



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



CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA QUITINASE DE
Anopheles gambiae EM *Pichia pastoris*

JANDER MATOS GUIMARÃES

MANAUS
2019

JANDER MATOS GUIMARÃES

Clonagem e expressão do gene da quitinase de *Anopheles gambiae* em *Pichia pastoris*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo – USP/Esalq
Coorientador: Prof. Dr. Edson Junior do Carmo – UFAM/ICB

Defesa de dissertação em 28 de junho de 2019

Banca Examinadora:

Titulares:

Prof. Dr. Edson Júnior do Carmo - Presidente

Prof. Dra. Iza Marineves Almeida da Rocha - UFAM

Prof. Dr. André Luiz Willerding – UNINORTE

Suplentes:

Prof. Dr. Jorge Luiz López-Lozano – FMT-HVD

Prof. Dr. Augusto Bucker - INPA

MANAUS - AM

2019

Ficha Catalográfica

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

G963c Guimarães, Jander Matos
Clonagem e expressão do gene da quitinase de *Anopheles gambiae* em *Pichia pastoris* / Jander Matos Guimarães. 2019
77 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Lúcio de Azevedo
Coorientador: Edson Júnior do Carmo
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Pichia pastoris*. 2. enzima recombinante. 3. quitinase. 4. *Anopheles gambiae*. 5. biologia molecular . I. Azevedo, João Lúcio de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Ao professor Edson Jr., pela valiosa orientação, infinita paciência, pelo estímulo em todas as tentativas, compreensão em tudo o que passei, a confiança na minha capacidade como pesquisador. Impecável em transmitir sempre todo conhecimento que possui.

Ao professor João Lúcio de Azevedo que contribuiu com sua orientação mesmo à distância, tornando possível esta pesquisa.

À Jéssica Araújo por todo apoio como namorada, companheira, amiga, parceira e inspiração, e a todo cuidado que dispensou a mim em todas as horas.

À minhas irmãs e mãe que me incentivaram de todas as formas, jeitos e que não falham em nada.

Ao fiel amigo André Vieira, que foi incansável em me ajudar em todos os momentos, e que com certeza é alguém que Deus ilumina.

Aos amigos que fiz no laboratório de microbiologia que foram excepcionais em compartilhar comigo seu conhecimento, Samanta, Lanna Lobo e Minerval.

A todos os bons amigos que me proporcionaram apoio e incentivo sem medidas, em especial a professora Lucivana Mourão e Cezar Romero.

À estrutura e apoio do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM, principalmente a profissionais como Paulo e Elza.

À coordenação e professores do PPGBIOTEC que contribuíram na minha formação.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Deus que não me deixa desistir de nada, me mostra pessoas, caminhos e oportunidades todos os dias, sem falta, e que me permitiu concluir este trabalho e ter todas essas bençãos aqui citadas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGNIFICADOS	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO	9
1.1 A BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS.....	9
1.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA	10
1.3 EXPRESSÃO EM <i>PICHA PASTORIS</i>	14
1.4 PROMOTORES DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	16
1.5 QUITINASES.....	18
1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDOS DE QUITINASES.....	24
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 ESTRATÉGIA DESENVOLVIDA	29
4.2 LINHAGENS HOSPEDEIRAS	30
4.3 VETORES UTILIZADOS	30
4.4 SÍNTESE QUÍMICA DO GENE CODIFICANTE DA QUITINASE DE <i>A. GAMBIAE</i>	34
4.5 CONSTRUÇÃO DOS VETORES RECOMBINANTES PPIC-QUIT E PPGK-QUIT	35
4.6 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES	36
4.7 EXTRAÇÃO PLASMIDIAL.....	37
4.8 DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL (ANÁLISE DE RESTRIÇÃO)	37
4.9 TRANSFORMAÇÃO DE <i>P. PASTORIS</i> POR ELETROPORAÇÃO.....	38
4.10 CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO POR <i>COLONY BLOTTING</i>	39
4.11 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA QUITINASE EM PLACA.....	40
4.12 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO EM FRASCOS AGITADOS.....	41
4.13 MEDIDA DA ATIVIDADE DE QUITINASE	42
4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 OTIMIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE	44
5.2 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO E CONSTRUÇÃO DE VETORES RECOMBINANTES	45
5.3 CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO NO GENOMA DE <i>P. PASTORIS</i>	49
5.4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL SEGUNDO A ATIVIDADE.....	51
5.4.1 TRIAGEM DE CLONES RECOMBINANTES	51
5.4.2 DELINEAMENTO PLACKETT & BURMAN (PB) E DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	51
6. CONCLUSÕES	62
7. PERSPECTIVAS.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

Lista de abreviaturas e significados

DNA – ácido desoxirribonucleico

RNA – ácido ribonucleico

pH – potencial hidrogeniônico

AOX – álcool oxidase 1

PGK – fosfoglicerato quinase

GRAS= Generally Recognized as Safe

EDTA= Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

SDS= Dodecil sulfato de sódio

pb= Par de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

SCP – Single cell protein

LB – Luria Bertani

AMCase – acidic mammalian chitinase

GlcNAc – N-acetilglucosamina

YPD – Yeast extract Peptona Dextrose

BMMY - Buffered Methanol-Complex Medium

BMGY - Buffered Glycerol Complex Medium

MD – Minimal dextrose

RESUMO

Sendo integrante da classe das glicosídeo-hidrolases, as quitinases (EC 3.2.1.14) atuam na clivagem de sítios randômicos da molécula de quitina através de hidrólise, formando cadeias de quitooligossacarídeos. Estruturalmente possuem subdomínios catalíticos que a auxiliam na ligação ao seu substrato insolúvel e ruptura da conformação cristalina. O potencial enzimático dessas enzimas compreende principalmente o controle biológico de fito-patógenos fúngicos e insetos vetores, organismos onde a quitina é um componente estrutural da parede celular ou exoesqueletos. Entretanto, sua aplicabilidade se estende à síntese de polissacarídeos artificiais, isolamento de protoplastos fúngicos e estimativa de biomassa em processos industriais. A partir do sequenciamento do genoma de *Anopheles gambiae* foi obtido o gene atribuído a expressão de quitinase, de maneira que através de síntese química esse gene foi clonado em *Escherichia coli* (linhagem DH5 α), e integrado ao genoma de *Pichia pastoris* nos vetores de expressão pPIC9 e pPICPGK. A atividade enzimática de 19 clones foi confirmada por análise do halo de degradação de quitina coloidal, e após a seleção foi realizada produção submersa em frascos agitados e caracterização bioquímica da enzima por delineamento central composto rotacional (DCCR). A clonagem e obtenção de vetores de expressão recombinantes foi consolidada de maneira que a integração ao genoma da levedura apresenta nível significativo de expressão, na atividade enzimática fatores como tempo de incubação e temperatura não revelaram significância, e o fator pH se demonstrou com resposta positiva em faixas mais acídicas.

ABSTRACT

As part of class of glycosidic hydrolases, chitinases (EC 3.2.1.14) acts on cleavage of random sites of chitin molecule through hydrolysis, forming chains of chitooligosaccharides. Structurally has catalytic domains that helps in the binding to them insoluble substrate and rupture of crystalline conformation. Its enzymatic potential mainly comprises the biological control of fungal phyto-pathogens and insect vectors, organisms where chitin is a structural component of cell wall or exoskeletons, however its applicability extends to synthesis of artificial polysaccharides, isolation of fungal protoplasts and estimation of biomass in industrial processes. From the sequencing of the genome of *Anopheles gambiae* the gene assigned to chitinase expression was obtained, so that by chemical synthesis the gene was cloned and *Escherichia coli* (DH5 α line) and integrated to the *Pichia pastoris* genome in the vectors of expression pPIC9 and pPICPGK. The enzymatic activity of 19 clones was confirmed by the presence of colloidal chitin degradation halo, and after selection was performed the submerged production, recovery, and biochemical characterization by central composite rotational design (CCRD). The cloning and generation of recombinant expression vectors was consolidated so that integration into the yeast genome shows a significant level of expression, in the enzymatic activity, factors like incubation period and temperature didn't show significance, and the pH factor demonstrates a positive response in more acidics ranges.

INTRODUÇÃO

1.1 A biotecnologia na produção de proteínas

Conforme o desenvolvimento humano avança em valores populacionais, econômicos ou sociais as demandas em meios de produção também crescem exponencialmente, sendo que a exploração natural se tornou inviável por ser insuficiente e não sustentável.

Sendo assim, compostos que constituem produtos farmacêuticos e alimentícios como as proteínas possuem uma necessidade cada vez maior de produção e obtenção. Grande parte dessas substâncias de interesse é produzida através de conversões a nível molecular, essas reações são catalisadas por enzimas ou complexos enzimáticos, nesse âmbito a pesquisa científica busca a produção dessas moléculas por via biológica observando fatores como biossegurança, rendimento sustentável e economia (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

Anteriormente compostos com fins terapêuticos de origem animal eram associados a reações alérgicas, intoxicações e atividade deficiente, em prol da solução de tais problemas o desenvolvimento biotecnológico passou a se utilizar da edição de genomas, reconduzindo a expressão de genes para organismos de interesse (GOES-FAVONI, 2017).

Define-se como *recombinante* a proteína obtida por expressão em organismo diferente da sua origem, através da edição do genoma deste, essa expressão agrega vantagens como elevado grau de pureza, economia, eficiência

e produção em alta escala (SAMBROOK, 1989). O mecanismo também pode ser denominado como expressão heteróloga.

A produção de proteínas foi um dos benefícios obtidos pela descoberta da tecnologia do DNA recombinante na década de 1970, e ocorreu frente à necessidade de produtos que atendam demandas do crescimento populacional e econômico, beneficiando também o setor de saúde pública (ASTOLFI *et al.*, 2000). Em primeiro momento esse processo contemplou os setores farmacêutico como no caso da produção da proinsulina, de interferons, assim como de enzimas industriais utilizadas na fabricação de alimentos, produtos de limpeza, papéis e combustíveis. Conforme se consolidou, essa produção passou a buscar soluções nas áreas de biorremediação e obtenção de monômeros de interesse empregados na síntese de nutracêuticos para humanos e animais (BOM; FERRARA; CORVO, 2008).

Com tais benefícios diretos e indiretos ao homem, é estimado que até 2030 os setores biotecnológicos somados movimentem cerca de US\$ 1 trilhão ao ano (OBORNE, 2009).

1.2 Expressão heteróloga

De maneira pioneira, a expressão heteróloga de insulina humana na década de 1970 solucionou o problema envolvendo o uso da insulina de origem suína, uma prática que resultava tanto em reações alérgicas quanto ineficiente resposta fisiológica (GURRAMKONDA, 2010). Desde então essa nova metodologia contemplou diversas outras áreas por meio de técnicas envolvendo

inserção de genes de interesse em organismos hospedeiros que favoreçam expressão eficiente, em citação podemos descrever a utilização de bactérias, leveduras, fungos multicelulares, células animais em cultura, plantas ou animais.

As diferenças nos sistemas de expressão estão relacionadas principalmente ao hospedeiro e podem oferecer vantagens ou desvantagens. Cada sistema pode ser desenvolvido de maneira a otimizar a expressão de uma proteína, no caso de enzimas é primordial que as moléculas obtidas ao final possuam a conformação química e estrutural adequada para seu mecanismo de ação (ASTOLFI *et al.*, 2005).

O tipo de proteína alvo define a escolha do sistema de expressão, em exemplo moléculas que não possuam estruturas tão complexas são melhor expressas em sistemas que utilizem bactérias, em razão da viabilidade no cultivo rápido e menos dispendioso enquanto moléculas empregadas no organismo de mamíferos por exemplo, necessitam de modificações pós traducionais para que obtenham a conformação estrutural eficaz (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Considerando tais critérios de escolha em um sistema de expressão, o organismo mais amplamente usado como hospedeiro, é a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, que reúne características favoráveis e bem consolidadas, uma vez que suas informações genéticas, fisiológicas e metabólicas foram solidamente desvendadas em trabalhos científicos.

Historicamente a obtenção de uma das primeiras moléculas recombinantes através da edição no genoma de *E.coli* foi feita por Goeddel (1978), onde o alvo era a síntese de insulina através da clonagem dos genes das insulinas humanas A e B, de origem sintética, sendo inserido e clonados no plasmídeo pBR22.

Por seguinte, diversos trabalhos (XIE *et al.*, 2008; PAIS *et al.*, 2003; KAUFMAN *et al.*, 1997) desenvolveram sistemas de expressão procarióticos para a insulina, e conforme a literatura avançou foi possível compreender as limitações do sistema, fatos como a incapacidade de processar peptídeos recém traduzidos de maneira correta, e o condicionamento de proteínas expressas em corpos de inclusão intracelulares, sendo que essa característica forma agregados protéicos pouco solúveis e altera a estrutura das proteínas tornando-as inelegíveis para tratamentos em organismo humano sem prévia re-edição *in vitro* (HAMILTON; GERNGROSS, 2007).

Além dos corpos de inclusão citados anteriormente, problemas como baixa concentração, método de extração e isolamento de proteínas produzidas através desse sistema também se apresentam como desvantagem para a obtenção de produtos.

Em alternativa foram se desenvolvendo sistemas de expressão a partir de hospedeiros eucarióticos, metodologia que passou a empregar leveduras e fungos filamentosos, juntando a versatilidade de seres unicelulares na manipulação genética e o processamento de proteínas em seu metabolismo semelhante ao de outros eucariotos (TORRES; MORAES, 2001), fato que confere ao produto final ausência de possíveis toxinas, e estrutura ajustada pelas modificações pós-traducionais realizadas.

Esse sistema logo apresentou inúmeras vantagens frente ao modelo utilizando procariotos, com economia nos meios de cultivo, alto rendimento na produção devido a níveis elevados de expressão, além da vantagem de o

processo fermentativo acelerar o metabolismo podendo ser modulado ou induzido (HENSING *et al.*, 1995).

A viabilidade para expressão heteróloga em leveduras segue critérios bem estipulados, a escolha da linhagem e espécie deve obedecer fatores como a possibilidade de cultivo em biorreatores em altas concentrações celulares, ser eficaz na conversão de substrato a biomassa, capacidade de expressão gênica desvinculada ao crescimento celular, na maioria dos casos necessita da capacidade de secretar proteínas editadas após a tradução e ser classificada como um organismo GRAS (*generally recognized as safe*) (DALY; HEARN, 2005). São ainda observadas as classificações segundo o metabolismo das espécies, existindo assim aquelas consideradas convencionais e não-convencionais, as *Crabtree* positivas (fermentadoras) e negativas (respiradoras) (GONZALES; FREIRE-PICOS, 2000; DEKEN, 1966).

Dentre as espécies que apresentam viabilidade para expressão heteróloga, podemos listar *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* (MATTANOVICH; SAUER; GASSER, 2014; MORKA *et al.*, 2014), sendo que esta última foi utilizada por muito tempo como ideal por ter tido seu metabolismo e características densamente estudados, uma vez que atendia ao consumo humano na fermentação de bebidas e outros alimentícios. O uso de leveduras foi de extrema relevância para estudos no campo da biologia molecular, por meio dos quais foram observados os perfis de modificações pós traducionais envolvendo acetilação de terminais amino, fosforilação, acilação, glicosilação e dobramentos em estruturas proteicas mais complexas (WANG *et al.*, 2016).

Diversos genes de interesse foram processados e expressados em sistemas utilizando *S.cerevisae*, voltados a produção de antivirais, insulina humana e anticorpos (WANG *et al.*, 2016). Somente após alguns anos foi percebido que a espécie além de apresentar níveis de expressão inferiores a outras leveduras, também apresentava tendências a hiperglicosilação de proteínas expressas, modificando por exemplo moléculas que deveriam apresentar imunogenicidade, impossibilitando aplicação terapêutica em humanos, além de frequente retenção de produtos do metabolismo no espaço periplasmático (CAPONE *et al.*, 2015).

Em contrapartida a espécie *Pichia pastoris* passou a ser utilizada como fonte de proteínas na década de 1980 principalmente em processos SCP (*single cell protein*), por empresas como a SIBIA (*Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc.*) e foi consolidada como sistema vantajoso para expressão heteróloga principalmente pela possibilidade do controle da expressão (CREGG, 2004; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005)

1.3 Expressão em *Pichia pastoris*

Uma das principais diferenças entre o sistema anterior que utilizava *S.cerevisae* e o sistema que utiliza *P.pastoris* é a capacidade de controle da expressão, uma vez que a espécie pode utilizar de metanol como fonte única de carbono para seu metabolismo (metilotrófica) (KRAINER *et al.*, 2012), fazendo com que a concentração desse reagente no meio de cultura altere os níveis de expressão.

A expressão de proteínas na espécie pode ser induzida e regulada, essa indução se dá pela transcrição de um promotor de alta intensidade, produzido através de genes codificantes da enzima álcool oxidase, denominados *aox I* e *aox*

II, sendo que *aox1* é o gene que expressa mais ativamente proteínas atuam na atividade enzimática quando na presença de metanol (LIN-CEREGHINO; CREGG, 2000), que nesse caso atua como indutor e regulador.

Esse sistema agrega ainda a possibilidade de expressão extracelular ou intracelular, sendo que no primeiro caso a presença da proteína livre no sobrenadante de cultivo facilita e agiliza a obtenção da mesma, preferencialmente o crescimento ocorre de maneira aeróbia proporcionando altas concentrações celulares, realiza modificações pós traducionais como processamento proteolítico e formação de pontes dissulfeto (GASSER *et al.*, 2013). Também realiza glicosilação, no entanto com perfil diferente em tamanho da cadeia de carboidratos apresentada em *S. cerevisiae*, onde manoses são comumente adicionadas às porções terminais de ligações alfa-1,3, essa ausência torna as proteínas produzidas em *P. pastoris* semelhantes aquelas expressas em mamíferos, sendo compatíveis ao organismo humano principalmente em imunogenicidade (CREGG *et al.*, 2009).

A manipulação genética dessa levedura compartilha os mesmos métodos aplicados em *S. cerevisiae*, que de maneira simples podem compreender transformação, substituição gênica ou clonagem por complementação funcional (CREGG & CEREGUINO, 2000).

Preferencialmente a recombinação homóloga ocorre através de integração cromossomal, nesse método a levedura é submetida a transformação utilizando cassetes de expressão com a sequência de interesse que se integram ao genoma da levedura via *crossing over* ou através de substituição genética gerando um duplo *crossing over*, de maneira eficaz esse procedimento possibilita a regulação

do sítio de integração e as formas com que ela pode ocorrer, além da possibilidade da integração de múltiplas cópias deste cassete resultando numa super expressão da proteína de interesse (MADSEN *et al.*, 2013).

1.4 Promotores de expressão heteróloga

As sequências de DNA que antecedem os genes e promovem a transcrição, são ferramentas comuns na engenharia genética desde que sua genômica foi investigada, a associação a vetores de clonagem e expressão significou um avanço robusto na recombinação de genes heterólogos. Em leveduras emprega-se a utilização de promotores sintéticos induzidos ou constitutivos, onde o primeiro necessita de um fator de indução (ex: metanol, temperatura ou pH) e o segundo é expresso constantemente ao longo do crescimento celular (CARMO; NEIVA; ASTOLFI-FILHO, 2015).

Há um volume grande de trabalhos que fizeram a associação de sequências promotoras com sequências peptídeo sinal, *P.pastoris* se mostrou um sistema promissor por possibilitar a secreção de proteínas para o meio extracelular por meio de sinalização com resíduos de aminoácidos que as direcionam para o meio extracelular, fenômeno que ocorre pela ação de peptidases e diaminopeptidases na proteína assim que a mesma adentra o lúmen do retículo endoplasmático (CREGG & CEREGUINO, 2001; DALY & HEARN, 2005).

Na expressão extracelular em leveduras o promotor mais comum se tornou opAOX, e a seu uso se atribui a eficácia na obtenção de muitas proteínas recombinantes, mas existem ainda modelos baseados em genes codificantes de outras enzimas como a formaldeído desidrogenase I (pFLD1) e gliceraldeído 3-

fosfato desidrogenase (GAP), ambos alternativos ao uso de metanol e regulados pelas condições de cultivo e uso de substratos específicos (VELLANKI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

Em sistemas de promotores induzíveis com os que utilizam o gene *aox*, a expressão é reprimida pela adição de outra fonte de carbono como glicose ou glicerol, e induzida pela presença de metanol, no entanto algumas desvantagens levaram a busca por promotores alternativos, alguns dos empecilhos são a manipulação de metanol em escala industrial por ser altamente volátil e tóxico, e a necessidade por vezes da expressão combinada com outras proteínas na promoção da atividade enzimática (CREGG, 2009; AHMAD *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016).

Assim foram selecionados promotores constitutivos que podem ser potencializados pela presença de outras substâncias, mas que em suma possuem expressão constante, como no caso do promotor PGK1 (fosfoglicerato quinase) (originalmente desenvolvido para *S. cerevisiae* mas otimizado em *P.pastoris*) (ALMEIDA *et al.*, 2005; BURKE *et al.*, 2000; KINGSMAN *et al.*, 1985; GRANGE *et al.*, 1996), e promotores CGw14 (proteína ancorada a fosfatidil glicosil inositol) e G1 (transportador de glicose) (MATTANOVICH *et al.*, 2014). Os exemplos citados constituem promotores de alta intensidade, fator que pode ser associado a alta expressão de genes codificantes de elementos da via glicolítica, e que independem do crescimento celular, uma dificuldade presente em promotores como o GAP de atividade baixa quando a levedura apresenta crescimento lento.

Observando as diferentes necessidades e particularidades de cada trabalho, foram desenvolvidas novas linhagens da espécie também com finalidade

de otimizar tanto mecanismos de seleção, quanto de níveis de expressão. O mesmo ocorreu com vetores plasmidiais e cromossomos bacterianos que passaram a ser bifuncionais, tendo aplicabilidade em procedimentos de somente clonagem ou clonagem e expressão, com porções homólogas ao genoma de leveduras e outras aos de bactérias, dispensando o uso de mais de um vetor contendo o mesmo gene.

É possível descrever a expressão de proteínas recombinantes utilizando o modelo em *P. pastoris* em pelo menos 400 trabalhos, com destaque para a produção de enzimas como lacases, fitases e enzimas com funções de lise como xilanases, pectinases, proteases, lipases, quitinases e amilases principalmente em escala industrial, a análise na literatura demonstra que sistemas desenvolvidos em *P. pastoris* têm aumento na atividade enzimática quando comparados a sistemas em *E. coli* e *S. cerevisiae* (CHANG *et al.*, 2006; RABERT *et al.*, 2013).

1.5 Quitinases

A classe das glicosil-hidrolases, ou glicosidades compreende enzimas que realizam a quebra de ligações glicosídicas por hidrólise, na natureza essas enzimas estão em muitos organismos em razão das funções estruturais e energéticas de monossacarídeos simples até carboidratos mais complexos. É classificada como uma superfamília por conter pelo menos 81 tipos de enzimas, que atuam na junção de carboidratos entre si ou de carboidratos e outras moléculas, apresentam muita similaridade na sequência de aminoácidos e são classificadas na mesma sub-família quando compartilham um mesmo domínio catalítico.

Um tipo de homopolissacarídeo clivado pela ação de glicosidases é a quitina, o segundo carboidrato mais abundante encontrado na natureza após a celulose (YANG *et al.*, 2009), constituído por duas unidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por ligações β (1-4) (HENRISSAT, BAIROCH, 1993). Possui forma cristalina se apresentando nos tipos α , β e γ e naturalmente constitui a parede celular de fungos, bactérias e o exoesqueleto de insetos e outros invertebrados (LEE *et al.*, 2010).

Em sua conformação forma longas cadeias de GlcNAc empacotadas de maneira uniforme lado a lado, as ligações se dão por meio de pontes de hidrogênio entre as terminações amina de uma cadeia e os grupamentos carbonila da cadeia seguinte. A diferença entre seus 3 tipos se dá pelo grau de hidratação, tamanho da unidade celular que forma, e número de cadeias de GlcNAc ligadas (SIKORSKI *et al.*, 2009; NISHIYAMA *et al.*, 2011)

Também estão distribuídos em larga proporção organismos que possuem enzimas com atividade quitinolíticas, seja para nutrição, parasitismo, reaproveitamento da quitina, morfogênese ou defesa contra patógenos (HOWARD *et al.*, 2003). Para essa finalidade existem duas principais estruturas, as quitinases (EC 3.2.1.14) e as β -N-acetilhexosaminidases (EC 3.2.1.52). As quitinases clivam as cadeias de quitina de maneira randômica em sítios internos, e as acetilhexosaminidases catalisam a remoção de resíduos de GlcNAc das extremidades não reduzidas das cadeias (ADRANGI *et al.*, 2010). As quitinases pertencem às classes 18 e 19 das glicosil-hidrolases, dentre as quais as diferenças se dão pelo padrão de reações catalíticas e homologia na sequência de aminoácidos (MIZUNO *et al.*, 2008).

As quitinases pertencentes à sub-família 18 ocorrem bactérias, fungos, arqueias, animais e plantas, e tem estrutura tridimensional característica formada por 8 α -hélices e 8 β - folhas formando domínio catalíticos em barril (Figura 1A) e realizam seu processo de hidrólise por catálise assistida pelo substrato (HUMPHREY *et al.*, 1996).

E as quitinases classificadas na família 19 são características de nematódeos, bactérias, vírus e algumas plantas, com destaque para espécies do gênero *Streptomyces*, e bactérias especificamente sulforosas ou de coloração púrpura de filos como Proteobacteria (SUMIDA *et al.*, 2011), possuem estrutura distribuída em uma quantidade maior de α -hélices (Figura 1b) e domínio catalítico similar ao de lisozima, tanto que esta enzima por vezes assume atividade quitinolítica (CHUANG *et al.*, 2008). Possui catálise mediada por acidez com inversão do carbono anomérico de β para α conforme exemplificado (Figura 2) (WOHLKONIG *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2010).

Essas enzimas também se classificam segundo o sítio catalítico onde a enzima realizará a hidrólise, sendo endoquitinases quando em sítios internos aleatórios da cadeia de quitina e que tem como produtos oligômeros de GlcNAc de baixa massa molecular, e exoquitinases quando atuante em sítios específicos internos e regulados gerando exclusivamente estruturas chamadas diacetilquitobioses, as ocorrências desses tipos se dão tanto nas sub-famílias 18 quanto 19 das glicosil-hidrolases.

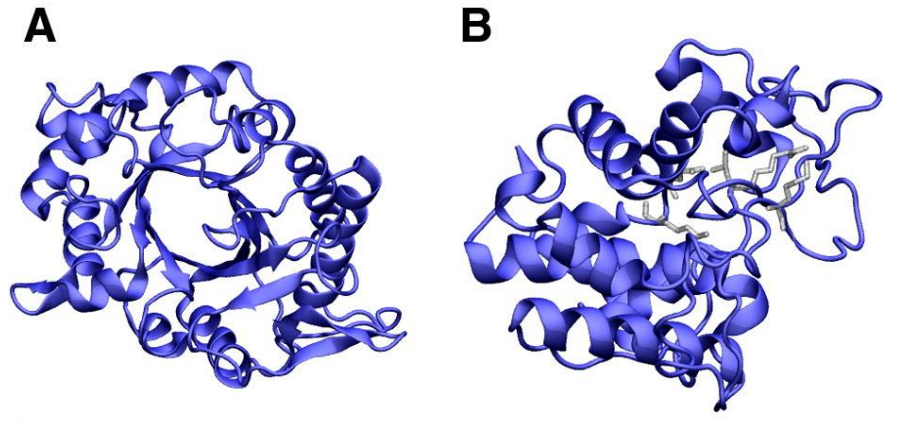


Figura 1. Estruturas tridimensionais da quitinase. A – quitinase da família 18 das glicosil hidrolases originária de *Aspergillus fumigatus* mostrando as estruturas em barril α e β . B – quitinase da família 19 das glicosil-hidrolases originária de *Carica papaya*. Extraído e modificado de Humphrey e colaboradores (1996).

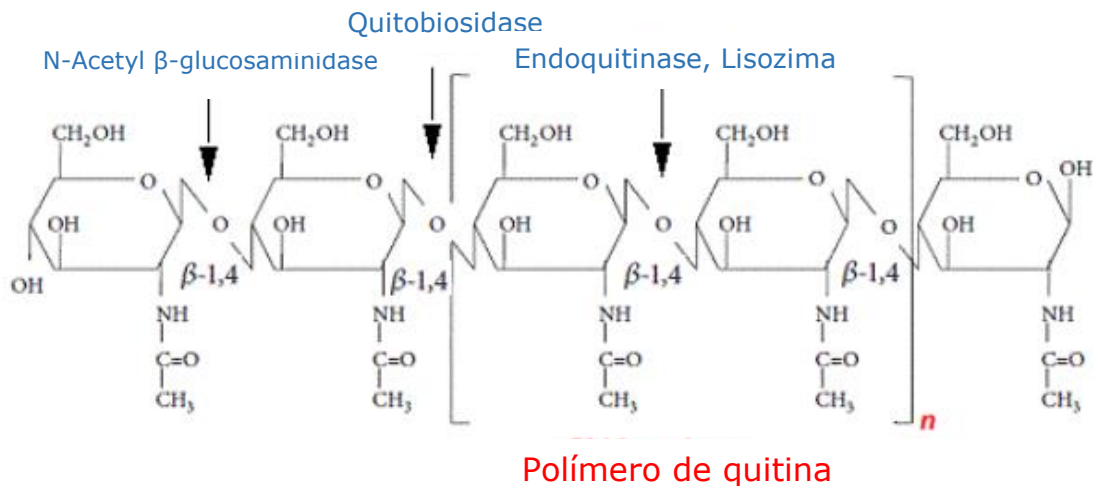


Figura 2. Especificidade de diferentes quitinases sobre o polímero de quitina. As N-acetil- β -glucosaminidase cliva unidades monoméricas de GlcNAc nas terminações não reduzidas. Exoquitinases ou quitobiosidases clivam o polímero de quitina em unidades diméricas de GlcNAc nas terminações não reduzidas e endoquitinases clivam as ligações glicosídicas em sítios internos randômicos das moléculas de quitina.

Conforme o tipo de organismo em que são expressas as quitinases podem assumir diferentes funções fisiológicas. Em fungos é integrante chave de todas as

fases de desenvolvimento desde sua morfogênese, até a manutenção de metabolismo energético (SAHAI; MANOCHA, 1993; ADAMS, 2004), enquanto em vírus está associada aos mecanismos de patogênese, especificamente em baculovirus se envolve na dissolução de tecidos em insetos e principalmente no rompimento de cutículas larvais (MEZENDORFER; ZIMMICH, 2003). Em plantas atuam contra infestações de fito-patógenos e controle de interações entre espécies, desenvolvendo resistência sistêmica ou local contra organismos que possuem principalmente quitina estrutural em sua composição (GRAHAM; STICKLER, 1994) sendo até utilizada em processos de transgenia maximizando a expressão da enzima em frutíferas (BISHOP *et al.*, 2000).

Em vertebrados que não produzem quitina mas são consumidores ou predadores de organismos que a possuem como insetos e crustáceos, as quitinases estão presentes principalmente em órgãos do trato digestivo e participam ativamente na degradação de moléculas utilizadas posteriormente no metabolismo de carboidratos (SOUZA *et al.*, 2011). Em humanos e outros mamíferos a quitinase não tem sua função específica totalmente desvendada, sabe-se que está presente no suco pancreático e que está associada a mecanismos de defesa contra organismos quitinosos, em destaque já foi detectada a presença de uma quitotriosidase (CHIT-1) e uma quitinase ácida (AMCase), ambas podem ser utilizadas como indicadores de infestações fúngicas quando expressadas em altos níveis no plasma de pacientes, a CHIT-1 foi evidenciada como sinalizador da doença de Gaucher sendo altamente expressadas por macrófagos representa um indicador de resposta imune inata em pacientes afetados, e a AMCase é secretada por células epiteliais pulmonares

sendo indicativo de inflamações no trato respiratório, reações alérgicas ao acúmulo de quitina e asma (VEGA; KALKUM, 2012; KIM *et al.*, 2015).

As quitinases bacterianas têm ampla função ecológica de reciclagem da quitina presente no ambiente, produzem uma variedade grande de diferentes quitinases, essencialmente a ação enzimática libera energia aproveitada por esses organismos, que também realizam liberação de nitrogênio e carbono principalmente em ecossistemas marinhos (KEIHANI; ROSEMAN, 1999). A variedade de quitinases produzidas corresponde a diversidade de variações de quitina encontradas no ambiente, em exemplo a espécie *Vibrio harveyi* é capaz de expressar até dez tipos de quitinases diferentes e algumas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* expressam quitinases com funções de lisozima (COHEN-CUPIEC & CHET, 1998).

Em insetos a quitinase tem atividade contínua na manutenção da renovação cuticular e rompimento da matriz peritrófica, estando presente em estruturas internas promovendo processos de reparação e maturação de estruturas como epiderme e traqueia, pertencem a família 18 das glicosil hidrolases e já foram identificadas em espécies do gênero *Chelonas sp.*, e nas espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Bombyx mori*, *Tenebrio molitor* e no genoma do transmissor da malária *Anopheles gambiae* no qual se baseia este trabalho, a maioria dos genes é comparado em homologia de sequencias aos genes de quitinase de *Drosophila melanogaster* (BEHR; HOCH, 2005 CONSOLI *et al.*, 2005; ADRANGI; FARAMARZI, 2013)

O primeiro gene de quitinase de insetos a ser clonado, expressado em sistema heterólogo e caracterizado foi o da espécie *Manduca sexta*, utilizando

sequências de Cdna (SAMUELS; REYNOLDS, 1993), em uma época onde se especulava que as espécies compartilhavam de uma única sequência gênica para a expressão da enzima, e estudos com *Bombyx mori* mostraram que o genoma de insetos pode expressar um complexo de enzimas com atividade quitinolítica ou ainda expressar mais de 4 tipos diferentes.

Por meio da caracterização genética e análise funcional do genoma de *A. gambiae* foi prospectada sequência de nucleotídeos codificante da quitinase, que ganhou destaque e proposta para a clonagem e produção heteróloga em sistema utilizando *P. pastoris*.

1.6 Expressão heteróloga e estudos de quitinases

A atividade enzimática das quitinases tem valor biotecnológico bem explorado atualmente, sua aplicabilidade contempla o setor de saúde pública, industrial e do agronegócio. Como já citado anteriormente um dos principais adventos do uso de quitinases recombinantes é a transgenia de espécies frutícolas, onde se estabelecem mecanismos de resistência contra micoinfecções e a síntese de bioinseticidas alternativos ao uso de agroquímicos (BISHOP *et al.*, 2000).

Em associação do setor industrial e de saúde, as quitinases são empregadas na fabricação de quitosana, um material de consistência versátil usado principalmente em cosméticos, nutracêuticos para emagrecimento, biofilme para alimentos e em estudos mais recentes vem sendo desenvolvido como potencial substituto para pele humana (SILVA *et al.*, 2006; DALLAN *et al.*, 2005).

Os benefícios se baseiam na expressão heteróloga em modelos bacterianos e eucarióticos, inúmeros genes já foram clonados, expressos e as proteínas resultantes já foram caracterizadas, os modelos mais bem estudados envolvem os genes da espécie *Bacillus turighiensis* e *Serratia marscensis*, e trabalhos atuais como os de Sousa e colaboradores (2019) já prospectam enzimas que além da eficácia tenham alta estabilidade térmica.

2. Justificativa

A espécie *A. gambiae* tem agregado destaque na análise funcional e estrutural do seu genoma, estando atrelada a problemática da difusão da malária no continente africano como principal vetor da doença, tem impulsionado grupos de pesquisa na obtenção de dados sobre sua fisiologia (BEHR; HOCH, 2005).

Com o volume reduzido de bioprodutos relacionados a controle biológico de organismos nocivos à saúde humana, zootécnica e vegetal, este estudo assim como alguns previamente citados aborda a clonagem e expressão do gene da quitinase como alternativa sustentável para esta problemática, uma vez que possui ação quitinolítica seletiva afetando exclusivamente microrganismos onde a quitina é componente estrutural ou tem funcionalidade metabólica (KEIHANI; ROSEMAN, 1999).

A relevância da produção de enzima recombinante representa potencial biotecnológico em aplicações no meio industrial, uma vez que quitinases tem um amplo espectro de aplicações, sobretudo no controle biológico. O modelo utilizando *Pichia pastoris* representa alto volume de expressão da proteína em questão principalmente pelo uso de expressão regulada pelo promotor aox, em alternativa a toxicidade do uso de metanol neste sistema de expressão este trabalho propôs o uso simultâneo do promotor da fosfoglicerato quinase pgk, com indução regulada por glicose. Ambos os sistemas representam potencial rendimento semelhante ou superior à outras proteínas já obtidas por recombinação homóloga de genes heterólogos em sua fisiologia, e a avaliação uniforme da atividade enzimática da proteína expressa colaborará com a

elucidação da ação enzimática em insetos vetores sendo promissor candidato a fator de controle biológico.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Clonar e expressar o gene da quitinase de *Anopheles gambiae* em *Pichia pastoris*

3.2 Objetivos específicos

Clonar o gene da quitinase em vetores de expressão e secreção pPIC9 e pPICPGK

Integrar o gene da quitinase em *Pichia pastoris* utilizando os vetores recombinantes pPIC9/QUIT e pPICPGK/QUIT.

Produzir a proteína recombinante por técnicas de indução (metanólica e com glicose).

Obter a enzima recombinante como produto da indução em frascos

Determinar a atividade da enzima recombinante

4. Metodologia

4.1 Estratégia desenvolvida

Esse trabalho foi dividido nas seguintes etapas: clonagem do gene de quitinase de *Anopheles gambiae*, construção de vetores recombinantes, integração no genoma de *P.pastoris* linhagem GS115, indução à expressão da quitinase, análise em gel de SDS, determinação de atividade enzimática e análise estatística. A figura 3 demonstra a sequência da aplicação dos métodos.

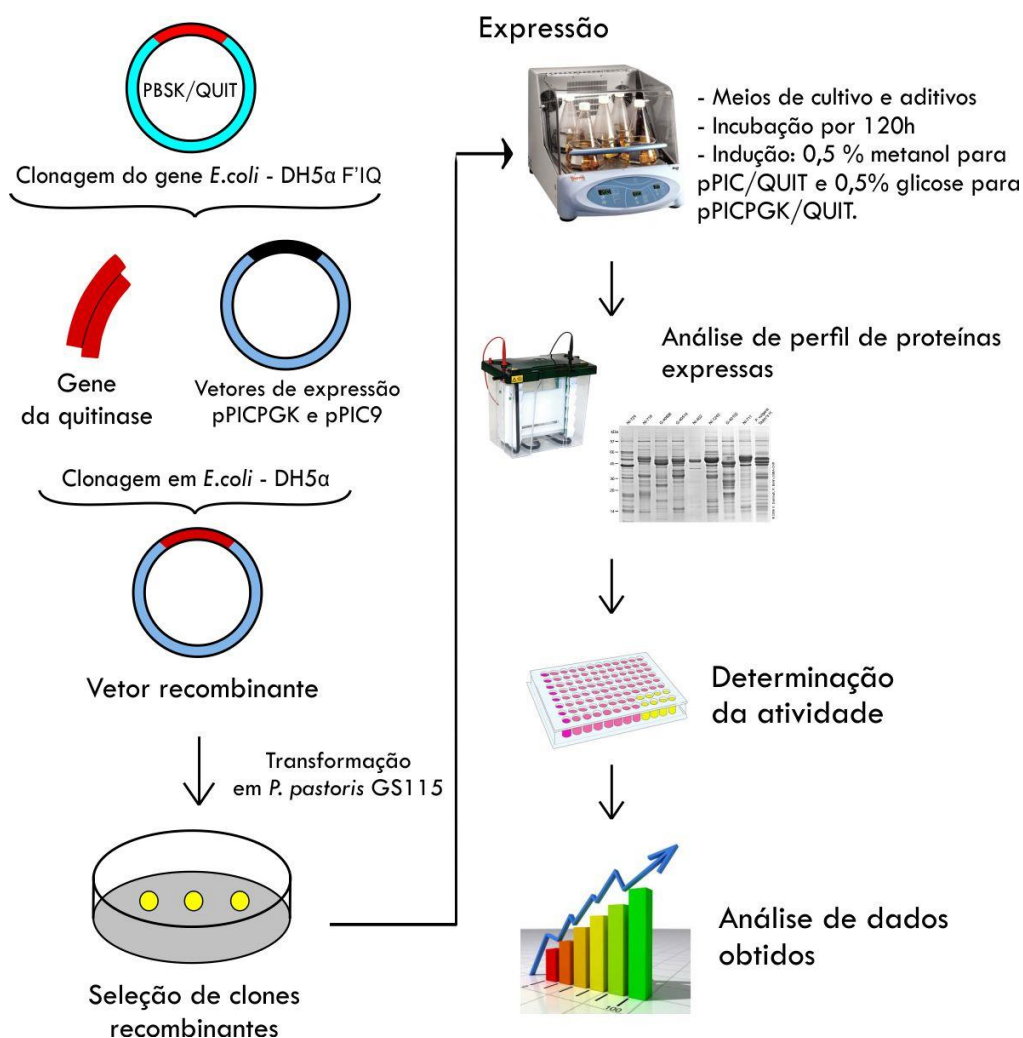


Figura 3. Fluxograma de atividades desenvolvidas durante a dissertação

4.2 Linhagens hospedeiras

Escherichia coli DH5 α

As células são de linhagem do genótipo F⁻ ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r κ ⁻, m κ ⁺) *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*. Indicada para procedimentos de clonagem gênica e construção de bibliotecas de cDNA (Invitrogen®). Essa linhagem foi utilizada em manipulações de DNA, em clonagem para obtenção e propagação do gene.

Pichia pastoris GS115

Linhagem do genótipo *his4* e fenótipo Mut⁺. É uma linhagem que possui mutação no gene *his4* de histidinol desidrogenase, o que representa que possui a deficiência na produção do aminoácido histidina (INVITROGEN, 2010), que funciona como uma marca de seleção auxotrófica, ou seja, um mecanismo para seleção de transformantes onde sequências codificadoras de *his4* foram incorporadas ao genoma e conseguem crescer em meios de cultura deficientes em histidina.

4.3 Vetores utilizados

pBlueScript K (GenOne)

Vetor comercial amplamente usado em clonagem e sequenciamento, possui região de sítio múltiplo de clonagem com pelo menos 21 sítios únicos de enzimas de restrição, esse sítio é flanqueado por promotores de RNA polimerase (T3 e T7) para uso em trabalhos com síntese de RNA *in vitro*, possui região codificante para o gene *lac Z* com região interrompida pela adição do gene da quitinase, a figura 4 mostra desenho esquemático dos sítios presentes no vetor e

regiões voltadas a replicação e expressão.

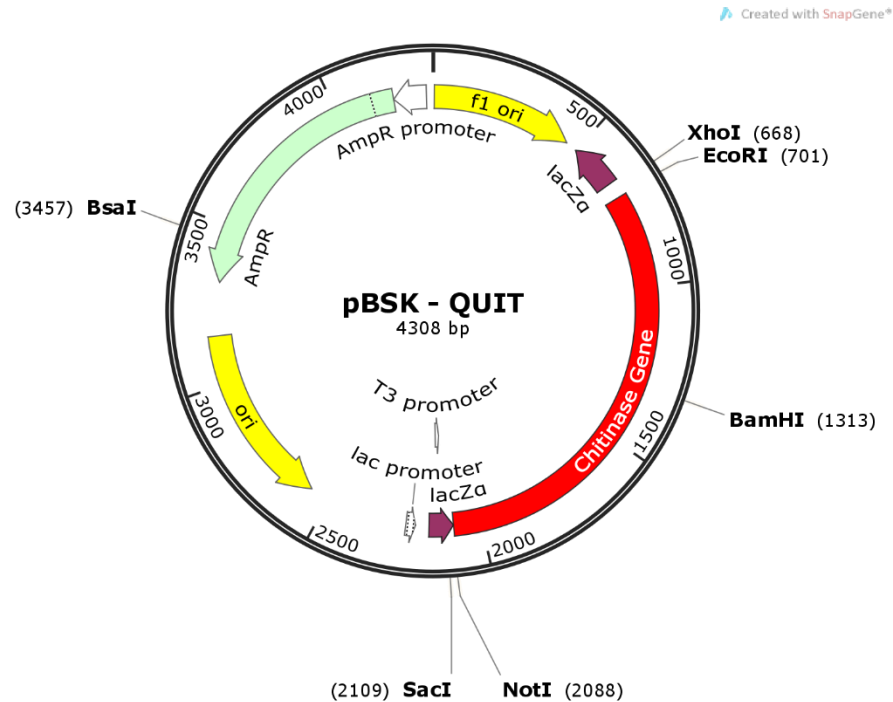


Figura 4. Mapa físico do vetor BlueScript K com o gene da quitinase que foi inserido após o promotor T3 nos sítios de restrição de *EcoRI* e *NotI*. Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene ® versão 3.2.1 (2004-2019)

pPIC9 (Invitrogen)

Vetor comercial indicado para expressão heteróloga de proteínas em *P. pastoris*, tem por base o sistema de secreção delimitado pela presença de sequência peptídeo sinal, possui as seguintes especificações: sequência de aproximadamente 8023 pb, presença do promotor *aox1* codificante da enzima álcool oxidase 1 e induzido pela adição de metanol, sequência peptídeo sinal de fator α de *S. cerevisiae* (S), região *polylinker* com múltiplos sítios de clonagem de endonucleases, terminador da transcrição (TT) origem de replicação bacteriana para uso também em sistemas com *E. coli* (pBR322), região *his4* para seleção auxotrófica mas que também tem homologia com o genoma de *P. pastoris*

proporcionando a integração assim como a região 3' *aox1* do cromossomo da levedura e região com sítio de resistência para ampicilina. A figura 5 ilustra um mapa físico do vetor com as regiões descritas.

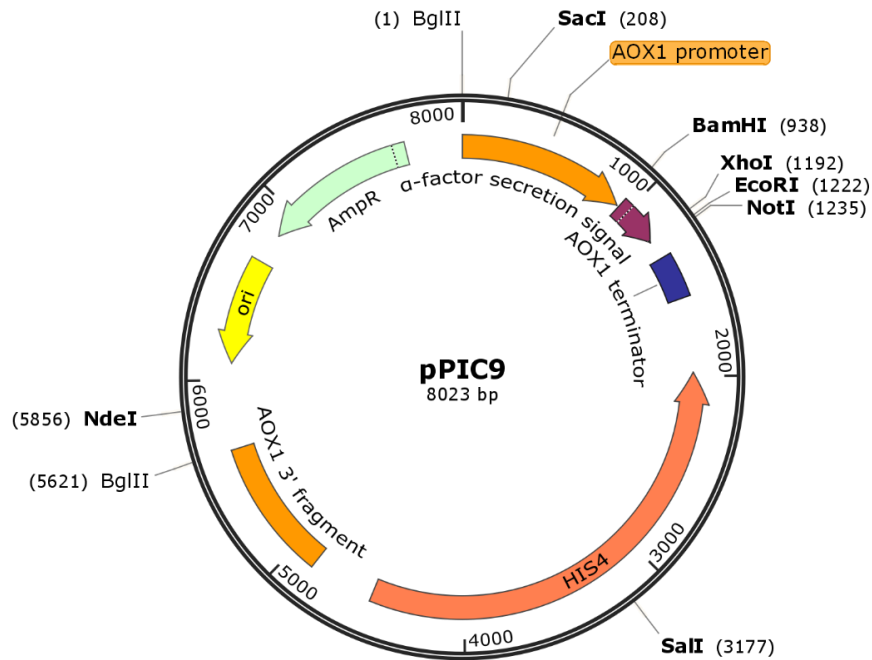


Figura 5. Mapa físico vetor plasmidial pPIC9 com os sítios delimitados, em roxo está indicado o peptídeo sinal fator α . Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene ® versão 3.2.1 (2004-2019)

pPICPGK-AMY

O vetor de expressão pPGK Δ 3AMY foi sintetizado no Laboratório de biologia molecular da Universidade de Brasília (ARRUDA, 2008) e cedido pelo professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres da UNB. Possui 4390 pb, com região promotora do gene da fosfoglicerato cinase (PGK) regulado por glicose, sequência condificante do peptídeo sinal de *S.cerevisae* (PS), origem de

replicação do vetor pUC 19 para a replicação em bactérias, marca de seleção do gene *sh ble* de origem em *Streptoallteichus hidustanus* que confere resistência ao antibiótico zeocina, controlado pelo promotor pTEF que indica fator de alongamento da transcrição, isto em leveduras, e o pEMT7 controlando a transcrição em *E.coli* sendo um promotor natural do fago T7, a região CYC1 proporciona um processamento eficiente do mRNA dando estabilidade ao gene de resistência a zeocina, a região codificante do gene da α -amilase de *Bacillus subtilis*, com sítios das enzimas de restrição *EcoR1* e *Not1*, e terminador de transcrição do gene *aox1* de *P. pastoris*. A figura 6 demonstra o mapa físico do vetor com cada sequência evidenciada.

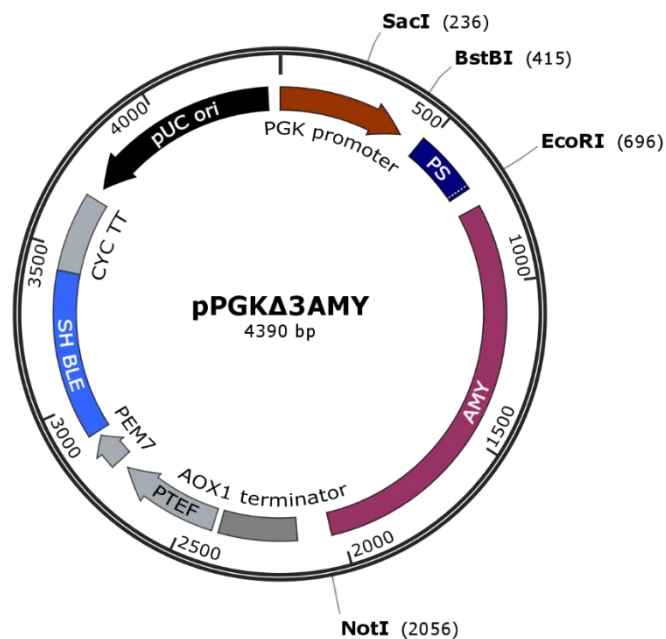


Figura 6. Mapa físico do vetor de expressão pPICPGK-AMY, com sítios delimitados PS indicando peptídeo sinal. Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene® versão 3.2.1 (2004-2019)

4.4 Síntese química do gene codificante da quitinase de *A. gambiae*

A sequência nucleotídica da região estrutural do gene da quitinase foi obtida a partir de um banco de dados genômico de *A. gambiae* disponível no site KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – www.genome.jp/kegg/). Essa sequência foi otimizada pela tabela do *codon usage bias* para expressão em *P. pastoris*, levando em consideração os códons preferenciais dessa levedura e o equilíbrio proporcional entre o conteúdo de bases nitrogenadas citosina (C) com guanina (G) e adenina (A) com timina (T). O gene foi flanqueado em 5' e 3' com sítios de restrição para reconhecimento específico das endonucleases *EcoRI* e *NotI*, respectivamente, o que viabilizou a sua subclonagem nos vetores de expressão e secreção pPIC9 e pPGK. Na extremidade 3', antecedendo ao *stop* códon, foi inserida uma sequência codificadora de uma cauda de seis resíduos de histidina (*his6-tag*) para detecção e confirmação da proteína expressada por meio de ensaios imunológicos, como forma de viabilizar sua purificação por afinidade em coluna de níquel. Essa construção gênica foi quimicamente sintetizada pela empresa *GenOne* e inserida no vetor pBSK pela mesma empresa sendo denominando como pBSK-QUIT.

Durante a construção da sequência do gene de quitinase otimizado para expressão em *P. pastoris* foram utilizadas as ferramentas de bioinformática KEGG, BLAST, ExPasy, UniProt, CBS Prediction Servers, *NEBcutter V 2.0*, *ClustalW2* disponíveis em sites especializados na internet. A determinação das propriedades teóricas como a massa molecular, sítios de glicosilação, ponto

isoelétrico (pI) e meia-vida da proteína recombinante traduzida a partir do gene *TPP* foi realizada com o auxílio das ferramentas de bioinformática *ExpASy ProtParam Tool* (<<http://web.expasy.org/protparam/>>)

4.5 Construção dos vetores recombinantes pPIC-QUIT e pPGK-QUIT

Para construção dos vetores de expressão e secreção de quitinase em *P. pastoris*, o gene sintético quitinase foi primeiramente liberado do vetor de clonagem pBSK-QUIT por digestão dupla com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* nas seguintes condições: tampão NEB 3 1X, 1U de cada endonuclease, 2 µL de DNA (~60 ng/µL) em volume final de 10 µL. O sistema de reação foi mantido em repouso a 37 °C por 3 h. A visualização dos produtos da digestão se deu por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

Em seguida, o fragmento correspondente ao gene sintético da quitinase foi purificado do gel de agarose utilizando-se o *kit* comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel BandPurification Kit* (GE Healthcare) e ligado ao múltiplo sítio de clonagem dos vetores de expressão e secreção pPIC9 e pPGK, previamente digerido com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* nas mesmas condições reacionais e também purificado com o *kit IllustraGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). A reação de ligação se deu por ação da enzima T4-DNA ligase (*New England BioLabs*), conforme as condições recomendadas pelo fabricante, e o sistema incubado por 24 horas a 16°C, respeitando as proporções de 3-5

moléculas de inserto para 1 molécula de vetor, as especificações do protocolo estão distribuídas no quadro 1 juntamente com os volumes utilizados.

Quadro 1. Valores aplicados na digestão preparativa para a ligação.

	PBSQUIT	pPic9GLA	pPGK-AMY
Tampão 3.1	2 µL	2 µL	2 µL
Vetor	10 µL	8 µL	10 µL
ECOR1	1 µL	0,7 µL	1 µL
NOT1	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
H2O	6,5 µL	8,8 µL	6,5 µL
Volume Final	20 µL	20 µL	20 µL

Os plasmídeos recombinantes resultantes da ligação do vetor pPIC9 e pPGK com o gene sintético da quitinase foram denominados pPIC-QUIT e pPGK-QUIT, uma cauda com seis resíduos do aminoácido histidina foi inserida na porção C-terminal do gene, localizada antes do códon de término da tradução. A cauda de histidina foi útil para a detecção em testes de *blott* de colônia, os quais confirmaram a expressão da proteína codificada pelo gene da quitinase. Ambos os plasmídeos foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH5α eletrocompetentes.

4.6 Transformação de células eletrocompetentes

Uma alíquota de 50 µL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH 5α foi utilizada para a transformação com os vetores pPIC9-QUIT e pPGK-QUIT. Um microlitro do princípio transformante (inserto + plasmídeo) foi utilizado para a transformação genética por eletroporação, em pulso elétrico de 1900 volts, em

aparelho eletroporador (Modelo Eletroporator 2510 Eppendorf, cubeta com passagem de 1,0 mm e capacidade de 100 μ L de células competentes) para a inserção do plasmídeo na célula hospedeira. Imediatamente após o pulso elétrico, as células eletroporadas foram ressuspensas em 500 μ L de meio LB (Luria Bertani, apêndice) e o conteúdo transferido para um microtubo de 1,5 mL, o qual foi incubado a 37 °C por 1 hora sob agitação a 180 rpm para revigoração celular. Logo após, realizou-se a semeadura (com volumes de células de 25 e 50 L) em placas de Petri contendo aproximadamente 25 mL de meio LB agar e ampicilina na concentração de 100 μ g/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas para crescimento das colônias transformantes de *E. coli* DH5 α /pPIC-QUIT e pPGK- QUIT.

4.7 Extração plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial dos clones recombinantes crescidos em placas foi utilizado o kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), o qual possui soluções atuantes nas fases de lise celular, desproteinização, lavagem e eluição do DNA plasmidial. Os procedimentos foram realizados segundo as especificações do fabricante. O perfil eletroforético dos produtos de extração plasmidial se deu em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado sob luz UV.

4.8 Digestão do DNA plasmidial (Análise de restrição)

Na análise de restrição, o DNA plasmidial extraído das bactérias transformantes sofreu dupla digestão com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* (*New*

England Biolabs). As condições da reação de digestão foram as seguintes: tampão NEB 3.1 1X, BSA 100 µg/mL, 1 U de cada endonuclease, 1 µL de DNA em volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas. O perfil eletroforético dos produtos da digestão enzimática se deu em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

4.9 Transformação de *P.pastoris* por eletroporação

Inicialmente, uma alíquota de 50 µL de células leveduriformes de *P. pastoris* GS115 foi utilizada para a subclonagem do cassete de expressão presente nos vetores pPIC9-QUIT e pPGK-QUIT. Para transformação das células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, o vetor pPIC9-QUIT foi digerido com a endonuclease *BglII* para liberação do cassete de expressão carregando o gene sintético da quitinase e o vetor pPGK-QUIT foi digerido com a endonuclease *SacI*, e as condições da reação de digestão foram as seguintes: tampão NEB3.1e 1X, 10U de *BglII*, 10 µg de DNA em volume final de 20 µL para o vetor pPGK-QUIT e tampão NEB1.1 e 1X, 10U de *BglII*, 10 µg de DNA em volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 2 horas.

Para a eletroporação, foram utilizados 50 µL de células eletrocompetentes misturadas com 10 µg do DNA linearizado. O sistema de transformação foi transferido para uma cubeta de eletroporação de 2 mm previamente resfriada e incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à eletroporação com voltagem de 1300 milivolts em eletroporador. Imediatamente após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M

gelado para auxiliar na recuperação da parede celular. O conteúdo foi transferido para um microtubo estéril de 1,5 mL e semeados volumes de 50 e 100 µL em placas de Petri contendo meio MD (*Minimal dextrose*) sem o aminoácido histidina para as leveduras transformadas com pPIC9-QUIT e meio YPD (Yeast peptona dextrose) com zeocina 100 µg/mL para as leveduras transformadas com pPGK-QUIT, ambos são métodos de seleção auxotrófica das células transformantes. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas.

4.10 Confirmação da integração do cassete de expressão por *colony blotting*

A técnica se baseia na imunodeteção da cauda C-terminal de histidina expressada em clones transformantes, e consiste em primeiro momento da imposição de uma membrana de nitrocelulose sobre a cultura celular, colocando várias camadas de papel de filtro e papel-toalha sobre a mesma, esse processo promove a transferência das proteínas marcadas com cauda de histidina para a membrana de nitrocelulose por capilaridade e transcorreu por aproximadamente 4 horas, transcorrido esse período foram retiradas as camadas de papel e a membrana de nitrocelulose foi transferida para uma placa estéril com a superfície das colônias voltada para cima.

Nos passos seguintes os procedimentos foram: (a) incubar a membrana em solução SDS 10 % (p/v) por 10 min; (b) transferir a membrana para a solução desnaturante (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) e incubar por 5 min; (c) transferir e incubar em solução neutralizante (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris pH 7,4) por pelo menos duas vezes (d) transferir e incubar em solução SSC652X (0,8765 g NaCl; 0,5025 g

citrato de sódio diidratado preparado em volume de 50mL) por 15 min.; (e) lavar em tampão TBS (10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl) por 10 min. sob agitação. Este procedimento foi realizado segundo o protocolo de *colonyblot* da Qiagen (*Protocol 4. Colony-blot procedure; The QIAexpressionist™*, pg. 43, June 2003).

Concluindo essas etapas foram seguidos os procedimentos de revelação e detecção da cauda de histina C-terminal conforme o protocolo de Imunodeteção Cromogênica Western Breeze da Invitrogen (*WesternBreeze® Chromogenic WesternBlot Immunodetection Kit*). Após a revelação da membrana, clones transformantes positivos para quitinase foram selecionados para os experimentos posteriores.

4.11 Indução da expressão da quitinase em placa

Para a realização do experimento de indução da expressão heteróloga foram selecionados cinquenta clones de *P. pastoris* recombinante transformados com pPIC9-QUIT e doze clones transformados com pPGK-QUIT. A levedura GS115 sem o inserto foi utilizada como controle negativo.

Para aumento de massa celular, os clones selecionados de pPIC-QUIT foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGY-U (Apêndice A) e em placa de Petri, enquanto os clones selecionados a partir de pPGK-QUIT foram inoculados em meio YPD sólido para ganho de massa celular. Ambas as placas foram incubadas a 30 °C por 18 a 24 horas. Em seguida, as culturas de pPIC9-QUIT foram transferidas para uma nova placa contendo aproximadamente 25 mL de meio BMMY-U + quitina coloidal 2%, e as culturas de pPGK-QUIT foram transferidas para meio YPD + quitina coloidal 2%. A indução do promotor pAOX1,

o qual sinaliza a transcrição do gene e que foi integrada aos clones pPIC9-QUIT, foi realizada poradição de metanol P.A. às culturas celulares a cada 24 horas, mantendo uma concentração final de 0,5 % (v/v). Já a indução do promotor pPGK, o qual sinaliza atranscrição do gene e que foi integrada aos clones pPGK-QUIT, foi realizada de modo constitutivo no meio de cultivo contendo glicose 2%. A indução da expressão gênica foi realizadadurante 120 horas a 30 °C em estufa bacteriológica. Após o término destas induções as placas foram reveladas por coloração com vermelho congo 0,1% e HCl 1M conforme descrito por Okay e colaboradores (2008).

4.12 Indução da expressão em frascos agitados

Para a realização do experimento de indução da expressão heteróloga emfrascos agitados, foram selecionados seis clones de *P. pastoris* de pPIC9-QUIT, um clone pPIC9 sem inserto (controle negativo) e um clone de *P.pastoris* produtor de lipase (controle positivo). Para aumento de massa celular, os clones selecionados foram inoculados em 25 mL de meio decultura BMGY-U em erlenmeyer de 250 mL e incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm até a cultura atingir D.O._{600nm} entre 2-6, em tempo aproximado de 18 a 24 horas. Ao atingir a D.O._{600nm} necessária, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em 50 mL de meio BMMY-U em erlenmeyer de 500 mL, de modo que a D.O._{600nm} inicial da cultura ficasse próximo a 1,0.

A indução do promotor pAOX1, o qual sinaliza a transcrição do gene da quitinase integrado ao genoma da hospedeira, foi realizada poradição de 250 µL de metanol PA às culturas celulares a cada 24 horas, mantendo uma

concentração final de 0,5 % (v/v). A indução da expressão gênica foi realizada durante 96 horas a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm.

A indução do promotor pPGK que também sinaliza a transcrição do gene da quitinase foi realizada de maneira que os clones selecionados foram inoculados em 15 mL de meio YPD em condições estéreis, em erlenmeyers de 250 mL, e incubados a 28 °C em agitação de 200 rpm durante a noite, assim que atingiram O.D._{600nm} de 0,3 a 0,5 de crescimento foram centrifugados e transferidos para erlenmeyers de 1L em *shaker* a 28 °C, em rotação de 200 rpm durante 96 horas. Foi realizada a adição de glicose 2% a cada 24 horas e retiradas alíquotas de 3 mL para determinação da atividade enzimática.

As alíquotas das culturas das duas estirpes foram centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos a 4 °C e os sobrenadantes imediatamente conservados a -80 °C para posterior análise.

4.13 Medida da atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi testada empregando ensaio fluorimétrico utilizando o substrato 4-Metilumbeliferona β -D-N,N',N''- triacetilquitotriosídeo, com a ocorrência de hidrólise nesta molécula o produto fluorescente liberado (umbeliferona) pode ser mensurado. A reação foi realizada em placa de 96 poços com 20 μ L substato em de tampão acetato de sódio pH 5,6 50 mM e 80 μ L do sobrenadante de cultura. A reação foi incubada durante 20 minutos a 37 °C e paralisada com adição de 400 mM de carbonato de sódio. A fluorescência foi

mensurada no comprimento de excitação de 340nm e emissão 460 nm (Modificado de Thimoteo *et al.* 2017).

4.14 Análises estatísticas

Os testes foram realizados em triplicatas, utilizando sobrenadante de cultura. A significância de cada ensaio será determinada de acordo delineamentos experimentais baseados no método de Plackett-Burman (PB) e delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizada a análise da influência dos parâmetros de pH, temperatura e tempo de reação, por meio do diagrama de Pareto e RSM. O nível de confiança foi de 95%. As matrizes de dados codificados, os cálculos matemáticos para representação dos dados experimentais e análise de variância foram obtidos utilizando o programa STATISTICA 10.0.

5. Resultados e discussão

5.1 Otimização da sequência do gene

Os dados da sequência nucleotídica do gene estão alocados no GenBank do *National Bank of Biotechnology Information* (NCBI) pela identificação *Anopheles gambiae* str. PEST AGAP005634-RA e possuem congruências com outros bancos de dados além deste, atestando a veracidade das sequências obtidas.

Na figura 7 a sequência representa o padrão da otimização realizada para expressão em *P.pastoris*, onde houve a retirada do peptídeo sinal e a adição de cauda de histidina C-terminal. Na análise dos aminoácidos traduzidos a previsão é que a proteína em seu estágio final de construção tenha pelo menos 461 resíduos de aminoácidos e um sítio de N- glicosilação na posição 316, a pesquisa foi feita com o auxílio de ferramentas como o *NetNGlyc 1.0 server* e em consulta ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Quitinase (49 kDa, 1353 nt)

```
GCTGAATTCGTCGTCGACGGACCACGATAGAGTTGTGCACATGCTACATCTCCACCTGGGCCGTTT
ACAGAACCGGTTCTGCTTCCCTACCCATTAGACGCCTTCGATCCTACCTTGTGTACTCATGCCAT
CTACGCATTTGCTGGTCTTGATGAGGAAAAGAATGCCATCAAATCTTTGGATGCTTGGCAGGAC
TTAAAAGATAACTACGAAAAGGGTGGCTACGAAAAACTTACCAGGAATGAGAGCCGCACATCCAC
ACTTGAAGGTCCTGTTAGCCATCGGTGGATGGAACGAGGGTTCTGAAAAGTACTCCAACCTGGC
TGCCAACCCAGAAAAGACGTCAAGCATTCGTTAAGAATGCTTTAGACTTTGTCAAACAGTACGGT
TTCGATGGACTTGACTTGGATTGGGAGTATCCTACTCAGAGAGGTGGAAAACCAGCCGATCGTG
AAAACCTTTGTTGCTTTAGTCAGAGAGTTGTCTCAGCTTTTCAGAAAACACAACCTACTGTTGAC
TTCCGCTTTCGGTCCCGGAAAGGACACTATCGATTCTGCATACGACGTCAAAGCTTTATCAAAG
TATCTGGATTTTCTTCACATCATGTGCTATGACTACAAAGGATCCTGGGATGGAAGAATTGGTC
CTAACGCACCACCTGACCTCTCGTGACTTCCTGAACGTCGAGTACTCAATCGAACATTTGTTAGA
GCTGGGTGCACCAGCCTCTAAACTTGTCTTGGGTCTGCCATTCACGGAAGAACCTTTGTCTCC
CCTATGGCAAAGGCCAGATTGGGTGACACTTCCGATAAAGTCGGATTTGCTGGTCCATCCACCA
AAGAGAACGGATTCATGGGCTACAATGAGGTCTGTGAAGAGCTTAAGAGAACCCTGATGACTG
GACCTTGAAGTGGGACGCTGCCGCATCCGAGATGGTTGCTATCAAATCTAACGGTACTGCCTCC
CAGGTTGTCGTGTACGATTCAACCAGATCTATCGCTAACAAGTTTCGTTTTGCAGTCAGACAAA
AATTAGCCGGTTTGATGGTTTGGTCCGTCGATACTGACGATTTCAATGGACTTTGTGCACCAGA
AGCTGACACTTACAAAGACTTTGGAGGTGCTGGCCTTACCATCCCCCACCTGTTTCCGGAAAG
TACCCTTTGTTAAAGACTATCTCTAACGCCGTCCTGCTTGCTACCGACGAGCAAACACAGGAGA
ACGTCATCCCTAATGGTCCAGAAGAGGTTCCCTCTGCCGGCGGTACCTCCACTGGACCTTCAGG
TGCCGCAAGTGTTCGGGAGCTTCCTGGTTACTTTCTGTGCTGTTGCTGGTTGCCACCGTGACC
GTCACTGTCAGAACATTAACGCGTCATCACCATCACCATCACATAACGCGCCGCGCT
```

Figura 7. Sequências com códons otimizados para *Pichia pastoris*. O peptídeo-sinal foi retirado. Foi inserida sequência para cauda de histidina. Sítios de restrição: EcoRI, SmaI, NotI, MluI. Terminação

correspondente ao gene da glicoamilase (7), o vetor pPGK-AMY intacto (8) e no último poço o vetor pPGK-AMY digerido liberando o fragmento gênico da α -amilase de aproximadamente 1500 pb (9).

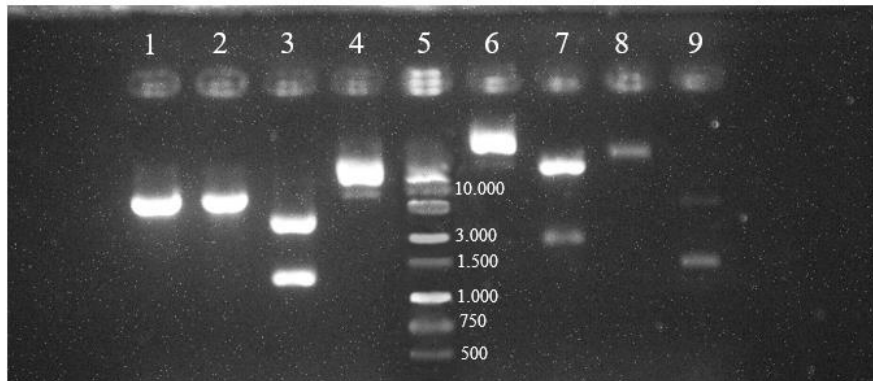


Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, demonstrando vetores linearizados com as enzimas *EcoR1* (1) e *Not1* (2), uma dupla digestão do plasmídeo pBSK-QUIT (3), o vetor pBSK intacto (4), dupla digestão dos plasmídeos pPIC9-QUIT (7) e pPGK-AMY (9). E marcador molecular GeneRuler 1kb ladder (5) Fermentas ®.

Partindo da liberação do inserto gênico, foram realizadas purificações do plasmídeo pPIC9 e pPGK-AMY após a digestão dupla, resultando plasmídeos dupla fita com extremidades *stick end* abertas nos sítios de *EcoR1* e *Not1*, e purificação do gene da quitinase liberado pelo pBSK.

Após a reação de ligase com ação da enzima T4, linhagens de *E.coli* DH5 α foram transformadas com os plasmídeos recombinantes, e após procedimento de extração de DNA plasmidial foi realizada nova digestão e foi constatada a liberação do gene da quitinase tanto em pPIC9-QUIT quanto pPGK-QUIT. A figura 10 ilustra os mapas físicos dos plasmídeos obtidos, sendo que o pPIC9-QUIT apresenta 9397 pb e pPGK-QUIT 4417 pb ambos com região dos sítios de clonagem flanqueando os genes.

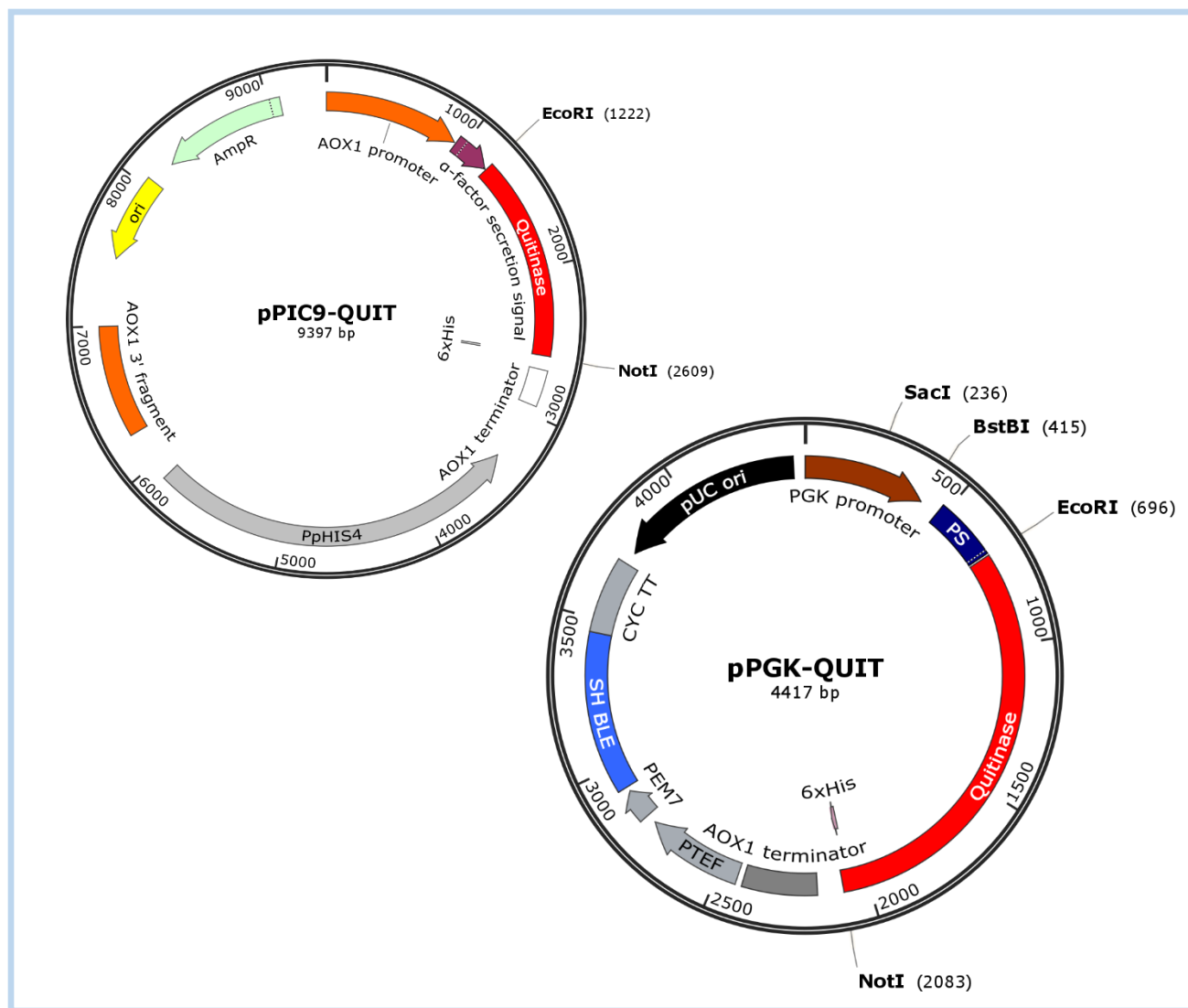


Figura 10. Mapa físico dos vetores recombinantes clonados nos sítios de restrição *EcoR*I e *Not*I. Desenho desenvolvido na plataforma Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene® versão 3.2.1 (2004-2019).

Evidenciando a construção dessas estruturas estão os perfis eletroforéticos dispostos nas figuras 11 e 12, mostrando os vetores intactos e após restrição com as endonucleases.

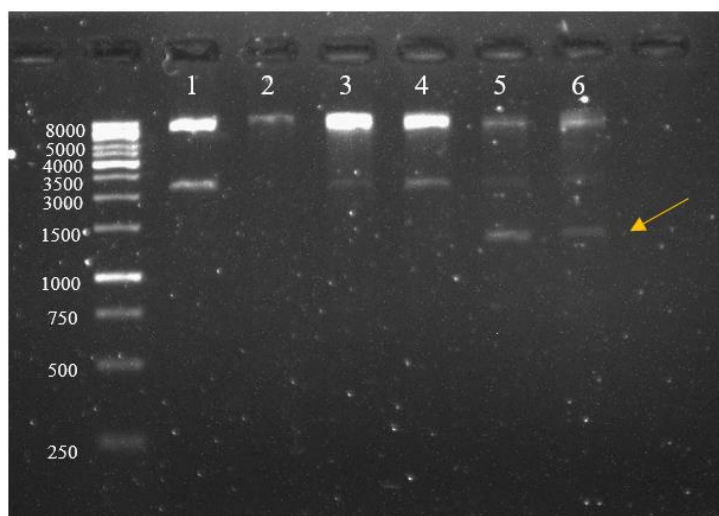


Figura 11. Perfil eletroforético de extrações plasmidiais de pPIC-QUIT e digestão liberando o gene de quitinase. (1) DNA plasmidial intacto, (2) DNA plasmidial digerido com *EcoR1*, (3 e 4) DNA plasmidial digerido com *NotI*, (5,6) DNA plasmidial digerido com as enzimas *EcoR1* e *NotI*, liberando o gene da quitinase indicado pela seta. Gel de agarose 0,8%.

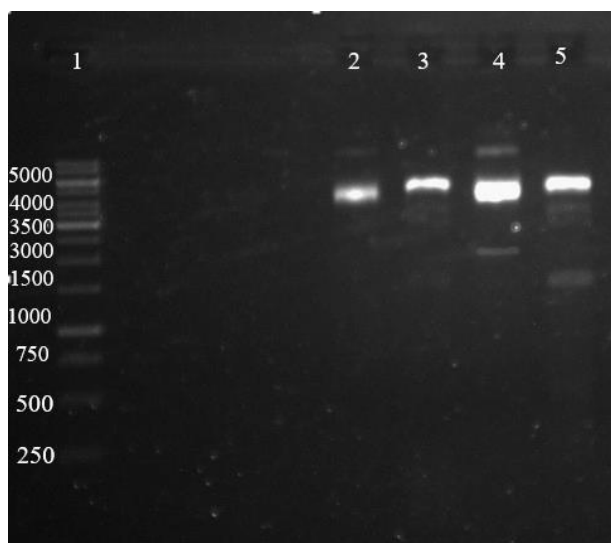


Figura 12. Perfil eletroforético de extrações plasmidiais de bactérias transformadas com pPGK-QUIT. Vetor intacto (2) e amostra com digestão dupla com liberação do gene da quitinase(3, 4 e 5). Gel de agarose 0,8%.

5.3 Confirmação da integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris*.

Com o término da indução inicial em placa por 72 h, a expressão da proteína quitinase nos clones transformantes de *P. pastoris* foi confirmada em um processo onde os clones foram submetidos ao teste de *colony blot* que consiste em transferir por um período de 4 h a colônia marcada com *his6-tag* para uma membrana de nitrocelulose por meio da imobilização desta molécula imunogênica. Após as 4 h de transferência, foram prosseguidos os passos do teste de *colony blot* descritos na metodologia (seção 4.9).

No teste que avaliou a placa com clones de pPGK-QUIT, houve a confirmação de 8 clones com expressão positiva da cauda de histidina c-terminal, e sua atividade quitinolítica foi constatada em uma placa réplica após indução com meio contendo o substrato da enzima, em mais de um teste os halos de degradação tiveram coloração forte, evidenciando a ligação entre o vermelho congo e os oligossacarídeos produzidos na hidrólise no meio de cultivo. A figura 13 compara o resultado da coloração em membrana de nitrocelulose com a revelação pelo método utilizando vermelho congo.

O mesmo mecanismo de avaliação nas leveduras transformantes de pPIC9-QUIT constatou 7 clones positivos para a integração do cassete de expressão ao genoma, e 12 positivos quanto em atividade quitinolítica. A figura 14 demonstra o resultado de ambos os testes, mostrando em A a membrana de nitrocelulose, e B a placa revelada por adição de solução com vermelho congo 2%.

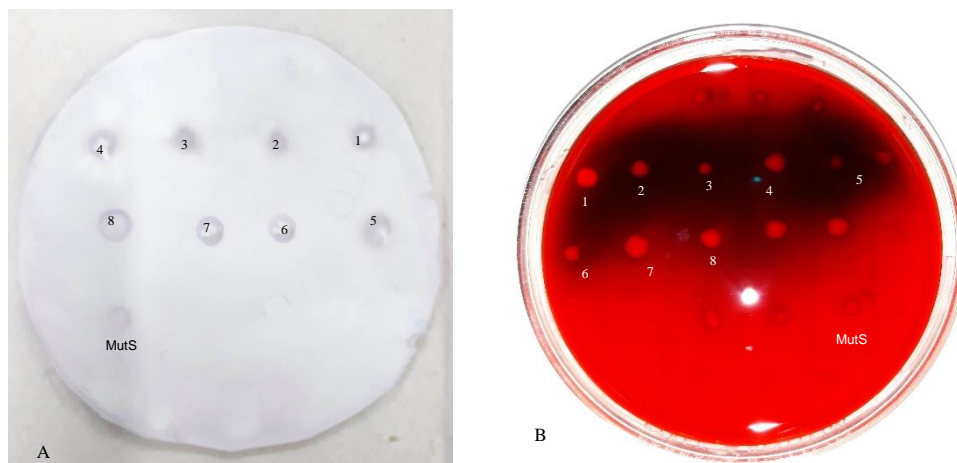


Figura 13. Membrana de nitrocelulose com o resultado do colony blotting (A), e revelação da atividade quitinolítica de alguns clones através da solução de vermelho congo 2%(B) de clones transformados com o vetor pPGK- QUIT.

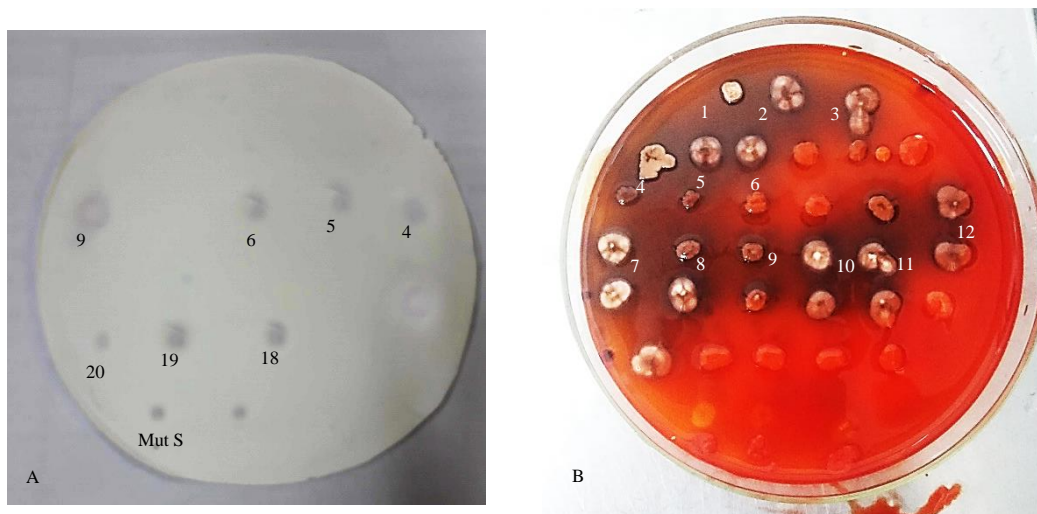


Figura 14. Membrana de nitrocelulose com o resultado do colony blotting (A), e revelação de atividade quitiniolítica de alguns clones através da solução de vermelho congo 2% (B) de clones transformados pelo vetor pPIC9-QUIT.

A intensidade e o diâmetro da coloração ao redor de cada colônia correspondem aproximadamente ao nível de secreção do produto recombinante expresso pelos diferentes clones. Porém não é um parâmetro linear (CREGG et al., 2009), por esta razão prevaleceu o princípio da aleatoriedade na triagem dos clones recombinantes a serem submetidos a indução em frascos agitados.

5.4 Caracterização parcial segundo a atividade

5.4.1 Triagem de clones recombinantes

Na análise da atividade enzimática foram realizados ensaios fluorométricos, empregando o substrato análogo a molécula de quitina denominado 4-Metilumbeliferona β -D-N,N',N''- triacetilquitotriosídeo, com a ocorrência de hidrólise nesta molécula o produto fluorescente liberado (umbeliferona) pode ser mensurado em determinado comprimento de onda 340nm (excitação) e 460 nm (emissão), na enzima recombinante presente nos sobrenadantes de cultura (Figura 15), esta metodologia foi descrita primeiramente por Kuranda e Robbins (1991) sendo amplamente utilizada nos parâmetros de determinação de atividade quitinolítica (KING & BUTLER, 1998; KIKKERT et al., 1998; CABIB; SILVERMAN; SHAW, 1992) de alta sensibilidade e rapidez quando comparada a quitina coloidal (MCCREATH; GOODAY, 1992).

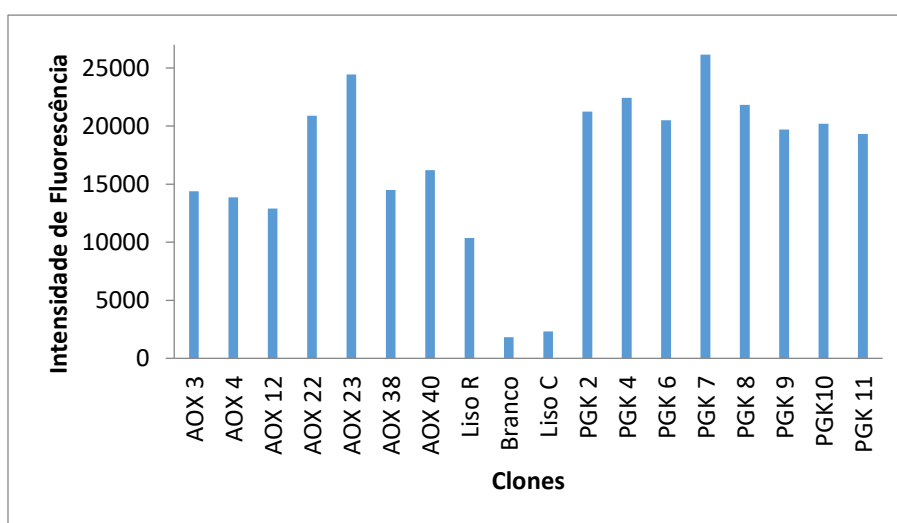


Figura 15. Triagem dos clones recombinantes produtores de quitinase. AOX = clones induzidos com metanol, Liso R = Clone produtor de lisozima de *A. darlingi*, Branco= reação realizada com água, Liso C= lisozima comercial e PGK= clones induzidos com glicose.

5.4.2 Delineamento Plackett & Burman (PB) e delineamento composto central rotacional (DCCR)

Após triagem inicial foram definidos com auxílio do software Estatística 10.0 os parâmetros de 15 ensaios turbidimétricos em triplicata a serem submetidos os sobrenadantes dos clones pPIC/QUIT-23 e pPGK/QUIT-07. A tabela 1 apresenta a matriz de dados com valores dos parâmetros utilizados nos ensaios e valores resposta obtidos do clone pPIC9/QUIT-23 e a tabela 2 apresenta matriz idêntica de parâmetros com dados obtidos a partir do clone pPGK/QUIT-07, ambas as respostas foram mensuradas imediatamente após os ensaios.

A confiabilidade dos resultados no teste pode ser constatada pela ausência de diferença significativa entre os ensaios 13, 14 e 15, definidos como pontos médios dos ensaios.

Tabela 1. Matriz de parâmetros aplicados no teste de Placket & Burman (PB) constituído de 15 ensaios fatoriais e 3 repetições em seu ponto central, referentes ao clone pPIC9/QUIT-23. A coluna em negrito demonstra os resultados obtidos a partir da produção do composto fluorescente.

Ensaio	Substrato(mM)	Enzima (uL)	pH	Temperatura	Tempo (min.)	Resultados (uM)
1	9	20	8	20	10	5.59
2	9	80	2	60	10	13.49
3	1	80	8	20	50	13.02
4	9	20	8	60	10	5.25
5	9	80	2	60	50	12.63
6	9	80	8	20	50	11.95
7	1	80	8	60	10	11.89
8	1	20	8	60	50	5.63
9	1	20	2	60	50	4.75
10	9	20	2	20	50	5.41
11	1	80	2	20	10	11.62
12	1	20	2	20	10	3.45
13	5	50	5	40	30	9.80
14	5	50	5	40	30	10.08
15	5	50	5	40	30	9.45

Tabela 2. Matriz de parâmetros aplicados no teste de Placket & Burman (PB) constituído de 15 ensaios fatoriais e 3 repetições em seu ponto central, referentes ao clone pPGK/QUIT-07. A coluna em negrito demonstra os resultados obtidos a partir da produção do composto fluorescente.

Ensaio	Substrato(mM)	Enzima (uL)	pH	Temperatura	Tempo (min.)	Resultado (uM)
1	9	20	8	20	10	13.02
2	9	80	2	60	10	14.50
3	1	80	8	20	50	12.61
4	9	20	8	60	10	8.78
5	9	80	2	60	50	13.94
6	9	80	8	20	50	13.62
7	1	80	8	60	10	11.82
8	1	20	8	60	50	7.85
9	1	20	2	60	50	5.30
10	9	20	2	20	50	9.14
11	1	80	2	20	10	13.37
12	1	20	2	20	10	4.78
13	5	50	5	40	30	12.83
14	5	50	5	40	30	13.04
15	5	50	5	40	30	11.33

A tabela 01 apresenta resultado elevado em pH 2 nos ensaios 2 e 3, ambos com valores maiores de caldo enzimático, no entanto quantidade menores deste caldo no mesmo pH demonstram decréscimo na resposta nos ensaios 9 e 12.

O diagrama de pareto apresentado na figura 16 se refere aos testes da tabela 01, também indica fatores como pH, temperatura e tempo como não significativos, demonstrando que a atividade pode ocorrer em outras faixas de pH além das apontadas nas respostas da tabela 01.

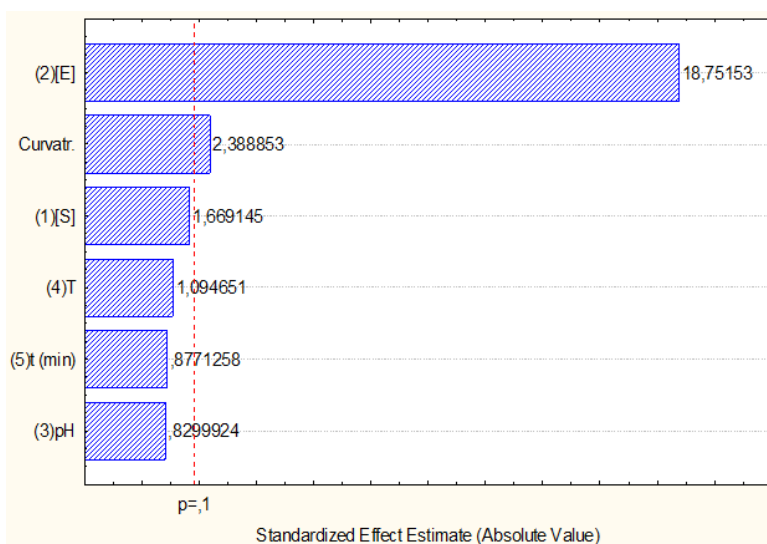


Figura 16. Diagrama de pareto obtido a partir do delineamento de Plackett e Burman de 5 parâmetros avaliados, com o valor de reposta indicado em Curvatr. As siglas representam respectivamente: [E] – Enzima, [S] – Substrato, t(min) – tempo e pH.

O diagrama de pareto demonstra que o efeito só foi significativo na enzima utilizada, para a validação destes parâmetros a análise sugeriu a repetição destes ensaios. E a mesma análise com os ensaios aplicados ao clone pPGK/QUIT-07, demonstraram a significância de pelo menos dois parâmetros (Figura 17). Tanto as análises de PB quanto de DCCR visam a otimização de sistemas de expressão e atividade enzimática, indicando respostas promissoras e pontos a serem modificados para a obtenção de respostas concisas.

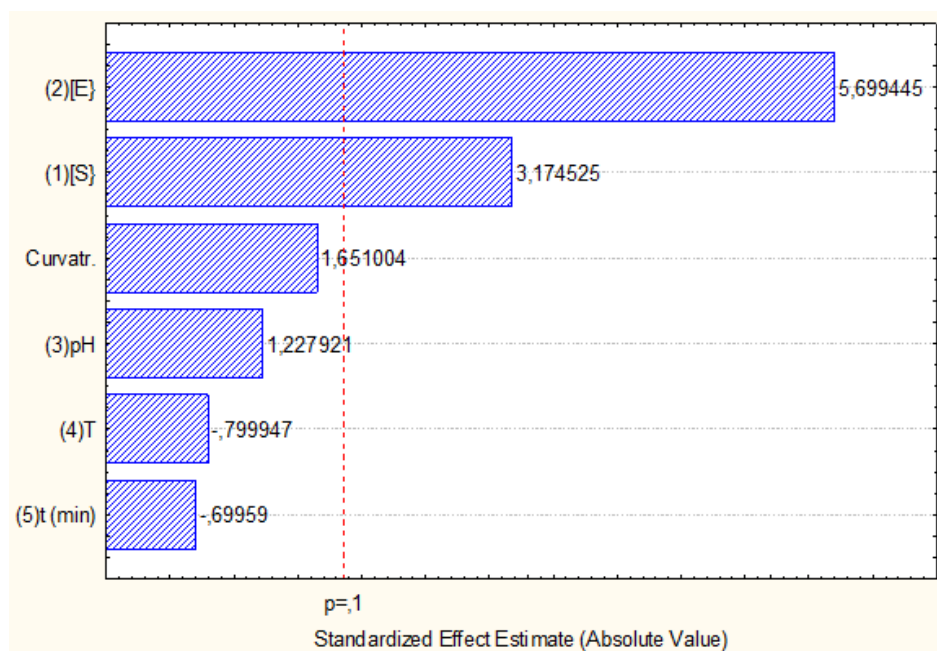


Figura 17. Diagrama de pareto obtido a partir do delineamento de Plackett e Burman de 5 parâmetros avaliados, com o valor de reposta indicado em Curvatr. As siglas representam respectivamente: [E] – Enzima, [S] – Substrato, t(min) – tempo e pH.

Através dos resultados distribuídos na figura 17, os fatores significativos foram a quantidade de enzima e o substrato aplicado. Foram necessárias modificações na concentração desses dois fatores para a obtenção de curva com resultado significativo. Segundo a tabela 2 a atividade enzimática teve destaque em ampla faixa de pH nos valores de 2 a 8, em adicional no diagrama de pareto da figura 17 demonstra que o pH não demonstra valor significativo, tornando ampla faixa de atividade em que a reação pode ocorrer.

A aplicação destes testes demonstra uma análise inicial sobre a influência de cada parâmetro avaliado na atividade enzimática, ficando evidentes os que possuem efeito significativo e não significativo a obtenção de proteínas depende da maneira que foi desenvolvida a expressão em frascos agitados, as condições deste procedimento estão bem delimitadas na literatura (CREGG, 2007; CREGG et al., 2009; LI et al., 2007; WEIDNER et al., 2010) mas ainda representam sistemas de produção heteróloga limitados pela disponibilidade de oxigênio, e com níveis variáveis na obtenção de biomassa.

No prosseguimento dos experimentos novos ensaios foram realizados com o clone pPGK/QUIT-07 observando as duas variáveis fixadas anteriormente, foram desenvolvidos parâmetros para análise através de Delineamento composto central rotacional (DCCR), com valores fixados na tabela 3 observando as respostas já obtidas no teste PB.

Tabela 3. Matriz de parâmetros aplicados no teste de Plackett & Burman (PB) constituído de 17 ensaios fatoriais e 3 repetições em seu ponto central, referentes ao clone pPGK/QUIT-07. A coluna em negrito demonstra os resultados obtidos a partir da produção do composto fluorescente.

Ensaio DCCR	Substrato (mM)	Enzima (uL)	pH	Resultado (uM)
1	5.00	50.00	5.00	28.832
2	5.00	50.00	11.00	23.142
3	5.00	110.00	5.00	25.457
4	5.00	110.00	11.00	21.174
5	13.00	50.00	5.00	30.839
6	13.00	50.00	11.00	18.452
7	13.00	110.00	5.00	27.904
8	13.00	110.00	11.00	19.632
9	2.27	80.00	8.00	19.242
10	15.73	80.00	8.00	22.875
11	9.00	29.55	8.00	16.607
12	9.00	130.45	8.00	24.127
13	9.00	80.00	2.95	31.395
14	9.00	80.00	13.05	5.355
15	9.00	80.00	8.00	19.105

16	9.00	80.00	8.00	19.670
17	9.00	80.00	8.00	20.236

Nas análises referentes a matriz de DCCR estão demonstradas nos gráficos de superfície de resposta a seguir, onde testes foram traçados para investigar de maneira comparativa a atividade da enzima em relação ao substrato (Figura 18), pH em relação a substrato (Figura 19), substrato em relação a enzima (Figura 20) e pH em relação a enzima (Figura 21). A tabela 4 traduz os valores aplicados no gráfico de superfície.

Tabela 4. Matriz de parâmetros aplicados no delineamento experimental DCCR, referentes a ensaios realizados com o clone pPGK/QUIT-07.

Matriz de dados e respostas obtidos no DCCR – pPGK/QUIT-07					
	-2	-1	0	1	2
Substrato (mM)	2.27	5	9	13	15
Enzima (ul)	29.54	50	80	110	130
pH	3	5	8	11	13

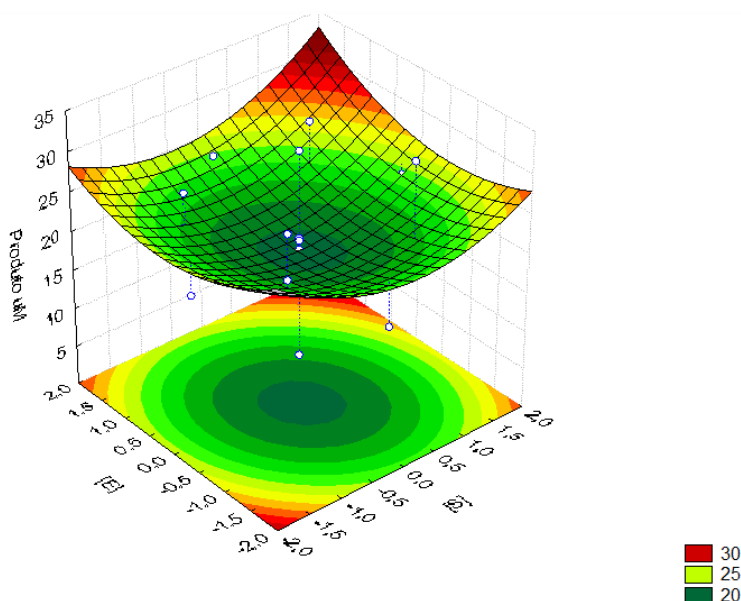


Figura 18. Gráfico de superfície de resposta e superfície de contorno do DCCR tendo como fatores a enzima recombinante e o substrato 4-MUF, a variável de resposta é o produto fluorescente da atividade enzimática em μM .

A análise da resposta no gráfico da figura 18 demonstra que na mais alta concentração de substrato e enzima é onde se obtém mais produto da hidrólise, com pico demonstrado entre 13mM e 15mM de substrato, com 110 a 130 uL de enzima para obtenção de 35 uM de resposta no substrato colorimétrico, esses dados sugerem otimização da concentração dos dois para a atividade enzimática, no entanto já demonstra resposta positiva.

Na figura 19 o gráfico da superfície de resposta analisa duas outras variáveis, o pH e o substrato utilizado, de maneira que o produto gerado tem crescimento linear conforme o aumento na quantidade de enzima, de forma indiferente às variações de pH indicadas em seu eixo. Seguindo os parâmetros distribuídos na tabela 4 há atividade em todas as concentrações de substrato e resposta aproximada entre a faixa de pH 2 e 9.

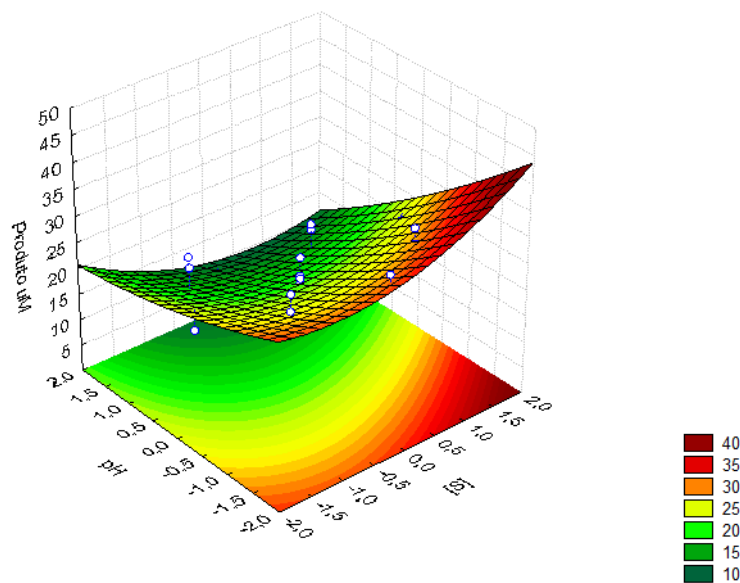


Figura 19. Gráfico de superfície de resposta e superfície de contorno do DCCR tendo como fatores o substrato 4-Metilumbeliferona e diferentes faixas de pH, a variável indicada na legenda é a resposta do produto fluorescente da atividade enzimática em μM .

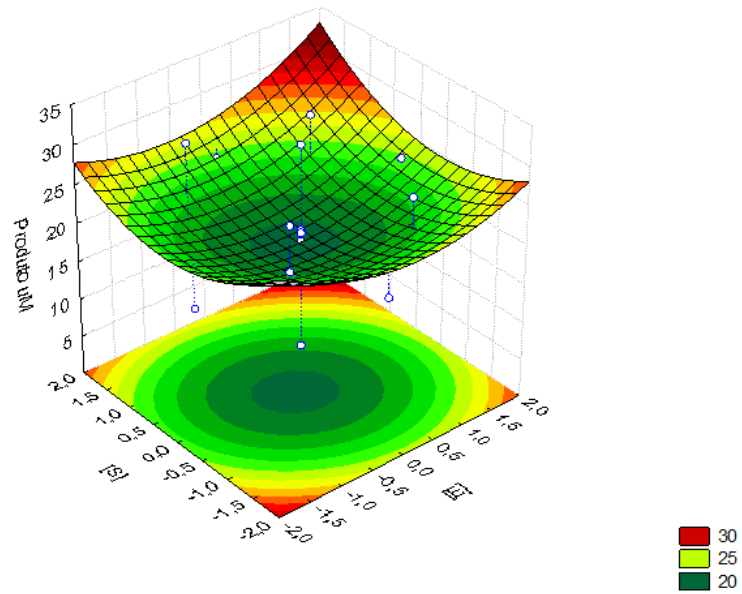


Figura 20. Gráfico de superfície de resposta e superfície de contorno do DCCR tendo como fatores o substrato 4-Metilumbeliferona e enzima recombinante, a variável indicada na legenda é a resposta do produto fluorescente da atividade enzimática em μM .

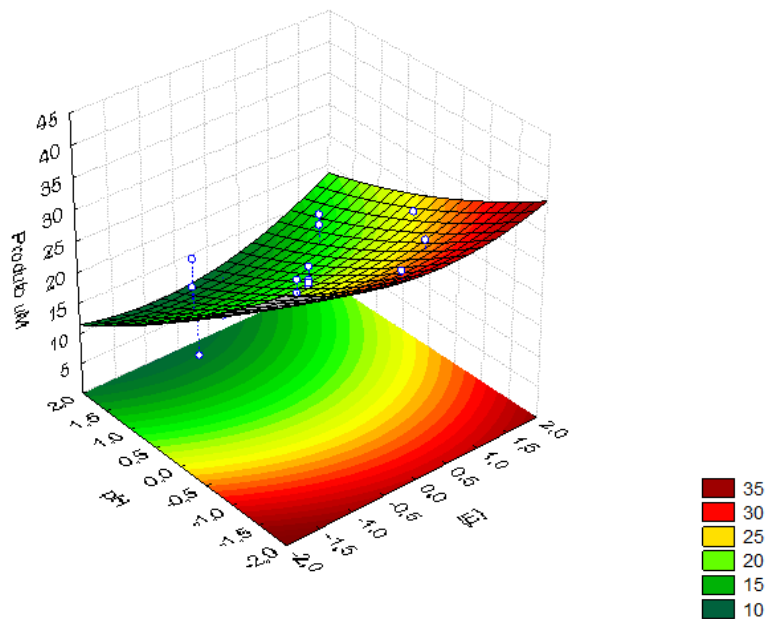


Figura 19. Gráfico de superfície de resposta e superfície de contorno do DCCR tendo como fatores o pH e de enzima recombinante, a variável indicada na legenda é a resposta do produto fluorescente da atividade enzimática em μM .

O desenvolvimento destes testes utilizando o substrato 4-metilumbeliferona mostrou características diferentes das habitualmente presentes em quitinases com origem em insetos. Em estudos que caracterizaram quitinases da espécie *M. sexta* (HUANG et al., 2000; LU et al., 2002; ZHANG et al., 2002), *C. fumiferana* (ZHENG et al., 2002) e *L. oleracea* (FITCHES et al., 2004) indicam uma faixa ótima de pH para atividade positiva compreendendo valores entre 6,0 e 9,0. Em muitos casos, um substrato pode induzir uma mudança conformacional na enzima para uma forma que será mais ou menos resistente à desnaturação pelo pH (SEGEL, 1979), o que não foi observado nestes testes.

Observando dados de quitinases presentes na epiderme e no trato digestivo em insetos da ordem lepidóptera, a predominância é que possuam caráter altamente alcalino (WATERHOUSE, 1949; BERENBAUM, 1980; DOW, 1992), sendo o presente em larvas nas faixas de 10 a 12 (DOW, 1984, DOW, 1992; GRINGORTEN et al., 1993). Através de técnicas avançadas com microelétrodos, foi mensurado que o pH da região do intestino dos insetos do gênero *Anopheles* tem valor de 11 e 8 em suas porções anterior e posterior (BOUDKO et al., 2001). Entretanto a quitinase recombinante desenvolvida neste trabalho, mostrou em mais de um teste atividade compreendida entre a faixa 2 e 8 de pH, fato que pode indicar uma eficiência em controle biológico com atividade substancial em fases de muda do inseto ou na modulação intestinal da matriz peritrófica.

Diversas espécies já foram caracterizadas nas espécies *A. gambiae*, *Chelonas sp.*, *G. morsitans*, *L. longipalpis*, e *P. cochleariae* (KRISHNAN et al., 1994; SHEN AND JACOBS-LORENA, 1997; GIRARD AND JOUANIN, 1999; YAN et al., 2002; RAMALHO-ORTIGAO e TRAUB-CSEKO, 2003; GENTA et al., 2006) com a atividade baseada com 4metilumbeliferona-(GlcNAc), no entanto os estudos propõem sempre que sejam realizados testes com o substrato insolúvel em razão do domínio de ligação da quitinase e sua afinidade pelo mesmo, a atividade observada nesses testes pode indicar a funcionalidade na ligação entre domínio e substrato polimérico, facilitando a ocorrência da reação e diminuindo o gasto de energia em razão da afinidade. Uma vez que já foi

constatado que quitinases de insetos tem atividade facilitada em substratos insolúveis mas não nos solúveis (ARAKANE et al., 2003).

Os testes com o sobrenadante demonstram que condições podem ser adotadas para experimentos com frações concentradas, com a molécula purificada. Em relação a estabilidade enzimática, uma gama de fatores deve ser levada em conta, além do pH fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de substratos ou cofatores da enzima e concentração da enzima também devem ser analisados. Segundo Shen (1997) uma quitinase isolada e purificada diretamente da espécie *A. gambie* demonstra atividade dependente de tripsina como cofator, e que parasitas do gênero *Plasmodium* se beneficiam desse mecanismo para penetrar a matriz peritrófica em porções onde a ação do cofator aliado a enzima catalisa a formação de poros na superfície da matriz.

Com base no delineamento PB foi possível mensurar que a temperatura não teve influência significativa nas reações, considera-se que aumentos de temperatura levam a aumentos da velocidade da reação por aumentar a energia cinética das moléculas envolvidas no sistema, assim como temperaturas acima da tolerância de uma molécula desnaturam sua estrutura, dentro deste parâmetro é observado que proteínas produzidas por sistemas de expressão heteróloga em levedura podem adquirir caráter termoestável (RABERT et al., 2013).

Estabilidade térmica pode significar uma característica promissora quando se trata de quitinases, uma vez que para utilização em processos industriais é necessária tolerância térmica por partes das enzimas pelas vantagens que o aumento de temperatura pode agregar a um processo produtivo, além da atuação de maneira eficiente em pH's ácidos (HOBEL et al., 2005).

A produção heteróloga em *P.pastoris* gera características diferenciadas de enzimas expressas, a habilidade da levedura em realizar diversas modificações pós-traducionais é um dos principais fatores já citados neste trabalho, o sistema de expressão utilizando o promotor pAOX1 necessita de melhor investigação tanto para melhoria na expressão, quanto para a determinação da atividade, já o clone que utiliza o promotor pPGK teve atividade significativa, a indução com a adição

de glicose pode potencializar a síntese de produtos integrantes da via glicolítica. Naturalmente a espécie *P. pastoris* não tem um perfil de proteínas diverso ou com grandes variações, presume-se que a investigação acerca da massa molecular e densidometria da banda da proteína recombinante dentro de uma eletroforese precisa ser otimizada, com análise de porções concentradas da enzima em vez de diluídas em sobrenadante de cultura.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

- O sistema de expressão em *P. pastoris* utilizando o vetor pPGK, com expressão constitutiva do promotor pgk, revelou ser um sistema eficiente para a produção de quitinase com secreção para o meio extracelular
- A expressão de quitinase recombinante em *P. pastoris* foi confirmada através da reação de imunodeteção, a qual apontou que o período de 72 h de indução foi eficiente para a produção da proteína recombinante;
- Foi evidenciado que a temperatura e tempo de reação não tiveram influência significativa na reação enzimática.
- Foi constatada que a atividade da enzima foi favorável entre a faixa de pH 2 e 8, com amplitude maior que outras quitinases produzidas em insetos.

7. PERSPECTIVAS

As seguintes perspectivas podem ser investigadas e desenvolvidas:

- Determinação da atividade frente ao substrato polimérico, com determinação de aspectos como $K(max)$ e $V(max)$
- Otimização da produção por meio de PB e DCCR
- Purificação da proteína por coluna de afinidade de níquel
- Realização de bioensaios contra larvas de Aedes
- Testes de inibição da atividade e adição de cofatores
- Investigação da aplicação industrial na síntese de oligômeros e substâncias como a quitosana
- Desenvolvimento de antígeno inibidor da atividade enzimática como candidato a vacina contra a proliferação de malária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, David J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

ADRANGI, Sina; FARAMARZI, Mohammad Ali. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1786-1795, 2013.

ADRANGI S., FARAMARZIMA, SHAHVERDI A.R., SEPEHRIZADEH Z. Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. **Carbohydr Res**; 345: 681 402–7, 2010.

AHMAD, M., HIRZ, M., PICHLER, H., SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris* : Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology** 98, 5301–5317, 2014.

ALMEIDA, J. R. M., MORAES, L. M. P., TORRES, F. A. G. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *Yeast* 22, 725–737, 2015.

ARAKANE, Yasuyuki et al. Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 6, p. 631-648, 2003.

ASTOLFI-FILHO, SPARTACO; LIMA, DOLABELA DE; JOSEF ERNST THIEMANN; HELOISA RIBEIRO; TUNES DE SOUSA; LUCIANO VILELA. United States Patent Date of Patent : Vetor para expressão de proteína heteróloga e métodos para extrair proteína recombinante e para purificar proinsulina recombinante isolada. Patent Number: 6,068,993, Date of Patent: Jul. 2, 1997, May 30, Biobras SA, Montes Claros; Universidade de Brasília, Brasília, both of Brazil. 2000.

ASTOLFI FILHO, S.; AZEVEDO, M. O.; PEREIRA, J. O.; XAVIER, M. A. S. *Noções Básicas de tecnologia do DNA recombinante*. Ed. **EDUA**, Manaus, Amazonas. 61pp. 2005.

BEHR M, HOCH M. Identification of the novel evolutionary conserved obstructor multigene family in invertebrates. **FEBS Lett**; 579:6827–33, 2005.

BERENBAUM, May. Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. **The American Naturalist**, v. 115, n. 1, p. 138-146, 1980.

BISHOP, J. G.; DEAN, Antony M.; MITCHELL-OLDS, Th. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5322-5327, 2000.

BOLLER, T., GEHRI, A., MAUCH, F., VOGELI, U.: Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function. **Plant** 157: 22-31, 1983.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Proteínas em biotecnologia: Produção, Aplicação e mercado*. **Interciência**. Rio de Janeiro, Brasil. 305pp. 2008.

BOUDKO, DMITRI Y. et al. In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 4, p. 691-699, 2001.

BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, Tim. **Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual (2000 Edition)**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000

CABIB, ENRICO; SILVERMAN, SANFORD J.; SHAW, J. ANDREW. Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 138, n. 1, p. 97-102, 1992.

CAPONE, S., ÓORAJEVIĆ, L., BONIFERT, G., MURTH, P., MARESCH, D., ALTMANN, F., et al. Combining protein and strain engineering for the production of Glyco-engineered

horseradish peroxidase C1A in *Pichia pastoris*. **International Journal of Molecular Sciences** 16, 23127–23142; 2015.

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

CHANG, S. W., LEE, G. C., SHAW, J. F. Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 5831–5838, 2006.

CHUANG, Hsu-Han; LIN, Hsu-Yang; LIN, Fu-Pang. Biochemical characteristics of C-terminal region of recombinant chitinase from *Bacillus licheniformis*—implication of necessity for enzyme properties. **The FEBS journal**, v. 275, n. 9, p. 2240-2254, 2008.

COHEN-KUPIEC, Rachel; CHET, Ilan. The molecular biology of chitin digestion. **Current opinion in biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 270-277, 1998.

CONSOLI FL, BRANDT SL, COUDRON TA, VINSON SB. Host regulation and release of parasitism- specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps*–*Heliothis virescens*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**; 142:181–91, 2005.

CREGG, J.M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; Sunga, J.; Madden, K.; Chappell, T. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 169-188. 2009.

CREGG, J. M., TOLSTORUKOV, I. I. *P. pastoris* ADH promoter and use thereof to direct expression of proteins. **Patent** 11, 905–910, 2012.

CREGG, J. M., TOLSTORUKOV, I., KUSARI, A., SUNGA, J., MADDEN, K., CHAPPELL, T. *Expression in the Yeast Pichia pastoris*. 1st ed. **Elsevier Inc.** 2009.

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

DAMASCENO, L. M.; PLA I.; CHANG, H. J.; COHEN, L.; RITTER, G.; OLD, L. J.; BATT, C. A. An optimized fermentation process for high-level production of a singlechain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 37: 18–26p, 2004.

D'ANJOU, M. C.; DAUGULIS, A. J. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 72, p. 1–11, 2000.

DALLAN, Paula Rulf Marreco et al. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. 2005.

DALY, R.; HEARN, M.T. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a usefull experimental tool in protein engineering and production. **J mol recognit**, v.18, n.2, Mar-Abr, p. 119-38, 2005.

DEMAIN, L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv** 27: 297-306. 2009.

DOW, J. A. Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 246, n. 4, p. R633-R636, 1984.

DOW, J. A. pH gradients in Lepidopteran midgut. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, n. 1, p. 355-375, 1992.

FITCHES, Elaine et al. Cloning, expression and functional characterisation of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 10, p. 1037-1050, 2004.

FLINTEGAARD, T. V.; THYGESEN, P.; RAHBK-NIELSEN, H.; LEVERY, S. B.; KRISTENSEN, C.; CLAUSEN, H.; BOLT, G. N-Glycosylation increases the circulatory half-life of human growth hormone. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5326–5336, 2010.

GASSER, B., PRIELHOFER, R., MARX, H., MAURER, M., NOCON, J., STEIGER, M., *ET AL.* *Pichia pastoris* : protein production host and model organism for biomedical research. **Future 134 Microbiol.** 8, 191–208, 2013.

GENTA, Fernando A. et al. Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 10, p. 789-800, 2006.

GIRARD, Cécile; JOUANIN, Lise. Molecular cloning of a gut-specific chitinase cDNA from the beetle *Phaedon cochleariae*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 6, p. 549-556, 1999.

GRINGORTEN, J. L.; CRAWFORD, D. N.; HARVEY, W. R. High pH in the ectoperitrophic space of the larval lepidopteran midgut. **Journal of Experimental Biology**, v. 183, n. 1, p. 353-359, 1993.

GOEDDEL, D. V.; YANSURA, D. G.; CARUTHERS, M. H. How lac repressor recognizes lac operator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 8, p. 3578-3582, 1978.

GÓES-FAVONI, S.P. *Modern Biotechnology Part 2: From Genetics To Genomics – A Review*. **UNIMAR CIÊNCIAS-ISSN 1415-1642**, Marília/SP, V. 26, (1-2), pp. 64-80, 2017.

GONZÁLEZ–SISO, M. I. et al. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*:: Insights and perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9-10, p. 699-705, 2000.

GOPALAKRISHNAN, Bhuvana; MUTHUKRISHNAN, Subbaratnam; KRAMER, Karl J. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 25, n. 2, p. 255-265, 1995.

GRAHAM, Lawrence S.; STICKLEN, Mariam B. Plant chitinases. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, n. 8, p. 1057-1083, 1994.

GRANGE, D. C.; PRETORIUS, I. S.; VAN, Z. Y. L. W. H.; Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene XYN2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **App Environ Microbiol** 62: 1036–1044. 1996.

GURRAMKONDA, C.; POLEZ, S.; SKOKO, N.; ADNAN, A.; GÄBEL, T.; CHUGH, D; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N.; TISMINETZKY, S. & RINAS, U. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. **Microb. Cell Fact.** **9**, 31 (2010).

HAMILTON, S.R.; GERNGROSS, T. U. Glycosilation engineering in yeast: the advento fully humanized yeast. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 5, Oct, p. 387-92.2007.

HENSING, M. C.; ROUWENHORST, R.J. Physiological and technological aspects ao large-scale heterologous protein production with yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 7, n.3, p. 261-79, 1995.

HENRISSAT, Bernard; BAIROCH, Amos. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical journal**, v. 293, n. 3, p. 781-788, 1993.

HOBEL, Cedric FV et al. Cloning, expression, and characterization of a highly thermostable family 18 chitinase from *Rhodothermus marinus*. **Extremophiles**, v. 9, n. 1, p. 53-64, 2005.

HOWARD, Michael B. et al. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627-635, 2003.

HU, S.; LI, L.; QIAO, J.; GUO, Y.; CHENG, L.; LIU, J. Códon optimization, expression, and characterization of na internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif.**,v.47.p.249-257, 2006.

HUANG, H. ZHANG, K.C. ZEN, S. MUTHUKRISHNAN, K.J. KRAMER. Homology modeling of the insect chitinase catalytic domain—oligosaccharide complex and the role of a putative active site tryptophan in catalysis **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 30, pp. 107-117, 2000.

HUMPHREY W., DALKE A., SCHULTEN K. VMD: visual molecular dynamics. **J Mol Graph** ;14:33–8, 1996

JACOBS-LORENA, M.; OO, M. M. The Peritrophic Matrix of Insects (Beatty, B. J., and Marquardt, W. C., eds), pp. 318–332, **The Biology of Disease Vectors**; University Press of Colorado, Niwot, CO; 1996.

LEE, SUNG GU *et al.* Expression of recombinant endochitinase from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. **Protein expression and purification**, v. 71, n. 1, p. 108-114, 2010.

KAUFMANN, J. E.; IRMINGER, J. C.; MUNGALL, J. & HALBAN, P. A.; Proinsulin conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. **Diabetes**. 46: 978-982. 1997.

KHATRI, N. K. Optimisation of recombinant protein production in *Pichia pastoris*. (Academic Dissertation). 2011, 57 p. University of Oulu, Faculty of Technology, Department of Process and Environmental Engineering, 2011.

KEYHANI, Nemat O.; ROSEMAN, Saul. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1473, n. 1, p. 108-122, 1999.

KIKKERT, J. R. *et al.* Expression of a fungal chitinase in *Vitis vinifera* L.'Merlot'and'Chardonnay'plants produced by biolistic transformation. In: **VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding 528**. 1998. p. 299-306.

KIM, Lark Kyun et al. AMCase is a crucial regulator of type 2 immune responses to inhaled house dust mites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 22, p. E2891-E2899, 2015.

KING, Lorraine; BUTLER, Geraldine. Ace2p, a regulator of CTS1 (chitinase) expression, affects pseudohyphal production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current genetics**, v. 34, n. 3, p. 183-191, 1998.

KINGSMAN, S. M.; KINGSMAN, A. J.; DOBSON, M. J.; ROBERTS, N. A. Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, 3: 377- 416. 1985.

KURANDA, Michael J.; ROBBINS, Phillips W. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 29, p. 19758-19767, 1991.

KRAINER, F. W., DIETZSCH, C., HAJEK, T., HERWIG, C., SPADIUT, O., GLIEDER, A. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories** 11, 22. 2012.

KRISHNAN, Anuradha; NAIR, Prakash N.; JONES, Davy. Isolation, cloning, and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20971-20976, 1994.

LI, P.; Anumanthan, A.; GAO, X.G.; ILANGO VAN, K.; SUZARA, V.V.; DÜZGÜNEŞ, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 142, p. 105-124. 2007.

LU, Yimin et al. Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 11, p. 1369-1382, 2002.

MACAULEY-PATRICK, SUE *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.

MADSEN, C. K., VISMANS, G., BRINCH-PEDERSEN, H. The PARS sequence increase the efficiency of stable *Pichia pastoris* transformation. **Journal of Microbiological Methods** 129, 1–7. 2016.

MATTANOVICH, D., SAUER, M., GASSER, B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. **Microbial cell factories** 13, 34. doi:10.1186/1475-2859-13-34, 2014.

MCCREATH, Kenneth J.; GOODAY, Graham W. A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 14, n. 4, p. 229-237, 1992.

MCILVANE, T. C. A buffer solution for colorimetric compararison. **J. Biol. Chem** 49, 183–186, 1921.

MERZENDORFER, Hans; ZIMOCH, Lars. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393-4412, 2003.

MIZUNO, Ryoji et al. Purification and characterization of a rice class I chitinase, OsChia1b, produced in *Esherichia coli*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 893-895, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent determination of reducing sugar. **Ana. Chemistry**, 31:420-428, 1959.

MORKA, K., PIETRUSZKA, J., MEYER ZU BERSTENHORST, S. Comparative expression of lipase CAL-A in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Hansenula polymorpha* to investigate a possible host influence. **Journal of Biotechnology** 191, 176–186, 2014.

NISHIYAMA, Y.; NOISHIKI, Y. WADA, M.. X-ray structure of anhydrous β -chitin at 1 Å resolution. **Macromolecules**, v. 44, n. 4, p. 950-957, 2011.

OBORNE, M.; *The bioeconomy to 2030: designing a policy agenda*, OECD Observer, 2009.

OKAY, S., TEFON, B.E., OZKAN M. AND OZCENGIZ, G. Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology** 104: 161–170; 2008.

OKAY, S., OZDAL, M., KURBANOGLU, E.B. Characterization, antifungal activity and cell immobilization of a chitinase from *Serratia marcescens* MO-1. **Turkish Journal of Biology**. Accepted paper; 2013.

OLIVEIRA, Luciana Gonzaga de; MANTOVANI, Simone Moraes. Transformações biológicas: patrocínios e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

PAIS, J. M.; VARAS, L.; VALDES, J.; CABELLO, C.; RODRIGUEZ, L.; MANSUR, M.; Modeling of mini-proinsulin production in *Pichia pastoris* using the AOX promoter. **Biotechnol Lett** 25:251-255, 2003.

RABERT, C., WEINACKER, D., PESSOA, A., FARÍAS, J. G. Recombinants proteins for industrial uses: Utilization of *Pichia pastoris* expression system. **Brazilian Journal of Microbiology** 44, 351–356, 2013.

RAMALHO-ORTIGAO, J. M.; TRAUB-CSEKÖ, Y. M. Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 3, p. 279-287, 2003.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host—parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 317-338, 1993.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. **New York**; 1989.

SAMUELS, Richard I.; REYNOLDS, Stuart E. Molting fluid enzymes of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: Timing of proteolytic and chitinolytic activity in relation to pre-ecdysial development. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 24, n. 1, p. 33-44, 1993.

SEGEL, I. H. **Bioquímica**: teoria e problemas. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora. 1979, 527 p.

SHEN, Zhicheng; JACOBS-LORENA, Marcelo. Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 46, p. 28895-28900, 1997.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, Elizabeth I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.

SOUZA, Claudiana P. et al. The importance of chitin in the marine environment. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 823, 2011.

SUMIDA T, FUJIMOTO K, ITO M. Molecular cloning and catalytic mechanism of a novel 1057 glycosphingolipid-degrading beta-N-acetylgalactosaminidase from *Paenibacillus* sp. 1058 TS12. **J Biol Chem** ;286:14065–72, 2011.

TORRES, F.A.G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, 20-22, 2001.

VEGA, Karina; KALKUM, Markus. Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2011.

VELLANKI, R. N., POTUMARTHI, R., DODDAPANENI, K. K., ANUBROLU, N., MANGAMOORI, L. N. Constitutive Optimized Production of Streptokinase in *Saccharomyces cerevisiae* Utilizing Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Promoter of *Pichia pastoris*. **BioMed research international**, 268249, 2013.

VOLPERT, M.; MANGUM, J. E.; JAMSAI, D.; D'SYLVA, R.; O'BRYAN, M. K.; McINTYRE, P. Eukaryotic expression, purification and structure/function analysis of native, recombinant CRISP3 from human and mouse. **Scientific Reports**: Nature, v. 4, p. 4217, DOI: 10.1038/srep04217, 2014.

WANG, M., JIANG, S., WANG, Y. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. **Bioengineered** 7, 155–165, 2016

WANG, J., WANG, X., SHI, L., QI, F., ZHANG, P., ZHANG, Y., *et al.* Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. **Scientific Reports** 7, 41850, 2017.

WATERHOUSE, D. F. The hydrogen ion concentration in the alimentary canal of larval and adult Lepidoptera. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 428-437, 1949.

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** 46; 401–412, 2014.

WEIDNER, M.; TAUPP, M.; HALLAM, S.J. Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **J Vis Exp**. v. 36, p. 1862. 2010.

WOHLKONIG A, HUET J, LOOZE Y, WINTJENS R. Structural relationships in the lysozyme super- family: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. **PLoS One** 5:e15388, 2010.

XIE, T.; LIU, Q.; XIE, F.; LIU, H.; ZHANG, Y. Secretory expression of insulin precursor in *Pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. **Prep Biochem Biotechnol**, 38:308-317, 2008.

YAN, J. et al. Cloning and functional expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 9, p. 979-989, 2002.

YANG, CHI-YEA et al. Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel *Bacillus subtilis* isolate from Taiwan potato field. **Bioresource technology**, v. 100, n. 3, p. 1454-1458, 2009.

YOSHIDA E, HIDAKA M, FUSHINOBU S, KOYANAGI T, MINAMI H, TAMAKI H, et al. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 beta-glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Biochem J**; 431:39–49, 2010.

ZHENG, Ning et al. Structure of the Cul1–Rbx1–Skp1–F box Skp2 SCF ubiquitin ligase complex. **Nature**, v. 416, n. 6882, p. 703, 2002.

