

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Isabela Giacomeli de Deus

**EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE UMA MIRACULINA DE
CITRUS EM *PICHIA PASTORIS* E EM *ESCHERICHIA COLI***

São Carlos

2023

Isabela Giacomeli de Deus

**EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE UMA MIRACULINA
DE *CITRUS* EM *PICHIA PASTORIS* E EM *ESCHERICHIA
COLI***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Carlos junto ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o apoio, incentivo e orações durante meus estudos. Em especial, agradeço meus pais pela paciência e compreensão comigo nesses anos. Obrigada mãe por sempre estar ao meu lado, seja nos momentos de conversas diárias ou nos finais de semana corridos que passamos juntas, você sempre se fez presente e, com isso, a distância entre nós só fortaleceu nossa ligação. Obrigada pai por sempre acreditar no meu potencial, por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, pelos vários momentos de festas e pelas nossas conversas francas, que são a base da nossa relação. Obrigada irmãozinho, João Pedro, por me fazer querer ser a melhor versão de mim e por me achar a irmã mais inteligente do mundo. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

Aos meus amigos de graduação, obrigada por todos nossos momentos juntos. Hiago, aquele amigo improvável, que foi conquistando seu espaço e se tornou o melhor parceiro. Príncia, aquela que sempre soube e foi atrás do que quer, mas ainda assim largaria tudo por aqueles que ama. Israel, o mais jovem, o mais doce e o mais puro de todos, aquele que enxergava o melhor de nós. Jacqueline, a menina inocente que eu tive o prazer de ver se tornar uma mulher desbravadora e aventureira. Vitor Hugo, o mais excêntrico de todos, que com seu jeito simples de ser, alegrava a todos.

Ainda, agradeço minhas companheiras de casa e de vida universitária. Obrigada Ana Luíza, a melhor colega de quarto que eu poderia ter. Em especial, obrigada Yasmin, minha irmã de outra mãe, com quem eu compartilho tudo.

Agradeço também minhas parceiras de laboratório, que foram essenciais para meu crescimento e para esse projeto acontecer. Obrigada Karina, Daniela e Sâmara pelos desabafos, fofocas, ensinamentos, risadas e por compartilharem as incertezas da vida junto comigo. Vocês são meu exemplo de equipe perfeita. Sempre levarei no coração todos os momentos que tive no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV).

À Prof. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, obrigada pela confiança em mim e na minha capacidade de pesquisa. Obrigada por me permitir fazer parte dessa equipe incrível e pela compreensão e orientação nos momentos mais conturbados da minha graduação.

Agradeço ainda o Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva pelos ensinamentos teóricos nas aulas de biologia molecular e por conceder os equipamentos necessários para minha pesquisa, encontrados no Laboratório de Biologia Molecular (LBM).

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desse projeto (processo de número 2021/00718-5).

RESUMO

O elevado consumo de açúcar no Brasil e no mundo vem apresentando consequências drásticas à saúde humana, trazendo inúmeras enfermidades. Na busca de alternativas para a diminuição do consumo de açúcar, têm surgido diversos estudos relacionados ao desenvolvimento de adoçantes calóricos e não calóricos, de origem natural ou artificial. Dentre os compostos naturais existe um grupo de proteínas que apresentam a propriedade de modificar o sabor dos alimentos. Dentro dessa classe de moléculas, encontra-se a proteína denominada miraculina, própria da planta *Richardella dulcifica*, natural da África, a qual detém a propriedade de modificar o sabor ácido dos alimentos em doce. Devido esse potencial, há relatos de diversos ensaios realizados na tentativa de produzir a miraculina através de expressão recombinante em outros organismos. Contudo, outros estudos descobriram a existência de proteínas semelhantes à miraculina em outras plantas. Em contrapartida, análises *in silico* permitiram encontrar em *Citrus paradisi* uma proteína com sequência gênica com alta similaridade àquela encontrada na miraculina original. Sendo assim, a caracterização dessa proteína e a exploração da sua capacidade potencial de modificação de sabor podem resultar em alternativas não calóricas para adoçar comidas ácidas, contribuindo, dessa forma, para uma melhora na saúde humana. Portanto, objetivou-se a expressão recombinante de uma miraculina oriunda de *Citrus paradisi*, denominada Citros_Mir, em levedura *Pichia pastoris* e em bactéria *Escherichia coli*. A clonagem foi realizada no vetor de propagação pGEM-T. Na expressão em *E. coli* utilizou-se o vetor de expressão pET-28a e a linhagem *Rosetta*, além de testar as temperaturas de 20, 30 e 37°C, e as concentrações finais de 0,2; 0,4 e 1,0 mM do indutor de expressão IPTG. A expressão em *P. pastoris* foi realizada com o vetor de expressão pPICZαC e as linhagens X-33 e KM71H. Nesse sistema, testou-se as concentrações finais 0,75; 1; 2 e 3% do indutor de expressão metanol, concluindo que o sistema de expressão da levedura é mais eficiente em meio de cultivo contendo 2% de metanol. Os resultados obtidos mostraram que as tentativas de expressão da Citros_Mir nesses sistemas não foram eficientes, sugerindo a necessidade de novos testes, modificando as condições e/ou os sistemas de expressão.

Palavras-chaves: miraculina; *Richardella dulcifica*; *Citrus paradisi*; miraculina de Citrus; adoçantes naturais; proteínas modificadoras de sabor.

ABSTRACT

The high consumption of sugar in Brazil and in the world result in drastic consequences for human health, causing numerous diseases. In the search for alternatives to reduce sugar consumption, several studies have emerged related to the development of caloric and non-caloric sweeteners, of natural or artificial origin. Among the natural compounds there is a group of proteins that have the property of modifying the flavor of food. Within this class of molecules, there is the protein called miraculin, from the plant *Richardella dulcifica*, native to Africa, which has the property of modifying the acidic taste of food into sweet. Due to this potential, there are reports of several tests carried out in an attempt to produce miraculin through recombinant expression in other organisms. However, other studies have discovered the existence of miraculin-like proteins in other plants, although there is still no description of miraculin-like proteins with such property. On the other hand, *in silico* analyzes allowed finding in *Citrus paradisi* a protein with a gene sequence with high similarity to that found in the original miraculin. Therefore, the characterization of this protein and the exploration of its potential ability to modify flavor may result in non-caloric alternatives to sweeten acidic foods, thus contributing to an improvement in human health. Therefore, the objective was the recombinant expression of a miraculin derived from *Citrus paradisi*, called Citros_Mir, in *Pichia pastoris* yeast and in *Escherichia coli* bacteria. Cloning was performed in the propagation vector pGEM-T. Expression in *E. coli* occur with pET-28a expression vector and the *Rosetta* strain, in addition to testing temperatures of 20, 30 and 37°C, and final concentrations of 0.2; 0.4 and 1.0 mM of the IPTG expression inducer. Expression in *P. pastoris* was performed with the pPICZ α C expression vector and the X-33 and KM71H strains. In this system, was test the final concentrations 0.75, 1, 2 and 3% of the methanol expression inducer, concluding that the yeast presents a better expression of proteins in a culture medium containing 2% of methanol. The results obtained showed that attempts to express Citros_Mir in these systems were not efficient, suggesting the need for new tests, modifying conditions and/or expression systems.

Keywords: miraculin; *Richardella dulcifica*; *Citrus paradisi*; Citrus miraculin; natural sweeteners; flavor-modifying proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fruto milagroso.....	14
Figura 2: Modelo molecular 3D da miraculina.....	15
Figura 3: Dispositivo de ultrafiltração Centriprep® 10K.....	32
Figura 4: Análise da integridade do RNA extraído das folhas de Citrus paradise.....	36
Figura 5: Eletroforese em gel da amplificação da ORF.....	38
Figura 6: Eletroforese em gel do fragmento que codifica a Citros_Mir.....	39
Figura 7: Eletroforese em gel do PCR de colônia da transformação do pPICZαC_Citros_Mir em DH5α.....	40
Figura 8: Resultado da indução da expressão da proteína Citros_Mir em pequena escala.....	41
Figura 9: SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul da expressão da Citros_Mir em pequena escala dos clones 9 e 16 em concentrações crescentes de metanol.....	43
Figura 10: Expressão da proteína Citros_Mir em maior escala em X-33.....	44
Figura 11: Ensaio de purificação da expressão da proteína Citros_Mir em maior escala pelo clone 9.....	45
Figura 12: Purificação da expressão da proteína Citros_Mir em maior escala pelo clone 16.....	46
Figura 13: Novos testes de expressão da proteína Citros_Mir em maior escala em X-33.....	48
Figura 14: Frações correspondentes as lavagens e frações coletadas na purificação da proteína Citros_Mir expressa em maior escala.....	49
Figura 15: Frações coletadas a partir da purificação da Citros_Mir em coluna Centriprep®.....	50
Figura 16: Imunodeteção da proteína Citros_Mir dos clones 9 e 16 em diferentes concentrações de metanol.....	51
Figura 17: Géis espelhos referentes à imunodeteção da proteína Citros_Mir.....	52
Figura 18: Membrana Western blot revelada por quimioluminescência.....	52
Figura 19: Análise da expressão da proteína Citros_Mir em pequena escala em 24 horas. SDS-PAGE 15% corado com Azul de Comassie.....	53
Figura 20: Eletroforese em gel da amplificação do inserto que codifica a proteína Citros_Mir em PCR.....	54
Figura 21: Eletroforese em gel da PCR de colônia realizado a partir da transformação da construção pGEM-T_Citros_Mir_2 em E. coli.....	54
Figura 22: Eletroforese em gel da PCR de colônia da transformação do pPET-28a_Citros_Mir em células competentes JM109.....	55

Figura 23: SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3).....	56
Figura 24: SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do segundo teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3) realizado a 37 °C.....	57
Figura 25: SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do terceiro teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3) realizado a 30°C com 0,2 mM, 0,4 mM e 1,0 mM de IPTG.....	58
Figura 26: SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do quarto teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3) realizado a 20°C com 0,2 mM, 0,4 mM e 1,0 mM de IPTG.....	58

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Sequência oligonucleotídeos da Citros_Mir	22
Tabela 2: Volumes de metanol adicionados a cada período do screening	27
Tabela 3: Concentração dos anticorpos primário e secundário testados no Western Blot .	29
Tabela 4: Sequência oligonucleotídeos da Citros_Mir.	32
Tabela 5: Condições testadas na indução da expressão em Escherichia coli	36
Tabela 6: Avaliação do RNA total extraído das folhas de Citrus paradise em relação à quantificação e pureza.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
Citros_Mir	Mirculina de Citrus
cm	Centímetros
D.O	Densidade óptica
h	hora(s)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodalton
<i>lacI</i>	Gene que codifica a proteína lacI, repressora do operon lac
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramas
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Ni	Níquel
nm	Nanômetro
NTA	Ácido nitrilotriacético
PBS	Tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
°C	Graus Celsius
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
rcf	Força Centrífuga Relativa
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
HCL	Ácido Clorídrico
V	Voltagem (Volts)
μ M	Micromolar

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Doenças e síndromes relacionadas ao açúcar e aos adoçantes.	12
1.2 Adoçantes e proteínas com sabor doce.....	13
1.3 Miraculina: história da fruta milagrosa e características moleculares.	13
1.3.1 Miraculinas recombinantes.....	16
1.4 <i>Citrus paradisi</i>	19
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	21
3.2 Clonagem e expressão em <i>Pichia pastoris</i>	22
3.2.1 Amplificação da ORF que codifica a Citros_Mir.....	22
3.2.2 Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação.....	23
3.2.3 Subclonagem do gene que codifica a Citros_Mir em vetor de expressão pPICZαC.....	24
3.2.4 Transformação do vetor de expressão pPICZαC_Citros_Mir em células de <i>Pichia pastoris</i>	25
3.2.5 Produção das células competentes e transformação	25
3.2.6 Seleção de cepas multicópias.....	26
3.2.7 Expressão recombinante de Citros_Mir em <i>Pichia pastoris</i> em pequena escala .	26
3.2.8 Imunodeteção da proteína Citros_Mir expressa em pequena escala	28
3.2.9 Expressão recombinante de Citros_Mir em <i>Pichia pastoris</i> em maior escala	29
3.2.10 Purificação da proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade	30
3.2.11 Diálise e concentração da proteína	31
3.3 Expressão recombinante em <i>Escherichia coli</i>	32
3.3.1 Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação.....	32
3.3.2 Subclonagem do gene que codifica a Citros_Mir em vetor de expressão pET-28a	34
3.3.3 Transformação e expressão do vetor de expressão pPET-28a_Citros_Mir em células de <i>E. coli</i>	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Apresentação e discussão dos resultados da expressão da Citros_Mir em <i>Pichia pastoris</i>	36
4.1.1 Análises de integridade e pureza e quantificação do RNA extraído das folhas de <i>Citrus Paradise</i>	36

4.1.2	Análise da amplificação da ORF que codifica Citros_Mir	37
4.1.3	Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação pGEM-T	38
4.1.4	Sequenciamento do vetor de expressão pGEM-T_Citros_Mir	39
4.1.5	Construção do vetor de expressão pPICZαC_Citros_Mir	39
4.1.6	Transformação do pPICZαC_Citros_Mir em células competentes de <i>P. pastoris</i>	40
4.1.7	Expressão recombinante em pequena escala de Citros_Mir em células X-33.....	41
4.1.8	Análise da expressão em larga escala e purificação da proteína Citros_Mir em X-33	43
4.1.9	Testes para melhorar o rendimento da expressão e purificação da Citros_Mir em células X-33	47
4.1.10	Western Blot da Citros_Mir	50
4.1.11	Expressão recombinante de Citros_Mir em células KM71H	53
4.2	Resultados da expressão em <i>Escherichia coli</i>	53
4.2.1	Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação pGEM-T	53
4.2.2	Construção do vetor de expressão pET-28a_Citros_Mir	55
4.2.3	Sequenciamento do vetor de expressão pET-28a_Citros_Mir	55
4.2.4	Transformação e Expressão do pET-28a_Citros_Mir em <i>E. coli</i>	56
4.5	Considerações finais e sugestões de melhorias para a expressão da Citros_Mir nos dois sistemas.....	59
6.	CONCLUSÃO	60
7.	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde, o consumo diário de açúcar no Brasil ultrapassa em 50% ao valor diário recomendado, que é equivalente a uma média de 80 g por dia, acarretando no aumento da obesidade relacionada à ingestão de açúcar e outras doenças, como o diabetes *mellitus* tipo II, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, entre outras (JOHNSON et al., 2007; DINICOLANTONIO and LUCAN, 2014). Como exemplo, tem-se a sacarose, um dos principais açúcares utilizados na atualidade, tratando-se de um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e outra de frutose, cujo consumo em excesso está intimamente ligada a tais patologias (POTUKUCHI et al., 2017; ACOSTA-COTA et al., 2018; YEH et al., 2020).

Devido esse agravamento, esse produto começou a ser substituído por adoçantes artificiais, ou edulcorantes (WEIHRAUCH; DIEHL, 2004; BELTRAMI, DÖRING, LINDNER, 2018) e, posteriormente, substituído pelos edulcorantes não calóricos, como as proteínas doces (KANT, 2005).

1.1 Doenças e síndromes relacionadas ao açúcar e aos adoçantes.

Com base nos estudos realizados por Breda, Jewell e Keller (2018), é possível visualizar uma correlação entre algumas doenças com o consumo excessivo de açúcar, como cáries, diabetes *mellitus* tipo II, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica, alguns tipos de câncer e desenvolvimento de demências, como o Alzheimer, além da síndrome metabólica (JOHNSON et al., 2007), doenças periodontais principalmente em adolescentes (MOREIRA et al., 2021) e agravamento de sintomas relacionados à doença de Parkinson (PALAVRA et al., 2021). Além do mais, doenças antes atribuídas unicamente ao sal, como hipertensão e doenças cardiometabólicas, parecem estar diretamente relacionadas, também, à ingestão de frutose (JOHNSON et al., 2007; DINICOLANTONIO; LUCAN, 2014). Não obstante, dentre os problemas relacionados à frutose, têm-se resistência à insulina, obesidade, diabetes tipo II, pré-eclâmpsia, doença renal crônica, acidente vascular cerebral, doença cardiovascular e mortalidade (JOHNSON et al., 2007).

Os substitutos para o açúcar, como os adoçantes artificiais, foram usados com o intuito de minimizar esses efeitos. Porém, tem sido demonstrado que o uso exacerbado desses adoçantes, isto é, mais de 1680 mg diários, tem relação com um risco relativo

aumentado no desenvolvimento do câncer de bexiga (WEIHRAUCH; DIEHL, 2004), resistência à insulina (FAGHERAZZI et al., 2013), doença hepática gordurosa não alcoólica, diabetes *mellitus* tipo II e lesão hepatocelular (KAKLEAS, CHRISTODOULI, KARAVANAKI, 2020). Ainda, a OMS divulgou uma nova diretriz sobre o uso de adoçantes, orientando que os edulcorantes não devem ser utilizados como substitutos do açúcar visando o controle do peso corporal ou a redução de doenças crônicas não transmissíveis, visto que não há evidências científicas que comprovem tais benefícios (BRASIL, 2023).

Com base nesses dados é evidente a necessidade do desenvolvimento de um substituto, eficiente na sua capacidade de adoçar os alimentos, no entanto, com propriedades que ofertam menos riscos à saúde humana.

1.2 Adoçantes e proteínas com sabor doce.

As substâncias adicionadas aos alimentos em substituição ao açúcar que proporcionam um sabor doce são chamadas de edulcorantes, ou adoçantes, e são divididos em calóricos ou nutritivos e não calóricos ou não nutritivos. Os calóricos ou nutritivos, são compostos por carboidratos e peptídeos bem como seus derivados, enquanto os não calóricos ou não nutritivos são substâncias artificiais ou naturais geralmente mais doces que o açúcar convencional (DUBOIS; PRAKASH, 2012). Com base em estudos de Dubois e Prakash em 2012, os primeiros adoçantes não calóricos identificados foram: sacarina, ciclamato, aspartame, acesulfame, sucralose, neotame, advantame e neohesperidina DC, os quais são compostos orgânicos sintéticos. Ainda destacaram oito adoçantes não calóricos naturais: esteviosídeo, rebaudiosídeo A, mogrosídeo V, eritritol, ácido glicirrízico, taumatina, brazina, e monatina, alguns nomeados de proteínas doces, como a Taumatina, a Brazina e a Monatina. Entretanto, existem ainda proteínas que induzem a doçura, mascarando o sabor ácido de comidas e bebidas, denominadas “proteínas modificadoras de sabor”, como as miraculinas (KANT, 2005).

1.3 Miraculina: história da fruta milagrosa e características moleculares.

A planta *Richardella dulcifica*, também conhecida como *Synsepalum dulcificum*, nativa do Oeste africano, é um arbusto tropical de folhagem densa que produz frutos vermelhos, popularmente conhecidos como “frutos milagrosos” (Figura 1). Esses

frutos, ao serem consumidos, são capazes de alterar a percepção de sabores ácidos de outros alimentos consumidos após, em doces (SWAMY et al, 2014). Essa propriedade foi, inicialmente, atribuída, ao que se achava ser na época, uma glicoproteína (INGLETT et al., 1965; KURIHARA, BEIDLER, 1968; CHACÓN, 2015). Isso se confirmou mais tarde no estudo de Kurihara e Beidler (1968), onde essa molécula foi designada, ainda, como da classe de “proteínas modificadoras de sabor”. Com base no nome vernáculo dado ao fruto - “fruto milagroso”, essa proteína foi então nomeada “miraculina” por Brouwer et al. (1968).



Figura 1 - Fruto milagroso. Fonte: Take Care Garden, 2023. Disponível em: <https://www.takecaregarden.com/2023/01/Fruta-do-milagre-Synsepalum-dulcificum-Fruto-milagroso.html>

A miraculina é, então, uma glicoproteína que consiste em 191 resíduos de aminoácidos e duas cadeias de açúcar. Com base na sequência de aminoácidos e no conteúdo de carboidratos (13,9%), calcula-se que a massa molecular do polipeptídeo de cadeia única é de 24,6 kDa (THEERASILP et al., 1989; KURIHARA, 1992). Inicialmente acreditava-se que sua massa molecular era de 44 kDa (KURIHARA; BEIDLER, 1968), mas posteriormente descobriram que esse valor se tratava de sua forma dimérica (KURIHARA, 1992). Baseado em um ensaio de modelagem molecular da miraculina, Paladino e colaboradores (2008) determinaram que dois monômeros dessa proteína formam um homodímero composto por duas cadeias contendo resíduos de asparagina (Asn) N-glicosilados, ligados através de uma ponte dissulfeto, apresentando ainda, resíduos de histidina (His) expostos, estes indicados como importantes para sua atividade (THEERASILP et al., 1989; PALADINO et al., 2008) (Figura 2). Ainda, confirmou-se que o monômero é inativo, enquanto as conformações dimérica e tetramérica (estrutura que pode ser linear ou globular) são ativas, em que a posição dos sítios de glicosilação não interfere na atividade da proteína como ocorre em outras proteínas doces (ITO, et al., 2007; PALADINO et al., 2008).

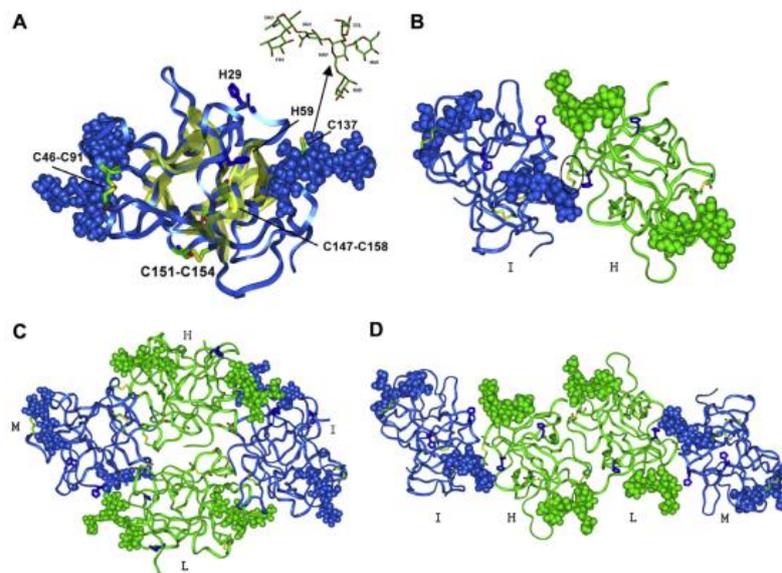


Figura 2 - Modelo molecular 3D da miraculina. A) monômero, B) dímero, com a ponte dissulfeto circulado, C) forma globular, D) forma linear. **Fonte:** Paladino et. al (2008).

A propriedade de modificação de sabor característico do fruto da *R. dulcifica* se deve exclusivamente a presença da proteína miraculina, que fica localizada no espaço intercelular após a maturação do fruto (HIRAI et al., 2010). O fruto *per se* não é doce (KURIHARA; BEIDLER, 1968), no entanto, ao ingerir um alimento ácido que diminui o pH da boca, a miraculina altera sua conformação, se tornando mais acessível, com maior exposição dos resíduos de histidina (KURIHARA, 1992; PALADINO et al., 2008; SANEMATSU et al., 2016), o que representa uma alta afinidade e permite a ligação aos receptores de membrana hT1R2 e hT1R3 das células gustativas presentes na língua, os quais são responsáveis pela percepção doce (KOIZUMI et al., 2011; BELTRAMI; DÖRING; LINDNER, 2018), ressaltando como essencial o domínio amino-terminal desses receptores (SANEMATSU et al., 2016). Em pH ácido é sugerido que a protonação em cascata dos resíduos das histidinas His30 da miraculina e do domínio hTAS1R2 do receptor hT1R2 é essencial para a interação com os receptores e ativação da proteína (ITO et al., 2007; KOIZUMI et al., 2011; SANEMATSU et al., 2016). Estudos mostraram que ácidos fracos são mais potentes que ácidos fortes no quesito de induzir a modificação de sabor, pois induzem a acidificação intracelular mais fortemente, a qual é requisitada para efetividade da proteína (SANEMATSU et al., 2016). Além disso, a proteína continua ligada aos mesmos receptores em pH neutro, agindo como antagonista, ou seja, inibindo a ativação dos receptores por outros adoçantes, podendo ser ativados novamente com a diminuição

do pH, assim, a sensação doce proporcionada pelos estímulos ácidos é mantida por aproximadamente 2 horas, desconsiderando as possíveis lavagens da língua (KURIHARA, 1992; KOIZUMI et al., 2011). Estudos comparativos entre miraculina, sacarose e sucralose (adoçante químico) envolvendo bebidas azedas e amargas, como limonadas e chá verde, mostraram que essa glicoproteína pode substituir os demais, proporcionando maior doçura e reduzindo a acidez rapidamente (ANDRADE et al, 2019). Choi e Garza (2020) testaram as propriedades de quatro tipos comerciais da fruta milagrosa em cinco alimentos, concluindo que o grau de doçura difere em cada tipo e depende dos alimentos. Todas essas propriedades caracterizam a miraculina como um potencial substituto para adoçar os alimentos.

1.3.1 Miraculinas recombinantes.

Normalmente proteínas sintetizadas em sua fonte natural se apresentam em baixas concentrações. Nesse sentido, a produção dessas proteínas de forma recombinante é uma alternativa para uma produção em larga escala. Devido suas propriedades, a miraculina se mostra um alvo de estudo bastante importante. No entanto, encontram-se diversos desafios quanto ao isolamento e expressão recombinante dessa proteína. Em um primeiro momento, Kurihara (1992) realizou a expressão da miraculina em *Escherichia coli*, porém não testou a atividade da proteína. Matsuyama e colaboradores (2009) também utilizaram esse sistema bacteriano na expressão da miraculina homodimérica sem glicosilação, concluindo que a proteína ainda retém sua capacidade modificadora de sabor, porém numa proporção inferior quando comparada à proteína natural da *Richardella dulcifica*, mas se mostrou insolúvel em água, dificultando sua produção para a comercialização. Por outro lado, a expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, mostrou que a atividade modificadora de sabor da proteína recombinante foi prejudicada pela glicosilação, pois a N-glicosilação do aminoácido asparagina, Asn42, que ocorre comumente nesse sistema, possivelmente causou um impedimento estérico entre os resíduos de aminoácidos e os receptores de sabor doce da língua (ITO et al., 2010). A atividade foi restaurada após desglicosilação. Entretanto, a cadeia de carboidratos adicionada por *S. cerevisiae* é maior do que aquela adicionada pela *P. pastoris* na glicosilação (GRINNA e STOCHOPP, 1989), outra vantagem desse sistema de expressão.

Outro estudo comparou a N-glicosilação e as estruturas N-glicano da proteína nativa com a proteína recombinante produzida em tomate, afirmando que, mesmo em diferentes estágios de maturação, essas características se mantêm semelhantes e inalteradas (KAJIURA et al., 2022).

A expressão da proteína alvo no fungo filamentosso *Aspergillus oryzae*, mostrou que a atividade modificadora de sabor da miraculina dependia tanto dos resíduos de histidina quanto da sua forma dimérica (ITO et al., 2007), mostrando que a conformação proteica nativa é intrinsecamente importante na manutenção da sua atividade.

Ademais, a expressão da miraculina recombinante em calos de cenoura pela transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi bem sucedida, porém sua atividade não foi avaliada (PARK et al., 2021). A expressão da proteína em plantas transgênicas mostrou empecilhos, apresentando em alguns casos silenciamento, perda de genes, ou competição com proteínas endógenas, comprometendo os resultados da expressão (SUN et al., 2006; SUN et al., 2007; SUGAYA et al., 2008; BACHCHU, 2011; KAJIURA et al., 2018; PARK et al., 2020).

A expressão na levedura *Pichia pastoris*, por sua vez, um importante sistema eucariótico, se mostra interessante visto que há a possibilidade de secreção da proteína heteróloga para o meio extracelular, contrapondo uma baixa secreção de proteínas endógenas, além de possuir mínima complexidade e apresentar um sistema capaz de realizar o processamento proteico requerido em proteínas oriundas de organismos complexos (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020).

Considerando como exemplo a proteína doce brazeína, descoberta a partir da planta *Pentadiplendra brazzeana* Baillon, a qual também interage com os receptores de sabor doce TIR2 e TIR3, há relatos sobre sua produção bem sucedida em sistemas eucariótico e procariótico (NEIERS et. al, 2016). Duas formas naturais e uma forma sintética dessa proteína foram expressas em *Pichia pastoris* de modo recombinante e apresentaram maior doçura, comparável com a proteína nativa da planta, em relação à sacarose (POIRIER et. al, 2012). Isso tudo corrobora para a utilização do sistema da *P. pastoris* no presente projeto.

Embora o sistema eucarioto seja o mais indicado para a produção da proteína em questão, há relatos da expressão tanto da miraculina recombinante de *Richardella dulcifica*, quanto de proteínas semelhantes à miraculina que foram expressas em microrganismos procariotos.

Matsuyama e colaboradores (2009) expressaram a proteína miraculina recombinante em *Escherichia coli*, a qual apresentou a propriedade de modificação de sabor sem ser glicosilada, visto que esse sistema não apresenta tal capacidade de modificação pós traducional. Entretanto, essa propriedade é menor do que a miraculina nativa e a miraculina recombinante glicosilada. Assim, concluíram que a glicosilação pode ser responsável pela conformação e estabilidade da proteína, ao passo que a miraculina não glicosilada se mostrou insolúvel em água. Além disso, afirmam que a dimerização é necessária para tal atividade. Isso embasa a capacidade de se expressar a proteína de interesse ativa nesse organismo.

Posteriormente, Ohkura et. al (2018) também teve sucesso na expressão da proteína semelhante à miraculina, vvMLP, presente na uva (*Vitis vinifera*), em *E. coli*. A proteína foi analisada quanto à propriedade modificadora de sabor, averiguando que a semelhança da sequência de aminoácidos com a miraculina nativa não é suficiente, exaltando a necessidade da dimerização e da presença dos resíduos de histidina já relatada (ITO et. al, 2007; THEERASILP et. al, 1989). Esse resultado corrobora para a possibilidade de se produzir a proteína de interesse, Citros_Mir, no sistema procarioto de *E. coli*, possibilitando análises futuras a respeito da atividade modificadora de sabor da mesma.

Com base nesses relatos, a possibilidade de produzir a proteína Citros_Mir em sistema bacteriano poderia ser uma alternativa interessante, possibilitando uma comparação da produção da proteína nos dois sistemas de expressão.

Em relação à inserção da miraculina como produto comercial, Tafazoli e colaboradores (2019 e 2020) destacam a história conturbada da introdução de produtos derivados da fruta milagrosa no mercado americano, inicialmente devido à negação da petição enviada ao Food and Drug Administration (FDA) pela Corporação Miralin em 1974, indicando que não havia informações suficientemente seguras para liberação da produção do aditivo alimentar, exigindo a interrupção do transporte do produto no país. Em 2009 o FDA novamente negou uma notificação da empresa My M Fruit, contrariando que o produto foi considerado erroneamente um suplemento dietético. Desse modo, esse estudo realizou análise proteômica, análise de bioinformática e um estudo sensorial, e provou que a miraculina é digerida normalmente pela pepsina, não apresenta potencial alergênico e/ou tóxico aos humanos e que a propriedade modificadora de sabor é breve e não tem impacto no receptor. Esses resultados resolvem as deficiências destacadas pelo FDA e sugerem que não há qualquer preocupação de segurança com o uso dessa proteína.

Por outro lado, o consumo humano do fruto milagroso ressecado, contendo a glicoproteína miraculina em uma composição menor do que 2,5%, como alimento ou como suplemento alimentar (com ingestão máxima de 0,7 g por dia) foi aprovado na Europa pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA – do inglês The European Food Safety Authority). As análises que confirmaram a segurança alimentar foram: 1) identificação de possíveis moléculas alergênicas; 2) categorização do mecanismo celular, ou de ação; e 3) determinação da concentração de antinutrientes, como as proteínas lectinas, através de ensaios de hemaglutinação. A aprovação se aplica aos indivíduos adultos, com exceção das mulheres gestantes ou lactantes (TURCK et al., 2021).

1.4 *Citrus paradisi*.

A *Citrus paradisi* é uma planta pertencente à família Rutaceae (gênero: *Citrus* spp.), sendo resultante do cruzamento genético entre as espécies *Citrus maxima* e *Citrus sinensis*, originária do continente asiático. A toranja, ou *grapefruit*, é um dos tipos de *Citrus* mais recentes, apresentando variações de acordo com a pigmentação, podendo ser branca ou avermelhada. (CLARKE, 2008). A espécie *C. paradisi* detém potenciais nutricionais interessantes para sua introdução em dietas, que tanto visam o emagrecimento quanto a saúde. Apresentando, por exemplo, uma relação com a obesidade e contribuição positiva aos que sofrem com a síndrome metabólica (FUJIOKA et al., 2006), além de propriedades antidiabéticas (FAZILAH; ARIFF; KHAYAT; HALIM, 2020). A maioria dos estudos envolvendo suas propriedades abordam seus extratos e óleos vegetais, bem como sua atividade antibacteriana (NEGI, JAYAPRAKASHA, 2001; DENG et al., 2020), antifúngica (ORTUÑO et al., 2006; VIUDA-MARTOS et al., 2008; DENG et al., 2020), e ainda, sua atividade antioxidante e de combate ao câncer (DENG et al., 2020). Além disso, outros estudos focam na naringina, um dos flavonoides mais abundantes na toranja (JOURDAN; MCINTOSH; MANSELL, 1985; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2016), que se encontra em grandes concentrações no suco da fruta e está associada ao tratamento de várias doenças, como por exemplo, a síndrome metabólica. Após a ingestão, a naringina é convertida em açúcar e naringenina, ou seja, sua forma aglicona, composto orgânico ligado a um glicosídeo, a qual está relacionada ao controle da hiperglicemia e, assim, vem sendo estudada para o combate à diabetes, além do controle da hipertensão, entre outras síndromes (RAZAVI;

HOSSEINZADEH, 2019). Tem sido demonstrada a possibilidade de substituir o açúcar pela naringina, visto que esta se mostra, comparativamente, mil vezes mais doce que a sacarose comumente utilizada (PRIYA; GUPTA; SRIKANTH, 2011). Embora a naringina apresente essa capacidade, estudos mostram que após a ativação de 0,1 μ M da miraculina original com 0,1M de ácido cítrico, estima-se que a doçura foi 400 mil vezes maior quando comparada a doçura fornecida pela sacarose, caracterizada como a substância natural com maior potencial de doçura (GIBBS; ALLI; MULLIGAN, 1996; SWIADER et al, 2019). A propriedade intrínseca presente na miraculina, capaz de alterar a percepção de sabor em elevadas proporções a caracteriza com um grande atrativo na substituição do açúcar convencionalmente utilizado.

Em análises preliminares, realizadas por nosso grupo de estudo, identificou-se em *C. paradisi* uma sequência que corresponde a uma miraculina com grande similaridade à proteína encontrada em *R. dulcifica*, correspondente à 99,47% de acordo com a análise utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponível no site oficial National Library of Medicine (NIH). Assim, a caracterização da miraculina de *Citrus* se faz importante, na qual se espera a obtenção da proteína ativa, com sua propriedade de modificação de sabor em proporções semelhantes à encontrada na miraculina original.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto foi expressar a proteína recombinante miraculina de *Citrus paradisi* em sistema de expressão de *Pichia pastoris* e de *Escherichia coli*.

2.1 Objetivos específicos

1. Clonar o cDNA que codifica a proteína Citros_Mir no vetor de propagação pGEM-T e, posteriormente, subclonagem no vetor de expressão pPICZ α C;
2. Expressar e purificar a proteína recombinante em *Pichia pastoris*;
3. Clonar o fragmento que codifica a proteína Citros_Mir no vetor de propagação pGEMT e, posteriormente, subclonar no vetor de expressão pET-28a;
4. Expressar e purificar a proteína recombinante em *Escherichia coli*;
5. Comparar os dois sistemas de expressão em relação à expressão da Citros_Mir

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

As folhas de *Citrus paradise* foram coletadas, imediatamente imergidas em nitrogênio líquido e transportadas até o laboratório sendo estocadas no freezer -80°C. Essas folhas foram usadas na extração do RNA, utilizando TRIzol™ (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Durante a extração, as bancadas foram higienizadas com álcool 70%, utilizou-se pipetas, ponteiras com filtro, tubos específicos livres de RNase, luvas sem talco, além de pinças, espátulas, gral e pistilos previamente autoclavados durante 30 minutos e mantidos por 8 horas em estufa a 100°C. As folhas estocadas (300 mg) foram maceradas com nitrogênio líquido até formarem um pó fino. Este pó foi coletado em tubo de 1,5 mL, seguido pela adição de 1 mL de TRIzol™. Após homogeneização e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e novamente incubou-se por 3 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 15 minutos, a 4°C, numa rotação de 12.000 rcf. A partir disso, o conteúdo foi separado em uma camada inferior avermelhada contendo fenol-clorofórmio, uma interfase e uma camada superior incolor aquosa, na qual se encontra o RNA. Foi adicionado 500 µL de isopropanol ao tubo, o qual foi invertido algumas vezes e, posteriormente, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 10 min, a 4°C, numa rotação de 12.000 rcf. Em seguida, realizou-se duas lavagens com 1 mL de etanol 75%. O RNA resultante foi ressuspensionado em água tratada com DEPC (Dicarbonato de Dietila) (GREEN e SAMBROOK, 2012). O RNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. A quantificação e a avaliação da pureza foram avaliadas usando o Espectrofotômetro Nanodrop. A pureza é dada por razões, a razão 260/280 nm indica contaminação por proteínas, com valores entre 1.7 e 2.0 considerados puros (GREEN e SAMBROOK, 2012). Desse modo, os contaminantes como, por exemplo, proteína e fenol, absorvem comprimento de onda igual ou próximo a 280 nm, resultando numa razão menor. A razão 260/230 nm, por sua vez, indicam contaminação por outros compostos, como EDTA, fenol, glicogênio, carboidrato ou guanidina, capazes de absorver comprimentos de onda de 230 nm. Assim, nessa razão considera-se puro os valores próximos a 2.0 (GREEN e SAMBROOK, 2012). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific), seguindo instruções do fabricante. Para a reação, usou-se 2 µg

de RNA, 10x RT *Buffer*, 25x dNTP Mix (100mM), 10x RT *Random Primers*, 1 U/ μ L de Multiscribe™ Reverse Transcriptase, 100 pmol de Oligo DTV, para um volume final de 20 μ L, em um ciclo de 65°C por 5 min; 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; 85°C por 5 min; 4°C.

Após a extração os experimentos seguiram duas linhas: uma para clonagem e expressão em *Pichia pastoris* e outra em *Escherichia coli*.

3.2 Clonagem e expressão em *Pichia pastoris*

3.2.1 Amplificação da ORF que codifica a Citros_Mir

A ORF (do inglês – *Open Reading Frame*) codante da Citros_Mir foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do cDNA obtido das folhas de *Citrus paradise*. Os *primers* Primer_pPIC_Mir_Fw e Primer_pPIC_Mir_Rv (Tabela 1) contendo os sítios de restrição *Eco* RI e *Xba* I, respectivamente, foram utilizados na reação, a qual contou com: 8 μ L de cDNA, *primer forward* (5 μ M), *primer reverse* (5 μ M), *Buffer* (1x), dNTP (0,2 mM), MgCl₂ (1,25 mM), enzima Taq DNA Polimerase (1U) e água autoclavada, em um volume final de 20 μ L. O ciclo utilizado foi: 98°C por 1 min, 98°C por 20 seg, 47°C por 20 seg, 72°C por 20 seg, 72°C por 10 min, 4°C. O produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Tabela 1 - Sequência oligonucleotídeos da Citros_Mir.

Identificação	Sequência de oligonucleotídeos
Primer_pPIC_Mir_Fw	5' GAATTCGAAGACTTCATTAGT ACAACACTCTCCTTCCTT 3'
Primer_pPIC_Mir_Rv	5'TGCTCTAGATACAGAGACGGAA ATAACATAGATCTTCCACTAT 3'

3.2.2 Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação

O produto obtido a partir da amplificação por PCR, purificado utilizando o kit Wizard PCR Clean Up (Promega), foi usado na clonagem com o vetor de propagação pGEMT (Novagen) através da reação de ligação contendo o inserto Citros_Mir (120 ng/ μ L), pGEM-T (30 ng/ μ L), Tampão (1x), enzima T4 ligase e água *nuclease free* em um volume final de 10 μ L. A reação foi incubada *overnight* (~16 horas) à 4°C e posteriormente utilizada na transformação de células quimiocompetentes de DH5 α de *Escherichia coli*, usando protocolo adaptado de Green e Sambrook (2001). A seleção das colônias recombinantes ocorreu em meio LB em placa de Petri contendo o antibiótico ampicilina em uma concentração final de 100 μ g/mL e, além disso, por coloração das colônias brancas e azuis. Esse mecanismo ocorre pela aplicação de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), um glicosídeo artificial análogo à lactose, numa concentração de 20 mg/mL e IPTG numa concentração de 0,4 mM (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), um indutor do *operon* LacZ presente em *E. coli.*, o qual expressa a enzima β -galactosidase. Entretanto, as cepas utilizadas geralmente apresentam uma deleção nesse gene, ao passo que os vetores utilizados apresentam a sequência que codifica a enzima em questão. Desse modo, a bactéria que carrega esse vetor consegue produzir β -galactosidase, hidrolisando o X-Gal, formando o 5-bromo-4-chloro-indoxy, o qual forma o dímero 5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo, composto insolúvel de pigmento azul. Esse vetor apresenta uma região chamada sítio de clonagem múltipla (MCS - do inglês, *Multiple Cloning Site*) contida na sequência LacZ, onde se encontra sítios de restrição de algumas enzimas, possibilitando a inserção do inserto e, conseqüentemente, interrompendo a sequência do gene e, assim, não produzindo β -galactosidase. Portanto, as colônias que carregarem o plasmídeo que contém a sequência de interesse não conseguem hidrolisar o X-Gal, apresentando coloração branca (PADMANABHAN, BANERJEE, MANDI, 2011). As placas de Petri foram incubadas por 16 horas à 37°C para o crescimento das colônias e posterior discriminação visual. Das colônias brancas, foram selecionadas 10 para uma PCR de colônia visando confirmar o clone positivo. O molde utilizado para a PCR de colônias foi preparado retirando uma pequena porção de cada colônia com o auxílio de um palito estéril e mergulhando em um tubo de 1,5 mL contendo 20 μ L de água autoclavada. Os tubos foram fervidos durante 10 minutos e centrifugados por 30 segundos. Na reação utilizou-se Pol Master Mix (Cellco) contendo todos os reagentes necessários, além dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* e 5 μ L do

DNA molde, em um volume final de 25 μL , sujeito ao seguinte ciclo: 95°C por 1 min; 95°C por 1 min; 47°C por 1.5 min; 72°C por 1 min; 72°C por 10 min e 4°C, com 35 repetições.

Após amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. As que apresentaram amplificação positiva foram utilizadas na extração do DNA plasmidial pGEM-T_Citros_Mir, seguindo o protocolo Fast-nEasy Plasmid Mini Prep Kit (Cellco). O plasmídeo foi sequenciado pelo método de Sanger 1970 para a confirmação de integridade e correta direção do inserto antes de seguir para o vetor de expressão. O sequenciamento foi realizado no LAB Multi (UNESP- Araraquara).

3.2.3 Subclonagem do gene que codifica a Citros_Mir em vetor de expressão pPICZ α C

Após verificação da sequência, o DNA plasmidial foi submetido a uma reação de digestão contendo 2 μL o plasmídeo pGEM-T_Citros_Mir (100ng/ μL), 1 μL da enzima de restrição *Xba* I (10U) e 1 μL da enzima de restrição *Eco* RI (10U), 5 μL do tampão Tango (2x) e 1 μL água *nuclease free*, completando para o volume final de 10 μL . A reação foi mantida à 37°C durante 3h. O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O fragmento correspondente à Citros_Mir foi subclonado no vetor de expressão para levedura, o pPICZ α C (Invitrogen), o qual foi previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição (*Xba* I e *Eco* RI). A reação de ligação continha a enzima T4 DNA ligase (3U) (Invitrogen), vetor pPICZ α C (120 ng/ μL), inserto de DNA (40 ng/ μL), *Buffer* (1x) e água *nuclease free*, em um volume final de 10 μL , deixada *overnight* (16h) à 4°C. A reação de ligação foi usada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*, DH5- α , seguindo o protocolo de Grenn e Sambrook (2001). A seleção das colônias se deve em placas de Petri contendo meio LB “Low Salt” (Acumedia®) com adição de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do antibiótico Zeocina™ (Invitrogen). Algumas colônias foram selecionadas para a reação de amplificação por PCR de colônia de maneira similar ao descrito anteriormente, visando confirmação dos recombinantes. O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e um dos clones positivos foi utilizado para extração do DNA plasmidial seguindo protocolo do kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Cellco) e se obtendo a construção pPICZ α C_Citros_Mir.

3.2.4 Transformação do vetor de expressão pPICZ α C_Citros_Mir em células de *Pichia pastoris*

O plasmídeo pPICZ α C_Citros_Mir foi linearizado para a transformação em células de *P. pastoris*. A reação de linearização foi preparada em um tubo de 1,5 mL e contou com 1 μ L da enzima *Pme* I (5U/ μ L) (ThermoFisher), 5 μ L de *Buffer* B 1x, 40 μ L do pPICZ α C_Citros_Mir (50 ng/ μ L) e 4 μ L de água autoclavada, em um volume final de 50 μ L. A reação foi mantida à 37°C *overnight* e, após confirmação da linearização por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, a reação foi parada expondo a amostra à 65°C por 20 min. Posteriormente o material genético linearizado foi precipitado a fim de se obter uma maior concentração do plasmídeo para aumentar a garantia do sucesso da transformação. A precipitação se deu pela adição inicial de 5 μ L de acetato de sódio 3M, pH5,2 (1/10 do volume final da linearização) e 137,5 μ L de etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume final após adição do acetato); o tubo foi invertido algumas vezes e mantido por 40 min no *freezer* -80°C. Depois desse período, o tubo foi centrifugado por 20 min a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi lavado uma vez com etanol 70%, seguido pela centrifugação por 3 min a 13000 rpm e descarte do sobrenadante, e outra vez com etanol 100% seguido do mesmo processo. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente para evaporar o etanol residual e depois ressuspendido em 10 μ L de água *nuclease free*.

3.2.5 Produção das células competentes e transformação

A transformação foi realizada usando células competentes de duas cepas de *P. pastoris* (X-33 e KM71H), que foram preparadas seguindo protocolo de Cregg et al (2007). As células competentes de *Pichia pastoris* foram preparadas no mesmo dia da transformação e as vidrarias usadas foram lavadas com água fervida, enquanto os tubos usados eram novos. Um pré-inóculo de 5 mL de meio YEPD líquido foi preparado a partir de uma placa nova e inoculado por 8 h a 30°C, 250 rpm. Deste, foram aliqotados 30 μ L transferidos para um inóculo em um erlenmeyer com 50 mL de meio YEPD líquido, mantido *overnight* a 30°C, 250 rpm, até atingir DO igual 1,2 – 1,5 a 600 nm. O inóculo foi transferido para um tubo, deixado 10 min no gelo e centrifugado por 10 min a 4°C, 1500 rcf. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 10 mL de YEPD e 2 mL de HEPES 1M, pH 7,0. Foi adicionado 250 μ L de DTT 1M, para afrouxar a parede

celular e facilitar a entrada do DNA, incubando por 15 min a 30°C, sem agitação. Foi adicionada água gelada até o volume de 50 mL e centrifugado por 10 min a 4°C, 1500 rcf. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 25 mL de água gelada, centrifugando nas mesmas condições. O *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de sorbitol 1M gelado e centrifugado. O *pellet* foi novamente ressuscitado em 100 µL de sorbitol 1M gelado e alíquotas foram preparadas com 40 µL do produto. Para a transformação foram usadas cubetas de 0,2 cm (BioRad). 10 µL do plasmídeo linearizado pPICZαC_Citros_Mir foram adicionados à 40 µL de células competentes, de modo que não formasse bolhas, e a mistura foi incubada no gelo por 5 min. O plasmídeo pPICZαC vazio, também linearizado, passou pelo mesmo processo a fim de servir como controle.

A transformação foi realizada por eletroporação da cubeta contendo a mistura no equipamento Gene Pulser (BioRad) a 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Após isso, foi adicionado 1 mL de Sorbitol 1M e a solução foi transferida para um novo tubo, sendo incubada durante 2 h, sem agitação, a 30°C. Passado esse tempo, as células foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPDS (1% Yeast Extract, 2% Peptona, 2% Dextrose, 2% Ágar, Sorbitol 1M) com histidina a 0,0004% e o antibiótico Zeocina em concentrações crescentes.

3.2.6 Seleção de cepas multicópias

A seleção das células na placa de Petri contendo meio YPDS e Zeocina contou com concentrações crescentes desse antibiótico (100, 250 e 500 µg/mL), de acordo com o método *posttransformational vector amplification* (PTVA) descrito por Sunga e equipe (2008). Esse método seleciona cepas multicópias, ou seja, populações de transformantes que contêm grande número de cópias do vetor de expressão e, conseqüentemente, são mais resistentes às altas concentrações de antibiótico e podem apresentar grandes níveis de expressão da proteína de interesse.

3.2.7 Expressão recombinante de Citros_Mir em *Pichia pastoris* em pequena escala

As placas foram mantidas na estufa durante três dias a 30°C até o aparecimento das colônias. As colônias foram selecionadas da placa com maior concentração de Zeocina (500 µg/mL) e usadas na expressão em pequena escala, objetivando avaliar a produção da proteína recombinante. Para isso, contou com uma

placa de cultura de 24 poços (Whatman) contendo 3 mL de meio BMGY (56 mL de base composta de extrato de levedura 1% e peptona 2%; 8 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 1,0 M; 8 mL de YNB 13,4%; 8 mL de glicerol 10%; 160 µL de biotina 0,02%). Nessa placa foram inoculadas algumas colônias, ou possíveis clones, além da célula competente transformada com o plasmídeo pPICZαC vazio como controle. Em alguns casos a célula estoque (X-33 ou KM71H) também foi utilizada como controle. Em cada poço foi adicionado o meio contendo 100 µg/mL Zeocina™ (100 µg/mL), exceto no poço contendo a célula estoque, onde se adicionou meio sem antibiótico. Cada colônia foi picada e a quantidade coletada foi transferida para o respectivo poço com o auxílio de palitos estéreis e pinça estéril. A placa foi mantida a 29°C por 48 h em uma agitação de 300 rpm. Após este período, alíquotas de 200 µL foram retiradas de cada poço, contabilizando amostras sem indução (0 horas). A placa foi centrifugada a 1500 rcf por 10 min e o sobrenadante foi descartado, adicionando em seu lugar 2 mL de meio BMMY (35 mL de base composta de extrato de levedura 1 % e peptona 2%; 5 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 1,0 M; 5 mL de YNB 13,4%; 250 µL de metanol absoluto filtrado; 100 µL de biotina 0,02%). Em um primeiro momento, houve adição de metanol absoluto filtrado a cada 24 h para obter uma concentração final de 0,75%. Posteriormente, em alguns dos *screening* realizados com a cepa X-33, a concentração final de metanol foi modificada, testando as concentrações 1%, 2% e 3% em relação à expressão da proteína de interesse, concluindo que a concentração de 2% é a melhor para expressão. As expressões realizadas com a cepa KM71H seguiram com a concentração final de metanol de 2% (ANGGIANI, HELIANTI, ABINAWANTO, 2018; KHATRI, HOFFMANN, 2006) (Tabela 2).

Tabela 2 – Volumes de metanol adicionados a cada período do *screening*.

Período (horas)		00h	24h	48h	72h	96h	120h
Volume de meio (µL)		2000	1800	1600	1400	1200	1000
Concentração final de metanol (%)	0,75	15 µL	13,5 µL	12 µL	10,5 µL	9 µL	7,5 µL
	1	20 µL	18 µL	16 µL	14 µL	12 µL	10 µL
	2	40 µL	36 µL	32 µL	28 µL	24 µL	20 µL
	3	60 µL	54 µL	48 µL	40 µL	36 µL	30 µL

A cada 24 h concluídas foram retiradas alíquotas de 200 μ L e adicionado o metanol necessário até atingir 144 h. As alíquotas foram usadas no preparo das amostras para análise da expressão, em cada um dos intervalos, em gel SDS-PAGE 15% (GREEN e SAMBROOK, 2001). Ao final do *screening*, o clone com maior expressão foi selecionado para confirmação por Western Blotting, seguindo para a expressão em larga escala nas mesmas condições descritas.

3.2.8 Imunodeteção da proteína Citros_Mir expressa em pequena escala

Os clones selecionados no screening que seguiram para a imunodeteção foram da cepa X-33. As amostras da proteína foram separadas em SDS-PAGE 15%. Preparou-se o tampão de transferência (2,5 g de Tris base, 4,13 g de glicina e 165 mL de metanol absoluto, num volume final de 975 mL). O metanol foi adicionado separadamente em um recipiente e a membrana de PVDF (8,0 cm por 5,4 cm) foi incubada na solução por 5 min. Foi realizada a montagem do aparato de transferência na seguinte ordem: esponja, papel filtro, gel de poliácridamida, papel e filtro e esponja. A transferência das proteínas contidas no gel para a membrana, foi realizada em cuba de eletroforese de duas maneiras: 1) a 150 V durante 2 horas; e 2) a 40 V durante 16 horas (*overnight*).

Posteriormente, para uma visualização prévia, a membrana foi corada com o corante avermelhado, Ponceau (Qhemis). A membrana foi lavada com água destilada para parar a reação e incubada *overnight*, a 4°C, com a solução de bloqueio (2,5 g de leite em pó desnatado e 50 mL de TBS 1x). Após essa etapa, a solução foi descartada e a membrana foi lavada três vezes com TBS 1x sob agitação leve. O anticorpo primário, nesse caso o anti-His (Invitrogen), foi preparado nas proporções: 1:250, 1:500 e 1:10.000 com TBS 1x, e adicionado à membrana. A reação foi mantida em agitação leve por 2 horas para o anticorpo reagir com a proteína de interesse. Após esse período a membrana foi lavada três vezes com TBS 1x novamente. A aplicação do anticorpo secundário diferiu em relação ao método de revelação utilizado.

No primeiro teste, o anticorpo secundário, anti-Mouse (Promega), conjugado com a enzima fosfatase alcalina, foi preparado na proporção 1:5000 com TBS 1x e adicionado à membrana, o qual reage com o anticorpo primário já ligado à proteína de interesse. A reação foi mantida por 2 h em agitação baixa e, após isso, a membrana foi

lavada como anteriormente. Depois, a membrana foi recoberta com a solução reveladora (NBT-Bcip), a qual reage com a enzima formando um produto visível. O recipiente foi tampado com papel alumínio e agitado suavemente durante aproximadamente 5 a 15 min, até as bandas de proteínas aparecerem. A reação foi parada com água destilada e a membrana foi mantida entre folhas de papel para devida secagem.

No segundo teste, o anticorpo secundário, anti-Rabbit (Merck), conjugado com a enzima peroxidase, foi preparado nas proporções: 1:2500 e 1:10.000 com TBS 1x e adicionado à membrana, o qual reage com o anticorpo primário já ligado à proteína de interesse. A relação das proporções dos anticorpos primário e secundário testadas pode ser observada na Tabela 3. A reação foi mantida por 2 h em agitação baixa e, após isso, a membrana foi lavada como anteriormente. Depois, a membrana incubada foi recoberta com uma solução composta por luminol e solução de peroxidase (na proporção de 1:1) para o método de revelação por quimioluminescência usando o kit Amersham (Cytiva). O recipiente foi tampado com papel alumínio por 5 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, a visualização foi feita pelo equipamento Chemidoc, possibilitada pela reação da solução reveladora com a enzima.

Tabela 3 - Concentração dos anticorpos primário e secundário testados no Western Blot

Testes	I		II		III	
	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Anticorpos						
Proporções	1:250	1:2.500	1:500	1:10.000	1:10.000	1:10.000

3.2.9 Expressão recombinante de Citros_Mir em *Pichia pastoris* em maior escala

Uma colônia recombinante que apresentou resultado positivo na expressão em pequena escala (usando a cepa X-33) foi usada na expressão em maior escala. Foram preparados pré- inóculos com o meio BMGY (7mL de base contendo 1% de extrato de levedura e 2% de peptona; 1mL de gliceral 10% estéril; 1mL de tampão fosfato 1M, pH 6,0; 1mL de YNB 13,4%; 20 µL de biotina 0,02%; e 10 µL de Zeocina 100 mg/µL), incubados a 30°C durante 24 horas sob agitação de 250 rpm no Incubador Shaker Series (New Brunswick Scientific). Depois desse período, 10 mL do pré-inóculo foram adicionados em um erlenmeyer contendo o meio BMGY (350 mL de base composta por 1% de extrato de levedura e 2% de peptona; 50 mL de glicerol 10% estéril; 50 mL de tampão fosfato 1M, pH 6,0; 50 mL de YNB 13,4%; e 1 mL de biotina 0,02%), incubando-

se por mais 20 horas a 30°C sob 250 rpm de agitação. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 1500 rcf durante 5 minutos a temperatura ambiente. Foi retirada uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, o que será considerada a amostra não induzida (0 h), e o restante foi descartado. O *pellet* formado foi ressuspenso delicadamente em meio BMMY (79 mL de base composta por 1% de extrato de levedura e 2% de peptona; 3,4 mL de metanol absoluto filtrado (considerando concentração final de 2%); 10 mL de tampão fosfato 1M, pH 6,0; 10 mL de YNB 13,4%; e 200 µL de biotina 0,02%) e a cultura foi transferida para outro erlenmeyer, incubado a 30°C, sob agitação de 250 rpm no Incubador Shaker Series, até completar 144 horas de indução. A cada 24 horas foi adicionado metanol absoluto a fim de manter a concentração final de 2% durante toda indução, o que está esquematizado na Tabela 2. A cada intervalo foram retiradas alíquotas de 1 mL para análise da expressão em gel SDS-PAGE 15%. Terminada a indução, a cultura foi centrifugada a 4000 rcf durante 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado e o produto foi purificado por cromatografia de afinidade na coluna contendo resina de níquel.

No intuito de aumentar a obtenção da proteína de interesse, em um dos testes o processo descrito acima foi repetido quatro vezes, ou seja, foram induzidos 400 mL de cultura, seguindo para purificação.

3.2.10 Purificação da proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade

Nessa etapa o sobrenadante filtrado foi submetido a uma cromatografia de afinidade usando a coluna contendo íons níquel ligados a uma resina – Ni-NTA (Qiagen). A coluna foi equilibrada com tampão (NaH₂PO₄ 50 mM, Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM ou 500 mM, imidazol 1 M) com volume duas vezes maior do que o tamanho da resina (nesse caso 3 mL, então se adicionou 6 mL de tampão). Posteriormente, o sobrenadante filtrado foi colocado na coluna e coletado em outro tubo, o que é nomeado como eluato. A partir disso, frações com concentrações crescentes de imidazol foram sendo adicionadas à coluna para eluição da proteína e, após passagem, coletadas em outros tubos. Foram preparadas duas frações de cada uma das seguintes concentrações de imidazol: 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM e três frações de 1 M. Desse modo, o imidazol compete com a proteína pela interação com os

íons de níquel, até que a proteína vai sendo liberada conforme a molaridade das frações aumenta.

Nessa fase, um dos testes realizados foi colocar na coluna todo o produto da expressão da proteína pelo clone 9 (400 mL) a fim de melhorar a captação da proteína pela resina de níquel.

Ao final do processo, as frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 15% a fim de determinar em quais concentrações de imidazol a proteína de interesse foi liberada de forma mais pura, ou seja, sem contaminação com outras proteínas da *P. pastoris*.

3.2.11 Diálise e concentração da proteína

Essa etapa foi realizada somente com a Citros_Mir purificada a partir do teste de expressão de 400 mL do clone 9. As frações coletadas com a proteína mais pura e o eluato contendo a proteína que não se ligou à membrana foram dialisados em tampão PBS pH 7,4 em membrana 3500 MW (Pierce) para a retirada do imidazol e foram usados no protocolo de concentração da proteína.

Para isso, utilizou-se a coluna Centriprep® 10K (Merck), um dispositivo de ultrafiltração que pode ser usado para concentrar, purificar, dessalinizar e filtrar amostras (Figura 3a). Esta coluna é composta por um recipiente de amostra com tampa, um coletor do filtrado com uma membrana de celulose regenerada (Ultracel®) de baixa adsorção e uma tampa que veda o ar, isolando a amostra (Figura 3b).

A amostra da proteína foi colocada no recipiente coletor até completar 15 mL e as partes do dispositivo foram encaixadas. A coluna foi submetida a uma centrifugação de 3000 rcf por 40 minutos e, assim, a pressão forçou os materiais de baixo peso molecular e os solventes a atravessar a membrana, entrando no coletor de filtrado, as amostras com peso molecular acima de 10 kDa permaneceram no recipiente, tornando-as mais concentradas em um volume remanescente de 3,2 mL. Essas etapas foram repetidas uma segunda vez usando o volume já concentrado de 3,2 mL, centrifugando 3.000 rcf por 10 min e obtendo um volume final concentrado de 1,2 mL.

Obtendo a amostra concentrada da Citros_Mir, esta foi usada nos testes de imunodeteccção pelo Western Blot, cujo protocolo foi descrito anteriormente.

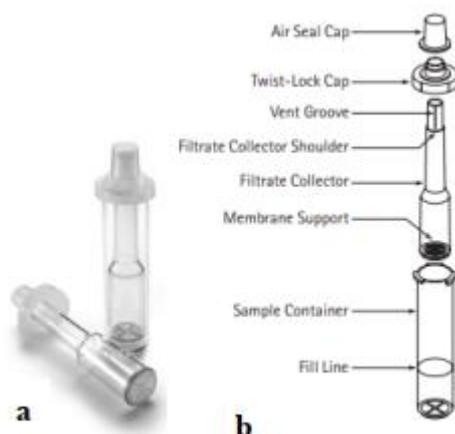


Figura 3. Dispositivo de ultrafiltração Centriprep® 10K. (a) foto ilustrativa da coluna usada para concentrar a Citros_Mir; (b) partes que compõem a coluna, contendo as indicações, de baixo para cima: linha de preenchimento, recipiente coletor, suporte da membrana, coletor de filtrado, suporte do coletor de filtrado, abertura de ar, tampa de trava de torção e tampa de vedação de ar. **Fonte:** User Guide Centriprep® Centrifugal Filter Devices, Merck KGaA.

3.3 Expressão recombinante em *Escherichia coli*

3.3.1 Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação

A construção pGEM-T_Citros_Mir sequenciada no projeto anterior e usada para expressão recombinante em *Pichia pastoris* foi utilizada como molde na amplificação do inserto, sequência que codifica a proteína Citros_Mir, com os *primers* Mirac_PET_Fw e Mirac_PET_Rv, construídos para expressão em *Escherichia coli* (Tabela 4). A reação de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) contou com 1 μ L de pGEM-T_Citros_Mir (60 ng/ μ L), 25 μ L de Taq Master Mix (Cellco), 2,5 μ L do *primer* Mirac_PET_Fw (10 pmol/ μ L), 2,5 μ L do *primer* Mirac_PET_Rv (10 pmol/ μ L) e 19 μ L de água *nuclease free*, totalizando um volume final de 50 μ L. O ciclo utilizado foi: 98°C por 1 min, 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min, 72°C por 10 min, 4°C. A amostra amplificada foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Tabela 4 - Sequência oligonucleotídeos da Citros_Mir.

Identificação	Sequência de oligonucleotídeos
Mirac_PET_Fw	5' CATATGAAGACTTCATTAGTAACAACACTCTCCTTC 3''
Mirac_PET_Rv	5' GAATTCCAGAGACGGAAATAACATAGATCTTCCACTAT 3'

O produto obtido a partir da amplificação por PCR, purificado utilizando o kit Wizard PCR Clean Up (Promega), foi usado na clonagem com o vetor de propagação pGEMT (Novagen) através da seguinte reação de ligação: 4 μ L do inserto Citros_Mir (50 ng/ μ L), 1 μ L do pGEM-T (50 ng/ μ L), 10 μ L de Tampão (2x), 1 μ L de enzima T4 ligase e 4 μ L de água *nuclease free* em um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada *overnight* à 4°C e posteriormente utilizada na transformação de células quimiocompetentes de JM109 de *Escherichia coli*, usando protocolo adaptado de Green e Sambrook (2000).

A seleção das colônias recombinantes ocorreu em meio LB em placa de Petri contendo o antibiótico ampicilina em uma concentração final de 25 μ g/mL e, além disso, por coloração das colônias brancas e azuis. Esse mecanismo ocorre pela aplicação de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), um glicosídeo artificial análogo à lactose, numa concentração de 20 mg/mL e IPTG numa concentração de 0,4 mM (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), um indutor do *operon* LacZ presente em *E. coli.*, o qual expressa a enzima β -galactosidase. Entretanto, as cepas utilizadas geralmente apresentam uma deleção nesse gene, ao passo que os vetores utilizados apresentam a sequência que codifica a enzima em questão. Desse modo, a bactéria que carrega esse vetor consegue produzir β -galactosidase, hidrolisando o X-Gal, formando o 5-bromo-4-chloro-indoxy, o qual forma o dímero 5,5''-dibromo-4,4''-dichloroindigo, composto insolúvel de pigmento azul. Esse vetor apresenta uma região chamada sítio de clonagem múltipla (MCS - do inglês, *Multiple Cloning Site*) contida na sequência LacZ, onde se encontra sítios de restrição de algumas enzimas, possibilitando a inserção do inserto e, conseqüentemente, interrompendo a sequência do gene e, assim, não produzindo β -galactosidase. Portanto, as colônias que carregarem o plasmídeo que contém a sequência de interesse não conseguem hidrolisar o X-Gal, apresentando coloração branca (PADMANABHAN, BANERJEE, MANDI, 2011). As placas de Petri foram incubadas por 16 horas à 37°C para o crescimento das colônias e posterior discriminação visual.

Das colônias brancas, foram selecionadas duas para uma PCR de colônia visando confirmar o clone positivo. O molde utilizado para a PCR de colônias foi preparado retirando uma pequena porção de cada colônia com o auxílio de um palito estéril e mergulhando em um tubo de 1,5 mL contendo 20 μ L de água autoclavada. Os tubos foram fervidos durante 10 minutos e centrifugados por 30 segundos. Na reação utilizou-se Pol Master Mix (Cellco) contendo todos os reagentes necessários, além dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* e 5 μ L do DNA molde, em um volume final de 50

μL, sujeito ao seguinte ciclo: 95°C por 1 min; 95°C por 1 min; 55°C por 1 min; 72°C por 1 min; 72°C por 10 min e 4°C, com 35 repetições. Após amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As que apresentaram amplificação positiva foram utilizadas na extração do DNA plasmidial pGEM-T_Citros_Mir_2, seguindo o protocolo Fast-nEasy Plasmid Mini Prep Kit (Cellco). O DNA plasmidial foi submetido a uma reação de digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Eco* RI. A reação contou com 4 μL do pGEM-T_Citros_Mir_2 (300ng/μL), 1 μL da enzima *Nde* I (5U) e 1 μL da enzima *Eco* RI (5U), 5 μL do *Buffer* Orange (1x) e 39 μL água *nuclease free*, completando para o volume final de 50 μL. A clivagem foi mantida à 37°C durante 3h. O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.3.2 Subclonagem do gene que codifica a Citros_Mir em vetor de expressão pET-28a

A partir da clivagem, o fragmento correspondente à Citros_Mir foi subclonado no vetor pET-28a (Merck), o qual foi previamente digerido pelas mesmas enzimas (*Nde* I e *Eco* RI). A reação de ligação continha 1 μL da enzima T4 DNA *ligase* (3U) (Invitrogen), 2 μL do vetor pET-28a (50 ng/μL), 12 μL do inserto de DNA (50 ng/μL) e 15 μL do *Buffer* (2x), em um volume final de 30 μL, deixada *overnight* (16h) à 4°C. A reação de ligação foi usada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*, JM109, seguindo o protocolo de Grenn e Sambrook (2000). A seleção das colônias se deve em placas de Petri contendo meio LB “Low Salt” (Acumedia®) com adição de 25 μg/mL do antibiótico Canamicina™ (Merck) e 25 μg/mL d antibiótico Cloranfenicol™ (Merck). Algumas colônias foram selecionadas para a reação de amplificação por PCR de colônia de maneira similar ao descrito anteriormente, visando confirmação dos recombinantes. O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e um dos clones positivos (colônia 1) foi utilizado na preparação de um inóculo em 5 mL de meio LB com adição de 25 μg/mL de Canamicina e 25 μg/mL de Cloranfenicol, mantido na incubadora shaker *overnight*, à 37°C e 250 rpm. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada e usada para extração do DNA plasmidial seguindo protocolo do kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Cellco) e se obtendo a construção pPET-28a_Citros_Mir, a qual foi sequenciada.

3.3.3 Transformação e expressão do vetor de expressão pPET-28a_Citros_Mir em células de *E. coli*

Dado o resultado do sequenciamento da construção pET-28a_Citros_Mir, esta foi submetida a transformação em células quimiocompetentes de *E. coli*, linhagem Rosetta (DE3), seguindo o protocolo de Grenn e Sambrook (2000). Uma colônia recombinante foi selecionada para preparo de um pré inóculo de 7,5 mL contendo meio LB e os antibióticos Canamicina e Cloranfenicol, ambos com concentração final de 25 µg/mL, mantido a 37°C, 250 rpm, *overnight*. Após esse período, o pré inóculo foi diluído a uma proporção 1:100 para preparo de um inóculo. Adicionou-se 1 mL em 100 mL de meio LB dentro de um Erlenmeyer de 500mL, para correta aeração, contendo os mesmos antibióticos nas mesmas condições. O inóculo foi mantido à 37°C e 250 rpm até atingir uma Densidade Óptica (DO) em 600 nm de 0,4. Após, retirou-se uma alíquota (controle não induzido) e iniciou-se a indução com adição 1 mL de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), garantindo uma concentração final de 0,4 mM, a temperatura de 37°C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 1 hora até totalizar 4 horas de indução e uma última alíquota foi retirada 16 h depois, as quais foram analisadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue R-250 (LAEMMLI, 1970) para avaliar o melhor tempo de indução.

Dada a primeira tentativa de expressão da construção pET-28a_Citros_Mir transformada em células quimiocompetentes de *E. coli*, Rosetta (DE3), seguindo o protocolo de Grenn e Sambrook (2000), as condições iniciais foram alteradas.

Uma colônia recombinante foi selecionada para preparo de um pré inóculo de 7,5 mL contendo meio LB e os antibióticos Canamicina e Cloranfenicol, ambos com concentração final de 25 µg/mL, mantido a 37°C, 250 rpm, *overnight*. Após esse período, o pré inóculo foi diluído a uma proporção 1:100 para preparo de um inóculo. Adicionou-se 5 mL do pré-inoculo em 500 mL de meio LB em um erlenmeyer de 2 L, para correta aeração, contendo os mesmos antibióticos nas mesmas condições. O inóculo foi mantido à 37°C e 250 rpm até atingir uma Densidade Óptica (DO) em 600 nm de 0,4. Posteriormente, retirou-se uma alíquota (controle não induzido) e iniciou-se a indução da expressão da proteína com adição de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (Merck). Foram testadas três concentrações finais de IPTG: 0,2 mM, 0,4 mM e 1,0 mM (Tabela 5). Três diferentes temperaturas de indução foram avaliadas, 20°C, 30°C e 37°C, a fim de determinar as melhores condições para expressão da Citros_Mir (Tabela 1).

Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 1 hora até totalizarem 4 horas de indução e uma última alíquota foi retirada 16 h depois. As alíquotas foram analisadas em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue R-250 (LAEMMLI, 1970) para avaliar o melhor tempo de indução.

Terminada a indução a cultura foi centrifugada a 4°C, 7000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* guardado a -20°C

Tabela 5. Condições testadas na indução da expressão em *Escherichia coli*

Temperatura (°C)	20			30			37	
Concentração de IPTG (mM)	0,2	0,4	1,0	0,2	0,4	1,0	0,2	1,0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Apresentação e discussão dos resultados da expressão da Citros_Mir em *Pichia pastoris*

4.1.1 Análises de integridade e pureza e quantificação do RNA extraído das folhas de *Citrus Paradise*

O RNA extraído utilizando TRIzol™ (Invitrogen) foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (Figura 4), sua integridade foi confirmada, porém observou-se uma degradação do material, o que pode ter influenciado na exacerbação da quantificação. No espectrofotômetro Nanodrop avaliou-se a pureza, dada pelas razões 260/280 nm e 260/230 nm, e o RNA foi quantificado (Tabela 6).

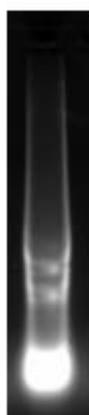


Figura 4 – Análise da integridade do RNA extraído das folhas de *Citrus paradise*.

Tabela 6 – Avaliação do RNA total extraído das folhas de *Citrus paradise* em relação à quantificação e pureza.

Amostra	Quantificação (ng/ μ L)	260/280 (nm)	260/230 (nm)
RNA	4261,0	1,03	1,22

A pureza do material dada pela razão 260/280 nm informa sobre a contaminação por compostos como proteínas, sendo os valores desejados entre 1.7 e 2.0 (GREEN e SAMBROOK, 2012). Assim, observa-se que o RNA extraído apresentou a razão 260/280 nm igual a 1,03 (Tabela 6) indicando uma amostra não muito pura. Já a razão 260/230 nm informa sobre a contaminação por compostos como EDTA, fenol, glicogênio, carboidrato ou guanidina, sendo o valor desejado próximo a 2.0. A amostra obteve valor de 1,22 nessa razão (Tabela 6), o que poderia ser otimizado em extrações futuras (GREEN e SAMBROOK, 2012). Apesar disso, foi dado seguimento aos experimentos.

4.1.2 Análise da amplificação da ORF que codifica Citros_Mir

O resultado da amplificação da fase aberta de leitura (ORF, do inglês – *Open Reading Frame*) que codifica a proteína Citros_Mir por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos contendo os sítios de restrição para as enzimas *Xba* I e *Eco* RI, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, no qual se observou a banda na altura esperada de 711 pb (Figura 5). Dado o resultado, os produtos foram purificados do gel a fim de ser clonados no vetor de propagação pGEM-T.

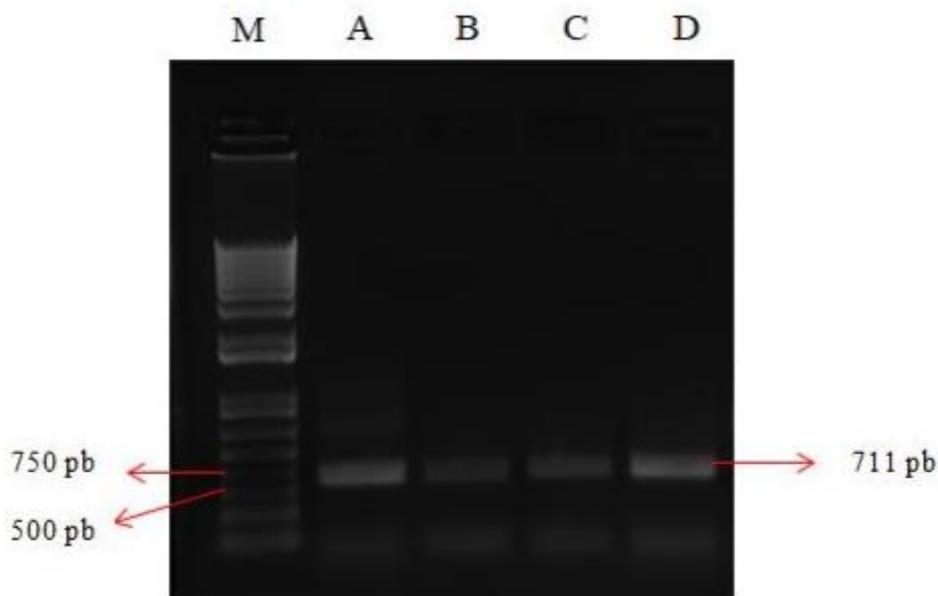


Figura 5 – Eletroforese em gel da amplificação da ORF. Resultado da amplificação da ORF que codifica Citros_Mir. M) marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen); A à D) ORF Citros_Mir.

4.1.3 Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação pGEM-T

O fragmento amplificado foi usado para clonagem no vetor de propagação pGEM-T. A reação de ligação entre vetor e inserto foi utilizada na transformação de células quimiocompetentes de DH5 α de *Escherichia coli* e resultou em colônias brancas e azuis. Foram selecionadas 10 colônias brancas para análise da construção pGEM-T_Citros_Mir por PCR de colônia. Os clones recombinantes 4 e 10 foram usados em uma extração do DNA plasmidial pGEM-T_Citros_Mir. Para confirmação foi realizada uma reação de clivagem com as enzimas de restrição apropriadas. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e também confirmou a presença do inserto (711 pb) no plasmídeo (3015 pb), como se observa na Figura 6.

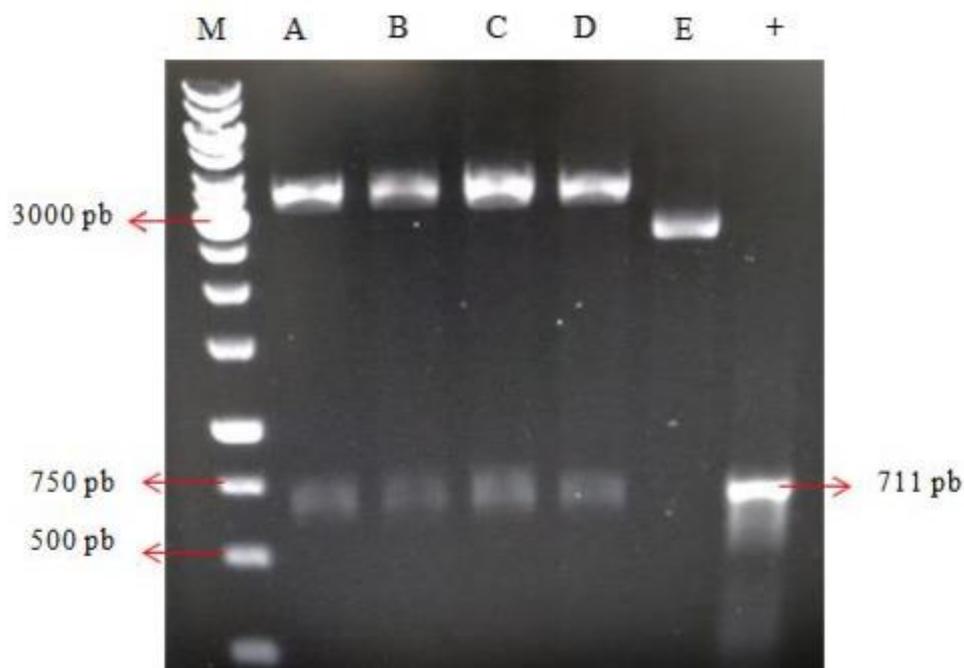


Figura 6 - Eletroforese em gel do fragmento que codifica a Citros_Mir. Clivagem dos plasmídeos recombinantes pGEM-T_Citros_Mir. M) marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen); A, B, C e D) plasmídeo clivados; E) plasmídeo fechado; +) controle positivo.

4.1.4 Sequenciamento do vetor de expressão pGEM-T_Citros_Mir

Os produtos da extração plasmidial do pGEM-T_Citros_Mir de ambos os clones (4 e 10) foram enviados para sequenciamento. O sequenciamento contou com os primers: Primer reverse do plasmídeo pGEM-T M13/pUC (5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGG '3), Primer forward do plasmídeo pGEM-T M13/pUC (5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG '3), Primer_pPIC_Mir_Rv e Primer_pPIC_Mir_Fw. O resultado dos sequenciamos do clone 10 foi conclusivo, confirmando a sequência correta desejada, além de sua integridade e posição no vetor. O sequenciamento do clone 4 mostrou uma mutação, na qual bases nitrogenadas foram trocadas, modificando o códon e, conseqüentemente, alterando o aminoácido traduzido. Assim, seguiu-se com o clone 10 para as demais etapas.

4.1.5 Construção do vetor de expressão pPICZαC_Citros_Mir

O inserto de interesse foi obtido pela clivagem da construção pGEMT_Citros_Mir e subclonado no vetor de expressão pPICZαC (Invitrogen), obtendo-se a construção pPICZαC_Citros_Mir, a qual foi usada na transformação das células quimiocompetentes DH5α de *E. coli*. Onze colônias foram selecionadas para uma PCR

de colônia (Figura 7) e a análise ocorreu por eletroforese em gel de agarose 1%, confirmando a presença do fragmento esperado (711 pb).

Um dos clones positivos foi selecionado para extração do DNA plasmidial e, disso, uma segunda confirmação foi feita a partir de uma clivagem com as enzimas *Xba* I e *Eco* RI, confirmando a presença do inserto no plasmídeo.

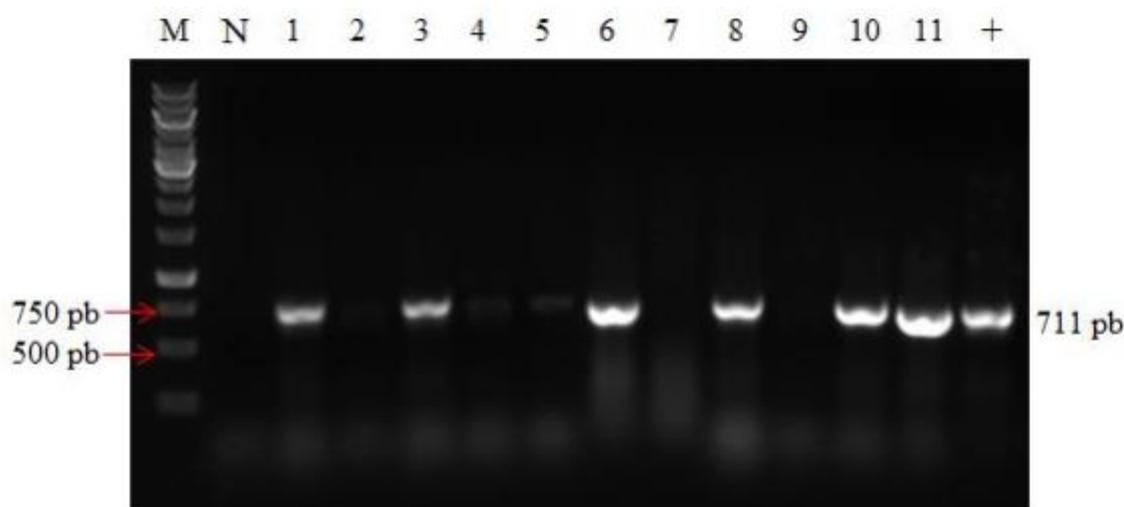


Figura 7 - Eletroforese em gel do PCR de colônia da transformação do pPICZ α C_Citros_Mir em DH5 α . M) marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen); N) controle negativo; 1 a 11) produtos amplificados Citros_Mir; +) controle positivo.

4.1.6 Transformação do pPICZ α C_Citros_Mir em células competentes de *P. pastoris*

A transformação da construção pPICZ α C_Citros_Mir em células competentes X-33 e KM71H de *Pichia pastoris* foi realizada. Dado o método *posttransformational vector amplification* (PTVA), os clones contendo multicópias do vetor de expressão são selecionados expondo-os às altas concentrações do antibiótico de resistência específico do vetor usado, cujo gene está contido na sequência (SUNGA, TOLSTORUKOV, CREGG, 2008). Como o vetor de expressão usado foi o pPICZ α C, o gene de resistência nele corresponde ao antibiótico Zeocina™ (Invitrogen). Assim, houve o crescimento de colônias em todas as placas, com concentrações crescentes de Zeocina (100, 250 e 500 μ g/mL). A transformação com o plasmídeo pPICZ α C vazio serviu como controle e também se mostrou positiva, apresentando grande quantidade de colônias em todas as concentrações. Para a expressão em pequena escala

foram selecionadas algumas colônias presentes na placa com 500 µg/mL de Zeocina, visando obter clones com maior número de cópias do vetor transformado.

4.1.7 Expressão recombinante em pequena escala de Citros_Mir em células X-33

Em relação à expressão da proteína recombinante em células X-33, o primeiro *screening* realizado contou com os primeiros 20 clones e utilizou como controle a célula competente X-33 de *P. pastoris* transformada com o plasmídeo de expressão pPICZαC vazio. A concentração final de metanol absoluto utilizado na indução foi de 0,75%. Dos clones analisados, somente o clone 9 aparentou expressar uma proteína de tamanho próximo ao da proteína de interesse Citros_Mir (26 kDa) a partir de 120 h de indução, e o clone 16 aparentou expressar uma proteína similar a partir de 144 h, o que foi observado em SDS-PAGE 15% (Figuras 8a e 8b). Ao todo, o *screening* foi realizado com 80 clones.

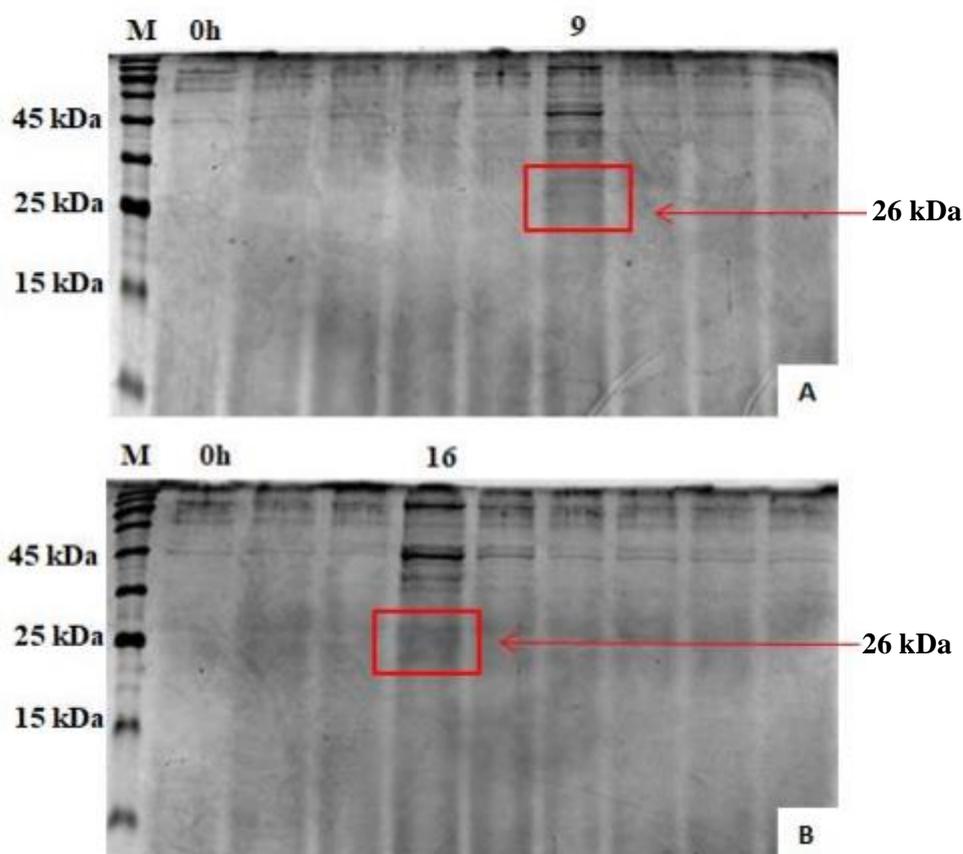


Figura 8 – Resultado da indução da expressão da proteína Citros_Mir em pequena escala. A) clone 9 em 120 horas; B) clone 16 em 144 horas. M) marcador de peso molecular, 180 kDa; 0h) amostra do não induzido.

É determinado que a *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono. O metanol é oxidado, usando oxigênio (O₂) celular, gerando como produto o formaldeído e liberando peróxido de hidrogênio. Essa reação é catabolizada pela enzima álcool oxidase (AOX), a qual é codificada, principalmente, pelo gene AOX1. O promotor desse gene é reprimido em outras fontes de carbono, como glicerol, e tem a expressão induzida quando a única fonte de carbono é o metanol. Como o peróxido de hidrogênio produzido no processo é tóxico para a célula, a enzima é sequestrada pelo peroxissomo. Assim, como a enzima álcool oxidase apresenta baixa afinidade pelo O₂, sua produção é exacerbada. Esse processo é utilizado na expressão das proteínas heterólogas a partir do promotor do AOX1 (CREGG et al., 1989; CREGG et al., 2000).

Considerando que o mecanismo de expressão da proteína de interesse nesse organismo usa o metanol como indutor, este é um fator essencial a ser analisado. A escolha da concentração final de metanol (0,75%) no primeiro *screening* foi embasada em descrições na literatura, adaptando o sugerido (0,5%) pelo manual de expressão de proteínas recombinantes usando os vetores pPIC e pPICZ em *Pichia pastoris*, EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Entretanto, ainda no manual, também é relatado que a concentração final de metanol na indução pode variar até 3% em culturas líquidas de cepas capazes de metabolizar metanol como única fonte de carbono, sem causar efeitos negativos. Além disso, há estudos que analisaram a expressão proteica nesses organismos em diferentes concentrações de metanol, variando até 3%, e observaram um aumento no rendimento da proteína sob condições normais e sob condições limitantes de O₂, sem causar malefícios à célula (ANGGIANI, HELIANTI, ABINAWANTO, 2018; KHATRI, HOFFMANN, 2006).

Desse modo, outro *screening* foi realizado com os clones 9 e 16, que aparentemente expressaram uma proteína de tamanho semelhante à Citros_Mir no primeiro teste, analisando a expressão nas concentrações finais de 0,75%, 1%, 2% e 3% de metanol. O resultado mostrou um ligeiro aumento na expressão da proteína de interesse em ambos os clones em 120h e 144h, nas concentrações 2 e 3% comparado com as demais concentrações, como é observado em gel SDS-PAGE 15% pelas bandas no tamanho desejado de 26 kDa (Figura 9a e 9b).

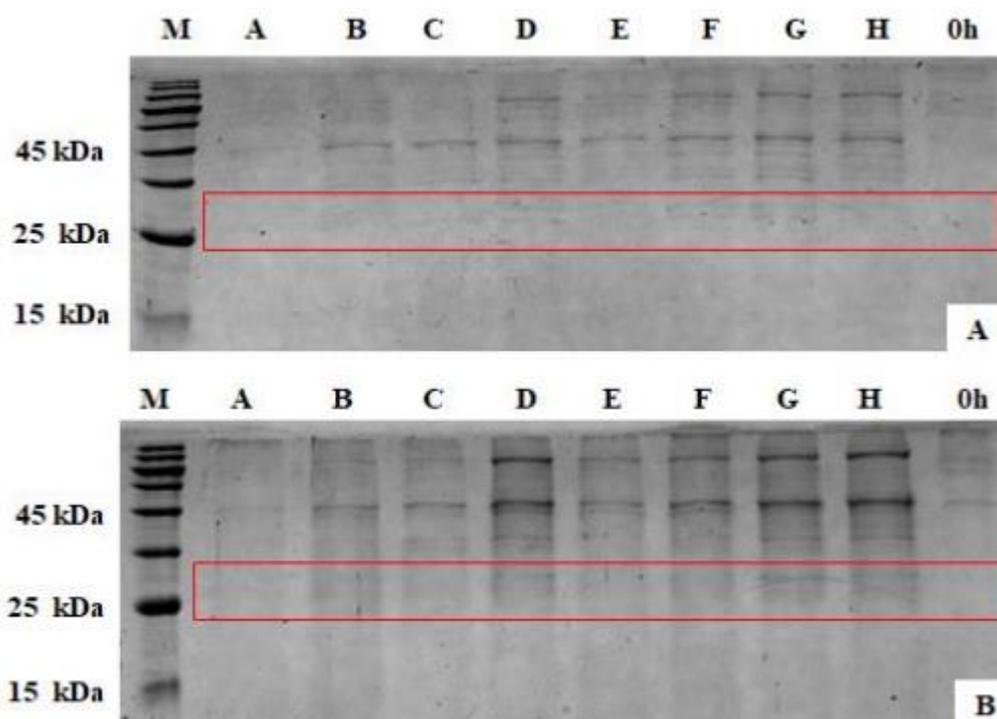


Figura 9 –SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul da expressão da Citros_Mir em pequena escala dos clones 9 e 16 em concentrações crescentes de metanol. A) expressão em 120h; B) expressão em 144h. M) marcador de peso molecular, 180 kDa; 0h) amostra não induzida; A) clone 9 induzido com 0,75% de metanol; B) clone 9 induzido com 1% de metanol; C) clone 9 induzido com 2% de metanol; D) clone 9 induzido com 3% de metanol; E) clone 16 induzido com 0,75% de metanol; F) clone 16 induzido com 1% de metanol; G) clone 16 induzido com 2% de metanol; H) clone 16 induzido com 3% de metanol.

4.1.8 Análise da expressão em larga escala e purificação da proteína Citros_Mir em X-33

De acordo com os resultados obtidos na expressão em pequena escala, seguiu-se para a expressão em maior escala considerando a concentração final de 2% de metanol absoluto durante a indução de 144 horas totais. A concentração de metanol foi determinada com base nos resultados obtidos e no levantamento dos dados na literatura já descritos (ANGGIANI, HELIANTI, ABINAWANTO, 2018; KHATRI, HOFFMANN, 2006).

Em relação ao clone 9, na expressão em maior escala não foi visto bandas de tamanho similar ao da Citros_Mir (26 kDa). Entretanto, notou-se bandas de tamanho próximo à 45 kDa (Figura 10A), também observadas na expressão em pequena escala (Figura 8), o que poderia indicar que a proteína também estava sendo expressa na forma dimérica. Considerando essa hipótese, observou-se que a proteína foi produzida em 48 horas, mas que em 96 horas de indução há uma produção maior em comparação com os

demais períodos. O mesmo resultado foi percebido no clone 16 (Figura 10B), porém este apresentou menor produção da proteína quando comparado com o clone 9.

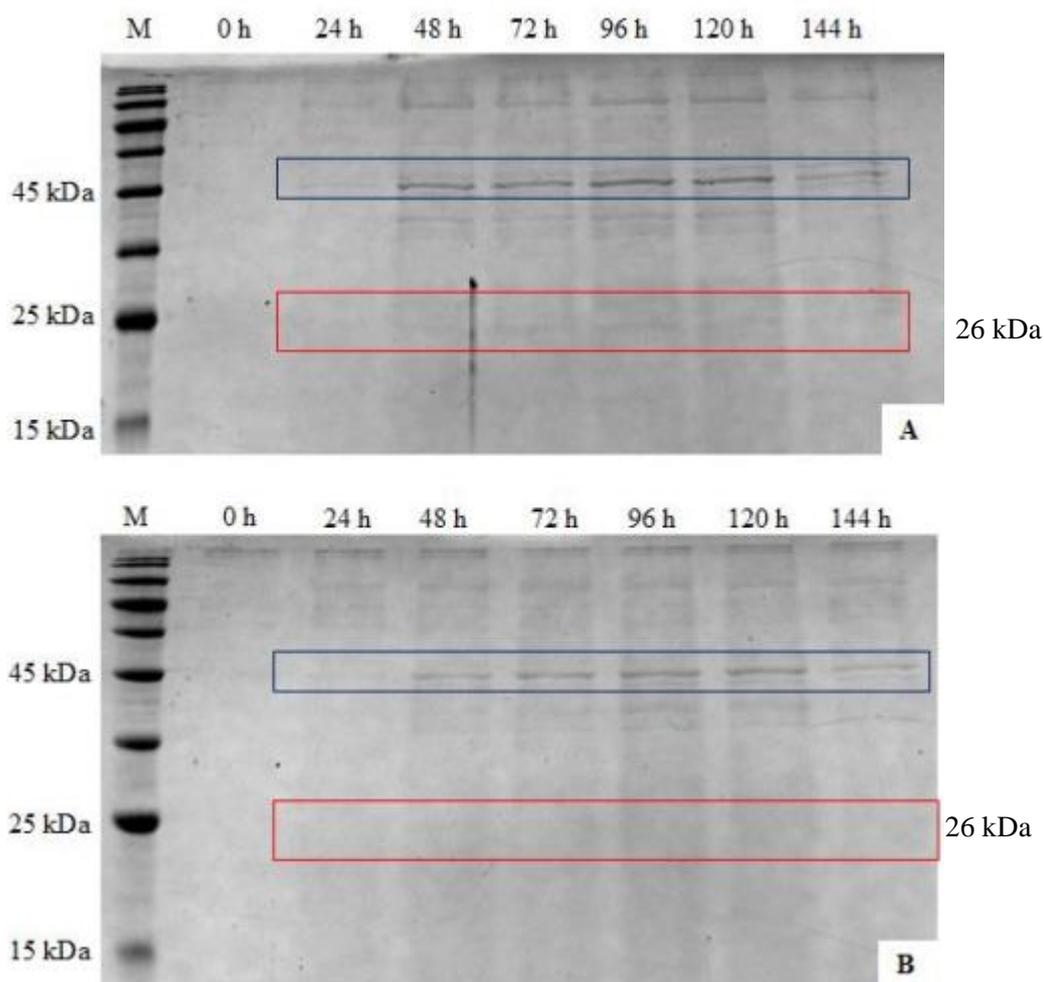


Figura 10 – Expressão da proteína Citros_Mir em maior escala em X-33. A) Clone 9; B) Clone 16. M) marcador de peso molecular, 180 kDa; 0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h) períodos da indução; Quadrado azul: dímeros da proteína Citros_Mir (~45 kDa); Quadrado vermelho: monômeros da proteína Citros_Mir (25,2 kDa).

Há indicações que a proteína miraculina extraída da planta *Richardella dulcifica* é uma cadeia polipeptídica simples de peso molecular de 24,600 kDa (THEERASILP et al., 1989), cuja forma pura é um tetrâmero e a forma desnaturada é um dímero, ambos presentes na planta, apresentando atividade modificadora de sabor (IGETA et al., 1991). Entretanto, sua forma monomérica não apresenta essa propriedade, ao passo que sua forma dimérica, tanto natural quanto recombinante, expressa em *Aspergillus oryzae*, apresentam dependência do pH para a ativação da atividade modificadora de sabor, sendo ativas em pH ácido (ITO et al., 2007), situação na qual a proteína se encontra mais aberta, com maior exposição dos resíduos de histidina, dados

como essenciais na atividade modificadora de sabor (ITO et al., 2007; PALADINO et al., 2008).

Vale ressaltar que a *Pichia pastoris* também aparenta expressar proteínas próprias no tamanho ~45 kDa, mas é possível observar mesmo no primeiro *screening* realizado (Figuras 8) que as bandas referentes à ~45 kDa aparecem em maior destaque tanto no clone 9 quanto no 16 em comparação aos demais clones analisados, os quais não apresentaram os monômeros de tamanho 26 kDa, resultado que se mantém no segundo *screening* usando concentrações crescentes de metanol (Figura 9).

O resultado obtido na expressão em maior escala pode ser considerado um indicativo de que a proteína Citros_Mir também possui forma dimérica, semelhante ao observado sobre a forma ativa da proteína miraculina original, abrindo espaço para indagações a respeito da atividade da proteína de interesse.

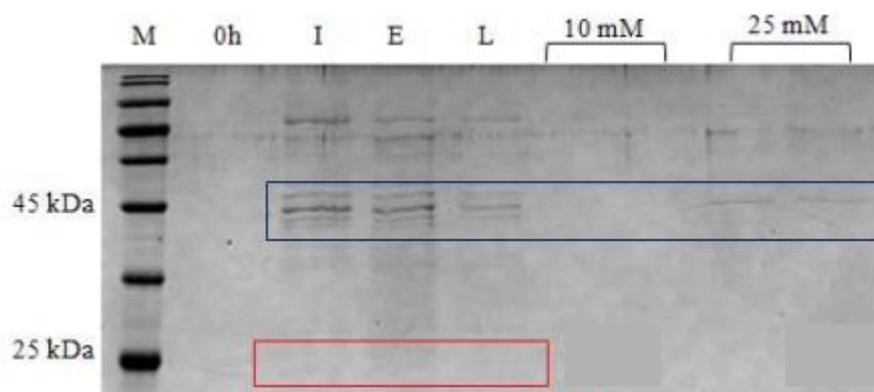


Figura 11 - Ensaio de purificação da expressão da proteína Citros_Mir em maior escala pelo clone 9. M) marcador de peso molecular, 180 kDa; 0h) amostra não induzida; I) amostra induzida; E) eluato; L) lavagem; 10 mM: eluições da proteína contendo tampão de lise com imidazol 10 mM; 25 mM: eluições da proteína contendo tampão de lise com imidazol 25 mM; Quadrado azul: proteína Citros_Mir em sua forma dimérica (~45 kDa); Quadrado vermelho: proteína Citros_Mir em sua forma monomérica (26 kDa).

A partir desses resultados a proteína Citros_Mir foi submetida a uma cromatografia de afinidade usando uma coluna contendo uma resina com íons de níquel ligados (Ni-NTA (Qiagen)). Em relação à purificação da Citros_Mir expressa pelo clone 9, observou-se proteínas na fração correspondente ao eluato, com eluição em menor quantidade nas frações de 25 mM de imidazol, o que está indicado na Figura 11. Isso pode representar uma baixa afinidade entre a proteína e a coluna, visto que quando o sobrenadante é passado pela coluna, é esperado que a proteína interagisse com os íons de níquel, de modo que ficasse retida na coluna e posteriormente pudesse ser eluída nas

frações contendo imidazol (WAUGH, 2005). Nas demais concentrações de imidazol não se observou a proteína.

A purificação da proteína Citros_Mir expressa em maior escala pelo clone 16 mostrou resultado similar ao ocorrido com o clone 9. Proteínas se mostraram presentes principalmente no eluato, na lavagem e nas frações de 25 mM de imidazol (Figura 12). Analisando esses resultados, conclui-se que era necessário aprimorar o rendimento da expressão da proteína Citros_Mir em ambos os clones.

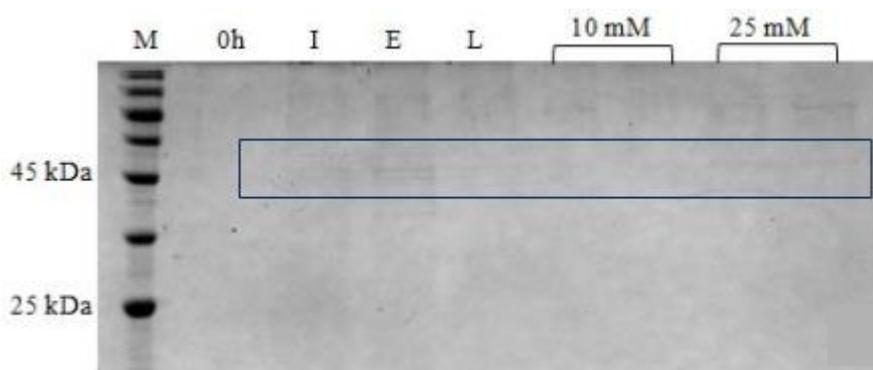


Figura 12 - Purificação da expressão da proteína Citros_Mir em maior escala pelo clone 16. M) marcador de peso molecular; 0h) amostra não induzida; I) amostra induzida; E) fração do sobrenadante coletado, contendo proteínas que não tiveram afinidades com a membrana (eluato); L) fração contendo apenas tampão de lise sem imidazol retirando excesso de proteínas não desejáveis (lavagem); 10 mM: eluições da proteína contendo tampão de lise com imidazol 10 mM; 25 mM: eluições da proteína contendo tampão de lise com imidazol 25 mM; Quadrado azul: proteína Citros_Mir em sua forma dimérica (~45 kDa).

O método de purificação por cromatografia por afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC – do inglês, Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) consiste na interação entre a cauda de histidina (His-tag) da proteína recombinante e os íons metálicos, como níquel ou cobre, os quais se encontram imobilizados em matrizes através de um ligante quelante, como o ácido nitrilotriacético (NTA) ou o ácido iminodiacético (IDA) (WAUGH, 2005). Desse modo, a proteína Citros_Mir foi purificada usando uma coluna contendo íons de níquel imobilizados em uma resina de ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Entretanto, em alguns casos pode ocorrer a purificação de contaminantes, ou proteínas endógenas, que também interagem com a coluna e, até mesmo, haver problemas com a interação da proteína de interesse. Nesses casos, alguns parâmetros podem ser modificados, como modificar a concentração de imidazol, aumentar a concentração de NaCl, diminuir adição de detergentes (SDS, por exemplo),

entre outros. (Structural Genomics Consortium et al., 2008; SPRIESTERSBACH et al., 2015).

Um problema encontrado na purificação da proteína que aparenta ser a Citros_Mir utilizando esse método foi sua baixa afinidade com a coluna, como é possível observar nas Figuras 11 e 12 nas frações correspondentes ao eluato e na lavagem. Dessa forma, sugere-se que a cauda de histidina poderia estar escondida devido ao enovelamento da proteína, não havendo contato com os íons metálicos da coluna e, assim, a proteína não é retirada. Foi necessário modificar alguns parâmetros da purificação, como alterar as concentrações de imidazol e de NaCl, já citados. O cloreto de sódio é um parâmetro interessante a ser analisado, pois atua no relaxamento da proteína de maneira semelhante ao aquecimento, interagindo com a superfície da molécula e diminuindo a rigidez das ligações de hidrogênio (ZHANG et al., 2014). Desse modo, um aumento na concentração de NaCl no tampão de lise usado na purificação da proteína Citros_Mir poderia otimizar esse processo, expondo a cauda de histidina.

4.1.9 Testes para melhorar o rendimento da expressão e purificação da Citros_Mir em células X-33

Novos testes de expressão foram realizados com o clone 9, afim de obter uma maior concentração da proteína de interesse. Nesse caso, foram induzidos 400 mL de cultura na expressão em maior escala. A análise ocorreu por SDS-PAGE 15%, exigindo bandas próximas de 25 kDa em 48h, 72h e 96h de indução (Figura 13a e 13b), considerando o tamanho da proteína de interesse com a cauda de histidina igual a 26 kDa, o que não é percebido nos controles (célula estoque X-33 e célula X-33 transformada com o plasmídeo pPICZ α C). Além disso, bandas mais fortes foram observadas no tamanho de, aproximadamente, 45 kDa em comparação com as bandas dos controles nos mesmos períodos, reforçando a hipótese de que a proteína se apresenta na forma dimérica. Ainda, nas Figuras 13a e 13b mostram uma maior expressão da proteína em 96 horas em comparação com 48 h e 72 h, confirmando o melhor tempo de indução do clone 9.

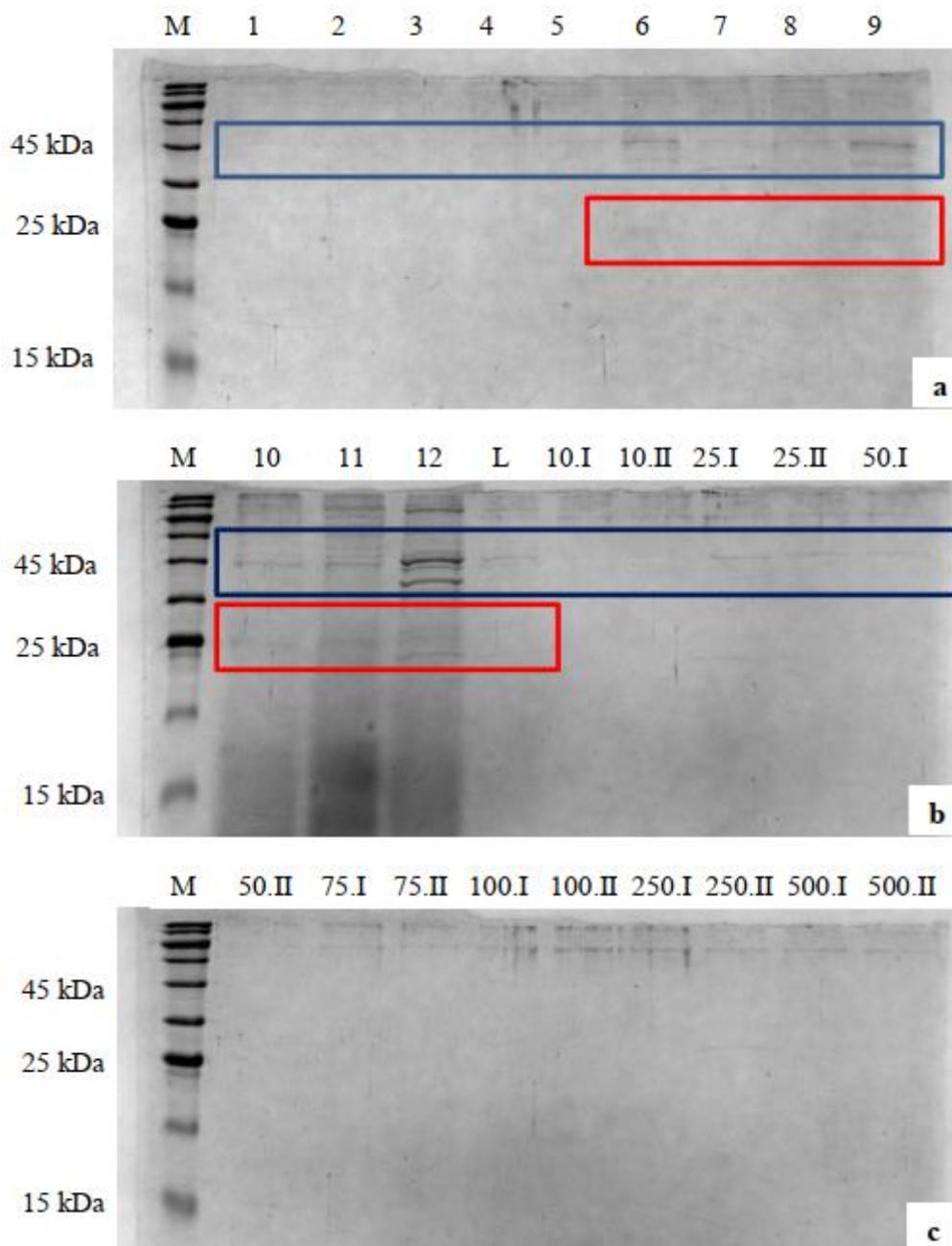


Figura 13 – Novos testes de expressão da proteína Citros_Mir em maior escala em X-33. a) M- marcador molecular 180 kDa, 1- controle X33 expresso em 24 h, 2- controle pPICZ α C expresso em 24h, 3- clone 9 expresso em 24h, 4- controle X33 expresso em 48h, 5- controle pPICZ α C expresso em 48h, 6- clone 9 expresso em 48h, 7- controle X33 expresso em 72h, 8- controle pPICZ α C expresso em 72h e 9- clone 9 expresso em 75h; b) M- marcador molecular 180 kDa, 10- controle X33 expresso em 96h, 11- controle pPICZ α C expresso em 96h, 12- clone 9 expresso em 96h, L- fração correspondente a lavagem, 10.I à 50.I- frações em duplicata com concentrações crescente de imidazol em mM; c) M- marcador molecular 180 kDa, 50.II a 500.II- frações em duplicata com concentrações crescentes de imidazol em mM. Quadrado azul: dímeros da proteína Citros_Mir (~45 kDa); Quadrado vermelho: monômeros da proteína Citros_Mir (26 kDa).

Em relação às tentativas de melhorar o rendimento da purificação da proteína Citros_Mir expressa pelo clone 9, observou-se que as bandas correspondentes à proteína com massa molecular de 26 kDa não aparecem nas frações purificadas, mas a banda próxima a 45 kDa, considerada uma possível representante do dímero da proteína de interesse, foi observada nas frações correspondente à lavagem, frações I e II com 10 mM de imidazol, frações I e II com 25 mM de imidazol e na fração I contendo 50 mM de imidazol, não sendo observada nas frações subsequentes (Figura 13b e 13c).

Entretanto, como foi induzido um volume de 400 mL, foram realizadas 8 lavagens da coluna e essas frações foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 15% (Figura 14) e possibilitou a visualização de bandas no tamanho de 45 kDa, referente aos possíveis dímeros da Citros_Mir, o que pode indicar que mesmo aumentando a concentração salina do tampão usado na purificação para 500 mM de NaCl, a afinidade da proteína à resina de níquel não foi aumentada.

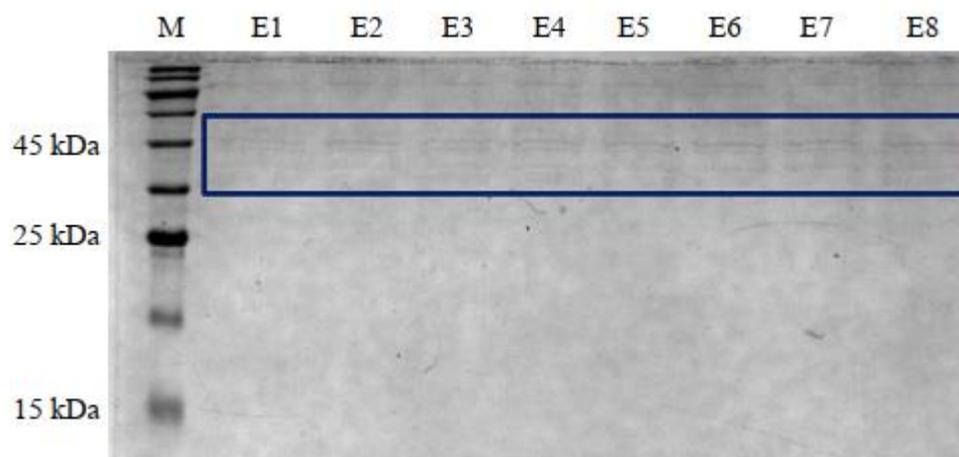


Figura 14 – Frações correspondentes as lavagens e frações coletadas na purificação da proteína Citros_Mir expressa em maior escala. M- marcador molecular 180 kDa, E1a E8- eluatos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Quadrado azul: dímeros da proteína Citros_Mir (~45 kDa).

Após a purificação da suposta Citros_Mir, as frações coletadas com a proteína mais pura e o eluato contendo a proteína que não se ligou à membrana foram dialisados em e usados no protocolo de concentração da proteína.

O resultado da concentração pelo dispositivo pode ser visto na Figura 6, ressaltando a montagem inicial antes da centrifugação (Figura 15a) e o volume final concentrado contido no recipiente após a centrifugação (Figura 15b). As frações de número 7 e 8, obtidas com as lavagens foram concentradas em coluna Centriprep®. As

amostras concentradas foram estocadas à -20°C , também foram guardados os restantes, solvente e materiais que foram retidos na coluna de filtrado após a centrifugação.

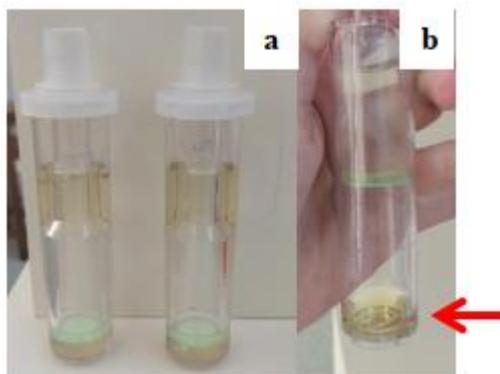


Figura 15 – Frações coletadas a partir da purificação da Citros_Mir em coluna Centriprep®. (a) montagem do dispositivo para concentração da proteína, antes da centrifugação; (b) resultado da concentração da proteína após centrifugação. Amostra concentrada indicada pela seta.

4.1.10 Western Blot da Citros_Mir

O Western blot foi realizado após os ensaios de expressão em pequena escala a partir do screening dos clones 9 e 16 em 120 horas e 144h, com variadas concentrações de metanol, porém não apresentou bandas que correspondem a proteína Citros_Mir (Figura 16).

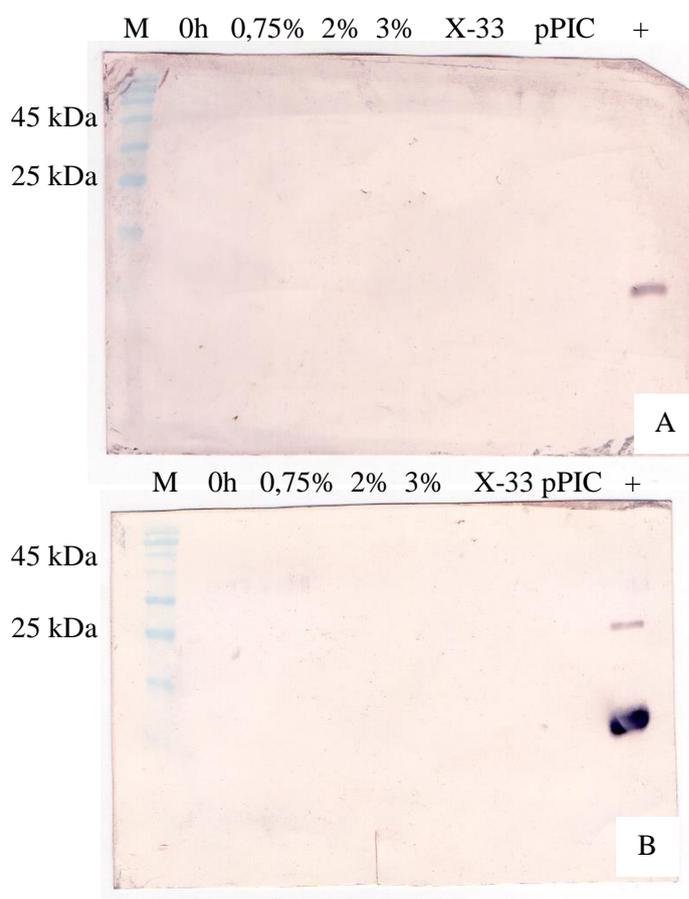


Figura 16 – Imunodeteção da proteína Citros_Mir dos clones 9 e 16 em diferentes concentrações de metanol. A) clone 9; B) clone 16. M) marcador de peso molecular; 0h) amostra não induzido; 0,75%, 1%, 2% e 3%) proteínas expressas em cada concentração de metanol; X-33) controle da célula X-33 estoque expresso em 2% de metanol; pPIC) controle da *P. pastoris* transformada com o vetor pPICZαC vazio; +) controle positivo de uma proteína qualquer. O quadrado vermelho destaca as bandas em 1% e 3% de metanol.

O Western blot também foi realizado após os ensaios de expressão em maior escala a partir do clone 9 com 2% de metanol. O primeiro teste contou com algumas alíquotas da expressão tanto do clone quanto dos controles (X-33 e pPICZαC) e com as frações duplicatas de 25 mM de imidazol da purificação. Nesse teste foram usados as 1:250 de anticorpo primário e 1:2500 do anticorpo secundário. O gel espelho analisado em SDS-PAGE 15% pode ser observado na Figura 17a. Outro teste realizado contou com as amostras da Citros_Mir concentrada e do restante filtrado. O gel espelho desse teste foi analisado em SDS-PAGE 15% e pode ser observado na Figura 17b. Esse teste foi utilizado a titulação de 1:500 de anticorpo primário e 1:10000 do anticorpo secundário.

O terceiro teste contou somente com a amostra da Citros_Mir concentrada e com titulações de 1:10000 dos anticorpos primário e secundário.

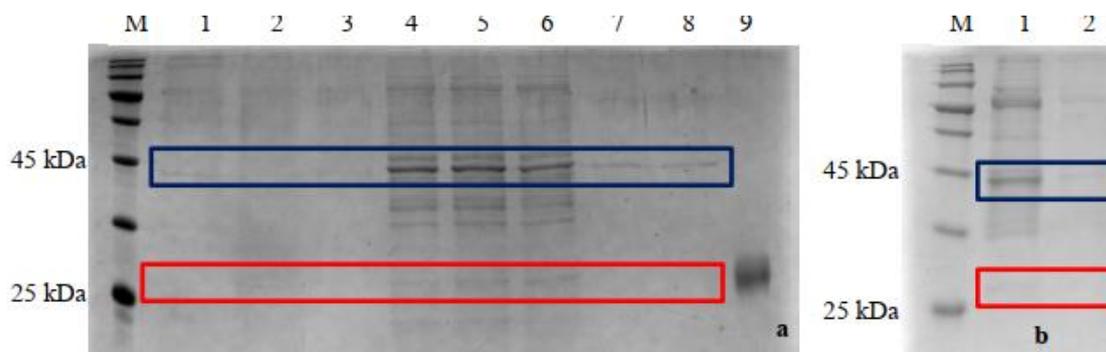


Figura 17 – Géis espelhos referentes à imunodeteção da proteína Citros_Mir. (a) 1- Controle X33 expresso em 96h, 2- controle pPICZαC expresso em 96h, 3- clone 9 não induzido (0h), 4- clone 9 expresso em 72h, 5- clone 9 expresso em 96h, 6- eluato 8 da purificação da proteína de interesse, 7- fração 25 mM I de imidazol coletada na purificação, 8- fração 25 mM II de imidazol coletada na purificação, 9- controle com proteína de tamanho conhecido (25kDa); (b) M- marcador de peso molecular de 180 kDa, 1- proteína Citros_Mir concentrada, 2- restante coletado na concentração da proteína. Quadrado azul: dímeros da proteína Citros_Mir (~45 kDa); Quadrado vermelho: monômeros da proteína Citros_Mir (26 kDa).

Em todos os testes realizados as bandas correspondentes à proteína Citros_Mir não foram marcadas. Ademais, houve o aparecimento de bandas inespecíficas ao longo de todas as amostras de proteínas aplicadas.

Testes adicionais vêm sendo realizados pelo grupo de pesquisa na tentativa de melhorar a detecção das proteínas pelo método de Western blot. A Figura 18 exibe a membrana do teste dois, com as colunas 1 e 2 sendo referentes à Citros_Mir. Nota-se uma quantidade relevante de bandas inespecíficas marcadas, além de uma membrana escurecida, o que foge do padrão desejado.

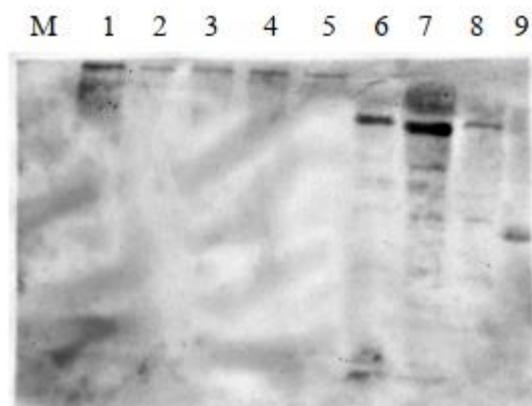


Figura 18 – Membrana Western blot revelada por quimioluminescência. M- Local do marcador de peso molecular, 1- Citros_Mir concentrada, 2- restante coletado do filtrado, 9- controle positivo na altura de 25 kDa. Nos demais números foram aplicadas outras proteínas trabalhadas no laboratório.

4.1.11 Expressão recombinante de Citros_Mir em células KM71H

Em relação à expressão da proteína recombinante em células KM71H, a transformação da construção pPICZ α C_Citros_Mir e do controle em células quimiocompetentes foi bem sucedida. Foram selecionadas 80 colônias da placa com maior concentração de Zeocina e expressas em pequena escala, considerando uma concentração final de 2% de metanol, determinado nos testes anteriores.

Os resultados foram analisados em SDS-PAGE 12% corado com azul de Comassie. Assim, é possível observar algumas bandas fracas próximas a 25 kDa no clone 3, que podem representar o monômero da proteína de interesse em 24h de expressão (Figura 19).

As análises realizadas nos testes anteriores com a célula X-33 demonstram que essas bandas podem corresponder a proteínas secretadas pela levedura, pois não foram detectadas pelas análises de Western blot realizadas com anticorpo anti his tag.

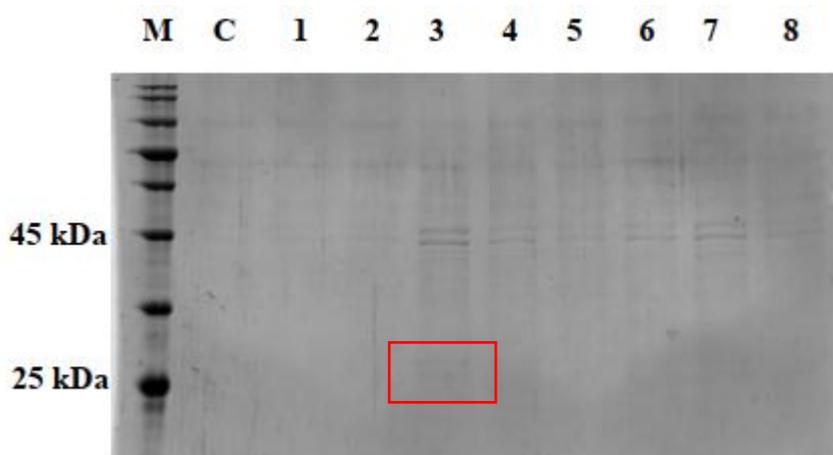


Figura 19 – Análise da expressão da proteína Citros_Mir em pequena escala em 24 horas. SDS-PAGE 15% corado com Azul de Comassie. M) marcador molecular; C) controle negativo do plasmídeo pPICZ α C vazio; 1 a 8) clones

4.2 Resultados da expressão em *Escherichia coli*

4.2.1 Clonagem do fragmento que codifica a proteína Citros_Mir em vetor de propagação pGEM-T

O resultado da amplificação do fragmento referente à sequência da Citros_Miros a partir do pGEM-T_Citros_Mir com os *primers* para *E. coli* foi positivo, como pode ser observado na Figura 20, com as bandas no tamanho de 705 pb. O resultado

da purificação do produto de PCR, correspondente ao inserto com a sequência da Citros_Mir, obteve uma concentração de 50 ng/μL.

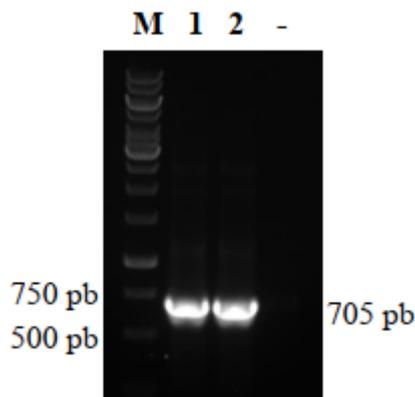


Figura 20 - Eletroforese em gel da amplificação do inserto que codifica a proteína Citros_Mir em PCR. M- marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen); 1 e 2 – produtos da amplificação; -) controle negativo.

O amplificado foi ligado no vetor de propagação pGEM-T novamente e a construção pGEM-T_Citros_Mir_2 foi transformada em células competentes JM109 de *E. coli*, resultando em colônias brancas e azuis. Foi realizado um PCR de colônia de duas colônias brancas, obtendo o resultado abaixo (Figura 21). As bandas correspondem ao tamanho do inserto, 705 pb. A partir disso, as colônias foram selecionadas para extração do DNA plasmidial pela miniprep, obtendo amostras com concentração de 150 ng/μL e 300 ng/μL.

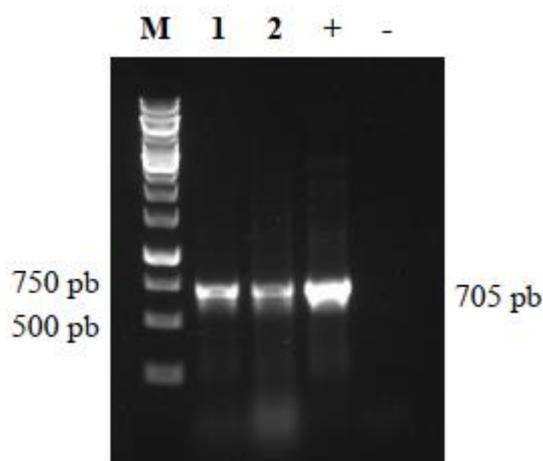


Figura 21 - Eletroforese em gel da PCR de colônia realizado a partir da transformação da construção pGEM-T_Citros_Mir_2 em *E. coli*. M- marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen); 1 e 2 – clones; +) controle positivo; -) controle negativo.

4.2.2 Construção do vetor de expressão pET-28a_Citros_Mir

O inserto de interesse foi obtido pela clivagem da construção pGEM-T_Citros_Mir_2 e subclonado no vetor de expressão pET-28a (Merck), obtendo-se a construção pPET-28a_Citros_Mir, a qual foi usada na transformação das células quimiocompetentes JM109 de *E. coli*. Seis colônias foram selecionadas para uma PCR de colônia (Figura 22) e a análise ocorreu por eletroforese em gel de agarose 1%, confirmando a presença do fragmento esperado (705 pb). Um dos clones positivos (colônia 1) foi selecionado para extração do DNA plasmidial.

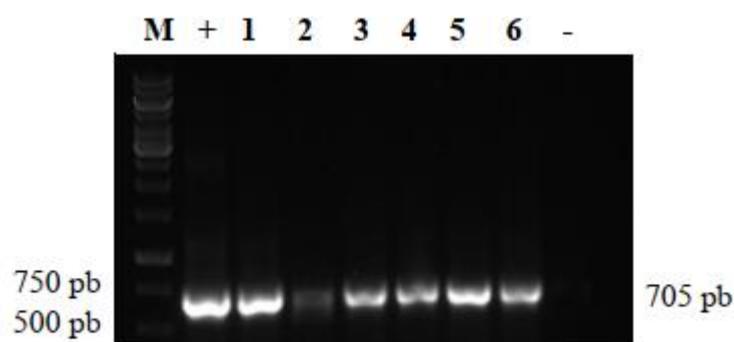


Figura 22 - Eletroforese em gel da PCR de colônia da transformação do pPET-28a_Citros_Mir em células competentes JM109. M) marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen); +) controle positivo; 1 a 6) produtos amplificados Citros_Mir; -) controle negativo.

4.2.3 Sequenciamento do vetor de expressão pET-28a_Citros_Mir

O produto da extração plasmidial do pET-28a_Citros_Mir do clone 1 foi enviado para sequenciamento. O sequenciamento contou com os primers: *Primer forward* do plasmídeo pET-28a (T7) (5' TAARACGACTCACTATAGGG '3); *Primer reverse* do plasmídeo pET-28a (T7) (5' GCTAGTTATTGCTCAGCG '3); Mirac_PET_Fw; e Mirac_PET_Rv.

Ao longo do alinhamento foi visto que algumas sequências substituem, deletam ou inserem bases, enquanto as demais mantêm sua sequência semelhante à sequência de interesse correspondente a Citros_Mir, sanando as dúvidas levantadas pelas sequências erradas. Entretanto, notou-se que os sequenciamentos acusaram uma troca de base T (timina) por uma base C (citosina), alterando a trinca TTG para CTG. Disso, analisou-se qual aminoácido essa trinca codificava, mostrando que ambas se referem ao aminoácido leucina.

O resultado do sequenciamento foi conclusivo, confirmando a sequência correta desejada, além de sua integridade e posição no vetor.

4.2.4 Transformação e Expressão do pET-28a_Citros_Mir em *E. coli*

No primeiro ensaio de expressão realizado utilizou-se uma concentração final de 0,4 mM de IPTG a temperatura de 37°C. A análise da expressão foi feita em SDS-PAGE 15% (Figura 23), no qual não foi visualizada a banda de expressão esperada.

Observando a Figura 23 é possível observar que não houve expressão recombinante da proteína Citros_Mir no teste realizado.

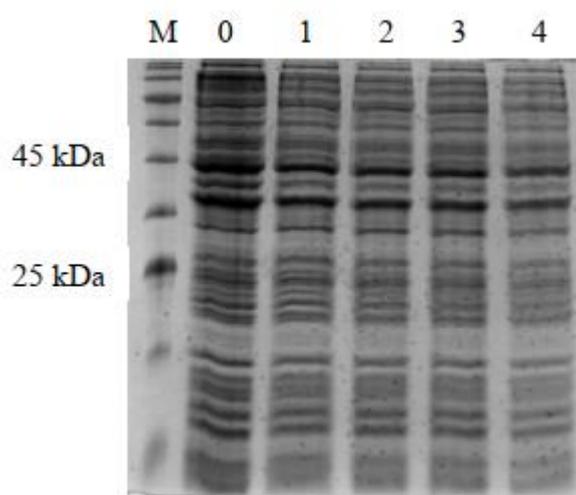


Figura 23 –SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3). M- Marcador de peso molecular, 180 kDa; 0- amostra não induzida; 1- uma hora de indução; 2- duas horas de indução; 3- três horas de indução; 4- quatro horas de indução.

Dado o resultado obtido no teste inicial, a concentração de IPTG e a temperatura foram alteradas. O segundo teste foi realizado a 37°C com 0,2 mM e 1,0 mM de IPTG (Figura 24a e 24b). O terceiro teste foi realizado a 30°C com 0,2 mM, 0,4 mM e 1,0 mM de IPTG (Figura 25a e 25b). O quarto teste foi realizado a 20°C com 0,2 mM, 0,4 mM e 1,0 mM de IPTG (Figura 26a e 26b).

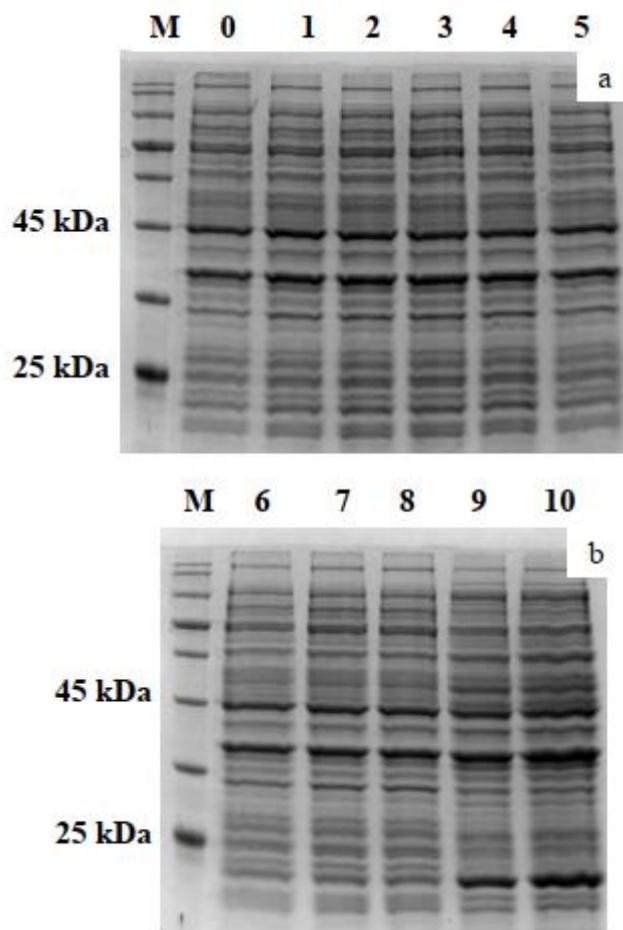


Figura 24 –SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do segundo teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3) realizado a 37 °C. a) contendo 0,2 mM de IPTG; b) contendo 1,0 mM de IPTG. M- marcador de peso molecular, 180 kDa; 0 - amostra não induzida; 1- uma hora de indução com 1,0 mM de IPTG; 2- uma hora de indução com 0,2 mM de IPTG; 3- duas horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 4- duas horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 5- três horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 6- três horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 7- quatro horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 8- quatro horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 9- indução *overnight* com 1,0 mM de IPTG; 10- indução *overnight* com 0,2 mM de IPTG.

Observando as figuras é possível assumir que não houve expressão recombinante da Citros_Mir em nenhum dos testes realizados, visto que não há diferenças entre as amostras induzidas e a não-induzida, tanto na região das bandas correspondente ao monômero (26kDa) quanto na região correspondente ao dímero (~45kDa).

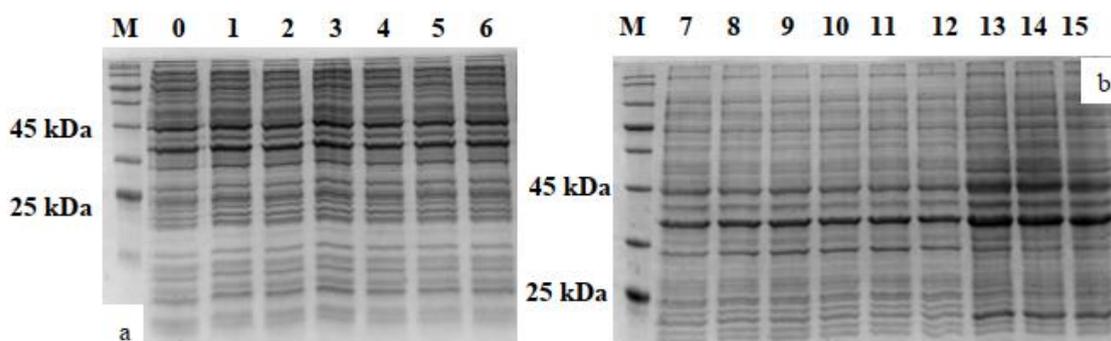


Figura 25 – SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do terceiro teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3) realizado a 30°C com 0,2 mM, 0,4 mM e 1,0 mM de IPTG. M- marcador de peso molecular, 180 kDa; 0) amostra não induzida; 1- uma hora de indução com 0,2 mM de IPTG; 2- uma hora de indução com 0,4 mM de IPTG; 3- uma hora de indução com 1,0 mM de IPTG; 4- duas horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 5- duas horas de indução com 0,4 mM de IPTG; 6- duas horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 7- três horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 8- três horas de indução com 0,4 mM de IPTG; 9- três horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 10- quatro horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 11- quatro horas de indução com 0,4 mM de IPTG; 12- quatro horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 13- indução *overnight* com 0,2 mM de IPTG; 14- indução *overnight* com 0,4 mM de IPTG; 15- indução *overnight* com 1,0 mM de IPTG.

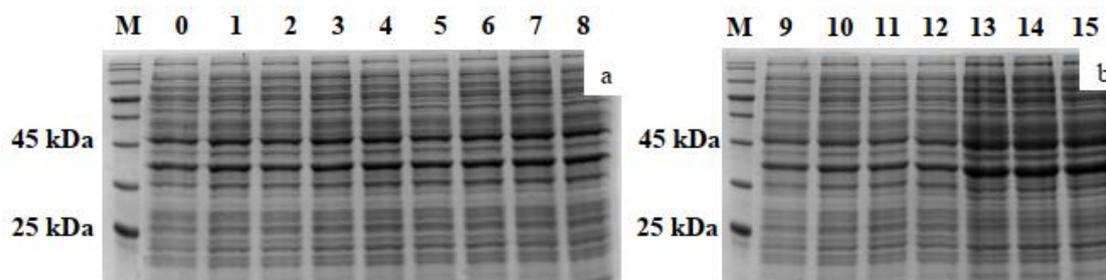


Figura 26 – SDS-PAGE 15% corado com Comassie azul do quarto teste de expressão da Citros_Mir em Rosetta (DE3) realizado a 20°C com 0,2 mM, 0,4 mM e 1,0 mM de IPTG. M- marcador de peso molecular, 180 kDa; 0) amostra não induzida; 1- uma hora de indução com 0,2 mM de IPTG; 2- uma hora de indução com 0,4 mM de IPTG; 3- uma hora de indução com 1,0 mM de IPTG; 4- duas horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 5- duas horas de indução com 0,4 mM de IPTG; 6- duas horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 7- três horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 8- três horas de indução com 0,4 mM de IPTG; 9- três horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 10- quatro horas de indução com 0,2 mM de IPTG; 11- quatro horas de indução com 0,4 mM de IPTG; 12- quatro horas de indução com 1,0 mM de IPTG; 13- indução *overnight* com 0,2 mM de IPTG; 14- indução *overnight* com 0,4 mM de IPTG; 15- indução *overnight* com 1,0 mM de IPTG.

4.5 Considerações finais e sugestões de melhorias para a expressão da Citros_Mir nos dois sistemas

Visto que a utilização dos sistemas de expressão heteróloga de *Pichia pastoris* e de *Escherichia coli* não foram eficientes na produção da proteína Citros_Mir nos testes realizados, a busca por outras metodologias e sistemas de expressão é interessante. Uma alternativa que deve ser considerada em testes futuros é a otimização dos códons, ou seja, modificar os códons dos aminoácidos que formam a proteína expressa na planta *Citrus paradise* para códons com maior pré-disposição de ocorrer na levedura e na bactéria em questão.

Sabe-se que o código genético é composto por 61 codons que codificam apenas 20 aminoácidos, ocorrendo códons sinônimos com trinca de nucleotídeos diferentes, mas que codificam o mesmo aminoácido (HERSHBERG and PETROV, 2008). A otimização de códons considera que cada espécie apresenta uma concentração própria de RNA transportador, ocasionando um viés na formação das trincas de códons que codificam determinados aminoácidos. Desse modo, para aumentar a expressão da proteína de interesse em um sistema de expressão diferente é interessante criar uma sequência de RNA mensageiro específica para o organismo que irá produzi-la, substituindo um códon menos frequente, ou raro, por um de maior incidência (GUSTAFSSON, GOVINDARAJAN and MINSHULL, 2004; HERSHBERG and PETROV, 2008).

Outra alternativa para expressar a proteína Citros_Mir seria explorar outras linhagens dos organismos testados. Como por exemplo, a linhagem Arctic Express (DE3) de *E. coli* expressa constitutivamente duas chaperonas de *Oleispira antarctica*, as quais são adaptadas ao frio, auxiliando significativamente no correto enovelamento de proteínas recombinantes produzidas ao se ligarem a elas. Tais chaperonas, Cpn10 e Cpn60, com cerca de 10 e 57 kDa respectivamente, são codificadas pelo plasmídeo pACYC, o qual também apresenta um gene que confere à linhagem resistência ao antibiótico Gentamicina; elas se encontram especialmente ativas em temperaturas entre 4 C e 12 C (FERRER et al., 2003). O uso de baixas temperaturas durante a expressão heteróloga e a co-expressão com chaperonas pode favorecer a estabilidade, a solubilidade e o correto enovelamento proteicos (JOSEPH et al., 2015), mostrando-se relevante aos interesses deste trabalho e que podem ser realizados para dar continuidade a esses estudos futuramente.

Outra possível alteração consiste em estender o tempo de indução da expressão em *Pichia pastoris* para além de 144 horas totais, visto que Menendez-Rey (2021) obteve resultados positivos na expressão da proteína recombinante miraculina de *Synsepalum dulcificum* no mesmo sistema, utilizando um tempo de indução de até 168 horas, tempo no qual obteve o melhor resultado de expressão em todos os testes realizados. Em sua pesquisa também utilizou a cepa WT BG10 e uma concentração final de metanol absoluto de 0,5%. A expressão foi confirmada no estudo pela análise Western Blot utilizando anticorpos específicos anti-miraculina.

Finalmente, análises futuras podem ser realizadas afim de identificar outras proteínas semelhantes à miraculina encontradas em diferentes variações de citros, pois, o presente trabalho se baseou na identificação preliminar somente da miraculina de *Citrus paradise*. Há relatos na literatura de grupos de pesquisa que realizam a busca de genes correspondentes à miraculina em diversas espécies vegetais, como é o caso do estudo de Souza (2015), no qual foram identificados genes miraculina em *Citrus sinensis* através de análises *in silico*, observando 16 genes no cultivar “Valência” e 15 genes no cultivar “Pera”. Os dados desse estudo ampliam as possibilidades de novos testes de expressão recombinante envolvendo as miraculinas de citros.

6. CONCLUSÃO

A expressão da proteína em sistema bacteriano utilizando células *Escherichia coli* (DE3) foram testadas em diferentes condições de crescimento considerando três temperaturas diferentes 20, 30 e 37 °C. No mesmo sistema, três concentrações de IPTG (0,2; 0,4 e 1,0 mM) foram analisadas, porém os resultados mostraram que não houve expressão quando comparado com o controle não induzido. Duas linhagens da levedura *Pichia pastoris* foram testadas na tentativa de expressar a proteína de interesse, a linhagem X-33 e a linhagem KM71H. Os protocolos de expressão foram adaptados após os testes mostrarem que a levedura apresenta uma melhor expressão de suas proteínas em meio de cultivo contendo 2% de concentração de metanol. Os resultados apresentados mostraram que a expressão da Citros_Mir nessas duas linhagens de levedura não exibiram diferenças significativas entre as bandas dos clones e dos controles não induzidos. Por fim, conclui-se que não se obteve sucesso na expressão da proteína recombinante Citros_Mir nos sistemas utilizados. Sugere-se que novos testes,

utilizando outros sistemas de expressão, alteração nas condições de indução e, até mesmo, otimização dos códons, sejam considerados.

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA-COTA, S. J.; AGUILAR-MEDINA, E.; RAMOS-PAYÁN, R.; RUIZQUINÓNEZ, A. K.; ROMERO-QUINTANA, J. G.; MONTES-AVILA, J.; RENDÓN MALDONADO, J. G.; SÁNCHEZ LÓPEZ, A.; CENTURIÓN, D.; OSUNA-MARTÍNEZ, U. Histopathological and biochemical changes in the development of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-sucrose diet at different times. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** v. 97, n.1, p. 23-36, 2019.

ANDRADE, A. M.; MARTINS, M. B.; RODRIGUES, J. F.; COELHO, S. B.; PINHEIRO, A. C. M.; BASTOS, S. C. Effect of different quantities of miracle fruit on sour and bitter beverages. **LWT – Food Science and Technology**. v. 99, p. 89-97, 2019.

ANGGIANI, M.; HELIANTI, I.; ABINAWANTO, A. Optimization of methanol induction for expression of synthetic gene *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris*. **AIP Publishing**. 2018

BACHCHU, M. A. A. et al. Functional Expression of Miraculin, a Taste-modifying Protein, in Transgenic Miyagawa Wase Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal Of The Korean Society For Applied Biological Chemistry**, [s.i.], v. 54, n. 1, p.24-29, 28 fev. 2011.

BELTRAMI, M. C.; DÖRING, T.; LINDNER, J. D. Sweeteners and sweet taste enhancers in the food industry. **Food Science and Technology**. v. 38, n. 2, p.181-187, 16 abr. 2018.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. OMS divulga nova diretriz sobre o uso de adoçantes. 16 de maio de 2023. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/oms-divulga-nova-diretriz-sobre-o-uso-de-adoçantes>>.

BREDA, J.; JEWELL, J.; KELLER, A. The Importance of the World Health Organization Sugar Guidelines for Dental Health and Obesity Prevention. **Caries Research**. v. 53, n. 2, p. 149-152, 7 ago. 2018.

BROUWER, J. N.; VAN DER WEL, H.; FRANCKE, A.; HENNING, G. J. Miraculin, the Sweetness-inducing Protein from Miracle Fruit. **Nature**. v. 220, n. 5165, p.373-374, out. 1968.

CASTRO-VAZQUEZ, L.; ALANON, M. E.; RODRIGUEZ-ROBLEDO, V.; PEREZCOELLO, M. S.; HERMOSIN-GUTIERRES, I.; DIAZ-MAROTO, M. C.; JORDAN, J.; GALINDO, M. F.; ARROYOJIMENEZ, M. M. Bioactive Flavonoids, Antioxidant Behaviour, and Cytoprotective Effects of Dried Grapefruit Peels (*Citrus paradisi* Macf.). **Hindawi Limited: Oxidative Medicine And Cellular Longevity**. v. 2016, p. 1-12, 2016.

CHACÓN, J. R. L. Miracle Fruit - Miracle Berry (*Synsepalum Dulcificum* Daniell): Basic Aspects for Contextualization. **Journal Of Investment And Management**. v. 4, n. 6, p.330- 333, 2015.

Characterization of the Tastemodifying Protein, Miraculin. **The Journal Of Biological Chemistry**. [s.i.], v. 264, n. 12, p. 6655-6659, 1989.

CHOI, S. E.; GARZA, J. Effects of diferent miracle fruit products on the sensory characteristics of different types of sour foods descriptive analysis. **Journal of Foos Science**. vol. 85, p. 36-49, 2020.

CLARKE, S. **Essential Chemistry for Aromatherapy**. 2. ed. Churchill Livingstone, 320 p., 2008.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**. v.16, p. 23-52, 2000.

CREGG, J.M. *Pichia* protocols. Totowa, **NJ: Humana Press**; 2007.

DENG, W.; LIU, K.; CAO, S.; SUN, J.; ZHONG, B.; CHUN, J. Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Grapefruit Essential Oil Prepared by Molecular Distillation. **Molecules**. v. 25, n. 1, p.1-12, 5 jan. 2020.

DINICOLANTONIO, J. J.; LUCAN, S. C. The wrong white crystals: not salt but sugar as aetiological in hypertension and cardiometabolic disease: not salt but sugar as aetiological in hypertension and cardiometabolic disease. **Open Heart**. v. 1, n. 1, p. 1-8, nov. 2014.

DUBOIS, G. E.; PRAKASH, I. Non-Caloric Sweeteners, Sweetness Modulators, and Sweetener Enhancers. **Annual Review Of Food Science And Technology**. v. 3, n. 1, p.353- 380, 10 abr. 2012.

FAGHERAZZI, G.; VILIER, A.; SARTORELLI, D. S.; LAJOUS, M.; BALKAU, B.; CLAVELCHAPELON, F. Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epidémiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale–European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. **The American Journal Of Clinical Nutrition**. v. 97, n. 3, p. 517-523, 30 jan. 2013.

FAZILAH, N. F.; ARIFF, A. B.; KHAYAT, M.; HALIM, M. Anti-diabetic properties of *Synsepalum dulcificum* and its potential inclusion in functional yogurt. **Iop Conference Series: Materials Science and Engineering**. v. 716, p. 12004-12012, 11 fev. 2020.

FERRER, M.; CHERNIKOVA, T.; YAKIMOV, M. *et al.* Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. **Nature Biotechnol.** v.21, n.11, p. 1266–1267, 2003.

FUJIOKA, K.; GREENWAY, F.; SHEARD, J.; YING, Y.. The Effects of Grapefruit on Weight and Insulin Resistance: Relationship to the Metabolic Syndrome. **Journal Of Medicinal Food**. v. 9, n. 1, p.49-54, mar. 2006.

GIBBS, B. F.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. Sweet and taste-modifying proteins: A review. **Nutrition Research**. v. 16, n. 9, p. 1619-1630, set. 1996.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2012.

GRINNA, L. S.; TSCHOPP, J. F. Size Distribution and General Structural Features of N-Linked Oligosaccharides from the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*. **Yeast**. v. 5, p. 107- 115, 1989.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**. v. 22, n. 7, p. 346-353, 2004.

HERSHBERG, R.; PETROV, D. A. Selection and Codon Bias. **Annual Review of Genetics**. v. 42, p. 287-299, 2008.

HIRAI, T.; SATO, M.; TOYOOKA, K.; SUN, H.; YANO, M.; EZURA, H. Miraculin, a tastemodifying protein is secreted into intercellular spaces in plant cells. **Journal Of Plant Physiology**. v. 167, n. 3, p.209-215, fev. 2010.

IGETA, H.; TAMURA, Y.; NAKAYA, K.; NAKAMURA, Y.; KURIHARA, Y. Determination of disulfide array and subunit structure of taste-modifying protein, miraculin. **Biochimica et Biophysica**. v. 1079, n. 3, p. 303-307, 1991.

INGLETT, G. E.; DOWLING, B.; ALBRECHT, J. J.; HOGLAN, F. A.. Taste-Modifying Properties of Miracle Fruit (*Synsepedum dukificum*). **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**. v. 13, n. 3, p. 284-287. 03 jun. 1965.

ITO, K.; ASAKURA, T.; MORITA, Y.; NAKAJIMA, K.; KOIZUMI, A.; SHIMIZUIBUKA, A.; MASUDA, K.; ISHIGURO, M.; TERADA, T.; MARUYAMA, J.; KITAMOTO, K.; MISAKA, T.; ABE, K. Microbial production of sensory-active miraculin. **Biochemical And Biophysical Research Communications**. v. 360, n. 2, p.407-411, ago. 2007.

ITO, K.; SUGAWARA, T.; KOIZUMI, A.; NAKAJIMA, K.; SHIMIZU-IBUKA, A.; SHIROSHI, M.; ASADA, H.; YURUGI-KOYASHI, T.; SHIMAMURA, T.; ASAKURA, T.; MASUDA, K.; ISHIGURO, M. MISAKA, T.; IWATA, S.; KOBAYASHI, T.; ABE, K. Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculin. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**. v. 1800, n. 9, p.986-992, set. 2010.

JOHNSON, R. J.; SEGAL, M. S.; SAUTIN, Y.; NAKAGAWA, T.; FEIG, D. I.; KANG, D.; GERSCH, M. S.; BENNER, S.; SANCHEZ-LOZADA, L. G. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. **The American Journal Of Clinical Nutrition**. v. 86, p.899-906, jan. 2007.

JOSEPH, B. C.; PICHAIMUTHU, S.; SRIMEENAKSHI, S.; MURTHY, M.; SELVAKUMAR, K.; GANESAN, M.; MAJUNATH, S.R. Na Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Cell Science and Therapy**. v.6, n.5, 2015.

JOURDAN, P. S.; MCINTOSH, C. A.; MANSELL, R. L.. Naringin Levels in Citrus Tissues. **Plant Physiology**. v. 77, n. 4, p.903-908, 1 abr. 1985.

KAJIURA, H.; HIWASA-TANASE, K.; EZURA, H.; FUJIYAMA, K. Comparison of the Nglycosylation on recombinant miraculin expressed in tomato plants with native miraculin. **Plant Biotechnology**. v. 35, n. 4, p. 375-379, 25 dez. 2018.

KAJIURA, H.; HIWASA-TANASE, K.; EZURA, H.; FUJIYAMA, K. Effect of fruit maturation on N-glycosylation of plant-derived native and recombinant miraculin. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 178, p. 70-79, 2022.

KAKLEAS, K.; CHRISTODOULI, F.; KARAVANAKI, K. Nonalcoholic fatty liver disease, insulin resistance, and sweeteners: a literature review: a literature review. **Expert Review Of Endocrinology & Metabolism**. p. 1-11, 26 mar. 2020.

KANT, R. Sweet proteins: Potential replacement artificial low calorie sweeteners. **Nutrition Journal**. Bangalore, p. 1-6. 9 fev. 2005.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal Of Cellular Physiology**. p. 1-15, 14 fev. 2020.

KHATRI, N. K.; HOFFMANN, F. Impact of Metanol Concentration on Secreted Protein Production in Oxygen-limited Cultures of Recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**. v.93, n.5, p. 871-879, 2006.

KOIZUMI, A.; TSUCHIYA, A.; NAKAJIMA, K.; ITO, K.; TERADA, T.; SHIMIZUIBUKA, A.; BRIAND, L.; ASAKURA, T.; MISAKA, T.; ABE, K. Human sweet taste receptor mediates acidinduced sweetness of miraculin. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**. v. 108, n. 40, p.16819-16824, 26 set. 2011.

KURIHARA, K.; BEIDLER, L. M.. Taste-Modifying Protein from Miracle Fruit. **Science**. v. 161, n. 3847, p.1241-1243, 20 set. 1968.

KURIHARA, Y.. Characteristics of antisweet substances, sweet proteins, and sweetness-inducing proteins. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**. v. 32, n. 3, p.231-252, jan. 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n.5259, p.680-685, 1970.

MATSUYAMA, T.; SATOH, M.; NAKATA, R.; AOYAMA, T.; INOUE, H. Functional Expression of Miraculin, a Taste-Modifying Protein in Escherichia Coli. **Journal Of Biochemistry**. v. 145, n. 4, p.445-450, 3 jan. 2009.

MENENDEZ-REY, A. Actividad biológica inmunogénica de Synzepam dulcificum para el desarrollo de alimentos funcionales. **Tesis Doctoral**. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación. Universidad Politécnica de Madrid. p. 186, 2021.

MOREIRA, A. R. O.; BATISTA, R. F. L.; LADEIRA, L. L. C.; THOMAZ, E. B. A. F.; ALVES, C. M. C.; SARAIVA, M. C.; SILVA, A. M.; BRONDANI, M. A.; RIBEIRO, C. C. C. Higher sugar intake is associated with periodontal diseases in adolescents. **Clinical Oral Investigations**. v. 25, p. 983-991, 2021.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K. Antibacterial activity of grapefruit (Citrus paradisi) peel extracts. **European Food Research And Technology**. v. 213, n. 6, p.484-487, 1 nov. 2001.

NEIERS, F.; NAUMER, C.; KROHN, M.; BRIAND, L. The recent development of sweet tasting brazzein and its potential industrial applications. **Springer International Publishing Switzerland**. p. 1-20, 2016.

OHKURA, S.; HORI, M.; SAITOH, K.; OKUZAWA, T.; OKAMOTO, I.; FURUKAWA, N.; SHIMIZUIBUKA, A. Structural and functional analysis of miraculin-like protein from Vitis vinifera. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**. v. 1866, n. 11, p. 1125-1130, nov. 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAN). **OMS recomenda que os países reduzam o consumo de açúcar entre adultos e crianças.** 2015. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4783:osecomenda-que-os-paises-reduzam-o-consumo-de-acucar-entre-adultosecriancas&Itemid=820> Acesso em: 22 jan. 2020.

ORTUÑO, A.; BAIDEZ, A.; GOMEZ, P.; ARCAS, M. C.; PORRAS, I.; GARCIA-LIDON, A.; DEL RIO, J. A. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**. v. 98, n. 2, p.351-358, jan. 2006.

PADMANABHAN, S., BANERJEE, S., MANDI, N. Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives. *Molecular Cloning - Selected Applications in Medicine and Biology*, Prof. Gregory Brown (Ed.), ISBN: 978-953-307-398-9, **InTech**. 2011.

PALADINO, A.; COLONNA, G.; FACCHIANO, A. M. Molecular modelling of miraculin: Structural analyses and functional hypotheses. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.i.], v. 367, n. 1, p.26-32, fev. 2008.

PALAVRA, N. C.; LUBOMSKI, M.; FLOOD, V. M.; DAVIS, R. L.; SUE, C. M. Increased Added Sugar Consumption Is Common in Parkinson's Disease. **Frontiers in Nutrition**. v. 8, 2021.

PARK, Y.; HAN, J.; LEE, H.; HO, T.; PARK, S. Production of recombinant miraculin protein in carrot callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Springer. v. 145, p. 615-623, 2021.

PARK, Y.; HAN, J.; LEE, H.; JUNG, Y.; MURTHY, H. N.; PARK, S. Large-scale production of recombinant miraculin protein in transgenic carrot callus suspension cultures using air-lift bioreactors. **AMB Express**. v. 10, n. 140, p. 1-7, 2020.

POIRIER, N.; ROUDNITZKY, N.; BROCKHOFF, A.; BELLOIR, C.; MAISON, M.; THOMAS-DANGUIN, T.; MEYERHOF, W.; BRIAND, L. Efficient Production and Characterization of the Sweet-Tasting Brazzein Secreted by the Yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 39, p. 9807–9814, 18 set. 2012.

POTUKUCHI, A.; ADDEPALLY, U.; UPADRASHTA, M.; NAGALLA, B.; MANCHALA, R. High sucrose diet feeding aggravates age related changes in oxidative stress and antioxidant status of WNIN/Gr-Ob obese rats. **International Journal of Medical and Health Sciences**, v. 6, n.3, p. 144-150, 2017.

PRIYA, K.; GUPTA, V. R. M.; SRIKANTH, K.. Natural Sweeteners: A Complete Review. **Journal Of Pharmacy Research**. v. 4, n. 7, p. 2034-2039. 12 abr. 2011.

RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. A Review of the Effects of Citrus paradisi (Grapefruit) and Its Flavonoids, Naringin, and Naringenin in Metabolic Syndrome. **Bioactive Food As Dietary Interventions For Diabetes**. p.515-543, 2019.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York., v. 1, 2001.

SANEMATSU, K.; KITAGAWA, M.; YOSHIDA, R.; NIRASAWA, S.; SHIGEMURA, N.; NINOMIYA, Y. Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by miraculin. **Scientific Reports**. vol. 6, n. 1, p. 1-7, 2016.

SOUZA, A. F. Seleção *in silico* de genes miraculina de *Citrus sinensis* candidatos a ensaios funcionais. Monografia. Unidade Acadêmica de Biologia e Química. Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Cuité, PB. p. 57, 2015.

SPRIESTERSBACH, A.; KUBICEK, J.; SCHAFFER, F.; BLOCK, H.; MAERTENS, B. Purification of His-Tagged Proteins. **Laboratory Methods in Enzymology**. v. 559, p. 115, 2015.

STRUCTURAL GENOMICS CONSORTIUM. Protein production and purification. **Nature Methods**. v. 5, n. 2, p. 135-146, 2008.

SUGAYA, T.; YANO, M.; SUN, H.; HIRAI, T.; EZURA, H. Transgenic strawberry expressing the taste-modifying protein miraculin. **Plant Biotechnology**. v. 25, p. 329-333. 14 maio 2008.

SUN, H.; CUI, M.; MA, B.; EZURA, H. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. **Febs Letters**. v. 580, n. 2, p.620-626, 3 jan. 2006.

SUN, H.; KATAOKA, H.; YANO, M.; EZURA, H. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. **Plant Biotechnology Journal**. v. 5, n. 6, p.768-777, nov. 2007.

SUNGA,A.J., TOLSTORUKOV, I & CREGG J.M. Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Res.** v. 8, p. 870–876, 2008

SWAMY, K. B.; HADI, S. A.; SEKARAN, M.; PICHIKA, M. R. The clinical effects of *Synsepalum dulcificum*: a review. **Journal Of Medicinal Food**. v. 17, n. 11, p. 1165-1169, 2014.

SWIADER, K.; WEGNER, K.; PIOTROWSKA, A.; TAN, F.; SADOWSKA, A. Plants as a source of natural high-intensity sweeteners: a review. **Journal of Applied Botany and Food Quality**. vol. 92, p. 160-171, 2019.

TAFAZOLIA, S.; VOA, T. D.; ROBERTSA, A.; RODRIGUEZB, C.; VIÑASB, R.; MADONNAC, M. E.; CHIANGC, Y.; NORONHAC, J. W.; HOLGUINC, J. C.; RYDERC, J. A.; PERLSTEIN, A. Safety assessment of miraculin using in silico and in vitro digestibility analyses. **Food and Chemical Toxicology**. vol. 133, p. 1-10. 2019.

TAFAZOLIA, S.; VOA, T. D.; ROBERTSA, A.; RODRIGUEZB, C.; VIÑASB, R.; MADONNAC, M. E.; CHIANGC, Y.; NORONHAC, J. W.; HOLGUINC, J. C.; RYDERC, J. A.; PERLSTEIN, A. Corrigendum to “Safety assessment of miraculin using in silico and in vitro digestibility analyses” [Food Chem. Toxicol. 133 (2019 Nov) 110762]. **Food and Chemical Toxicology**. vol. 137, p. 1-2. 2020.

THEERASILP, S.; HITOTSUYA, H.; NAKAJIQ, S.; NAKAYAQ, K.; NAKAMURAQ, Y.; KURIHARALL, Y. Complete Amino Acid Sequence and Structure.

TURCK, D.; CASTENMILLER, J.; HENAUW, S. D.; HIRSCH-ERNST, K. I.; KEARNEY, J.; MACIUK, A.; MANGELSDORF, I.; MCARDLE, H. J.; PELAEZ, A. N. C.; PENTIEVA, K.; SIANI, A.; Thies, F.; TSABOURI, S.; VINCETI, M.; CUBADDA, F.; FRENZEL, T.; HEINONEN, M.; MARCHELLI, R.; NEUHÄUSER-BERTHOLD, M.; POULSEN, M.; MARADONA, M. P.; SCHLATTER, J. R.; LOVEREN, K.; MATIJEVIC, L.; KNUTSEN, H. K. Safety of dried fruits of *Synsepalum dulcificum* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA Journal**. v. 19, n. 6, 2021.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZALVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**. v. 19, n. 12, p.1130- 1138, dez. 2008.

WAUGH, D. S. Making the most of affinity tags. **TRENDS in Biotechnology**. v. 23, n. 6, p. 316-320, 2005.

WEIHRAUCH, M. R.; DIEHL, V. Artificial sweeteners: do they bear a carcinogenic risk?. **Annals Of Oncology**. v. 15, n. 10, p.1460-1465, out. 2004.

YEH, S. H. H.; SHIE, F. S.; LIU, H. K.; YAO, H. H.; KAO, P. C.; LEE, Y. H.; CHEN, L. M.; HSU, S. M.; CHAO, L. J.; WU, K. W.; SHIAO, Y. J.; TSAY, H. J. A high-sucrose diet aggravates Alzheimer's disease pathology, attenuates hypothalamic leptin signaling, and impairs foodanticipatory activity in APP^{sw}/PS1^{dE9} mice. **Neurobiology of Aging**, v. 90, p. 60-74, 2020.

ZHANG, X.; YAN, T.; HUANG, Y.; MA, Z.; LIU, X.; ZOU, B.; SUN, C. Q. Mediating relaxation and polarization of hydrogen-bonds in water by NaCl salting and heating. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 16, n. 45, p. 24666-24671, 2014.