

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

SAMANTA GABRIELA SOUZA DA SILVA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LISOZIMA DE
ANOPHELES DARLINGI EM *PICHTIA PASTORIS*

MANAUS - AM
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SAMANTA GABRIELA SOUZA DA SILVA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
LISOZIMA DE *ANOPHELES DARLINGI* EM *PICHA*
PASTORIS

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: PROF. Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. EDSON JÚNIOR DO CARMO

MANAUS - AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586c Silva, Samanta Gabriela Souza da
Clonagem, expressão e caracterização de lisozima de *Anopheles darlingi* em *Pichia pastoris*. / Samanta Gabriela Souza da Silva.
2019
68 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Coorientador: Edson Júnior do Carmo
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. enzima. 2. lisozima. 3. bactericida. 4. levedura. 5. metilotrófica.
I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título



135ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 24 de junho (segunda-feira) de 2019, às 09:00h, no auditório do Bloco M, Mini-Campus, Setor Sul – UFAM. **Samanta Gabriela Souza da Silva** defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: "Clonagem, expressão e caracterização de lisozima de *Anopheles darlingi* em *Pichia pastoris*."

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Edson Junior do Carmo	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Edson Junior do Carmo</u> CPF: <u>000.247.231-84</u>
Dra. Sonia Maria da Silva Carvalho	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Sônia Maria da Silva Carvalho</u> CPF: <u>300727.272-68</u>
Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Isabelle B. Cordeiro</u> CPF: <u>743.877.502-91</u>

Manaus, 24 de junho de 2019.

Resultado Final: Aprovado (a) (X)
Reprovado (a) ()



Coordenador PPGBIOTEC/UFAM

Coordenador PPGBIOTEC/UFAM

AGRADECIMENTOS

À minha família, o porto seguro, que me apoiou e incentivou nessa caminhada e que me auxiliou em tudo que pôde para eu continuar mesmo diante das dificuldades que surgiram no caminho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. Sem esta não poderia dar prosseguimento aos estudos e atividades de pesquisa.

Aos meus orientadores Spartaco Astolfi-Filho, que aceitou me orientar mesmo sem me conhecer. E, Edson Júnior do Carmo que aceita os desafios junto comigo desde a especialização e agora, se fez presente e essencial durante o mestrado. Agradeço imensamente os ensinamentos, o profundo conhecimento, sabedoria e paciência que compartilharam comigo.

Aos membros da banca de qualificação e defesa por contribuírem com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes do PPG-BIOTEC, pelo tempo, disposição e conhecimento ministrado durante as disciplinas do mestrado.

À equipe e Coordenação do PPG-BIOTEC pelo auxílio nas questões administrativas.

À equipe do CAM, Paulo, Dona Elza, Patrícia, Elen, Dina e Carmem pelas dicas, sugestões e amparo especialmente em relação ao uso dos equipamentos. Ao Dr. Marcos Pessoa pela doação do substrato enzimático.

Aos meus colegas de mestrado, Tarcila, Jennifer, André, Dib, Paulo, Jander, Larissa, Minerval e Hudison por estarem sempre apoiando e incentivando uns aos outros. Em especial, Tarcila e Jennifer por estarem dispostas a tomar café, conversar e espairecer sempre que possível. André, Jander e Minerval pela ajuda mútua nos laboratórios.

Aos colegas de laboratório e de café, sim café de novo, Lanna, Cida, Pamella, Jéssica, Anita, Hayssa, Elisangela, Samara, Kerollen e Diego pelas conversas em momentos difíceis, pelo compartilhamento de conhecimento, pelas risadas e loucuras (oooo), pelos lanches nas horas apropriadas e pela amizade.

Aos amigos que a Biologia trouxe e que se fizeram presentes, mesmo com a distância, Raquel, Itamara, Polliana e Demetrius. Obrigada meu povo lindo. Amo vocês.

Às minhas amigas Tati, Glauciane, Ana Meire e Suzzy que estiveram presentes e sempre dispostas a sair mesmo eu dizendo que não. Amo vocês.

A todos que participaram direta e indiretamente desta jornada que teve momentos difíceis e angustiantes mas também foi repleta de momentos de risada alegrias, de conhecimento, paciência e tudo isso regado com muito café, claro.

Obrigada meu Deus por proporcionar mais um degrau na escalada do conhecimento e por permitir que eu tenha saúde e disposição na caminhada. Que não nos falte fé para continuar. Obrigada!

Tenho-vos dito isto, para que em mim
tenhais paz; no mundo tereis aflições,
mas tende bom ânimo, eu venci o
mundo.

João 16:33

RESUMO

Desde a sua descoberta em 1922 por Alexander Fleming, a lisozima tornou-se um dos modelos enzimáticos mais estudados, devido ao seu mecanismo de ação como barreira natural de defesa contra microrganismos, especialmente bactérias gram-positivas. Na natureza, a lisozima é dividida em 6 tipos: tipo C, tipo G, tipo I, fúngico e bacteriano, fagos e plantas com características diferenciadas. Esta pesquisa tem como objetivo clonar e expressar a lisozima de *Anopheles darlingi* na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Para este fim, uma cassette de expressão foi montado para inserção do gene da lisozima sintética de *Anopheles darlingi* no genoma da *Pichia pastoris* usando o vector de expressão pPIC9, confirmado por análise de restrição com as enzimas *EcoRI* e *NotI*. O cassette de expressão foi introduzida em *P. pastoris* por eletroporação, e 40 clones resultantes da transformação foram selecionados em meio mínimo sem aminoácidos. A técnica de imunodeteccção cromogênica Western Breeze confirmou 39 clones recombinantes produtores de lisozima detectando a cauda de histidina presente na porção C-terminal no gene da lisozima. O uso do promotor AOX1 na cassette de expressão permitiu a indução dos clones recombinantes com metanol a 1% por 96 horas em fermentação submersa e a confirmação da expressão da proteína foi realizada pela análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condição desnaturante SDS-PAGE 15% onde a presença da lisozima foi detectada em aproximadamente 14 kDa. A caracterização da enzima mostrou que a lisozima de *A. darlingi* possui aspectos distintos em relação a lisozima do ovo de galinha. Os resultados obtidos demonstram a capacidade que a levedura *Pichia pastoris* possui de expressar a lisozima e demonstram a agregação de potencial biotecnológico a esta pesquisa.

Palavras – Chave: enzima, lisozima, bactericida, levedura, metilotrófica.

ABSTRACT

Since its discovery in 1922 by Alexander Fleming, lysozyme has become one of the most studied enzymatic models, due to its mechanism of action as a natural defense barrier against microorganisms, especially gram-positive bacteria. In nature, lysozyme is divided into 6 types: type C, type G, type I, fungal and bacterial, phages and plants. This research aims to clone and express the lysozyme of *Anopheles darlingi* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. To this end, an expression cassette was assembled for insertion of the synthetic lysozyme gene of *Anopheles darlingi* into the *Pichia pastoris* genome using the pPIC9 expression vector, confirmed by restriction analysis with the *EcoRI* and *NotI* enzymes. The expression cassette was introduced into *P. pastoris* by electroporation, and 40 clones resulting from the transformation were screened in minimal medium lacking amino acids. The Western Breeze chromogenic immunodetection technique confirmed 39 recombinant lysozyme-producing clones detecting the histidine tail present in the C-terminal portion in the lysozyme gene. The use of the AOX1 promoter in the expression cassette allowed the induction of the recombinant clones with 1% methanol for 96 hours in submerged fermentation and the confirmation of protein expression was performed by the electrophoretic analysis in polyacrylamide gel in denaturing condition SDS-PAGE 15% where the presence of lysozyme was detected at approximately 14 kDa. The characterization of the enzyme showed that *A. darlingi* lysozyme has distinct aspects regarding chicken egg lysozyme. The results obtained demonstrate the ability of *Pichia pastoris* yeast to express lysozyme and demonstrate the possible biotechnological potential aggregation to this research.

Keywords: enzyme, lysozyme, bactericidal, yeast, methylotrophic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura de uma unidade repetida de peptidoglicano de parede celular bacteriana (pg. 17)
- Figura 2. Diferenças entre as paredes celular bacteriana (pg. 17)
- Figura 3. Mapa físico do vetor de clonagem pBSK lisozima de *Anopheles darlingi* (pg. 30)
- Figura 4. Mapa físico do vetor de expressão pPIC/gla baseado no vetor pPIC9 (pg. 31)
- Figura 5. Análise do perfil de restrição dos plasmídeos pBSK/lis e pPIC/gla (pg. 44)
- Figura 6. Mapa físico do plasmídeo recombinante pPIC-ES (pg. 45)
- Figura 7. Confirmação da subclonagem do gene de lisozima em pPIC (pg. 46)
- Figura 8. Perfil eletroforético da extração do DNA de clones de leveduras transformantes (pg. 47)
- Figura 9. Análise da presença do gene de lisozima em clones de leveduras transformantes por PCR (pg. 48)
- Figura 10. Análise da expressão das colônias de pPIC-ES através do teste de *colony blot* (pg. 49)
- Figura 11. Análise da expressão das colônias de pPIC-ES através do teste de *colony blot* (pg. 49)
- Figura 12. Contagem de células viáveis e inviáveis de *P. pastoris* produtora de lisozima (pg. 50)
- Figura 13. Confirmação da expressão de lisozima por *Pichia pastoris* em gel de poliacrilamida 15% (pg.51)
- Figura 14. Lise do substrato *M. lysodeiktycus* (pg. 52)
- Figura 15. Ensaio turbidimétrico de *P. pastoris* lisozima e *P. pastoris* GS115 (pg. 53)
- Figura 16. Avaliação de temperatura ótima para atividade de lisozima recombinante de *A. darlingi* (pg. 55)

LISTA DE ABREVIATURAS

PI	-----	Ponto isoelétrico
kDa	-----	Kilodalton
pH	-----	Potencial hidrogeniônico
BLA	-----	Bactérias lácticas
DNA	-----	Ácido desoxirribonucleico
Kg	-----	Kilograma
GRAS	-----	Generally regarded as safe
AOX	-----	Álcool oxidase
GAP	-----	Gliceraldeído-5-fosfato
pFLDI	-----	Formaldeído desidrogenase 1
pGUT 1	-----	Glicerol quinase
Mut ⁺	-----	Methanol utilization plus
Mut ^s	-----	Methanol utilization slow
Mut ⁻	-----	Methanol utilization minus
ZEO _r	-----	Resistência a Zeocina
GLA	-----	Glicoamilase
tGH	-----	Hormônio de crescimento de tambaqui
pBSK	-----	Vetor de clonagem pBlueScript K
NCBI	-----	National Center of Biotechnology Information
LB	-----	Luria-Bertani
OD	-----	Densidade Ótica
EDTA	-----	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
SDS	-----	Dodecil Sulfato de Sódio
NEB	-----	New England Biolabs
UV	-----	Ultra violeta
PB	-----	Pares de base
KB	-----	Kilobase
PCR	-----	Reação de Polimerase em Cadeia

YPD	-----	Yeast extract – Peptone- Dextrose
MD	-----	Minimal Dextrose Medium
dNTP	-----	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Pmol	-----	Picomol
µg	-----	Micrograma
µl	-----	Microlitro
BMGY	-----	Buffered Glycerol Complex Medium
BMMY	-----	Buffered Methanol Complex Medium
PBST	-----	Phosphate Buffered Saline Tween
PBS	-----	Phosphate Buffered Saline
TCA	-----	Ácido Tricloroacético
mM	-----	Milimolar
MG	-----	Miligrama

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO-----	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	16
2.1	Lisozima -----	16
2.2	Lisozima De Invertebrado-----	21
2.3	Aplicações da Lisozima-----	23
2.4	Mercado De Enzimas -----	25
2.5	A Levedura <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella phaffii</i>) Como Sistema De Expressão Heteróloga.-----	26
3.	OBJETIVOS GERAL E ESPECIFICOS-----	28
3.1	Objetivo Geral-----	28
3.2	Objetivos Específicos -----	28
4.	MATERIAIS E MÉTODOS -----	29
4.1	Estratégia-----	29
4.2	Linhagens Hospedeiras -----	29
4.3	Vetores Utilizados -----	30
4.4	Montagem De Vetor De Expressão E Secreção Em Levedura-----	32
4.4.1	Preparo de células competentes para transformação e multiplicação dos vetores. 32	
4.4.2	Transformação bacteriana-----	32
4.4.3	Extração DNA plasmidial-----	33
4.4.4	Análise de restrição com endonucleases -----	34
4.4.5	Purificação do gene da lisozima e do vetor de expressão e secreção pPIC9. ---	34
4.4.6	Ligação da região estrutural do gene de lisozima no vetor de expressão e secreção pPIC9 pPIC9 35	
4.4.7	Transformação bacteriana para multiplicação do vetor quimera (pPIC9/lisozima) 35	
4.4.8	Análise de restrição para confirmação da subclonagem do gene lis no vetor de expressão e secreção pPIC9 -----	36
4.5	Transformação Genética De Levedura E Integração Do Vetor No Genoma De <i>Pichia pastoris</i> .-----	36
4.5.1	Preparo de levedura <i>Pichia pastoris</i> competentes para transformação genética	36

4.5.2	Linearização do cassete de expressão -----	36
4.5.3	Transformação da levedura por eletroporação -----	37
4.5.4	Confirmação da integração do gene <i>lis</i> no genoma da levedura-----	37
4.5.4.2	Amplificação do cassete de expressão por PCR para detecção da integração do gene <i>lis</i> -----	38
4.6	Produção E Caracterização Da Lisozima Recombinante -----	38
4.6.1	Confirmação da expressão de lisozima de <i>A. darlingi</i> em <i>P. pastoris</i> -----	38
4.6.2	Indução em placa dos clones recombinantes para análise de expressão por imunodeteção -----	39
4.6.3	Análise dos recombinantes por <i>colony blot</i> -----	39
4.6.4	Produção da lisozima por cultivo submerso -----	40
4.6.5	Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida para confirmação da expressão de lisozima-----	41
4.7	Ensaio Da Atividade Enzimática Da Lisozima-----	42
4.7.1	Avaliação da influência do pH na atividade da lisozima -----	43
4.7.2	Efeito da temperatura na atividade da lisozima -----	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	44
5.1	Integração Do Cassete De Expressão No Genoma De <i>Pichia pastoris</i> -----	44
5.2	Transformação E Integração Do Cassete De Expressão No Genoma Da Levedura <i>Pichia pastoris</i> -----	46
5.3	Produção E Atividade Da Proteína Recombinante-----	48
5.4	Ensaio Da Atividade Enzimática Da Lisozima-----	52
5.4.1	Efeito da variação pH na atividade da lisozima recombinante -----	53
5.4.2	Influência da temperatura na reação enzimática-----	55
6.	CONCLUSÕES -----	57
7.	REFERÊNCIAS -----	58

1. INTRODUÇÃO

A lisozima se tornou um dos modelos enzimáticos mais estudados e tem sido amplamente utilizada na biotecnologia por possuir ação antimicrobiana. (JOLLÈS E JOLLÈS, 1984; IBRAHIM *et al.*, 2002; SCHENBERG *et al.*, 2010; SAHOO *et al.*, 2012).

Esta enzima encontra-se dividida na natureza em seis tipos, seguindo a classificação dos organismos de origem ou em cinco famílias quando se considera propriedades bioquímicas. Está distribuída de forma diversificada atuando na defesa contra infecções bacterianas ou auxiliando na digestão de ruminantes e insetos. As características diferenciadas das lisozimas digestivas, como pH ácido, em especial das lisozimas de insetos, atraíram a atenção de diversos pesquisadores (JOLLÈS E JOLLÈS, 1984; PIMENTEL, 1991; TERRA, FERREIRA, 1994; REGEL *et al.*, 1998; ALMEIDA, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2006; CANÇADO *et al.*, 2007; URSIC-BEDOYA *et al.*, 2008; CANÇADO, 2008; RUAS, 2010; ZHAO *et al.*, 2010).

Neste contexto, o estudo de lisozimas provenientes de mosquitos é primordial. Em especial o gênero *Anopheles*, de grande interesse epidemiológico por causarem malária. No Brasil, especialmente na região Amazônica, o *Anopheles darlingi* é o principal vetor da doença. Kajla *et al.*, em 2011, publicaram um trabalho sobre a atuação da lisozima no desenvolvimento do *Plasmodium* nos mosquitos do gênero *Anopheles* e, incentivaram o estudo destas lisozimas para compreensão deste mecanismo a fim de se interromper a transmissão deste parasita. Em 2018, uma pesquisa publicada por Wang *et al.*, afirmou que a lisozima encontrada tipicamente em invertebrados não é tão estudada quanto as lisozimas do tipo C presentes em mamíferos, sugerindo que as lisozimas de invertebrados podem ter funções ainda não determinadas. Behbahani *et al.*, 2018, publicaram uma pesquisa determinando a atividade anti-HIV-1 das lisozimas encontradas em galinha, codorna e em aves do gênero *Meleagris*. Segundo os pesquisadores, essa atividade pode ser encontrada em todos os tipos de lisozimas e, sugeriram que as lisozimas testadas podem ser candidatas a terapia contra HIV-1 (TADEI *et al.*, 1988; KAJLA *et al.*, 2011; BEHBAHANI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

Neste cenário, aprofundar o conhecimento sobre as lisozimas provenientes de invertebrados é de suma importância, especialmente com a possibilidade de utilização da lisozima no combate as doenças como a malária e AIDS. Tendo em vista o escasso

conhecimento sobre as lisozimas de invertebrados, este estudo faz se primordial para a realização de trabalhos futuros. Para realização desta pesquisa, o gene da lisozima proveniente de *Anopheles darlingi* foi clonado e expressado utilizando a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas e as condições de reação enzimática foram determinadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

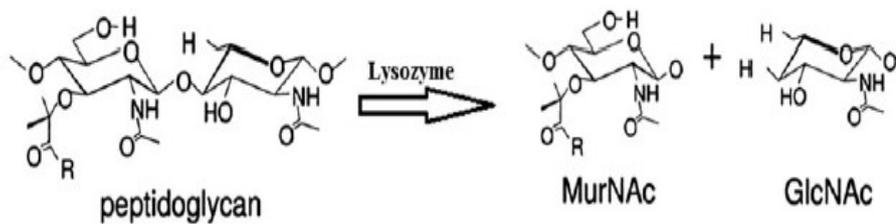
2.1 Lisozima

Desde sua descoberta em 1922 por Alexander Fleming, a lisozima se tornou um dos modelos enzimáticos mais estudados. Foi a primeira proteína a ter sua sequência primária de aminoácidos determinada, a primeira submetida a cristalografia em raio – x e a primeira a ter seu mecanismo de ação proposto (BLAKE *et al.*, 1965).

A lisozima (EC 3.2.1.17) é uma enzima de baixa massa molecular, geralmente possui 14 kDa, podendo variar entre 11 a 25 kDa contendo 129 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico (pI) de 10.5 – 11.0. São proteínas de estruturas oligoméricas e em sua estrutura polipeptídica há quatro ligações dissulfeto importantes para estabilidade da enzima. A atividade enzimática da molécula é perdida se pelo menos duas das ligações dissulfeto não estiverem intactas ou se todas as ligações estiverem reduzidas. Lisozimas possuem um núcleo hidrofóbico com cadeia de aminoácidos hidrofílicos voltados para a superfície conferindo estabilidade à proteína (JOLLÈS E JOLLÈS, 1984; ALMEIDA, 2003).

Estas enzimas, também conhecidas como muramidases, são capazes de hidrolisar as ligações 1,4 β - glicosídicas entre o ácido *N*-acetilmurâmico (NAM) e *N*-acetilglicosamina (NAG) dos resíduos de peptidoglicano da parede celular das bactérias (Figura 1). Como resultado da hidrólise, as células bacterianas ficam susceptíveis ao choque osmótico, e por isso são facilmente lisadas (DIAS, 2010).

Figura 1. Estrutura de uma unidade repetida de peptidoglicano de parede celular bacteriana. A estrutura é formada por NAG (*N*-acetilglicosamina), NAM (ácido *N*-acetilmurâmico) e um tetrapeptídeo comum em parede de bactérias Gram-negativas.

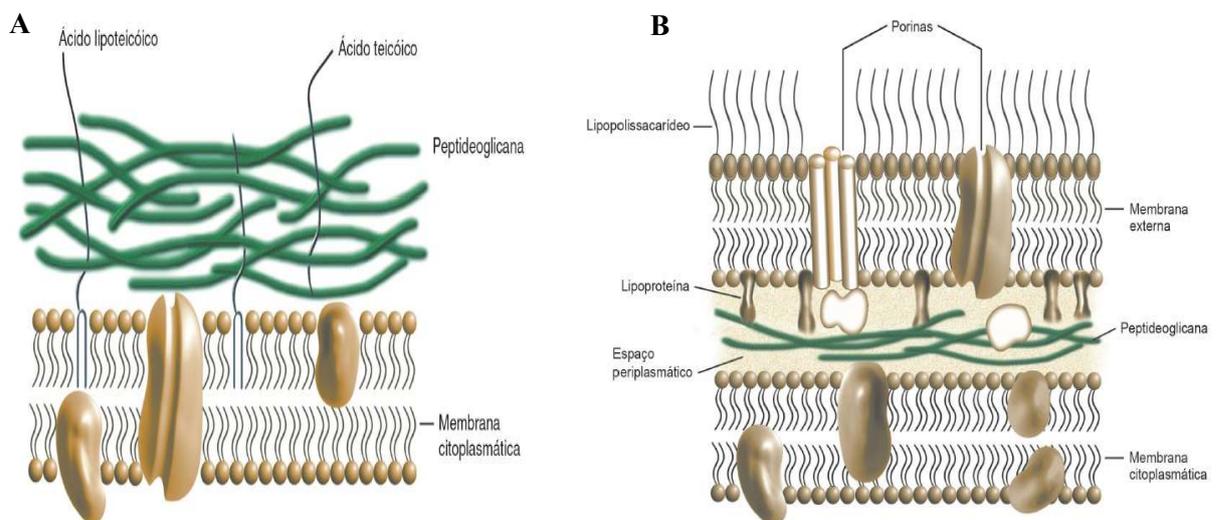


Fonte: Extraído de Callewaert e Michiels, 2010.

Embora geralmente chamadas de muramidase devido atividade em substrato bacteriano, algumas lisozimas podem exibir atividade de quitinase, ou seja, a hidrólise de ligações β -*N*-acetilglicosaminas da quitina, conferindo para alguns tipos proteicos a atividade antimicótica. Esta atividade quitinolítica é exibida em plantas para proteger os tecidos vegetais contra alguns tipos de fungos filamentosos (JOLLES e JOLLES, 1984; DIAS, 2010).

Em relação ao seu mecanismo de ação as lisozimas atuam principalmente como barreira de defesa natural contra microrganismos. Em virtude da diferença na parede celular bacteriana, a atividade de lise no peptidoglicano bacteriano é eficaz em bactérias gram-positivas. Bactérias gram-negativas resistem à lisozima devido à membrana externa lipossolúvel que impede o acesso da proteína ao peptidoglicano (Figura 2) (IBRAHIM *et al.*, 1996).

Figura 2. Parede celular bacteriana: A) Bactérias gram-positivas e B) Bactérias gram-negativas



Fonte: Extraído de Vermelho e Bastos, 2007.

O espectro de ação antimicrobiana da lisozima é bastante amplo e tem sido considerado principalmente para organismos de saúde humana. Em geral, lisozima possui atividade *in vitro* contra os gram positivos *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium tyrobutyricum*, mas baixa atividade com os gram negativos (AMINLARI *et al.*, 2014; DAVISON *et al.*, 2005). Na Tabela 1 é representada o espectro de ação para alguns microrganismos.

Tabela 1- Espectro antimicrobiano da lisozima

a. Organismos fortemente lisados ou inibidos por lisozima

Bacillus coagulans

Bacillus stearothermophilus

Clostridium thermosaccharolyticum

Clostridium tyrobutyricum

Micrococcus spp.

Sarcina spp.

b. Organismos moderadamente inibidos ou levemente sensíveis a algum linhagem

Bacillus cereus

Brucella spp.

Campylobacter jejuni

Clostridium botulinum tipos A, B e E

Listeria monocytogenes

Enterococcus faecalis

Lactobacillus spp.

Moraxella spp.

Pseudomonas aeruginosa

Yersinia enterocolitica

Leveduras: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

c. Organismos frequentemente não lisados ou não inibidos

Aeromonas hydrophila

Brocothrix thermosphacta

Clostridium butyricum

Clostridium perfringens

Escherichia coli O157:H7

Klebsiella pneumoniae

Lactococcus spp.

Salmonella enterica sorotipo Typhimurium

Shewanella putrefaciens

Shigella spp.

Staphylococcus aureus

Streptococcus thermophilus

Vibrio cholerae

Fonte: Davison *et al* 2005.

Na parede celular de bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano é conectado por ácidos teicóicos e polissacarídeos. A razão para diferentes graus de susceptibilidade para lisozima pode ser a quantidade de ácidos teicóicos que pode variar entre as espécies. Já a complexidade da parede de bactérias gram-negativas é a maior causa da resistência a ação tanto de lisozima quanto de outros reagentes como antibióticos, moléculas hidrofóbicas entre outros (ERCAN *et al.*, 2015).

Vários tipos de lisozima foram encontrados, mas todos compartilham a propriedade característica de clivar ligações β -glicosídicas entre o carbono 1 (C1) do ácido N-acetil murâmico e o carbono 4 (C4) no N-acetilglicosamina o peptidoglicano bacteriano (DAVISON *et al.*, 2005).

Lisozimas são comumente divididas em seis tipos baseados em diferenças na sequência de aminoácidos e em propriedades bioquímicas: 1) *C-type* (*chicken type* ou convencional), primeiramente encontrado no ovo de galinha, é presente em vertebrados incluindo os mamíferos, tendo sido descrita também em insetos, aracnídeos e crustáceos;

2) *G-type (goose egg type)* seus primeiros relatos apontam para presença em ovos de ganso. Posteriormente, encontrada em espécies de aves como galinhas e cisnes. No entanto, pesquisas apontam lisozima do tipo-g em algumas espécies de peixes e insetos; 3) *I-type (invertebrate type)* sua presença foi descrita em invertebrados como artrópodes, moluscos, anelídeos, equinodermos e nematódeos; 4) Lisozima de fagos possui similaridade de estrutura com a lisozima tipo C; 5) Lisozima bacteriana e de fungos – diferem do tipo C de lisozima, em função dos resíduos ácidos de seus aminoácidos e 6) Lisozima de plantas – encontrada particularmente em algumas flores, raízes e tubérculos (JOLLÈS E JOLLÈS, 1984; ALMEIDA, 2003; FREITAS, 2007; CALLEWAERT E MICHIELS, 2010; RUAS, 2010; ZHAO *et al.*, 2010).

As enzimas tipo G são significativamente maiores (20-22 kDa) que os tipo C e I (11-15 kDa) e em geral os tipos C e G são proteínas básicas, o que reflete em seus altos pontos isoelétricos, enquanto a lisozima tipo I possuem pI bastante variáveis. Em humanos é uma proteína básica com 130 aminoácidos encontrada na saliva, lágrimas, urina, leite e pele. Em aves apresenta-se com massa de 21 kDa e 185 aminoácidos. Nos bacteriófagos, a lisozima possui massa molecular de 18,7 kDa e 164 aminoácidos em sua cadeia. Nos invertebrados, o massa molecular da lisozima pode variar de 15,5 - 24 kDa. Em plantas, como o mamão, apresentam massa molecular de 25kDa (HOWARD E GLAZER, 1967; JOLLÈS E JOLLÈS, 1984; OKA *et al.*, 1999; CALLEWAERT E MICHIELS, 2010).

Todavia, também estão inseridas em um sistema de classificação baseado na semelhança da sequência de aminoácidos e catálise aliada a informações estruturais tridimensionais das enzimas. De acordo com esta classificação as lisozimas estão agrupadas em cinco famílias: 22, 23, 24, 25 e 73. Pertencem à família 22 as lisozimas do tipo C e de invertebrados cuja estrutura é formada por uma combinação de α -hélices e folhas β . Na família 23 encontram-se as lisozimas do tipo G cuja hidrólise é feita por inversão do carbono anomérico. A família 24 é composta por lisozimas fagos, bactérias e fungos com destaque para lisozima de fagos possuindo 2 domínios e uma fenda contendo sítio catalítico. Composto a família 25 estão as lisozimas de bactérias, fagos e fungos que possuem um único domínio e são capazes de lisar a parede celular de *Staphylococcus aureus*. E na família 73 agrupam-se as lisozimas de fagos e bactérias a qual se desconhecem o mecanismo e resíduos catalíticos (MATTHEWS *et al.*, 1981; FUKAMIZO, 2000; RAU *et al.*, 2001; CANÇADO, 2008; LOMBARD *et al.*, 2014).

Além de sua atuação constatada na defesa contra infecção bacteriana, a lisozima tem sido relatada com participação na digestão de bactérias no intestino de animais, como os ruminantes e insetos, por exemplo. Isto acontece pela hidrólise da parede celular bacteriana e então os nutrientes deste organismo são liberados para posterior absorção celular. As lisozimas digestivas apresentam características diferenciadas, o pH ótimo é mais ácido que as demais lisozimas em virtude da redução do número de aminoácidos básicos, apresentam alta expressão no tubo digestivo e resistência a proteinases acidófilas (RUAS, 2010; CANÇADO, 2008).

Em virtude das características peculiares das lisozimas digestivas, pesquisas em insetos tem sido realizadas a fim de compreender o mecanismo de ação destas enzimas. Pimentel (1991) estudou as características funcionais e bioquímicas da lisozima das glândulas salivares dos mosquitos adultos de *Aedes aegypti* constatando a diferença na concentração da proteína de acordo com o tipo de alimentação dos insetos. Terra e Ferreira em 1994 publicaram uma revisão sobre enzimas digestivas de insetos, destacando a ação de várias enzimas incluindo a lisozima. Em 1998 Regel *et al.*, relataram a adaptação molecular da lisozima de *Drosophila melanogaster* para atuação na função digestiva. CANÇADO *et al.*, (2007) estudaram a estrutura de cristal da lisozima digestiva tipo C da *Musca domestica*. Em 2008 Ursic-Bedoya *et al.*, identificaram e caracterizaram lisozima tipo C isolada do trato digestivo de *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas (PIMENTEL, 1991; TERRA, FERREIRA, 1994; REGEL *et al.*, 1998; ARAÚJO *et al.*, 2006; CANÇADO *et al.*, 2007; URSIC-BEDOYA *et al.*, 2008).

2.2 Lisozima de invertebrado

A lisozima tipo I ocorre nos filos molusca, anelida, echinoderma, nematoda e artropoda. Análises de genoma completo de insetos depositados em bancos de dados revelaram a presença da lisozima tipo I em todos os genomas sugerindo que estas enzimas estão amplamente difundidas, se não, universalmente presente em todos insetos (CALLEWAERT e MICHIELS, 2010).

Em invetebrados, a lisozima pode servir como uma barreira protetora primária, uma vez que estes organismos não produzem imunoglobulinas (WEI *et al.*, 2012). Nas últimas décadas é crescente o interesse na distribuição e caracterização de lisozimas de

invertebrados, que incluem lisozimas de insetos de interesse epidemiológico, como os vetores de doenças tropicais.

Os mosquitos do gênero *Aedes*: *A.aegypti* e *A. albopictus*, são vetores de doenças como a dengue, zika vírus, febre chikungunya e febre amarela. Ursic-Bedoya *et al.*, (2005) estudaram o mosquito *Aedes aegypti* e identificaram que a lisozima estava presente desde o estágio larval até a fase adulta do mosquito em suas glândulas salivares e no trato digestivo e, concluíram que a lisozima atua auxiliando na digestão e no sistema digestivo destes insetos. Em 2003, Hernandez e colaboradores caracterizaram lisozimas de *Aedes albopictus* secretadas após tratamento com bactérias mortas por aquecimento. Neste estudo eles concluíram que as lisozimas presentes em *Aedes* se assemelham as lisozimas encontradas em mosquitos do gênero *Anopheles*, quando analisadas filogeneticamente (HERNANDEZ *et al.*, 2003; VASCONCELOS, 2003; URSIC-BEDOYA *et al.*, 2005; VIANA E IGNOTTI, 2013; LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014; PETERSEN *et al.*, 2016).

Em 1996, Kang e colaboradores isolaram e caracterizaram o gene da lisozima de *Anopheles gambiae*, um dos vetores da malária no continente africano. Os pesquisadores notaram que o mosquito ao alimentar-se de açúcar, aumentava consideravelmente o número de lisozimas em relação ao repasto sanguíneo. Esta observação os levou a concluir que ao ingerir açúcares os mosquitos poderiam ser contaminados com bactérias e fungos, enquanto o consumo de sangue seria estéril. Logo, a lisozima poderia estar atuando no sistema inute dos mosquitos durante a digestão (KANG *et al.*, 1996).

Com base neste trabalho em 1998 Moreira-Ferro *et al.*, publicaram um estudo genômico sobre a lisozima presente nas glândulas salivares do *Anopheles darlingi*, o principal vetor neotropical da malária em humanos no continente americano. As glândulas salivares do mosquito fêmea de *A. darlingi* foram isoladas e sequenciadas e encontrou-se uma proteína similar a lisozima descrita em outros insetos, nomeada Lysdar. Os estudos relataram atividade desta lisozima tanto nas glândulas salivares quanto abdômen com pH ótimo variável: 6,0 e 5,0, respectivamente e massa molecular variando entre 13,4 – 16 kDa, com ponto isoelétrico 8.42 (MOREIRA-FERRO *et al.*, 1998).

A morfologia e bioquímica das glândulas salivares de *A. darlingi* foram analisadas por Moreira-Ferro *et al.* 1999 e por Moreira *et al.* 2001, em ambas as pesquisas houve diferenças morfológicas no aparelho bucal entre machos e fêmeas. Em relação às avaliações bioquímicas constatou-se que machos e fêmeas possuem lisozima, no entanto

foi apontada divergências na quantidade de proteínas em suas glândulas salivares. (MOREIRA-FERRO *et al.* 1999; MOREIRA *et al.*, 2001).

Estudos posteriores sobre o transcriptoma das glândulas salivares de *Anopheles darlingi* descreveram uma série de proteínas com diferentes funções incluindo a lisozima. Em razão de algumas variações nas lisozimas encontradas sugeriu-se que esta enzima tenha origem em genes distintos (CALVO *et al.*, 2004; CALVO *et al.*, 2009).

Estudos recentes de Kajla *et al.*, 2011 e Lapcharoen *et al.*, 2012 apontam a lisozima como agonista no processo de desenvolvimento do *Plasmodium* em *Anopheles gambiae* e *Anopheles dirus*, respectivamente, e sugerem estudos para entender essa relação e possivelmente utiliza-la no combate contra a malária (KAJLA *et al.*, 2011; LAPCHAROEN *et al.*, 2012).

2.3 Aplicações da Lisozima

Em razão de suas diversas aplicações as enzimas industriais estão divididas em três categorias: 1) enzimas técnicas abrangendo detergentes, produtos têxteis e cuidados pessoais; 2) enzimas alimentares utilizadas em pães, vinhos, sucos, óleos; e 3) enzimas de alimentação animal (CHERRY; FIDANTSEF, 2003).

A lisozima é uma das enzimas que tem sido amplamente utilizada na biotecnologia pela sua ação antimicrobiana e devido algumas bactérias não apresentarem resistência a essa enzima (IBRAHIM *et al.*, 2002; SCHENBERG *et al.*, 2010; SAHOO *et al.*, 2012).

Na indústria de bebidas a lisozima é usada na fabricação de vinho para inibir o crescimento de bactérias lácticas (BLA) que convertem o ácido málico em ácido láctico alterando o vinho. Na produção de etanol, testes com adição de lisozima nos extratos foram realizados e bons resultados foram alcançados no combate à contaminação bacteriana (GAO *et al.*, 2003; DIAS, 2010; SCHENBERG *et al.*, 2010). Na Europa a lisozima é usada na produção de queijos impedindo a sua deterioração pelo crescimento de microrganismos indesejáveis. Em países da Ásia é muito aplicada em massas, saladas e vegetais. Uma das razões para o seu emprego em detrimento de outros agentes químicos é a atividade contra *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, microrganismos patogênicos psicofílicos entre outros (JOHANSEN *et al.*, 1994; DAVISON *et al.*, 2005).

No campo farmacêutico, diversos trabalhos utilizam a lisozima como um antimicrobiano de ação isolada ou em conjunto com outra substância. Valenta *et al.*, 1998 demonstraram a eficiência da conjugação da lisozima e ácido caféico na conservação de produtos dérmicos. Ibrahim *et al.*, 2002 propuseram estratégias de uso e o melhoramento da lisozima para ampliar sua efetividade em bactérias gram-negativas. Sahoo *et al.*, 2012 relataram em seu estudo alguns tratamentos em que a lisozima é incorporada a vários antibióticos, enzimas e vitaminas (VALENTA *et al.*, 1998; IBRAHIM *et al.*, 2002; SAHOO *et al.*, 2012).

Em 2015, Pardieu *et al.* propuseram a suplementação com lisozima na prevenção de tuberculose em pacientes que apresentem doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Cebrià *et al.*, 2018 examinaram a eficácia de uma bacteriocina chamada AS-48 combinada com a lisozima contra *Propionibacterium acnes*, bactéria causadora de acne e concluíram que a combinação de AS-48 e lisozima mostrou eficácia e potencial bactericida contra patógenos resistentes aos antibióticos convencionais. Em aplicações clínicas, a lisozima é proposta como antimicrobiano, mas também em tratamentos antiviral e antiinflamatório em humanos e animais (PARDIEU *et al.*, 2015; CEBRIÀ *et al.*, 2018; BEHBAHANI *et al.*, 2018).

A lisozima também tem sido estudada para atuar como adjunto em suplemento alimentar animal. Lichtenberg *et al.*, 2017 expressaram a lisozima de *Acremonium alcalophilum* e a utilizaram para incrementar a ração de frangos. Seus resultados apontaram que a enzima pode ser adicionada a alimentação dos animais sem causar nenhum dano e atuar na defesa de infecção bacteriana (LICHTENBERG *et al.*, 2017).

Além de suas aplicações industriais a lisozima também é utilizada em procedimentos laboratoriais de biologia molecular e microbiologia em virtude da sua ação de sensibilização das paredes celulares de bactérias Gram-positivas, especialmente em processos extração de DNA, lise celular e obtenção de extratos de proteínas (DE-SOUZA *et al.*, 2016).

2.4 Mercado de enzimas

As enzimas são fundamentais em uma gama de processos biológicos e, a biotecnologia como parte essencial na expansão dos processos industriais, busca novas características das enzimas para aprimorar procedimentos e inovar no desenvolvimento de novos produtos e formulações (ORLANDELLI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2016; DIAS; DE CARVALHO, 2017).

O mercado global de enzimas industriais durante os anos de 2008 – 2009 esteve imune à crise financeira e cresceu moderadamente. No ano de 2010, o mercado das enzimas girou em torno de 3,7 bilhões de dólares, tendo as hidrolases como maior representante neste mercado, aproximadamente 75% das vendas. Em 2012, as vendas no mercado global de enzimas eram compostas por 31% de enzimas alimentares, 6% em alimentação animal e 63% em enzimas técnicas. Em 2014, o mercado global de enzimas industriais girou em torno de 4,2 bilhões de dólares. A previsão de crescimento em 2018 indicava que o mercado global de enzimas industriais alcançaria 5,6 bilhões de dólares. Com estes dados é possível prever um crescimento na demanda por enzimas e valores aproximados a 6,3 bilhões de dólares até 2021 (SARROUH *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016; PRASAD E ROY, 2018).

Os consumidores mais vorazes deste mercado são a América do Norte e Europa, no entanto outras regiões como Ásia-Pacífico, África e Oriente Médio também despontam como compradores desta tecnologia. Os maiores produtores são os Estados Unidos (EUA), Japão e Europa, com destaque para Dinamarca com a Novozymes e Danisco, Genencor nos EUA, BASF na Alemanha e DSM na Holanda. Somente nos Estados Unidos, o comércio de enzimas passou de 1,3 bilhões de dólares em 2002 para 5,1 bilhões de dólares no ano de 2009. Entretanto com a aceleração da economia, China e Índia começam a despontar nesse mercado. Em 2013, a China ocupou o 3º lugar entre os maiores exportadores com 20% do mercado, perdendo apenas dos EUA com 40% e Europa com 25% das exportações. Neste mesmo ano, a Índia comercializou 3.387,30 milhões de dólares em enzimas, com previsão de aumento especialmente com demanda no mercado interno (SARROUH *et al.*, 2012; BINOD *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014).

Na América Latina, no ano de 2005, cerca de 80% do consumo eram de enzimas industriais, com destaque para alimentos e bebidas. Esta demanda representava 3,4% da

demanda mundial, sendo o Brasil o principal consumidor com uma fatia de 2,4% do total na região. No que se refere as enzimas especiais em relação a kg a Lisozima e seu cloridrato foram os mais importados pelo País. Neste mesmo ano, o mercado brasileiro de enzimas foi avaliado em 147,5 milhões de dólares, desse montante 20,6 milhões em exportações e 126,6 milhões em importações correspondendo a 3,7% do mercado internacional. Dentre os Estados que mais importam e exportam estão São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Santa Catarina (POLITZER E BON, 2006).

Em 2012, o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) apresentou um diagnóstico sobre a biotecnologia no País. Os resultados deste documento mostraram que 95% das empresas desta área estão localizadas na região Sudeste (73,7%) e Sul (15,7%). As áreas de atividade de saúde humana, reagentes/insumos e agriculturas obtiveram maior destaque e as enzimas industriais foram relatadas com grande frequência como um futuro investimento. De acordo com este documento, o mercado brasileiro de enzimas foi avaliado no ano de 2011, em 119 milhões de dólares e as exportações em 52 milhões de dólares, destacando o Brasil como importador de enzimas. Em 2014, a Confederação Nacional das Indústrias apresentou uma pesquisa sobre bioeconomia no Brasil durante o 3º Fórum de Bioeconomia. Foram entrevistados um total 160 pessoas composta por 100 representantes de empresas, 40 pessoas do poderes Executivo e Legislativo e 20 acadêmicos. Constatou se que 78,8% não acreditava haver segurança jurídica no Brasil para desenvolver a bioeconomia, 65,6% dos entrevistados afirmaram não haver mão de obra qualificada. No entanto, 92% dos entrevistados afirma que o Brasil pode se tornar referência mundial se souber utilizar o grande potencial da biodiversidade (BRASIL, 2012; MONACO, 2014; ARRUDA, 2017).

2.5 A levedura *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) como sistema de expressão heteróloga.

Em biotecnologia, os sistemas de expressão heteróloga são aqueles capazes de expressar proteínas oriundas de outros organismos, para tal são usados microrganismos e cultivos de células animal e vegetal (TAMÁS, SHEWRY, 2006).

Os microrganismos mais utilizados para expressão de proteínas são: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Embora os procariotos tenham se estabelecido como poderosos sistemas de expressão de mensagens genéticas heterólogas, os hospedeiros eucariotos apresentam consideráveis vantagens (CARMO *et al.*, 2015).

Estas vantagens são importantes, principalmente, quando as proteínas a serem expressas são eucarióticas, em função da semelhança de certas características moleculares, genéticas e bioquímicas entre espécies eucarióticas. Uma das principais vantagens destes sistemas de expressão é a capacidade de processar modificações pós-traducionais e proporcionar altos níveis de expressão da proteína heteróloga (CREGG *et al.*, 1993; WANDERLEY, 2011).

Dentre os microrganismos usados para expressar proteínas heterólogas, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, reclassificada como *Komagataella phaffii*, tem obtido grande destaque em virtude da sua fácil manipulação genética, possuir o *status* GRAS (*Generally regarded as safe*), capacidade de expressar altos níveis de proteínas extracelular e intracelular com correto processamentos e maturação (CEREGHINO *et al.*, 2002; BARROS, 2006; RUBINI, 2009; CAVALCANTI, 2010; ARAÚJO, 2012; AHMAD *et al.*, 2014; ANASTÁCIO, 2014).

Em *Pichia pastoris*, existe a enzima álcool oxidase - AOX – dentro de uma organela chamada peroxissoma, responsável pela metabolização de metanol na levedura. A reação inicialmente libera água oxigenada e formaldeído. A água oxigenada é convertida em água e oxigênio. Parte desse formaldeído é oxidado em forma de CO₂ e o restante é condensado para formação de duas moléculas contendo 3 carbonos: gliceraldeído-5-fosfato (GAP) e fosfato de di-hidroxiacetona. O GAP então é liberado e participa da conversão de diversos constituintes celulares (CREGG *et al.*, 2018).

O promotor AOX1 altamente regulável controla a expressão dos genes *aox1* e *aox2*, sendo expresso na presença de metanol e inibido na presença de outras fontes de energia como glicose, glicerol ou etanol. Seu controle em fase transcricional associado a processos fermentativos induzidos pelo metanol facilitam sua utilização em diversos processos industriais e biotecnológicos (CREGG *et al.*, 1985; CREGG *et al.*, 1993; CEREGHINO, CREGG, 2000; CREGG *et al.*, 2000; CEREGHINO *et al.*, 2002; MACAULEY-PATRICK, 2005; BARROS, 2006; CARMO, 2010; WANDERLEY, 2011; AHMAD *et al.*, 2014; BYRNE, 2015).

Embora a utilização do promotor AOX1 seja amplamente utilizada existem situações em que seu uso não é recomendado, por exemplo na indústria alimentícia. Alternativamente, foram desenvolvidos promotores não induzíveis por metanol: promotor GAP (gliceraldeído-3-P desidrogenase) – promotor constitutivo induzido com glicose, pFLDI (formaldeído desidrogenase 1) – Induzível com metilamina ou glicose, pGUT1 (glicerol quinase) – promotor constitutivo induzido com glicose ou etanol, pPGK (3-fosfoglicerato quinase) – promotor constitutivo que pode ser induzido com glicose (CEREGHINO *et al.*, 2000; AHMAD *et al.*, 2014).

Assim como há uma variedade de promotores também existem numerosos vetores de expressão em *Pichia pastoris*. Em suma, são vetores bifuncionais que podem ser utilizados para transformação em *E. coli* ou em leveduras, com marcas de seleção auxotrófica (HIS4, ARG4, URA3) e dominante (ZEO_r) (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005; CARMO, 2010; AHMAD *et al.*, 2014).

A integração dos vetores de expressão no genoma de *P. pastoris* confere 3 fenótipos distintos: Mut⁺ (*Methanol Utilization Plus*) – possui os dois genes aox 1 e 2 funcionais e seu crescimento se assemelha ao da levedura selvagem; Mut^S (*Methanol Utilization Slow*) – possui apenas o gene aox2 funcional e apresenta fraca transcrição; Mut⁻ (*Methanol Utilization Minus*) – os dois genes aox não são funcionais. (CEREGHINO *et al.*, 2000; CARMO, 2010; INVITROGEN, 2014).

Sendo assim, o gene da lisozima proveniente de *Anopheles darlingi* foi clonado e expressado utilizando a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas e as condições de reação enzimática foram determinadas.

3. OBJETIVOS GERAL E ESPECIFICOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a clonagem e expressão da lisozima de *Anopheles darlingi* em *Pichia pastoris* e estabelecer as condições de lise da parede celular bacteriana.

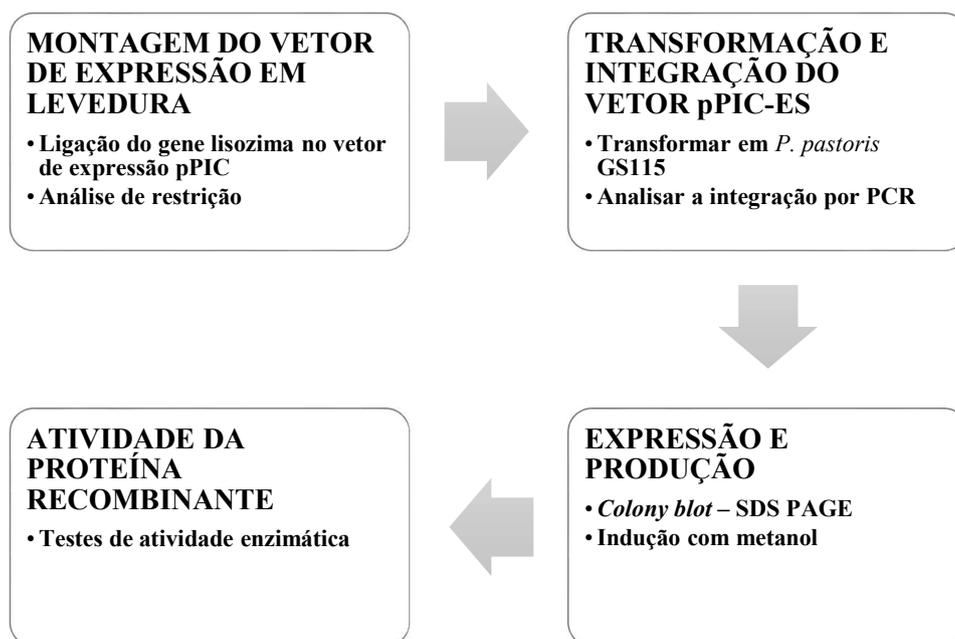
3.2 Objetivos específicos

1. Integrar o cassete de expressão de lisozima anofelina no genoma de *Pichia pastoris*;
2. Expressar a proteína recombinante em produção em frascos agitados;

- Determinar as condições ótimas da atividade enzimática em relação ao pH e temperatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia



4.2 Linhagens hospedeiras

Escherichia coli DH5 α – F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20* ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169, *hsdR17*(*rK⁻mK⁺*), λ^- . Frequentemente usada para rotinas de clonagem molecular (INVITROGEN,2014).

Pichia pastoris GS115 *his4* – Esta linhagem comercializada pela Invitrogen, possui uma mutação no gene *his4* impedindo a síntese de histidina, cujos transformantes são selecionados através de meio seletivo deficiente em histidina (INVITROGEN, 2014). Utilizou – se para expressão da enzima recombinante lisozima de *Anopheles darlingi*.

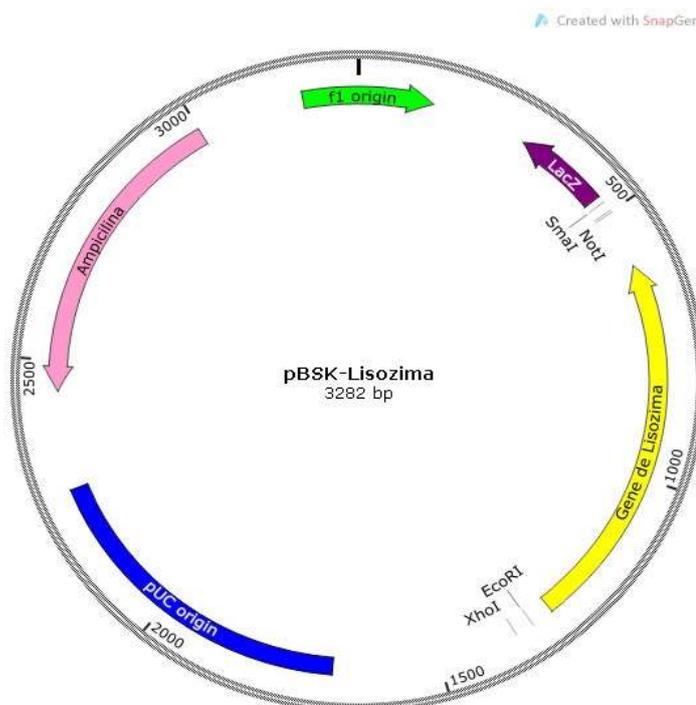
Pichia pastoris GS115 produtora da glicoamilase (GLA) de *Aspergillus awamori* (CARMO, 2010). Usada como controle experimental negativo no teste de *colony blot*.

Pichia pastoris GS115 produtora do hormônio de crescimento de tabaqui (tGH) *Colossoma macropomum* (SADALLA-PINTO, 2012). Utilizada como controle positivo de expressão da cauda de histidina no teste de *colony blot*.

4.3 Vetores utilizados

pBlueScript K Lisozima – O vetor utilizado neste trabalho contém a sequência gênica da lisozima de *Anopheles darlingi* com aproximadamente 400 pb, obtida a partir de síntese química, baseada na sequência obtida no banco de dados do NCBI e previamente otimizado para expressão na levedura *Pichia pastoris*. A sequência codificadora contém nas extremidades os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* e uma cauda de histidina na porção C-terminal gerando o fragmento no vetor de clonagem pBSK fornecida pela Gen Script apresentado na figura 03. A otimização da sequência foi previamente desenvolvida no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) pelo Dr. Marcos César Fernandes Pessoa, Dr. Edson Júnior do Carmo e Dra. Erika Izumi.

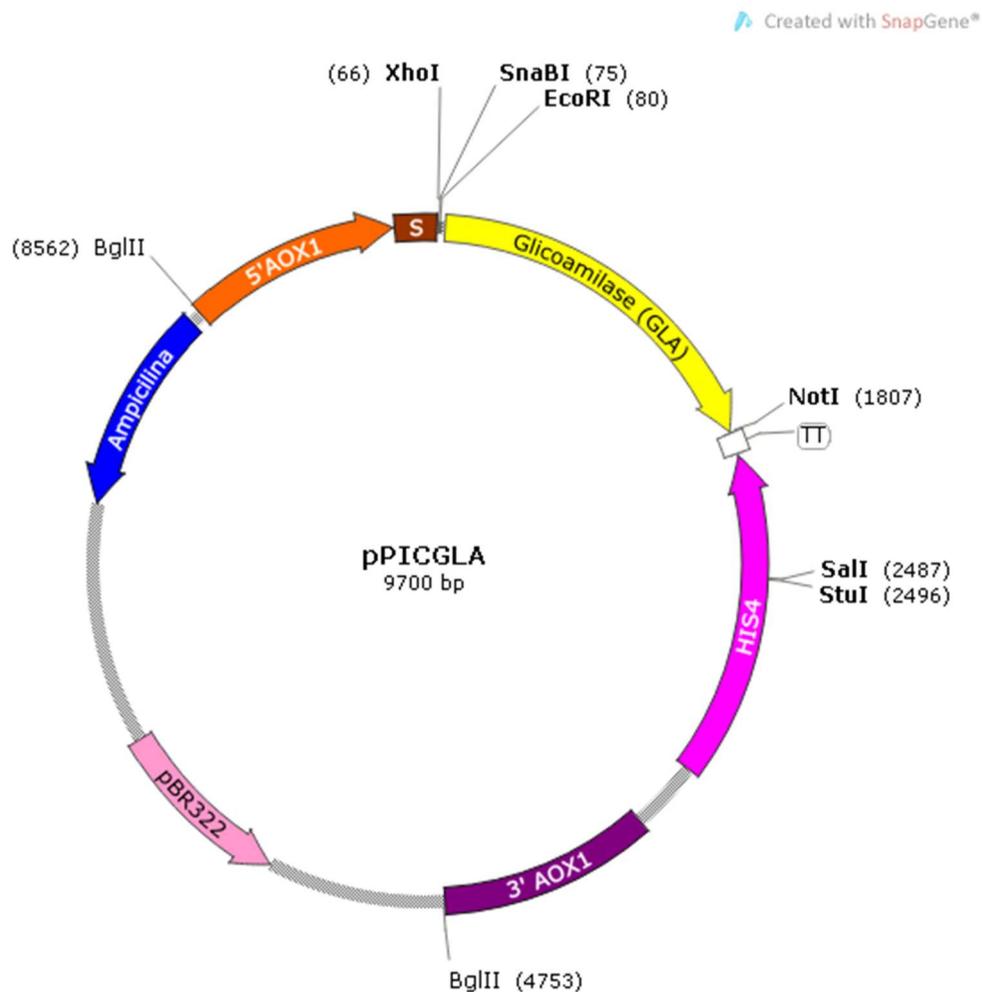
Figura 03: Mapa físico do vetor de clonagem pBSK contendo o gene da lisozima de *Anopheles darlingi*. A região estrutural do gene de lisozima (amarelo) está flanqueada pelas sequências das endonucleases de restrição *EcoRI* e *NotI* para a subclonagem direcionada no vetor de expressão e secreção.



Fonte: Genescript (2012).

pPIC/gla- É um vetor de expressão e secreção em *Pichia pastoris* baseado no vetor pPIC9. Contém um promotor AOX1, um fator α de secreção de *Saccharomyces cerevisiae*, o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção dominante em *E. coli*, marca de seleção auxotrófica HIS4 para seleção em levedura e possui o gene gla (glicoamilase de *Aspergillus awamori*) de aproximadamente 1700 pb clonado nos sítios de enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (CARMO 2010). O cassete de expressão é flanqueados por sítios de restrição da enzima *BglII* para sua linearização, conforme observado na figura 04. Esse vetor foi utilizado para subclonagem do gene de lisozima nos sítios *EcoRI* e *NotI* após a excisão do gene gla.

Figura 04: Mapa físico do vetor de expressão pPIC/gla baseado no vetor pPIC9. Em amarelo é apresentado o gene gla (glicoamilase de *Aspergillus awamori*) de aproximadamente 1700 pb clonado nos sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*



Fonte: CARMO,2010.

4.4 Montagem de vetor de expressão e secreção em levedura

4.4.1 Preparo de células competentes para transformação e multiplicação dos vetores.

Células de *Escherichia coli* DH5 α cresceram *overnight* a 37°C em meio Luria Bertani (LB) líquido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) para preparação para eletrocompetência. Para tal, foi inoculado em 5 mL de meio LB uma colônia da bactéria e mantendo – se em agitação constante *overnight* a 37°C. Após esse período, foi retirado 0,5 mL e inoculado em 200 mL de meio LB sob agitação constante a 37°C para atingir O.D₆₀₀= 0,7. Atingindo a densidade óptica, a cultura bacteriana foi mantida em gelo durante 30 minutos a 1 hora e, posteriormente separada em tubos cada um contendo 50 mL da cultura e então centrifugados a 4000xg durante 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuscitado vagarosamente com 20 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Em seguida os tubos foram submetidos a nova centrifugação de 4000xg durante 10 minutos a 4°C descartando – se o sobrenadante e ressuscitando em 20 mL de glicerol 10% estéril e gelado, este procedimento foi realizado 3 vezes consecutivas. O *pellet* celular obtido ao final desta etapa foi ressuscitado em 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril e retiradas alíquotas de 80 μ l para adição em microtubos e posterior congelamento e estoque em freezer na temperatura de -80°C.

4.4.2 Transformação bacteriana

As células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas por eletroporação. Esta técnica consiste na aplicação de uma descarga elétrica a fim de desestabilizar a membrana externa das células por meio da formação de poros que permitem a entrada do DNA exógeno (DOWER *et al.*, 1988).

O procedimento consistiu no descongelamento em banho de gelo das bactérias competentes estocadas no freezer -80°C, seguida da adição de cerca de 20 ng do DNA plasmidial pBSK liso e pPIC/gla. As misturas foram transferidas para cubetas de 1 mm, mantidas no gelo, e receberam descarga elétrica de 1900 Volts no aparelho eletroporador. Após a descarga elétrica, o conteúdo da cubeta foi recuperado com 1 mL

de meio LB líquido e transferido para microtubo de 2 mL estéril, sendo incubado em seguida a 37°C durante 1 hora sob agitação lenta.

Após este procedimento, foram semeadas em meio LB sólido contendo o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/ml e incubadas em estufa bacteriológica durante 18 horas a 37°C, para posterior visualização do crescimento bacteriano e seleção dos clones transformantes através da resistência a ampicilina conferida pela introdução do plasmídeo.

4.4.3 Extração DNA plasmidial

Após transformação, o DNA plasmidial de pBSK lisozima e pPIC/gla foram extraídos por “preparação caseira” utilizando as soluções: 1) Solução I: Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 10mM pH8, Lisozima 2mg/mL – para manutenção da osmolaridade; 2) solução II: NaOH 0,2M, SDS 1% (p/v) – lise celular; 3) solução III: Acetato de sódio ou potássio 5M, pH 4,8– precipitação; 4) RNase A (10mg/mL); 5) Tampão TR: EDTA 0,2mM, Tris-HCl 10mM pH 8.

Em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido suplementado com 100 µg/ml de ampicilina foram adicionadas colônias pós transformação para extração e purificação dos vetores. Este pré-inóculo foi incubado sob agitação de 150 rpm à temperatura de 37°C durante 18 horas. Após turvação das culturas nos tubos de ensaio, foram separados em microtubos 3mL de cultura, em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000xg durante 2 minutos descartando o sobrenadante. O *pellet* celular decorrente foi ressuspendido em 200 µL da tampão TE gelada (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0; Lisozima 2 mg/mL) sendo agitado em *vortex*, acrescido de 1 µL de RNase A (10mg/mL) e incubados em temperatura ambiente durante 10 minutos. Ao final do tempo de incubação, 360 µL da solução II (NaOH 0,2M; SDS 1%) foram adicionados e misturados por inversão sendo incubados no gelo por 5 minutos. Posteriormente, 300 µL da solução III gelada (Acetato de Potássio 5M, pH 5,8) foram adicionados e homogeneizados por inversão até a verificação de um precipitado claro. A amostra foi centrifugada a 12.000xg durante 5 minutos a fim de separar o DNA cromossomal e restos celulares para recuperação do sobrenadante em novo microtubo. Em seguida adicionou-se um volume (1V) de isopropanol, os tubos foram invertidos e mantidos durante em temperatura ambiente por 5 minutos e, posteriormente centrifugados a 12.000xg durante

5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o excesso de isopropanol foi removido. Foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado ao tubo e se efetuou nova centrifugação de 12000 xg durante 5 minutos, descartando o sobrenadante. Para secagem do líquido restante os tubos foram mantidos em fluxo de ar corrente presente nas cabines de segurança biológica. Foram adicionados 100 µL de Tampão TR (EDTA 0,2 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0) a fim de diluir o DNA plasmidial.

A extração dos vetores foi confirmada por meio da visualização da topologia do DNA plasmidial em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml.

4.4.4 Análise de restrição com endonucleases

Os plasmídeos extraídos receberam tratamento com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* durante 2 horas e 30 minutos seguindo as recomendações do fornecedor *New England Biolabs* (NEB). Esta etapa consistiu na liberação do fragmento de interesse de 400 pb correspondentes ao gene da lisozima de *Anopheles darlingi* do vetor de clonagem pBSK e obter o vetor de expressão e secreção pPIC9 de 8 kb após a liberação do gene glicoamilase (*gla*) de 1,7 kb.

A liberação dos fragmentos do gene de lisozima (*lis*) e da glicoamilase (*gla*) foram confirmadas através da análise do perfil eletroforético realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Sua visualização foi realizada em câmara de luz ultravioleta (UV).

4.4.5 Purificação do gene da lisozima e do vetor de expressão e secreção pPIC9.

Após confirmação da liberação do gene da lisozima (400 pb) e do gene *gla* para obter o vetor pPIC9 (8 kb), as bandas correspondentes foram excisadas e purificadas de acordo com o protocolo do kit *Illustra GFX PCR and gel band purification*. Para confirmação da etapa de purificação, as amostras de lisozima e pPIC9 foram analisadas por migração eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml e visualizado em câmara de luz ultravioleta (UV).

4.4.6 Ligação da região estrutural do gene de lisozima no vetor de expressão e secreção pPIC9

Após a purificação, o gene da lisozima foi ligado ao vetor de expressão e secreção pPIC9 com a utilização da enzima T4 DNA ligase, conforme orientação estabelecida no protocolo do fornecedor. O sistema de ligação com volume final de 30 µl contendo 4,5 µl de H₂O deionizada, 3 µl de tampão DNA ligase, 5 µl do vetor de expressão pPIC9 (cerca de 80 ng), 17 µl do gene de lisozima (cerca de 12 ng) e 0,5 µl de T4 DNA ligase foi incubado a 16°C durante 18 horas. A razão 1:3 (vetor:inserto) foi empregada em concentração em massa em ng de DNA. O produto de ligação foi concentrado por precipitação de ácidos nucleicos e introduzido em *E. coli* para multiplicação.

Para precipitação de ácidos nucleicos foi adicionado 100 µg glicogênio, 1/10 do volume de NaCl 3M e 2,5x do volume de etanol 100% P.A. gelado, mantendo-se incubado no gelo durante 4 horas a 4°C, centrifugando durante 1 hora, a 4°C, 7000xg. O sobrenadante foi descartado, com uma lavagem com etanol 70% gelado, centrifugando novamente nas mesmas condições durante 30 minutos, descartando o sobrenadante e com posterior secagem do tubo, adição de 5 µl H₂O deionizada e eluição por 2 horas a 37°C.

4.4.7 Transformação bacteriana para multiplicação do vetor quimera (pPIC9/lisozima)

Ao término da precipitação para concentração e eluição do vetor recombinante, efetuou-se a transformação bacteriana com o sistema de ligação em condições semelhantes ao tópico 4.4.2., a fim de que o vetor de expressão e secreção pPIC9 com o gene de lisozima subclonado fosse incorporado na *E. coli DH5α*.

Após confirmação da transformação ocorreu a extração do DNA plasmidial seguindo o protocolo do Kit mini prep QIAGEN, baseado na lise alcalina das células bacterianas e adsorção do DNA na presença de altas concentrações de sal, para retirada do plasmídeo das células bacterianas.

4.4.8 Análise de restrição para confirmação da subclonagem do gene lis no vetor de expressão e secreção pPIC9

Para confirmação da construção do vetor de expressão foi feita a análise de restrição seguindo as recomendações do fabricante *New England Biolabs* com as enzimas *EcoRI* e *NotI* que flanqueiam o gene de lisozima subclonado no vetor de expressão e secreção. O resultado foi observado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml e visualização em câmara de luz ultravioleta (UV).

4.5 Transformação genética de levedura e integração do vetor no genoma de *Pichia pastoris*.

4.5.1 Preparo de levedura *Pichia pastoris* competentes para transformação genética

Células de *Pichia pastoris* GS115 *his4* crescidas em meio Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) líquido (peptona 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L, dextrose 20 g/L), foram mantidas sob agitação constante a 30°C para atingir O.D₆₀₀= 1,5. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 1500xg, a 4°C durante 10 minutos e ressuspendida em 20 mL de água estéril. Esta etapa foi repetida 3 vezes, seguida de centrifugação a 1500xg, a 4°C por 10 minutos e lavagem com sorbitol 1M. As células competentes de *Pichia pastoris* GS115 foram estocadas em freezer -80°C, para uso em etapas posteriores.

4.5.2 Linearização do cassete de expressão

O vetor de expressão e secreção na concentração de 10µg foi linearizado com 1U de enzima de restrição *Bgl II* que flanqueia o cassete de expressão de lisozima no vetor pPIC9, para integração no genoma de *Pichia pastoris* GS115. Esta etapa é necessária para obtenção do cassete de expressão da levedura, após a linearização do plasmídeo a região funcional em bactéria foi descartada. A linearização foi confirmada pela visualização de dois fragmentos em gel de agarose, um fragmento de aproximadamente 6 kb correspondente ao cassete de expressão de lisozima e um fragmento de cerca de 2,4 kb

referentes as regiões do vetor pPIC9 funcionais em *E. coli*. O vetor linearizado foi concentrado por precipitação e introduzido na levedura *Pichia pastoris* por eletroporação.

4.5.3 Transformação da levedura por eletroporação

As células competentes de *P. pastoris* GS115 *his4* foram misturadas com 10 µg do cassete de expressão linearizado e este sistema incubado no gelo durante 5 minutos. Em seguida, as células foram transferidas para a cubeta de 2 mm de eletroporador e submetidas a descarga elétrica de 1500 V, sendo adicionado imediatamente sorbitol gelado e o conteúdo transferido para o microtubo estéril. Após o choque elétrico foram plaqueadas em meio seletivo Minimal Dextrose Medium (MD) sólido (YNB 1,34%, Biotina $4 \times 10^{-5}\%$, Dextrose 2%, Ágar 15 g/L) com ampicilina 100 µg/mL incubadas a 30°C e selecionadas pela habilidade de crescimento em meio mínimo sem aminoácidos. As colônias que receberem o plasmídeo terão a capacidade de produzir os aminoácidos essenciais incluindo histidina presente no vetor de expressão e ausente na linhagem GS115, portanto crescerão no meio de cultivo sem a presença de nutrientes. Os transformantes foram confirmados por cultivo em meio seletivo sem histidina por três repiques e posteriormente confirmada a integração e analisados quanto a capacidade de produzir e secretar a enzima ativa.

4.5.4 Confirmação da integração do gene *lis* no genoma da levedura

Após a seleção por auxotrofia foi realizada a confirmação da recombinação nos clones selecionados. Para este propósito foi extraído o DNA total de *P. pastoris* e utilizado como molde para determinar a integração do gene *lis* por PCR.

4.5.4.1 Extração de DNA de *Pichia pastoris*

As colônias resultantes da transformação foram transferidas para meio sólido YPD contendo ampicilina 100µg/ml. Após crescimento nas placas, efetuou-se inóculo em meio YPD líquido e mantendo-se a 30°C durante 24 horas.

As culturas crescidas foram centrifugadas por 10 minutos a 12000xg, o sobrenadante foi descartado e adicionando 500µL do tampão H (2% Triton x-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris HCl pH 8; 1mM EDTA). Em seguida foi feito choque térmico a 95°C por 1 minuto e em cuba com gelo por 2 minutos repetindo por seis vezes. Os sistemas foram agitados por vórtex durante 30 segundos, adicionando clorofórmio em seguida e agitando novamente por 2 minutos. Posteriormente, os sistemas foram centrifugados a 12000xg por 10 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi recuperado seguido de adição de etanol 100% gelado, homogeneizados por inversão e incubados a -20°C. Após um período de 5 minutos, foi centrifugado novamente nas condições anteriores, descartando o sobrenadante. O *pellet* restante foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi removido e o *pellet* celular seco ressuspenso em H₂O deionizada seguido da adição de RNase e incubados em banho seco a 37°C durante 20 minutos.

A confirmação da extração do DNA de levedura se deu através da análise do perfil eletroforético corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml em luz ultravioleta (UV).

4.5.4.2 Amplificação do cassete de expressão por PCR para detecção da integração do gene *lis*

Após a confirmação da extração do DNA da levedura, foram coletadas e diluídas alíquotas para amplificação do gene da lisozima por PCR utilizando primers específicos do vetor pPIC9. O sistema foi montado de acordo com o protocolo de PCR contendo: H₂O, solução tampão 10x, Mg²⁺ 50mM, dNTP 2,5 mM, Taq DNA polimerase 5 U/µl, primer F(AOX5') 5 pmol/µl, primer R (AOX3') 5 pmol/µl e 21ng de DNA molde.

4.6 Produção e caracterização da lisozima recombinante

4.6.1 Confirmação da expressão de lisozima de *A. darlingi* em *P. pastoris*

A confirmação da expressão do gene *lis* foi realizada pelo reconhecimento da cauda poli-histidina dos clones produtores da enzima. Os clones foram cultivados em meio sólido para produção da lisozima por indução com metanol e posteriormente analisados por *colony blot* para detecção de his-tag fusionada na enzima recombinante.

4.6.2 Indução em placa dos clones recombinantes para análise de expressão por imunodeteção

Para análise da expressão foram selecionados clones recombinantes de *Pichia pastoris* com cassete de expressão de lisozima integrado no genoma, um clone de *Pichia pastoris* GS115 sem inserto, um recombinante de *Pichia pastoris* produtor de glicoamilase (ambos controle negativo por não produzir proteínas com cauda de histidina) e um recombinante *Pichia pastoris* produtora de hormônio de crescimento tabaqui - tGH utilizado como controle positivo por produzir tGH com cauda de histidina. Os clones selecionados foram inoculados em meio de cultura Buffered Glycerol Complex Medium (BMGY) (YNB 1,34%, Glicerol 1%, Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, Biotina 4×10^{-5} , ágar 15 g/L), incubados a 30°C durante 3 dias. Em seguida, as colônias foram transferidas para nova placa contendo meio de cultura Buffered Methanol Complex Medium (BMMY) (YNB 1,34%, metanol 0,5%, Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, Biotina 4×10^{-5} , ágar 15 g/L), e incubadas em estufa a 30°C durante 120 horas com adição de 0,5% de metanol PA a cada 24 horas, para indução da expressão gênica.

4.6.3 Análise dos recombinantes por *colony blot*

A técnica de *colony blot* seguiu as recomendações do protocolo de imunodeteção cromogênica *Western Breeze*.

Os clones induzidos com metanol foram utilizados nesta etapa para avaliação da produção de lisozima recombinante. Primeiramente, uma membrana de nitrocelulose foi disposta sobre as placas de Petri contendo as colônias, seguida de várias camadas de papel toalha a fim de transferir as proteínas recombinantes com cauda de histidina C-terminal para a membrana de nitrocelulose, por um período de 4 horas.

Após esse período as camadas de papel toalha foram retiradas e a membrana de nitrocelulose transferida para uma placa de Petri estéril onde foi lavada com tampão PBST (NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ pH 7,2 10 mM; Tween 20 0,1%) para retirada do excesso de células e de meio de cultura. Após foi adicionada uma solução bloqueadora do kit comercial *Western Breeze*[®] *Chromogenic Immunodetection System* (Life Technologies)

mantendo o sistema em agitação constante durante 30 minutos. Em seguida, a solução foi descartada e então adicionado água, mantendo a placa sob agitação constante durante 5 minutos, repetindo o processo uma vez. Foi adicionada solução de anticorpo primário Anti-His-Tag C-terminal (*Life Technologies*) na diluição de 1:5000 (v/v) e após agitação durante 1 hora, a solução foi descartada. A membrana foi lavada com solução de lavagem durante 5 minutos por três vezes. Adicionada solução de anticorpo secundário seguido de descarte após 30 minutos. A membrana foi lavada novamente com solução de lavagem durante 5 minutos, por três vezes. Em seguida, lavada com água deionizada durante 20 minutos, repetindo por duas vezes. Foi adicionado o substrato cromogênico para revelação e detecção da cauda de histidina. O bloqueio da ação do substrato foi feito por meio de lavagem com água deionizada. Após a revelação das amostras na membrana, a imagem foi documentada por digitalização em scanner (HP LaserJet M1212nf MFP). As manchas reveladas na membrana retrataram as colônias de *P. pastoris* produtoras de lisozima.

4.6.4 Produção da lisozima por cultivo submerso

Com o intuito de induzir a expressão de lisozima por *P. pastoris*, foram escolhidas colônias recombinantes e uma cepa de *P. pastoris* GS115 para controle negativo. Primeiramente, foi realizado o crescimento de massa celular em frascos *erlenmeyer* contendo 50 mL de meio de cultura BMGY líquido (YNB 1,34%, Glicerol 1%, Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, Biotina 4×10^{-5}). Ao atingir a densidade ótica de 6 a 8 OD₆₀₀, as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em 100 mL de meio de cultura BMMY (YNB 1,34%, Metanol 0,5%, Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, Biotina 4×10^{-5}) com adição de metanol PA a cada 24 horas durante 120 horas. Posteriormente, houve centrifugação, coleta do sobrenadante, armazenamento em freezer -20°C para análise em SDS-PAGE e avaliação da atividade enzimática.

Paralelamente, alíquotas de 1 mL foram retiradas das amostras em indução para verificação da densidade ótica em 600nm e contagem de células viáveis e inviáveis em câmara de Neubauer através do microscópio, segundo a metodologia de Lee *et al.*, 1981. Esta etapa foi realizada para obtenção de um tempo estimado de indução das amostras. As contagens foram realizadas a cada 24 horas da indução por metanol, totalizando cinco

leituras. As alíquotas foram diluídas 5x e 10x em H₂O destilada estéril, de acordo com a necessidade para contagem. Após a diluição, foram misturados 10µl de cada amostra e 10µl de azul de metileno para leitura na câmara de Neubauer.

Segundo Ceccato-Antonini (2010), não há método definitivo estabelecido de viabilidade celular de leveduras. A contagem em microscópio tem sido usada para avaliar a proporção de células viáveis e, em leveduras a coloração com azul de metileno tem sido empregada (CECCATO-ANTONINI, 2010).

4.6.5 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida para confirmação da expressão de lisozima

Após indução da expressão e secreção da proteína recombinante foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (LAEMMLI, 1970), também conhecida como SDS – PAGE, este procedimento separa as proteínas de acordo com seu peso molecular e cargas elétricas.

As análises foram realizadas em sistema de mini géis da BioRad com malha de acrilamida de 15%. Uma alíquota de 1750 µl foi retirada do sobrenadante da cultura da indução de lisozima e adicionado 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%, com posterior incubação do sistema durante 30 minutos a 4°C e, havendo centrifugação a 14000xg durante 10 minutos a 4°C para precipitação das proteínas, descartando o sobrenadante. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 20 µl de H₂O milliQ., com adição de 1 mL de acetona para desagregação do *pellet* celular e incubação *overnight* a – 20° C. As amostras foram submetidas a nova centrifugação a 4° C, 14000xg durante 10 minutos, descartando o sobrenadante e mantendo as amostras em temperatura ambiente para secagem.

Posteriormente as proteínas precipitadas foram dissolvidas em 50 µl de tampão de amostra 1x para SDS – PAGE e, aquecidas em banho fervente durante 5 minutos para aplicação no gel de acrilamida 15%. A migração eletroforética ocorreu nas condições de 200 V, 30 w e 15 mA durante 60 minutos em tampão de corrida Tris-glicina 1x. Ao fim da migração, o gel de acrilamida foi corado com *Comassie Blue*.

4.7 Ensaio da atividade enzimática da lisozima

A atividade enzimática da lisozima recombinante foi avaliada através de ensaio turbidimétrico adaptado de Wei *et al*, 2012, utilizando como substrato células liofilizadas da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeiktycus* ATCC M3770 SIGMA –ALDRICH cedidas gentilmente pelo Dr. Marcos César Fernandes Pessoa. Neste ensaio, é acompanhado o decréscimo da turbidez da suspensão bacteriana resultado da lise celular pela ação da lisozima que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas entre os carboidratos que compõem o peptidoglicano da parede celular de bactérias.

Os ensaios preliminares foram realizados seguindo as recomendações do fabricante do substrato. Para tal, o substrato *M. lysodeiktycus* foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio pH 6,2 50mM, com posterior leitura em espectrofotômetro 450nm e ajuste da densidade óptica inicial em 0.7.

O volume reacional foi composto de 500µl de suspensão bacteriana e 500µl de caldo enzimático (sobrenadante de cultivo). A turbidez foi imediatamente anotada no tempo zero (A_0). O ensaio foi incubado em banho-maria a 40°C durante 30 minutos e novamente foi mensurado o valor da absorbância (A). A atividade foi avaliada ao longo do tempo de 30 minutos.

Após a produção por cultivo submerso e indução da expressão da lisozima recombinante, a cultura final foi centrifugada a 4000xg 4°C 20 minutos para precipitação celular e, recuperação do sobrenadante da cultura com o qual foram realizados os ensaios enzimáticos.

A atividade lítica (U_L) será calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$U_L = (A_0 - A)/A.$$

Em que:

U_L = Atividade lítica

A_0 = Absorbância inicial (450 nm)

A = Absorbância final (450 nm)

Uma unidade (1 U) de atividade da lisozima foi definida como decréscimo de 0,001 valor de absorção em 450nm por minuto para hidrólise catalítica da suspensão de *M. lysodeikticus* como substrato.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Os controles experimentais foram lisozima comercial como controle positivo e o sobrenadante de cultura da hospedeira *Pichia pastoris* GS115 como controle negativo.

4.7.1 Avaliação da influência do pH na atividade da lisozima

O teste de pH foi realizado segundo a tabela de McIlvaine (1921), que correlaciona os volumes de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M para encontrar o valor de pH, formando o tampão citrato-fosfato 150 mM utilizado neste trabalho com variação de pH entre 2 a 9.

O substrato foi suspenso em NaCl 0,8% estéril, diluída em tampão citrato-fosfato 150 mM na proporção 3 (tampão): 1 (substrato) variando pH entre 2 a 9, com ajuste de densidade ótica para 0.3. As misturas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C. A variação da turbidez foi tomada em espectrofotômetro a 450 nm para determinação da atividade enzimática.

4.7.2 Efeito da temperatura na atividade da lisozima

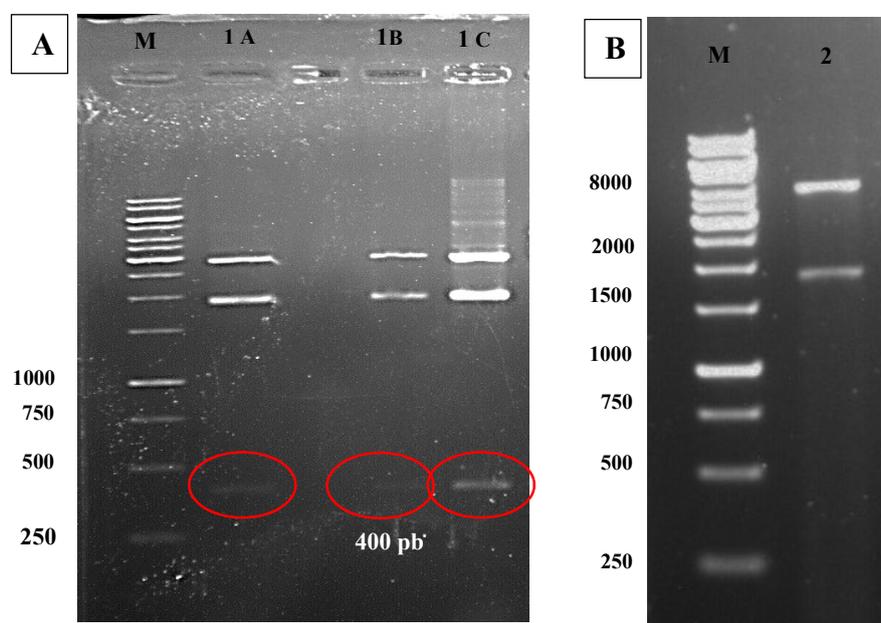
Para avaliar a influência da temperatura na atividade enzimática, a suspensão de *M. lysodeikticus* foi diluída em tampão citrato-fosfato 150 mM pH 5. Após adição de lisozima, os tubos foram incubados durante 30 minutos em temperatura do banho Maria de 20° C a 100° C com intervalos de 10° C. A variação da turbidez foi tomada em espectrofotômetro a 450 nm para determinação da atividade enzimática.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Integração do cassete de expressão no genoma de *Pichia pastoris*

Os vetores pBSK/lis e pPIC/gla recuperados após transformação de *E. coli* linhagem DH5 α foram tratados com as enzimas *EcoRI* e *NotI* para montagem do cassete de expressão. Na análise de restrição observou-se a liberação do gene da lisozima do vetor de clonagem comercial pBSK e a recuperação do vetor de expressão pPIC9 isento de inserto através da análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (Figura 05 A e B). Na figura 5A é apresentado o resultado da clivagem do vetor pBSK lisozima (pBSK/lis). Observamos que houve corte parcial do vetor com uso das enzimas de restrição pois existem 3 fragmentos no perfil, este evento pode ter ocorrido em função do tempo de armazenamento em estoque das enzimas *EcoRI* e *NotI*. Entretanto a liberação do fragmento gênico da lisozima é confirmada na altura de 400 pb. Na figura B se visualiza o resultado da digestão do vetor de expressão pPIC9 com gene gla, também efetuada com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Neste perfil, na canaleta M, encontra-se o marcador de 1kb e na canaleta 2 contém o plasmídeo pPIC/gla clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, sendo possível visualizar a liberação do gene de glicoamilase (gla) contendo aproximadamente 1700pb.

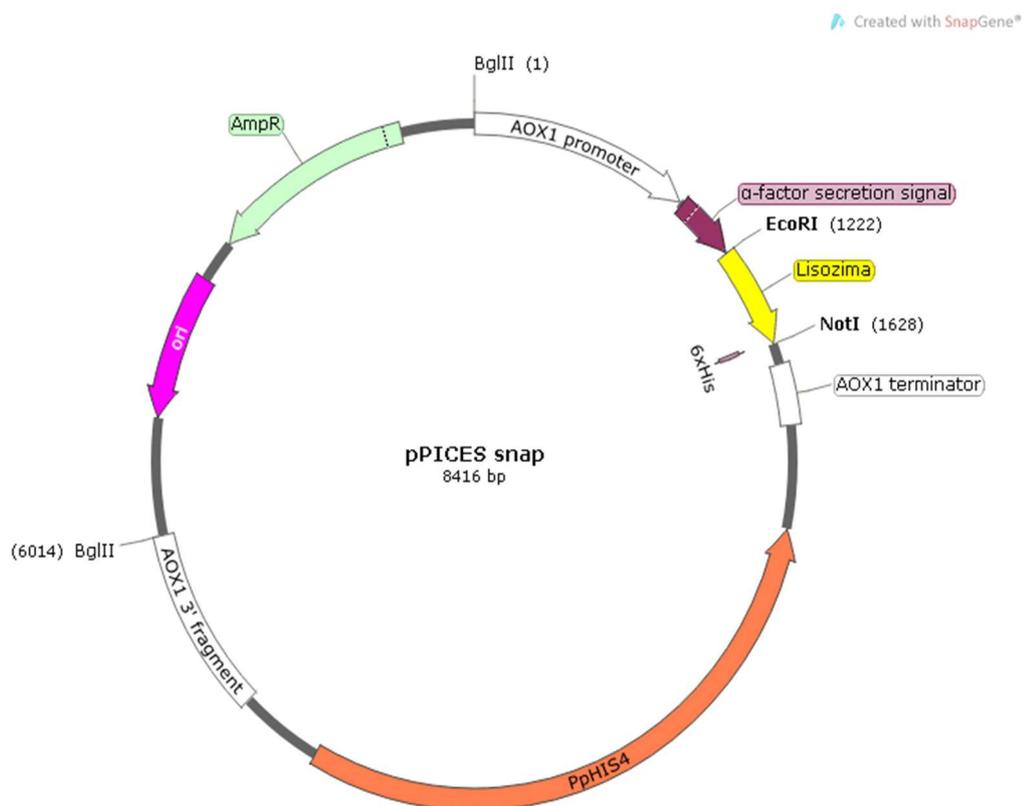
Figura 05 (A e B): Análise do perfil de restrição dos plasmídeos pBSK/lis e pPIC/gla. Em A) perfil eletroforético do vetor de clonagem clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. M= marcador de peso molecular; 1A, 1B e 1C – pBSK lisozima clivado com *EcoRI* e *NotI*. Em B) Perfil de restrição do plasmídeo recombinante com gene da glicoamilase, utilizando as enzimas *EcoRI* e *NotI*. M= marcador de peso molecular 1kb; 2 – pPIC/gla clivado com as enzimas *EcoRI* e *NotI* liberando o gene da glicoamilase de aproximadamente 1700pb.



Fonte: a própria autora.

Em seguida, os fragmentos do gene de lisozima e pPIC9 foram purificados e, posteriormente ligados com T4 DNA ligase. O produto desta ligação foi precipitado e transformado em *E. coli* DH5 α . A figura 06 mostra o mapa do plasmídeo recombinante, nomeado pPIC-ES, construído com auxílio do programa SnapGene 4.

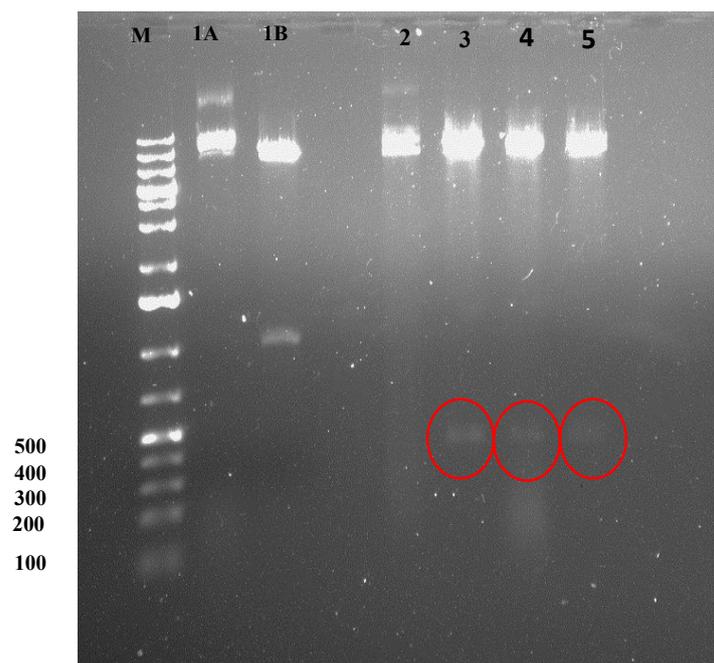
Figura 06: Mapa físico do plasmídeo recombinante pPIC-ES. O gene da Lisozima é mostrado em amarelo, apresenta resistência ao antibiótico ampicilina, origem de replicação bacteriana pBR322, marca de seleção auxotrófica HIS e gene AOX1



Fonte: a própria autora.

Para confirmação da subclonagem, após a extração dos plasmídeos, as amostras foram submetidas à digestão analítica com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. A figura 07 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8%. Nas canaletas enumeradas de 2 a 5 estão as amostras da sub clonagem do fragmento gênico de lisozima no vetor de expressão pPIC, e pode-se observar a liberação do fragmento sub clonado do gene da lisozima de 400 pb.

Figura 07: Confirmação da subclonagem do gene de lisozima em pPIC através da análise de restrição com endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M= marcador de peso molecular 100 pb. As amostras 1A e 1B correspondem amostras pPIC9/lípase (utilizadas como controles de clivagem com as enzimas de restrição) e os poços 2 a 5 referentes as amostras sub clonadas do gene de lisozima no vetor de expressão pPIC.

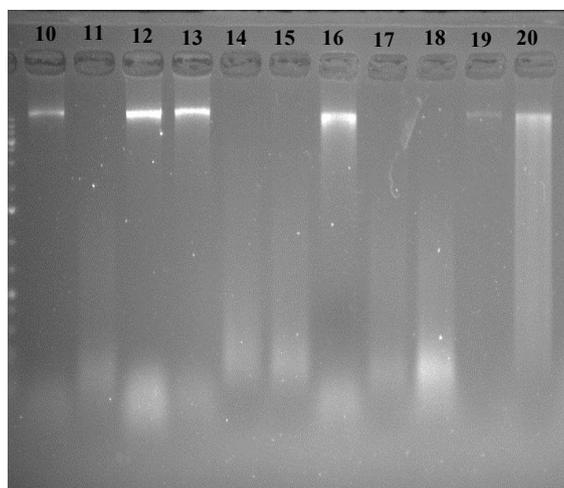


Fonte: a própria autora.

5.2 Transformação e integração do cassete de expressão no genoma da levedura *Pichia pastoris*

Com a confirmação da sub-clonagem do gene de lisozima em pPIC9, o experimento seguiu para integração do vetor em *Pichia pastoris*. A transformação resultou em clones que, após espalhamento em meio seletivo MD foram selecionados pela capacidade de crescer neste meio mínimo pois o plasmídeo possui o gene HIS4. Na figura 08 observamos o DNA genômico dos clones selecionados identificados por números, utilizados também na identificação dos perfis eletroforéticos.

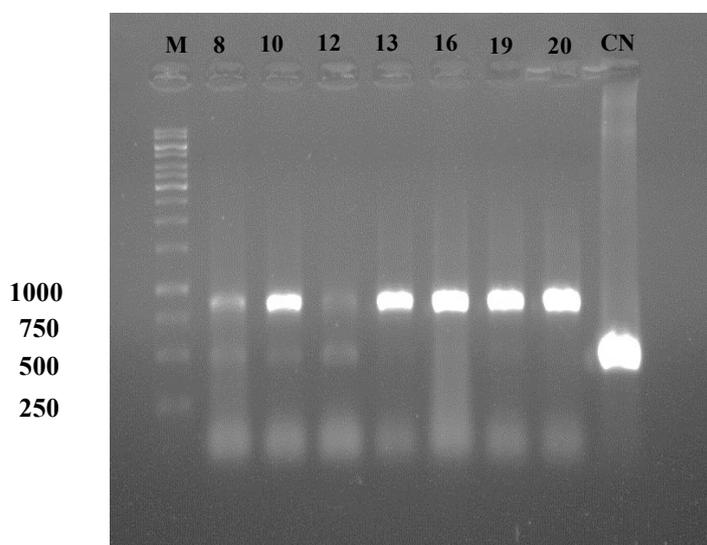
Figura 08: Perfil eletroforético da extração do DNA de clones de leveduras transformantes. Os poços numerados de 10 a 20 contém amostras da extração de *Pichia pastoris* com gene de lisozima.



Fonte: a própria autora.

Utilizando os *primers* AOX5' e AOX3' do vetor de expressão foi confirmada a integração no genoma da levedura. O resultado da PCR é visto na figura 09. Observa-se a amplificação de sequência de DNA de 900 pb correspondente ao gene da lisozima de 400 pb somado a cerca de 500 pb da região AOX do vetor onde anelam os *primers* (canaletas 8-20). Na última canaleta (CN) encontra-se a amostra do plasmídeo pPIC9 intacto (sem a presença do gene de lisozima-controle negativo) mostrando a amplificação de 500 pb utilizando o par de *primers* AOX5' e AOX3', quando o gene de interesse está clonado no *amplicom* é acrescido da sequência de 0,5kb.

Figura 09: Análise da presença do gene de lisozima em clones de leveduras transformantes por PCR. A canaleta M corresponde ao marcador molecular de 250 pb, as amostras 8, 10, 12,13, 16, 19 e 20 correspondem as colônias onde encontram se os plasmídeos que abrigam o gene da lisozima, e o Controle negativo –plasmídeo pPIC9 intacto foi utilizado como controle da reação de PCR.



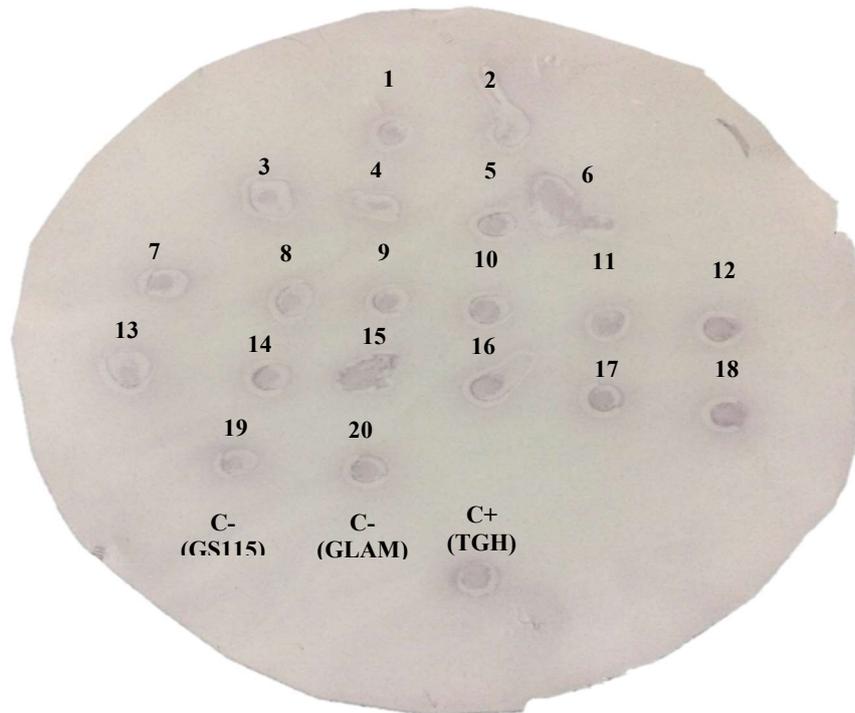
Fonte: a própria autora.

5.3 Produção e atividade da proteína recombinante

Para caracterizar as propriedades da enzima lisozima de *Anopheles darlingi* estratégia foi expressar a proteína em *P. pastoris*. A análise da expressão foi realizada utilizando 40 clones transformantes, destes clones a expressão de lisozima foi confirmada em 39 clones ditos recombinantes, conforme observado nas Figuras 10 e 11.

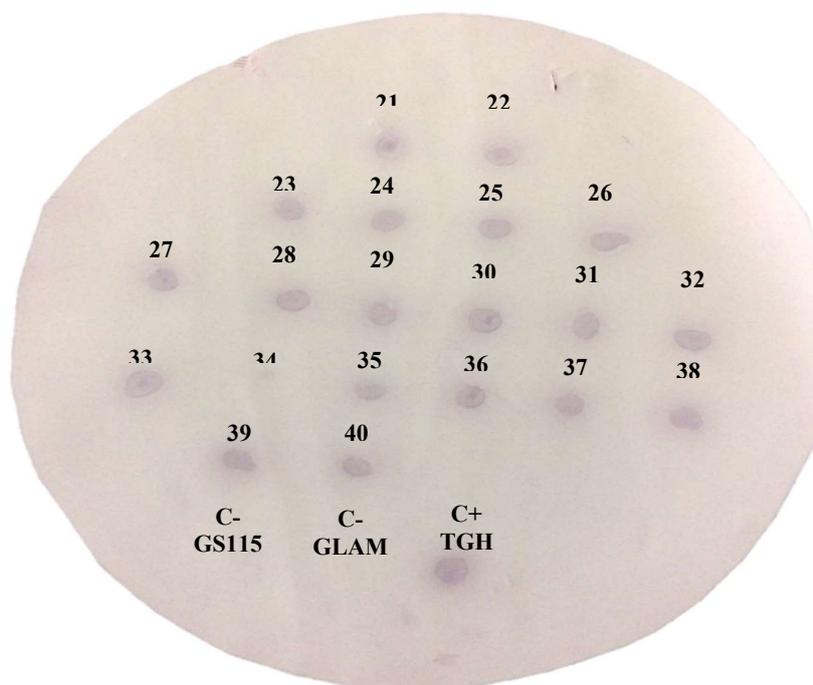
As marcações observadas nas Figuras 10 e 11 confirmam a expressão de lisozima por *Pichia pastoris*. Essa coloração é conferida às colônias recombinantes que possuem a cauda de histidina que são detectadas na presença do substrato cromogênico. O gene da lisozima e do hormônio de crescimento de tabaqui tGH utilizado como controle positivo apresentam em sua porção C-terminal seis aminoácidos de histidina e, por isso as colônias recombinantes podem ser vistas com coloração escura. As colônias que não possuem a marcação escura, controle negativo *P. pastoris* GS115 e *P. pastoris* com gene da glicoamilase (gla) não foram marcadas e logo se confirma que não possuem a cauda histidina. Entre as colônias testadas, no clone 34 não se observou marcação evidente, sugerindo não produzir a enzima recombinante ou ter expressado baixa concentração.

Figura 10: Análise da expressão das colônias de pPIC-ES através do teste de *colony blot* conferindo coloração aos recombinantes que possuem cauda de histidina em seu genoma. Colônias recombinantes pPIC-ES numeradas de 1 a 20, e controles negativos *Pichia pastoris* GS115 e *P. pastoris* com gene da glicocamilase sem cauda de histidina e controle positivo *P. pastoris* com hormônio de crescimento de tabaqui (*Colossoma macropomum*).



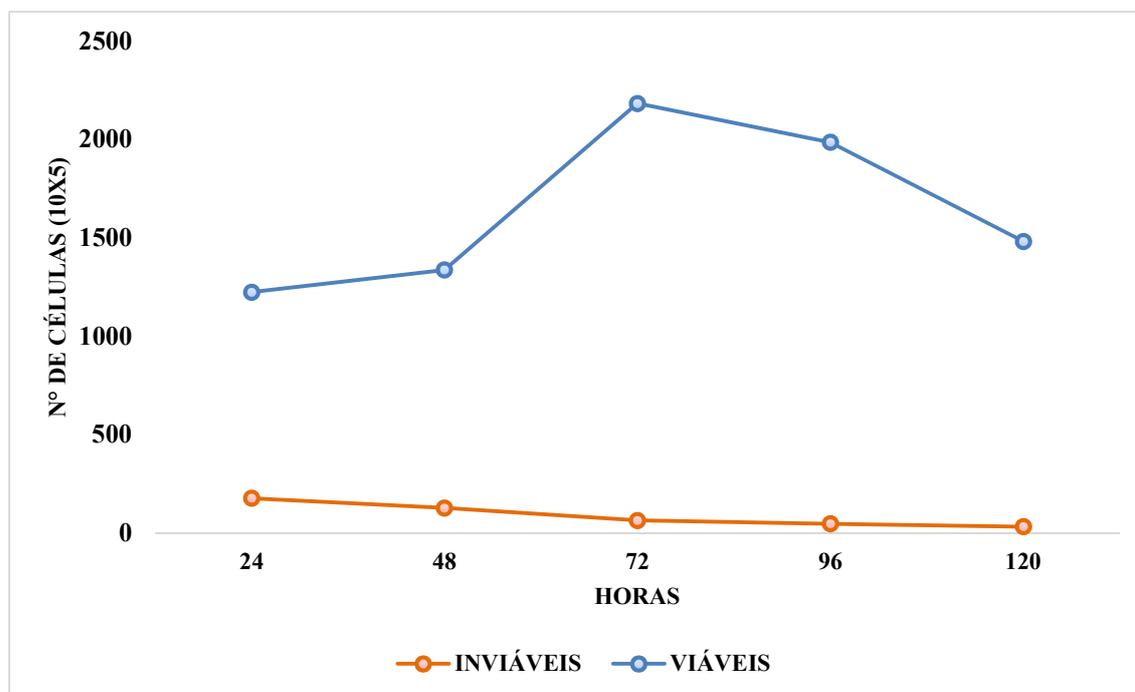
Fonte: a própria autora.

Figura 11: Análise da expressão das colônias de pPIC-ES através do teste de *colony blot* conferindo coloração aos recombinantes que possuem cauda de histidina em seu genoma. Colônias recombinantes pPIC-ES numeradas de 21 a 40, e controles negativos *Pichia pastoris* GS115 e *P. pastoris* com gene da glicocamilase sem cauda de histidina e controle positivo *P. pastoris* com hormônio de crescimento de tabaqui com cauda de histidina (*Colossoma macropomum*).



Durante a fermentação submersa foi realizada a contagem de células viáveis e inviáveis das culturas de *Pichia pastoris* produtoras de lisozima. Nesta contagem ficou estabelecido o tempo de indução da expressão baseado na quantidade de células viáveis capazes de secretar a proteína recombinante, o resultado é visto na figura 12.

Figura 12: Contagem de células viáveis e inviáveis de *P. pastoris* produtora de lisozima.



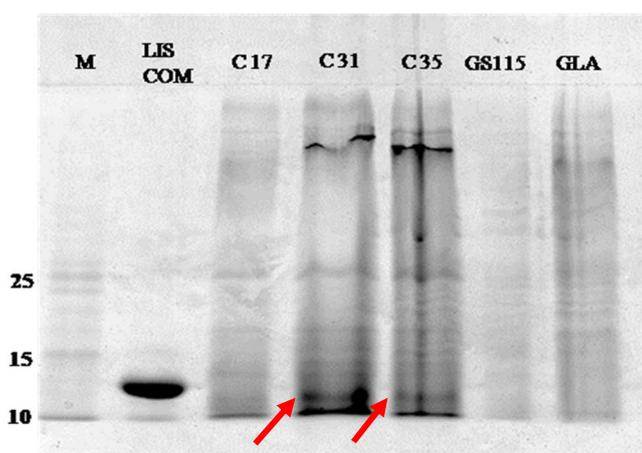
Fonte: a própria autora.

A contagem de células viáveis e inviáveis de *P. pastoris* produtora de lisozima seguiu a metodologia descrita por Lee *et al.*, (1981) e recomendações no Guia do usuário de *P. pastoris* (2014), os resultados são visualizados na figura 12. A cultura foi contada a cada 24 horas pós adição de metanol no período de 120 horas. Observa-se que no período de 48 horas a viabilidade celular manteve-se constante entretanto, após 72 horas de indução da expressão proteica houve um pico na contagem de células viáveis e, transcorridas 96 horas houve redução de células viáveis. Segundo o Guia do usuário de *P. pastoris* da Invitrogen (2014) a expressão da proteína varia de acordo com fenótipo da levedura, quando apresenta fenótipo Mut⁺ a levedura leva até 96 horas para expressão das proteínas, no caso de fenótipo Mut^s a expressão ocorre no período de 144 horas. Em casos extremos de acordo com Cregg *et al.* (1993), a levedura necessita de aproximadamente 200 horas para expressar a proteína (CREGG *et al.*, 1993; INVITROGEN, 2014). Com

os resultados obtidos, estabeleceu-se o tempo de indução de 96 horas para expressão da lisozima pelas culturas de *P. pastoris*.

As proteínas recombinantes produzidas por fermentação submersa foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. O perfil eletroforético pode ser observado na figura 13.

Figura 13: Confirmação da expressão de lisozima por *Pichia pastoris* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. M – marcador Spectra multicolor broad range protein ladder da Thermo Fisher, LIS COM – Lisozima comercial (14 kDa), C -17, C- 31 e C – 35 – correspondem as leveduras recombinantes com lisozima, GLA – *Pichia pastoris* com gene da glicoamilase e GS115 – *Pichia pastoris* (controle negativo).



Fonte: a própria autora.

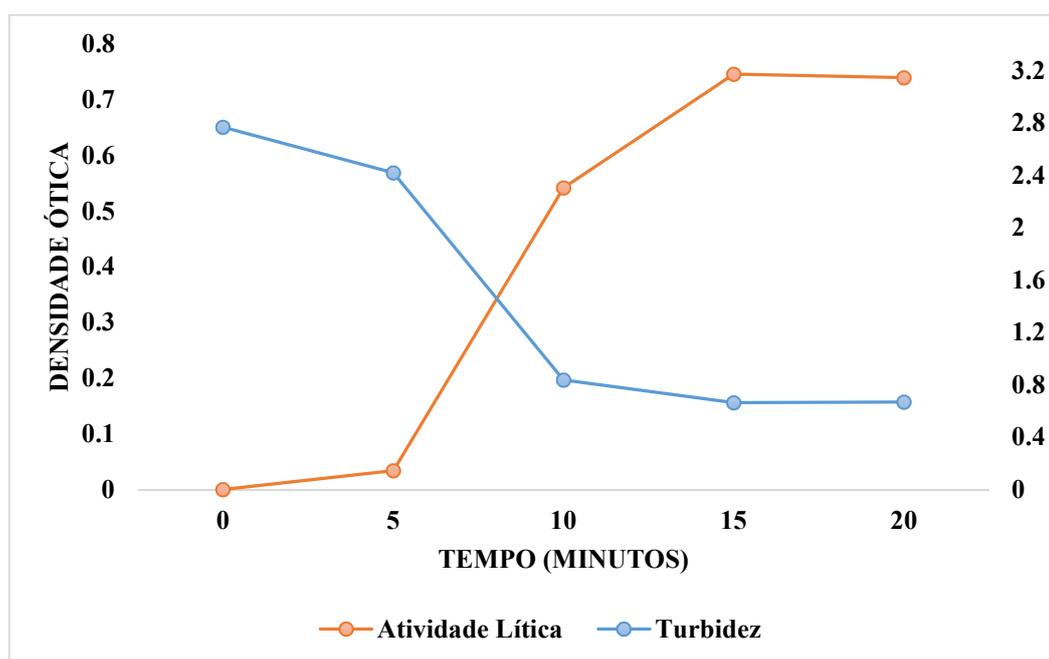
O perfil da eletroforese de proteínas mostra a expressão da lisozima de *A. darlingi* com massa molecular aproximada de 13 kDa conforme predito em ferramentas de bioinformática para o gene estudado e dentro do estabelecido para a massa molecular da lisozima tipo I varia de ~11 a 15 kDa (Wu *et al.*, 2018). Os clones 31 e 35 produziram lisozima, tal perfil que não é observado nos controles GLA (*Pichia pastoris* produtora de glicoamilase) e controle GS115 (Hospedeira *Pichia pastoris* GS115).

Pichia pastoris produzindo eficientemente lisozima foi reportada para a enzima de tipo G humana (HUANG *et al.*, 2018a), para lisozima tipo I de ouriço do mar (HUANAG *et al.*, 2018b), lisozima tipo c de ave (MUSUDA *et al.*, 2005 a,b), lisozima tipo I de pepino do mar (WANG *et al.*, 2011) e lisozima do tipo C humana (WEI *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2014).

5.4 Ensaio da atividade enzimática da lisozima

A atividade enzimática da lisozima recombinante foi determinada pela hidrólise da parede celular de *M. lysodeiktycus*. A velocidade da reação é acelerada nos tempos iniciais, desacelerando após 15 minutos de incubação (figura 14).

Figura 14: Lise do substrato *M. lysodeiktycus* diluído tampão fosfato pH6.2 50mM com sobrenadante de cultura com lisozima recombinante.



Fonte: a própria autora.

Na figura 14 observa-se variáveis inversamente proporcionais, quanto maior o decréscimo da turbidez do substrato maior será o aumento da atividade lítica. Este fato se deve a hidrólise das ligações glicosídicas existentes entre os sacarídeos N-acetil glicosamina e N-acetilmurâmico componentes do peptidoglicano que formam a parede celular do substrato *M. lysodeiktycus* pela atividade da lisozima conforme mencionado por diversos autores ao longo dos anos de estudo com lisozimas (BLACK E HOGNESS, 1969; JOLLÈS E JOLLÈS, 1984; IBRAHIM *et al.*, 1996; NILSEN E MYRNES, 2001; OLIVA *et al.*, 2015). Este resultado demonstra que a enzima encontra-se ativa no sobrenadante da cultura, assim como obtivemos um tempo estimado de ação da lisozima.

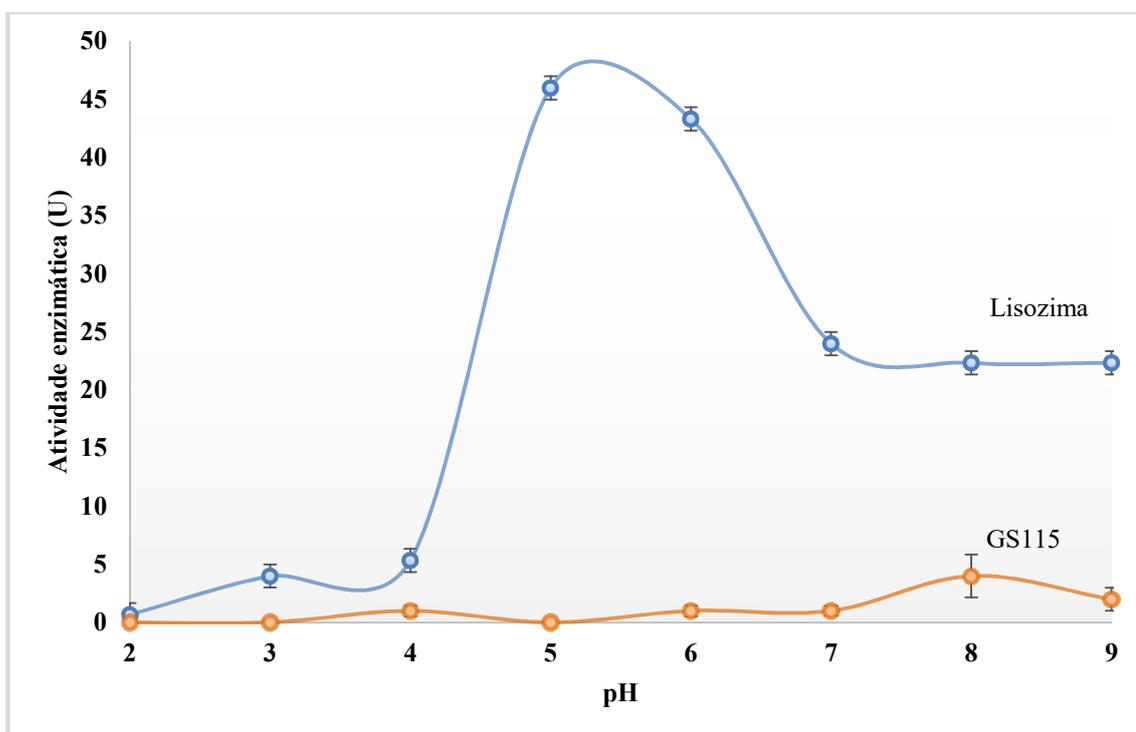
5.4.1 Efeito da variação pH na atividade da lisozima recombinante

A viabilidade dos sistemas biológicos é dependente de diversas propriedades físico-químicas, sendo o pH (potencial Hidrogeniônico) uma das condições mais importantes (SOARES E FERREIRA, 2004).

Para os ensaios de pH, a enzima recombinante lisozima foi avaliada com variação de pH entre 2,0 a 9,0 com intervalos de 1,0 ponto. O tampão citrato-fosfato (Na_2HPO_4 0,2 M; Ácido cítrico 0,1 M) foi utilizado para os testes seguindo as diluições propostas na tabela de McIlvaine (1921).

A melhor condição para atividade de lisozima de *A. darlingi* foi em pH 5,0. Na figura 15 podemos observar a atividade enzimática frente a variação de pH na reação. Os ensaios foram realizados utilizando a cultura de *Pichia pastoris* produtora de lisozima e *Pichia pastoris* linhagem GS115 (não transformada).

Figura 15: Ensaio turbidimétrico de *P. pastoris* lisozima e *P. pastoris* GS115 frente ao substrato *M. lysodeiktycus* em variação de pH.



Fonte: a própria autora.

Neste ensaio observa-se a ação enzimática através da redução da turbidez das amostras contendo *P. pastoris* produtora de lisozima em pH 5,0 e pH 6,0 e,

discretamente em pH 7,0, pH 8,0 e pH 9,0. Esta atividade também pode ser confirmada ao comparar as culturas *P. pastoris* GS115 e *P. pastoris* lisozima. Em *P. pastoris* GS115 não há atividade e afirma-se que a linhagem GS115 de *P. pastoris* não é capaz de lisar o substrato microbiano e que a diminuição na turbidez vista em *P. pastoris* lisozima é de fato, decorrente da atividade da lisozima de inseto.

Enzimas antimicrobianas tolerantes em pH ácido são amplamente aplicadas na indústria alimentícia como conservantes. Baixos valores de pH aumentam a atividade de lisozima contra uma série de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RAZAVI-ROHANI E GRIFFITHS, 1996).

A atividade lítica da lisozima tipo I tem sido caracterizada como diferente para os organismos estudados. O pico de atividade de lisozima tipo I de ouriço do mar foi entre pH 6,0 e 7,5. Ruas (2010) em seu trabalho sobre atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas oriundas de *Musca domestica* concluiu que a atividade da lisozima tinha melhor ação em uma faixa de pH ácido. Wang *et al.* (2018) relataram o decréscimo da turbidez de *M. lysodeiktycus* ocasionado pela ação da lisozima da mosca *Bemisia tabaci* entretanto, descreveu como a faixa de atuação de pH entre 4,0 e 8,0, sendo o pH ótimo 6,5 e, ressaltaram a importância do estudo das lisozimas de invertebrados (RUAS, 2010; WANG *et al.*, 2018; HUANG *et al.* 2018b).

Moreira-Ferro *et al.*, (1998) detectaram atividade ótima da lisozima de *Anopheles darlingi* em pH 6,0 para as lisozimas oriundas das glândulas salivares e pH 5,0 para as lisozimas extraídas do abdômen do inseto (MOREIRA-FERRO *et al.*, 1998).

A atividade ótima em pH 5,0 é uma característica notável para a lisozima recombinante de *A. darlingi*. Uma lisozima de invertebrado produzida em *P. pastoris* foi mais ativa em pH 7,5, com 50% desta atividade em pH 5,0 (HUANG *et al.* 2018b). Estudos anteriores relatam o pH ótimo da lisozima do ovo da galinha frente a *M. lysodeiktycus* com características neutras sendo aproximadamente 6,6 e com inibição por produtos da reação em pHs inferiores a 5,3 (PROCTOR E CUNNINGHAM, 1988; JOHNSON E LARSON, 2005; FREITAS, 2007).

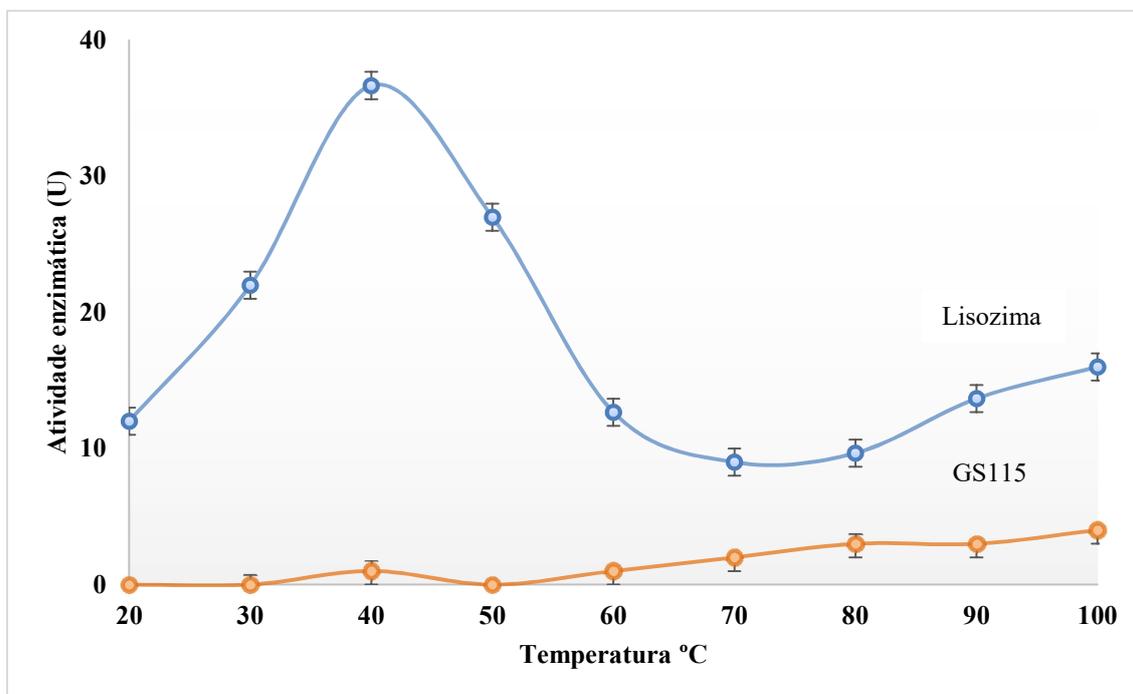
Com a definição de pH ótimo de atividade para a lisozima recombinante de *A. darlingi* os ensaios para avaliação de temperatura prosseguiram, tendo sido definido o pH 5,0 para realização dos testes.

5.4.2 Influência da temperatura na reação enzimática

Assim como o pH, a temperatura é uma das variáveis que podem afetar a ação enzimática dos organismos, acelerando ou reduzindo sua atividade. Desta forma a atividade de lisozima relaciona-se com a temperatura de incubação (FLEMING, 1922; SUDHARHSAN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os ensaios de temperatura foram realizados em pH 5,0, com sobrenadante da cultura de *P. pastoris* lisozima e *P. pastoris* GS115. O efeito da variação da temperatura na reação é visto na figura 16.

Figura 16: Avaliação de temperatura ótima para atividade de lisozima recombinante de *A. darlingi*.



Fonte: a própria autora.

Na figura 15 observa-se a avaliação da temperatura ótima da lisozima recombinante frente a *M. lysodeiktycus*. O ensaio turbidimétrico é mostrado nas temperaturas de 20°C a 100°C, sendo o decréscimo da turbidez indicativo da atividade enzimática. Apesar da lisozima recombinante se mostrar ativa em ampla faixa de temperatura, nota-se que na temperatura de 40°C é visto maior atividade enzimática em relação as demais temperaturas, com boa ação catalítica entre 30 a 50°C. Assim inferimos que a temperatura ótima de ação da lisozima recombinante de *A. darlingi* é 40°C.

Resultado similar foi encontrado por Smolelis e Hartsell (1952) constatando maior lise em temperaturas entre 37°C a 52°C (SMOLELIS e HARTSELL,1952). Yang *et al.*, (2011) reportaram que a atividade de lisozima não é afetada quando a temperatura varia entre 25°C e 60°C, mas a atividade foi muitas vezes maior ao redor de 40°C. Esta característica parece se manter para diferentes tipos de lisozimas (YANG *et al.*, 2011).

A lisozima recombinante de *A. darlingi* produzida em *P. pastoris* foi inibida em altas temperaturas em pH 5,0. Por outro lado, a atividade da lisozima é estável em altas temperaturas quando mantida em soluções com pH ácidos, entretanto com a adição de NaCl a estabilidade térmica pode se estender aos pHs básicos 7,0 a 9,0 (MAKKI, 1996). Lisozima torna-se mais estável quando mantida em soluções com solutos como açúcares e polímeros que podem servir como protetores contra inativação térmica (PROCTOR E CUNNINGHAM, 1988).

A revisão publicada por Proctor e Cunningham em 1988, sobre a lisozima do ovo de galinha abordava entre outras características a influência da temperatura sobre a atividade da enzima. Neste trabalho, os autores citam diversas pesquisas realizadas que reportam a atividade da lisozima em faixas de temperaturas distintas que variam de 100°C a 20°C, influenciadas por pH, tipo de tampões, concentrações de NaCl e glicose. Para Wu *et al.*, (1975) a atividade da lisozima se mantém constante entre 5 e 20 minutos e essa flutuação de atividade em função da temperatura ocorre após esse período (WU *et al.*, 1975; PROCTOR E CUNNINGHAM,1988).

Os resultados relacionados a temperatura encontrados nesta pesquisa são corroboram os dados mencionados na literatura e apontam que a atividade lítica da lisozima de *Anopheles darlingi* pode ser influenciada pelo ambiente reacional. Um estudo de delineamento fatorial para avaliar as variáveis poderá contribuir com mais informações sobre a catálise enzimática de lisozima recombinante produzida neste presente trabalho.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um sistema eficiente de secreção de lisozima e pode ser utilizada para expressão desta enzima em trabalhos futuros.

A lisozima recombinante proveniente de *Anopheles darlingi* mostrou características notáveis no ensaio enzimático. Os ensaios apontaram que o pH ótimo de atividade da lisozima recombinante possui perfil ácido, atuando em pH 5,0.

A comprovação da atividade da lisozima recombinante em pH ácido ressalta a importância de investigação e estudo básico da natureza das lisozimas digestivas. Especialmente por participar do sistema imune inato, os atributos distintos desta lisozima recombinante podem ser empregados de diversas maneiras como biocontrole em insetos e processos industriais que exigem parâmetros diferenciados de pH.

No que tange a temperatura, a lisozima recombinante de *A. darlingi* atuou na faixa de temperatura de 30°C a 60°C, com atividade máxima em 40°C.

Em virtude da precariedade de informações em relação às lisozimas digestivas, a realização deste trabalho contribui para o incremento de conhecimento e fomenta a pesquisa das lisozimas de invertebrados, visando o desenvolvimento de tecnologias enzimáticas provenientes da atividade diferenciada deste tipo de lisozima.

Estudos de inibição enzimática poderão contribuir para o conhecimento sobre biocontrole de *A. darlingi* visto que a lisozima desempenha função importante no desenvolvimento ovariano de insetos.

7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbial Biotechnol*, n. 98, 2014. p. 5301 – 5317.
- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, n. 4, 2014. p. 117 – 139.
- ALMEIDA, E.H. Digestão ácida em Diptera superiores. Dissertação (mestrado em Ciências), Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 2003. 103 p.
- AMINLARI, L., HASHEMI, M.M., AMINLARI, M. Modified lysozymes as novel broad spectrum natural antimicrobial agents in food. *J. Food Sci.* 79, 1077–1090, 2014
- ANASTÁCIO, G.S. Produção de quimosina bovina e de camelo recombinante por *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana). Universidade de Brasília. 2014.
- ARAÚJO, C.A.C., WANIEK, P.J., STOCK, P., MAYER, A., JANSEN, A.M., SCHAUB, G.A. Sequence characterization and expression. Patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of their duvid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect biochemistry and molecular biology*. n 36, 2006. p. 547 – 560.
- ARAÚJO, J.A. Modificações genéticas em leveduras para expressão de celulases. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília. 2012.
- ARRUDA, H.J.; Produção industrial de enzimas e aplicações no processo cervejeiro: uma revisão de literatura. In: VII Congresso Brasileiro de Engenharia de Produção. Paraná, 2017.
- BARROS, C.C.P. Sequenciamento do genoma completo e expressão heteróloga da capa protéica do marafivirus associado à morte súbita dos citros. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília. 2006.

- BEHBAHANI, M.; NOSRATI, M.; MOHABATKAR, H. Inhibition of human immunodeficiency type 1 virus (HIV-1) life cycle by diferente egg White lysozymes. *Appl Biochem. Biotechnol.* 2018.
- BON, E.P.S; PEREIRA JUNIOR, N., PEREIRA, P.S., ROSEIRO, J.C., FERRARA, M.A. Bioprocessos para produção de enzimas. *Enzimas em biotecnologia: Aplicações, tecnologias e mercado.* Ed. Interciência. 2008. p. 95 – 122.
- BINOD, P.; PALKIHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K.M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial enzymes – Present status and future perspectives for India. *Journal of Scientific & Industrial Research.* v. 72. 2013. p. 271 – 286.
- BLAKE, C. C. F., KOENIG, D. F., MAIR, G. A., NORTH, A. C. T., PHILLIPS, D. C., SARMA, V. R. Structure of hen egg-white lysozyme. *Nature* 4986:757–761, 1965.
- BLACK, L.W.; HOGNESS, D.S. The lysozyme of bacteriophage λ . *The Journal of Biological Chemistry.* n.8. v.244. p. 1968-1975, 1969.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR – MDIC. SECRETARIA DE INOVAÇÃO. FUNDAÇÃO BIO-RIO. Diagnóstico de referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil. 2012.
- BYRNE, B. *Pichia pastoris* as an expresssion host for membrane protein structural biology. *Current Opinion in Structural Biology.* 2015. p. 9-17.
- CALLEWAERT, L.; MICHIELS, C.W. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal Biosci.* n. 35. 2010. p. 127 – 160.
- CALVO, E.; ANDERSEN, J.; FRANCISCHETTI, M.; DEL CAPURRO, M.; DEBIANCHI, A.G.; JAMES, A.A.; RIBEIRO, J.M.C.; MARINOTTI, O. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivar glands. *Insect Molecular Biology,* n. 13, v. 1, 2004. p. 73 – 88.
- CALVO, E.; PHAM, V.M.; MARINOTTI, O.; ANDERSEN, J.F.; RIBEIRO, J.M.C. The salivar gland transcriptome of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* reveals accelerated evolution of genes relevantt hematophagy. *BMC Genomics,* n. 10, v. 57, 2009.

CANÇADO, F.C., VALÉRIO, A.A., MARANA, S.R., BARBOSA, J.A.R.G. The Crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. *Journal of Structural Biology*. n. 160, 2007. p. 83- 92.

CANÇADO, F.C. Bases moleculares do efeito do pH na atividade catalítica de duas lisozimas digestivas de *Musca domestica* (Diptera). Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica). Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 2008.

CARDOSO, C.L.; MORAES, M.C.; CASS, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, n.1, v. 32, 2009. p. 175 – 187.

CARMO, E.J. Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. 2010.

CARMO, E. J., NEIVA, M., e ASTOLFI-FILHO, S.. “Novas técnicas de recombinação em microrganismos: engenharia genética pela tecnologia do dna recombinante,” in *Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações*, ed. C. R. Resende, Rodrigo Ribeiro, Soccol (São Paulo: Blucher), 1189,2015.

CAVALCANTI, I.D.M. Otimização dinâmica do cultivo semi-contínuo de *Pichia pastoris* recombinante para produção de enzimas heterólogas alfa amilase e penicilina G acilase. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. 2010.

CEBRIÀN, R.; ARÉVALO, S.; RUBINO, S.; ARIAS-SANTIAGO, S.; ROJO, M.D.; MONTALBAN-LOPEZ, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. Control of *Propionibacterium acnes* by natural antimicrobial substances: Role of the bacteriocin AS-48 and lysozyme. *Scientific Reports*. n.8. 2018.

CECCATO-ANTONINI, S.R. Microbiologia da fermentação alcoólica: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos – UFSCar. 2010.

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

CEREGHINO, G.P.L.; CEREGHINO, J.L.; ILGEN, C.; CREGG, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, n. 13, 2002. p. 329 – 332.

CHANDEL, A.K.; RUDRAVARAM, R.; RAO, L.V.; RAVINDRA, P.; NARASU, M.L. Industrial enzymes in bioindustrial sector development: An Indian perspective. *Journal of Commercial Biotechnology*, n. 4, v. 13, 2007. p. 283 – 291.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: na uptade. *Current opinion in biotechnology*, n. 14, 2003. p. 438 – 443.

COLTRO, W.K.T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E. Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Química Nova*, n. 8, v. 30, 2007. p. 1896 – 2000.

CREGG, J.M.; BARRINGER, K.J.; HESSLER, A.Y.; MADDEN, K.R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, n.12, v. 5, 1985. p. 3376- 3385.

CREGG, J.M.; VEDVICK, T.S.; RASCHKE, W.C. Recent advances in the expression. of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, v. 11, 1993. p. 905- 910.

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

CREGG, J.M.; TOLSTORUKOV, I., KUSARI, A.; SUNGA, A.J.; MADDEN, K; CHAPPELL, T. Expression of recombinant genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Current Protocols Essential Laboratory*. 2018.

DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A. L. Antimicrobials in food 3rd ed. *Food science and technology*. 143, 2005.

DE-SOUZA, M.T., BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Técnicas básicas de biologia molecular. Brasília: Universidade de Brasília. 2 ed. 2016.

DIAS, R.L.G. Ação da lisozima sobre bactérias do ácido láctico isoladas no vinho: A influência de proteínas de superfície (S-layer). Tese (Doutorado em Microbiologia), Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. 2010.

DIAS, R.F.; DE CARVALHO, C.A.A. Bioeconomia no Brasil e no Mundo: panorama atual e perspectivas. *Revista Virtual de Química*. n.1, v.9, 2017. p. 410-430.

DOWER, W.J.; MILLER, J.F.; RAGSDALE, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*. n. 13, v. 16, 1988.

ERCAN, D.; DEMIRCI, A. Recent advances for the production and recovery methods of lysozyme. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2015.

FLEMING, A. On remarkable bacteriolytic element found in tissue and secretions. *Proc. Roy. Soc.* 1922.

FREITAS, D.S. Extração, purificação e peglação de lisozima. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

FUKAMIZO, T. Chitinolytic enzymes: Catalysis, substrate binding and their application. *Current Protein and Peptide Science*. n. 1. v. 1. 2000. p. 105 - 124

GAO, Y.C.; POWER, J.; LAGARDE, G.; KRENTZ, S. A utilização da lisozima para combater a alteração dos vinhos tintos. *Revista Internet Técnica do Vinho*, n. 9, 2003.

HUANG, P.; SUN, Q.; SHI, W.; Du, W.; ZHANG, N. Efficient production of human goose-type lysozyme 2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 275 , 44–52, 2018.

HUANG, P.; SHI, J.;SUN, Q.; DONG, X.; ZHANG, N. Engineering *Pichia pastoris* for Efficient Production of a Novel Bifunctional *Strongylocentrotus purpuratus* Invertebrate-Type Lysozyme. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018.

HERNANDEZ, V.P.; HIGGINS, L.A.; FALLON, A.M. Characterization and cDNA cloning of an immune-induced lysozyme from cultured *Aedes albopictus* mosquito cells. *Developmental & Comparative Immunology*. n.27. 2003. p. 11-20.

HOWARD, J.B.; GLAZER, A.N. Studies of the physicochemical and enzymatic properties of Papaya lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*. n. 24. v. 242. 1967. p. 5715 – 5723.

IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; KOKETSU, M.; JUNEJA, L.R.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem*. n. 12. v. 44. 1996.

IBRAHIM, H.R.; AOKI, T.; PELLEGRINI, A. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: Lysozyme and aprotinin as model molecules. *Current Pharmaceutical Design*, n.8, 2002. p. 671 – 693.

INVITROGEN. LIFE TECHNOLOGIES. *Pichia* expression. Kit: For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. 2014.

KANG, D.; ROMANS, P.; LEE, J.Y. Analysis of a lysozyme gene from malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Gene*. n. 174, 1996. p. 239 – 244.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Revista Saúde e Biol.* n.3, v.7, p. 97 – 109, 2012.

JOHANSEN, C.; GRAM, L.; MEYER, A. The Combined Inhibitory Effect of Lysozyme and Low pH on Growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 57:7, 561-566.

JOHNSON, E.A.; LARSON, A.E. Lysozyme. In: *Antimicrobials in Food*. P. Michael Davidson, John N. Sofos, A.L. Branen. 3rd ed. 2005.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's a new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry*. n. 63, 1984. p. 165-189.

KAJLA, M. K.; SHI, L.; LI, B.; LUCKHART, S.; LI, J.; PASKEWITZ, S. M. A new role for na old antimicrobial: Lysozyme c-1 can function to protect malaria parasites in *Anopheles* mosquitoes. *PLoSOne*.. v.6, n. 5, 2011.

KUMAR, V.; SINGH, D.; SANGWAN, P.; GILL, P.K. Global Market scenario of industrial enzymes. In *Industrial enzymes: Trends, scope and relevance*. Nova Science Publishers. New York, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259). 1970.p. 680-685.

LAPCHAROEN, P.; KOMALAMISRA, N.; RONGSRIYAM, Y.; WANGSUPHACHART, V.; DEKUMYOY, P.; PRACHUMSRI, J.; KAJLA, M.K.; PASKEWITZ, S.M. Investigations on the role of a lysozyme from the malaria vector *Anopheles dirus* during malaria parasite development. *Dev. Comp. Immunol.* n.36. v.1. 2012. p. 104 – 111.

- LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* v. 11. 1981.
- LEPARC-GOFFART, I.; NOUGAIREDE, A.; CASSADOU, S.; PRAT, C.; LAMBALLERIE, X. Chikungunya in the Americas. *The Lancet.* v.383. 2014.
- LICHTENBERG, J.; CALVO, E.P.; MADSEN, K.; LUND, T.Ø.; BIRKVED, F.K.; VAN CAUWENBERGHE, S.; MOURIER, M.; WULF-ANDERSEN, L.; JANSMAN, A.J.M.; LOPEZ-ULIBARRI, R. Safety evaluation of a novel muramidase for feed application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, n. 89, 2017. p. 57 – 69.
- LOMBARD, V.; RAMULU, H.G.; DRULA, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate – active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research.* v.42. 2014. p. 490 – 495.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, v. 22, 2005. p. 249 – 270.
- MAKKI, F. Thermal inactivation kinetics of lysozyme and preservative effect in beer. (Tese de doutorado). University of British Columbia. 1996.
- MARTINS, M.P. Prospecção de enzimas de interesse biotecnológico de *vibrio* associados a corais endêmicos brasileiros. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília – 2010.
- MASUDA T, IDE N, KITABATAKE N. Structure–sweetness relationship in egg white lysozyme, role of lysine and arginine residues on the elicitation of lysozyme sweetness. *Chem Senses*, 30, 667–81, 2005a.
- MASUDA T, UENO Y, KITABATAKE N. High yield secretion of the sweet tasting protein lysozyme from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 39, 35–42, 2005b.
- MATTHEWS, B.W.; REMINGTON, S.J.; GRUTTER, M.G.; ANDERSON, W.F. Relation between hen egg white lysozyme and bacteriophage T4 lysozyme: Evolutionary implications. *J. Mol. Biol.* n. 147. 1981. p. 545 – 558.
- MCILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol.Chem.* n.49. 1921. p. 183-186.

MEDEIROS, G.A., GONÇALVES, S.B., RODRIGUES, D.S., NETO, B.A.D. Enzimas em líquidos iônicos: Uma combinação promissora para um biodiesel limpo. *Revista Virtual de Química*. n. 1, v.5, 2013. p. 74-94.

MONACO, R. Expansão da bioeconomia no Brasil depende de regras claras, profissionais qualificados e incentivo a pesquisa. Agência CNI de Notícias. Disponível em: <https://noticias.portaldaindustria.com.br/noticias/sustentabilidade/expansao-da-bioeconomia-no-brasil-depende-de-regras-claras-profissionais-qualificados-e-incentivo-a-pesquisa/#> Acesso em: 11 de maio de 2019.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*. SENAI. n. 5, 2009. p. 9 – 23.

MOREIRA-FERRO, C.K.; DAFFRE, S.; JAMES, A.A.; MARINOTTI, O. A lysozyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Insect Molecular Biology*, n. 7, v. 3, 1998. p. 257 – 264.

MOREIRA-FERRO, C.K.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A.T. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Tissue&Cell*, n. 31, v. 3, 1999. p. 264 – 273.

MOREIRA, C.K., MARRELLI, M.T.; LIMA, S.P.; MARINOTTI, O. Analysis of salivary gland proteins of the mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, n. 38, v.5, 2001. p. 763 – 767.

MUSSATO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Revista Ciência Hoje*. n. 242, v. 41, 2007. p. 28 -33.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standards. 8^o Ed. USA – 2003.

NILSEN, I.W.; MYRNES, B. The gene of chlamysin, a marine invertebrate-type lysozyme, is organized similar to vertebrate but different from invertebrate chicken-type lysozyme genes. *Gene*. n.269. 2001. p. 27-32.

OKA, C.; TANAKA, M., MURAKI, M., HARATA, K., SUZUKI, K., JIGAMI, Y. Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. *Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. n. 63, v. 11, 1999. p. 1977 – 1983.

OLIVA, C.; FACCHINELLI, L.; BASILICO, N.; SPACCAPELO, R. Role of lysozymes of *Anopheles* mosquitoes in *Plasmodium* development. Human and Mosquito lysozymes. 2015.

OLIVEIRA, A. N.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, L.A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. Acta Amazonica. n.2. v.40. 2010.

PARDIEU, C.; CASALI, N.; CLARK, S.O.; HOOPER, R.; WILLIAMS, A.; VELJI, P.; GONZALO, X.; DROBNIIEWSKI, F. Correlates between models of virulence for *Mycobacterium tuberculosis* among isolates of the Central Asian Lineage: A case of Lysozyme resistance testing? Infection and Immunity. n.6. v.83. 2015. p. 2213-2223.

PETERSEN, L.R.; JAMIESON, D.J.; POWERS, A.M.; HONEIN, M.A. Zika vírus. The new England Journal of Medicine. 2016.

PIMENTEL, G.E. A lysozyme-likeprotein in the salivar glands of adult *Aedes aegypti*: Functional and biochemical characteristics. Tese (Doutorado em Entomologia), Oregon State University. 1991.

POLITZER, K.; BON, E.P.S.(Org.). Enzimas industrias e especiais. Centro de gestão e estudos estratégicos. Rio de Janeiro, 2006.

PRASAD, S.; ROY,I. Converting enzymes into tools of industrial importance. Recent Patents on Biotechnology. n.1. v.12. 2018. p. 33 – 56.

PROCTOR, V.A.; CUNNINGHAM, F.E.; FUNG, D.Y.C. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. n.4. v.26. 1988. p. 359-395.

RAU, A.; HOGG, T.; MARQUARDT, R.; HILGENFELD, R. Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution. The Journal of Biological Chemistry. n.34. v.276. 2001. p. 31994 - 31999.

RAZAVI-ROHANI, S. M.; GRIFFITHS, M. W. The effect of mono and polyglycerol laurate on spoilage and pathogenic bacteria associated with foods. *J. Food Safety*. n.14. 1994.

REGEL, R., MATIOLI, S.R., TERRA, W.R. Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect biochemistry and molecular biology*. n. 28, 1998. p. 309 – 319.

RUAS, G.W. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas. Dissertação (mestrado em Farmácia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2010. 80 p.

RUBINI, M.R. Clonagem, expressão heteróloga e uma caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum*. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. 2009.

SADALLA-PINTO, E. A. Clonagem e expressão do gene codificador do hormônio de crescimento de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Amazonas. 2012.

SAHOO, N.R.; KUMAR, P.; BHUSAN, B.; BHATTACHARYA, T.K.; DAYAL, S.; SAHOO, M. Lysozyme in livestock: A guide to selection for disease resistance: A review. *J. Anim. Sci. Adv.*, n. 2, v. 4, 2012. p. 347 – 360.

SANTOS, A.F.; GANDRA, R.M.; OLIVEIRA, S.S.C.; KNEIPP, L.F.; D'ÁVILA-LEVY, C.M.; SODRÉ, C.L.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S. Peptidases em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. In: *Biotecnologia aplicada à agroindústria: Fundamentos e aplicações*. Capítulo 11, v. 4, Ed. Bluncher, São Paulo, 2016.

SARROUH, B.; SANTOS, T.M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global Market. *J. Bioproc. Biotechniq.* 2012.

SCHENBERG, A.C.G. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. *Estudos Avançados*, n. 24, v. 70. 2010.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. v. 6. n. 174. 2016.

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. Factors affecting the lytic activity of lysozyme. *J. Bacteriol.* 1952.

SOARES, T.A.; FERREIRA, R. Aplicação da equação de Poisson-Boltzman ao cálculo de propriedades dependentes do pH em proteínas. *Química Nova*. n.4. v.27. 2004. p.640-647.

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of bacillus isolated from spoiled food waste. *African Journal of Biotechnology*. n.4. v.6. 2007.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; COSTA, W.L.S.; SCARPASSA, V.M. Biologia dos anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de Anopheles, dinâmica da transmissão e controle na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev. Inst. Med. Trop.* n.3. v.30. 1988.

TAMÁS, L.; SHEWRY, P.R. Heterologous expression and protein engineering of wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, n. 43, 2006. p. 259 – 274.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B. n. 1, 1994. p. 1 – 62.

URSIC-BEDOYA, R.J.; MITZEY, A.M.; OBRAZTSOVA, M.; LOWENBERGER, C. Molecular cloning and transcriptional activation of lysozyme-encoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. n. 14. v.1. 2005. p. 89-94.

URSIC-BEDOYA, R.J., NAZZARI, H., COOPER, D., TRIANA, O., WOLFF, M., LOWENBERGER, C. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Journal of Insect Physiology*. n. 54, 2008. p. 593 – 603.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. n.36. v.2. 2003. p. 275-293.

VALENTA, C.; SCHWARZ, E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Lysozyme-caffeic acid conjugates: Possible novel preservatives for dermal formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 174, 1998. p. 125 – 132.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F. *Bacteriologia geral*. Ed. Guanabara. 2008.

VIANA, D.V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. *Rev. Bras. Epidemiol.* n.16. v.2. 2013. p. 240-256.

WANDERLEY, M.S.O. Produção de proteínas utilizando leveduras como sistema/expressão. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco. 2011.

WANG, T.; XU, Y.; LIU, W.; SUN, Y.; JIN, L. Expression of *Apostichopus japonicus* lysozyme in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. n.1. v.77. 2011.

WANG, Z-Z.; ZHAN, L-Q.; CHEN, X-X. Two types of lysozymes from the whitefly *Bemisia tabaci*: Molecular characterization and functional diversification. Developmental and Comparative Immunology. 2018.

WEI, S.; HUANG, Y.; HUANG, X.; CAI, J.; WEI, J.; LI, P.; OUYANG, Z. L.; QIN, Q. Molecular cloning and characterization of a new G-type lysozyme gene (Ec-lysG) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Developmental and Comparative Immunology. n.46 .2012. p.401–412.

WEI, J.T., TANG C.D., WU M.C., LIU G.L., SHI H.L., LI J.F. Cloning and functional expression of a human lysozyme gene (hly) from human leukocytes in *Pichia pastoris*. Mol Med Rep. n.6. 2012.

WU, A.C.M.; EITENMILLER, R.R.; POWERS, J.J. Yields from chymotrypsin and lysozyme under fluctuating temperature treatments. Journal of Food Science. v.40. 1975.

WU, T., JIANG, Q., WU, D., HU, Y., CHEN, S., DING, T., YE, X., LIU, D., CHEN, J., What is new in lysozyme research and its application in food industry? -A review, *Food Chemistry*. 2018.

ZHAO, J., QIU, L., NING, X., CHEN, A., WU, H., LI, C. Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum*. Journal Comparative Biochemistry and Physiology, part B. n. 156, 2010. p. 56 – 60.

ZHOU, X.; YU, Y.; TAO, J.; YU, L. Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 1e6, 2014.