

JÚLIO CÉSAR CÂMARA ROSA

**OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Kluyveromyces lactis*
RECOMBINANTES PRODUTORAS DE ESTREPTAVIDINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós -
Graduação em Microbiologia Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

JÚLIO CÉSAR CÂMARA ROSA

**OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Kluyveromyces lactis*
RECOMBINANTES PRODUTORAS DE ESTREPTAVIDINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós -
Graduação em Microbiologia Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 9 de março de 2007

Prof^ª Elza Fernandes de Araújo
(Co-Orientadora)

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Co-Orientador)

Prof^ª Marisa Vieira de Queiroz

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

Prof^ª Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender e nem tão
pequeno que não possa ensinar”*

Voltaire

A Deus pelas forças e bênçãos a mim concedidas por toda minha vida e principalmente durante a execução deste trabalho.

À minha amada mãe Marina e minha tia Titina, meus refúgios, que sempre me deram forças e inspiração para alcançar essa vitória.

À minha querida avó “Dona Anita” que sempre lembra do seu neto em seus momentos de orações e de agradecimentos a Deus.

À minha “irmã” do coração Sãozinha que sempre me apoiou nos momentos de dificuldades.

*A todos os meus queridos primos em especial Aninha e Miguel, Bel e Rick (*in memoriam*), Dani e Cris, e Dai que sempre me apoiam e me acompanham nesta trajetória.*

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, pelo companheirismo e amizade durante a busca do saber científico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo precioso dom da vida e pelas bênçãos em mim depositadas na conquista de mais uma vitória.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia por essa oportunidade de crescer como profissional ampliando meus conhecimentos.

À professora Flávia Passos pela orientação deste trabalho, pelo compartilhamento das suas experiências profissionais e pessoais, pela amizade e confiança em mim depositada.

Aos Co-orientadores Prof^a. Elza Fernandes de Araújo, Prof. Luciano Gomes Fietto e a Dr^a Virginia Maria Chaves Alves pelas valiosas dicas e sugestões durante a execução deste trabalho.

A todos os professores do departamento de Microbiologia pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos pelo auxílio, pela convivência e amizade. Vocês são para mim uma verdadeira família que me acolheu aqui em Viçosa.

Aos funcionários Danilo, Evandro, Sr. Toninho e Sr. Paulo pela amizade e prontidão em auxiliar na execução deste trabalho, mesmo durante as correrias pelos corredores do BIOAGRO.

Aos colegas e amigos do laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos e do laboratório de Microbiologia Industrial pela amizade e agradável convivência.

À minha mãe Marina e minha avó D. Anita pelo amor incondicional, pela dedicação e pelas orações. Obrigado por terem compreendido meus momentos de fraqueza e por sempre terem entendido quando eu dizia: NÃO POSSO IR PARA CASA.

Aos meus amigos, Franklin, Well, William, Sandra, Cris, Guálter e aos INTOCÁVEIS Éder, Fernanda e Otávio pela amizade e pelos momentos de alegria que passamos juntos. Vocês estão guardados para sempre em meu coração

À minha querida amiga Rosilaine pela paciência, amizade, compreensão e companheirismo durante toda essa caminhada. Obrigado Rosi por incentivar-me e animar-me nos momentos de fraqueza.

A todos os amigos que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para o êxito desse trabalho.

BIOGRAFIA

Júlio César Câmara Rosa, filho de Marina Câmara e Júlio Maria Peixoto Rosa, nasceu no dia 28 de julho de 1982, na cidade de Piranga, MG. Em agosto de 2000 iniciou o curso superior na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e em julho de 2004 graduou-se em Ciências Biológicas Habilitação Licenciatura sendo agraciado como aluno que mais se destacou durante o curso. Em Fevereiro de 2005 obteve o título de Bacharel em Ciências Biológicas pela mesma Instituição. Durante a graduação participou de programa de iniciação científica vinculada à linha de pesquisa Biologia Molecular das Hepatites Virais no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM). Durante a graduação também participou de programas de monitorias e de extensão, além de lecionar Biologia na Escola Estadual de Ouro Preto. Em Março de 2005, ingressou no curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo dissertação de mestrado em março de 2007.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Plasmídeos e linhagens de Microrganismos.....	11
3.2 Meios de cultura e condições de cultivo.....	12
3.3 Obtenção, amplificação e clonagem do <i>core</i> da estreptavidina (cStp).....	13
3.4 Confirmação da clonagem do cStp no plasmídeo pKLAC1.....	15
3.5 Transformação de células de <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2359 e MW 98.8C com o plasmídeo pKLAC1-cStp.....	16
3.6 Análise da estabilidade mitótica das células recombinantes.....	16
3.7 Indução da expressão do <i>core</i> da estreptavidina (cStp).....	17
3.8 Análise da proteína recombinante.....	17
3.8.1 Análise de Proteínas totais.....	17
3.8.2 Análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	17
3.9 Detecção da estreptavidina no sobrenadante das culturas recombinantes.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Amplificação e clonagem do fragmento corresponde à sequência codificadora do <i>core</i> da estreptavidina.....	19
4.2 Transformação e análise da estabilidade dos transformantes.....	24
4.3 Expressão do cStp pelas linhagens de <i>Kluyveromyces lactis</i> recombinantes..	27
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	33
6. REFERENCIAS.....	35
APÊNDICE.....	46
APÊNDICE A.....	47
APÊNDICE B.....	48
APÊNDICE C.....	49
APÊNDICE D.....	50

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Modelo esquemático da indução dos genes GAL em *S. cerevisiae* proposto por PENG & HOPPER (2002).....5
- FIGURA 2:** Representação dos plasmídeos utilizados neste trabalho..... 12
- FIGURA 3:** Seqüência do gene da Estreptavidina (Gene Bank nº X03591, 638 pb, *Streptomyces avidinii*) (ARGARAÑA *et al.*, 1986).....14
- FIGURA 4:** Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE. produto da amplificação do pSTP4.....19
- FIGURA 5:** Alinhamento da seqüência cStp utilizando o programa BlastN.....20
- FIGURA 6:** Seqüência de aminoácidos deduzida a partir da seqüência obtida da reação do seqüenciamento do plasmídeo pCR2.1 TOPO contendo o cStp.....21
- FIGURA 7:** Eletroforese em gel de agarose (1,8% p/v) em tampão TBE. Da reação de clivagem do pKLAC1/cStp com endonucleases *Xho* I e *Bgl* II.....22
- FIGURA 8:** Representação esquemática da inserção do cStp no plasmídeo pKLAC1..23
- FIGURA 9:** Cassete de integração no promotor pLAC4, contendo a seqüência de nucleotídeos referente ao core da proteína Estreptavidina (cStp), e o gene marcador *amdS*, que codifica a enzima acetamidase, que foi utilizado para a obtenção das linhagens recombinantes.....24
- FIGURA 10:** Análise da estabilidade mitótica dos transformantes.....25

FIGURA 11: Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE, produto de PCR, do genoma de <i>Klyuveromyces lactis</i> MW 98.8C e CBS 2359.....	26
FIGURA 12: A e B Perfil de secreção de proteínas totais pelas linhagens MW 98.8C CBS 2359 respectivamente, nos diferentes meios de indução testados em função do tempo.....	28
FIGURA 13: Fracionamento em gel de poliacrilamida 15% (p/v) em condições desnaturantes das proteínas extracelulares presente no sobrenadante das culturas recombinantes <i>K.lactis</i> MW 98.8C/cStp e CBS 2359/cStp.....	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Teste HABA para detecção de estreptavidina no sobrenadante da cultura de *K. lactis* MW 98.8C recombinante.....31

TABELA 2: Teste HABA para detecção de estreptavidina no sobrenadante da cultura de *K. lactis* CBS 2359 recombinante.....31

RESUMO

ROSA, Júlio César Câmara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março, 2007.
Obtenção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* recombinantes produtoras de estreptavidina. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo, Luciano Gomes Fietto e Virginia Maria Chaves Alves.

A forte interação da proteína estreptavidina pela molécula de biotina constitui um excelente sistema para a separação e/ou imobilização de proteínas e de enzimas de interesse industrial. Com a intenção de produzir proteínas com propriedades de adsorção biosseletiva, nós temos modificado a seqüência do plasmídeo pKLAC1 pela inserção do domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina. Utilizando a técnica da Reação da Polimerase em cadeia (PCR), a seqüência de cerca de 355pb foi amplificada a partir do vetor pSTP4 que contém toda seqüência de nucleotídeos referente à proteína estreptavidina. O Fragmento amplificado apresentou 100% de identidade com a seqüência de nucleotídeos da proteína estreptavidina depositada no Gene Bank. O fragmento foi inserido no vetor pKLAC1 nos sítios *Xho* I e *Bgl* II em fase com a seqüência do peptídeo sinal do *mating- α -factor*. O plasmídeo pKLAC1/cStp foi linearizado com enzima *Ahd* I e foi utilizado para a transformação das linhagens de *K. lactis* MW 98.8C e CBS 2359. Os transformantes selecionados em meio YCB (Yeast Carbon Base) contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio e confirmados por PCR foram mitoticamente estáveis. A alta biomassa celular ($DO_{600} = 18$) obtida em erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YPD foi centrifugada e transferida para meio de indução contendo 2% (p/v) de lactose. O sobrenadante das culturas foi analisado qualitativamente para estreptavidina pela técnica de SDS PAGE. As proteínas totais foram determinadas pelo método de BRADFORD utilizando BSA (Albumina Bovina Sérica) como padrão. As amostras foram coletadas a cada 24 horas durante 6 horas de cultivo sob regime de batelada. A atividade da proteína estreptavidina presente no sobrenadante das culturas recombinantes foi determinada pelo teste do reagente HABA. Os meios YPL e YNB contendo 0,5% de extrato de levedura exibiram

os melhores resultados quanto à produção extracelular de estreptavidina ativa e de proteínas totais.

ABSTRACT

ROSA, Júlio César Câmara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2007.
Obtaining of recombinant strains of the yeast *Kluyveromyces lactis* producers of streptavidin. Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo, Luciano Gomes Fietto and Virginia Maria Chaves Alves.

The high affinity interaction streptavidin-biotin provides an excellent system for industrial enzyme separation or immobilization involving a fused streptavidin-enzyme and a biotinylated support. In order to produce proteins with affinity to biotin, we have modified the commercial *K. lactis* system, pKLAC1 (New England Biolabs), a LAC4 promoter-driven integration vector for protein expression, with the gene coding streptavidin. The codifying sequence for biotin binding domain of streptavidin (cStp) was amplified by PCR from pSTP4, purified and subcloned to the pCR2.1TOPO (Invitrogen). The fragment has revealed 100% identity with streptavidin gene according to Gene Bank and it was inserted into *Xho* I / *Bgl* II pKLAC1 in frame with mating- α -factor signal peptide. The pKLAC1/cStp cut by *Ahd* I enzyme was used to transform the strains *K. lactis* MW 98.8C and CB S2359. The transformants selected in Yeast Carbon Base (YCB) containing 5 mM acetamide and confirmed by PCR were mitotically stable. A high cell biomass ($OD_{600} = 18$), obtained in shake-flask 50 mL YPD medium, was centrifuged and transferred to an induction medium, containing 2% of lactose. The cell free medium was qualitatively analyzed for streptavidin and proteins by SDS PAGE. The samples were collected in each 24 hours during 6 days of bath culture. The biotin binding activity of streptavidin in the culture supernatant was determined by HABA test. The medium YPL and YNB with 0,5% of yeast extract have exhibited the best yields for streptavidin extracellular protein production.

1. INTRODUÇÃO

Os avanços nas técnicas de biologia molecular vieram transformar a tradicional indústria das fermentações. Proteínas e peptídeos, antes somente obtidos por métodos complexos de extração de tecidos animais ou vegetais, com baixos rendimentos e pureza, e às vezes, impróprios para consumo, hoje potencialmente podem ser produzidos por microrganismos em processos fermentativos. Ao contrário de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* exibe um metabolismo predominantemente oxidativo com baixa repressão por glicose, o que favorece maior rendimento de biomassa. Essa característica aliada ao potencial em secretar proteínas de alta massa molecular para o meio extracelular, torna essa levedura uma candidata promissora na produção de proteínas heterólogas. A levedura *K. lactis* é tradicionalmente conhecida como fonte de β -galactosidase para a indústria de alimentos e tem seu uso seguro em aplicações destinadas à indústria alimentícia ou farmacêutica. Além disso, é capaz de assimilar lactose, o açúcar presente no soro de queijo, subproduto de indústrias de derivados do leite, cujo aproveitamento é necessário.

Atualmente, um vetor integrativo para expressão e secreção de proteínas recombinantes em *K. lactis*, o plasmídeo pKLAC1, está disponível comercialmente. Neste vetor a expressão de proteínas recombinantes é dirigida por uma forma variante do promotor do gene LAC4, que foi modificado para não apresentar atividade transcricional em *Escherichia coli*. O vetor apresenta o gene *amdS* sob o controle do promotor do gene AHD2 (álcool desidrogenase). O gene *amdS* codifica uma acetamidase, proveniente de cepas de *Aspergillus nidulans*, que permite a seleção de células transformantes em meio mínimo contendo acetamida como única fonte de

nitrogênio. Esse método de seleção, pela conversão de acetamida em amônia, favorece o crescimento de células que apresentam múltiplas cópias do cassete de integração, consequentemente maior produção da proteína de interesse.

Considerando a forte interação estreptavidina-biotina com uma constante de afinidade na ordem de 10^{-15} M, pode-se inferir que a inserção de parte do gene, que codifica o domínio de afinidade à biotina, da proteína estreptavidina (cStp) no vetor pKLAC1, facilitará o processo de isolamento e purificação de proteínas heterólogas, em uma coluna de separação biotinilada. É conveniente que enzimas hidrolíticas, tais como glucoamilase, lipases, pectinases ou proteases contenham em sua estrutura um domínio de afinidade. Esse domínio permite que a enzima seja isolada e imobilizada numa coluna, integrante da linha de processamento de produtos como xarope de milho, óleos, sucos de frutas etc. A produção da enzima quimérica por *Kluyveromyces lactis* garante o status GRAS exigido pela indústria de alimentos. O objetivo deste trabalho foi inserir parte do gene da estreptavidina, que contém o domínio de afinidade pela biotina (cStp) no vetor pKLAC1 para permitir a produção de proteínas heterólogas com propriedades de adsorção biosseletiva. Foi também avaliado o potencial das linhagens MW 98.8C e CBS 2359 de *K. lactis* em secretar o cStp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leveduras são organismos eucariotos unicelulares bem conhecidos do ponto de vista científico e tecnológico, cujas propriedades biológicas e fisiológicas têm justificado sua potencial aplicação como hospedeiros para produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico (PORRO & MATTANOVICH, 2004). Várias espécies, além da *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido estudadas com esse objetivo, entre as quais *Hansenula polymorpha* (MÜLLER *et al.*, 1998; GELLISSSEN, 2000), *Arxula adenivorans* (RÖSEL & KUNZE, 1998), *Pichia stipitis*, *Schwanniomyces occidentalis* (PIONTEK *et al* 1998), *Pichia pastoris* (CEREGHINO & CREGG, 2000), *Candida boidinii* (GELLISSSEN G, 2000) e *Yarrowia lipolytica* (JURETZEK *et al.*, 2001). Dentre tantas, *Kluyveromyces lactis* tem atraído especial atenção por suas características, que incluem desde o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), até a predominância de um metabolismo oxidativo com baixa repressão catabólica, o que resulta em maiores rendimentos de biomassa e proteína, além de baixos níveis de glicosilação na via secretória e de processamento de proteínas. Embora leveduras não sejam consideradas excelentes secretoras de enzimas quando comparadas a fungos filamentosos, algumas linhagens de *K. lactis* são bem conhecidas devido à capacidade de secretar uma proteína *killer* de alta massa molecular (Zimocina). O sequenciamento completo do genoma de *K. lactis* está disponível na rede (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt>) e as relações filogenéticas entre *K. lactis* e *S. cerevisiae* permitem o compartilhamento de técnicas de manipulação genética para construção de sistemas eficientes de expressão e secreção de

proteínas (FLEER *et al.*, 1991a, b; ROMANOS *et al.*, 1992; SWINKLES *et al.*, 1993; WESOLOWSKI-LOUVEL *et al.*, 1996; DUJON, *et al.*, 2004).

Desde a década de 50, *K. lactis* tem sido utilizada como fonte comercial da enzima β -galactosidase (lactase), para o processamento de derivados de leite com concentração reduzida de lactose e na síntese de galacto-oligossacarídeos de interesse para saúde e nutrição humana (YANG & SILVA, 1995; RIVERO-URGELL & SANTAMARIA-ORLEANS, 2001).

Na década de 60, um suplemento alimentar protéico tendo como base a massa celular de *K. lactis* foi conhecido como *Single Cell Protein* (SCP) e nessa mesma década, já haviam os estudos para investigar os mecanismos de regulação da síntese da β -galactosidase. Mas somente a partir da década de 80, que os componentes principais do LAC/GAL regulon foram identificados. As leveduras tanto do gênero *Kluyveromyces* quanto *Saccharomyces*, pertencentes à família *Saccharomycetaceae*, originaram-se de um mesmo ancestral, e a habilidade dessas leveduras em assimilar galactose como fonte de carbono é determinada pela presença de genes em comum que compõe o GAL regulon (SCHAFFRATH & BREUNIG, 2000; BHAT & MURTHY, 2001; KELLIS *et al.*, 2004; RUBIO-TEXEIRA, 2005). A principal diferença entre o GAL regulon dessas leveduras é a evolução no sistema de internalização e hidrólise das diferentes fontes de galactose presente no ambiente. A assimilação de lactose (O- β -D-galactopiranosil -1,4 - β - D -glicose) por *K. lactis* é dependente de dois genes inexistentes em *S. cerevisiae*, LAC12 e LAC4, os quais, respectivamente, codificam para a permease e β -galactosidase (lactase) (SREEKRISHNA & DICKSON, 1985). Esses genes são divergentemente transcritos a partir de uma região intergênica de cerca de 2,6 Kb, que contém uma seqüência ativadora *upstream* (UAS). A seqüência ativadora contribui sinergisticamente para a ativação de ambos os genes por permitir a ligação do ativador transcricional Lac9/KlGal4p. A presença de lactose/galactose acentua a transcrição do LAC/GAL regulon. A galactose juntamente com uma molécula de ATP, ativa a função sensora de KlGal1p (galactocinase) que é a primeira enzima atuante da via metabólica para conversão de galactose em glicose-6-fosfato, intermediário da via glicolítica (*Leloir Pathway*). Embora em *S. cerevisiae* Gal1p seja também uma proteína bifuncional, a atividade sensora é realizada pela proteína Gal3p que não possui atividade de galactocinase, mas é idêntica a KlGal1p e Gal1p (PLATT *et al.*, 2000). Após a interação com galactose e ATP, Gal3p sofre uma mudança conformacional que permite o seqüestramento de Gal80p para o citosol, reduzindo seus níveis intranucleares. Desta forma, o ativador transcricional Gal4p que atua como um

0,8% de ácido láctico (MORESI, 1994). Devido a alta concentração de compostos orgânicos, representados principalmente pela lactose (aproximadamente 70% dos sólidos totais) e pelas proteínas (aproximadamente 20% dos sólidos totais), o soro de queijo impõe um alto valor de demanda biológica de oxigênio (DBO) durante o tratamento de água residual. Os valores de DBO alcançam 30.000-60.000 mg.mL⁻¹, dependendo do processamento específico utilizado na fabricação de queijos e do conteúdo de lactose (EL-HAWARY & MEHANNA, 1991; BRANDÃO, 1994). A eliminação da lactose do soro de queijo por intermédio da fermentação com simultânea conversão deste contaminante em produtos de interesse comercial, como, por exemplo, a produção de solventes orgânicos, etanol combustível ou biomassa protéica, é um projeto de grande interesse sócio-econômico.

Os recentes progressos no entendimento da genética e da fisiologia molecular de *K. lactis* têm favorecido o desenvolvimento de estratégias para expressão de proteínas heterólogas utilizando esta levedura. A assimilação de lactose combinada com uma via de secreção de proteínas heterólogas mais eficiente, torna *K. lactis* uma hospedeira ideal para produção de enzimas de interesse industrial. Maullu *et. al.*, (1999) realizaram a com sucesso a produção de lisozima em linhagens de *K. lactis* utilizando o soro de queijo.

A levedura *K. lactis* foi uma das primeiras leveduras para a qual o sistema de transformação foi estabelecido (DAS & HOLLENBERG, 1982). Com isso o interesse de alguns grupos de pesquisa em utilizar essa levedura como uma célula hospedeira, para produção de proteínas heterólogas, se intensificou após a descoberta de uma proteína *killer*, cujo gene foi mapeado em seqüências extracromossomais lineares em *K. lactis* durante a década de 80. Algumas linhagens de *K. lactis* mostraram conter um par de plasmídeos citoplasmáticos lineares pGKL1 (8,8 kb) e pGKL2 (13,4 kb), sendo que o menor plasmídeo confere o fenótipo *killer* estritamente depende do pGKL2 (JESKE *et. al.*, 2006). A toxina protéica heterotrimérica (zimocina) causa um rompimento irreversível do ciclo celular na fase G1 nas células sensíveis, como por exemplo, *S. cerevisiae*. A zimocina consiste de três subunidades α (97 kDa), β (31 kDa) e γ (28 kDa). Uma vez secretadas as subunidades α e β se ancoram na parede celular das células suscetíveis e facilitam a transferência da subunidade γ para o citosol da célula alvo. A toxina inibe o crescimento celular por realizar a clivagem dos tRNA^{Glu}, tRNA^{Lys} e tRNA^{Gln} na extremidade 3' do ribonucleosídeo modificado 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina presente no braço do anticódon (LU *et. al.*, 2005).

A descoberta dos plasmídeos lineares pGKL1 e pGKL2, juntamente com a capacidade da levedura *K. lactis* de expressar, processar e secretar um complexo protéico de alta massa molecular, como a zimocina, estimulou o desenvolvimento de vetores para expressão de proteínas utilizando elementos desse sistema. Porém as construções baseadas nos plasmídeos lineares não foram bem sucedidas. Os vetores episomais mais comuns para expressão de proteínas heterólogas em *K. lactis* são derivados do plasmídeo pKD1, identificado na levedura *Kluyveromyces drosophilorum* (FALCONE *et. al.*, 1986; CHEN *et. al.*, 1986). Esse plasmídeo é muito semelhante ao plasmídeo 2 μ m de *S. cerevisiae* em relação à estabilidade, estrutura e ao número de cópias por célula, e replica estavelmente em linhagens de *K. lactis* (CHEN *et al.*, 1996; HSIEH & DA SILVA, 1998).

A existência de ambos os vetores episomal e integrativo amplia a utilização de *K. lactis* em processos biotecnológicos. Alguns promotores nativos de *K. lactis*, como o do gene que codifica β -galactosidase (LAC4) e o do gene que codifica álcool desidrogenase (KIADH4), induzíveis por lactose/galactose e etanol exógeno, respectivamente, são empregados na produção de proteínas heterólogas por esta levedura. Porém, o promotor do gene KIADH4 tem sido útil em linhagens de *K. lactis* deficientes na produção de etanol a partir de fontes de carbono fermentáveis (Rag⁻) (SALIOLA *et al.*, 1999). Entretanto, o promotor do gene LAC4 é mais investigado por ser bem conhecido e por ser induzível (SWINKELS *et al.*, 1993). O uso desse promotor para expressão de proteínas, continua sendo amplamente explorado em *Kluyveromyces* (HSIEH & DA SILVA, 2000; PANUWATSUK & DA SILVA, 2002; PANUWATSUK & DA SILVA, 2003). Além do promotor LAC4, a expressão de proteínas heterólogas em *K. lactis* tem sido reportada com o promotor constitutivo do gene que codifica fosfoglicerato cinase (PGK) e o promotor induzível do gene que codifica fosfatase ácida (PHO5), ambos de *S. cerevisiae*.

A levedura *K. lactis* é empregada como hospedeira para produção comercial de quimosina bovina (VAN DEN BERG *et. al.*, 1990). A quimosina bovina é apropriada para o processo de fabricação de queijos devido à sua alta especificidade por κ -caseína. Essa especificidade de clivagem da enzima quimosina garante a qualidade e o rendimento máximo na produção de queijo (WILLIAMS *et. al.*, 1997). A utilização de bioreator industrial no processo de produção é importante pelo fato de substituir o sacrifício de bezerros recém nascidos, uma vez que, pelos métodos tradicionais, a quimosina é extraída das células de estômagos desses recém nascidos. Além disso, a produção recombinante resulta em uma enzima cataliticamente ativa.

O potencial de *K. lactis* como hospedeira para produção de proteínas na indústria alimentícia ampliou suas perspectivas para produção de proteínas terapêuticas na indústria farmacêutica. De fato, um grande número de proteínas de relevância farmacológica tem sido produzidas em *K. lactis* na última década, incluindo a interleucina humana 1 (FLEER *et. al.*, 1991a; BLONDEAU *et. al.*, 1994), o antígeno de superfície da vírus da hepatite B (HbsAg) (MARTINEZ *et. al.*, 1992), o interferon α A (CHEN *et. al.*, 1992), o fator de estimulação de colônias de macrófagos (HUA *et. al.*, 1994), o precursor da insulina (FENG *et. al.*, 1997), a cadeia leve Fv de anticorpos (SWENNEN *et. al.*, 2002; ROBIN *et. al.*, 2003), a soroalbumina humana (FLEER *et. al.*, 1991b; SALIOLA *et. al.*, 1999; COLUSSI & TARON, 2005), e a lisozima (IWATA *et. al.*, 2004). Atualmente, mais de 40 proteínas, tanto de origem bacteriana, quanto de origem fúngica, viral, vegetal e animal, têm sido produzidas utilizando *K. lactis* como hospedeira. O potencial biotecnológico de *K. lactis* tem sido revisto e a massa celular seca dessa levedura tem novamente atraído grande interesse como fonte de proteína *single-cell* com putativas propriedades probióticas (KUMURA *et. al.*, 2004; GHALY *et. al.*, 2005).

Colussi & Taron (2005) desenvolveram um vetor integrativo de expressão e secreção de proteínas recombinantes, denominado pKLAC1, cuja integração ocorre na região promotora do gene LAC4. Esse vetor tem sido comercializado pela New England Biolab. O fato desse promotor promover a expressão gênica em *Escherichia coli* anterior à sua introdução em *K. lactis*, levou ao desenvolvimento de formas variantes desse promotor apresentando alterações na seqüência “Pribnow box” (TATA Box) do tipo PBI, PBII e PBIII, impedindo sua atividade em células procarióticas. Dessa forma, proteínas consideradas tóxicas para *Escherichia coli* podem ser seguramente clonadas e expressas.

Além da expressão de proteínas e enzimas de interesse industrial e farmacêutico, proteínas quiméricas vêm sendo construídas pela fusão de seqüências de nucleotídeos que codificam domínios de afinidade para facilitar a detecção e a separação da proteína de interesse. Por exemplo, domínios que permitem a detecção imunológica de proteínas sem a necessidade da produção de anticorpos específicos (JARVIK & TELMER, 1998). Dentre outros domínios de afinidade, destaca-se o da proteína estreptavidina (Stp) que tem afinidade pela molécula de biotina. A estreptavidina é uma proteína homotetramérica com cerca de 60 kDa, produzida por culturas de *Streptomyces avidinii*. Apresenta quatro sítios ativos para interação com biotina, sendo um em cada monômero. A interação estreptavidina-biotina é uma das interações não-covalentes mais

fortes até então conhecida, exibindo uma constante de afinidade na ordem de 10^{-15} M (SANO *et al.*, 1998). Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, predominantemente entre a biotina e quatro resíduos de triptofano (Trp 79, Trp 92, Trp 108, Trp 120), são responsáveis por essa alta afinidade. Além disso, o *loop* formado pela interação estreptavidina-biotina adquire uma estrutura em β -barril que adota rapidamente uma conformação fechada, recobrando todo o sítio de ligação (STAYTON *et al.*, 1999). Esse sistema tem sido muito explorado em “kits” para diagnósticos em análises clínicas, pesquisas e processos de purificação de proteínas (TUNTASUVAN *et al.*, 2000; DRIEGEN *et al.*, 2005).

As proteínas avidina e estreptavidina possuem afinidades similares pela biotina, porém apresentam diferentes massas moleculares e mobilidades eletroforéticas. Ambas as proteínas são ricas em resíduos de triptofano, sendo que os resíduos presentes na estreptavidina são menos suscetíveis à oxidação por N-bromosuccinimida. Pelo fato da biotina ser uma vitamina relativamente pequena, de cerca de 244 Da, encontrada em tecidos e sangue, pode ser conjugada a muitas proteínas sem alterar a atividade biológica das mesmas. A alta afinidade pode ser explicada em parte devido à seqüência conservada de triptofano e lisina (Trp-Lys) (GITLIN *et al.*, 1987). A avidina contém seqüências Trp-Lys em duas posições, 70-71 e 110-111 e a estreptavidina retém esta conservação nas posições 79-80 e 120-121. A formação da ligação entre biotina e avidina é muito rápida e uma vez formada não é afetada nem por pH extremos, nem por solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes. Sendo este complexo capaz de resistir à ação desnaturante do cloreto de guanidina na concentração de 3 M. A molécula de biotina pode ser liberada por cloreto de guanidina 6-8 M, pH 1,5 ou por autoclavagem (HOFMANN *et al.*, 1980). A avidina é uma glicoproteína, com um ponto isoelétrico (pI) em torno de 10 enquanto que a estreptavidina não apresenta nenhum resíduo de carboidrato e seu pI é de aproximadamente 5-6. A estreptavidina é mais resistente do que a avidina à dissociação em subunidades, quando submetida ao tratamento com Cloreto de guanidina (CHAIET *et al.*, 1964). A estreptavidina naturalmente secretada por *S. avidinii* apresenta moléculas com seqüências terminais truncadas, devido à clivagem pós-secretória das regiões terminais que são altamente suscetíveis à ação de proteases intrínsecas, que podem clivá-las nos resíduos de 1-14 e 139-159 (GREEN, 1990). Dessa proteólise resultam peptídeos de cerca de 13.3 kDa referentes ao core da estreptavidina (WEBER *et al.*, 1989; SWAISGOOD *et al.*, 1994). As moléculas de estreptavidina não truncadas ou parcialmente truncadas possuem a tendência de formar agregados com baixa solubilidade (SANO *et al.*, 1995). A

afinidade dessa proteína pela biotina facilita o desenvolvimento de novas drogas, como: vacinas, inibidores ou ativadores químicos e ligantes para proteínas e ácidos nucleicos (CLARE *et. al.*, 2001; WU *et. al.*, 2003). Além disso, a imobilização de enzimas em suportes para bioprocessamento de alimentos possibilita uma maior produtividade por unidade de enzima (JANOLINO *et. al.*, 1982; SOLOMON, *et. al.* 1987; SWAISGOOD *et. al.*, 1998; MACÊDO, 2001).

Desde a primeira clonagem, a estreptavidina tem sido produzida em hospedeiras bacterianas como *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (SANO & CANTOR, 1990; NAGARAJAN *et. al.*, 1993; GALLIZIA *et. al.*, 1998; WU *et. al.*, 2002a; WU *et. al.*, 2002b). Recentemente, no laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), essa proteína foi obtida a partir de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* por DAMASCENO (2001), utilizando o sistema de expressão pPIC9. Posteriormente, a produção dessa proteína foi otimizada por FONSECA (2005), sob o regime de batelada alimentada, determinando as melhores condições de cultivo das linhagens de *P. pastoris* recombinantes, nível de aeração, fluxo de alimentação, alcançando cerca de 4 g.L⁻¹ de proteína no sobrenadante. Além disso, a reutilização da biomassa da levedura pode favorecer o aumento da produtividade volumétrica de proteínas heterólogas por eliminar etapas improdutivas de obtenção de biomassa.

O sistema de expressão de proteínas em *P. pastoris* induzido por metanol, pPIC9, é um sistema bem estabelecido e utilizado por diversos laboratórios de pesquisa com o objetivo de obter altas concentrações de proteínas para fins científicos como, determinação de estrutura por cristalografia a atividade funcional. O requerimento de elevadas concentrações de metanol, volátil, na fase de indução da síntese protéica restringe sua utilização em grandes bioreatores industriais. O plasmídeo pKLAC1 para expressão e secreção de proteínas em *K. lactis*, é um sistema recentemente desenvolvido, alternativo ao pPIC9 da *P. pastoris* com características promissoras e perspectivas adicionais de aplicação em larga escala.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plasmídeos e Microrganismos

O plasmídeo pSTP4, [North Carolina State University, USA (SWAISGOOD & WALSH, 1994)] foi utilizado para obtenção e amplificação da seqüência de nucleotídeos referente ao core da proteína estreptavidina. É derivado do vetor pSE280 (Invitrogen, San Diego, CA), apresenta cerca de 4,2 Kb e contém toda seqüência de nucleotídeos que codifica a proteína estreptavidina inserida entre os sítios *Nco* I e *Sal* I.

O Plasmídeo pCR[®] 2.1 TOPO (Invitrogen) foi utilizado para a clonagem do fragmento obtido a partir da reação da polimerase em cadeia. O sitio múltiplo de clonagem localiza-se na região interna do gene *lacZ* que permite a triagem dos transformantes recombinantes utilizando X-gal e IPTG.

O plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs, Figura 2) foi utilizado nos processos de expressão e secreção do *core* da estreptavidina e contém as seqüências referentes às extremidades 5' e 3' do promotor do gene *LAC4*, a seqüência líder do “Mating alpha factor” de *Kluyveromyces lactis* (α MF), o sitio múltiplo de clonagem (MCS), e o terminador da transcrição do gene *LAC4* (TT) que estão a *downstream* da seqüência 3' do promotor do gene *LAC4* (pLAC4-PBI 3'). O Promotor do gene que codifica álcool desidrogenase (*ADH2*) de *Saccharomyces cerevisiae* dirige a expressão do gene *amdS*, isolado de *Aspergillus nidulans*, que codifica acetamidase.

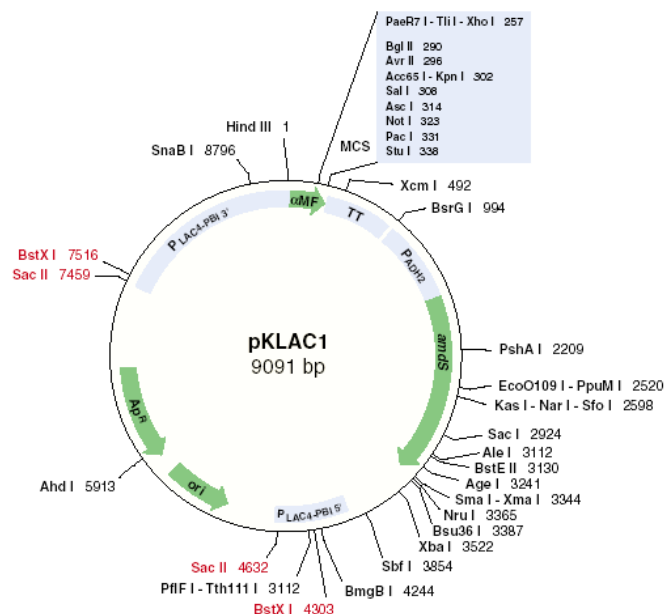


Figura 2: Plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs).

As células *E. coli* DH5 α TM foi utilizada para propagação dos plasmídeos utilizados neste trabalho.

As linhagens *K lactis* MW 98.8C (*MAT α* , *uraA1*, *argA1*, *lysA1*, *Rag-*, K+, pKD1⁰) e CBS 2359 (linhagem referência utilizada no sequenciamento pela *Genolevure*) foram utilizadas como células hospedeiras para a expressão do *core* da estreptavidina, utilizando o plasmídeo pKLAC1. Essas linhagens foram gentilmente cedidas por Hiroshi Fukuhara, Institut Curie, Universidad Paris XI, France.

3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

Células de *E. coli* DH5 α TM foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (20g.L⁻¹ triptona, 10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ cloreto de sódio) sob agitação de 250 rpm a 37°C. Células transformadas com o plasmídeo pCR 2.1[®] TOPO foram cultivadas sob as mesmas condições em meio LB contendo 50 μ g.mL⁻¹ de Kanamicina para seleção dos transformantes e manutenção do plasmídeo, enquanto que o meio de cultivo para *E. coli* DH5 α TM contendo os plasmídeos pKLAC1 e pKLAC1/*cStp* foram suplementados com 50 μ g.mL⁻¹ de ampicilina.

As linhagens de *K. lactis* transformantes foram selecionadas em meio YCB ágar (Yeast Carbon Base) contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio. A

biomassa das linhagens de *K lactis* foi obtida em meio YPD (1% p/v extrato de levedura, 2% p/v peptona e 2% p/v dextrose) a 30°C sob agitação de 200 rpm. Para indução da síntese da proteína heteróloga foram utilizados os meios YPL [1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona e 2% (p/v) de lactose], YNB_{lac + ext lev} [13,4 g.L⁻¹ Yeast Nitrogen Base with Aminoacid and Ammonium Sulfate (Sigma)] contendo 2% (p/v) de lactose e suplementado com 0,5% p/v de extrato de levedura e em soro de queijo desproteínizado. Para as culturas em meio sólido foram adicionados 2% p/v de ágar no meio YPD.

3.3. Obtenção, amplificação e clonagem do *core* da estreptavidina (cStp)

A seqüência de nucleotídeos codificadora do “core” da estreptavidina foi obtida a partir do plasmídeo pSTP4, pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir da seqüência do gene íntegro da estreptavidina. As seqüências dos oligonucleotídeos adicionam sítios de restrição para as endonucleases *Xho* I (em azul) (JCORESTP-F) e *Bgl* II (em vermelho) (JCORESTP-R) como apresentado a seguir:

JCORESTP-F: 5'CTCGAGAAAAGAGGCATCACCGGCACCTGGTAC'3

JCORESTP-R: 5' AGATCTCACCTTGGTGAAGGTGTCGTGGCC 3'

O oligonucleotídeo JCORESTP-F contém ainda o sítio de clivagem da enzima Kex2p (em verde), uma serina-protease dependente de íons cálcio presente no complexo de Golgi da célula hospedeira, destinada a processar as proteínas na via secretória.

As posições de anelamento dos oligonucleotídeos foram determinadas de acordo com os dados de SANO *et. al.*(1995) citado por DAMASCENO (2001) (Figura 3).

```

1  CCCTCCGTCC  CCGCCCGGGCA  ACAACTAGGG  AGTATTTTTC  GTGTCTCACA  TGC GCAAGAT
61  CGTCGTTGCA  GCCATCGCCG  TTTCCTGAC  CACGGTCTCG  ATTACGGCCA  GC GCTTCGGC
121  AGACCCCTCC  AAGGACTCGA  AAGGCCAGGT  CTEGGCCGCC  GAGGCCGGCA  TCACCGGCAC

181  CTGGTACAAC  CAGCTCGGCT  CGACCTTCAT  CGTGACCGCG  GGC GCGGACG  GCG CCC TGAC
241  CGGACCTTAC  GAGTCGGCCG  TCGGCACGCG  CGAGAGCCGC  TAC GTCC TGA  CCG GTC GTTA
301  CGACAGCGCC  CCGGCACCG  ACGGCAGCG  CACCGCCCTC  GGT TGGACG  TGG CCTGGAA
361  GAATTACTAC  CGCACGCCC  ACTCCGCGAC  CACGTGGAGC  GGC CAGTAG  TCG GCG GCGC
421  CGAGGCGAGG  ATCACACCC  AGTGGCTGCT  GACCTCCGGC  ACC ACC GAGG  CCACG CCTG
481  GAGTCCACG  CTGGTCGGCC  ACGACACCTT  CACCAAGGTG  AAG CCG TCCG  CC GCCTCCAT

541  CGACGCGGCG  AAGGAGGCCG  GCGTCAACAA  CGGCACCCG  CTC GAC GCCG  TTCAGCAGTA
601  GTCGCCTCCC  GGCACCGGCG  GGTGCCGGGA  CCTCGGCC

```

Figura 3: Seqüência do gene da Estreptavidina (Gene Bank nº X03591, 638 pb, *Streptomyces avidinii*) (ARGARAÑA *et al.*, 1986). As bases em cinza representam o fragmento resultante da amplificação; as setas indicam o local de anelamento dos oligonucleotídeos JCORESTP-F e JCORESTP-R e o sentido da amplificação *in vitro*.

A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 50 µL contendo: 20ng do DNA plasmidial pSTP4, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 200 µM de cada dNTP, 5 µL tampão 10X para Taq DNA polimerase; e 10µmoles de cada um dos oligonucleotídeos específicos. A amplificação foi efetuada de acordo como seguinte protocolo: (i) 94°C por 5 minutos (um ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto (35 ciclos); (iii) 72°C por 10 minutos (um ciclo). O produto da amplificação foi fracionado em gel de agarose 1% p/v de tampão TBE 1X. O volume de 5µL da reação de amplificação foi aplicado no gel e o fragmento de DNA de cerca de 355 pb esperado foi visualizado utilizando o aparelho Eagle Eye Stratagene. O volume restante da reação (45 µL) foi purificado utilizando o QIAquick PCR Purification (Quiagen). O fragmento de DNA purificado foi subclonado no vetor pCR2.1® TOPO (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante, seguida da transformação de células *E. coli* DH5αTM segundo método proposto por INOUE *et al.* (1990).

A triagem dos transformantes foi realizada pelo cultivo em meio Luria-Bertani (LB) ágar contendo 40 µg.mL⁻¹ de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-

galactopiranosídeo), 200 μM de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Kanamicina. Após confirmação da clonagem realizou-se o seqüenciamento do gene inserido no vetor pCR2.1[®] TOPO a fim de verificar a correta amplificação da seqüência de nucleotídeos referente ao *core* da estreptavidina. O fragmento de 355 pb foi liberado do vetor pCR2.1[®] TOPO pela clivagem com as enzimas *Xho* I e *Bgl* II, purificado e submetido à reação de ligação com 1 unidade da enzima T4 DNA ligase com o vetor pKLAC1 clivado com as mesmas enzimas. Em seguida realizou-se a transformação de células *E. coli* DH5 α [™], segundo Inoue *et al.* (1990). As células transformantes foram selecionadas em meio LB ágar (20g.L⁻¹ triptona, 10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ cloreto de sódio e 2% p/v ágar bacteriológico) suplementado com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina. Colônias isoladas foram inoculadas em 15 ml de caldo LB seletivo (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina) e incubadas a 37°C, sob agitação de 225 rpm por cerca de 16 horas. Após incubação, foram retiradas alíquotas de 1 mL cada, seguida da adição de 30 % (v/v) de glicerol e armazenamento a -80 °C. O volume restante da cultura de células *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pKLAC1-cStp, foi utilizado para a extração do DNA plasmidial, utilizando a Miniprep Kit Wizard SV Plus (Promega).

Todos os procedimentos de manipulação de DNA foram realizados segundo SAMBROOK *et al.*, 1989.

3.4. Confirmação da clonagem do cStp no pKLAC1

O plasmídeo pKLAC1-cStp foi submetido à reação de clivagem com endonucleases de restrição *Xho* I e *Bgl* II (Invitrogen), utilizando o tampão *React 2* (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl₂ 50 mM NaCl) e posteriormente fracionado em gel de agarose 1,0 % (p/v), em tampão TBE 1X a 80 volts por cerca de 60 minutos utilizando o padrão de tamanho 1 kb DNA *ladder plus*. O plasmídeo pKLAC1 foi ainda seqüenciado utilizando os oligonucleotídeos pKLAC1 Reverse e Mating- α -factor (Invitrogen).

Mating- α -factor: 5'GAAGAAGCCTTGATTGGA 3'

pKLAC1 Reverse: 5'TTATCGCACAAGACAATC 3'

3.5. Transformação das linhagens CBS 2359 e MW 98.8C de *Kluyveromyces lactis* com o plasmídeo pKLAC1-cStp.

Células *K. lactis* CBS 2359 e MW 98.8C foram transformadas com o plasmídeo pKLAC1-cStp previamente linearizado com a endonuclease de restrição *Ahd* I (New England Biolabs), utilizando o tampão NEB 4 (10 mM Tris-acetato, 50 mM acetato de potássio, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM ditiotretitol) adicionado de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA. O processo de transformação de leveduras *K. lactis* foi realizado segundo HILL *et. al.* (1991). Inicialmente as linhagens de *K. lactis* foram inoculadas em 10 mL de meio YPG e incubadas a 30°C e 200 rpm. Ao atingir a fase estacionária, as culturas foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio YPG e incubadas nas mesmas condições. Após atingir uma $\text{DO}_{600} = 0.5$, que corresponde aproximadamente a 10^7 UFC/mL, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram descartados. Com sedimento celular foi realizada uma suspensão de células em 10 mL de uma solução de acetato de lítio (0,1M acetato de lítio, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). Foi retirada uma alíquota de 100 μL da suspensão de células e adicionado 4 μg do plasmídeo pKLAC1-cStp previamente linearizado, e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 280 μL de uma solução de PEG [50% PEG (polietilenoglicol) (p/v) em solução de acetato de lítio] homogeneizado 4-6 vezes por inversão. A mistura foi incubada a 30°C por 45 minutos sem agitação. Após incubação foi adicionado 43 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) que corresponde aproximadamente a 10% (v/v) seguida da mesma homogeneização. A mistura foi submetida a um choque térmico a 42°C por 5 minutos e centrifugada a 12.000 x g por 3-5 segundos. O sedimento celular foi lavado com água Mili Q estéril e centrifugado novamente nas mesmas condições. Uma alíquota de 100 μL das células foram plaqueadas em meio YCB ágar seletivo contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio e 30 mM tampão fosfato de sódio em pH 7,0 para a seleção dos transformantes. A confirmação da seqüência de nucleotídeos do *core* da estreptavidina no genoma das linhagens transformadas, foi realizada pela reação da polimerase em cadeia utilizando os oligonucleotídeos JCORESTP-F e JCORESTP-R.

3.6. Análise da estabilidade mitótica das linhagens recombinantes

As células recombinantes foram retiradas da placa contendo meio seletivo YCB adicionado de 5 mM de acetamida e repicadas cinco vezes consecutivas em meio não

seletivo YPD para avaliar a estabilidade dos transformantes. Após cada repicagem, as placas foram incubadas a 30°C por 96 horas. Ao final das repicagens em meio não seletivo, os clones foram novamente cultivados em meio seletivo YCB suplementado com 5 mM de acetamida e submetidos às mesmas condições de incubação.

3.7. Indução da expressão do *core* da estreptavidina (cStp)

Para a indução da expressão do “core” da estreptavidina, inicialmente foi obtida uma biomassa celular em torno de 16 - 18 (A_{600}) em 50 mL de meio YPD. Após centrifugação da biomassa a 1500 x g por cerca de 10 minutos, o sedimento foi lavado com água peptona 0,01 % (p/v) e ressuspendido em 100 mL de meio YPL ou YNB_{lac+ext lev}, ambos contendo 2 % lactose e em soro de queijo em Erlenmeyer de 500 mL. As células foram incubadas a 30°C sob agitação de aproximadamente 200 rpm. A cada 24 horas, durante 144 horas foram retiradas 5 alíquotas de 1 mL cada para análise da expressão.

3.8. Análise da proteína recombinante

3.8.1. Análise de Proteínas totais

A concentração de proteínas extracelulares totais foi avaliada segundo método proposto por BRADFORD (1976).

3.8.2. Análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As Proteínas totais foram precipitadas com 10 % (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) por 60 minutos a 0°C, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado duas vezes com 0,3 mL de acetona gelada, recuperado por centrifugação a 4°C por 15 minutos a 13000 x g, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de tampão de amostra [125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% β-mercaptoetanol, 10% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol e 0,05 (p/v) azul de bromofenol] para SDS-PAGE. As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos e analisadas por SDS-PAGE.

A eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (v/v) foi realizada conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989). Os géis foram preparados a partir de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30%, tampão Tris/HCl 1,5 mol.L⁻¹, pH 8,3 para o gel separador, e tampão Tris/HCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 6,8 para o gel empilhador, persulfato de amônio 10% (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v), e N,N,N,N,-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente na presença de marcadores com padrão de massa molecular. Foram utilizados dois procedimentos de coloração *Coomasie brilliant blue* R250 [50% (v/v) metanol, *Coomasie brilliant blue* 1gL⁻¹, 10% (v/v) ácido acético glacial] e o coloidal G250 segundo método proposto por NEUHOFF *et. al.* (1988).

3.9. Detecção da estreptavidina no sobrenadante das culturas recombinantes

Para determinar a presença do *core* da estreptavidina, um teste qualitativo foi realizado com o reagente HABA (ácido 2-hidroxiázobenzeno-4'-carboxílico). Um volume de 25 µL do reagente HABA (10 mM do reagente em uma solução de 10 mM de NaOH) foi adicionado as seguintes soluções : i) 1mL água destilada; ii) 1 mL de uma solução de avidina 0,5 mg. mL⁻¹ [preparada em 50 mM tampão fosfato, pH 6,0, contendo 0,9 % (p/v) de cloreto de sódio]; iii) 1 mL do sobrenadante das culturas controle, linhagens selvagens (não transformadas); iv) 1 mL do sobrenadante das culturas recombinantes contendo o cStp. Após a adição a mistura foi incubada à temperatura ambiente por cerca de 5 minutos e procedeu-se a leitura da absorbância (A₁) a 500 nm. A todas as soluções foram adicionados 25µL da solução de Biotina [5 mM preparada em 50 mM tampão fosfato, pH 6,0, contendo 0,9 % (p/v) de cloreto de sódio]. A mistura foi homogeneizada e após 5 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura da absorbância (A₂) a 500 nm foi determinada. A diferença entre as absorbâncias A₁ e A₂, refletiu o deslocamento da avidina e da estreptavidina do reagente HABA pela biotina em solução.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação e clonagem da seqüência codificadora do *core* da estreptavidina (cStp)

A amplificação *in vitro* do gene cStp a partir do plasmídeo pSTP4, resultou em um fragmento de DNA de cerca 355 pb conforme apresentado na Figura 4.

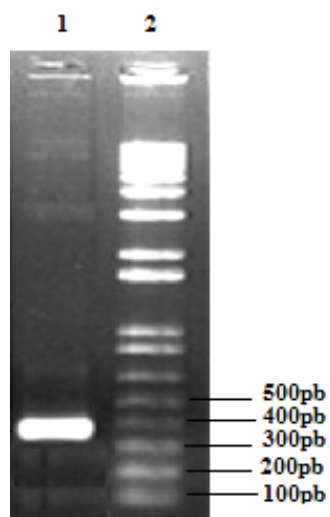


Figura 4: Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1X do produto de amplificação a partir do pSTP4. **1,** fragmento amplificado *in vitro* utilizando os oligonucleotídeos JCORESTP-F e JCORESTP-R correspondente ao core da proteína estreptavidina (~355pb). **2,** Padrão de tamanho molecular 1Kb DNA ladder plus (Invitrogen)

O fragmento de 355 pb contido na mistura de reação de PCR ou previamente purificado após amplificação foi subclonado no vetor pCR 2.1 TOPO (dados não mostrados) e propagados em células *Escherichia coli* DH5 α em meio LB ágar seletivo para a triagem das células transformantes. A clonagem do produto amplificado direto da mistura de reação de PCR não foi tão eficiente quanto a clonagem do fragmento previamente purificado da reação, contradizendo as recomendações dos fabricantes do vetor.

A clonagem no vetor pCR2.1TOPO foi útil para verificar a correta amplificação da seqüência de nucleotídeos referentes ao *core* da estreptavidina bem como para realizar as clivagens com as enzimas *Xho* I e *Bgl* II necessárias à subsequente clonagem no plasmídeo pKLAC1. A Figura 5 apresenta o resultado do alinhamento da seqüência obtida pela análise de seqüenciamento do fragmento contido no vetor pCR2.1TOPO, com as seqüências de nucleotídeos depositadas no *Gene Bank*, utilizando o programa BlastN *on-line*.

```

Query: 1   ggcacacccggcacctggtacaaccagctcgggctcgaccttcatcgtgaccgcgggcgcc 60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Subjct:167 ggcacacccggcacctggtacaaccagctcgggctcgaccttcatcgtgaccgcgggcgcc 226

Query: 61  gacggcgccctgaccggaacctacgagtcggccgctcggcaacgcccagagaccgctacgtc 120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Subjct:227 gacggcgccctgaccggaacctacgagtcggccgctcggcaacgcccagagaccgctacgtc 286

Query: 121 ctgaccggtcggttacgacagcgccccggccaccgacggcagcggcaccgcccctcggttgg 180
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Subjct:287 ctgaccggtcggttacgacagcgccccggccaccgacggcagcggcaccgcccctcggttgg 346

Query: 181 acggtggcctggaagaataactaccgcaacgcccactccgcgaccacgtggagcggccag 240
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Subjct:347 acggtggcctggaagaataactaccgcaacgcccactccgcgaccacgtggagcggccag 406

Query: 241 tacgtcggcgccgcccagggcgaggatcaacaccagtggtgctgacctccggcaccacc 300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Subjct:407 tacgtcggcgccgcccagggcgaggatcaacaccagtggtgctgacctccggcaccacc 466

Query: 301 gaggccaacgcctggaagtccacgctggtcggccacgacaccttaccagggtga 355
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Subjct:467 gaggccaacgcctggaagtccacgctggtcggccacgacaccttaccagggtga 521

```

Figura 5: Alinhamento da seqüência do fragmento contido no vetor pCR 2.1 TOPO utilizando o programa BlastN. *Query* representa a seqüência do fragmento (355pb). *Subjct* representa a seqüência do gene estreptavidina proveniente de *Streptomyces avidinii*.

A seqüência de nucleotídeos inserida no vetor pCR2.1 TOPO apresentou 100% de identidade com a seqüência de nucleotídeos referente ao domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina (cStp) correspondente à região de 167 a 521 da seqüência original do gene integro (638 pb) (ARGARAÑA *et. al.*, 1986). A Figura 6 mostra a seqüência de aminoácidos deduzida do fragmento corretamente amplificado utilizando o programa Biology Workbench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu>; Department of Bioengineering; University of California, San Diego).

```

      G I T G T W Y N Q L G S T F I V T A G A
1    ggcatacaccggcacctggtacaaccagctcggctcgaccttcatcgtgaccgcggcgcc 60
      D G A L T G T Y E S A V G N A E S R Y V
61  gacggcgccctgaccggaacctacgagtcggccgctcggcaacgccgagagccgctacgtc 120
      L T G R Y D S A P A T D G S G T A L G W
121 ctgaccggtcggttacgacagcgccccggccaccgacggcagcggcaccgcccctcggttg 180
      T V A W K N N Y R N A H S A T T W S G Q
181 acggtggcctggaagaataactaccgcaacgcccactccgcgaccacgtggagcggccag 240
      Y V G G A E A R I N T Q W L L T S G T T
241 tacgtcggcgggcgccgagggcgaggatcaacacccagtggtgctgacctccggcaccacc 300
      E A N A W K S T L V G H D T F T K V
301 gaggccaacgcctggaagtccacgctggtcggccacgacaccttcaccaaggtg

```

Figura 6: Seqüência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento de DNA amplificado que corresponde ao *core* da estreptavidina (cStp).

Essa seqüência codifica para um peptídeo de 118 resíduos de aminoácidos com cerca de 13,3 kDa, a mesma seqüência utilizada por Sano *et. al.*, (1995) e Damasceno, (2001). Bayer *et. al.* (1989) utilizaram uma seqüência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de 127 resíduos de aminoácidos referente ao *core* da proteína estreptavidina processada por proteases intrínsecas da *Streptomyces avidinii*.

O plasmídeo pCR2.1[®] TOPO foi clivado com *Xho* I e *Bgl* II. O fragmento de DNA de aproximadamente 355 pb liberado e fracionado em gel de agarose foi purificado e submetido a reação de ligação com o plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs) clivado com as mesmas enzimas. A mistura da reação de ligação foi utilizada na transformação de *E.coli* DH5 α e colônias transformantes foram submetidas à extração e análise de restrição do DNA plasmidial para verificar a inserção do cStp no plasmídeo pKLAC1.

A Figura 7 mostra a análise de eletroforese em gel de agarose evidenciando um fragmento de DNA entre 300 e 400 pb, resultante da clivagem do plasmídeo com as enzimas *Xho* I e *Bgl* II. Um fragmento de DNA semelhante não é observado na análise do plasmídeo controle pKLAC1 submetido à mesma reação de clivagem.

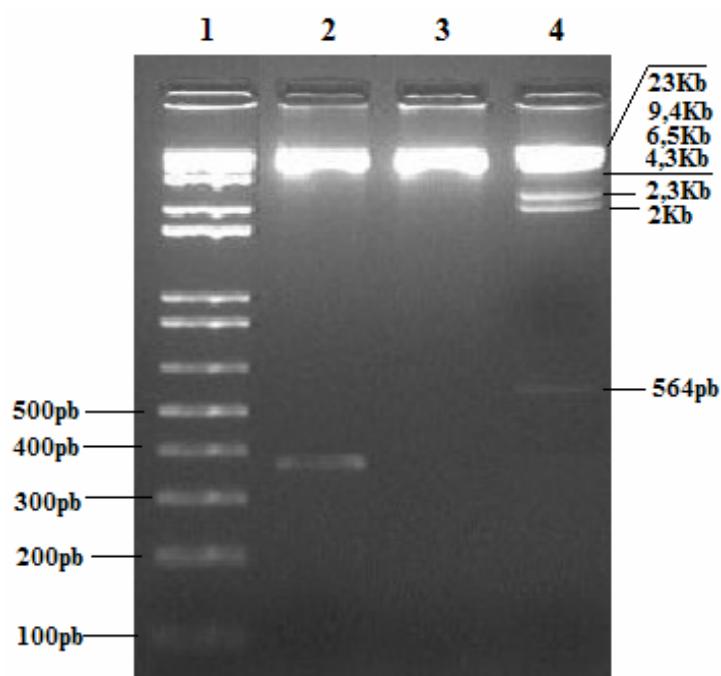


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1,8% p/v) padrão de restrição do pKLAC1/cStp. **1**, marcador de tamanho molecular 1Kb DNA *ladder plus* (invitrogen); **2**, plasmídeo pKLAC1-cStp clivado com as endonucleases de restrição *Xho* I e *Bgl* II, mostrando um fragmento de DNA de cerca de 355 pb referente ao *core* da proteína estreptavidina; **3**, controle plasmídeo pKLAC1 clivado com as mesmas endonucleases de restrição; **4**, DNA do fago λ clivado com endonuclease de restrição *Hind* III

O seqüenciamento do plasmídeo pKLAC1-cStp com os oligonucleotídeos *Mating-α-factor* e pKLAC1 *Reverse*, confirma a clonagem do cStp, um fragmento de 355 pb, no plasmídeo pKLAC1 nos sítios *Xho* I e *Bgl* II em fase com seqüência codificadora do peptídeo líder do *Mating-α-factor*. A inserção da seqüência do *core* da estreptavidina no pKLAC1 adjacente ao peptídeo sinal gerou um códon de parada da tradução cerca de 42 pb do cStp viabilizando a síntese em potencial de uma proteína de cerca de 15 kDa, conforme indicado na Figura 8.

```

M K F S T I L A A S T A L I S V V M A A
1 ATGaaattctctactatattagccgcatctactgctttaatttccggttggtatggctgct 60
P V S T E T D I D D L P I S V P E E A L
61 ccagtttctaccgaaactgacatcgacgatcttccaatatcggttccagaagaagccttg 120
I G F I D L T G D E V S L L P V N N G T
121 attggattcattgacttaaccggggatgaagtttcccttggtgcctgtaataacggaacc 180
H T G I L F L N T T I A E A A F A D K D
181 cacactgggtattctattcttaaacaccaccatcgctgaagctgctttcgctgacaaggat 240
D L E K R G I T G T W Y N Q L G S T F I
241 gatctcgagaaaagaaggcatcaccggcacctgggtacaaccagctcggctcgaccttcac 300
V T A G A D G A L T G T Y E S A V G N A
301 gtgaccgcgggacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 360
E S R Y V L T G R Y D S A P A T D G S G
361 gagagccgctacgtcctgaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 420
T A L G W T V A W K N N Y R N A H S A T
421 accgcccctcggttggaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 480
T W S G Q Y V G G A E A R I N T Q W L L
481 acgtggagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 540
T S G T T E A N A W K S T L V G H D T F
541 acctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 600
T K V R S P R G T V D G A P A A A *
601 accaaggtgagatctcctaggggtaccgctcgacggcggcggcggcggcggcggcggcggc 660
ccttgaatcgagaatttatacttagataagtatgtacttacaggtatatttctatgagat 720
721 actgatgaatacagnatgatataaac 747

```

Figura 8: Inserção da seqüência do cStp no sítio *Xho* I/*Bgl* II do plasmídeo pKLAC1. Em negrito, o ponto de início da tradução do peptídeo sinal do *Mating- α -factor*. Em verde e amarelo, os sítios *Xho* I e *Bgl* II respectivamente, flanqueando a seqüência de nucleotídeos referente ao cStp (em azul); em cinza, o sítio de clivagem da enzima KEX2; em vermelho, o códon de parada gerado a 42 pb do cStp.

A alteração da matriz de leitura na seqüência do vetor, gerando o códon de parada, é de fundamental importância, uma vez que a seqüência truncada de nucleotídeos inserida no pKLAC1 corresponde à região central do gene da estreptavidina. A síntese do domínio truncado da estreptavidina foi a estratégia adotada para facilitar sua imobilização em colunas biotiniladas. Conforme SANO *et. al.* (1995) esta estratégia resulta em proteínas mais solúveis, isto é, menos sujeitas a formar agregados, quando comparado com a proteína integral.

4.2. Transformação e análise da estabilidade dos transformantes

O plasmídeo pKLAC1-cStp foi linearizado com a enzima *Ahd* I para transformar as linhagens MW 98.8C e CBS 2359. A linearização resultou em um cassete contendo o gene da estreptavidina flanqueado pelas regiões 3' P_{LAC4} e 5' P_{LAC4} , direcionam a integração do cassete por recombinação homóloga na região promotora do gene LAC4, como representado na Figura 9. A recombinação homóloga é importante devido ao fato de reconstituir a seqüência do promotor para que se proceda a expressão do *cStp*. Caso contrário a expressão do *cStp* será inviabilizada e a peptídeo não será detectado no meio extracelular.

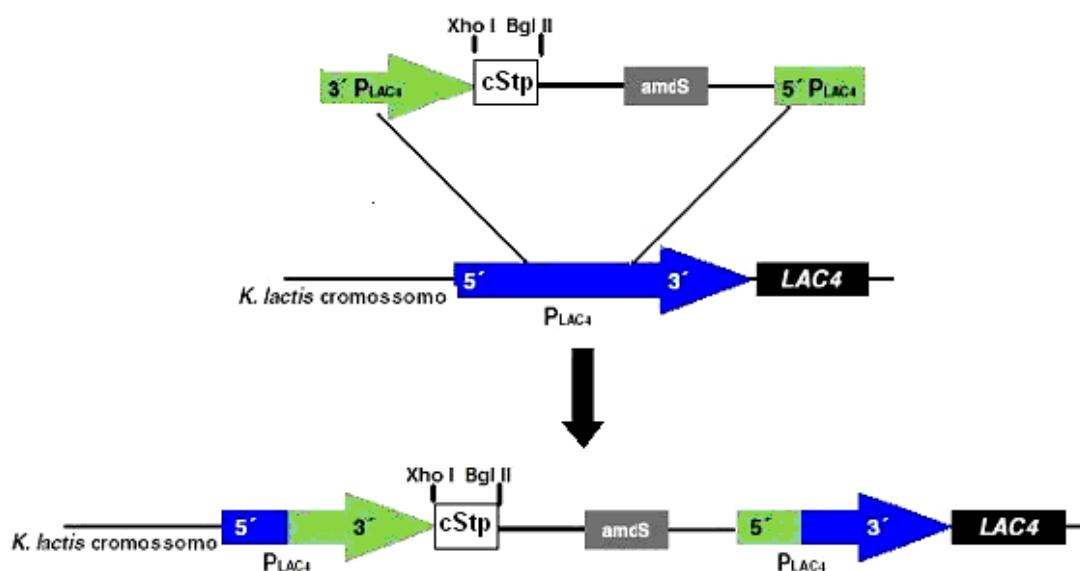


Figura 9: Cassete de integração no promotor $pLAC4$, contendo o gene marcador *amdS* e a seqüência de nucleotídeos referente ao core da proteína Estreptavidina (*cStp*) flanqueados pelas regiões 3' P_{LAC4} e 5' P_{LAC4} .

As leveduras transformantes foram selecionadas em placas de meio YCB contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio. O metabolismo de acetamida é dependente do produto do gene *amdS* presente no cassete. Como controle negativo para a produção, foi realizada a transformação das mesmas linhagens com o plasmídeo pKLAC1. O procedimento de transformação utilizando DMSO (dimetilsulfoxido) como proposto por Hill *et al.* (1991), resultou em 10^3 e 10^4 transformantes/ μ g de DNA nas linhagens CBS 2359 e MW 98.8C respectivamente. A

transformação pela adição de DMSO foi reportado ser mais eficiente em *S. cerevisiae* quando comparado aos métodos tradicionais empregando apenas acetato de lítio. Os resultados obtidos demonstram a mesma eficiência do método na transformação de *K. lactis*. O crescimento de colônias CBS 2359 transformantes nas placas de Petri contendo meio seletivo foi observado após 4 dias de incubação a 30°C enquanto que os primeiros transformantes da linhagem MW 98.8C surgiram após 6 dias de incubação. A linhagem auxotrófica MW 98.8C apresenta maior tempo de geração do que a linhagem selvagem CBS 2359.

A confirmação da integração do cassete contendo o *core* da estreptavidina no genoma das linhagens transformantes foi realizada por PCR. O DNA total dos transformantes foi utilizado nas reações de amplificação *in vitro* com os oligonucleotídeos JCOREST-F e JCORESTP-R, cujos resultados se encontram apresentados na Figura 10.

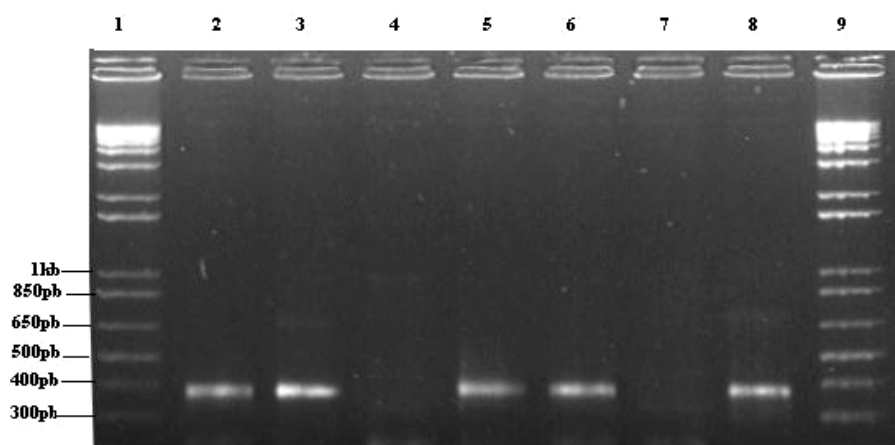


Figura 10: Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1X. Padrão de tamanho molecular 1Kb DNA *ladder plus* (Invitrogen) (1 e 9). Produtos da amplificação por PCR utilizando o DNA total das linhagens de *K. lactis* MW 98.8C/pKLAC1-cStp (2 e 3), CBS 2359/pKLAC1-cStp (5 e 6) e das linhagens MW 98.8C/pKLAC1(4) e CBS 2359/pKLAC1 (7) como controles negativo; 8, controle positivo utilizando o plasmídeo pSTP4 como molde.

A reação de amplificação a partir do DNA total das linhagens transformadas com o plasmídeo pKLAC1-cStp (canaletas 2, 3, 5 e 6) produziu um fragmento de mesmo tamanho que o produto amplificado a partir do DNA controle pSTP4 (canaleta 8). Esse

fragmento não foi observado quando o DNA total das linhagens transformadas com o plasmídeo pKLAC1 foi utilizado na reação de amplificação (canaletas 4 e 7). Estes resultados confirmam que os transformantes são portadores de uma cópia do gene da estreptavidina proveniente da *Streptomyces avidinii* inserido no genoma. Todos os transformantes analisados foram positivos quanto à presença do cStp confirmando a eficiência do procedimento de transformação proposto por Hill *et. al.*,(1991). Não foi determinado o número de cópias do cStp presente no genoma dos transformantes, embora o sistema de seleção pela conversão de acetamida em amônia é reconhecido por favorecer o crescimento de linhagens com mais de um cassete integrado (Colussi & Taron, 2005).

Após a confirmação da integração do cassete, a estabilidade mitótica das linhagens recombinantes foi avaliada em meio não seletivo. A Figura 11 apresenta os resultados do plaqueamento das linhagens MW 98.8C/cStp e CBS 2359/cStp em meio não seletivo (A e B) e em meio seletivo contendo 5 mM de acetamida (C e D).

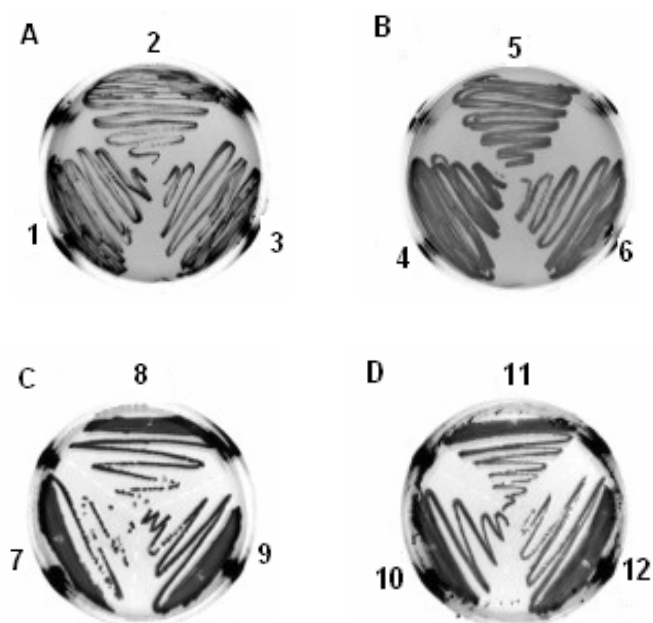


Figura 11: Cultivo das linhagens recombinantes em meio não seletivo YPD (A e B) e em meio seletivo YCB (Yeast Carbon Base) contendo 5 mM de acetamida (C e D); 1, 2, 7 e 8, MW 98.8C/cStp; 3 e 9 *K. lactis*/pKLAC1; 4, 5, 10 e 11, CBS 2359/cStp integrado no genoma; 6 e 12 CBS 2359/pKLAC1.

Após 5 repicagens em meio sólido não seletivo, as leveduras recombinantes foram capazes de utilizar acetamida com única fonte de nitrogênio. Esse fenótipo indica a capacidade das linhagens utilizadas em manter o cassete no genoma ao longo de aproximadamente 40 a 50 gerações. A estabilidade mitótica pode indicar que não houve

integração *in tandem* e também é importante na aplicação desse sistema para a produção de proteínas em larga escala por reduzir custos com meios de pressão seletiva.

4.3. Expressão do gene cStp nas culturas de *Kluyveromyces lactis* recombinantes CBS 2359/cStp e MW 98.8C/cStp

O crescimento das linhagens recombinantes CBS 2359/cStp e MW 98.8C/cStp de *K. lactis* e indução da expressão do gene cStp foram conduzidas em duas etapas independentes. Inicialmente foi obtida uma biomassa das linhagens recombinantes com absorbância a 600 nm de 18,0 em regime de batelada sob agitação em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YPD. Em seguida a biomassa foi ressuspensa em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meios de indução ($A_{600} = 8,0$). Os meios de indução, contendo lactose para induzir o promotor LAC4, foram: YPL (tendo peptona como principal fonte de nitrogênio), YNB_{lac + ext lev} (com sulfato de amônio e 0,5% de extrato de levedura) e o soro de queijo parcialmente desproteínizado. A Figura 12 mostra a concentração total de proteínas extracelulares, presentes no sobrenadante das linhagens recombinantes durante a fase de indução. Nessa fase, ainda foi observado crescimento em todos os meios de cultura utilizados (dados não mostrados).

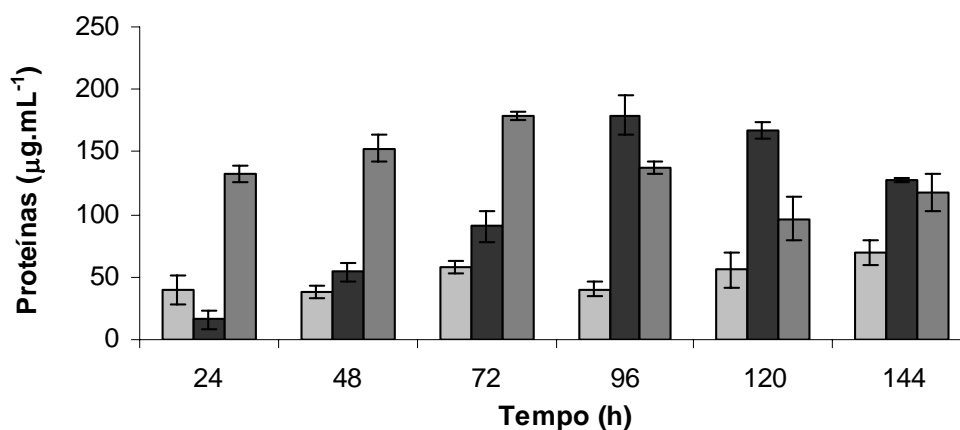
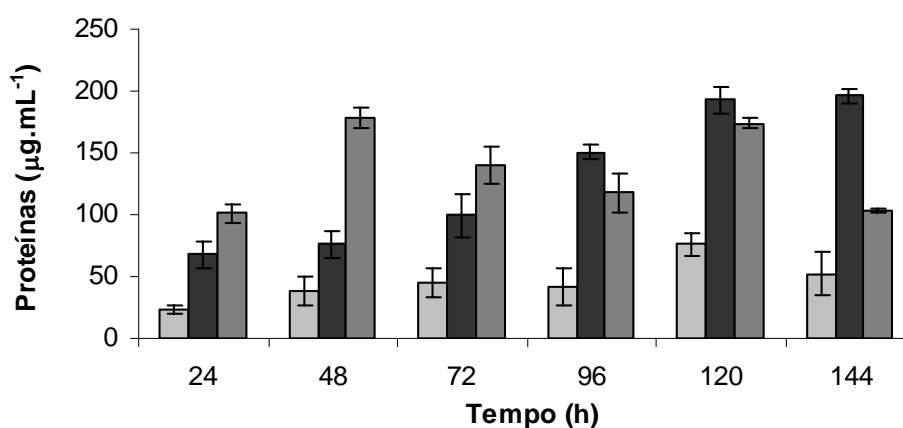
A**B**

Figura 12: Concentração de proteínas extracelulares totais das culturas CBS 2359/cStp (A) e MW 98.8C/cStp (B) de *K. lactis* recombinantes em função do tempo, nos meios de indução: □ Soro de queijo, ■ YNB_{lac+ext lev}, ▒ YPL.

Nas primeiras 72 horas de indução o meio YPL propiciou maiores concentrações de proteínas extracelulares quando comparado aos demais meios. Entretanto a partir de 96 horas o meio YNB_{lac+ext lev} supera o meio YPL quanto à concentração de proteínas extracelulares (Apêndices B e C). Esses resultados são observados em ambas as linhagens recombinantes. O meio YPL possui peptonas que podem favorecer a secreção de proteases extracelulares para a assimilação dos peptídeos presentes no meio como fonte de nitrogênio (FLORES *et. al.*, 1999). O meio YNB_{lac+ext lev}, embora suplementado com extrato de levedura, tem menos requerimento da atividade de proteases extracelulares. Embora não tenha sido analisada a natureza das proteínas extracelulares, é interessante que a atividade proteolítica no sobrenadante das culturas recombinantes em ambos os meios seja investigada. Além da atividade proteolítica

extracelular é importante avaliar também se o pH do meio de indução pode interferir no acúmulo de proteínas extracelulares. Após 96 horas de indução, o pH dos meios YPL e $\text{YNB}_{\text{lac} + \text{ex lev}}$ apresentaram valores em torno de 5,7 e 2,2 respectivamente. Choi *et.al.*, (2005) e COS *et.al.*, (2005) têm enfatizado que altas concentrações de proteínas extracelulares em culturas de *P. pastoris* recombinantes depende da baixa atividade de proteases extracelulares. Creeg *et. al.*, (1993) e Barral *et.al.*, (2005) sugerem a redução do pH a valores entre 2 e 4,5 com a finalidade de inibir a ação de proteases. O meio YPL mantém o pH mais estável do que o meio $\text{YNB}_{\text{lac} + \text{ext lev}}$ cujo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao ser assimilado acidifica o meio (WHITE, 2000). Desta forma a acidificação do meio $\text{YNB}_{\text{lac} + \text{ext lev}}$ verificada após 96 horas de indução pode ter reduzido a ação de proteases extracelulares.

Ambas as linhagens apresentaram uma concentração de proteínas extracelulares surpreendentemente mais baixas quando cultivadas em soro de queijo comparado aos demais meios.

A Figura 13 apresenta o perfil do fracionamento das proteínas extracelulares totais das culturas recombinantes. Um grande número de bandas é observado nos géis, contrapondo a baixa concentração de proteínas extracelulares. Esses resultados revelam que *K.lactis* secreta um numero mais elevado de proteínas extracelulares que o esperado pela maioria das leveduras. A presença de uma banda com cerca de 15 kDa no sobrenadante das culturas recombinantes e ausente na amostra controle, sugere a presença extracelular do core da estreptavidina.

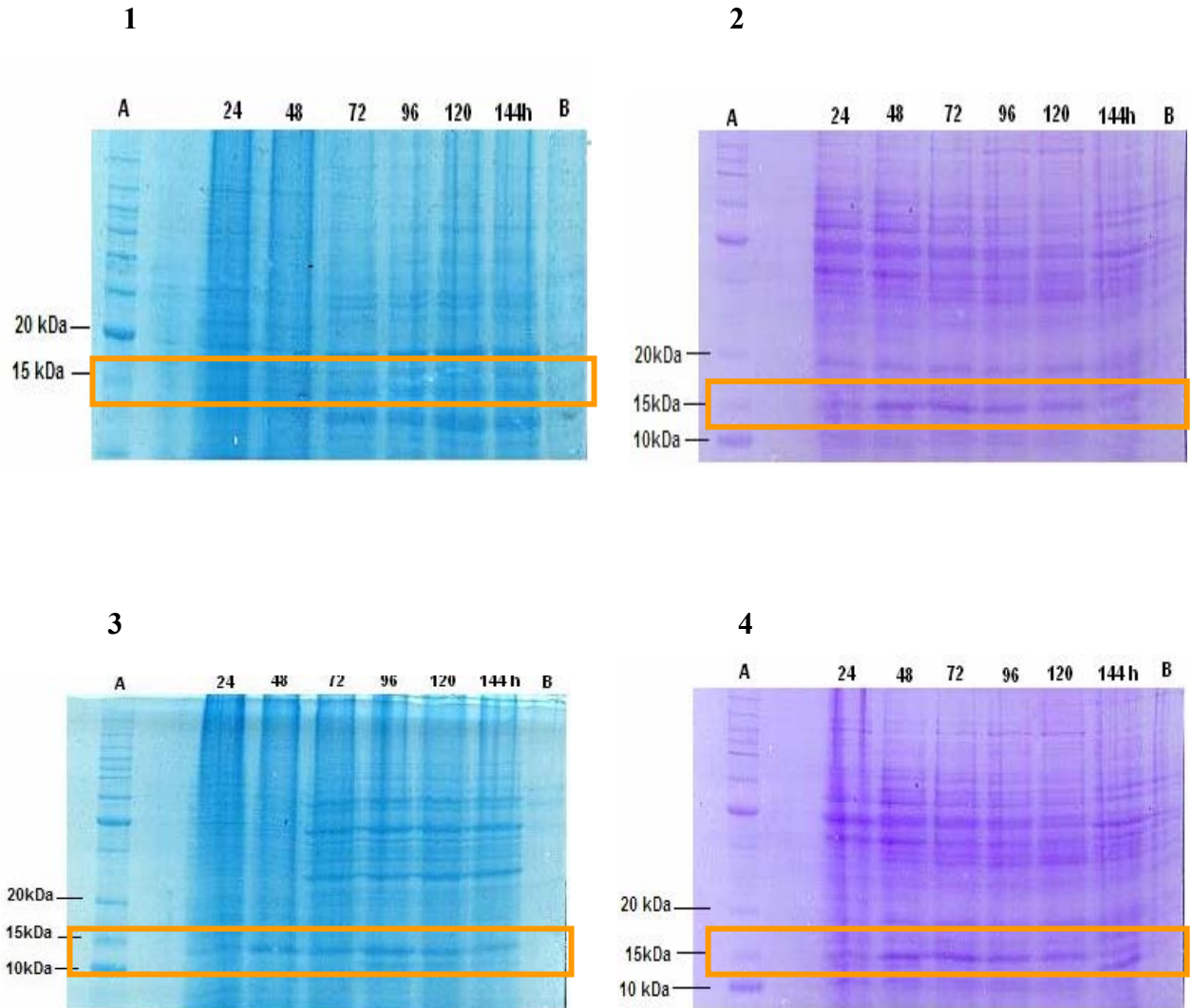


Figura 13: Fracionamento em gel de poliacrilamida 15% (p/v) em condições desnaturantes das proteínas extracelulares presente no sobrenadante das culturas recombinantes *K.lactis* MW 98.8C/cStp em meio YNB_{lac + ext lev} (1) e em YPL (2) e *K.lactis* CBS 2359/cStp em meio YNB_{lac + ext lev} (3) e em YPL (4). A- Marcador de massa molecular (Invitrogen), B - sobrenadante controle das respectivas linhagens transformadas com pKLAC1.

Entretanto a detecção de uma banda com um perfil de mobilidade eletroforética semelhante ao padrão de massa molecular de 15 kDa, mesmo que ausente no sobrenadante controle, não necessariamente indica a presença do *core* da estreptavidina nos sobrenadantes das culturas recombinantes. Para avaliar a presença do domínio funcional da estreptavidina, foi realizado o ensaio com o reagente HABA (PIERCE[®]), cujos resultados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. O reagente HABA na presença de estreptavidina forma um complexo que absorve luz em 500 nm. A adição de biotina

remove a estreptavidina do complexo reduzindo a absorvância. Conseqüentemente quanto maior a diferença entre absorvância na ausência de biotina e absorvância na presença de biotina, maior a concentração de estreptavidina no meio.

Tabela 1: Teste HABA para análise da presença do *core* da estreptavidina no sobrenadante da cultura de *K. lactis* recombinante MW 98.8C/cStp. A absorvância foi lida a 500 nm e os valores representam a média de três repetições.

Amostra	A ₁ ^a	A ₂ ^b	A ₁ - A ₂
H ₂ O + HABA	0,1548 ± 0,0002	0,1546 ± 0,0001	0,0002
Avidina (0,5mg.mL ⁻¹) + HABA	1,211 ± 0,002	0,640 ± 0,001	0,570
MW 98.8C/cStp YPL + HABA	0,811 ± 0,003	0,739 ± 0,003	0,072
MW98.8C/cStp YNB _{lac + ext lev} + HABA	0,303 ± 0,003	0,225 ± 0,003	0,078
CBS 2359/cStp YPL + HABA	0,822 ± 0,003	0,747 ± 0,002	0,075
CBS 2359/cStp YNB _{lac + ext lev} + HABA	0,342 ± 0,002	0,269 ± 0,002	0,073
Controle YPL+ HABA	0,718 ± 0,002	0,716 ± 0,002	0,002
Controle YNB _{lac + ext lev} + HABA	0,214 ± 0,001	0,211 ± 0,002	0,003

^aA1= leitura da absorvância anterior à adição de biotina.

^bA2 = leitura da absorvância após a adição de biotina.

Tabela 2: Teste HABA para análise da presença do *core* da estreptavidina no sobrenadante da cultura de *K. lactis* recombinante CBS 2359/cStp. A absorvância foi lida a 500 nm e os valores representam a média de três repetições.

Amostra	A ₁ ^a	A ₂ ^b	A ₁ - A ₂
H ₂ O + HABA	0,1548 ± 0,0002	0,1546 ± 0,0001	0,0002
Avidina (0,5mg.mL ⁻¹) + HABA	1,211 ± 0,002	0,640 ± 0,001	0,570
CBS 2359/cStp YPL + HABA	0,822 ± 0,003	0,747 ± 0,002	0,075
CBS 2359/cStp YNB _{lac + ext lev} + HABA	0,342 ± 0,002	0,269 ± 0,002	0,073
Controle YPL + HABA	0,714 ± 0,001	0,710 ± 0,002	0,004
Controle YNB _{lac + ext lev} + HABA	0,216 ± 0,001	0,213 ± 0,002	0,003

^aA1= leitura da absorvância anterior à adição de biotina.

^bA2 = leitura da absorvância após a adição de biotina.

A redução na absorvância representada pela diferença entre A1 e A2 reflete o deslocamento da estreptavidina do reagente HABA pela biotina, fato que não foi observado na amostra controle quando o volume de sobrenadante da cultura foi substituído pelo mesmo volume de água ou dos sobrenadantes das culturas controles. Tanto para a linhagem MW 98.8C/cStp quanto para a CBS 2359/cStp o ensaio do reagente HABA foi realizado com amostras de sobrenadantes nos tempos de máxima concentração de proteínas extracelulares. Os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2 comprovam a presença do domínio da estreptavidina funcional, isto é, com afinidade pela biotina, no sobrenadante de ambos os meios YPL e YNB_{lac + ext lev}.

O soro de queijo, nas condições utilizadas, não foi capaz de induzir a produção extracelular de estreptavidina pelas linhagens recombinantes em concentrações detectáveis (Apêndice D). Este fato não é suficiente para descartar a possibilidade de sua utilização como uma fonte alternativa de lactose para indução da expressão de proteínas pelas linhagens recombinantes. Maior concentração de biomassa pode ser obtida resultando consequentemente numa maior concentração de proteínas extracelulares na fase de indução. A volatilização do etanol percebida durante a fase de indução da síntese da proteína sugere a ocorrência de metabolismo fermentativo. É possível que o metabolismo fermentativo não favoreça a expressão e secreção da proteína recombinante. É necessário avaliar esses e os demais fatores fisiológicos que possam interferir na síntese e na secreção da estreptavidina pelas linhagens recombinantes nos meios de indução estudados inclusive no soro de queijo. A análise das melhores condições de cultivo e de indução como concentração de lactose, aeração, pH, micro e macronutrientes são necessários para aumentar o rendimento da proteína de interesse. Estudos semelhantes realizados por Fonseca (2006) resultaram na produção de 4g.L⁻¹ de estreptavidina extracelular por culturas de *Pichia pastoris* recombinantes.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

A seqüência de 355 pb foi isolada da reação de PCR utilizando o plasmídeo pSTP4 como molde. O fragmento amplificado apresentou 100% de identidade com a região codificadora do domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina (cStp). Com a finalidade de obter um sistema de expressão e secreção de proteínas em *Kluyveromyces lactis* que permita isolar e/ou imobilizar proteínas recombinantes em suportes biotinilados, a seqüência codificadora do domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina (cStp) foi inserido no vetor de expressão e secreção pKLAC1 de *K. lactis*. A inserção do cStp nos sítios *Xho* I e *Bgl* II em fase com a seqüência do peptídeo líder do *mating- α -factor*.

O plasmídeo pKLAC1-cStp linearizado com a enzima *Ahd* I resultou um cassete cujas regiões 3'P_{LAC4} e 5'P_{LAC4}, direcionaram o cassete para recombinação homóloga na região promotora do gene da β -galactosidase (LAC4) presente no genoma das linhagens *K. lactis* MW 98.8C e CBS 2359 transformadas. O procedimento de transformação pela utilização de DMSO proposto por Hill *et. al.* (1991) resultou numa eficiência de transformação na ordem de 10³ e 10⁴ transformantes/ μ g de DNA nas linhagens CBS 2359 e MW 98.8C respectivamente. Os transformantes analisados foram positivos quanto a presença do cStp no genoma e demonstraram estabilidade mitótica.

Uma concentração de biomassa correspondente a A₆₀₀ de 18 das linhagens recombinantes MW 98.8C/cStp e CBS 2359/cStp foi obtida em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio YPD. Posteriormente essa biomassa foi transferida para os meios YPL, YNB_{lac + ext lev} e em soro de queijo, todos contendo lactose para a indução da síntese da estreptavidina. As amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas durante um período de 6 dias para análise de proteínas totais.

Para ambas as culturas recombinantes maiores concentrações de proteínas extracelulares totais foram obtidas durante as primeiras 72 horas de indução no meio YPL e após 96 horas no meio $YNB_{lac+ext lev}$.

O fracionamento em condições desnaturantes das proteínas extracelulares totais do sobrenadantes das culturas recombinantes revelou uma banda de 15kDa ausente nas culturas controle. A atividade biológica da estreptavidina presente no sobrenadante das culturas recombinantes foi analisada pela interação com biotina. Ambas as linhagens de *K. lactis* MW 98.8C/cStp e CBS 2359/cStp obtidas neste trabalho foram capazes de expressar e secretar o *core* da proteína estreptavidina funcionalmente ativo.

Mais estudos são necessários para determinar as condições fisiológicas que maximizam o rendimento de proteína nos meios de indução principalmente no soro de queijo.

A estabilidade mitótica das linhagens recombinantes favorece sua aplicação em larga escala, uma vez que células recombinantes mitoticamente estáveis reduzem as dificuldades com a manutenção da pressão seletiva no meio.

O plasmídeo pKLAC1 contendo o cStp está apto para a expressão e secreção de proteínas e de enzimas de interesse biotecnológico destinadas à adsorção biosseletiva em colunas biotinizadas. Sugere-se a fusão de genes de enzimas hidrolíticas tais como lipases, para modificação funcional de óleos e gorduras; pectinases, para clarificação de sucos e vinhos; α -glucosidases, para a obtenção de xarope de milho ou celulasas úteis na obtenção de substratos fermentáveis de resíduos lignocelulolíticos para a indústria de biocombustível. Colunas biotinizadas contendo as enzimas imobilizadas podem ser incorporadas em uma linha de produção industrial.

6. REFERÊNCIAS

ARGARAÑA, C. E., KUNTZ, I. D. BIRKEN, S., AXEL, R., CANTOR, C. R. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. **Nucleic Acids Research**, 14: 1871-1882, 1986.

BARRAL, P., BATANERO, E., VILLALBA, M., RODRÍGUEZ, R. Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris*: Evidence of post-translational modifications. **Protein Expression and Purification**, 44: 147–154, 2005.

BHAT, P.J., MURTHY, T.V. Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose mediated signal transduction. **Molecular Microbiology**, 40:1059– 66, 2001.

BLONDEAU, K., BOUTUR, O., BOZE, H., JUNG, G., MOULIN, G., GALZY, P. Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1 beta production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the PHO5 promoter. **Applied Microbiology Biotechnology**, 41(3), 324 – 329, 1994.

BLONDEAU, K., BOZE, H., JUNG, G., MOULIN, G., GALZY, P. Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture; **Yeast**, 10(10), 1297 – 303, 1994.

BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*: biochemical characteristics and attempted genetical analysis. **Journal of General Microbiology**, 133:15 – 23, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding . **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BRANDÃO, S.C.C. Soro: um desafio para as fábricas de queijo. **Leite & Derivados**, v. 15, p. 13-18, 1994.

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

CHAIET, I., WOLF, F.J. The properties of streptavidin, biotin-binding protein produced by Streptomycetes. **Archives Biochemistry and Biophysics**, 106: 1-5, 1964.

CHEN, X.J. Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. **Gene**, 172: 131–136, 1996.

CHEN, X.J., GAO, B., SHI, W., LI, Y. Expression and secretion of human interferon alpha A in yeast *Kluyveromyces lactis*. **Yi Chuan Xue Bao**, 19: 284-288, 1992.

CHEN, X.J., SALIOLA, M., FALCONE, C., BIACHINI, M.M., FUKUHARA, H. Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces drosophilarum*. **Nucleic Acids Research**, 14: 4471-4481, 1986.

CHOI, D.B., PARK, E.Y. Enhanced production of mouse α -amilase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-bath culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry** – In press 2005.

CLARE, D.A., VALENTINE, V.W., CATIGNANI, G.L., SWAISGOOD, H.E. Molecular design, expression, and affinity immobilization of a trypsin-streptavidin fusion protein. **Enzyme and Microbial Technology**, 28: 483-491, 2001.

COLUSSI, P.A., TARON, C.H. *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in yeast. **Applied Environmental Biotechnology**, 71: 7092-7098, 2005.

COS, O., SERRANO, A., MONTESINOS, J.L., FERRER, CREEG, J.M., VALERO, F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *P. pastoris* fed-bath culture. **Journal of Biotechnology**, 116: 321-335, 2005.

CREGG, J.M., VEDVICK, T.S., RASCHKE, W.C. Recent advances in expression of foreign genes in *Pichia pastoris*- a review- **Biotechnology**, 11: 905-910, 1993.

DAMASCENO, L.M. Produção de estreptavidina em *Pichia pastoris* e sua imobilização em sílica biotinizada. **Dissertação. Viçosa, UFV**, 2001.

DAS, S., HOLLENBERG, C.P. A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Current Genetics**, 6: 123-128, 1982.

DRIEGEN, S., FERREIRA, R., VAN ZON, A., STROUBOULIS, J., JAEGLE, M., GROSVELD, F., PHILIPSEN, S., MEIJER, D. A generic tool for biotinylation of tagged proteins in transgenic mice. **Transgenic Research**. 14(4):477-82, 2005.

DUJON, B., SHERMAN, D., FISHER, G. Genome evolution in yeasts. **Nature** 430: 35-44, 2004.

EL-HAWARY, F.I., MEHANNA, A.S. Production of single cell protein from yeast grown in whey. **Acta Alimentaria**, v. 20, p. 205-213, 1991.

FALCONE, C., SALIOLA, M., CHEN, X.J., FRONTALI, L., FUKUHARA, H. Analysis of a 1.6-micron circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilum*: structure and molecular dimorphism. **Plasmid**, 15: 248-252, 1986.

FENG, Y.M., ZHANG, B.Y., ZHANG, Y.S., HIROSHI, F. Secretory expression of porcine insulin precursor in *Kluyveromyces lactis* and its conversion into human insulin. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao**, 29: 129-134, 1997.

FLEER, R., CHEN, X.J., AMELLAL, N., YEH, P., FOURNIER, A., GUINET, F., GAULT, N., FAUCHER, D., FOLLIARD, F., FUKUHARA, H., MAYAYAUX, J.F. High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 in *Kluyveromyces lactis*. **Gene**, 107:285–295, 1991a.

FLEER, R., YEH, P., AMELLAL, N., MAURY, I., FOURNIER, A., BACCHETTA, F., BADUEL, P., JUNG, G., L'HOTE, H., BECQUART, J., FUKUHARA, H., MAYAYAUX, J.F. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces lactis* yeasts. **Bio/Technology**, 9: 968–975, 1991b.

FLORES, M.V., CUELLAS, A., VOGET, C.E. The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, 15: 1437-1448, 1999.

FONSECA, M. C. Produção de estreptavidina recombinante pela levedura *Pichia pastoris*. **Dissertação, Viçosa, UFV**, 2006.

GALLIZIA, A., LALLA, C. D.E., NARDONE, E., SANTAMBROGIO, P., BRANDAZZA, A., SIDOLI, A., AROSIO, P. Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, 14: 192–196, 1998.

GHALY, A.E., KAMAL, M., CORREIA, L.R. Kinetic modeling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. **Bioresource Technology**, 96: 1143-1152, 2005.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54: 741–750, 2000.

GITLIN, G., BAYER, E.A., WILCHEK, M. Studies of the biotin-binding site of avidin. Lysine residues involved in the active site. **The Biochemical Journal**, 242: 923-926, 1987.

GREEN, N. M. Avidin and streptavidin. **Methods in Enzymology**, 184: 51-67, 1990.

HILL J., IAN, K.A., DONALD, G., GRIFFITHS, D.E. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. **Nucleic Acids Research**, Vol. 19 (20) 5791, 1991.

HOFMANN, K., WOOD, S.W., BRINTON, C.C., MONTIBELLER, J.A., FINN, F.M. Iminobiotin affinity columns and their applications to retrieval of streptavidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 77 (8) 4666-4668, 1980.

HSIEH H.P., DA SILVA, N.A. Development of a LAC4 promoter-based gratuitous induction system in *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Bioengineering**, 67:408–16, 2000.

HSIEH, H.P., DA SILVA, N.A. Partial-pKD1 plasmids provide enhanced structure stability for heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 49:411–416, 1998.

HUA, Z., LIANG, X., ZHU, D. Expression and purification of a truncated macrophage colony stimulating factor in *Kluyveromyces lactis*; **Biochemistry and Molecular Biology International**, 34: 419 – 27, 1994.

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. **Gene**, 96: 23 – 28, 1990.

IWATA, T., TANAKA, R., SUETSUGU, M., ISHIBASHI, M., TOKUNAGA, H., KIKUCHI, M., TOKUNAGA, M. Efficient secretion of human lysozyme from the yeast, *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters** 26: 1803–1808, 2004.

JANOLINO, V.G., SWISGGOOD, H.E. Analysis and optimization of methods using water-soluble carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass. **Biotechnology and Bioengineering**, 24: 1069-1080, 1982.

JARVIK, J.W., TELMER, C.A., Epitope tagging. **Annual Review of Genetics**, 32: 601– 618. 1998.

JESKE, S., TIGGEMANN, M., MEINHARDT, F. Yeast autonomous linear plasmid pGKL2: ORF9 is an actively transcribed essential gene with multiple transcription start points. **FEMS Microbiology Letters**. 255(2):321-7, 2006.

JURETZEK, T., LE DALL, M.T., MAUERSBERGER, R., GAILLARDIN, C., BARTH, G., NICAUD, J.M. Vectors of gene expressions and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, 18: 97–113, 2001.

KELLIS, M., BIRREN, B.W., LANDER, E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, 428:617–24, 2004.

KIM, C.S., JI, E.S., OH, D.K. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 25:1769–74, 2003.

KUMURA, H., TANOUE, Y., TSUKAHARA, M., TANAKA, T., SHIMAZAKA, K. Screening of dairy yeasts strains for probiotic application. **Journal of Dairy Science**, 87:4050-4056, 2004.

LU, J., HUANG, B., ESBERG, A., MARCUS, J.O.J., BYSTRÖM, A.S. The *Kluyveromyces lactis* g-toxin targets tRNA anticodons. **RNA**, 11:1648–1654, 2005.

MACÊDO, C.S. Expressão heteróloga de β -galactosidade de *Kluyveromyces lactis*: transformação estável de *Pichia pastoris* com o gene quimérico. **Dissertação. Viçosa, UFV**, 2001.

MARTINEZ. E., MORALES, J., AGUIAR, J., PINEDA, Y., IZQUIERDO, M., FERBEYRE, G. Cloning and expression of hepatitis B surface antigen in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, 14: 83–86, 1992.

MAULLU, C., LAMPIS, G., BASILE, T., INGIANNI, A., ROSSOLINI, G.M., POMPEI, R. Production of lysozyme-enriched biomass from cheese industry by-products. **Journal of Applied Microbiology**, 86 (2): 182-186, 1999.

MORESI, M. Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey. Italian **Journal of Food Science**, v. 6, p. 357-370, 1994.

MÜLLER, S., SANDAL, T., KAMP-HANSEN, P., DALBOGE, H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosacchomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, 14:1267– 1283, 1998.

NAGARAJAN, V., RAMALEY, R., ALBERTSON, H., CHEN, M. Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*, **Applied Environmental Microbiology**, 59: 3894–3898, 1993.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, 9: 255-262, 1988.

PANUWATSUK, W., DA SILVA, N.A. Evaluation of pKD1-based plasmid systems for heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58:195–201, 2002.

PANUWATSUK, W., DA SILVA, N.A. Application of a gratuitous induction system in *Kluyveromyces lactis* for the expression of intracellular and secreted proteins during fed-batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, 81:712– 8, 2003.

PENG, G., HOPPER, J. E. Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, 99: 8548–8553, 2002.

PILAURI, V., BEWLEY, M., DIEP, C., HOPPER, J. Gal80 dimerization and the GAL genes switch. **Genetics**, 169 (4): 1903-1914, 2005.

PIONTEK, M., HAGEDORN, J., HOLLENBERG, C.P., GELLISSEN, G., STRASSER, A.W. Two novel gene expression systems based on the yeasts

Schwanniomyces occidentalis and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50: 331-338, 1998.

PLATT, A., ROSS, H.C., HANKIN, S., REECE, R.J. Insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, 97:3154–9, 2000.

PORRO, D., MATTANOVICH, D. Recombinant protein production in yeasts. **Methods in Molecular Biology**, 267: 241–258, 2004.

RIVERO-URGELL, M., SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, 65 Suppl:S43–52, 2001.

ROBIN, S., PETROV, K., DINTINGER, T., KUJUMDZIEVA, A., TELLIER, C., DION, M. Comparison of three microbial hosts for expression of an active catalytic scFv. **Molecular Immunology**, 39: 729-738, 2003.

ROMANOS, M.A., SCORER, C.A., CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, 8: 423–488, 1992.

RÖSEL, H., KUNZE, G. Integrative transformation of the dimorphic yeast *Arxula adenivorans* LS3 based on hygromycin B resistance. **Current Genetics**, 33:157–163, 1998.

RUBIO-TEXEIRA, M.A. comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, 5 (12) 1115-28, 2005.

SALIOLA, M., MAZZONI, C., SOLIMANDO, N., CRISA, A., FALCONE, C., JUNG, G., FLEER, R. Use of the KIADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. **Applied Environmental Microbiology**, 65: 53-60, 1999.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory manual, second edition. **Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY**, 1989.

SANO, T., CANTOR, C.R. Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, 87: 142–146, 1990.

SANO, T., PADORI, M.W., CHEN, X., SMITH, C. L., CANTOR, C. R. Recombinant core streptavidin. A minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. **The Journal of Biological Chemistry**, 270(47): 28204-28209, 1995.

SANO, T., VAJDA, S., CANTOR, C., R. Genetic engineering of streptavidin, a versatile affinity tag. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, 715: 85-91, 1998.

SCHAFFRATH, R., BREUNIG, K.D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Fungal Genetics and Biology**, 30:173– 90, 2000.

SOLOMON, B., HOLLANSER, Z., KOPPEL, R., KATCHALSKI-KATZIR, E. Use of monoclonal antibodies for the preparation of highly active immobilized enzymes. **Methods in Enzymology**, 135: 160-170,1987.

SREEKRISHNA, K., DICKSON, R.C. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, 82:7909– 13, 1985.

STAYTON, P.S., FREITAG, S., KLUMB, L.A., CHILKOTI, A., CHU, V., PENZOTTI, J.E., TO, R., HYRE, D., LE TRONG, I., LYBRAND, T.P., STENKAMP, R.E. Streptavidin-biotin binding energetic; **Biomolecular Engineering**, 16(1-4):39-44, 1999.

SWENNEN, D., PAUL, M.F., VERNIS, L., BECKRICH, J.M., FOURNIER, A., GAILLARDIN, C. Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*. **Microbiology**, 148: 41-50, 2002.

SWINKELS, B.W., VAN OUYEN, A.J.J., BONEKAMP, F.J. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 64: 187–201, 1993.

SWAISGOOD, H.E., LEE, P. Cloning and expression of a streptavidin-lipase fusion gene in *Escherichia coli* and characterization of the immobilization fusion protein. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 246-254, 1998.

SWAISGOOD, H.E, WALSH, M.K. An *Escherichia coli* plasmid vector system for production of streptavidin fusion proteins: Expression and biospecific adsorption of streptavidin- β -galactosidase. **Biotechnology and Bioengineering**, 44: 1348-1354, 1994.

TUNTASUVAN, D., MIMAPAN, S., SARATAPHAN, N., TRONGWONGSA, L., INTRARAKSA, R., LUCKINS, A.G. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidin-biotin immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, 89: 337-338, 2000.

VAN DEN BERG, J., A., VAN DER LAKEN, K., J., VAN OOVEN, A., J., RENIERS, T., C., RIETVELD, K., SCHAAP, A., BRAKE, A., J., BISHOP, R., J., SCHULTZ, K., MOYER, D., RICHMAN, M., SHUSTER, J.R. *Kluyveromyces lactis* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. **Biotechnology**, 8: 138-139, 1990.

WANER, M. J., NAVROTSKAYA, I., BRAIN, A., OLDHAM, E.D., MASCOTTI, D.P. Thermal and sodium dodecylsulfate induced transitions of streptavidin. **Biophysical Journal**, 87: 2701-2713, 2004.

WEBER, P.C., OHLENDORF, D.H., WENDOLOSKI, J.J., SALEMME, F.R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. **Science Direct**, 243: 85-88, 1989.

WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M., BREUNIG, K.D., FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis*. In: Wolf K (ed) Genetics, biochemistry, and molecular biology of non-conventional yeasts. **Springer, Berlin Heidelberg New York**, 139–201, 1996.

WILLIAMS, M.G., WILSHER, J., NUGENT, P., MILLS, A., DHANARAJ, V., FABRY M., SEDLACEK, J., UUSITALO, J.M., PENTTILA, M.E., PITTS J.E., BLUNDELL T.L. Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin, **Protein Engineering**, 10: 991–997, 1997.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. Oxford University Press, 2nd edition, 2000.

WU, J., CHIENG, L., HSU, T., LEE, C. Sequential expression of recombinant proteins and their separate recovery from a *Pichia pastoris* cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, 16: 9-16, 2003.

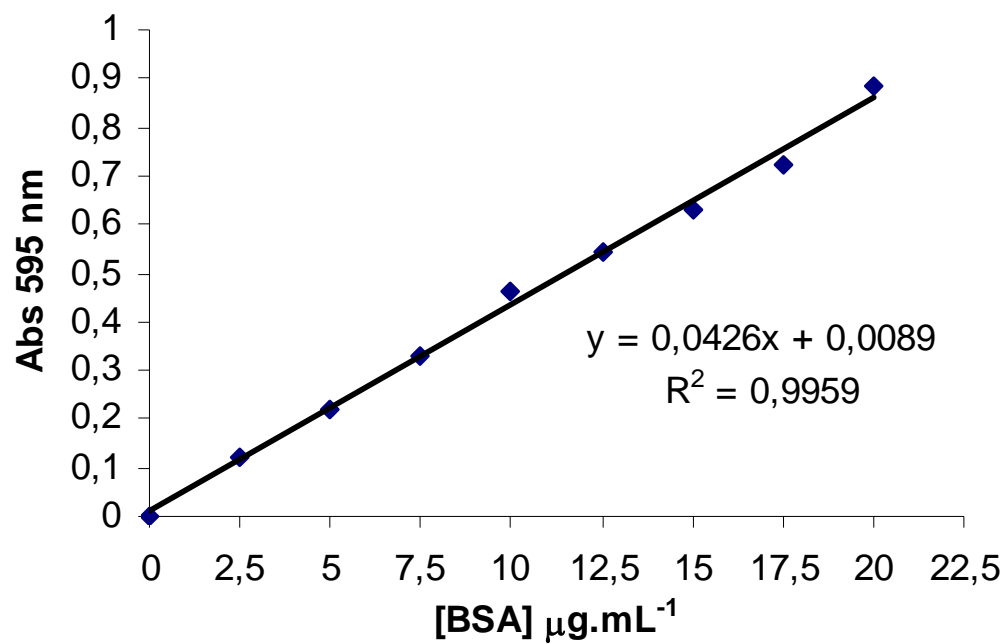
WU, S.C., QURESHI. M.H., WONG, S.J. Secretory production and purification of functional full-length streptavidin from *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**, 24: 348–356, 2002a.

WU, S.C., WONG, S.L. Engineering of a *Bacillus subtilis* strain with adjustable levels of intracellular biotin for secretory production of functional streptavidin, **Applied Environmental Microbiology**, 68: 1102–1108, 2002b.

YANG, S.T., SILVA, E.M. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **Journal of Dairy Science**. 78: 2541–62, 1995

APÊNDICE

APÊNDICE A



Apêndice A: Curva padrão de Albumina Bovina Sérica (BSA) utilizada como referência para o cálculo de proteínas totais pelo método de Bradford.

Apêndice B

Tempo (h)	Soro de Queijo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	YNB _{lac +ext lev} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	YPL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
0	0	0	0
24	23,33 \pm 3,57	67,88 \pm 10,48	101,00 \pm 7,17
48	38,29 \pm 11,5	76,49 \pm 10,98	178,20 \pm 8,97
72	44,93 \pm 11,99	99,44 \pm 17,59	140,38 \pm 15,40
96	42,07 \pm 15,05	150,81 \pm 5,64	117,69 \pm 15,42
120	75,89 \pm 9,31	192,54 \pm 10,81	173,76 \pm 4,41
144	51,95 \pm 17,26	195,93 \pm 5,96	103,35 \pm 2,06

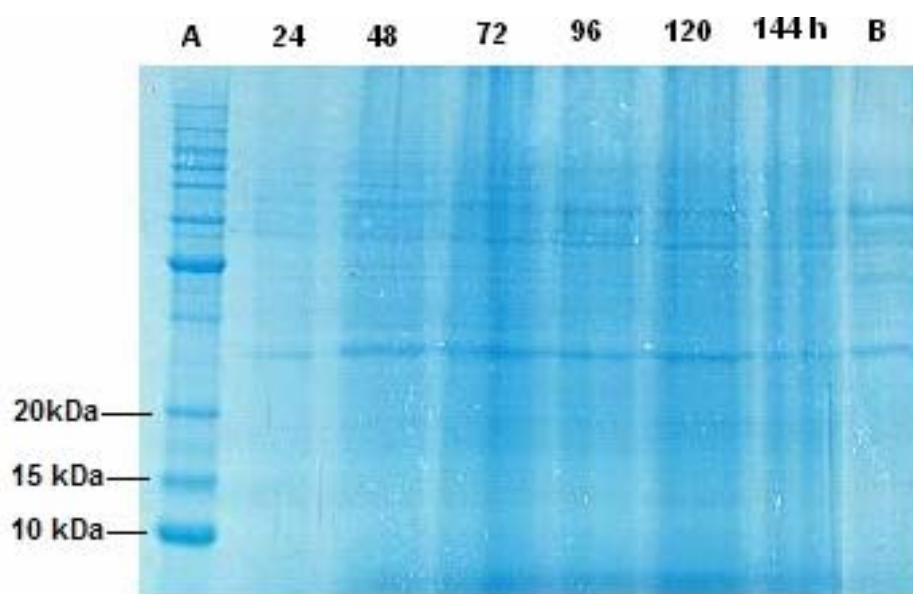
Apêndice B: Quantificação de proteínas totais secretadas presente no sobrenadante da cultura de *K. lactis* MW 98.8C cStp nos diferentes meios de cultivos em regime de batelada pelo método de Bradford.

APÊNDICE C

Tempo (h)	Soro de queijo ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	YNB _{lac+ext lev} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	YPL ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
0	0	0	0
24	40,25 \pm 11,37	15,98 \pm 7,85	131,78 \pm 6,62
48	38,43 \pm 5,01	54,32 \pm 7,72	152,90 \pm 10,39
72	58,20 \pm 5,31	90,31 \pm 12,14	178,72 \pm 3,86
96	40,51 \pm 5,11	179,24 \pm 16,01	137,78 \pm 4,96
120	56,12 \pm 14,07	166,72 \pm 6,67	96,31 \pm 17,66
144	69,65 \pm 9,88	127,08 \pm 1,65	117,96 \pm 15,22

Apêndice C: Quantificação de proteínas totais secretadas presente no sobrenadante da cultura de *K. lactis* CBS 2359 cStp nos diferentes meios de cultivos em regime de batelada, pelo método de Bradford.

APÊNDICE D



Apêndice D: Fracionamento das proteínas extracelulares totais em gel de poliacrilamida 15% (p/v) sob condições desnaturantes das amostras do sobrenadante da cultura recombinante de *K. lactis* CBS 2359/cStp em meio de soro de queijo. **A-** Marcador de massa molecular (Invitrogen); **B-** sobrenadante controle da cultura CBS 2359/pKLAC1.