



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**“Desenvolvimento de um sistema de produção recombinante de uma cistatina em uma linhagem industrial de *Sacharomyces cerevisiae*”.**

**Darlan Gonçalves Nakayama**

**São Carlos, 2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**“Desenvolvimento de um sistema de produção recombinante de uma cistatina em uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae*”.**

**Darlan Gonçalves Nakayama**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: genética e evolução.**

**São Carlos, 2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

N163ds

Nakayama, Darlan Gonçalves.

Desenvolvimento de um sistema de produção recombinante de uma cistatina em uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* / Darlan Gonçalves Nakayama. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Engenharia genética. 2. Fermentação. 3. Expressão heteróloga. 4. Levedos. 5. Canacistatina. I. Título.

CDD: 575.10724 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Dissertação de Mestrado de **DARLAN GONÇALVES NAKAYAMA**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

  
.....

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

  
.....

Profa. Dra. Daniela Morilha Neo Justino

  
.....

*“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”.*

*Confúcio*

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a um grande amigo que recentemente nos deixou indo habitar, com certeza, planos superiores. Guardarei em minha memória os excepcionais momentos de convívio, as conversas descontraídas, as disputas de carteados e as nossas discussões futebolísticas. Pessoa extraordinária que deixou saudades e boas lembranças no coração de todos os seus amigos e familiares. Um brinde ao meu eterno amigo Dirceu Vicentin!*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva pela oportunidade de iniciar minha carreira científica em seu laboratório e pela aprendizagem adquirida ao longo destes anos que muito contribuirá em minha carreira profissional.*

*A Profa. Dra. Andréa Soares da Costa Fuentes, pela orientação, apoio, incentivo, paciência e confiança em mim depositada.*

*A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), pela ajuda, amizade e solidariedade em todos os momentos possíveis.*

*A Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini e a todos os pesquisadores do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), em especial Ana Paula Bassi, que me auxiliaram na realização deste trabalho.*

*A todos os meus amigos, a todos os moradores e agregados da República Auto Posto!*

*A todos que direta ou indiretamente me acompanharam e auxiliaram na conclusão deste projeto.*

*A minha família que sempre me apoiou, acreditou e tornou tudo isso possível. Obrigado pela confiança e carinho incondicionais depositados em mim!*

*E a Deus por iluminar todos os meus passos ao longo desta jornada!*

## RESUMO

*Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais importante usado no processo de fermentação alcoólica. Uma linhagem de *S. cerevisiae* amplamente utilizado para produzir álcool no Brasil é a PE-2, devido à sua alta capacidade de fermentação e persistência no sistema. Neste trabalho utilizou-se esta linhagem industrial de levedura como um sistema de expressão de proteínas de interesse biotecnológico. A proteína escolhida como modelo para este sistema foi a CaneCPI-1, uma cistatina de cana-de-açúcar que possui ação inseticida. Inicialmente, foi realizada a construção de um plasmídeo contendo o gene que codifica para a proteína CaneCPI-1 e este foi utilizado para transformar células da levedura *S.cerevisiae* linhagem PE-2. Posteriormente foram realizados sucessivos ciclos de fermentação (5 ciclos) com esta levedura transformada e as células fermentadas foram submetidas a análises de expressão da proteína CaneCPI-1. Foi possível purificar a proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Anticorpo policlonal anti-CaneCPI-1 e anticorpo monoclonal anti-His-Tag foram capazes de imunodetectar a proteína purificada e no extrato proteico bruto do último ciclo fermentativo. Ensaio da atividade inibitória mostraram que a CaneCPI-1 purificada foi capaz de inibir a atividade hidrolítica da papaína. A utilização da linhagem transformada não afetou a eficiência do processo fermentativo durante os quatro primeiros ciclos. A produção da CaneCPI-1 em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* ao longo do processo fermentativo se mostrou viável, abrindo-se novas perspectivas para a produção de qualquer proteína de aplicações biotecnológicas durante o processo de fermentação alcoólica.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2, caneCPI-1, fermentação, sistema de expressão.



## ABSTRACT

*Saccharomyces cerevisiae* is the most important microorganism used in alcoholic fermentation process. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* widely used to produce alcohol in Brazil is the PE-2, due to its high fermentation capacity. The goal of this study was to develop an expression system for recombinant proteins using the industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2. The protein chosen to be used as a model for this system was the Cane-CPI-1, an inhibitor of cysteine protease. Initially the construction of plasmids containing CaneCPI-1 gene was performed and yeast cells were transformed with pYADE4-CaneCPI-1 construction. The transformed strain was submitted to expression analyses during batch fermentative process with cell recycle. The recombinant protein was expressed in yeast cells and it was possible to purify the recombinant protein by affinity chromatography on nickel column. This purified protein was immunodetected using a polyclonal anti-CaneCPI-1 antibody and monoclonal anti His-Tag antibody, which were also able to detect the CaneCPI-1 in a crude extract from *Saccharomyces cerevisiae* cells. Assays of inhibitory activity performed with the purified CaneCPI-1 revealed its ability to inhibit the catalytic activity of a cysteine proteinase. This study showed that the use of transformed strain did not affect the fermentation process and that the PE-2 industrial strain of *S. cerevisiae* can be a viable expression system for recombinant protein production and open perspectives for production of any protein of biotechnological applications during fermentation alcoholic process.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2, fermentation, cystatin, CaneCPI-1, and recombinant expression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema da interação cistatina – cisteíno peptidase.....	21
<b>Figura 2.</b> Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da CaneCPI-1.....	24
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
<b>Figura 4.</b> Plasmídeo pYADE4 utilizado como vetor de expressão.....	32
<b>Figura 5.</b> Análise de expressão, purificação e imunodeteccção da CaneCPI-1 recombinante produzida em células de <i>S. Cerevisiae</i> PE-2.....	47
<b>Figura 6.</b> Análises de expressão e imunodeteccção da proteína recombinante em células de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 transformadas ao longo dos ciclos fermentativos.....	48
<b>Figura 7.</b> Inibição da atividade enzimática da papaína pela adição de CaneCPI-1 purificada.....	49
<b>Figura 8.</b> Análises fermentativas.....	52
<b>Figura 9.</b> Células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas com DNA total extraído de células de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 transformadas e <i>screening</i> por PCR de colônia.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Viabilidade celular durante o processo de fermentação alcoólica por <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	50
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°Brix teor de sólidos solúveis em porcentagem na solução

°C graus Celsius

Abs absorvância

ART açúcares redutores totais

cDNA DNA complementar

DNA ácido desoxirribonucléico

DNS ácido 3,5 dinitrossalicílico

dNTPs desoxirribonucleotídeos trifosfato

DO densidade óptica

DTT ditioneitol

EDTA ácido etileno-diamino-tetra-acético

g grama

GRAS generally regarded as safe – geralmente considerado seguro

h hora

IPTG isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

Kb quilobase

$K_i$  constante de inibição

M molar

mA miliampéres

mg miligrama

min minuto

mL mililitro

mRNA RNA mensageiro

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

ng nanograma

nm nanômetros

nt nucleotídeo(s)

ORF *open reading frame* – fase aberta de leitura

pb pares de bases

PBS solução salina tamponada com fosfato

PCR *Polimerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

pH potencial de hidrogênio

RNA ácido ribonucléico

rpm rotações por minuto

s segundo

SDS-PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato

U unidade enzimática

UV ultravioleta

V volts

YPD *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar* extrato de levedura peptona dextrose

Z-Phe-Arg-MCA carbobenzoxycarbonil-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina

$\mu$ F microfaraday

$\mu$ g micrograma

$\mu$ L microlitro

$\mu$ m micrômetro

$\mu$ M micromolar

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Enzimas proteolíticas.....	15
1.1.1. Cisteíno peptidases.....	16
1.1.1.1. Regulação da atividade de cisteíno peptidases.....	18
1.2. Cistatinas.....	19
1.2.1. Fitocistatinas.....	22
1.3. Características da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
1.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema de produção de proteínas recombinantes.....	27
1.3.2. Produção de cistatinas da cana-de-açúcar em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
1.3.2.1. Linhagem industrial PE-2 da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
1.3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no processo de fermentação alcoólica.....	29
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Cepas e plasmídios.....	34
3.2. Construção do vetor de expressão.....	35
3.3. Transformação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
3.4. Seleção dos transformantes.....	37
3.5. Ensaios fermentativos.....	37
3.5.1. Clarificação do caldo de cana.....	37
3.5.2. Meio de multiplicação.....	38
3.5.3. Meio de fermentação.....	38
3.5.4. Propagação de células para obtenção do inóculo.....	38
3.6. Processo fermentativo em batelada simples com reciclo celular.....	38
3.6.1. Obtenção da proteína recombinante via lise celular.....	39
3.7. Análises fermentativa.....	39
3.7.1. Viabilidade celular.....	39
3.7.2. Análise de pH.....	40
3.7.3. Determinação de °Brix.....	40
3.7.4. Determinação de açúcares redutores totais (ART).....	40
3.7.5. Determinação da concentração de etanol durante o processo fermentativo.....	41
3.7.6. Determinação da eficiência fermentativa.....	41
3.8. Purificação da cistatina expressa na linhagem industrial <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	42
3.9. Imunodeteção da proteína recombinante CaneCPI-1.....	42
3.10. Ensaio de atividade da proteína recombinante.....	43
3.11. Isolamento do vetor pYADE4_CaneCPI-1 a partir da cepa transformada.....	44

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Expressão e purificação da CaneCPI-1 .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2. Imunodeteccção da CaneCPI-1.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3. Ensaio fermentativo.....</b>	<b>47</b>
<b>4.4. Ensaio de atividade inibitória.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5. Análises fermentativas.....</b>	<b>50</b>
<b>4.6. Isolamento do vetor pYADE4_CaneCPI-1 a partir da cepa transformada.....</b>	<b>55</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo A – Análises fermentativas.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo B – Curva de glicose padrão.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas, também conhecidas como peptidases, representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos vitais nos mais variados organismos, sendo consideradas enzimas ubíquas. Elas estão distribuídas em compartimentos celulares e teciduais, sendo responsáveis por aproximadamente 2% do produto gênico total (BARRETT, 1987).

Devido à sua capacidade de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas de outras proteínas, elas estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos, patofisiológicos e bioquímicos, como digestão de alimentos, coagulação sanguínea, ativação de pró-enzimas, processos de inflamação e invasão tumoral, renovação e morte celular, direcionamento do ciclo celular (RANDALL, 1996) e diferenciação tissular, através de síntese e degradação de polipeptídios (LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002).

As peptidases são classificadas em exopeptidases e endopeptidases conforme o seu mecanismo de ação. As exopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas próximas às extremidades C-terminal, liberando um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases) e N-terminal, liberando um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As endopeptidases, como o nome indica, catalisam a hidrólise de ligações peptídicas internas em proteínas e polipeptídios (ULRICH, 1994).

As peptidases também são classificadas segundo os resíduos de aminoácido essenciais ao seu sítio ativo ou em torno da ligação peptídica do substrato; conforme seu



mecanismo de ação; de acordo com a extensão do pH ótimo de atividade; similaridades de seqüências de aminoácidos, estruturas secundárias e similaridade de inibidores. Assim, são classificadas em seis grupos: serino, cisteíno, aspartil, metalo, treonino e glutamil peptidases (RAWLINGS *et al.*, 2006).

Considerando que este trabalho está diretamente relacionado às cisteíno peptidases e seus inibidores cistatínicos, estas serão descritas detalhadamente.

### **1.1.1. Cisteíno peptidases**

As cisteíno peptidases se caracterizam por apresentarem em seu sítio catalítico, o aminoácido cisteína ativado para a atividade proteolítica e um resíduo de histidina como doador de prótons, fundamental para a reação enzimática (BEYNON *et al.*, 1989). Algumas peptidases também podem apresentar um terceiro resíduo, de asparagina, para a orientação do resíduo de histidina (BARRET *et al.*, 2004).

Compreendem um grupo de enzimas de variadas propriedades físicas e bioquímicas (BARRET *et al.*, 1998). A partir de comparações estruturais e de seqüência, foram determinados pelo menos seis clãs distintos, constituídos de um total de 44 famílias agrupadas de acordo com a seqüência de aminoácidos e seus domínios conservados (RAWLINGS *et al.*, 2006; MÉNARD, 1993).

As cisteíno peptidases se subdividem em dois clãs principais: o das enzimas papaína-*like* (clã CA), que incluem as catepsinas H, L e S de mamíferos, que possuem os resíduos catalíticos na ordem Cys....His....Asn/Asp, e o das enzimas legumaína-*like* (clã CD), que possui um sítio catalisador ativo pareado com o motivo His-Gly-espçador-Ala-Cys (CHEN *et al.*, 1998).

As papaína-*like*, como diversas catepsinas lisossomais e calpaínas citosólicas de mamíferos, exercem importantes funções em muitos processos fisiológicos e estão envolvidas em sistemas de degradação de proteínas, processamento proteolítico de pró-hormônios e pró-enzimas, degradação de proteínas e apresentação de antígenos (quebram a molécula de imunoglobulina em regiões acima da ponte de dissulfeto que associam as duas cadeias pesadas, originando três fragmentos: dois que se associam ao antígeno e são os Fab e um que se cristaliza que é o Fc). Essas enzimas exercem também um papel extracelular em desordens metabólicas de humanos, como processos inflamatórios, doença de Alzheimer, osteoporose, invasão tumoral e metástase (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997; ABRAHAMSON 1993; ZWIRSKA-KORCZALA *et al.*, 2004). Um desequilíbrio entre estas peptidases e seus inibidores endógenos, as cistatinas, tem sido associado com o desenvolvimento de fenótipos metastáticos (ZAJC *et al.*, 2002; COLELLA & CASEY, 2003).

As legumaínas-*like* são asparaginil endopeptidases que possuem grande afinidade por ligações peptídicas com Asn na posição P1. Elas foram identificadas inicialmente em plantas (onde parecem estar envolvidas no processamento e mobilização do estoque de proteínas precursoras durante o desenvolvimento e germinação), mas também foram encontradas em mamíferos e parasitas (DICKINSON, 2002). A legumaína lisossomal de mamíferos se mostrou como a principal enzima envolvida no processamento de antígenos microbiológicos para a apresentação no MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II. Curiosamente, ela foi encontrada no plasma de medula de doadores normais, e se mostrou como um inibidor significativo da formação de osteoclastos e reabsorção óssea, sugerindo que ela possa

ter um papel fisiológico como um inibidor local da ação e formação de osteoclastos (DICKINSON, 2002).

Quando super-expressa em células cancerosas de tumores sólidos, a legumaína promove metástase por sua ação de degradação da matriz extracelular (LIU *et al.*, 2003) se destacando assim, como potencial alvo terapêutico contra o câncer.

As peptidases de plantas inclusas neste grupo podem ser encontradas tanto nos vacúolos, sendo responsáveis pela mobilização de proteínas estocadas no endosperma durante a germinação das sementes (ARAI *et al.*, 2002) quanto no meio extracelular, como aquelas presentes em papaia (papaína), kiwi (actinidina) e abacaxi (bromelina) (RAWLINGS & BARRETT, 1994; ROWAN, 1990).

As cisteíno peptidases, presentes também em invertebrados, desempenham funções importantes que possibilitam o comportamento parasitário (e.g. *Trypanosoma sp.* e *Schistosoma sp.*) e constituem as principais enzimas digestivas de muitos coleópteros, hemípteros e nematóides (GATEHOUSE *et al.*, 1985). Encontradas em artrópodes como a lagosta, essas enzimas estão relacionadas ao sistema nervoso dos mesmos (RAWLINGS & BARRETT, 1994).

#### **1.1.1.1. Regulação da atividade de cisteíno peptidases**

Uma vez envolvidas em inúmeros eventos fisiológicos e bioquímicos, a atividade das cisteíno peptidases deve estar sujeita a um severo mecanismo de controle, além dos controles transcricionais e pós-transcricionais. Estes processos reguladores se baseiam na inativação das cisteíno peptidases por oxidação do resíduo de cisteína do sítio ativo e estão envolvidos na liberação celular de enzimas que requerem um ambiente redutor para sua atividade. Muitas cisteíno peptidases humanas são instáveis em pH neutro, e

requerem um pH ácido para a sua ação. Uma vez ativada, a atividade da enzima pode ser perdida por degradação (LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002). Contudo, o principal controle da atividade das peptidases ocorre pela presença de inibidores protéicos que se ligam firmemente à enzima, impedindo a ligação desta ao substrato. Estes inibidores, conhecidos como cistatinas, atuam intra e extracelularmente, formando complexos com as enzimas alvos mantendo um equilíbrio apropriado entre a enzima livre e seus complexos, processo crítico para o funcionamento normal de quaisquer sistemas vivos. Um *turnover* anormal das cisteíno peptidases ou sua introdução no sistema biológico por infecções virais, bacterianas, parasíticas ou fúngicas podem ocasionar um desequilíbrio no organismo (LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002; DICKINSON, 2002).

. Assim, pode-se atribuir aos inibidores cistatínicos uma função adicional, a proteção contra a atividade de peptidases exógenas ao organismo.

## 1.2. Cistatinas

As cistatinas, descobertas em meados da década de 50 (FINKENSTAEDT, 1957), são proteínas inibidoras de cisteíno peptidases. O nome cistatina foi originalmente proposto por BARRET (1987) a um inibidor de peptidases cisteínicas do tipo papaína, isolado da clara do ovo de galinha. Desde então, esta tem sido a nomenclatura usada para se referir às proteínas inibidoras de peptidases cisteínicas.

A cinética de interação entre as cistatinas e as cisteíno peptidases alvo caracteriza-se por ser uma reação bimolecular reversível e competitiva. No entanto, sua afinidade às enzimas alvo é tão alta que se torna difícil demonstrar o caráter reversível

da interação desses inibidores ou a competição direta com os substratos (BARRET, 1987).

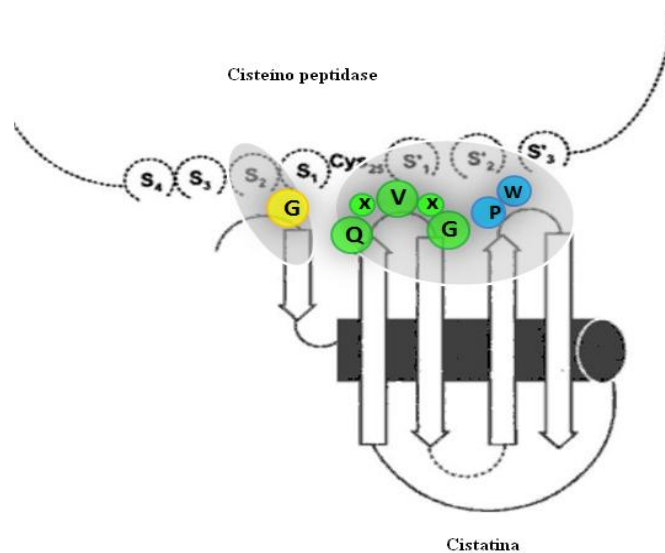
Através do alinhamento de diversas seqüências de inibidores cistatínicos, foi possível localizar regiões que possuem resíduos ou domínios que se mantiveram conservados nessas proteínas. Vários modelos de interação sugerem o envolvimento de três regiões no reconhecimento entre inibidor e a cisteína peptidase alvo: um motivo QXVXG (Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly) na porção central da cadeia formando um *loop*, um resíduo de glicina (Gly) conservada na porção N-terminal e um resíduo triptofano (Trp) formando um segundo *loop* próximo a porção C-terminal (Figura 1). Essas porções da cadeia levam à formação de um sítio de ligação equivalente ao substrato que permite uma forte ligação com a enzima, tornando seu sítio ativo inacessível ao substrato (BARRET, 1987).

Estes inibidores, evolutivamente relacionados, foram agrupados numa superfamília denominada “família das cistatinas”. De acordo com o grau de homologia entre os membros dessa superfamília, com base em suas seqüências de aminoácidos, características protéicas, estruturas moleculares e localização subcelular (TURK *et al.*, 1997), estes foram classificados em três famílias de origem animal: estefinas, cistatinas e cininogênios [23]; e uma família de cistatinas vegetais, as fitocistatinas (ABRAHAMSON, 1994).

As proteínas que constituem a família das estefinas, também denominada família 1, possuem cerca de 100 resíduos de aminoácidos e não apresentam pontes dissulfeto e carboidratos. Apresentam peso molecular de aproximadamente 11kDa, conservam um *loop* Gln-Val-Val-Ala-Gly na região central, sendo geralmente citosólicas (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A família 2 recebeu o mesmo nome da superfamília das cistatinas, com

grupos protéicos que possuem cerca de 120 aminoácidos, contêm quatro resíduos conservados de cisteína e formam duas pontes dissulfeto (BARRET, 1987). Apresentam peso molecular de aproximadamente 15kDa, são glicosiladas e conservam um *loop* central formado de Gln-X-Val-X-Gly. Estas cistatinas são secretadas e possuem uma seqüência sinal (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Na família cininogênio ou família 3, estão os cininogênios do plasma sanguíneo, que são as cistatinas com maior peso molecular, sendo formada por glicoproteínas de 60 a 120kDa que apresentam repetições da seqüência Gln-Val-Val-Ala-Gly. Possuem oito pontes dissulfeto e três domínios cistatínicos sucessivos, dos quais apenas o segundo e terceiro apresentam atividade inibitória (SALVESEN *et al.*, 1986).

Considerando que este trabalho tem como foco a produção recombinante de uma cistatina de planta, em particular cistatinas da cana-de-açúcar, a família das fitocistatinas será descrita detalhadamente a seguir.



**Figura 1: Esquema da interação cistatina – cisteína peptidase.** Em destaque as três regiões da cistatina envolvidas na inibição: em amarelo a região N-terminal contendo o resíduo de glicina conservado que interage com a peptidase no sítio S2; em verde a alça central contendo o motivo QxVxG e em azul a região C-terminal contendo o resíduo de triptofano conservado que constituem as outras regiões de contato com a peptidase em S1' e S2', respectivamente. Modificado de ABRAHAMSON, 1994.

### 1.2.1. Fitocistatinas

A inclusão de uma quarta família, a das fitocistatinas, a qual incluiria os inibidores de cisteíno peptidases de plantas, foi sugerida por MARGIS e colaboradores (1998). Esta família de proteínas apresenta características que são comuns as famílias 1 e 2, visto que, se assemelham a família das estefinas pela ausência de pontes dissulfeto e resíduos de cisteína e se assemelham a família das cistatinas pelo tamanho e seqüência primária das proteínas. Todavia, as cistatinas de plantas, apresentam peculiaridades estruturais e no arranjo genômico que justificam a sua inclusão em uma família própria. Estas peculiaridades podem ser traduzidas pela presença de uma alfa hélice na região N-terminal [(LVI)-(AGT)-(RKE)-(FY)-(VI)-X-(EDQV)-(HYFQ)-N], presente apenas nas fitocistatinas; pela análise de uma árvore filogenética que as agrupou em um único ramo distinto das outras famílias; e pela diversidade de organização de seus íntrons (MARGIS *et al.*, 1998).

Estes inibidores de proteases vegetais podem ser classificados em dois grupos: um constituído por fitocistatinas que possuem apenas um domínio de interação com a protease alvo, compreendendo a maioria das fitocistatinas e um segundo grupo que possui múltiplos domínios, por exemplo, a multicistatina isolada de tubérculos de batatas que pode interagir com até oito moléculas de cisteíno peptidases simultaneamente (ABE *et al.*, 1987; PERNAS *et al.*, 1998).

Considerando suas funções, as fitocistatinas estão envolvidas na regulação da atividade das peptidases endógenas durante a maturação de sementes, germinação, morte celular programada e na defesa contra cisteíno peptidases exógenas de insetos e nematóides, que geralmente têm essas peptidases em seu trato intestinal (ARAI *et al.*, 2002). A presença destes inibidores nas folhas pode levar os insetos herbívoros à morte

por má nutrição como em consequência da inibição de suas peptidases digestivas (BRODWAY E DUFFEY, 1996).

Estes inibidores têm sido identificados em uma variedade de plantas superiores, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas. Como exemplo pode-se destacar sua presença em milho (ABE *et al.*, 1992), soja (HINES *et al.*, 1991; BOTELLA *et al.*, 1996), cevada (JOSHI *et al.*, 1998), maçã (RYAN *et al.*, 1998), trigo (KURODA *et al.*, 2001), kiwi (RASSAM E LAING, 2004), gergelim (SHYU *et al.*, 2004), morango (MARTINEZ *et al.*, 2005), nhamê (YANG *et al.*, 2005) cana-de-açúcar (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; GIANOTTI *et al.*, 2006), entre outras.

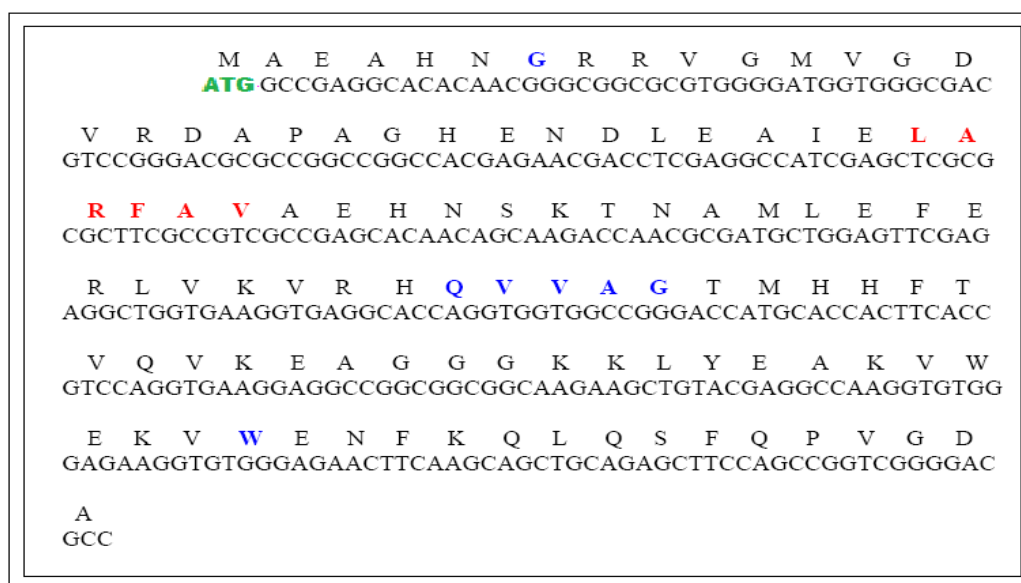
Em arroz já foram descritos três inibidores de cisteíno peptidases até o momento. As cistatinas de arroz, chamadas de Orizacistatinas I, II, e III, apresentam diferentes especificidades contra cisteíno peptidases humanas e de origem vegetal (KONDO *et al.*, 1991). A Orizacistatina, I foi a primeira cistatina caracterizada de origem vegetal. Essa proteína atua como inibidora de cisteíno peptidase e tem potencial de ação em enzimas alvos exógenas como a dos insetos e fungos (ABE *et al.*, 1987).

As fitocistatinas têm atraído a atenção dos pesquisadores devido a sua capacidade de inibir não apenas peptidases que ocorrem em muitas espécies de insetos herbívoros e nematódeos, mas também em fungos patogênicos que acarretam grandes prejuízos para economia agrícola (RYAN *et al.*, 1998), além de poderem atuar como proteínas de defesa contra estresses abióticos e bióticos (RASSAM e LAING, 2004).

Atualmente, as fitocistatinas também estão sendo utilizadas em aplicações biotecnológicas como no processamento de alimentos (ARAI *et al.*, 2002) e obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos (INANAGA *et al.*, 2001).



A identificação de novas fitocistatinas foi facilitada pela disponibilidade de bancos de ESTs originados em projetos de seqüenciamento em larga escala. O banco de dados do projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST – FAPESP) permitiu a identificação da primeira cistatina dessa espécie vegetal, a canacistatina (doravante denominada CaneCPI-1). Este inibidor cistatínico caracterizado e produzido de forma recombinante em nosso laboratório por SOARES-COSTA e colaboradores (2002), é composto por 126 aminoácidos, possui massa molecular de aproximadamente 13kDa e mostrou-se eficiente na inibição de catepsinas humanas assim como outras cisteíno peptidases (OLIVA *et al.*, 2004). A figura-2 mostra a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da CaneCPI-1.



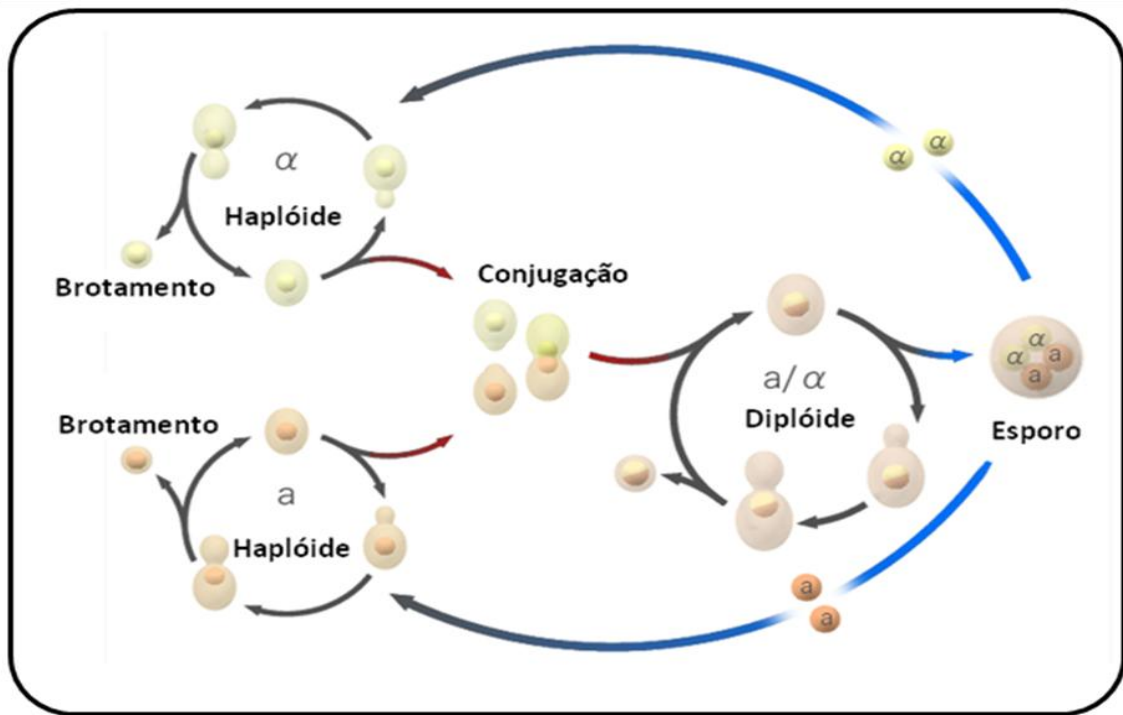
**Figura 2: Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da CaneCPI-1.** A região codificante pode ser visualizada a partir do códon de iniciação (ATG), em verde. Em azul destacam-se as regiões conservadas da superfamília Cistatina. Em laranja o motivo característico da família Fitocistatina.

### 1.3. Características da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* têm sido, desde a antiguidade, largamente utilizadas nos mais diversos processos industriais tais como a produção de pães, bebidas alcoólicas e etanol combustível (BARNETT, 2003).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser considerada o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido (AQUARONE *et al.*, 2001). São fungos unicelulares anaeróbicos facultativos, apresentam glicogênio como reserva energética, possuem parede celular composta basicamente de polissacarídeos de glicose, manose e N-acetilglicosamina. A gemulação ou brotamento é o modo de crescimento vegetativo mais comum, onde se verifica a formação de uma protuberância (broto) na superfície externa da célula parental. À medida que este broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide e um dos núcleos migra para o broto. Uma nova parede celular é sintetizada entre o broto e a célula parental e este eventualmente se separa da célula mãe (TORTORA *et al.*, 2002). Uma única célula de levedura pode produzir mais de 24 células filhas por brotamento. Algumas leveduras produzem brotos que não se separam completamente um dos outros, formando pequenas cadeias de células denominadas de pseudohifas.

Normalmente, a reprodução sexual só ocorre em condições de limitado suprimento nutricional, onde se observa a conjugação de células de tipo sexual oposto (*a* e *α*), originando uma célula diplóide capaz de se reproduzir por brotamento. Em *Saccharomyces cerevisiae*, sob condições de escassez de nutrientes, a meiose é induzida, levando a formação de quatro esporos haplóides, os quais segregam 2:2, isto é, dois esporos de *mating type a* e dois esporos do *mating type α* (CECCATO-ANTONINI, 2010) (Figura 3).



**Figura 3. Esquema representativo do ciclo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Observa-se as células haplóides de *mating type a* e  $\alpha$ , e a célula diplóide  $a/\alpha$ . Fonte: <http://www.vegetal-placenta.com/pt/index2.php?Content=Study>, acesso em: 27/06/2011.

Estes microorganismos variam consideravelmente no que diz respeito às suas dimensões, com limite de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de largura e 5 a 30  $\mu\text{m}$  de comprimento. Apresentam formas características: esférica, oval, cilíndrica, em formato de pêra e alongada em pseudomicélio.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico e devido à sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, ela foi classificada como *microrganismo geralmente considerado seguro* (GRAS – generally regarded as safe) (OSTERGAARD *et al.*, 2000). Além disso, os processos fermentativos e tecnológicos bem estabelecidos para a produção em larga escala com esta levedura fazem este microorganismo ser bastante utilizado em muitos processos biotecnológicos. Outra importante razão para a aplicabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* dentro do campo da biotecnologia é a sua susceptibilidade a modificações genéticas pela tecnologia do DNA

recombinante, que vem sendo bastante facilitado graças à publicação, em 1996, do genoma completo desta levedura (ROMANOS *et al.*, 1992).

### **1.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de produção de proteínas**

#### **recombinantes**

Leveduras têm sido usadas desde o início da década de 80 para a produção em larga escala de proteínas intracelulares e extracelulares de origem humana, animal ou vegetal. No campo da pesquisa aplicada as leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, são os eucariontes mais comumente utilizado para esta finalidade (ROMANOS *et al.*, 1992). *Saccharomyces cerevisiae* tem várias propriedades que a torna uma ferramenta importante na expressão de proteínas heterólogas; já que possuem a facilidade de crescimento microbiano e da manipulação genética encontrada em bactérias; apresentam níveis de expressão elevados; têm a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, como o processamento proteolítico, ponte dissulfeto e glicosilação (ZURBRIGGEN *et al.*, 1990). Além disso, goza do status GRAS, o que é de suma importância para a produção de biofármacos via engenharia genética.

Na utilização de leveduras como sistemas de expressão de proteínas recombinantes, a escolha do vetor é um fator determinante para a expressão do gene clonado e para o desempenho da linhagem transformada, uma vez que o número de cópias controla a dosagem do gene e a estabilidade do mesmo afeta o desempenho da população celular.

Os vetores de expressão mais utilizados em *Saccharomyces cerevisiae* são baseados nos vetores de clonagem bacteriana e de levedura, chamados “Shuttle vectors”, que por sua vez, são baseados no vetor 2  $\mu$ m. Este possui 6.3 Kb e encontra-se

presente em muitas espécies de *Saccharomyces* em 30-100 cópias por célula, possuindo um sistema de amplificação do número de cópias (ROMANOS *et al.*, 1992).

### **1.3.2. Produção de cistatinas da cana-de-açúcar em *Saccharomyces cerevisiae***

Existem diversas razões para a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* em processos biotecnológicos. Entre elas está o fato de que a padronização da tecnologia de fermentação em larga escala já está bem desenvolvida, mostrando que ela é capaz de crescer facilmente e com baixo custo de produção. Além disso, esta levedura possui capacidade de fermentar e crescer na presença de açúcares, secreta naturalmente poucas proteínas e produz etanol como produto final do seu metabolismo energético.

Algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são largamente utilizadas em escala industrial no processo de produção de etanol em usinas e destilarias, sendo interessante utilizar uma destas linhagens industriais como sistema de produção de proteínas de interesse biotecnológico. Assim, seria possível produzir proteínas recombinantes nestas leveduras em escala industrial sem um custo adicional de produção, visto que, as leveduras industriais são descartadas no final do processo fermentativo. É sabido também, que quando ocorre alto crescimento celular, pode haver um excedente de levedura. Segundo AMORIM (2005) o excesso de fermento nas dornas (acima de 15%) pode esgotar os nutrientes mais rapidamente, causando decréscimo da viabilidade celular do agente fermentador, aumento do consumo de ácido e redução do rendimento da fermentação. Neste caso ocorre uma sangria de parte do leite de levedura sendo este excedente desidratado e vendido para várias finalidades, tais como para formulação de rações, sendo atualmente também cogitada a possibilidade de sua utilização para a obtenção e purificação de proteínas heterólogas.

Considerando que a utilização desse sistema seja um modelo viável, a proteína CaneCPI-1, uma cistatina de cana-de-açúcar (SOARES-COSTA *et al.*, 2002) foi escolhida como modelo para a padronização do sistema de produção de proteínas recombinantes em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **1.3.2.1. Linhagem industrial PE-2 da levedura *Saccharomyces cerevisiae***

É bastante comum o uso de linhagens de leveduras selecionadas a fim de aumentar a eficiência fermentativa e a produção de etanol (GUERRA *et al.*, 2001; PATARO *et al.*, 2000). Portanto, o desempenho do processo de fermentação é altamente influenciado pelo tipo de levedura que o executa. Assim, o agente de fermentação escolhido deve garantir uma alta eficiência na produção de etanol, baixa produção de glicerol e alta tolerância a vários fatores estressantes, tais como pH, temperatura, concentração de açúcares e álcool (LIMA *et al.*, 2001).

Para este trabalho optou-se pela utilização da linhagem diplóide de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 (NCYC3233), isolada de processo fermentativo da Usina da Pedra, como sistema de produção da proteína CaneCPI-1. Esta linhagem combina elevada eficiência fermentativa com alta persistência no sistema. É um dos exemplos mais bem sucedidos de utilização de leveduras selvagens isoladas para a produção de etanol. No Brasil é usada por cerca de 30% das destilarias, sendo responsável pela produção de aproximadamente 10% do bioetanol produzido no mundo (ARGUESO *et al.*, 2009).

#### **1.3.3. *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica**

Em escala industrial as leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, têm sido largamente utilizadas para a produção de álcool. A levedura realiza a fermentação do

açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto desse processo. Todavia, é desejável produzir tanto o álcool, quanto conhecer as condições ideais para a levedura produzir etanol com maior eficiência.

Defini-se fermentação alcoólica como sendo o fenômeno pelo qual açúcares são transformados em álcool e gás carbônico. Inicialmente, pela via glicolítica, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato por meio de dez reações catalisadas por diferentes enzimas. As duas moléculas de piruvato, sob condições anaeróbicas, são descarboxiladas pela ação da enzima piruvato descarboxilase, formando duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de gás carbônico. As moléculas de acetaldeído são reduzidas a duas moléculas de etanol pela álcool desidrogenase (CARDOSO, 2006).

O processo industrial de fermentação alcoólica pode ser dividido em três fases: fermentação preliminar ou pré-fermentação, fermentação principal ou tumultuosa e fermentação complementar ou pós-fermentação (AMORIM, 2005)

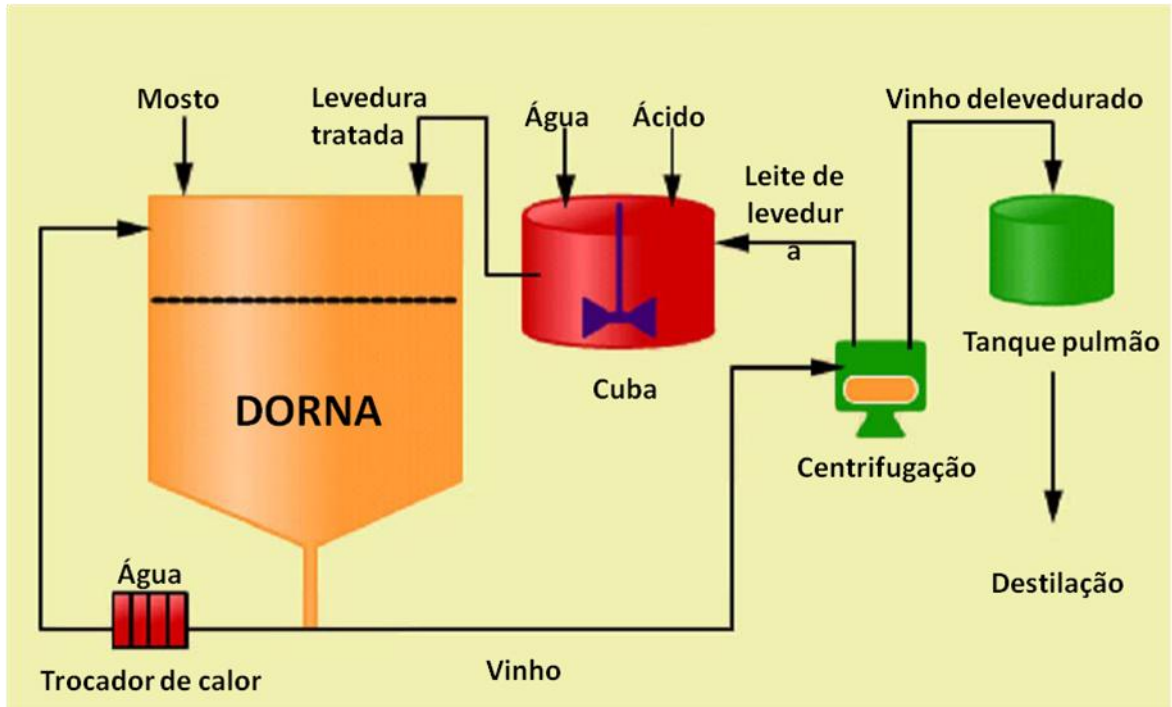
A pré-fermentação se inicia quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado e se caracteriza por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Ocorrendo o aumento da produção de álcool, evidenciado pela produção de gás carbônico, tem-se o final desta fase e o início da fase de fermentação principal ou tumultuosa.

As principais características da fase de fermentação principal são: intensa produção de álcool e liberação de CO<sub>2</sub>; aumento da temperatura, a qual deve ser controlada por resfriamento; progressivo aumento de espumas e elevação da acidez do mosto. A fermentação principal cessa quando diminui a liberação de gás e, conseqüentemente, a turbulência característica do mosto. Essa fase encerra quando as espumas desaparecem, durando de 9 a 10 horas. A pós-fermentação é caracterizada pela

diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, redução do desprendimento do gás carbônico e não se verifica a formação de mais espuma. Essa fase persiste de 6 a 8 horas e deve durar o mínimo possível para evitar a contaminação do vinho e do pé-de-cuba (suspensão de microrganismo de concentração adequada, capaz de garantir, em condições econômicas, a fermentação de um dado volume de mosto) que será utilizado em nova fermentação. O mosto totalmente fermentado é denominado vinho (CECCATO-ANTONINI E PARAZZI, 2000). Ao final da fermentação, o vinho é então centrifugado, separando as leveduras (leite ou creme de leveduras), que são tratadas com água e ácido sulfúrico, retornando as dornas para outro ciclo fermentativo. O vinho delevedurado é destilado para obtenção do etanol, gerando o resíduo denominado vinhaça (Figura 4).

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação. O reator biológico pode ser operado de forma descontínua (batelada simples), semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Atualmente no Brasil, o processo predominante é o de batelada alimentada com reciclo total do agente da fermentação, o qual permite uma maior produtividade em relação ao processo.





**Figura 4:** Esquema representativo do processo de fermentação alcoólica industrial para a produção de álcool combustível.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver um sistema de expressão recombinante para a produção de uma cistatina de cana-de-açúcar, a CaneCPI-1, em uma linhagem industrial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e utilizar a linhagem transformada no processo fermentativo de produção de etanol com o objetivo de se obter cistatinas recombinantes em larga escala com um custo de produção embutido no processo de produção de etanol.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Construir um vetor para expressão da CaneCPI-1 e sua utilização para transformar a linhagem industrial PE-2 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Utilizar a linhagem PE-2 transformada no processo de fermentação alcoólica;
- Realizar testes fermentativos com a linhagem PE-2 transformada para monitoramento do processo de produção de etanol;
- Purificar a proteína expressa ao longo do processo fermentativo;
- Realizar testes de imunodeteção da proteína recombinante produzida;
- Realizar ensaios de inibição com a proteína purificada;
- Realizar testes que confirmem a estabilidade e persistência da linhagem PE-2 transformada.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Cepas e plasmídios

Utilizou-se a linhagem diplóide de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 (NCYC3233), isolada de processo fermentativo – Usina da Pedra. A linhagem de *E.coli* DH5- $\alpha$  foi utilizada para transformar os plasmídeos. O vetor utilizado para a expressão, pYADE4 (BRUNELLI E PALL, 1993) (Figura 5), foi gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. Anderson Ferreira da Cunha do Departamento de Genética e Evolução - Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCar. Este é um plasmídeo não comercial, tipo “shuttle vector” que contém a seqüência de replicação autônoma em levedura (ARS), possui o promotor ADH2 e o gene TRP1 para seleção em levedura.

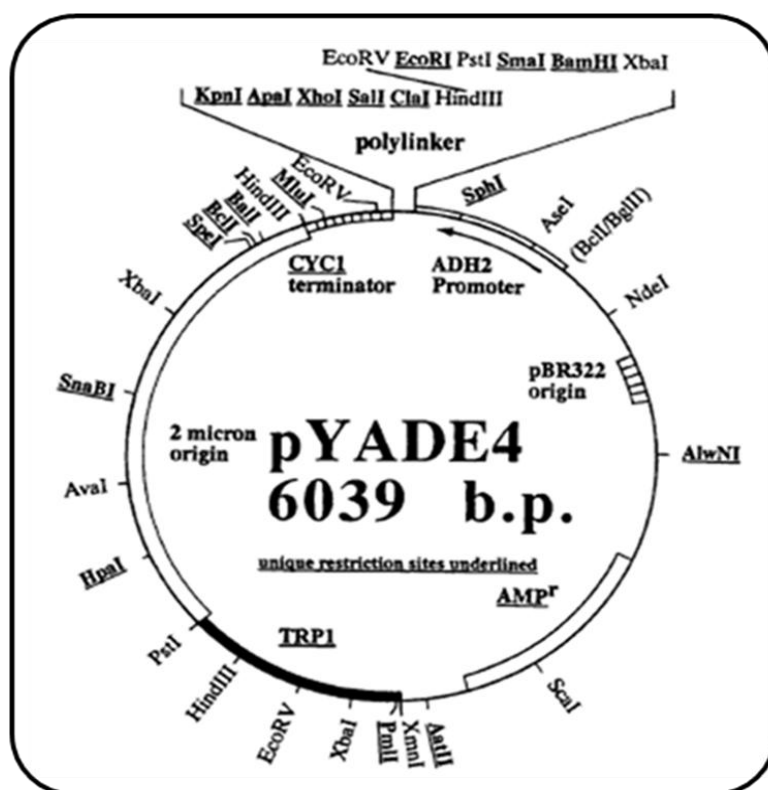


Figura 5. Mapa do plasmídeo pYADE4 utilizado como vetor de expressão. Modificado de (BRUNELLI E PALL, 1993).

A decisão de utilizar este vetor pYADE4 na transformação da linhagem de levedura PE-2 se deve ao fato de que alguns experimentos realizados com a linhagem PE-2 demonstraram que ela se manteve estável durante vários ciclos de fermentação viabilizando assim a utilização deste plasmídeo. Estes experimentos foram realizados pela Prof. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini do Centro de Ciências agrárias da UFSCar - Araras.

### 3.2. Construção do vetor de expressão

A fase aberta de leitura (ORF) que codifica para a caneCPI-1 fusionada a uma sequência de seis histidinas em sua porção C-terminal foi obtida por meio de uma reação de amplificação utilizando o vetor pET28aCaneCPI-1, construído previamente por SOARES-COSTA e colaboradores (2002), como molde e os seguintes primers: Forward *Cane\_Sma I*: 5'CCCGGGATGGCCGAGGCACACAACGG 3' e Reverse *Cane\_Cla I*: 5'ATCGATTTAATGATGATGATGATGATGGGCGTCCCCGACCGGCTG 3', nos quais foram inseridos sítios de restrição para as enzimas *Sma I* e *Cla I* respectivamente, para posterior subclonagem direcional no vetor pYADE4, previamente digerido com as mesmas enzimas. A reação de amplificação foi realizada num volume final de 100 µL, e nela foram utilizadas 10 ng do molde, 200 µM de cada dNTP (Promega), tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM), 20 pmoles dos primers *forward Cane\_Sma I* e *reverse Cane\_Cla I*, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A programação utilizada no termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) foi à seguinte: temperatura de 94 °C por 3 min para desnaturação do DNA; 35 ciclos de amplificação de 45 s a 94 °C (desnaturação); 30 s a 55 °C (hibridização); 1 min a 72 °C (extensão); extensão final de 10 min a 72 °C.

O produto de amplificação foi purificado com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega), e ligados ao vetor de expressão pYADE4 previamente clivado e purificado. A reação de ligação foi feita em um volume final de 10  $\mu$ L contendo 55 ng do vetor, 200 ng do fragmento amplificado e purificado, 1U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão da enzima 1x [Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM, polietilenoglicol (PEG) 8000 5 %]. A reação se deu por 16 h a 4 °C e seu produto foi utilizado para transformar, via choque térmico, as células competentes da bactéria de propagação *E. coli* linhagem DH5- $\alpha$ , preparadas pelo método de CaCl<sub>2</sub> (SAMBROOK E RUSSEL, 2001). As colônias transformantes obtidas foram repicadas e cultivadas em meio líquido contendo antibiótico. Estas foram utilizadas para extração do DNA plasmidial que foi posteriormente seqüenciado pelo método dideoxi (SANGER *et al.*, 1977) para a confirmação da inserção do gene no plasmídeo.

### **3.3. Transformação em *Saccharomyces cerevisiae***

A transformação das células de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 com o plasmídeo construído (pYADE4\_CaneCPI-1) foi realizada por eletroporação utilizando o aparelho Gene-Pulser (Bio-Rad) segundo SAMBROOK E RUSSEL (2001). O DNA plasmidial foi adicionado às células competentes e a mistura mantida em gelo durante 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi transferida para um cubeta de eletroporação de 0,2 cm. Os parâmetros usados para a eletroporação de *Saccharomyces cerevisiae* foram: voltagem de 1,5 volts, resistência de 200 ohms e capacitância de 25  $\mu$ F. Após o pulso, adicionou-se 1mL de meio de cultura YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glucose e 2% agar) a cubeta e o conteúdo transferido para um tubo para o crescimento.

As células foram incubadas por 16 horas, a 30° C e 85 rpm. A cultura foi então plaqueada em meio YPD contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubada a 30° C durante cerca de cinco dias.

### **3.4. Seleção dos transformantes**

Para a seleção de clones recombinantes utilizou-se a técnica de PCR de colônia, na qual colônias de leveduras transformadas foram picadas com palitos de dente estéril em tubos de 1,5 mL contendo 30 µL de água Mili Q autoclavada. Os tubos foram mantidos em banho-maria em temperatura de ebulição por 5 minutos para uma lise rápida das células e liberação do DNA plasmidial. Do material resultante, um volume de 1 µL foi utilizado como molde para as reações de PCR. O protocolo das reações de PCR e o programa de amplificação usados foram os mesmos descritos no item 3.2. Para confirmação dos resultados os plasmídeos recombinantes foram purificados através do método de lise alcalina e seqüenciados.

### **3.5. Ensaio fermentativos**

#### **3.5.1. Clarificação do caldo de cana**

Para a clarificação do caldo de cana, foi utilizada a técnica descrita por FALCÃO DE MORAIS (1993), que consiste em adicionar uma clara de ovo batida (em neve), para cada litro de caldo a ser clarificado, colocando a mistura em recipiente de alumínio, em autoclave com água em ebulição, e com a tampa semi-aberta (vapor fluente). Após 20 minutos, procede-se com o resfriamento. Os meios de caldo de cana foram diluídos nas concentrações desejadas (4°Brix e 12°Brix) com água destilada e acrescidos de

solução de sais: 50g/L de sulfato de amônio, 20g/L de fosfato monobásico de potássio, 10g/L de sulfato de magnésio, 1g/L de sulfato de zinco e 1g/L de sulfato de manganês.

### **3.5.2. Meio de multiplicação**

No caldo de cana clarificado 4° Brix foi adicionado 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado para 5,5-6,0.

### **3.5.3. Meio de fermentação**

Foi utilizado caldo de cana clarificado 12° Brix, com 10 mL de solução de sais por litro de meio.

### **3.5.4. Propagação de células para obtenção do inóculo**

Os inóculos foram preparados pela transferência de cerca de 5 µL do estoque em glicerol 20% de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem PE-2, tanto transformadas com o plasmídeo construído (pYADE4\_CaneCPI-1), quanto não transformadas (controle) em 10 mL de meio de multiplicação e mantidas a 30 °C e 200 rpm, durante 24h, tempo necessário para atingir uma densidade de 10<sup>8</sup> células de leveduras por mL.

## **3.6. Processo fermentativo em batelada simples com reciclo celular**

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicatas, utilizando-se frascos erlenmeyers de 500mL com 50 mL de meio de fermentação e 20% de inóculo vol/vol, mantidos a 30 °C e 200 rpm, durante quatro ciclos fermentativos de 9 horas, sendo realizado também um quinto ciclo de 36 horas, no qual se espera haver a produção da

proteína recombinante. Ao término de cada ciclo o caldo fermentado foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C (sorvall), sendo a biomassa de células proveniente de cada erlenmeyer, ressuspensa em 50 mL de novo meio de fermentação para início do próximo ciclo, e assim sucessivamente até o final do último ciclo fermentativo. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para realização de análises posteriores.

### **3.6.1. Obtenção da proteína recombinante via lise celular**

Ao final do quinto ciclo fermentativo, a biomassa de células foi submetida à lise celular para obtenção da proteína recombinante, visto que, ela não é secretada. A lise celular foi efetuada mecanicamente através da adição de igual volume de esferas de vidro (Glass Beads; 425-600 µm; Sigma) e 500 µL de tampão de quebra [50 mM fosfato de sódio (pH 7,4), 1mM EDTA, 5% Glicerol]. Cada amostra foi agitada no “PRECELLYS 24” por 30 segundos e mantida por mais 30 segundos no gelo, sendo este processo repetido ao longo de 10 minutos. Ao término manteve-se as amostras por 10 minutos em repouso no gelo e então a mistura foi centrifugada 10 minutos, a 10.000 rpm e 4 °C, sendo o sobrenadante, o extrato protéico bruto, transferido para um novo tubo e mantido a -20 °C para posterior purificação via cromatografia de afinidade.

## **3.7. Análises fermentativa**

### **3.7.1. Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada por meio da contagem de células ao microscópio em câmara de Neubauer [66] no início do primeiro ciclo fermentativo e ao término do último. Utilizou-se solução de azul de metileno com citrato de sódio (0,01 g de azul de metileno e 2,0 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada) como



corante, sendo que a viabilidade foi obtida pela relação (em porcentagem) entre células viáveis e número total de células (vivas e mortas).

### **3.7.2. Análise de pH**

O pH foi obtido com auxílio de um potenciômetro digital Tecnal.

### **3.7.3. Determinação de °Brix**

O teor de sólidos solúveis foi determinado pelo processo de refração, expresso em ° Brix, usando um refratômetro manual, faixa 0-32 ° Brix.

### **3.7.4. Determinação de açúcares redutores totais (ART)**

A quantidade de ART foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS), conforme descrito por MARTELLI E PANEK (1968) no qual alíquotas de 10 mL das amostras previamente diluídas (quando necessário) foram colocadas em balão volumétrico de 100 mL, acrescido de 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 2N para se obter a hidrólise ácida através de aquecimento em banho-maria em temperatura de ebulição durante 5 minutos. Resfriou-se em água com gelo e adicionou-se 2,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N. Completou-se o volume do balão (100 mL) com água destilada e em seguida 1 mL da solução foi transferida para tubos de ensaio contendo 1 mL da solução estoque do reagente DNS. Após homogeneização, os tubos foram aquecidos por 5 minutos em banho-maria em temperatura de ebulição e posteriormente resfriados em água corrente. Completou-se o volume para 10 mL com água destilada, homogeneizou-se e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (*Thermo*<sup>®</sup> *Biomate 3*). O mesmo procedimento foi feito utilizando-se água ao invés da amostra para se obter o branco da reação, que foi utilizado para calibrar o aparelho.

A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi obtida através de uma curva padrão de glicose, pesando-se 1,2 g de glicose previamente seca a 70 °C durante 2 horas e resfriada em dessecador de sílica gel, transferindo-a para um balão volumétrico de 200 mL e completando-se o volume com água destilada. Alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume também com água destilada. Cada mL dessas soluções, considerando-se a diluição, possuíam, respectivamente, 0,012; 0,024; 0,036; 0,048; 0,060; 0,072; 0,084; 0,096; 0,108; 0,120 mg de glicose. Para a leitura da absorbância a 540 nm, realizou-se o mesmo procedimento anterior. A partir da concentração de glicose e da respectiva absorbância, efetuou-se a regressão linear e a correlação ( $R^2$ ) entre tais valores.

### **3.7.5. Determinação da concentração de etanol durante o processo fermentativo**

Para se determinar o conteúdo alcoólico, 10 mL de cada amostra de sobrenadante (vinho fermentado delevedurado) obtido ao término de cada reciclo foram destiladas com auxílio de um microdestilador TECNAL (modelo TE-012) e posteriormente, determinou-se o teor alcoólico por meio da densidade alcoólica obtida em densímetro digital Anton Paar (DMA-45), segundo AMORIM (2005)

### **3.7.6. Determinação da eficiência fermentativa**

A eficiência fermentativa (%) foi calculado com base no teor alcoólico do meio e na concentração inicial de açúcares redutores totais (ART), com base na estequiometria proporcionada pela fermentação, onde 0,511 é o fator de conversão do açúcar em etanol com base no rendimento máximo teórico, isto é, levou-se em consideração que todo o açúcar consumido na reação foi transformando em álcool e gás carbônico.

### **3.8. Purificação da cistatina expressa na linhagem industrial *S. cerevisiae* PE-2**

A cistatina recombinante foi purificada a partir da fração solúvel obtida conforme descrito no item 3.6.1 por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna contendo 5 mL de resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), conforme descrito por [42]. Como a proteína foi expressa em fusão a uma sequência de seis histidinas (His-Tag) na sua porção C-terminal e considerando que resíduos de histidina possuem afinidade pelo níquel, esta pode ser purificada em etapa única neste procedimento. Para isso, o sobrenadante contendo a cistatina recombinante foi passado pela respectiva coluna previamente equilibrada com cinco volumes (25 mL) de tampão de lise. A resina foi então lavada com três volumes (15 mL) de tampão de lise e a eluição da proteína recombinante foi realizada passando-se pela resina dois volumes de tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). O imidazol, que também apresenta forte afinidade pelo níquel, compete com as histidinas pela ligação ao metal, liberando a proteína de fusão. Após a eluição da proteína, uma diálise foi realizada em tampão contendo Tris-HCl (10 mM) e NaCl (50 mM), pH 8.0. Os produtos purificados foram analisados em SDS-PAGE 15% e a concentração da proteína determinada pelo método de Bradford [68] usando o reagente *Bio Rad Protein Assay* (Bio-Rad) e a albumina sérica bovina como padrão.

### **3.9. Imunodeteção da proteína recombinante CaneCPI-1**

Quantidades iguais das amostras protéicas a serem analisadas por *Western blot* foram separadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen) em tampão de transferência (Tris 200 mM, Glicina 50 mM, metanol 20%) durante 2 h a 150 V e 150 mA. Após a transferência, as membranas

foram coradas por 5 minutos em solução de Ponceau (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%) para visualização das bandas. As membranas foram então bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado (Molico) 5% diluído em TBS 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM) a 4 °C por 16 h. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS (5 minutos cada) sob agitação e incubadas por 2 h com o anticorpo policlonal anti-CaneCPI-1, previamente produzindo em nosso laboratório por SORES-COSTA e colaboradores (2002), e anticorpo monoclonal anti His-Tag na diluição de 1:10.000 em TBS 1x, sob agitação suave à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (Anti-Mouse IgG conjugado à fosfatase alcalina – Sigma) diluído na proporção de 1:10.000 por 2 h sob agitação suave à temperatura ambiente. Então, as membranas foram lavadas e as bandas de proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas com o kit *AP Conjugate Substrate* (BioRad).

### **3.10. Ensaio de atividade da proteína recombinante**

A atividade inibitória da CaneCPI-1 recombinante foi obtida pela medida da atividade hidrolítica residual da papaína após sua pré-incubação com diferentes concentrações deste inibidor na presença do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA (carbobenzoxicarbonil-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina) (Calbiochem).

Os ensaios foram realizados em cubeta de quartzo de 1 mL, a 37 °C e em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5. Para os ensaios de inibição, a papaína (0.1 μM) foi pré-ativada com 2,5 mM de DTT (dithiothreitol) por 5 minutos. O DTT é utilizado como agente redutor do resíduo de cisteína presente no sítio ativo das cisteíno proteases. A cistatina foi então adicionada e uma pré-incubação de 150 segundos seguiu-se para a interação da enzima com o inibidor. O substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA

(Calbiochem) foi adicionado na cubeta na concentração de 2  $\mu\text{M}$  e as mudanças na fluorescência foram continuamente monitoradas. A hidrólise resulta na liberação da molécula de MCA, a qual, ao ser excitada no comprimento de onda de 380 nm, emite uma fluorescência no comprimento de onda de 460 nm que é detectada pelo espectrofotômetro de fluorescência (Hitachi F-2000). Desta forma, o aumento na fluorescência é proporcional à velocidade de reação. Os valores das velocidades de hidrólise obtidas na ausência do inibidor ( $V_0$ ) e na presença do inibidor em diferentes concentrações ( $V_i$ ) são utilizados para gerar um gráfico, cuja inclinação (*slope*) é utilizada na determinação do valor da constante de inibição ( $K_i$ ) conforme o procedimento de Morrison [69].

### **3.11. Isolamento do vetor pYADE4\_CaneCPI-1 a partir da cepa transformada**

Inicialmente, uma única colônia tanto da cepa transformada como da cepa não transformada (controle) foram repicadas em um pré-inóculo contendo 5 mL de meio YPD líquido, o qual foi mantido sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 16 horas. Os pré-inóculos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm e a biomassa de células obtida submetida a extração de DNA total via homogeneização em vortex ao qual adicionou-se igual volume de esferas de vidro (Glass Beads; 425-600  $\mu\text{m}$ ; Sigma) na presença de 100  $\mu\text{L}$  de tampão de quebra (Triton X-100 2%; SDS 1%; mM NaCl 100; Tris HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1mM), fenol, clorofórmio, álcool isoamílico. Após 10 minutos de repouso no gelo, o lisado celular foi centrifugado por 10 minutos, a 10.000 rpm e 4 °C. Utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante para transformar, via choque térmico, células competentes da bactéria de propagação *E. coli* linhagem DH5- $\alpha$ , preparadas pelo método de CaCl<sub>2</sub> (SAMBROOK E RUSSEL, 2001). PCR de colônia foram realizados a

partir das colônias transformadas obtidas, utilizando as mesmas condições utilizadas para amplificação inicial, como descrito anteriormente. Além disso, o plasmídeo pYADE4\_CaneCPI-1 foi isolado das colônias transformadas e re-sequenciado pelo método dideoxy no seqüenciador de DNA MegaBace™1000, utilizando o Kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

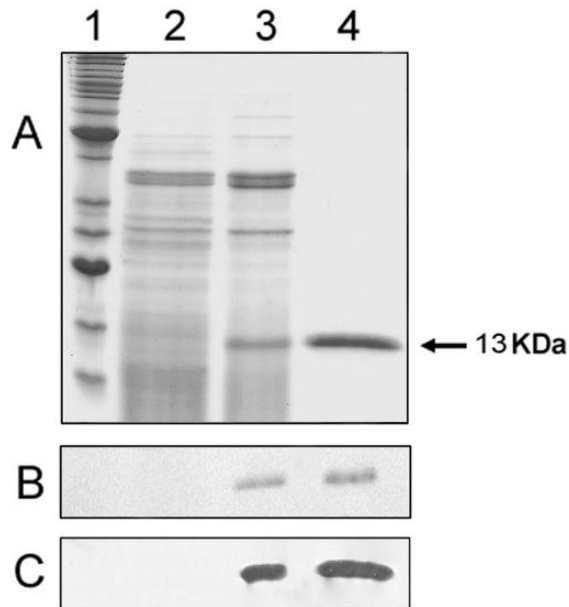
### **4.1. Expressão e purificação da CaneCPI-1**

A ORF correspondente à CaneCPI-1 foi subclonada no vetor de expressão pYADE4 e o vetor recombinante obtido foi sequenciado estando em correta fase de leitura.

Este plasmídeo foi utilizado para transformar células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e posteriormente utilizado para a expressão recombinante da cistatina em sucessivos ciclos de fermentação.

As células de levedura transformadas e não-transformadas (controle), obtidas do quinto reciclo fermentativo foram lisadas, centrifugadas e o sobrenadante utilizado para a purificação do CaneCPI-1 diretamente através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A purificação da proteína recombinante foi eficiente, sendo esta eluída da coluna na fração contendo 250 mM de imidazol. A comparação dos perfis protéicos das leveduras transformadas e não-transformadas por meio da análise em SDS-PAGE 15%, revelou a presença de uma única banda de tamanho esperado, com cerca de 13 kDa, correspondente a CaneCPI-1 fusionada a “cauda” de histidinas, somente no extrato proteico bruto da levedura transformada e na fração purificada contendo 250 mM de imidazol (Figura 6A).

O rendimento da proteína purificada foi de aproximadamente 10 mg por litro de cultura, semelhante ao rendimento obtido anteriormente da mesma proteína expressa de forma recombinante em células de *E. coli* BL21 (DE3) (SOARES-COSTA *et al.*, 2002).



**Figura 5. Análise de expressão, purificação e imunodeteção da CaneCPI-1 recombinante produzida em células de *S. Cerevisiae* PE-2.** (A) Expressão e purificação da CaneCPI-1: SDS-PAGE 15% corado com azul de comassie; (B) Imunodeteção com anticorpo policlonal anti-CaneCPI-1; (C) Imunodeteção com anticorpo comercial anti-His-Tag; Em 1: marcador de massa molecular (Invitrogen); 2: extrato proteico bruto de *S. cerevisiae* PE-2 não-transformadas; 3: extrato proteico bruto de *S.cerevisiae* PE-2 transformadas; 4: fração eluída com 250 mM de imidazol.

#### 4.2. Imunodeteção da CaneCPI-1

Análises de *Western blotting* revelaram que os anticorpos primários utilizados (antiCaneCPI-1 e anti-His-Tag) foram capazes de detectar uma proteína de massa molecular esperado (13KDa) (Figura 6B, 6C). Os anticorpos provaram ser específicos (ou seja, não foram observadas bandas inespecíficas) e permitiram a confirmação da expressão desta proteína ao longo do ensaio fermentativo apenas no último reciclo (Figura 7B, 7C). Não foi detectado a presença da proteína recombinante nos extratos proteicos de células de levedura não-transformadas, conforme o esperado.

#### 4.3. Ensaio fermentativo

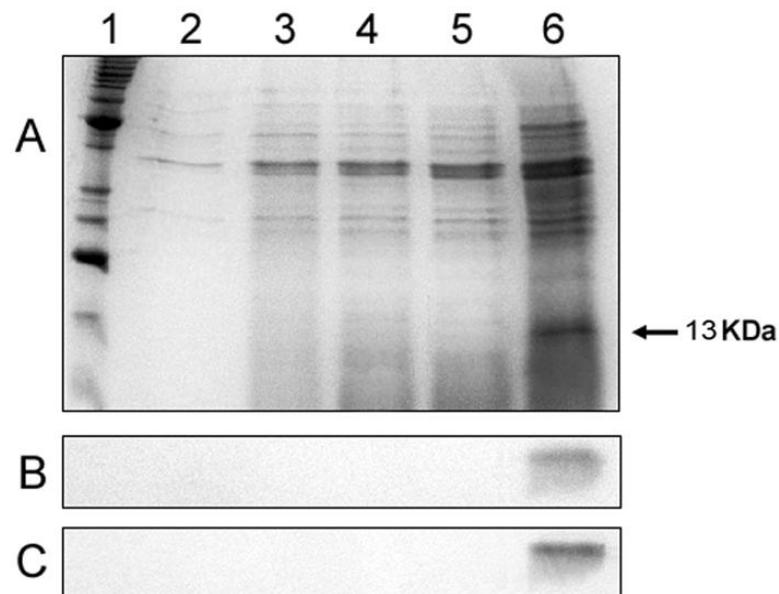
A análise de expressão por SDS-PAGE 15% ao longo do ensaio fermentativo mostrou que nos quatro primeiros ciclos de fermentação, que duram apenas nove horas, não foi detectada a expressão da proteína recombinante. A CaneCPI-1 só foi expressa



no quinto reciclo, visto que, o promotor ADH2 é reprimido na presença de glicose, a transcrição somente foi iniciada quando a glicose no meio estava sendo esgotada, ou seja, ao término das 36h do último reciclo fermentativo (Figura 7A).

A produção desta cistatina na linhagem industrial PE-2 de *S. cerevisiae* ao longo do processo fermentativo se mostrou viável, sendo este sistema de produção recombinante um modelo para síntese de outras proteínas de interesse comercial.

Neste sistema o custo para a produção de proteínas recombinantes seria minimizado, pois estaria embutido no custo do processo de fermentação para a produção de etanol. A única despesa adicional seria em relação à extração e purificação da proteína produzida. Estas técnicas podem ser adotadas pela indústria, caso os resultados sejam satisfatórios e não afetem a produção de álcool. Ou a massa de células de leveduras obtida poderia ser apenas vendida para outras indústrias que seriam responsáveis por esses procedimentos e comercialização da proteína de interesse biotecnológico produzida, agregando valor à produção.



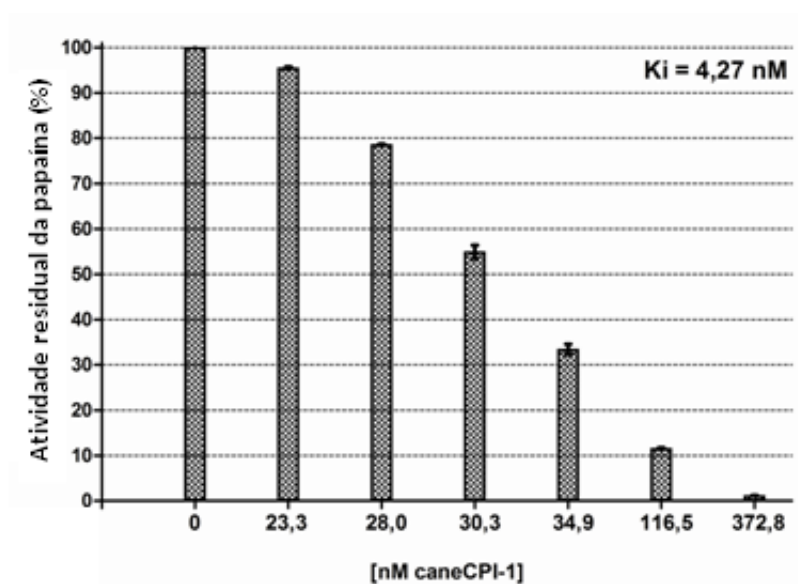
**Figura 7. Análises de expressão e imunodeteção da proteína recombinante em células de *S. cerevisiae* PE-2 transformadas ao longo dos ciclos fermentativos. (A) Expressão da CaneCPI-1 ao**

longo dos ciclos fermentativos: SDS-PAGE 15% corrado com azul de comassie. (B) ) Imunodeteção com anticorpo policlonal anti-CaneCPI-1; (C) Imunodeteção com anticorpo comercial anti-His-Tag; Em 1: marcador de massa molecular (Invitrogen); 2: extrato proteico bruto do primeiro reciclo; 3: extrato proteico bruto do segundo reciclo; 4: extrato proteico bruto do terceiro reciclo; 5: extrato proteico bruto do quarto reciclo; 6: extrato proteico bruto do quinto reciclo.

#### 4.4. Ensaio de atividade inibitória

Os resultados, apresentados na Figura 8, revelaram que a proteína recombinante purificada foi capaz de inibir eficientemente a ação hidrolítica da enzima papaína com um valor de constante inibição ( $K_i$ ) de 4,27 nM. A capacidade inibitória da CaneCPI-1 contra a papaína indica que a proteína recombinante está em sua conformação correta e ativa.

Estudos anteriores, com a proteína CaneCPI-1 expressa em células de *E. coli* BL21, demonstraram uma atividade inibitória sobre papaína com um ( $K_i$ ) de 3,0 nM e que a presença da “cauda” de histidinas não influencia a atividade inibitória (SOARES-COSTA *et al.*, 2002).



**Figura 8. Gráfico demonstrando a curva de inibição da atividade enzimática da papaína pela adição de CaneCPI-1 purificada.** Papaína (0,1 uM) foi ativada pela incubação tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,5 contendo 2,5 mM de DTT. A atividade inibitória foi determinada medindo-se a atividade hidrolítica residual da papaína incubada com diferentes concentrações de inibidor na presença do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA.

#### 4.5. Análises fermentativas

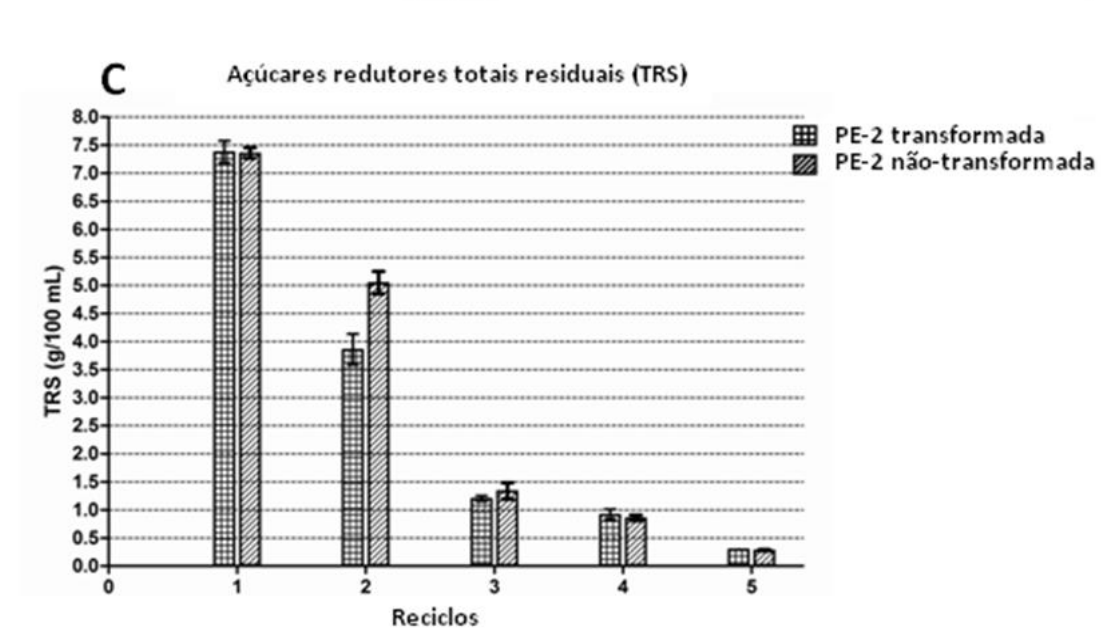
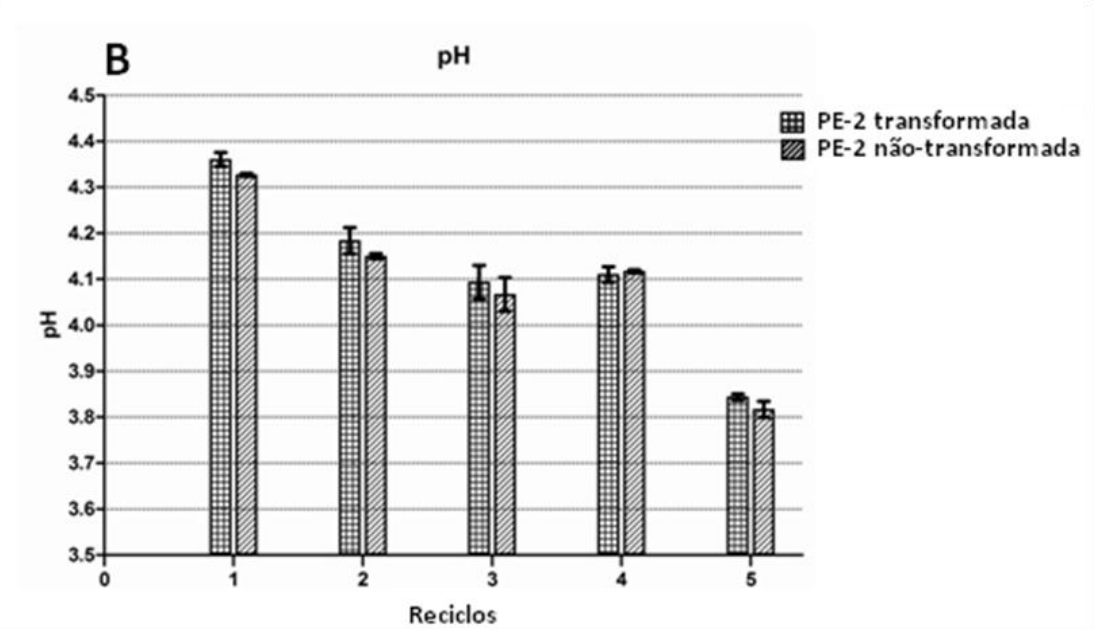
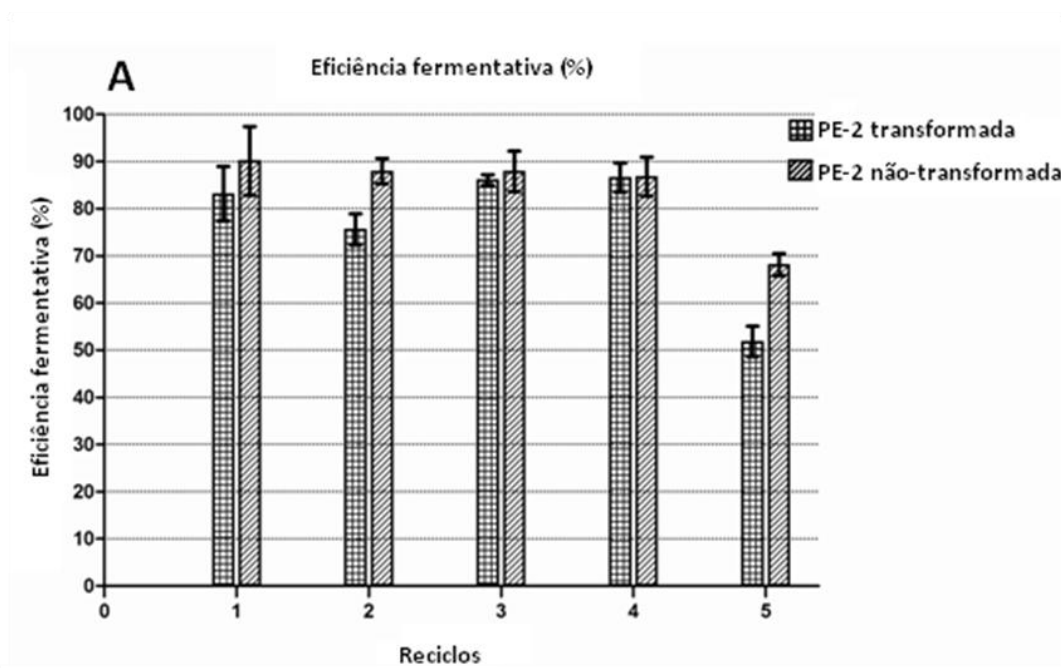
A viabilidade celular da *S. cerevisiae* PE-2 transformada é um importante aspecto no controle da fermentação alcoólica. Quanto maior este valor, maior será o desempenho deste processo.

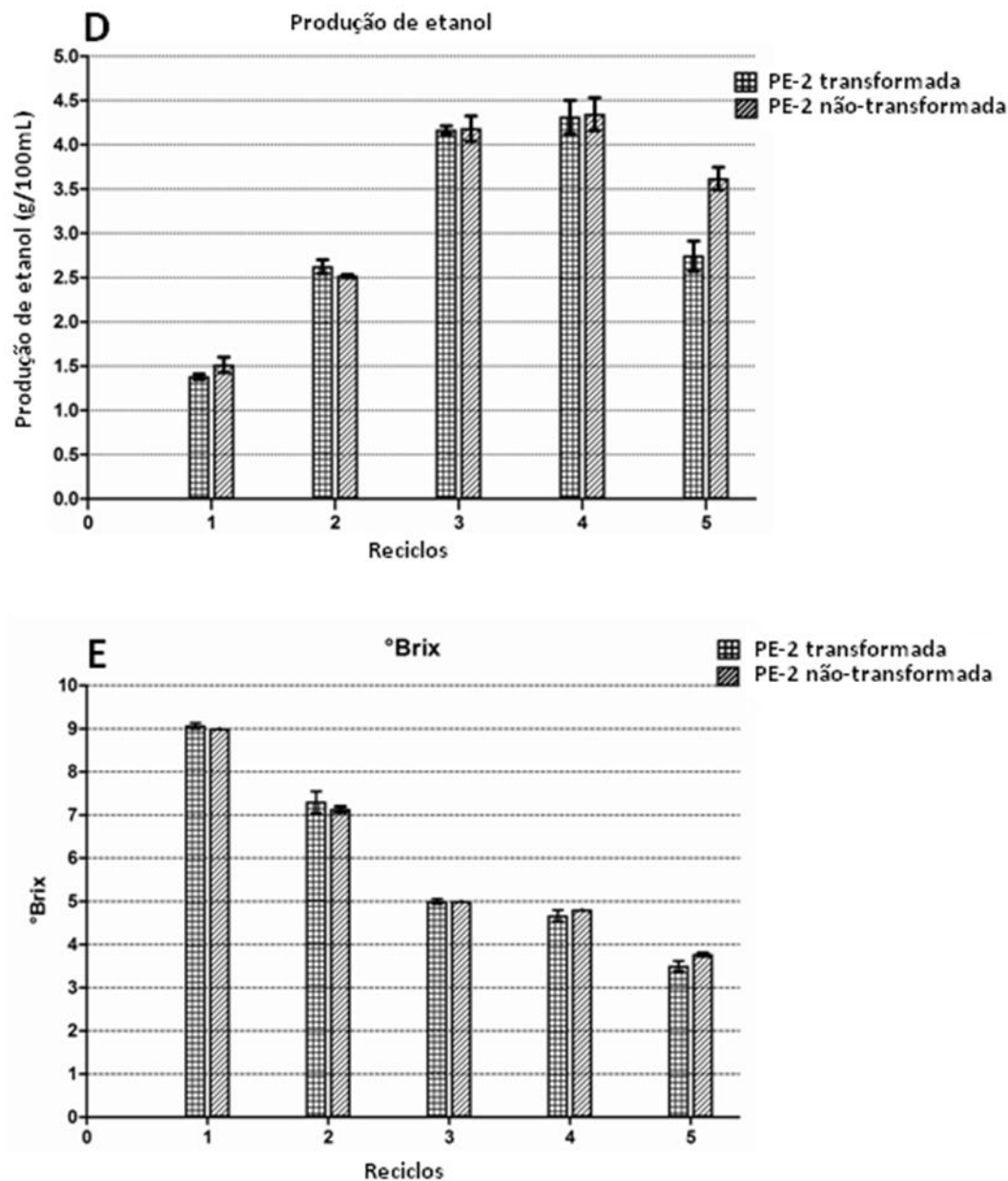
Tanto as leveduras transformadas com o vetor pYADE4\_CaneCPI-1, quanto as leveduras não-transformadas (selvagens), mostraram uma alta viabilidade celular e persistência ao longo dos ciclos fermentativos, apresentando uma queda de 18% e 16,1% respectivamente, desde o início do primeiro ciclo fermentativo até o término do quinto (Tabela 1).

**Tabela 1. Viabilidade celular durante o processo de fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* PE-2.**

	<b>Viabilidade celular (%) início do 1° reciclo fermentativo</b>	<b>Viabilidade celular (%) final do 5° reciclo fermentativo</b>
<b><i>S. cerevisiae</i> PE-2 transformada</b>	<b>98,5</b>	<b>80,5</b>
<b><i>S. cerevisiae</i> PE-2 não-transformada</b>	<b>99,1</b>	<b>83,0</b>

Os valores de pH, °Brix, teor alcoólico, ART residual e eficiência fermentativa obtidos, encontram-se organizados no anexo A. Para a quantificação dos ARTs, foi também necessário a construção de um curva padrão de glicose, da qual efetuou-se a regressão linear e a correlação ( $R^2$ ) entre os valores de concentrações de glicose utilizada e de suas respectivas absorbâncias (Anexo B). Este conjunto de dados foi usado na construção de gráficos para melhor visualização e compreensão destas análises fermentativas (Figura 8).





**Figura 8. Análises fermentativas.** (A): Eficiência fermentativa (%); (B): pH; (C): Açúcares redutores totais residuais (g/100 mL); (D): teor alcoólico (g/100 mL); (E) °Brix; durante o processo de fermentação alcoólica em frascos de 500mL, a 30 °C, utilizando caldo de cana clarificado 12° Brix, inoculo de 20% (v/v), com reciclo de células tanto para linhagem PE-2 transformada, quanto para a linhagem PE-2 não transformada (controle).

A eficiência fermentativa verificada nas usinas sucroalcooleiras varia de 70 a 90%. Esta eficiência está diretamente relacionada a infra-estrutura apresentada pela usina, qualidade da matéria prima utilizada e das condições em que o processo é

estabelecido: fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (concentração de inoculo, contaminação bacteriana, leveduras selvagens) que afetam diretamente o rendimento da fermentação (DORTA *et al.*, 2006).

Ao longo dos quatro primeiros ciclos fermentativos, com duração de 9 horas cada, tanto a linhagem transformada quanto a não-transformada não prejudicaram o processo de fermentação para a produção de etanol, apresentando eficiências fermentativas que condizem com os dados observados nas indústrias sucroalcooleiras (Figura 8A).

No quinto ciclo, a linhagem PE-2 não-transformada (selvagem), apresentou uma diminuição na eficiência fermentativa para cerca de 68,14%. Esse decréscimo deve-se principalmente a exposição das células de levedura por um longo período (36 horas) ao etanol gerado durante a fermentação. O etanol constitui um dos principais agentes inibidores da fermentação e também leva a uma redução na viabilidade das células de levedura, por provocar alterações nas propriedades da membrana celular e nos sistemas de transporte de solutos. Na escassez de açúcares fermentescíveis (ART residual de 0,36 g/100 mL) (Figura 8C) a levedura não-transformada provavelmente consumiu o etanol gerado como subproduto da fermentação, para a produção de energia e manutenção do metabolismo celular.

Em se tratando da linhagem PE-2 transformada verificou-se no quinto ciclo, um declínio acentuado na eficiência fermentativa para cerca de 51,85% (Figura 8A). Neste ciclo, além dos fatores que influenciaram na eficiência da linhagem PE-2 não-transformada, com a redução na concentração de glicose do meio, o promotor ADH2 deixou de ser reprimido, permitindo a produção da CaneCPI-1. A levedura transformada utilizou o etanol produzido como fonte energética tanto para a manutenção do

metabolismo celular quanto para produção da proteína recombinante. Este desvio de rota metabólica, explica a diferença de valores de teor alcoólico observada entre a linhagem PE-2 transformada (2,74 g/100 mL) e não-transformada (3,61 g/100 mL) no último reciclo fermentativo (Figura 8D) e conseqüentemente a diminuição brusca da sua eficiência fermentativa.

A elevação progressiva dos valores de teor alcoólico e o decréscimo nos valores de ART ao longo dos quatro primeiros ciclos de fermentação devem-se a um período de adaptação tanto da levedura transformada quanto da não-transformada ao novo meio de fermentação a qual foram submetidas (12°Brix), já que, os inóculos foram preparados em um meio de multiplicação contendo 4°Brix. Em geral, a homogeneização do processo e estabilização dos valores ocorre por volta do terceiro ou quarto reciclo, levando em consideração o seu curto tempo de duração (9 horas).

Os valores de °Brix (Figura 8E) obtidos foi condizente com o esperado, visto que, o aumento no consumo dos açúcares redutores totais implicou na redução proporcional dos valores de sólidos solúveis presentes no meio de fermentação. Os valores de Brix nos fornecem uma medida rápida da quantidade de sacarose presente no meio, todavia além de sacarose, outros sólidos solúveis estão presentes no meio de fermentação, por isso mesmo que a quantidade de açúcares redutores residuais foi muito pequena ao término do quinto reciclo, os valores de Brix observados se mantiveram elevados (3,5 °Brix PE-2 transformada; 3,77 °Brix PE-2 não-transformada).

À medida que a densidade do meio de fermentação (°Brix) diminuía, ou seja, estavam sendo consumidos os açúcares fermentescíveis presentes no meio, elevaram-se os teores alcoólicos e diminuíram os valores de pH (Figura 8B). O pH é um fator significativo nas fermentações industriais devido sua importância tanto no controle de

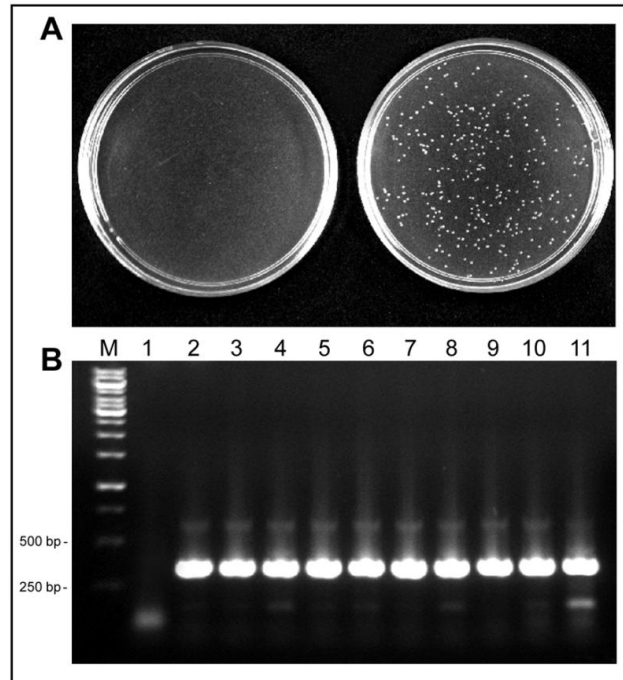
contaminações bacterianas, quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (AMORIM *et al.*, 1996).

O pH ótimo para produção de etanol por *S. cerevisiae* está entre 4 e 5. Nos mostos industriais os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 e 5,5. Desta maneira, a fermentação inicia-se com valores de pH baixos, finalizando com valores entre 3,5 a 4,0. Estes dados conferem com os valores de pH observados. Nos processos com reutilização da levedura, é realizado um tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2 que embora estressante para a levedura, tem efeito benéfico por inibir o crescimento de bactérias contaminantes (AMORIM *et al.*, 1996).

#### **4.6. Isolamento do vetor pYADE4\_CaneCPI-1 a partir da cepa transformada**

Este teste permitiu confirmar que a linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* transformada com o vetor pYADE4\_CaneCPI-1 se manteve estável durante todos os ciclos de fermentação e que este vetor construído se encontra na forma episomal, isto é, não integrado no genoma da levedura, visto que, foi possível transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  CaCl<sub>2</sub> competentes com o DNA total extraído da linhagem PE-2 transformada. Na figura 9A, no lado direito, células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com DNA total extraído de células de *S. cerevisiae* PE-2 transformadas com o plasmídeo pYADE4 CaneCPI-1 e no lado esquerdo foi feito um controle com células de *E. Coli* DH5 $\alpha$  transformadas com DNA total extraído de células *S. cerevisiae* PE-2 do tipo selvagem, onde não foi observado o crescimento de células. A presença da ORF codificadora da proteína CaneCPI-1 foi confirmado por PCR (Figura 9B) onde foi possível visualizar, em gel de agarose 1%, um fragmento de 338 pb correspondente ao produto de amplificação obtido a partir de amostras de DNA de colônias de *E. Coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o vetor recombinante (Figura 9B).





**Figura 9. Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com DNA total extraído de células de *S. cerevisiae* PE-2 transformadas e screening por PCR de colônia.** (A): ao lado esquerdo, placa de Petri contendo *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o DNA total extraído de *S. cerevisiae* PE-2 selvagens (controle) e no lado direito, placa de Petri contendo *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o DNA total extraído de células de *S. cerevisiae* PE-2 transformadas. (B): gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados das amostras de DNA de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com pYADE4\_CaneCPI-1. M: 1 kb DNA ladder; linha 1: controle negativo; linhas 2-11: colônias de bactérias selecionadas.

## 5. CONCLUSÕES

- A construção do vetor pYADE4\_CaneCPI-1 e sua utilização para transformar células da linhagem industrial PE-2 da levedura *S.cerevisiae* (NCYC3233) foram realizadas com sucesso.
- As análises de SDS-PAGE e *Western blotting* revelaram que a proteína recombinante CaneCPI-1 foi expressa somente no último reciclo fermentativo.
- Foi possível purificar a proteína recombinante via cromatografia de afinidade, a partir do extrato protéico bruto, obtido da lise celular de leveduras do último reciclo fermentativo.
- A proteína recombinante purificada foi capaz de inibir eficientemente a atividade hidrolítica da papaína apresentando um valor de *Ki* de 4,27nM.
- A produção da CaneCPI-1 em uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* ao longo do processo fermentativo se mostrou viável.
- A linhagem transformada nos primeiros quatro ciclos fermentativos não prejudicou o processo de fermentação para produção de álcool, mantendo uma eficiência fermentativa similar a observada nas destilarias.
- A cepa transformada se manteve estável durante todos os ciclos de fermentação e o vetor pYADE4\_CaneCPI-1 na sua forma episomal.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; KONDO, H.; ARAI, S. *Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor*. *Agric. Biol. Chem.* v. 51, p. 2763-2768, 1987.
- ABRAHAMSON, M. *Cystatins – Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases*. *Journal of the Brazilian Association of the Advancement of Science*, v. 45, n. 5, p. 299-304, 1993.
- ABRAHAMSON, M. *Cystatins*. *Methods Enzymol*, v. 24, p. 685-700, 1994.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. *Processo de produção de álcool controle e monitoramento*. 2.ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. 1996. p. 103.
- AMORIM, HV. *Fermentação Alcoólica -. Ciência & Tecnologia*. Piracicaba: Editora Fermentec. 2005.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. *Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo: Ed. Edgarg Blücher Ltda. 2001; v.5, p. 1-43.
- ARAI, S. *et al. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. A Review*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6612-6617, 2002.
- ARGUESO, J.L. *et al. Genome structure of a Saccharomyces cerevisiae strain widely used in bioethanol production*. *Genome Res.* v. 19, p. 2258-2270, 2009.
- BARNETT, J.A. *Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research*. *Microbiology*. v.149, p. 557-567, 2003.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, F.J.; *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2<sup>a</sup> ed. London: Academic Press; 1998.
- BARRETT, A. J. *The Cystatins, a new class of peptidase inhibitors*. *Trend Biochemistry Science*, v. 12, p. 193-196, 1987.

- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, F.J. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2. ed. London: Elsevier Academic Press, 1998.
- BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2. Ed. London: Elsevier Academic Press, 2004.
- BEYNON, R. J.; BOND, J. S. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, 1989.
- BOTELLA, M. A. *et al.* *Diferential expression of soybean cysteine peptidase inhibitor genes during development and response to wounding and methyl jasmonate*. *Plant Physiology*, v. 112, p. 233-238, 1996.
- BRADFORD, M.M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRODWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. *Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larva Heliothis zea and Spodpeta exigua*. *J Insect Physiol*, v.32, p. 827-833, 1996.
- BRUNELLI, J.P.; PALL, M.L. *A series of yeast/E.coli expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and cre/Iox-mediated plasmid excision*. *Yeast*. v. 9, p. 1309-1318, 1993.
- CARDOSO, M.G. *Produção de aguardente de cana*. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 444.
- CECCATO-ANTONINI, S.R. *Microbiologia da fermentação alcoólica*. São Carlos: EdUFSCar, 2010. p. 103.
- CECCATO-ANTONINI, S.R., PARAZZI, C. *Monitoramento microbiológico da fermentação etanólica: uma experiência*. Ribeirão Preto: Jornal cana, 2000. p. 25-26.
- CHEN, J.M. *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. *FEBS Lett*. v.3, p.361-365, 1998.

COLELLA, R.; CASEY, S.F. *Decreased activity of cathepsin L + B and decreased invasive ability of PC3 prostate cancer cells*. Biotechnic & Histochemistry. v. 78, p. 101-108, 2003.

DICKINSON, D. P. *Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease*. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. v. 13, p. 238-275, 2002.

DORTA, C. *et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of Saccharomyces cerevisiae (PE-2 and M-26)*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 22, p. 177-182, 2006.

FALCÃO DE MORAIS, J.O. *Zymomonas mobilis research in the Pernambuco Federal University*. J. Biotechnol. v. 31, p.75-91, 1993.

FINKENSTAEDT, J. T. *Intracellular distribution of proteolytic enzymes in rat liver tissue*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 95, p. 302-304, 1957.

GATEHOUSE, A.M.R. *et al. Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of Callosobruchus maculatus*. Entomologia Experimentalis et Applicata. v.39, p. 279-286, 1985.

GIANOTTI, A. *et al. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (Saccharum officinarum)*. Protein Expression and Purification, v. 47, p. 483-489, 2006.

GUERRA, J.B. *et al. Genetic diversity of Saccharomyces cerevisiae strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the arthisanal Brazilian cachaça*. Letters in Applied Microbiology. v. 33, p. 106-111, 2001.

HINES, M. E.; OSUALA, C. I.; NIELSEN, S. S. *Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of Coleopteran digestive proteolytic activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 39, p. 1515-1520, 1991.

INANAGA, H. *et al. Protein engineering of novel proteinases inhibitors and their effects on the growth of Spodoptera exigua larva*. Biosc. Biotechnol. Biochem. v. 65, n. 10, p. 2259-2264, 2001.

- JOSHI, B. N. *et al.* *Cysteine Peptidase Inhibitor from Pearl Millet: A new class of antifungal protein.* Chemical and Biophysical Research Communication, v. 246, p. 382-387, 1998.
- KNIGHT, C.G. *The characterization of enzyme inhibition.* In: BARRETT, A.J.; SALVESEN, G. (Eds.). *Proteinase Inhibitors.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1986. p. 23-51.
- KONDO, H. *et al.* *Gene organization of oryzacystatin-II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins.* FEBS Lett. v. 278, n. 1, p. 87-90, 1991.
- KURODA, M. *et al.* *Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins.* Biosc. Biotechnol. Biochem. v. 65, p. 22-28, 2001.
- LEE, S.S.; ROBISON, F.M.; WANG, H.Y. *Rapid determination of yeast viability.* Biotech. Bioeng. v. 11, p. 641-649, 1981.
- LEUNG-TOUNG, R.; LI, W.; TAM, T. F.; KARIMIAN, K. *Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review.* Current Medicinal Chemistry, v. 9, p. 979-1002, 2002.
- LIMA, U.A.; BASSO, L.C. AMORIM, H.V. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos E Enzimáticos.* São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 3. p. 616.
- LIU, C. *et al.* *Overexpression of Legumain in Tumors Is Significant for Invasion/Metastasis and a Candidate Enzymatic Target for Prodrug Therapy.* Cancer research. V. 63, p. 2957-2964, 2003.
- MAIA, A.B.R.A. *Fundamentos de fermentação alcoólica.* 1989. p. 129. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989. (Apostila do curso de Engenharia Química).
- MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. *Structural and Philogenetic Relationships among Plant and Animal Cystatins.* Archives of biochemistry and biophysics, v. 359, n. 1, p. 24-30, 1998.

MARTELLI, H.L.; PANEK, A.D. *Bioquímica experimental*. Rio de Janeiro: Livro Técnico. 1968, p. 112.

MARTINEZ, M. *et al.* *Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases*. FEBS Letters. v. 58, p. 2914-2918, 2007.

MÉNARD, R. *Structure-function studies in the papain family of cysteine peptidases*. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, v. 45, p. 292-298, 1993.

OLIVA, M. L. V. *et al.* *Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 320, p. 1082-1086, 2004.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. *Cysteine proteinases and Cystatins. A Review*. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 46, p. 91-104, 2003.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 64, p. 34-50, 2000.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. *Cysteine proteases and their inhibitors*. Chemical Reviews, v. 97, p. 133-171, 1997.

PATARO, C. *et al.* *Yeast communities and genetic polymorphism of Saccharomyces cerevisiae strains associated with artisanal fermentation in Brazil*. Journal of Applied Microbiology. v. 88, p.1-9, 2000.

PERNAS, M. *et al.* *A chestnut seed cystatin differentially effects against cysteine proteinases from closely related pests*. Plant. Mol. Biol., v. 38, p. 1235-1242, 1998.

RANDALL, W.K. *How proteolysis drives the cell cycle*. Science. v. 274, p. 1652-1659, 1996.

RASSAM, M.; LAING, W. A. *Purification and characterization of phytocystatins from kiwifruit cortex and seeds*. Phytochemistry, v. 65, p. 19-30, 2004.

- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. *Families of cysteine peptidases*. *Methods Enzymology*, v. 244, p. 461-486, 1994.
- RAWLINGS, N. D. *et al.* *The peptidase database*. *Nucleic Acids Research*, v. 34, D270-D272, 2006.
- ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE J.J. *Foreign Gene Expression in Yeast: a Review*. *Yeast*. v. 8, p. 423-488, 1992.
- ROWAN, A. D.; BUTTLE D. J.; BARRETT A. J. *The cysteine proteinases of the pineapple plant*. *Biochem. J.*, v. 266, p. 869-875, 1990.
- RYAN, C. A. *Peptidase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens*. *Annu. Rev. Phytopathol*, v. 28, p. 425-449, 1990.
- SALVESEN, G. *et al.* *Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases*. *Biochem. J.* v. 234, p. 429-434, 1986.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANGER, F. *et al.* *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 74, p.5463–5467, 1977.
- SHYU, D. J. H. *et al.* *Cloning, Functional Expression, and Characterization of Cystatin in Sesame Seed*. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 52, p. 1350-1356, 2004.
- SOARES-COSTA, A. *et al.* *A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 296, p. 1194-1199, 2002.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE ,C.L. *Microbiology*. 4 ed. Califórnia: Art Méd. 2002.
- TURK, B.; TURK, V.; TURK, D. *Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors*. *Biol. Chem.* v. 378, p. 141-150, 1997.



ULRICH, K. *Comparative animal biochemistry*. 1. Ed. Nova Iorque: Springer Verlag Pod, 1994.

YANG, A. H.; YEH, K. W. *Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (Colocasia esculenta cv. Kaosiung no. 1)*. *Planta*, v. 4, p. 493-501, 2005.

ZAJC, I. *et al.* *Expression of cysteine peptidase cathepsin L and its inhibitors stefins A and B in relation to tumorigenicity of breast cancer cell lines*. *Cancer Letters*. v.187, p.185-190, 2002.

ZURBRIGGEN, B, *et al.* *Pilot scale production of a heterologous Trichoderma reesei cellulase by Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. v. 13, p. 267-278, 1990.

ZWIRSKA-KORCZALA, K, *Influence of thyroxine on serum soluble interleukin-2 receptor alpha levels in thyroid disorders*. *J Clin Pharm Ther.*; n. 29; v. 2, p. 151-156, 2004.

## ANEXOS

**Anexo A. Análises fermentativas.** Valores de pH, teor alcoólico, ART residual e eficiência fermentativa, durante a fermentação alcoólica, em frascos de 500ml, a 30 °C, utilizando caldo de cana clarificado (12° Brix), inóculo de 20% (v/v), com reciclo celular, por células de *S. cerevisiae* PE-2 transformadas e não transformadas. Os ensaios foram realizados em triplicata e a média dos valores obtidos com seus respectivos desvios padrão usados para a formulação dos gráficos visualizados na figura 8.

Levedura	Reciclo	°Brix	pH	teor alcoólico (g/100mL)	ART residual (g/100mL)	eficiência fermentativa (%)
PE-2 transformada	1	5	4,33	1,34	6,99	71,69
PE-2 transformada	1	5,1	4,38	1,36	7,63	87,89
PE-2 transformada	1	4,9	4,37	1,44	7,52	89,90
PE-2 transformada	2	4,8	4,16	2,77	3,56	76,19
PE-2 transformada	2	4,8	4,24	2,51	3,61	69,60
PE-2 transformada	2	4,4	4,15	2,59	4,41	81,02
PE-2 transformada	3	4,1	4,02	4,21	1,13	86,34
PE-2 transformada	3	4	4,13	4,21	1,29	87,90
PE-2 transformada	3	4	4,13	4,07	1,19	84,04
PE-2 transformada	4	4	4,08	4,60	0,78	91,16
PE-2 transformada	4	3,9	4,14	3,95	1,09	80,75
PE-2 transformada	4	3,7	4,11	4,38	0,89	87,84
PE-2 transformada	5	3,7	3,83	2,86	0,29	54,08

PE-2 transformada	5	3,5	3,85	2,96	0,30	55,96
PE-2 transformada	5	3,3	3,85	2,41	0,24	45,52
PE-2 não-transformada	1	5	4,32	1,68	7,52	104,67
PE-2 não-transformada	1	5	4,33	1,38	7,36	81,88
PE-2 não-transformada	1	5	4,33	1,48	7,20	83,84
PE-2 não-transformada	2	4,8	4,14	2,55	4,68	83,39
PE-2 não-transformada	2	4,8	4,16	2,49	5,10	87,66
PE-2 não-transformada	2	4,8	4,15	2,51	5,37	92,76
PE-2 não-transformada	3	4	4,03	4,42	1,52	94,74
PE-2 não-transformada	3	4	4,14	3,93	1,05	80,01
PE-2 não-transformada	3	4	4,03	4,19	1,44	88,90
PE-2 não-transformada	4	4	4,12	3,97	0,77	78,52
PE-2 não-transformada	4	4	4,12	4,50	0,94	90,65
PE-2 não-transformada	4	4	4,11	4,56	0,87	91,18
PE-2 não-transformada	5	3,8	3,81	3,46	0,35	65,17
PE-2 não-transformada	5	3,8	3,79	3,87	0,39	72,84
PE-2 não-transformada	5	3,7	3,85	3,52	0,35	66,41

**Anexo B. Curva de glicose padrão.** A equação da reta obtida foi utilizada para gerar os valores de ART em (g/100 mL) a partir das leituras de absorbância de cada amostra e sua respectiva diluição.

