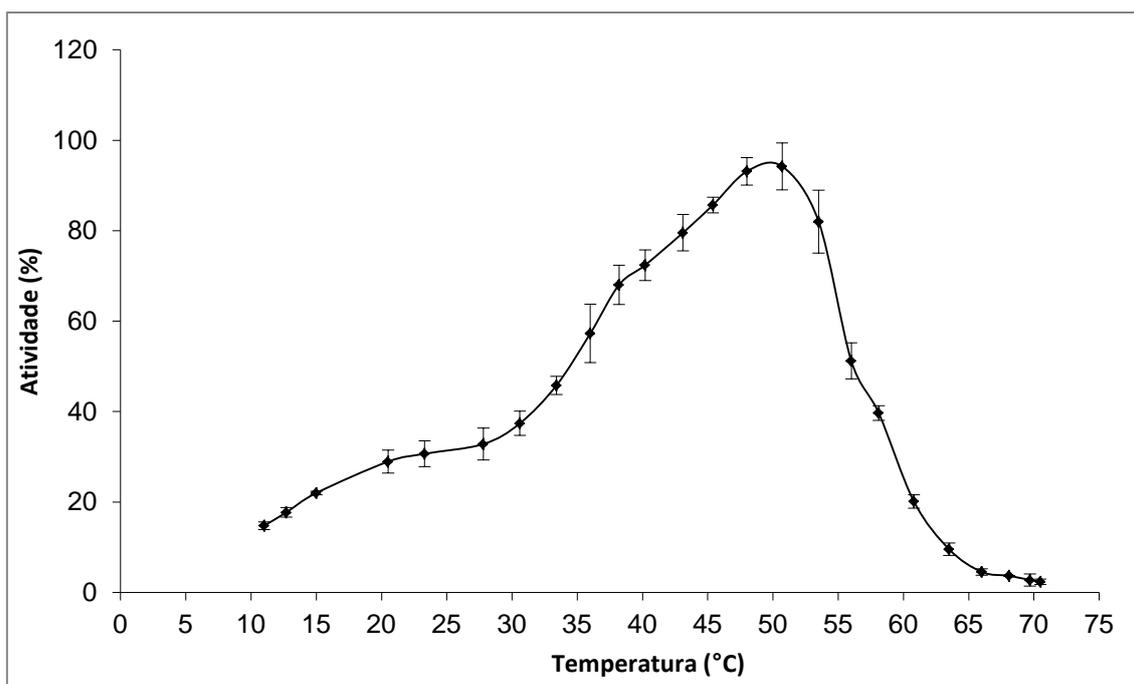


Figura 18: Curva de influência da temperatura. Eixo Y: Mensuração da atividade enzimática em porcentagem; Eixo X: Valores crescentes de temperatura. Variação de 10 a 70 °C. A maior atividade foi encontrada na temperatura 50 °C.

4.2.5. Estabilidade ao pH

A curva mostrou que a maior estabilidade enzimática nas condições testadas é conseguida com pH próximo de 6,0 (figura 19). A diferença em relação à curva de influência do pH demonstra que a condição hidrogeniônica de maior atividade pode ser capaz de diminuir a meia vida da enzima, assim como é observado para o caso da temperatura.

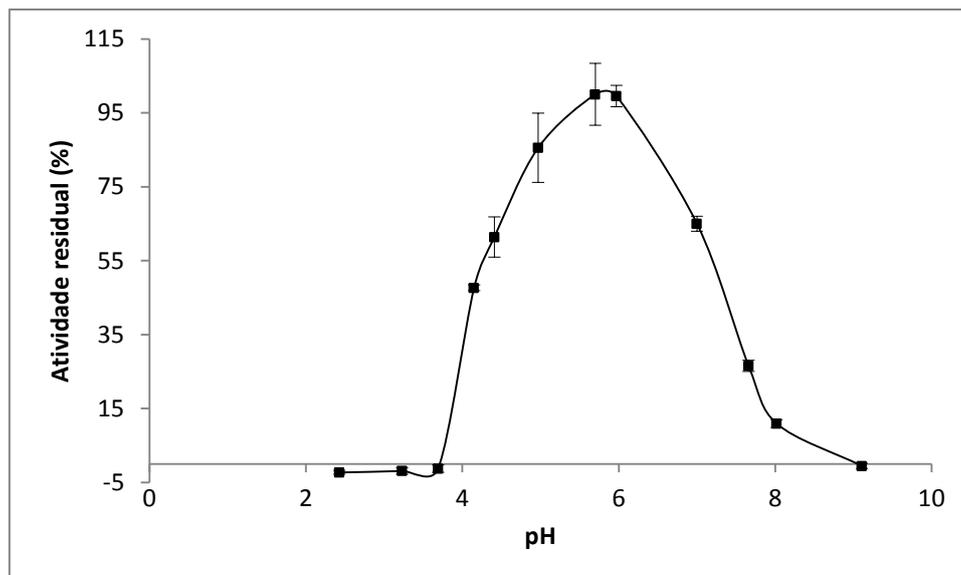


Figura 19: Curva de estabilidade da rSI- β -fruct em função da variação de pH. Eixo Y: Mensuração da atividade enzimática em porcentagem; Eixo X: Quantidade crescente de pH. Variação de 2,5 a 9,0. A maior estabilidade da rSI- β -fruct foi detectada em aproximadamente pH 6,0.

4.2.6. Estabilidade à temperatura

A curva de estabilidade à temperatura mostrou claramente que a temperatura de maior atividade é consideravelmente maior que a temperatura de maior estabilidade enzimática, dentro das condições testadas (figura 20). Esse resultado corrobora o pensamento de que uma enzima trabalhando em temperatura de máxima atividade tem sua vida útil reduzida devido à alta energia cinética que lhe é imposta.

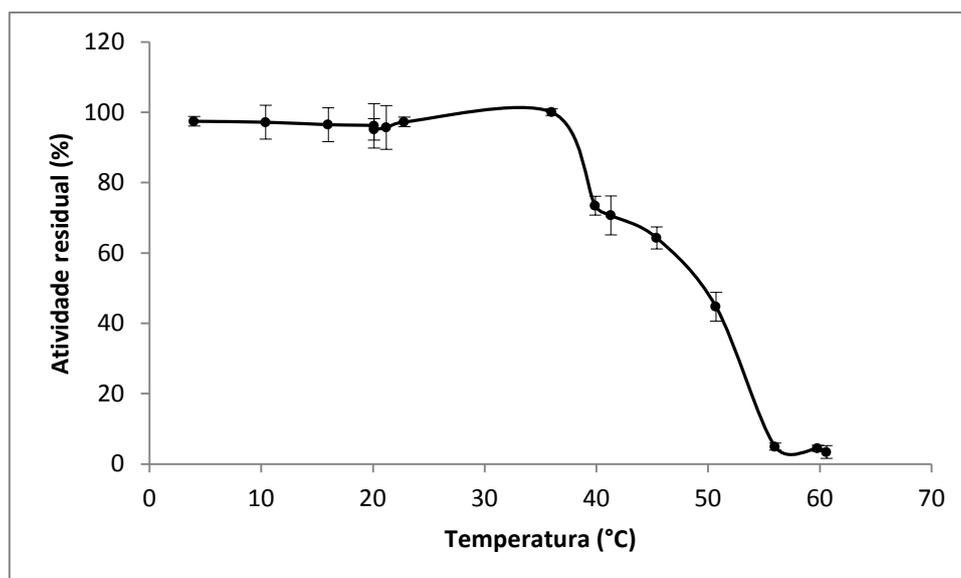


Figura 20: Estabilidade da rSI- β -fruct em função da variação de temperatura. Curva mostrando no eixo Y: Mensuração da atividade enzimática em porcentagem; Eixo X: temperatura crescente. Variação de 4 a 60,6 °C. A maior estabilidade da rSI- β -fruct foi detectada em até quase 40 °C .

4.2.7. Termorresistência

A análise de termorresistência mostra que as temperaturas de 10 e 20 °C podem ser usadas para armazenar a enzima nas condições ensaiadas (figura 21). Entretanto, quando a temperatura passa para 30 °C é possível observar que a enzima suporta poucas horas, o que inviabiliza seu estoque nessas condições.

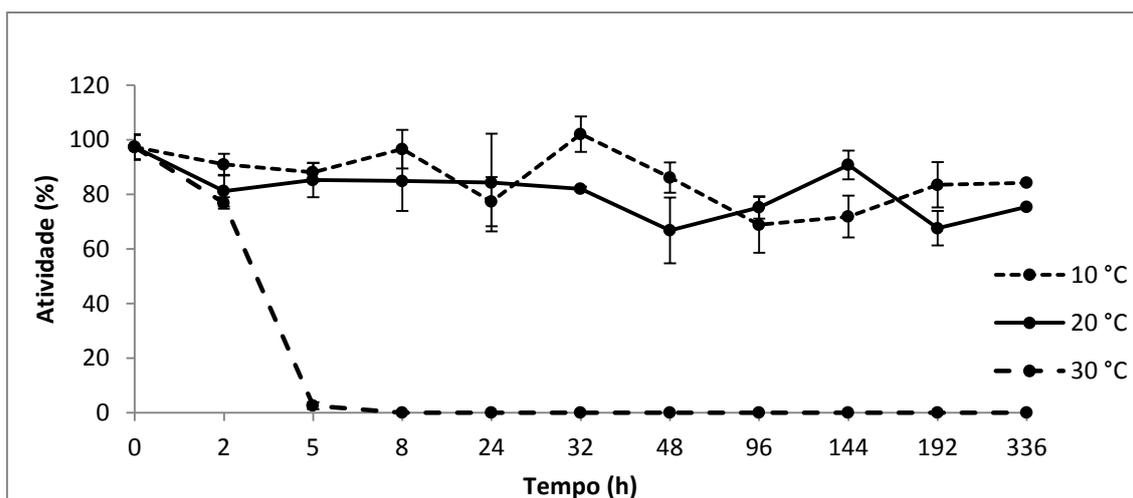


Figura 21: Curva de resistência térmica: Quando a enzima é estocada a 30 °C se desnatura em poucas horas. As temperaturas possíveis de armazenagem, dentro das condições ensaiadas, são 10 e 20 °C, pois a atividade residual permanece constante ao longo do tempo.

4.2.8. Influência de íons

A determinação da influência de íons revelou resultados diferentes para cada concentração ensaiada. Com 50 mM houve queda de atividade em todos os íons testados (figura 22). Já com 1 mM, NH_4Cl_2 e ZnCl_2 mostraram discreta melhora na atividade, enquanto MgCl_2 e SDS inibiram totalmente a enzima (figura 23). Esses resultados mostram que a variação na concentração de alguns íons resulta na mudança de comportamento da enzima.

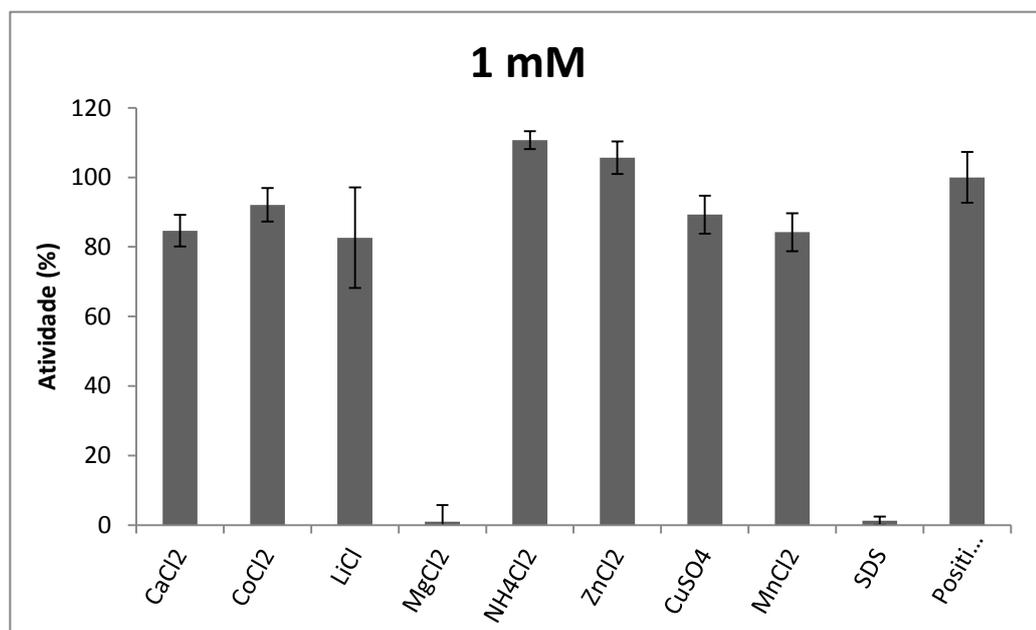


Figura 22: Influência de íons (1 mM) na atividade de rSI-β-fruct. SDS e MgCl₂ provocam inibição na atividade enzimática.

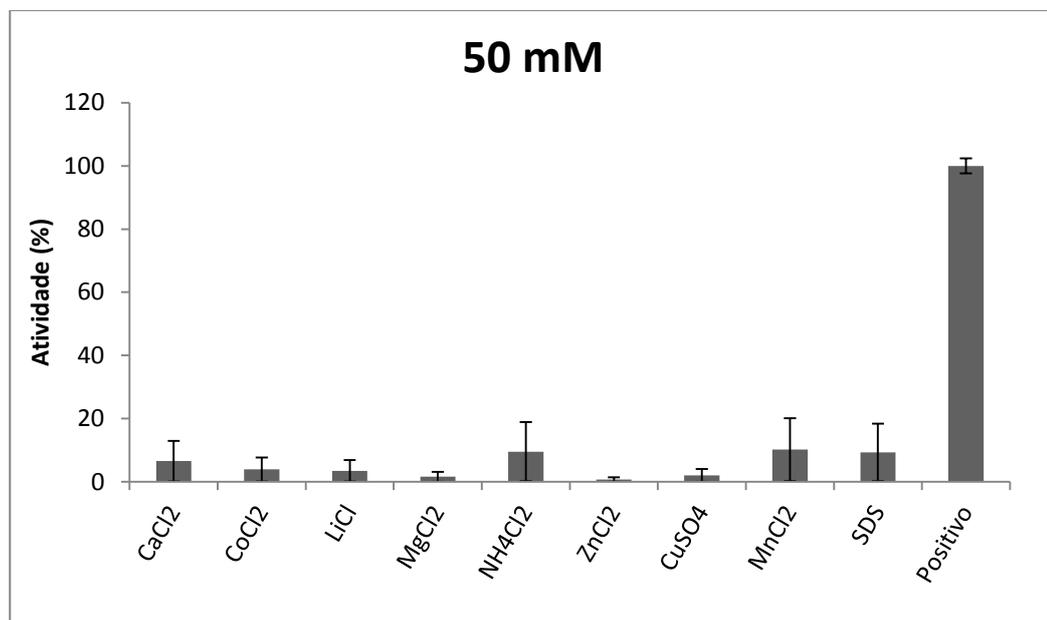


Figura 23: Influência de íons (50 mM) na atividade de rSI-β-fruct. Todos os íons testados provocam inibição na atividade enzimática.

4.2.9. Parâmetros cinéticos

Como já mencionado, o software utilizado para a estimativa dos parâmetros enzimáticos da enzima foi o GraphPad Prism 6.0. O programa foi alimentado com os dados de velocidade de reação e concentração de substrato. O modelo foi ajustado a uma dispersão não linear, assim como é o modelo proposto por Michaelis-Menten. O gráfico resultante pode ser observado na figura 24.

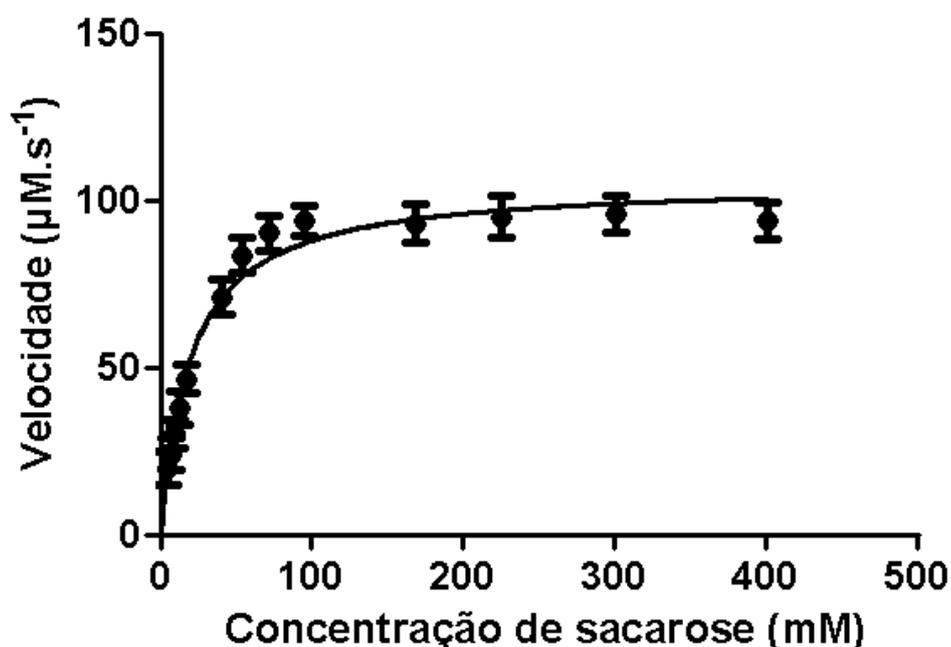


Figura 24: Curva de Michaelis-Menten para a cinética da rSI-β-fruct. Eixo Y: Mensuração da atividade enzimática em Velocidade de reação (μM/s); Eixo X: Concentrações crescentes de sacarose. Variação até 400 mM.

Os valores de V_{\max} , K_m e K_{cat} foram calculados pelo programa e estão apresentados na tabela 1, juntamente com os dados estatísticos da curva.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da rSI-β-fruct, calculados a partir da curva de Michaelis-Menten. Software utilizado GraphPad Prism 6.0.

Constante	Valor	Erro padrão
K_m	20,02 mM	2,29 mM

V_{\max}	$105,7 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	-
k_{cat}	$520,9 \text{ s}^{-1}$	$14,91 \text{ s}^{-1}$
k_{cat}/K_m	$2,60 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	-

Esses resultados não podem ser diretamente levados à fisiologia do inseto, visto que essa é uma enzima recombinante, com cauda de histidina e produzida em células de leveduras. Além da cauda de histidina, o fato da enzima ser glicosilada pode interferir na atividade enzimática, pois ainda não se sabe o grau de glicosilação da enzima nativa. Sendo assim, tem-se um panorama geral de uma enzima recombinante e não o reflexo exato de como a invertase nativa do inseto atua em seus processos fisiológicos.

5. Discussão

O sistema de expressão em *P. pastoris* se mostrou eficiente para nosso propósito, visto que realizamos a expressão heteróloga para melhor estudar a enzima de *S. levis* para então extrair informações de seu papel no metabolismo do inseto e seu potencial de aplicação como uma enzima biotecnológica. O rendimento de 26 mg/L foi suficiente para a realização dos experimentos, apesar de ser baixo quando comparado aos possíveis 830 mg/L de uma PME (EC 3.1.1.11) de *S. levis*, produzida por nosso grupo de pesquisa (Evangelista, 2012). A caracterização da sequência levou à predição de sítios de glicosilação. Essa predição se confirmou com a produção de uma proteína recombinante glicosilada, com aproximadamente 10 kDa a mais que sua massa molecular esperada.

O ensaio enzimático com diferentes substratos demonstrou a especificidade da rSI- β -fruct com sacarose e rafinose. Isso está em perfeito acordo com as características de

uma β -frutofuranosidase (Terra e Ferreira, 2011). A atividade β -frutofuranosídica foi descrita erroneamente em algumas espécies de coleópteros, pois a enzima foi testada apenas contra sacarose (Hirashima et al., 1989; Bauchop e Clarke, 1975), que também pode ser hidrolisada por α -glicosidases. No estudo de Hirashima e colaboradores (1989) foi sugerida atividade de invertase em *Tribolium castaneum*. Entretanto, o genoma desse inseto (Richards et al., 2008) não possui um gene de β -frutofuranosidase, levando-nos a associar esta atividade a uma α -glicosidase ou a uma contaminação por enzimas da microbiota.

A presença de peptídeo sinal na sequência gênica da *Sl- β -fruct* associada ao perfil de expressão encontrado sugerem secreção da proteína no lúmen do intestino médio do *S. levis*. O teste de influência do pH na atividade da rSl- β -fruct resultou na atividade máxima em pH 5,0. Essa natureza ácida é recorrente em invertases já caracterizadas, tanto de procariotos quanto de eucariotos (Dipasquale et al., 2009; Gáscon et al., 1968; Kim et al., 2011). O pH interno do intestino médio de *S. levis* varia de 5,5 (região anterior) a 7,6 (região posterior) (Soares-Costa et al., 2011). Portanto, a característica ácida da rSl- β -fruct suporta a hipótese de que essa enzima possui ação digestiva em *S. levis*.

O teste de influência de íons deixa muito claro que 50 mM é uma concentração muito alta para qualquer um dos íons testados, ou seja, deve existir uma concentração limite para cada molécula começar a apresentar inibição sobre a rSl- β -fruct. Existem dois reagentes que, já na concentração de 1 mM, apresentaram interferência negativa na atividade enzimática: SDS e MgCl₂. O SDS também inibe a invertase de *Bifidobacterium adolescentis* (Omori et al., 2010). O MgCl₂ inibe invertase de *Bifidobacterium breve* (Ryan et al., 2005), assim como em *S. levis*, mas não gera efeito

algum sobre a invertase de *B. adolescentis* (Omori et al., 2010). Analisando os resultados de testes em três diferentes espécies, observa-se que a resposta aos íons é bastante particular para cada enzima, portanto não foi possível estabelecer um padrão para β -frutofuranosidases em geral.

A temperatura de máxima atividade atingida pela rSI- β -fruct está próxima das invertases bacterianas e fúngicas, mas muito abaixo das encontradas em organismos termófilos, como *Thermotoga neapolitana*, com temperatura ótima em 85 °C e *Thermotoga marítima*, com atividade máxima a 95 °C (Dipasquale et al, 2009; Liebl et al, 1998). Esse parâmetro não garante que a enzima consiga trabalhar na temperatura de maior atividade por muito tempo. O que acontece quando se aumenta a energia cinética para a reação ocorrer é a desnaturação precoce da enzima. Portanto, mais importante do que ter uma enzima com alta temperatura ótima é tê-la em atividade nessas condições por períodos longos de tempo.

A termoestabilidade encontrada para rSI- β -fruct é compatível com o encontrado em *Microbacterium saccharophilum*, o qual também possui β -frutofuranosidase que não suporta temperaturas maiores que 40 °C. No caso de *M. saccharophilum*, foi realizado um estudo com mutações sítio-específicas para aumentar a termorresistência da mesma, que passou a resistir a temperaturas de até 60 °C (Ohta et al., 2014). As invertases de *Mucor geophilus* e de *Xanthophyllomyces dendrorhous* são capazes de suportar até 55 °C e 60 °C em atividade máxima respectivamente, portanto, são consideradas naturalmente termoestáveis dentro dos padrões encontrados para invertases (Qureshi et al., 2012; Linde et al., 2008).

A partir da comparação entre os parâmetros cinéticos estimados para rSI- β -fruct e outras invertases já caracterizadas, indicadas na tabela suplementar 1, observa-se que a

constante de afinidade ao substrato (K_m) é muito próxima do encontrado em *Sacharomyces cerevisiae*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*. O valor da V_{max} de reação é superior ao encontrado em *S. cerevisiae*, por exemplo. Esse valor reflete que a enzima possui alta capacidade de catálise. A eficiência catalítica da rSI- β -fruct, mensurada pela razão k_{cat}/K_m , mostrou-se na mesma ordem de grandeza dos valores demonstrados na tabela 2. Isso mostra que a enzima possui característica semelhante às enzimas de outros organismos.

Considerando a possibilidade de aplicação dessa enzima na indústria de produção de açúcar invertido, o panorama encontrado pela rSI- β -fruct é complexo. Apesar dos parâmetros cinéticos promissores, observa-se que tanto a temperatura ótima quanto a termorresistência da enzima encontram-se abaixo das condições de produção, que são 24 h a 60 °C (Marquez, 2007). Existem muitos estudos para imobilização das enzimas no processo produtivo de açúcar invertido (Arica et al., 2006; Bahar e Tuncel, 2001; Tümtürk e Tufan, 2002). Esse mecanismo permite maior recuperação da enzima e tem como efeito adicional melhorar a termorresistência e estabilidade da enzima. Sendo assim, tanto a imobilização quanto a produção de mutações sítio dirigidas da rSI- β -fruct podem ser técnicas promissoras para uma futura melhora em suas características térmicas.

Considerações finais

O presente estudo expande o conceito da ocorrência de β -frutofuranosidases em coleópteros. Apesar dos poucos relatos desse gene no reino animal, é possível afirmar que a β -frutofuranosidase é importante e vem sendo mantida entre algumas espécies de lepidópteros e coleópteros.

A SI- β -fruct se mostra importante na digestão de sacarose em *S. levis* e verifica-se que a mesma não é a única β -fructofuranosidase presente no processo. Esse fato abre portas para a busca por informações sobre uma segunda enzima, que pode ser produzida pelo próprio *S. levis* ou por integrantes de sua microbiota.

Tratando-se das potencialidades que a rSI- β -fruct apresenta para uma aplicação industrial, observa-se uma boa cinética de reação. Entretanto, seria adequado investir na melhoria de suas características térmicas, empregando estudos de mutação sítio dirigida ou imobilização enzimática. Ambas as abordagens se mostram promissoras, tendo-se como referência outros trabalhos encontrados na literatura.

Referências

- Akaike H. (1974), A new look at the statistical model identification, *Autom. Control. IEEE Trans.* 19, 716–723.
- Alberto F., Bignon C., Sulzenbacher G., Henrissat B. and Czjzek M. (2004), The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases, *J. Biol. Chem.* 279 (18), 18903–18910.
- Alvaro-Benito M, de Abreu M, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez-Barbero J, Ballesteros A, Polaina J, Fernández-Lobato M. (2007), Characterization of a beta-fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose., *Journal of Biotechnology.* 15;132(1):75-81.
- Arica M. Y., Bayramoğlu G. G. (2006), Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly(GMA–MMA) beads for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38 131–138.

Bahar T. e Tuncel A. (2001) Immobilization of Invertase onto Crosslinked Poly(p-chloromethylstyrene) Beads. Chemical Engineering Department, Hacettepe University, 06532-Beytepe, Ankara, Turkey

Bauchop, T.; Clarke, R. T. J. (1975), Gut microbiology and carbohydrate digestion in the larva of *Costelytva zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). New Zealand Journal of Zoology, v. 2, n. 2, p. 237-243.

Boettner, M.; Prinz, B.; Holz, C.; Stahl, U.; Lang, C. (2002) High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology. v. 99, May. p. 51-62.

Carneiro, C.N., Isejima E.M., Samuels R.I. and Silva C.P. (2004), Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalk borer *Diatraea saccharalis*, J. Insect Physiol. 50, 1093–1101.

Chen S. and Gopalakrishnan P., Speaker, (1998) environment and channel change detection and clustering via the Bayesian information Criterion, In: Proc. DARPA Broadcast News Transcription and Understanding Workshop, 1–6.

Chinnery J.A.B. (1971), Carbohydrases of the midgut of the leather beetle *Dermestes maculatus*, J. Insect Physiol. 17, 47–61.

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira. Acesso on-line pelo endereço: www.ctc.com.br.

Daimon T., Taguchi T., Meng Y., Katsuma S., Mita K. and Shimada T. (2008), β -fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *Bombyx mori* to toxic alkaloids in mulberry latex, J. Biol. Chem. 283, 15271–15279.

Dahlqvist, A. (1968). Assay of intestinal disaccharides. Analyt. Biochem. 22, 99-107.

Devi M.B. and Singh S.N. (2011), Physiology of digestion in mango weevil, *Sternochetus gravis* (Fabr.) (Curculionidae : Coleoptera), J. Exp. Sci. 2 (12), 07–09.

Dipasquale L., Gambacorta A., Siciliano R.A., Mazzeo M.F. and Lama L. (2009), Purification and biochemical characterization of a native invertase from the hydrogen-producing *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359), *Extremophiles* 13 (2), 345–354.

Evangelista, D. E. (2012), Produção recombinante, caracterização enzimática e estudos sobre a ocorrência de pectinases no “bicudo da cana-de-açúcar” (*Sphenophorus levis*, Curculionidae). São Carlos: UFSCar, 2012. 110 p. Mestrado (Genética e Evolução) , orientador: Prof.Dr. Flávio Henrique Silva, banca: Prof.Dr. Flávio Henrique Silva; Profa.Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza; Prof.Dr. André Rodrigues-UFSCar.CCBS - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.GEv.

Fonseca, F. P. P. (2012) "Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*" Doutorado em genética evolutiva e biologia molecular Instituição de Ensino: Universidade Federal De São Carlos Biblioteca Depositária: biblioteca comunitária ufscar

Galperin M.Y. e Fernández-Suárez X.M. (2012), The 2012 nucleic acids research database issue and the online molecular biology database collection, *Nucleic Acids Res.* 40, D1–D8.

Gáscon S., Neumann N.P. and Lampen J.O. (1968), Comparative study of properties of purified internal and external invertases from yeast, *J. Biol. Chem.* 243, 1573–1577.

Gatehouse, A.M.R., SHI, Y., Powell, K.S., Brough, C., Hilder, V.A., Hamilton, W.D.O., Newell, C.A., Merryweather, A., Boulter, D., Gatehouse, J.A. (1993), Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philos Trans Royal Soc London, Series B.* 342: 279-286.

Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C, (2001). An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, v. 25, p. 386-401.

Hall, T.A. (1999), BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98,.

Hirashima A., Ishaaya I., Ueno R., Oyama K. and Eto M. (1989), Effect of salithion enantiomers on the trehalase system and on the digestive protease, amylase and invertase of *Tribolium castaneum*, *Pest. Biochem. Physiol.* 34, 205–210.

Holt S., Jong V.D., Faramus E., Lang T. and Brand Miller J. (2003), A bioflavonoid in sugar cane can reduce the postprandial glycaemic response to a high-GI starchy food, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 12 (S66).

Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Lerin, J., Pham-Delegue, M.H. (2000), Expression of protease inhibitors in rapeseed. In *Recombinant Protease Inhibitors in Plants* (Michaud, D., ed.), 179-190.

Keeling C.I., Yuen M.M., Liao N.Y., Docking T.R., Chan S.K., Taylor G.A., Palmquist D.L., Jackman S.D., Nguyen A., Li M., Henderson H., Janes J.K., Zhao Y., Pandoh P., Moore R., Sperling F.A., Huber D.P., Birol I., Jones S.J. and Bohlmann J. (2013), Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major forest pest, *Genome Biol.* 14, 2013, R27, <http://dx.doi.org/10.1186>.

Kim D., Lee G., Chang M., Park J., Chung Y., Lee S. and Source Lee TK. (2011), Purification and biochemical characterization of insoluble acid invertase (INAC-INV) from pea seedlings, *J. Agric. Food Chem.* 59 (20), 11228–11233.

Lane, D. J., (1991) 16S/23S rRNA sequencing., *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.*, E. Stackebrandt and Goodfellow p. 115 – 175.

Le S.Q. and Gascuel O. (2008), An improved general amino acid replacement matrix, *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320.

Liebl, W., Brem, D., and Gotschlich, A. (1998), Analysis of the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 55–64.

Linde D, Macias I, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez A, Fernández-Lobato M. (2008), Molecular and biochemical characterization of a beta-fructofuranosidase from

Xanthophyllomyces dendrorhous., Appl Environ Microbiol. 75(4):1065-73. doi: 10.1128/AEM.02061-08.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D.(2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, v. 25, p. 402 – 408.

Maddison D., Schulz K., Wayne P. and Maddison W. (2007), The tree of life web project, Zootaxa 1668, 19–40.

Marquez, L. D. S. (2007), Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas., 124 f.: il. Universidade Federal de Uberlândia.

Noelting G. e Bernfeld P. (1948), On amylases. The beta-amylase: enzyme assay and check for the absence of alpha-amylase, Helv. Chim. Acta 31, 286–290.

Ohta Y, Hatada Y, Hidaka Y, Shimane Y, Usui K, Ito T, Fujita K, Yokoi G, Mori M, Sato S, Miyazaki T, Nishikawa A, Tonozuka T. (2014) Enhancing thermostability and the structural characterization of *Microbacterium saccharophilum* K-1 β -fructofuranosidase. Appl Microbiol Biotechnol. 98(15):6667-77. doi: 10.1007/s00253-014-5645-3.

Omori T, Ueno K, Muramatsu K, Kikuchi M, Onodera S, Shiomi N. (2010), Characterization of recombinant beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1., Chem Cent J. 4:9. doi: 10.1186/1752-153X-4-9.

O'Sullivan C. and Tompson F.W. (1890), Invertase: a contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment, J. Chem. Soc. 57, 834–931.

Papini-Terzi F.S., Rocha F.R., Vencio R.Z., Felix J.M., Branco D.S., Waclawovsky A.J., Del Bem L.E., Lembke C.G., Costa M.D., Nishiyama M.Y., J R. and Vicentini R. (2009), Sugarcane genes associated with sucrose content, BMC Genomics 21 (10), 120.

Pauchet , Y.; Muck , A.; Svatos , A.; Heckel , D. G.; Preiss , S. (2008) Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect . Journal Proteome Research, v. 7 , p. 1629 – 1639.

Pauchet Y., Wilkinson P., Vogel H., Nelson D.R., Reynolds S.E., Heckel D.G. and French-Constant R.H. (2010), Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence, *Insect Mol. Biol.* 19 (1), 61–75.

Peduzzi R., Fonseca F. P. P., Júnior C. D. S., Kishi L. T., Terra W. R., Henrique-Silva F. (2014), A novel β -fructofuranosidase in Coleoptera: Characterization of a β -fructofuranosidase from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*., *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 55 (2014) 31e38.

Posada D. and Buckley T.R. (2004), Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests, *Syst. Biol.* 53, 793–808.

Posada D. (2008), jModelTest: phylogenetic model averaging, *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.

Qureshi A. S., Khushk I., Bhutto M. A., Dahot M. U., Ikram-ul-Haq, Bano S. and Iqbal H. (2012), Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophyllus* EFRL 03., *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(47), pp. 10736-10743; DOI:10.5897/AJB11.4303.

Reddy A., Maley F. (1990) Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 265, 10817–10820

Rinke R.1, Costa A.S., Fonseca F.P., Almeida L.C., Delalibera Júnior I. and Henrique-Silva F., Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae), *Genet. Mol. Res.* 10 (4), 2011, 2679–2691.

Richards S., Gibbs R.A., Weinstock G.M., Beeman R.W., Lorenzen M.D., Lord J.C. and Oppert B.S. (2008), The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*, *Nature* 452, 949–955.

Rokas A., Williams B.L., King N. and Carroll S.B. (2003), Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies, *Nature* 425, 798–804, <http://dx.doi.org/10.1038/nature02053>.

Ryan S. M, Fitzgerald G. F, van Sinderen D. (2005), Transcriptional regulation and characterization of a novel beta-fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol.* 71(7):3475-82.

Santos , C. D.; Terra , W. R. (1986) Midgut alpha-glucosidase and beta-fructosidase from *Erinnyis ello* larvae and imagoes: physical and kinetic-properties. *Insect Biochemistry*, v. 16, p. 819 -824.

Scrivener A.M., Watanabe H. and Noda H. (1997), Diet and carbohydrate digestion in the yellow-spotted longicorn beetle *Psacotha hilaris*, *J. Insect Physiol.* 43 (11), 1039–1052.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, p. 76-85.

Soares-Costa, A.; Dias, A. B.; Dellamano, M.; De Paula F. F.; Carmona, A. K.; Terra, W. R.; Henrique-Silva, F. (2011) Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *Journal of Insect Physiology*, v. 57, n. 4, p. 462-468.

Stafylakis T., Katsouros V. and Carayannis G. (2009), Redefining the Bayesian information criterion for speaker diarisation, In: INTERSPEECH 2009, 10th Annual Conference of the International Speech Communication Association. Brighton, United Kingdom, 1051–1054.

Sumida , M.; Yuan , X. L.; Matsubara , F. Purification and some properties of soluble beta-fructofuranosidase from larval midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, v. 107, p. 273 -284, 1994.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013), MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

Terra W.R., Ferreira C. and De Bianchi A.G. (1979), Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara americana* and its physiological significance, *J. Insect Physiol.* 25, 487–494.

Terra W.R. and Ferreira C. (1994), Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function, *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1–62.

Terra, W. R.; Ferreira, C. (2011), Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert, L. I. (Ed.) *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, p. 365-418.

Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (22), 4673–4680.

Tümtürk H e Tufan Y. (2002), Immobilization of Invertase onto Dimer Acid-co-alkyl Polyamine., *Journal of Applied polymer science* DOI 10.1002/app.20623

Wallis, G.L.F., Hemming, F.W. Peberdy, J.F. (1997), Secretion of two β -fructofuranosidase by *Aspergillus niger* growing in sucrose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.345, p.214-222.

Warchol M., S. Perrin, J.-P. Grill, F. Schneider (2002), Characterization of a purified β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01224.x.

Zerbino D.R. and Birney E. (2008), Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs, *Genome Res.* 18 (5), 821–829.

Zhao C., Doucet D., Mittapalli O. (2014), Characterization of horizontally transferred β -fructofuranosidase (ScrB) genes in *Agrilus planipennis*., *Insect Molecular Biology* doi: 10.1111/imb.12127

Material suplementar

Tabela suplementar 1: Tabela comparativa de diferentes parâmetros cinéticos e pHs de atuação para invertases de procariotos, eucariotos e eucariotos superiores.

Nome	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1}.s^{-1}$)	pH	Referência
<i>Thermotoga neapolitana</i>	14,0		6	DIPASQUALE et. al, 2009
<i>Thermotoga maritima</i>	64,0	$4,1 \times 10^4$	5,5	LIEBL et. al, 1998
<i>Bifidobacterium breve</i>	25,0		6	RYAN et. al, 2005
<i>Bifidobacterium infantis</i>	24,0		6	WARCHOL, et. al, 2002
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	4,0	$8,5 \times 10^4$	5,0 a 6,5	LINDE et. al, 2008
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	4,9	$1,6 \times 10^4$	5.5	ALVARO-BENITO et. al, 2007
<i>Sacharomices cerevisiae</i>	26,0		3 a 7,6	GÁSCON et. al, 1968
<i>Pisum sativum</i>	4,41		4	KIM et. al, 2011
<i>Diatraea saccharalis</i>	3,34		7 a 8	CARNEIRO et. al, 2004
<i>Sphenophorus levis</i>	20,02	$2,6 \times 10^4$	5,0	PEDEZZI et al., 2014

Tabela suplementar 2: Correlação entre os organismos utilizados na análise filogenética e seus códigos

Nome	Grupo	Número de acesso (NCBI)
<i>Cedecea_davisae</i>	Gram -	WP016537676.1
<i>Klebsiella_oxytoca</i>	Gram -	376382642
<i>Shigella_flexneri</i>	Gram -	YP689836.1
<i>Shigella_sonnei</i>	Gram -	WP005150256.1
<i>Thermotoga_maritima</i>	Gram -	O33833
<i>Yersinia_rohdei</i>	Gram -	WP004713180.1
<i>Citrobacter_freundii</i>	Gram -	ZP09335719
<i>Enterobacter_cloacae</i>	Gram -	YP004950363
<i>Rahnella_aquatilis</i>	Gram -	AEX54718
<i>Escherichia_coli</i>	Gram -	ZP08356306
<i>Yersinia_rohdei</i>	Gram -	WP_004713180.1
<i>Raoultella_ornithinolytica</i>	Gram -	YP007876886.1
<i>Anoxybacillus_flavithermus</i>	Gram +	YP002315570
<i>Bacillus_licheniformis</i>	Gram +	BAL45530
<i>Bacillus_megaterium</i>	Gram +	AEN90524
<i>Clostridium_arbusti</i>	Gram +	WP_010237937.1
<i>Paenibacillus_polymyxa</i>	Gram +	YP003946857
<i>Bacillus_sonorensis</i>	Gram +	WP_006639648.1

<i>Anoxybacillus_kamchatkensis</i>	Gram +	WP019417832.1
<i>Paenibacillus_sp.</i>	Gram +	WP017811233.1
<i>Penicillium_chrysogenum_wisconsin</i>	Fungos	XP504435
<i>Pichia_jadinii</i>	Fungos	BAJ07830
<i>Saccharomyces_cereviseae</i>	Fungos	CAA73208
<i>Saccharomyces_cereviseae</i>	Fungos	NP588300
<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	Fungos	XP002568486
<i>Saccharomyces_paradoxus</i>	Fungos	P10594
<i>Schizosaccharomyces_pombe</i>	Fungos	P10596
<i>Yarrowia_lipolytica</i>	Fungos	CAG80036.1
<i>Ceratitis_capitata</i>	Díptera	XP004528766.1
<i>Bombus_impatiens</i>	Himenóptera	XP003494683.1
<i>Bombyx_mori</i>	Lepidóptera	BAG30883
<i>Bombyx_mori</i>	Lepidóptera	BAG30882
<i>Danaus_plexippus</i>	Lepidóptera	EHJ72267
<i>Danaus_plexippus</i>	Lepidóptera	EHJ63730
<i>Helicoverpa_armigera</i>	Lepidóptera	ABU98615
<i>Manduca sexta</i>	Lepidóptera	ACX49762
<i>Manduca sexta</i>	Lepidóptera	ACX49763
<i>Dendroctonus_ponderosae</i>	Coleóptera	AEE61467.1
<i>Dendroctonus_ponderosae</i>	Coleóptera	ENN82946.1
<i>Dendroctonus_ponderosae</i>	Coleóptera	ENN82076.1
<i>Sitophilus_orizae</i>	Coleóptera	SRX017240
<i>Dendrocalamopsis_oldhamii</i>	Plantas	AAC16654
<i>Hordeum_vulgare</i>	Plantas	ACY78467
<i>Oryza_sativa</i>	Plantas	ACG30542
<i>Oryza_sativa_Japonica</i>	Plantas	ABB77251
<i>Saccharum_officinarum</i>	Plantas	XP004528766.1
<i>Saccharum_robustum</i>	Plantas	NP001045626
<i>Sorghum_bicolor</i>	Plantas	AF276704
<i>Triticum_monococcum</i>	Plantas	BAJ93214
<i>Zea_mays</i>	Plantas	AAS88729
<i>Bambusa_oldhamii</i>	Plantas	ABB77251

Anexo



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmb

A novel β -fructofuranosidase in Coleoptera: Characterization of a β -fructofuranosidase from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*



Rafael Peduzzi ^{a,1}, Fernando P.P. Fonseca ^{a,1}, Célio Dias Santos Júnior ^a, Luciano T. Kishi ^a, Walter R. Terra ^b, Flávio Henrique-Silva ^{a,*}

^a Department of Genetics and Evolution, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of São Carlos, CEP: 13565-905, São Carlos, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, CEP: 26077 05513-970, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2014

Received in revised form

6 October 2014

Accepted 17 October 2014

Available online 1 November 2014

Keywords:

Sphenophorus levis

 β -fructofuranosidase

Coleoptera

Invertase

Horizontal gene transfer

Sugarcane

ABSTRACT

β -fructofuranosidases or invertases (EC 3.2.1.26) catalyze the hydrolysis of sucrose into fructose and glucose. β -fructofuranosidases have been widely described in microorganisms, but were not known in the animal kingdom until very recently. There are studies reporting lepidopteran β -fructofuranosidases, but no β -fructofuranosidase gene sequence or encoding transcript has previously been identified in beetles. Considering the scarcity of functional studies on insect β -fructofuranosidases and their apparent non-occurrence among coleopterans, the aim of the present study was to investigate the occurrence and characterize a β -fructofuranosidase transcript identified in a cDNA library from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis* (Curculionidae). To validate that the β -fructofuranosidase sequence (herein denominated *Sl- β -fruct*) is indeed encoded by the *S. levis* genome, PCRs were performed using genomic DNA extracted from the larval fat body as well as DNA from the midgut with microbial content. Amplification of *Sl- β -fruct* gene using larval fat body DNA indicated its presence in the insect's genomic DNA. The *Sl- β -fruct* gene was cloned in *Pichia pastoris* to produce the recombinant enzyme (r*Sl- β -fruct*). Molecular weight of the recombinant protein was about 64 kDa, indicating possible glycosylation, since the theoretical weight was 54.8 kDa. The substrate specificity test revealed that r*Sl- β -fruct* hydrolyzes sucrose and raffinose, but not melibiose or maltose, thereby confirming invertase activity. The pH curve revealed greatest activity at pH 5.0, demonstrating r*Sl- β -fruct* to be an acidic β -fructofuranosidase. Quantitative PCR (qRT-PCR) analyses indicated that the production of mRNA only occurs in the midgut and reaches the greatest expression level in 30-day-old larvae, which is the expected pattern for digestive enzymes. Chromatography of glycosidases from *S. levis* midguts showed two enzymes acting as β -fructofuranosidase, indicating the presence of a *Sl- β -fruct* isoform or a β -fructofuranosidase from insect intestinal microbiota. Moreover, it was found that α -glucosidases do not act on sucrose hydrolysis. Phylogenetic analyses indicated this enzyme to be similar to enzymes found in other coleopteran and lepidopteran β -fructofuranosidases, but also closely similar to bacterial enzymes, suggesting potential horizontal gene transfer. Despite this, the enzyme seems to be restricted to different groups of bacteria, which suggests distinct origin events. The present study expands the concept of the occurrence of β -fructofuranosidase in insects. Despite the few descriptions of this gene in the animal kingdom, it is possible to state that β -fructofuranosidase is crucial to the establishment of some insects throughout their evolutionary history, especially members of the Lepidoptera and Coleoptera clades.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Artigo científico fruto do presente trabalho. Publicado no periódico Insect Biochemistry and Molecular Biology, em dezembro de 2014