



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Produção de quimosina bovina e de camelo
recombinante por *Pichia pastoris*.

Gisele Soares Anastácio

Brasília, DF

2014



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Produção de quimosina bovina e de camelo recombinante por *Pichia pastoris*.

Gisele Soares Anastácio

Orientadora: Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco

Coorientadora: Prof. Dra. Nádia Skorupa Parachin

*Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Microbiana da Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre.*

Brasília, DF

2014

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação da professora Dra. Janice Lisboa De Marco com apoio financeiro do Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco
Universidade de Brasília
Presidente da Banca

Prof. Dr. Alex Leite Pereira
Universidade de Brasília
Examinador interno

Prof. Dra. Viviane Castelo Branco Reis
Universidade de Brasília
Examinador externo

*...mas os que esperam no Senhor renovarão as forças;
subirão com asas como águias;
correrão e não se cansarão;
caminharão e não se fatigarão.*

Isaías 40: 31

Dedico esta conquista à Deus, meu tudo!

À minha família, pelo apoio e orações

Ao meu namorado que esteve sempre ao meu lado

Todas pessoas que me ajudaram...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela infinita graça que sempre me proporciona, dando-me forças e me protegendo em todos meus caminhos.

À minha família, quem mais acreditou neste sonho, me apoiando e sempre orando.
Aos conselhos inigualáveis e todo amor... Amo vcs!!

Ao meu namorado, que em bons e difíceis momentos sempre esteve ao meu lado com muito amor, me apoiando, orando e me dando forças, assim como sua família.

À minha amiga Ana Paula que faz parte da minha história particular e profissional, que nunca descreditou deste meu sonho, me apoiando com palavras de otimismo, com seu imenso carinho e boas risadas.

Ao grupo de pesquisa do laboratório da Biologia Molecular, que inicialmente me receberam, me dando a oportunidade de aprimorar minha experiência profissional.
Sou imensamente grata por todos seus ensinamentos. Obrigada pela confiança.

Professores: Dr. Fernando Araripe e Dra. Lídia Pepe.

À minhas orientadoras, que formaram uma dupla incomparável... Sinto-me honrada por vocês ter me orientado. Vocês foram profissionais que eu pude encontrar competência, ética, lealdade, e até mesmo palavras de carinho e forças nas horas de dificuldades.

Vocês proporcionaram que este período fosse muito importante em minha vida.

Sou muito agradecida por tudo!!

À todos da BioMol, especialmente aos colegas do Lab.2, pelos bons momentos:
Juliana, Cris, Maritza, Túlio, Luíza, Mirna, Bruno, Tiago, Marciano, Daniel, Carol e Danuza, incluindo à Amanda do lab. biofísica. Agradeço minha amiga Viviane Reis, pela imensa ajuda que me proporcionou com seu ensinamentos incomparáveis.

Aos que já não estão no lab, mais deixaram saudades: Carol, Osmar, Vinícius, Theyssa,
Zé Carlos, Alyson, Luane, Neumara e Fernanda.

À todos professores da BioMol que ajudaram com ensinamentos na minha formação,
em especial a Prof. Dra. Élide Campos

Aos amigos de Santa Catarina, incluindo da Unesc, que mesmo de longe estavam
torcendo por mim.

Aos amigos da igreja L2 de Brasília que me acompanharam com muito apoio...
Em especial: Ana Paula e Flávio, Rânia e Pedro Felipe, Vinícius e Iael, Flávia, Aline,
Juliana, Aldeneide e Fernandinha.

Aos funcionários da BioMol: Dona Ivonildes, Dona Fátima e Thompson pelo apoio
técnico. Muito grata. À Ivone pela ótima companhia de almoço. Vou sentir falta!

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de avaliar a minha defesa.

Aos membros do departamento de Biologia Microbiana pelo apoio técnico.

Ao Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni) pelo
apoio financeiro

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Lista de abreviaturas e símbolos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1 Introdução	1
Quimosina	1
<i>Pichia pastoris</i>	7
3 Objetivos	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
2 Estratégia	10
4 Materiais	11
4.1 Microrganismos	11
4.2 Vetores de expressão	11
4.3 Enzimas	11
4.4 Marcadores de Massa Molecular	12
4.5 Kits	12
4.6 Meios de cultura	12
4.7 Antibióticos	14
4.8 Soluções para células competentes bacteriana	14
4.9 Soluções para miniprep	14
4.10 Soluções para eletroforese em gel de agarose	15
4.11 Precipitação de digestões	15
4.12 Solução para quantificação de proteínas	15
4.13 Soluções para precipitação de proteínas	16
4.14 Análise de proteínas por eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE	16
4.15 Soluções e meios para os testes de caracterização enzimática	17
5 Métodos	19
5.1 Obtenção dos vetores de expressão constitutivos	19
5.1.1 Construção do vetor pPICKCHYM (chym bovina)	19
5.1.2 Obtenção do vetor pPGK Δ 3CHYM (chym de camelo)	19
5.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição	19
5.3 Análise eletroforética de DNA	19
5.4 Purificação e eluição de fragmentos de DNA	20
5.5 Ligação de fragmentos de DNA (vetor - inserto)	20
5.6 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico	20
5.7 Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	21
5.8 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)	21
5.9 Extração de DNA plasmidial em larga escala (maxprep)	22
5.10 Transformação de <i>P. pastoris</i> por eletroporação	22
5.11 Produção de quimosina recombinante bovina e de camelo	23
5.12 Determinação de atividade enzimática da quimosina	24
5.13 Quantificação de proteínas	24

5.14 Precipitação de Proteínas com Ácido Tricloro Acético (TCA)	24
5.15 Análise Proteica em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
5.16 Coloração com Coomassie Brilliant Blue Coloidal	25
5.17 Purificação enzimática	25
5.18 Caracterização enzimática	26
5.18.1 Determinação de pH ótimo	26
5.18.2 Determinação de temperatura ótima	26
5.18.3 Efeito de CaCl ₂ e outros íons	27
5.18.4 Ensaio de especificidade das quimosinas para α , β e κ caseínas	27
6 Resultados e Discussão	28
6.1 Obtenção dos vetores de expressão constitutivos	28
6.1.1 Construção do vetor de expressão pPICKCHYM (chym bovina)	28
6.1.2 Obtenção do vetor de expressão pPGK Δ 3CHYM (chym de camelo)	30
6.2 Produção de quimosina recombinante bovina e de camelo	31
6.3 Purificação das quimosinas bovina e de camelo	33
6.4 Caracterização enzimática	37
6.4.1 Efeito do pH	37
6.4.2 Efeito da temperatura	38
6.4.3 Efeito de CaCl ₂	39
6.4.4 Efeito de íons	40
6.4.5 Especificidade a substratos	41
7 Conclusões	43
8 Perspectivas	44
9 Referências Bibliográficas	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura primária da pré-pró-quimosina	3
Figura 2. Estruturas da quimosina bovina e de camelo	4
Figura 3. Estratégia	10
Figura 4. Mapa físico do vetor pPICK α PRO	29
Figura 5. Mapa físico do vetor pPICKCHYM	29
Figura 6. Análise de restrição do vetor pPICKCHYM	29
Figura 7. Mapa físico do vetor pPGK Δ 3PRO	30
Figura 8. Mapa físico do vetor pPGK Δ 3PROCHYM	30
Figura 9. Análise de restrição do vetor pPGK Δ 3CHYM	30
Figura 10. Curva de crescimento celular de <i>P. pastoris</i>	31
Figura 11. Atividade enzimática de quimosina em sobrenadante	32
Figura 12. Perfil cromatográfico e atividade enzimática da purificação	34
Figura 13. Gel SDS-PAGE para análise da purificação das quimosinas	36
Figura 14. Caracterização enzimática – efeito do pH	38
Figura 15. Caracterização enzimática – efeito da temperatura	39
Figura 16. Caracterização enzimática – efeito de Ca ⁺²	40
Figura 17. Teste de especificidade das quimosinas à substratos	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das etapas da purificação enzimática de quimosina bovina e camelo produzidas por <i>P. pastoris</i>	37
Tabela 2. Análise do efeito de diferentes íons na atividade enzimática de quimosina bovina e de camelo	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å	Ångström
cm	Centímetro
Da	Dalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
g	grama
<i>g</i>	força gravitacional
h	hora
kb	quilobase
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	Mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
OD ₆₀₀	densidade celular óptica medida a 600 nm
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso por volume
RNase A	ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
s	Segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
U	Unidade
v	Volume
V	Volts

v/v	volume por volume
°C	graus Celsius
μF	microfarad
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
Ω	ohm

RESUMO

Quimosina, é uma aspartil protease utilizada como coagulante do leite na indústria de fabricação de queijo. Tradicionalmente, a quimosina é extraída a partir do abomaso de bezerro lactantes. Com o aumento da demanda desta enzima, as fábricas de queijos foram buscar outras fontes alternativas de baixo custo, entre elas a quimosina recombinante que surgiu como uma opção promissora. Neste trabalho, os cDNA de quimosina bovina e de camelo foram clonados em vetores de *Pichia pastoris* para a expressão constitutiva de elevado nível, sob o controle do promotor endógeno P_{PGK1} . Os vetores foram integrados no genoma da levedura para expressão estável. Após crescimento, os sobrenadantes foram recolhidos e ambas as proteínas recombinantes foram purificadas num único passo de cromatografia com uma coluna de exclusão molecular (Sephacryl S-100) antes de caracterização enzimática. As quimosinas recombinantes apresentaram uma massa molecular entre 35 e 45 kDa. Quimosina bovina purificada exibiu uma atividade enzimática de cinco vezes superior a quimosina de camelo nas mesmas condições padrão. Ambas quimosinas apresentaram um pH ótimo de aproximadamente 4,0 e a temperatura ótima entre 55 e 60 °C. O efeito dos íons sobre a atividade das proteínas também foi estudado: maior atividade com Ca^{+2} foi observado entre 40-140 mM e o íon Mg^{+2} favoreceu um aumento da atividade enzimática de ~100% (bovina) e 66% (camelo), quando comparado com o íon Ca^{+2} . Testes de especificidade de substrato revelaram que ambas as enzimas mostraram uma maior afinidade para k-caseína do que para α e β -caseína. Juntos, os resultados apresentados neste trabalho mostram que a quimosina bovina produzida por *P. pastoris* é uma fonte recombinante mais atraente do que a quimosina camelo para a fabricação de queijo.

ABSTRACT

Chymosin is an aspartic protease used as a milk coagulant in the cheese making industry. Traditionally, chymosin is extracted from the abomasum of suckling calves. With the increasing demand for this enzyme, cheese manufacturers seek other low cost alternative sources, among them recombinant chymosin has emerged as a promising option. In this work, bovine and camel chymosin cDNAs were cloned into a *Pichia pastoris* vectors for high level constitutive expression under the control of endogenous P_{PGK1} promoter. The vectors were integrated into the *P. pastoris* genome for stable expression. After growth, supernatants were collected and both recombinant proteins were purified in a single chromatographic step with an exclusion molecular column (Sephacryl S-100) prior to enzyme characterization. Recombinant chymosins showed a molecular mass between 35 kDa and 45 kDa. Purified bovine chymosin showed an enzymatic activity five times higher than camel chymosin under the same standard conditions. Both chymosins showed optimum pH around 4.0 and optimum temperature between 55 and 60°C. The effect of ions on protein activity was also studied: highest activity with Ca^{2+} was observed between 40-140 mM and Mg^{2+} favored an increase of enzyme activity of ~ 100% (bovine) and 66% (camel) when compared to Ca^{2+} . Substrate specificity tests revealed that both enzymes showed a higher affinity for k-casein over the α and β -casein counterparts. Together, the results presented in this work show that bovine chymosin produced in *P. pastoris* is a more attractive recombinant source than camel chymosin for cheese manufacturing.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Quimosina

A quimosina (renina; EC 3.4.23.4) é uma aspartil protease gástrica extraída do abomaso de bezerros lactentes, de importância comercial na indústria de fabricação de queijos (LANGHOLM JENSEN *et al.*, 2013; CHITPINITYOL *et al.*, 1998; MOHANTY *et al.*, 1999). O papel desta enzima na digestão do animal é o de coagular o leite ingerido, produzindo uma massa pastosa, aumentando o tempo de permanência do leite no animal, podendo ser degradadas pela ação de outras enzimas proteolíticas (FOX *et al.*, 1997). O coalho de bezerro é constituído de 85-95% de quimosina e de 5-15% de pepsina (USTUNOL *et al.*, 1990).

Segundo a ABIQ (associação brasileira das indústrias de queijo), o consumo de queijos no Brasil tem aumentado significativamente. Atualmente o consumo foi calculado para 5 Kg de queijo por habitante/ano correspondendo a 1 milhão de toneladas para 200 milhões de habitantes do Brasil. Segundo o instituto, aproximadamente 1/3 da produção total de leite produzida no Brasil é destinado a fabricação de queijos. Os queijos encontrados no Brasil são de leite de vaca (com maior diversidade e consumo), queijos de leite de búfalo e de cabra, que estão aos poucos ganhando espaço.

O leite utilizado na fabricação de queijos em geral é pasteurizado (eleva-se à temperatura de 70 a 80° C, durante 15 a 20 segundos) com o objetivo de eliminar a presença de micro-organismos (ABIQ, 2014). O leite pode ser tratado quimicamente por adição de peróxido de hidrogênio para apenas reduzir os níveis bacterianos, sendo o H₂O₂ removido pela adição de catalase de fígado ou de *Micrococcus lysodeikticus*. Este procedimento é aplicado para determinados queijos, e possui vantagens como a não eliminação de bactérias produtoras de ácido láctico, não inativando lipases e outras enzimas do leite. A adição de lisozima é outra alternativa (BON *et al.*, 2008a).

Na fabricação de queijos no Brasil, a primeira etapa ocorre pela coagulação das proteínas do leite e subsequente precipitação com cálcio. São utilizados coalhos (peptidase ácida) para a coagulação do leite. Estas preparações enzimáticas são obtidas a partir do abomasso de bezerros lactentes, ovelhas ou cabras desmamados ou a partir de micro-organismos. O principal agente proteolítico encontrado nestes coalhos é a

quimosina também chamada de renina. Dependendo do tipo de queijo, são acrescentados além do coalho, fermento ou ácido láctico, para possibilitar a coagulação do leite (ABIQ, 2014).

Dependendo de cada tipo de queijo, ocorrem diferentes processos de agitação e aquecimento da massa, que é então enformada em determinados moldes para seu formato final. Depois de enformados, os queijos são prensados para expulsar o excedente de soro e imersos em banho de salmoura antisséptica, responsável pelo teor de sal e pela formação de cascas que os protegem. No processo de maturação, os queijos passam por processos de secagem em câmaras frias, e posteriormente direcionados a câmara de maturação, permanecendo em temperatura e teor de umidade adequadas até o ponto ideal de cada qualidade de queijo. A maturação é muito importante na definição da aparência, da textura e do sabor do queijo (ABIQ, 2014). Como é um processo lento, existe o interesse em acelerar o processo com adição de enzimas exógenas, como lipases e peptidases, incluindo a utilização de micro-organismos como *Streptococcus spp.*, em conjunto com *Lactobacillus sp.*, dependendo do tipo de queijo (BON *et al.*, 2008a).

A maioria dos queijos duros são maturados por ação de bactérias internas, entretanto, nos queijos de variedades macias, emprega-se o crescimento de bactérias, fungos e leveduras na superfície do queijo. As culturas de micro-organismos usados na indústria que contribuem para as características físicas e sabores dos queijos, porque diversas enzimas são excretadas (BON *et al.*, 2008a).

A quimosina possui um desempenho diferente quando comparada com outras proteínas aspárticas gástricas. Esta enzima apresenta uma baixa atividade proteolítica, em contraste com outras proteases aspárticas (por exemplo, pepsina), que exibem especificidade ampla e digerem facilmente todas as proteínas no lúmen gástrico (GUSTCHINA *et al.*, 1996).

A quimosina é secretada como um precursor inativo, a pré-pró-quimosina, consistindo em uma simples cadeia de peptídeos de 365 resíduos de aminoácidos (Figura 1). Para a secreção da quimosina através das membranas celulares se faz necessário uma sequência sinal líder de 16 aminoácidos hidrofóbicos. Esta sequência sinal será removida durante a via de secreção e, no estômago, a enzima se apresentará na forma inativa denominada pró-quimosina com uma massa molecular de 40777 Da. Em condições

ácidas no estômago (pH <5) este precursor é então processado para quimosina ativa, com a remoção destes 42 aminoácidos a partir da sua extremidade amino-terminal da cadeia peptídica (BARKHOLT PEDERSEN *et al.*, 1979; FOLTMANN *et al.*, 1977). A quimosina que sofreu ativação autocatalítica é uma proteína com massa molecular de 35600 Da, contendo 323 aminoácidos (GILLILAND *et al.*, 1990; NEWMAN *et al.*, 1991).

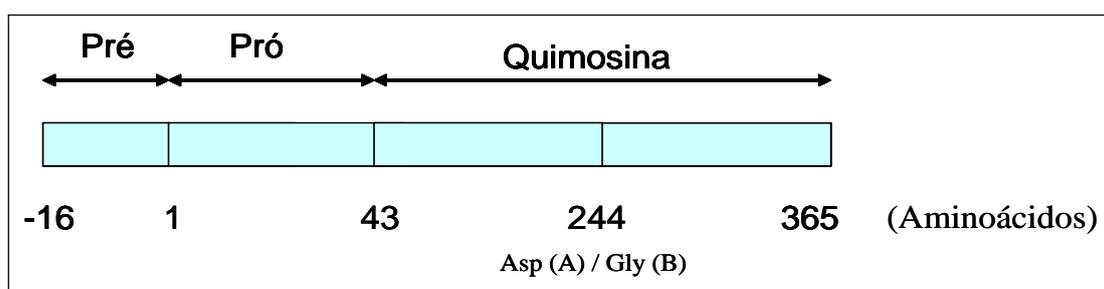


Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da pré-pró-quimosina. Fonte: (ARAÚJO, 2008).

Quanto a sua estrutura secundária (Figura 2) a quimosina é constituída principalmente por folhas β -pregueadas e poucos segmentos de α -hélice (MOHANTY *et al.*, 1999). Em sua estrutura terciária a enzima adota uma forma bilobular, que consiste nos domínios C-terminal e N-terminal, dividido por um profundo sulco onde está localizado o sítio ativo com a capacidade de agir na ligação peptídica Phe105-Met106 presente nas moléculas da k-caseína do leite, para formar *para*-k-caseína insolúveis, que finalmente leva à coagulação do leite (VALLEJO *et al.*, 2008). As quimosinas exibem especificidade de hidrólise idênticas, removendo o C-terminal hidrófilo e predominantemente carregado negativamente, que faz parte da camada externa das micelas de k-caseína (FOX *et al.*, 1998; MOLLER *et al.*, 2012).

Um estudo mais detalhado da estrutura da quimosina bovina e de camelo relata que as duas enzimas possuem dobramentos semelhantes, exceto que a quimosina bovina possui uma cadeia adicional na parte N-terminal, o que proporciona uma maior flexibilidade para quimosina de camelo. Ambas as enzimas possuem regiões na superfície carregadas positivamente, e a quimosina de camelo possui duas regiões adicionais, podendo favorecer a interação com o substrato. A quimosina de camelo possui maior termoestabilidade, entretanto, quando possui glicosilação no resíduo Asn291, perto do sitio ativo sua atividade enzimática pode reduzir significativamente (LANGHOLM JENSEN *et al.*, 2013).

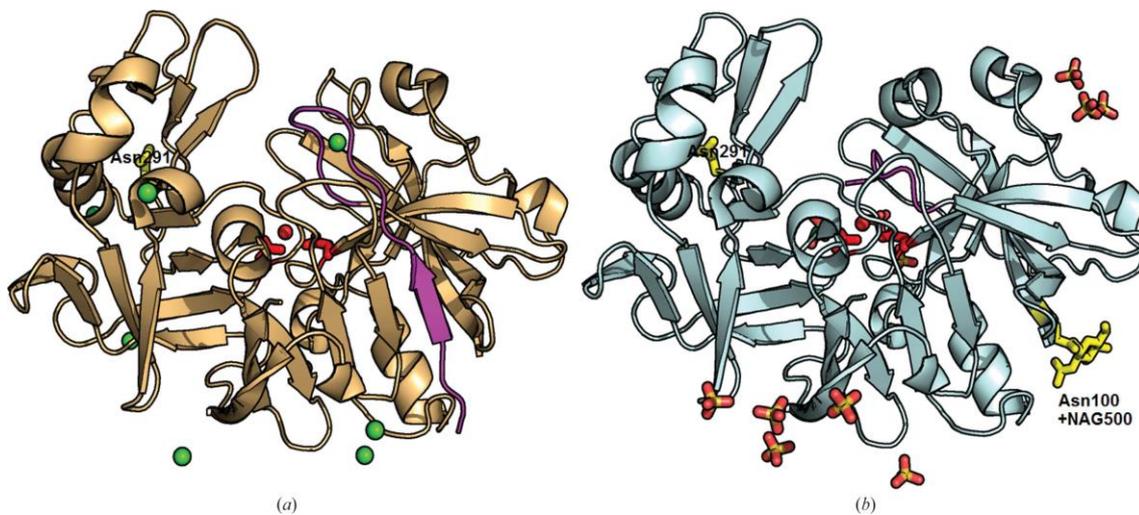


Figura 2. Estruturas da quimosina bovina (a) e de camelo (b). A estrutura de uma variante duplamente glicosilada para (b) foi determinada a uma resolução de 1,6 Å e para (a) não glicosilada em uma resolução ligeiramente mais elevada (1,8 Å). Os resíduos do sítio ativo são mostrados em vermelho e o resíduo N-terminal adicional está mostrado em magenta. Os locais de glicosilação verificados experimentalmente estão em amarelo e os íons cloreto em verdes. Fonte: (LANGHOLM JENSEN *et al.*, 2013).

O leite bovino possui dois grupos marcadamente diferentes de proteínas, as paracaseínas e as proteínas do soro de leite (não-caseínas). A caseína representa cerca de 83% do nitrogênio total do leite bovino. É constituída por quatro principais proteínas: alfa (α -S1 e α -S2), beta (β) e kapa (k), na proporção de 40:10:35:12, respectivamente. Todas as caseínas são fosforiladas. Por causa do alto teor de fosfato, α -S1, α -S2 e β -caseína ligam-se fortemente ao Ca^{+2} e precipitam, porém a k-caseína, que possui apenas um resíduo fosfato, não se liga fortemente ao Ca^{+2} sendo solúvel em altas concentrações de Ca^{+2} . Este íon também reage com α -S1 e α -S2, e β -caseína podendo estabilizar a formação de agregados coloidais densos. A k-caseína tem a capacidade de formar pequenos agregados em solução aquosa, por associação das partes hidrofóbicas das moléculas, formando micelas. No leite, mais de 95% das caseínas existe naturalmente como grandes partículas coloidais ou micelas (FOX, 1988; MOHANTY *et al.*, 1999; FARRELL *et al.*, 1996).

O processo de coagulação ocorre em duas etapas. Primeiramente ocorre clivagem da ligação peptídica Phe105-Met106 da k-caseína pela quimosina, gerando dois macropeptídeos, a *para*-kappa-caseína (pk-CN), com N-terminal hidrofóbico e outro chamado de porção caseinomacropeptideo (CMP) com C-terminal hidrofílico. Esta

região C-terminal se projeta para a parte externa, proporcionando estabilização eletrostática, auxiliando na suspensão da proteína. Na segunda fase, ocorre a coagulação, que é o processo de agregação (gelificação) de pk-CN através do íon Ca^{2+} , com a formação de uma rede tridimensional de gel, em temperaturas superiores a 20 °C (FOX, 1988; CARLSON *et al.*, 1987; TUINIER *et al.*, 2002; MELLEMA *et al.*, 2002).

Tradicionalmente a quimosina bovina utilizada como coagulante (coalho) é obtida a partir do abomaso de bezerros lactentes (YOUSIF *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 2010). Diversos micro-organismos foram identificados como produtores de quimosinas, tais como *Mucor pusillus*, *M. meihei*, *Entothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactis* (BEPPU, 1983; BELDARRAIN *et al.*, 2000; SARDINAS, 1968; AIKAWA *et al.*, 1990). Os micro-organismos *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *Myxococcus xanthus* também foram relatados como produtores de enzimas coagulantes, no entanto os níveis de enzimas para coagulação específicas obtidas através destes micro-organismos são baixos, resultando em baixos rendimentos e proporcionando em queijos com sabor amargo (JIANG *et al.*, 2012). Coagulantes derivados de plantas também são relatados, como *Moringa oleifera*, *Cynara scolymus*, *Ficus carica* e *Solanum dobium* (PONTUAL *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2012; YOUSIF *et al.*, 1996).

A FAO (*Food and Agriculture Organization*) previu uma severa queda no uso da quimosina de bezerro nos anos 1960. Foi relatado que a alta demanda de carne poderia fazer necessário o abatimento de bezerros de idade mais avançada, e como consequência, poderia ocorrer redução na produção de quimosina, já que quanto mais jovem o animal, mais enzima é secretada (ARAÚJO, 2008). Alguns motivos como custo elevado do sacrifício de bezerros para obtenção do coalho, desaprovação do abate destes bezerros por alguns grupos religiosos e a alta demanda da carne, induziu aos fabricantes de queijos procurarem alternativas de menor custo, e que garantissem a qualidade dos queijos (CHITPINITYOL *et al.*, 1998; USTUNOL *et al.*, 1990).

A demanda de estômagos de bezerro para extração do coalho por quimosina animal, que dá um sabor característico ao queijo nativo, aumentou significativamente. A quimosina recombinante surge como alternativa, pois pode substituir completamente a enzima de origem animal, tendo sido utilizada para produzir uma variedade de queijos com qualidade comparáveis aos feitos com coalho de vitelo (MOHANTY *et al.*, 1999).

O gene da quimosina foi clonado com sucesso e expressado utilizando uma série de vetores em diversos organismos hospedeiros. Em procariotos, *Escherichia coli* foi o primeiro a ser utilizado para expressão de quimosina. *Bacillus subtilis*, *Bacillus lactis* e *Proteus mirabilis* também foram relatados (CHITPINITYOL *et al.*, 1998; MOHANTY *et al.*, 1999). Eucariotos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus* spp., *Yarrowia lipolytica*, *Trichoderma reesei* e *Pichia pastoris* também são descritos na literatura como micro-organismos utilizados para expressar (MOHANTY *et al.*, 1999; CHITPINITYOL *et al.*, 1998; UUSITALO *et al.*, 1991; RAMEZANI *et al.*, 2013, VALLEJO *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2012).

A quimosina recombinante expressa em bactérias ocorre em corpos de inclusão intracelulares, que para recuperação da enzimas devem passar por um processo de tratamento com uréia, e posterior diálise (MOHANTY *et al.*, 1999). Este procedimento pode aumentar o custo, apresentando desvantagem em comparação a outros micro-organismos, como *Pichia pastoris*, que possui capacidade de secretar proteínas heterólogas (CREGG *et al.*, 2000).

A quimosina bovina constitui um ingrediente tradicional enzimático para a coagulação do leite, proporcionando uma alta atividade de coagulação e baixa atividade proteolítica (KAPPELER *et al.*, 2006; MOLLER *et al.*, 2012). Quimosina bovina recombinante é mais utilizada na indústria. Atualmente, novas fontes de quimosina recombinante como a cabra, camelo, ou búfala, já estão disponíveis (VALLEJO *et al.*, 2012).

A quimosina de camelo foi expressa em *Aspergillus* por fermentação e apresentou uma taxa de coagulação 70% superior a quimosina bovina (KAPPELER *et al.*, 2006). Um estudo comparando queijos cheddar obtidos pela quimosina bovina e de camelo mostrou que os queijos obtidos a partir da quimosina de camelo apresentaram um bom sabor, assim como para a quimosina bovina, entretanto níveis mais baixos de proteólise primária foram detectados para quimosina de camelo. A quimosina bovina proporcionou uma textura mais suave, coesa e adesiva em comparação à quimosina de camelo (BANSAL *et al.*, 2009).

1.2 *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris*, atualmente reclassificada como *Komagataella pastoris* é amplamente utilizada para a expressão de proteínas heterólogas demonstrando sucesso em fermentação de larga escala. A levedura *Pichia pastoris* possui características vantajosas, tais como: expressão extracelular, fácil manipulação genética, forte preferência para crescimento aeróbico promovendo altas densidades celulares e ainda faz modificações pós-traducionais, como processamento proteolítico, dobramentos, formação de pontes dissulfeto, metilação e glicosilação (CREGG *et al.*, 2000). Além disso, *P. pastoris* possui o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) reconhecido pela FDA (American Food and Drug Administration) (JIANG *et al.*, 2012).

Para expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* é essencial a escolha de combinações de promotores/terminadores, marcas de seleção adequadas e vetores para expressão intracelular ou extracelular, incluindo a seleção de sequência de sinais para a secreção apropriada da proteína heteróloga (AHMAD *et al.*, 2014).

Na expressão extracelular por *P. pastoris*, as proteínas da via de secreção são dirigidas por uma pequena sequência hidrofóbica chamada de peptídeo sinal, presente na extremidade N-terminal das proteínas. Na ausência do peptídeo sinal, a expressão é intracelular, não ocorrendo glicosilação. A maioria das proteínas secretadas por *P. pastoris* são glicosiladas no complexo de Golgi, com adição de pequenas cadeias de carboidratos, semelhantes a mamíferos. Esta é uma vantagem desta levedura, pois pode ser utilizada para produção de algumas proteínas terapêuticas humanas, como biofármacos (BON *et al.*, 2008b).

Em uma revisão (RABERT *et al.*, 2013), foram descritas diversas proteínas recombinantes produzidas por *P. pastoris*. Dentre as enzimas relatadas estão as enzimas líticas tais como celulases, xilanases, proteases, lipases, amilases, fosfatases e peptinases amplamente utilizado na pasta de papel, nas indústrias têxtil, de detergentes, alimentos, bebidas e indústrias farmacêuticas. Outras também foram mencionadas: enzimas fitase, proteínas da gelatina e não gelificante, lacases e proteínas anticongelantes. Os resultados mostram um aumento significativo na atividade específica das enzimas produzidas em comparação com organismos como *E. coli*, *S. cerevisiae* e *H. polimorpha*. Este aspecto tem uma vantagem altamente relevante em relação ao rendimento de produto na produção industrial.

Diversos promotores estão disponíveis atualmente para expressão em *Pichia pastoris*. Os promotores induzíveis são: AOX1, DAS, FLD1, ICL1, PHO89, THI11, ADH1, ENO1 e GUT1. Os promotores constitutivos são: GAP, TEF1, GCW14, G1, G6 e PGK1 (AHMAD *et al.*, 2014).

No laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), o promotor do gene *PGK1* de *P. pastoris* foi isolado por Almeida e colaboradores em 2005, sendo relatado que este forte promotor constitutivo proporcionou elevada expressão quando utilizado para dirigir a expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis* em três distintas fontes de carbono (glicose, seguido de glicerol e metanol). Novos vetores de expressão estão sendo desenvolvidos baseados nesse sistema (ARRUDA, 2008). Este promotor foi selecionado para este trabalho para expressão constitutiva de quimosina bovina e de camelo por *Pichia pastoris*. As vantagens de utilizar este sistema de expressão constitutiva é que não necessita o uso de indutores para expressão no meio no meio de cultura, ocorrendo transcrição contínua do gene de interesse (BOM *et al.*, 2008b; AHMAD *et al.*, 2014).

2 – OBJETIVOS

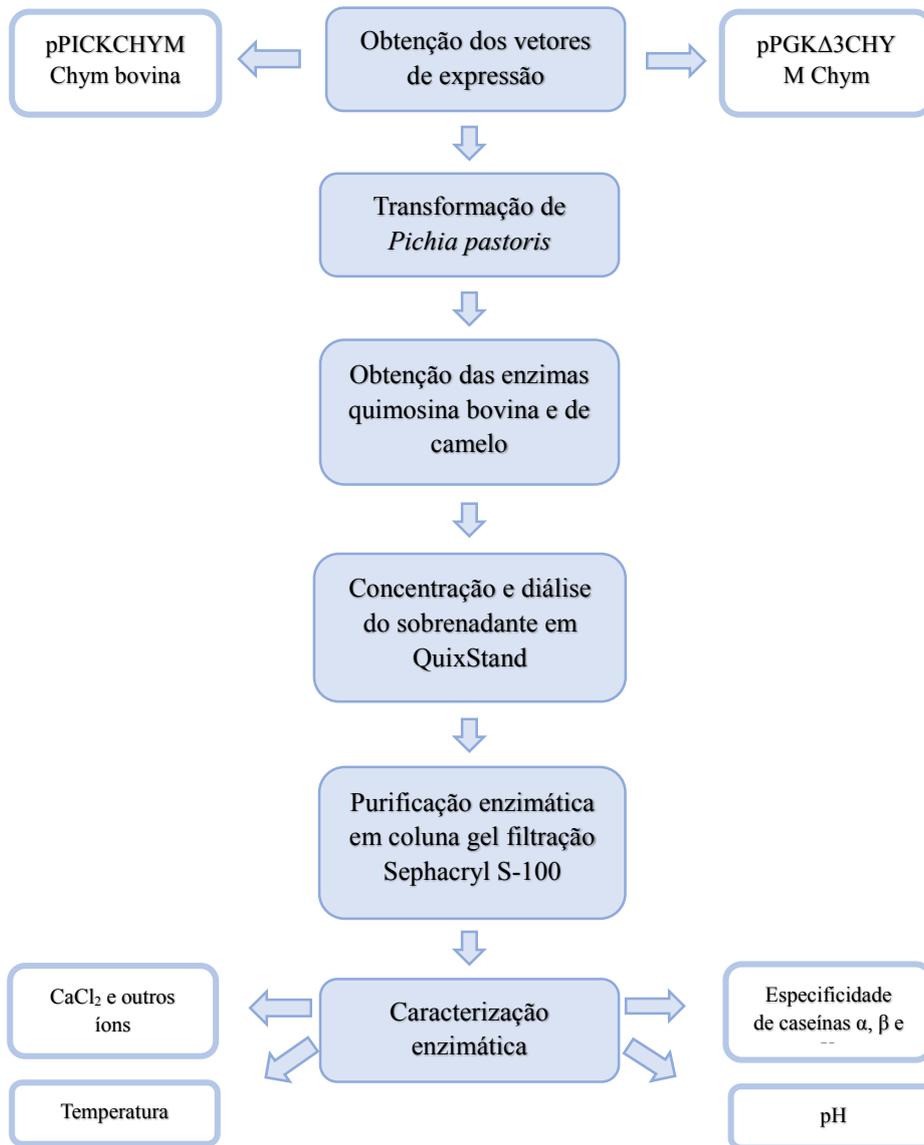
2.1 Objetivo geral

- Comparar as quimosinas bovina e de camelo recombinantes produzidas por *Pichia pastoris* através de expressão constitutiva.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os vetores contendo os genes da quimosina bovina e de camelo sob o controle do promotor constitutivo P_{PGK1}.
- Produzir as quimosinas bovina e de camelo recombinantes através de expressão constitutiva em *P. pastoris*.
- Purificar ambas as quimosinas recombinantes.
- Caracterizar bioquimicamente as quimosinas recombinantes.

3 - ESTRATÉGIA



4 - MATERIAIS

4.1 Micro-organismos

Bactéria

- *Escherichia coli* - linhagem XL10-Gold (Stratagene) *Tet^RΔ (mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy^R Cam^R]*.

Levedura

- *Pichia pastoris* - linhagem X33 (Invitrogen EUA): *his4::HIS4*.

4.2 Vetores de expressão

- **pPICKαPRO** – Foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia de Leveduras da UnB por Batista (2012), originado a partir do vetor de expressão comercial pPICZαA (Invitrogen®). Este vetor foi utilizado para clonagem do gene da quimosina bovina - CHYMb (*Bos taurus*). Possui o promotor constitutivo P_{PGK1}, seguido de uma sequência de secreção do fator α T12 (com códons otimizados para *P. pastoris*), e a marca dominante *kan^R* (resistência a kanamicina/G418) como marca de seleção para bactérias e leveduras, respectivamente.
- **pPGKΔ3PRO** – Este vetor também foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia de Leveduras da UnB por Arruda (2008). Foi utilizado para clonagem do gene da quimosina de camelo (*Camelus dromedarius*). Possui o promotor constitutivo P_{PGK1}, fator α T12 e marca de resistência zeocina para bactéria e levedura.

4.3 Enzimas

- **Enzimas de restrição** - Foram utilizadas as enzimas de restrição *Xho* I, *Not* I, *Sac* I, *Bgl* II, *Hind* III e *Bam*H I (New England Biolabs), seguindo o protocolo de uso do fabricante.
- **Enzima T4 DNA ligase** (New England Biolabs)
- **Hannilase®** (Chr. Hansen) – quimosina recombinante produzida pelo fungo *Aspergillus niger var awamori* sendo comercializada pela empresa Chr. Hansen.

Esta enzima foi utilizada como controle positivo no teste de especificidade de α , β e κ caseínas.

- **RNase A**

RNase A (DNase free) - (Sigma) 10 mg/mL

Acetato de sódio pH 4,8 50 mM

Aquecido a 100 °C por 10 minutos

4.4 Marcadores de Massa Molecular

- **Marcadores de DNA**

- 1 Kb *Ladder* (promega);
- DNA de fago λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III (λ *Eco/Hind*) (Invitrogen).
- DNA de fago λ digerido com *Hind* III (λ *Hind*) (Invitrogen).
- 2 log DNA Ladder (Uniscience)

- **Marcadores de Massa Molecular para proteínas**

- Marcador molecular de proteínas (Thermo scientific). Padrões de massa molecular: beta-galactosidase (116 kDa), soro albumina bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), beta-lactoglobulina (18,4 kDa), lisozima (14,4 kDa).

4.5 Kits

- **Qiagen plasmid Max kit** (Qiagen) –purificação de plasmídeos em larga escala.
- **QIAquick Gel Extraction Kit** (QIAGEN) - purificação de fragmentos de DNA extraídos de gel de agarose.
- **QIAquick PCR purification** (QIAGEN) - purificação de produtos de PCR.

4.6 Meios de cultura

Os meios e soluções foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120 °C. Soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração utilizando-se membranas de 0,2 μ m de diâmetro. Quando necessário foram adicionados os devidos antibióticos nas seguintes concentrações: zeocina: 25 μ g/mL para *E. coli* e 100 μ g/mL para *P. pastoris*, kanamicina: 50 μ g /mL para *E. coli* e G418: 0,5

mg/mL para *P. pastoris*. As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia a qual foram empregadas.

Meio de cultivo para bactéria

- **LB** (Luria-Bertani)

Extrato de levedura	0,5 %
Peptona de caseína	1 %
NaCl	1 %

pH 7,2. Ao meio de cultura sólido foram adicionados 1,5% de ágar bacteriológico.

Meio de cultivo para leveduras

- **BMGY**

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Tampão fosfato de potássio pH 6,0	100 mM
*YNB	1 x
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (v/v)
#Glicerol	2 e 4 % (v/v)

*Solução YNB 10X (sem aminoácidos) - Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids (Difco) 3,4% (p/v) e 10% de sulfato de amônio (p/v). Esterilização por filtração em membrana Millipore (0,2 µm).

#2% de glicerol para o crescimento dos pré inóculos e 4% para obtenção das enzimas.

- **YPD**

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)

Ao meio sólido foram adicionados 2% (p/v) de ágar bacteriológico.

- **YPG**

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
*Glicerol bruto	1 e 2 % (p/v)

**Screening*: 1 % e curva de crescimento: 2 %.

- **YPDS**

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Sorbitol	1 M

4.7 Antibióticos

- **Kanamicina** (50 µg/mL para *E.coli*)

Solução estoque Kanamicina (Sigma Aldrich) - 30 mg/mL dissolvida em água Milli-Q.
Esterilizada por filtração.

- **G418** (0,5 mg/mL para *P.pastoris*)

Solução estoque G418 (Sigma Aldrich) - 50 mg/mL dissolvido em água Milli-Q.
Esterilizada por filtração.

- **Zeocina** (25 µg/mL para *E.coli* e 100 µg/mL para *P. pastoris*)

Solução estoque zeocina (Invitrogen) - 100 mg/mL. É obtida comercialmente em solução.

4.8 Soluções para células competentes bacteriana

*CaCl ₂	100 mM
#Glicerol	50 % (v/v)

Esterilização por *filtração e #autoclavação.

4.9 Soluções para miniprep

- **Solução I**

Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM

- **Solução II**

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (p/v)

Solução preparada no momento do uso.

- **Solução III**

Acetato de potássio	3 M
Ácido acético	2 M

pH ajustado para 5,0.

4.10 Soluções para eletroforese em gel de agarose

- **Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 10x**

Tris-acetato	2 M
EDTA	0,05 M

pH 8,0

- **Tampão de amostra para gel de agarose (10x)**

TAE 20x	50 % (v/v)
Glicerol	30 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)

Dissolvidos em água MilliQ.

- **Brometo de Etídeo**

EtBr	10 mg/mL
------	----------

4.11 Precipitação de digestões

NaAc	0,3 M
Ethanol 100% gelado	2,5 V

4.12 Solução para quantificação de proteínas

- Solução Bradford

Reagente corante 1x (BioRad) Ready to use

4.13 Soluções para precipitação de proteína

Ácido tricloroacético - TCA 100% (p/v) (100 g de TCA para 45,4 mL de água destilada) - estocar a 4 °C.

Acetona 100% - estocar a 4 °C

4.14 Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

- **Tampão de amostra (4X) para proteína**

Tris-HCl 1M (pH 6,8)	200 mM
SDS	4 % (p/v)
β-Mercaptoetanol	4 % (v/v)
Glicerol	20 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)

- **Gel concentrador 4%**

(volumes para 1 gel do Sistema BioRad – Mini-PROTEAN® Tetra System)

Água destilada	2,75 mL
Acrilamida: Bis-acrilamida (29:1)	0,625 mL
Tris- HCl 0,5M pH 6,8	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	50 µL
TEMED (Gibco BRL)	4 µL
Persulfato de Amônio - APS 10% (p/v)	37,5 µL

- **Gel separador 10%**

(volumes para 1 gel do Sistema BioRad – Mini-PROTEAN® Tetra System)

Água destilada	3,63 mL
Acrilamida: Bis-acrilamida (29:1)	2,5 mL
Tris- HCl 3 M pH 8,8	0,94 mL
SDS 10% (p/v)	75 µL
TEMED (Gibco BRL)	8 µL
APS 10% (p/v)	56,25 µL

- **Tampão de corrida - Tris-glicina 5x (estoque)**

Trizma base	125 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,5 % (p/v)

- **Solução corante**

Comassie brilliant blue G-250	0,1 % (p/v)
Sulfato de amônio	10 %
Ácido fosfórico	2 %
Metanol	20 % (v/v)

- **Solução descorante**

Metanol	50 % (v/v)
Ácido acético glacial	12 % (v/v)

4.15 Soluções e meios para os testes de caracterização enzimática

- **Solução para ativação enzimática**

HCl	1M
NH ₃	1M

- **Solução de leite desnatado**

Leite em pó desnatado (Molico®- Nestlé)	12%
CaCl ₂	20 mM
Tampão fosfato de potássio pH 6,0	25 mM

Dissolver o leite em pó em água e posteriormente acrescentar os demais componentes.

- **Tampões para análise de pH ótimo (solução estoque)**

pH 3: tampão citrato de sódio	0,5 M
pH 4 a 5: tampão acetato de sódio	0,5 M
pH 6 a 7: tampão fosfato de potássio	1 M

pH 8 a 9: tampão Tris-HCl

1 M

- **Solução estoque de íons**

As soluções de íons foram todas preparadas na concentração de 0,5M. Os seguintes reagentes foram utilizados

- MnCl_2 / MgCl_2 / FeCl_2 / CoCl_2 / CuCl_2 / KCl / ZnCl_2 / CaCl_2

- **Teste de Especificidade para Substratos α , β e κ - caseína de leite bovino (Sigma Aldrich)**

Solução estoque para uso: 1,5 mg de cada substrato dissolvido em 1 mL de 67 mM de NaH_2PO_4 - pH 6,8

5 - MÉTODOS

5.1 Obtenção dos vetores de expressão constitutivos

5.1.1 Construção do vetor pPICKCHYM (quimosina bovina)

Para a construção do vetor pPICKCHYM (Figura 5) o gene de quimosina bovina (CHYMb) foi inserido no vetor pPICK α PRO (Figura 4). Inicialmente, o gene CHYMb foi sintetizado comercialmente pela empresa Epoch Biolabs gerando o vetor pBSSK-CHYM (ARAÚJO, 2008).

O gene CHYMb foi liberado do vetor por uma digestão com XhoI e NotI, as mesmas usadas para o vetor pPICK α PRO, gerando extremidades coesivas complementares em ambos, para posterior ligação com a enzima T4 DNA ligase, originando o vetor pPICKCHYM (Figura 5).

Para transformação de *P. pastoris*, o vetor foi linearizado com SacI, sítio presente no promotor do vetor, para dirigir a integração do cassete de expressão no *locus PGK1* nativo da levedura.

5.1.2 Obtenção do vetor pPGK Δ 3CHYM (Quimosina de Camelo)

Este vetor foi desenvolvido pela empresa Epoch Biolabs, utilizando o vetor pPGK Δ 3PRO (Figura 7) para clonagem do gene da quimosina de camelo gerando o vetor pPGK Δ 3CHYM (Figura 8). O vetor foi linearizado com SacI, para dirigir a integração no *locus PGK1* nativo da levedura.

5.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas conforme instruções do fabricante das enzimas. O tempo de incubação, os tampões, as temperaturas de reação, as concentrações de DNA e enzima variaram de acordo com o material a ser digerido e o tipo da enzima.

5.3 Análise eletroforética de DNA

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise dos fragmentos de DNA de acordo com SAMBROOK *et al*, 2001. O gel de agarose foi preparado na concentração de 0,8 % (p/v) em tampão de corrida TAE 1X. Também foi adicionado ao gel de agarose brometo de etídeo para concentração final de 0,5 μ g/mL. O tampão de amostra das

amostras de DNA foi diluído para a concentração final de 1X. As amostras de DNA e os marcadores moleculares foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese com a corrente e voltagem adequadas (1-5 V/cm). Para visualização dos fragmentos de DNA o gel foi exposto à luz ultravioleta.

5.4 Purificação e eluição de fragmentos de DNA

Após digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição requeridas, os fragmentos de DNA contendo as sequências de interesse foram aplicados em gel de agarose e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA contendo os fragmentos de interesse foram recortados do gel com lâminas de bisturi de aço carbono estéril (Wiltex plus) e posteriormente purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction, conforme as especificações do fabricante.

5.5 Ligação de fragmentos de DNA (Vetor-Inserto)

Os sistemas de ligação foram realizados de modo que a razão molar entre vetor e inserto ficasse entre 1:3 e 1:10, com um volume total de 10 µL de reação. A enzima T4 DNA Ligase foi utilizada em concentração de 40 U/µL com seus respectivos tampões de reação conforme indica o fabricante. A reação ocorreu por aproximadamente 16 horas a 16 °C. Os sistemas foram incubados a temperatura de -20 °C antes de serem utilizados para transformação de bactérias.

5.6 Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por COHEN *et al.*, 1972, com algumas modificações. A partir de uma placa de Petri contendo meio LB sólido, uma colônia isolada de *E. coli* XL10-Gold foram incubadas em 5mL de meio LB, a 37°C sob agitação de 200 rpm durante a noite. Posteriormente, 1 mL deste pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a OD_{600nm} de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 x *g* durante 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em 10 mL de solução 100 mM CaCl₂ estéril e gelada. Em seguida, as células foram submetidas à nova centrifugação sob as mesmas condições. Finalmente, as células foram ressuspendidas em 2 mL de solução 100 mM CaCl₂ contendo 25 % de glicerol estéril.

Alíquotas de 100 µL, foram distribuídas em eppendorfs de 1,5 mL sobre gelo seco/álcool. As células foram estocadas a -80°C para posterior utilização.

5.7 Transformação de *E. coli* por choque térmico

Para cada sistema de ligação foi utilizada uma alíquota de célula competente. (XL10-Gold) estocadas a -80 °C e foram descongeladas no gelo. Em seguida, adicionou-se 10 µL do sistema de ligação às células, deixando as mesmas incubadas no gelo por 30 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas ao choque térmico, incubando-se a 42 °C por 90 segundos, e retornando ao gelo por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 800 µL de meio LB ao sistema que foi incubado a 37 °C por 60 minutos em banho. O plaqueamento das células foi feito em meio LB Agar com antibiótico adequado espalhando-se as células com pérolas de vidro estéreis. As placas foram incubadas a 37 °C por período aproximado de 16 h.

5.8 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)

Para a extração de plasmídeos em pequena escala seguiu-se o método de SAMBROOK *et al.*, 2001, introduzindo algumas adaptações. Uma colônia de bactéria isolada foi incubada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado e cultivada a 37 °C por 16-18 horas. As células foram coletadas através de centrifugação a 12.000 x *g* por 2 minutos em temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 200 µL de solução I, e em seguida adicionou-se 360 µL de solução II recém-preparada. A amostra foi homogeneizada por inversão suave do tubo. Depois de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 300 µL de solução III gelada ao lisado, procedendo-se nova homogeneização por inversão do tubo. A amostra foi então incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 12000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo adicionados 750 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova centrifugação a 12000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200 µL de solução TE. Foram então adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M seguindo-se centrifugação a 12.000 x *g* por 10 minutos (4 °C). O sobrenadante foi recuperado em um tubo novo sendo adicionados 750 µL de

etanol 100% gelado. A mistura foi centrifugada a 12.000 x *g* por 5 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado (sem ressuspender) com 1 mL de etanol 70% gelado. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de água e RNase A (20 µg/mL) e incubada a 37 °C por uma hora. O DNA plasmidial foi estocado a -20 °C até o uso.

5.9 Extração de DNA plasmidial em larga escala (max-prep)

Para obtenção de DNA plasmidial em larga escala foi utilizado o kit Qiagen Plasmid Max (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Este método permite a obtenção de grandes concentrações de DNA plasmidial para transformação em *P. pastoris*.

5.10 Transformação de *P. pastoris* por eletroporação

A levedura foi transformada por eletroporação segundo o protocolo descrito no EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, EUA) com algumas modificações. Uma colônia da levedura *P. pastoris* crescida em meio YPD ágar, foi inoculada em 12,5 mL de meio YPD e crescidas em um Erlenmeyer com capacidade de 125 mL. O pré inóculo foi incubado por 24 horas a 28 °C sob agitação (200 rpm). Posteriormente, foi medido a OD₆₀₀ e calculado o volume a ser utilizado para o inóculo levando em consideração o tempo de geração de 2 horas. O volume de células suficiente para atingir a OD_{600nm} de 1,3 no horário programado foi adicionado a 100 mL de meio YPD em frasco Erlenmeyer de 1 L, retornando a incubação nas mesmas condições anteriores. Quando o inóculo atingiu o crescimento esperado (OD₆₀₀ ~1,3 -1,5), fez-se uma incubação no gelo por 15 minutos para cessar o crescimento. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 x *g* por 5 min a 4 °C e ressuspensas em 100 mL de água estéril gelada (4 °C). As células foram centrifugadas como anteriormente. Este processo de lavagem foi repetido duas vezes. Posteriormente o pellet foi ressuspensionado em 50 mL de água estéril gelada e centrifugado como anteriormente. As células foram ressuspensas novamente em 10 mL de sorbitol estéril 1M gelado. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em sorbitol 1M gelado para um volume final que não ultrapassasse 800 µL, e mantidas no gelo. Para a eletroporação, 200 µL das células foram misturadas com 5-10 µg do DNA

plasmidial (previamente linearizado) e 320 μ L de sorbitol 1M gelado, e então transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada. As células foram eletroporadas nas seguintes condições para o eletroporador da BioRad: 1,500 V, 25 μ F e 400 Ω . O tempo de eletroporação foi de aproximadamente 10 ms. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo de 1,5 mL estéril e incubado a 28 °C por duas horas. As células do sistema de transformação foram plaqueadas no volume de 100, 200, 300 μ L e pellet em YPDS contendo o antibiótico adequado. As placas foram incubadas por 4 dias, período necessário para visualizar o aparecimento das colônias. Algumas colônias escolhidas aleatoriamente foram repicadas em uma nova placa de meio YPD com antibiótico adequado, contendo uma grade numérica para numeração e controle dos clones. A partir desta placa, foram selecionados clones para realizar um *screening* através do teste de atividade enzimática. Foi selecionado um clone de cada transformação. O controle negativo utilizado foi o vetor vazio sem o gene de quimosina (bovina e de camelo).

5.11 Produção de quimosina recombinante bovina e de camelo por *Pichia pastoris*

Uma colônia isolada do clone da quimosina bovina, quimosina de camelo e controle negativo (pPICK α PRO) crescidas em meio YPD ágar com os respectivos antibióticos, foram inoculadas em 12,5 mL de meio BMGY em Erlenmeyer de capacidade de 12,5 mL a 28 °C e agitação de 200 rpm. Os pré-inóculos foram crescidos por um período de 20 horas. A OD₆₀₀ inicial foi analisada por absorvância (600 nm) e calculou-se o volume correspondente para uma OD₆₀₀ de 0,3 em 100 mL de meio BMGY. Este volume foi adicionado em Erlenmeyer aletados com capacidade de 1 L e retornadas para agitação. O teste foi feito em quintuplicata biológica. A cada 24h foram retirados aproximadamente 3 mL de cada cultura, analisado o crescimento celular (OD₆₀₀), e centrifugado (5 minutos a 5.000 rpm) para separação das células. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C para posterior análise (item 4.12 e 4.13). Os volumes correspondentes ao tempo de 96 horas (aproximadamente 450 mL) de cada quintuplicata foram centrifugados para separação das células (5.000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante de cada quimosina foi utilizado para o processo de purificação.

5.12 Determinação de atividade enzimática da quimosina

O teste de atividade coagulante quimosina foi baseado no método de EMTAGE *et.al.*, 1983, com algumas modificações. As amostras enzimáticas foram acidificadas com HCl 1M para um pH 2,20 e incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente o pH foi ajustado para 6,3 com NaOH 1M.

As amostras enzimáticas dos sobrenadantes foram analisadas em solução de leite desnatado (12% p/v) Molico®, 20 mM CaCl₂, 25 mM tampão fosfato de potássio - pH 6.3). Foram adicionadas 100 µL da amostra enzimática ativada e não ativada em 400 µL de solução de leite pré aquecida a 37 °C. Quando o volume da amostra enzimática foi menor que 100 µL, o volume foi completado com água destilada. Verificou-se o tempo necessário para o aparecimento dos primeiros sinais de coágulo nas paredes do tubo eppendorf (1,5 mL) por inversão dos mesmos. Controles foram feitos utilizando água destilada no lugar da amostra enzimática. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade mínima de enzima necessária para coagular o leite em 5 minutos, nas mesmas condições.

5.13 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais das amostras do item 4.11 foi determinada em triplicata pelo método colorimétrico de BRADFORD, 1976, com o reagente Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Ready to use - BioRad). A curva padrão foi construída utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como proteína padrão nas concentrações: 10, 25, 60, 75 e 100 µg/mL.

A quantificação das proteínas purificadas foi determinada por absorvância a 280 nm, utilizando-se um coeficiente de extinção de 55155 e 52175 M⁻¹ cm⁻¹ para quimosina bovina e de camelo, respectivamente. Os coeficientes de extinção das proteínas foram obtidos através do portal: ExpASY SIB Bioinformatics Resource Portal. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

5.14 Precipitação de Proteínas com Ácido Tricloro Acético (TCA)

Para cada 1 mL dos sobrenadantes coletados das fermentações foram adicionados 250 µL de TCA 100 %. O tubo contendo a mistura foi incubado a 4 °C durante

a noite e depois centrifugado a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 1 mL de acetona (100%) gelada e novamente centrifugado nas condições anteriormente descritas, porém durante 15 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e ressuspenso em 50 µL de tampão de amostra 2X. No caso das amostras com o pH ácido (amostra com coloração amarela) acrescentou-se 2 µL de tampão acetato de sódio 3 M pH 6,0 para correção do valor do pH. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para análise do perfil proteico.

5.15 Análise Proteica em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel de poliacrilamida desnaturante conforme a descrição de LAEMMLI (1970) em um sistema de eletroforese (Bio-Rad). As amostras foram fervidas a 100 °C por 5 minutos em banho seco antes da aplicação no gel para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X com uma voltagem constante de 100 V. Os padrões de massa molecular utilizados foram: beta-galactosidase (116 kDa), soro albumina bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), beta-lactoglobulina (18,4 kDa), lisozima (14,4 kDa), marcador molecular Thermo Scientific.

5.16 Coloração com Coomassie Brilliant Blue Coloidal

Após a corrida eletroforética os geis foram incubados na solução corante [Coomassie brilliant blue G-250] por, no mínimo 12 horas com agitação lenta. Após lavagens sucessivas com solução descorante, observou-se a visualização das bandas de proteínas (NEUHOFF *et al.*, 1988).

5.17 Purificação enzimática

O sobrenadante contendo as amostras enzimáticas foram concentrados (aproximadamente 10X) e dialisados por filtração tangencial (equipamento QuixStand™ Benchtop System-GE) com um fluxo de 60 rpm, pressão de aproximadamente 13 psi e poder de retenção para moléculas com massa molecular superior 3.000 Da. A diálise foi feita com a adição de 10 vezes o volume de água em relação ao volume inicial da amostra

enzimática concentrada. Foi repetido o processo por 3 vezes. As amostras enzimáticas dialisadas foram liofilizadas, ressuspendidas em água destilada e adicionadas em coluna de gel filtração Sephacryl S-100 HR (1,6 cm x 60 cm) Sigma Aldrich, previamente equilibrada com 50 mM de tampão fosfato pH 6,0. A eluição foi realizada com um fluxo contínuo de 20 mL/h. Frações de 3 mL foram coletadas e a concentração de proteína foram analisadas por absorbância (280 nm). As frações correspondendo aos picos foram selecionadas para realizar o teste de atividade enzimática (item 5.12 - sem utilizar o procedimento de ativação), as frações que apresentaram atividade enzimática foram precipitadas com TCA e analisadas o perfil de purificação em gel de poliacrilamida (item 5.15 e 5.14). A concentração das proteínas purificadas foi determinada de acordo com o item 5.13. As frações de cada quimosina que demonstraram ter um melhor perfil de purificação foram reunidas para serem utilizadas na caracterização enzimática.

5.18 Caracterização enzimática

5.18.1 Determinação de pH ótimo

O pH ótimo para cada quimosina foi testado utilizando-se sistemas tamponantes que variaram os valores de pH entre 3 a 9. As enzimas foram incubadas em solução de leite com diferentes tampões, para uma concentração final de 25 mM, como no teste padrão. Os tampões usados foram: 0,5 M citrato de sódio (pH 3), 0,5 M acetato de sódio (pH 4-5), 1 M fosfato de sódio (pH 6-7) e 1M Tris-HCl (pH 8-9). O teste foi feito a 37 °C, seguindo a metodologia do ensaio enzimático (item 5.12 – sem utilizar o procedimento de ativação) descrito anteriormente.

5.18.2 Determinação de Temperatura Ótima

O efeito de diferentes temperaturas na atividade das quimosinas foi avaliado. Um volume de quimosina (bovina e de camelo) foi adicionado em uma solução de leite nas mesmas condições do ensaio enzimático (item 5.12 - sem utilizar o procedimento de ativação) e, posteriormente incubadas em temperaturas que variaram de 10 a 70 °C.

5.18.3 Efeito de Ca²⁺ e outros íons

A influência de Ca²⁺ foi determinada utilizando-se diferentes concentrações do mesmo na solução de leite (0-240 mM). O efeito de diversos íons também foi avaliado, tais como Mn²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, K⁺ e Zn²⁺. A concentração deste íons na solução de leite foi de 20 mM, como no teste padrão. O teste de atividade enzimática foi realizado como descrito no item 5.12 (sem utilizar o procedimento de ativação), exceto na análise de Ca²⁺, onde foram utilizadas diferentes concentrações do mesmo. No ensaio com os diferentes íons a concentração foi fixada em 20 mM.

5.18.4 Ensaio de especificidade das quimosinas para α , β e κ caseínas.

Para determinar a especificidade das quimosinas bovina e de camelo em relação à capacidade de hidrolisar substratos contendo ligações dos tipos α , β e κ caseínas foram feitos os seguintes ensaios de acordo com Jiang e colaboradores (2012), com algumas modificações. As caseínas foram dissolvidas em 67 mM tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄) pH 6,8 para uma concentração final de 1,5 mg/mL. Cada reação foi composta de 40 μ L da solução de cada caseína, e 10 μ L da amostra de quimosina recombinante purificada (aproximadamente 100 μ g de cada quimosina). Para o controle negativo foi utilizado água Milli-Q no lugar das quimosinas, e no controle positivo utilizou-se a Hannilase® nas mesmas condições. As reações foram incubadas por 90 minutos a 37 °C e foram adicionados 13 μ L de tampão de amostra 4x. Aplicou-se no no gel de poliacrilamida 20 μ L da reação total para posterior análise.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção dos vetores de expressão constitutivo de quimosina bovina e de camelo.

Foram utilizados vetores de expressão constitutiva, optando-se pelo promotor do gene da 3-fosfoglicerato quinase (P_{PGK1}). Este promotor foi isolado por Almeida e colaboradores (2005) no laboratório de biologia molecular (UnB), e os resultados obtidos com este promotor mostraram uma eficiente expressão de α -amilase de *Bacillus subtilis*. Recentemente um estudo com diferentes tamanhos do promotor P_{PGK1} foi realizado. Os resultados obtidos com a expressão da α -amilase truncada (*amyE*) mostram que o tamanho do promotor não interfere na produção enzimática (comunicação pessoal ARRUDA, 2008).

O genes da quimosina bovina e camelo foram desenhados com substituição de códons nativos por códons otimizados para *P. pastoris*. Araújo (2008), descreve a metodologia para obtenção do gene da quimosina bovina (CHYMb) para expressão em *P. pastoris*.

Para expressão de quimosina foram utilizados os vetores pPICKCHYM e o vetor pPGK Δ 3CHYM que contêm o gene de quimosina bovina e de camelo otimizados para *P. pastoris*. A quimosina de camelo foi escolhida para realizar um estudo comparativo com a bovina, já que resultados recentes mencionados na literatura mostraram características superiores da quimosina de camelo em relação à bovina (KAPPELER *et al.*, 2006).

Os respectivos vetores foram linearizados com SacI, direcionando a integração no locus *PGK1* de *P. pastoris*. Depois que ocorre a integração do cassete de expressão em *P. pastoris*, o promotor nativo do gene *PGK1* é restaurado.

6.1.1 Construção do vetor de expressão pPICKCHYM (Quimosina Bovina)

O vetor pPICKCHYM (Figura 5) foi construído a partir da inserção do gene otimizado da quimosina (CHYMb) sob controle do promotor constitutivo P_{PGK1} no vetor pPICK α PRO (Figura 4). Após transformação em *E. coli*, foi feita uma mini extração de DNA plasmidial (miniprep) de 4 clones transformantes. As amostras de DNA plasmidial foram submetidas à digestão com enzimas de restrição para confirmação da inserção do gene da quimosina. As enzimas de restrição XhoI e NotI foram utilizadas, pois as mesmas

clivam sítios específicos que possibilitam a liberação do fragmento contendo o gene da quimosina (1123 pb). Para todos os clones foram confirmados a clonagem, sendo uma banda correspondente ao gene (1123 pb) e a outra refere-se ao restante do vetor (3604 pb). As flechas indicam as respectivas bandas referentes ao clone selecionado (Figura 6).

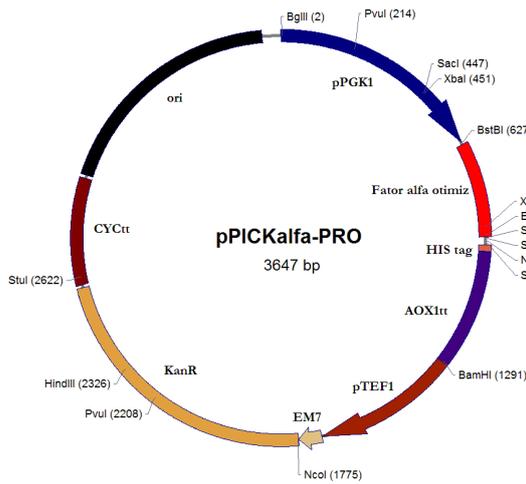


Figura 4. Mapa físico do vetor pPICK α PRO. Os sítios XhoI e NotI foram utilizados para clonagem.

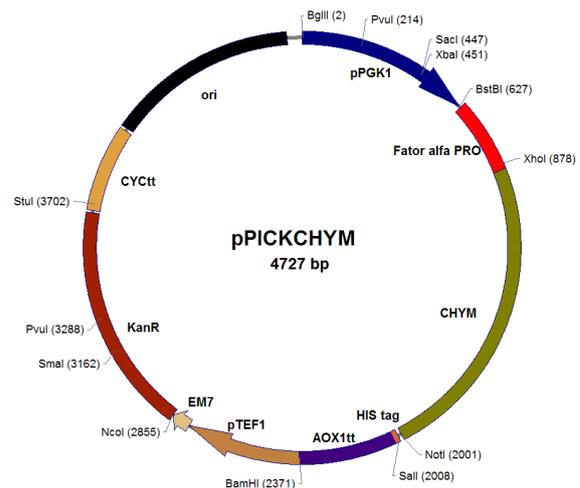


Figura 5. Mapa físico do vetor pPICKCHYM. Os sítios BglIII e SacI linearizam o vetor.

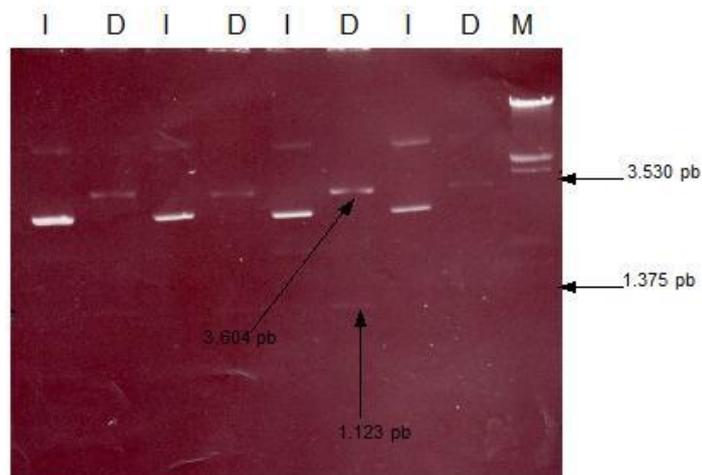


Figura 6. Análise de restrição do vetor pPICKCHYM: Gel de agarose (0,8%) das digestões com XhoI e NotI da mini prep de 4 clones para confirmação da inserção do gene da quimosina bovina. As enzimas clivam as extremidades do gene da quimosina. **I:** DNA plasmidial intacto (sem digestão). **D:** DNA plasmidial digerido. **M:** marcador λ Eco/Hind.

6.1.2 Obtenção do vetor de expressão pPGKΔ3CHYM (Quimosina de Camelo)

O vetor pPGKΔ3CHYM (Figura 8) foi construído a partir da inserção do gene da quimosina sintetizado no vetor pPGKΔ3PRO (Figura 7).

Após a construção do vetor pPGKΔ3CHYM pela empresa Epoch Biolabs, este plasmídeo foi transformado em *E. coli* para realização de uma extração de DNA plasmidial em grande quantidade (Maxprep) de um clone transformante selecionado. Este foi linearizado com *SacI* (4140 pb) (Figura 9) para posteriormente ser usado na transformação de *P. pastoris*, direcionando a integração no *locus PGK1* da levedura.

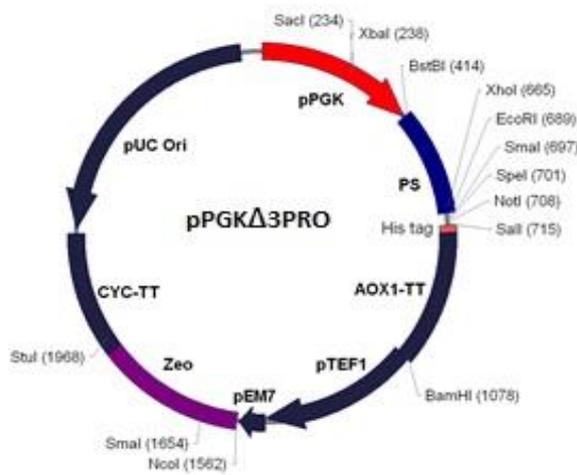


Figura 7. Mapa físico do vetor pPGKΔ3PRO. Os sítios *XhoI* e *NotI* foram utilizados para clonagem do gene de interesse.

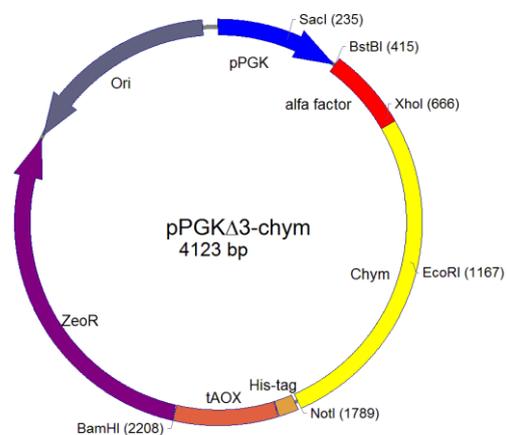


Figura 8. Mapa físico do vetor pPGKΔ3PROCHYM. O sítio *SacI* lineariza o vetor.

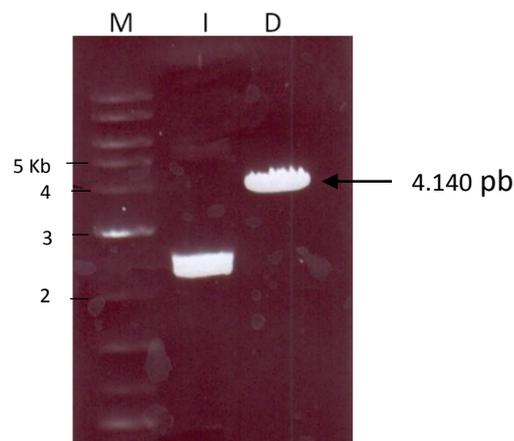


Figura 9. Análise de restrição do vetor pPGKΔ3CHYM. Gel de agarose (0,8%) da digestão de DNA plasmidial com *SacI*. **M:** Marcador molecular: 2 log. **I:** DNA intacto. **D:** DNA digerido. A seta indica o vetor linearizado com *SacI*.

6.2 Produção de quimosina recombinante bovina e de camelo em *P. pastoris*

Para obtenção da enzima quimosina bovina e de camelo, os clones 24 (quimosina bovina) e 15 (quimosina de camelo) selecionados a partir de um *screening* (item 5.10) foram crescidos por 96 h em frascos tipo Erlenmeyer aletados de capacidade de 1L contendo 100 mL de meio BMGY (4% de glicerol inicial). O controle negativo (clone C-) também foi crescido, nas mesmas condições. Foi realizada uma suplementação de glicerol como fonte de carbono (2%) nos tempo 48 e 72 horas. O crescimento celular (OD_{600}) dos clones foi semelhante apresentando o mesmo perfil de crescimento (Figura 10).

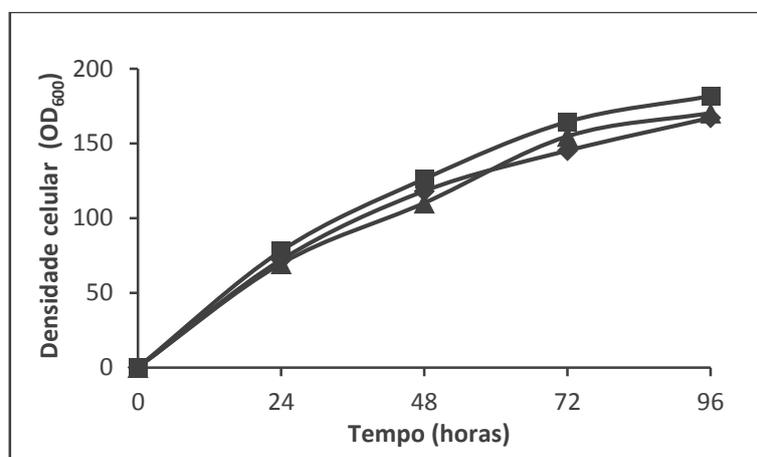


Figura 10. Curva de crescimento celular de *P. pastoris*. Clone 24 (quimosina bovina ◆), clone 15 (quimosina de camelo ■) e controle negativo C- (▲). Teste em quintuplicata biológica. O desvio padrão foi calculado e inserido no gráfico.

O teste de atividade enzimática foi realizado para as enzimas quimosina bovina e de camelo presentes no sobrenadante. A ativação enzimática por neutralização/acidificação foi feita para fins comparativos. Conforme as Figuras 11 (A, B), os resultados mostram que este processo de ativação pode reduzir em até 50% a atividade enzimática, nas condições padrões do teste, como foi o caso da quimosina de camelo. Para a quimosina bovina a redução na atividade enzimática foi de 30%. Este procedimento também foi aplicado para o sobrenadante do controle negativo, não sendo detectada atividade enzimática tanto para o sobrenadante ativado como o não ativado. Sendo assim, nos demais testes deste trabalho esta etapa de ativação enzimática foi eliminada.

Em 2008, Araújo expressou quimosina bovina (CHYMb) em *P. pastoris* e relatou em seu trabalho, que não foi necessário realizar a etapa de ativação enzimática antes do ensaio do teste de atividade coagulante, pois depois de 72 horas, praticamente toda a enzima do sobrenadante estava na forma ativa quando observada em gel SDS-PAGE (massa molecular de aproximadamente 36 kDa). Esta auto-ativação, conforme o autor sugere, pode estar relacionado com a queda do valor de pH, que ocorre ao decorrer do tempo no cultivo celular, ativando assim a enzima naturalmente. O autor ainda não descarta a clivagem da pró-quimosina por uma protease secretada de *P. pastoris*. Em 1999, Espinosa e colaboradores também relataram este fato ocorrido, quando expressaram esta quimosina em *P. pastoris*.

Em relação à comparação da atividade enzimática entre as quimosinas bovina e de camelo (Figura 11B), os resultados mostraram que a atividade enzimática para quimosina bovina foi superior em até quase três vezes em relação à quimosina de camelo. O tempo utilizado para comparação da produção das duas quimosinas foi de 96 h.

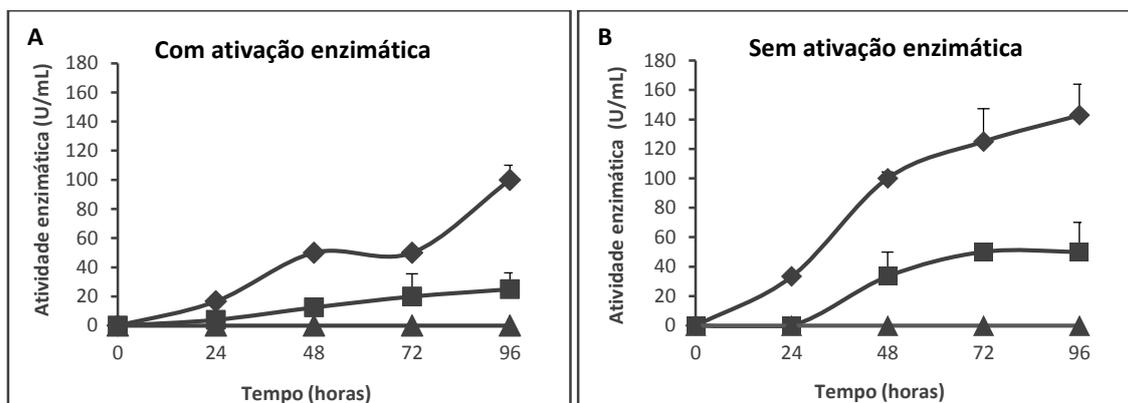


Figura 11. Atividade enzimática de quimosina em sobrenadante produzidas por clones de *P. pastoris* coletadas em diferentes tempos. Clones 24 (chym bovina ◆), 15 (chym camelo ■) e controle negativo C- (▲). **A:** teste com ativação enzimática; **B:** teste sem ativação enzimática. O desvio padrão foi calculado e inserido nos gráficos. Teste em triplicata técnica.

De acordo com Kappeler e colaboradores (2006), as quimosinas bovina e de camelo apresentam uma elevada identidade de sequência de nucleotídeos (87%). Possuem especificidades idênticas, clivando a ligação Phe105-Met106 da k-caseína para produzir *para*-k-caseína e caseinomacropeptídeo (MOLLER *et al.*, 2012).

A quimosina bovina é relatada na literatura como a mais utilizada na indústria, tendo vantagens por apresentar uma forte capacidade de coagulação e baixa atividade proteolítica (MOLLER *et al.*, 2012); (VALLEJO, *et al.*, 2012).

Kappeler e colaboradores (2006) analisaram a atividade enzimática da quimosina bovina e de camelo, expressas em *Aspergillus niger*. Os resultados obtidos mostraram que a quimosina de camelo exibiu uma atividade de 70% superior à quimosina bovina.

Em 2012, Moller e colaboradores realizaram um estudo comparativo para as ambas quimosinas e os resultados mostraram que a quimosina de camelo apresentou uma eficiência catalítica (kcat/Km) superior em 15% em relação a quimosina bovina porém. Uma região na quimosina de camelo com cargas negativas foi identificada e, segundo o autor, pode reduzir a afinidade da enzima ao substrato ou acelerar a dissociação enzima-substrato, em comparação a quimosina bovina. Tal relato pode corroborar com os resultados obtidos nesse trabalho, pois, embora alguns autores tenham relatado uma atividade superior da quimosina de camelo, os resultados obtidos mostraram o contrário, onde a quimosina bovina apresentou uma atividade enzimática bastante superior a de camelo.

6.3 Purificação das Quimosinas Bovina e de Camelo

Os sobrenadantes do crescimento do tempo de 96 horas dos clones 24 (chym bovina) e 15 (chym camelo) foram previamente centrifugados, concentrados, dialisados por filtração tangencial (equipamento QuixStand™ Benchtop System-GE) e posteriormente liofilizados. As amostras liofilizadas foram submetidas à cromatografia em coluna de gel filtração (Sephacryl S-100) previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0. Nas Figuras 12A e 12B são mostrados os perfis de atividade enzimática (sem ativação) e da concentração de proteínas totais de cada fração. A eluição com tampão fosfato das amostras enzimáticas resultou em alguns picos de proteínas totais. A atividade enzimática para quimosina bovina foi observada nas frações entre 23 a 30 (pico I) (Figura 12A). Para a quimosina de camelo foram observadas atividades enzimáticas em dois picos: frações 19 a 24 (pico I) e 40 a 42 (pico II) (Figura 12B). O segundo pico desta última foi selecionado por apresentar um perfil de purificação melhor em SDS-PAGE (Figura 13).

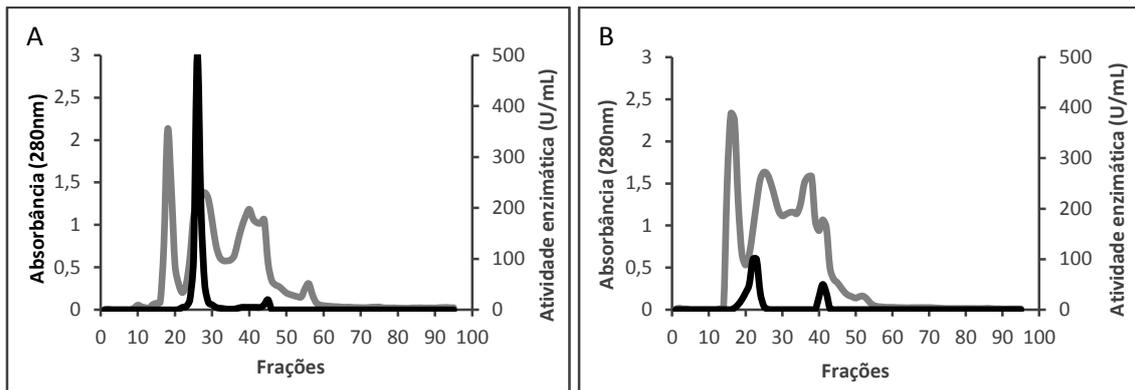


Figura 12. Perfil cromatográfico e atividade enzimática de frações eluídas através de coluna Sephacryl S-100 a partir de sobrenadantes concentrados produzidos por *P. pastoris*. **A:** quimosina bovina, **B:** quimosina de camelo. Em preto o perfil de proteínas totais de cada fração e em vermelho a atividade enzimática.

Pode-se observar os perfis de purificação das duas quimosinas, bovina e de camelo nas Figuras 13A e 13B. Aparentemente ocorreu uma melhor purificação da quimosina bovina quando comparada com a de camelo, embora algumas bandas do extrato bruto desta última tenham sido eliminadas no processo de purificação.

O processo cromatográfico utilizado para purificar as duas proteínas nesse trabalho mostrou-se eficiente, pois foram eliminadas algumas proteínas presentes no extrato bruto, descartando-se, inicialmente a possibilidade de uma segunda etapa de purificação. Em 2008, Araújo expressou quimosina bovina (CHYMb) em *P. pastoris* e também conseguiu um bom grau de purificação na primeira etapa, utilizando a mesma resina deste trabalho. A quimosina de *Mucor pusillus* expressa em *P. pastoris* também foi purificada em uma única etapa em coluna *Fast Flow Q-* Sepharose de troca iônica (BELDARRAIN *et al.*, 2000). Já em outros trabalhos, foram necessários pelo menos duas etapas de purificação para a quimosina bovina (ZHANG *et al.*, 1997; TICHY *et al.*, 1993; EMTAGE *et al.*, 1983; MOSCHOPOULOU *et al.*, 2006). A quimosina de camelo até o momento foi purificada utilizando somente cromatografia de afinidade (MIMO1300 matrix), em uma única etapa de purificação (KAPPELER *et al.*, 2006).

As massas moleculares aparente das duas quimosinas secretadas foram verificadas em SDS-PAGE e os valores obtidos estão na faixa entre 35 e 45 kDa (Figuras 13A e 13B). Não obstante, os valores estão de acordo com os mencionados na literatura para ambas quimosinas (KAPPELER, *et al.* 2006; ZHANG *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2012; ARAÚJO, 2008).

Nas Figuras 13A e 13B podemos observar uma banda que sugere a forma glicosilada da enzima. De acordo com a Figura 13B, a forma glicosilada da quimosina de camelo está em maior destaque, porém na quimosina bovina também é possível de se observar uma banda correspondente a forma glicosilada(13A).

As estruturas de quimosina bovina e de camelo foram comparadas recentemente (LANGHOLM JENSEN *et al.*, 2013). Foram obtidas diferentes frações das quimosinas através coluna de interação hidrofóbica, sendo observado que a enzima quimosina bovina possui um sítio de glicosilação (Asn291) enquanto que a quimosina de camelo pode possuir um ou diferentes graus de glicosilação (Asn291 e Asn100). Foi observado que frações obtidas da quimosina de camelo com duplo sítio de glicosilação teve redução na atividade enzimática, quando comparado com frações de sítio único. O autor comenta que esta redução pode estar relacionada a localização do sítio de glicosilação na enzima, pois o sítio Asn291 está localizado na parte do sulco da enzima, próximo ao sítio ativo, podendo atrapalhar na interação enzima/substrato. Em contraste o sítio Asn100 está na parte externa da enzima

Embora neste trabalho tenha sido feito o teste para deglicosilação, os dados obtidos não foram conclusivos e posteriormente deverão ser repetidos.

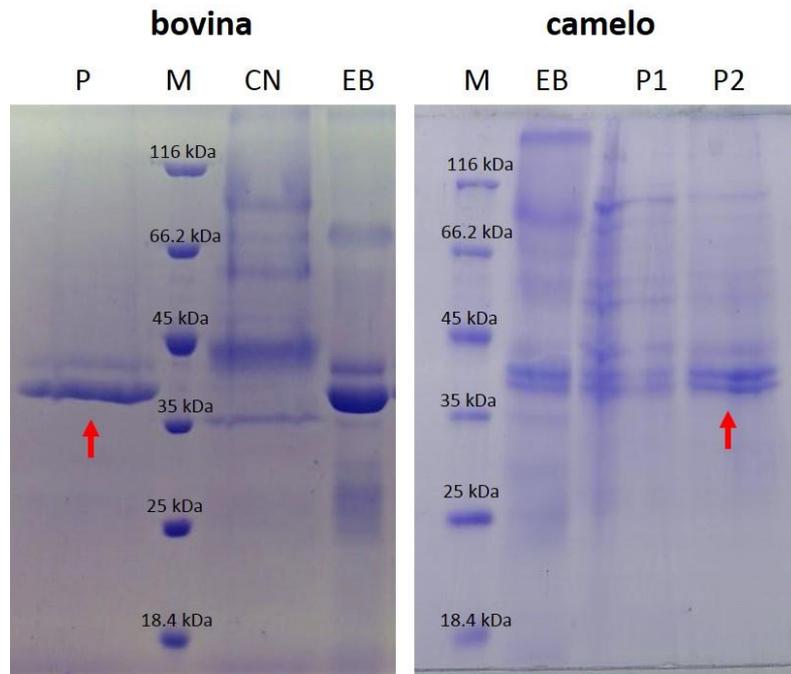


Figura 13. Gel SDS-PAGE 10% para análise da purificação de quimosina bovina e de camelo precipitadas com TCA. **M:** marcador de peso molecular de proteínas não corado (Thermo scientific). **P:** eluato da Sephacryl S-100 de chym bovina; **CN:** controle negativo; **EB:** chym bovina e de camelo não purificadas; **P1** eluato da Sephacryl S-100 correspondente ao 1º pico de chym camelo; **P2:** eluato da Sephacryl S-100 correspondente ao 2º pico da purificação. As flechas em vermelho indicam as frações selecionadas para caracterização enzimática.

Na tabela 1 são mostradas as etapas de purificação das duas quimosinas. Os dados demonstraram que para a quimosina de camelo, ocorreu uma maior taxa de purificação, porém em contraste o rendimento foi menor, quando comparado a quimosina bovina.

O rendimento encontrado nesse trabalho para quimosina bovina (44%) é bem expressivo quando comparado com os relatos na literatura descritos por Jiang e colaboradores (2012). Quanto à purificação de quimosina de camelo até o momento existem poucos relatos na literatura para comparação, porém acreditamos que o processo possa vir a ser otimizado para obtermos um melhor rendimento quanto à purificação.

As amostras purificadas selecionadas foram utilizadas posteriormente na caracterização enzimática.

Tabela 1. Resumo das etapas da purificação enzimática de quimosina bovina e camelo produzidas por *P. pastoris*.

Quimosina	Etapas	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (x)	Rendimento (%)
Bovina	*E.B.	200	5,15	9.000	231,75	38,83	1	100
	Sephacryl	100	0,959	4.000	38,36	104,27	2,68	44
Camelo	*E.B.	50	11,06	3.750	829,5	4,52	1	100
	Sephacryl	18,3	0,858	340,38	15,95	21,33	4,72	9

* Extrato bruto

6.4 Caracterização enzimática

Fatores como diferentes pH, temperatura, concentração de Ca^{+2} e o efeito de diferentes íons foram analisados, verificando o efeito destes na atividade enzimática das quimosinas. Os resultados mostraram que o efeito dos fatores proporcionou um perfil semelhantes para as quimosinas, e a quimosina bovina apresentou uma atividade enzimática superior em relação a quimosina de camelo para todos os fatores testados.

6.4.1- Efeito do pH

O efeito de pH foi analisado sobre a atividade enzimática das quimosinas. O pH que proporcionou uma maior atividade enzimática para as quimosinas neste trabalho foi de 4 (Figura 14). Foi relatado um pH ótimo de 5,1 para quimosina de camelo enquanto que para quimosina bovina um pH de 4,9, testando uma gama de pH entre 2-6,7 para ambas quimosinas (KAPPELER *et al.*, 2006). Os pHs 3,7; 4,2 e 5 também foram mencionados como pH ótimos para quimosina bovina (KUMAR, *et al.*, 2010; MIYOSHI *et al.*, 1976).

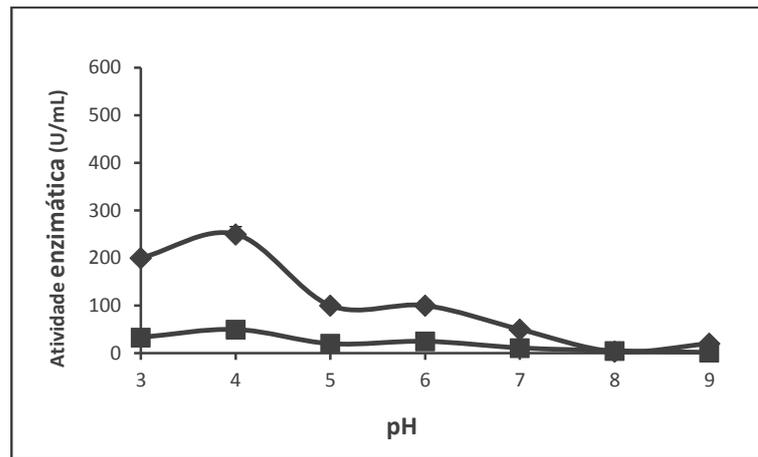


Figura 14. Caracterização enzimática de quimosina bovina (◆), e quimosina de camelo (■). Efeito de diferentes pH na atividade enzimática das respectivas quimosinas. Teste em triplicata técnica. O desvio padrão foi calculado e inserido no gráfico.

6.4.2- Efeito da Temperatura

O efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade enzimática de ambas enzimas também foi analisado. As temperaturas de 55 a 60 °C para quimosina bovina, e 60 °C para quimosina de camelo, foram as temperaturas mais eficientes neste trabalho (Figura 15). Em um estudo comparando ambas quimosinas mostraram que a temperatura ótima para a quimosina bovina estava na faixa de 42 °C e 56 °C, enquanto que para quimosina de camelo estava entre 42 °C e 47 °C (KAPPELER *et al.*, 2006). Contudo, existem relatos de temperaturas ótimas para quimosina bovina de 30, 37 e 50 °C (KUMAR, *et al.*, 2010; MCCAMAN *et al.*, 1985; WILLIAMS *et al.*, 1997; FOLTMANN, 1969; PITTS *et al.*, 1993; ABDEL MALAK *et al.*, 1996; MIYOSHI *et al.*, 1976).

O que observamos na literatura é um amplo espectro de valores de temperatura para atividade ótima da quimosina bovina e, mais recentemente para de camelo, e que a maioria dessas quimosinas apresentam melhor atividade em temperaturas entre 40°C a 55°C. É importante ressaltar que posteriores experimentos de termoestabilidade deverão ser realizados, para verificar qual temperatura e o tempo nos quais a enzima mantém sua plena atividade, fator importante para a indústria.

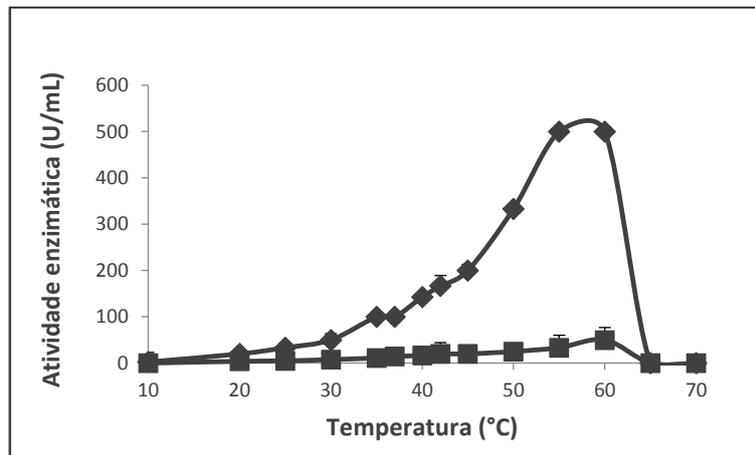


Figura 15. Caracterização enzimática de quimosina bovina (◆), e quimosina de camelo (■). Efeito de diferentes temperaturas na atividade enzimática das respectivas quimosinas. Teste em triplicata técnica. O desvio padrão foi calculado e inserido no gráfico.

6.4.3 – Efeito de Ca^{+2}

O ensaio do efeito de Ca^{+2} sobre as quimosinas mostrou que concentrações entre 40 a 140 mM de Ca^{+2} proporcionaram um aumento na atividade enzimática (Figura 16). A concentração usada no teste padrão do ensaio de atividade enzimática neste trabalho (item 5.12) foi de 20 mM, indicando que uma concentração maior proporciona um aumento na atividade das enzimas, especialmente em relação a quimosina bovina.

Foi relatado na literatura que concentrações de 50 mM teriam proporcionado um aumento na atividade enzimática da quimosina bovina, sendo testado uma gama de 0 a 50 mM de CaCl_2 (KAWAGUCHI *et al.*, 1987). Também foi verificado o efeito de concentrações entre 0 a 8 mM de CaCl_2 nas enzimas quimosina bovina e de camelo (KAPPELER *et al.*, 2006). Os resultados mostram que a maior concentração proporcionou redução da atividade da quimosina bovina, diferente da outra quimosina, que manteve valores constantes de atividade enzimática em todas concentrações.

O íon cálcio exerce um papel fundamental no processo de coagulação do leite. Ele auxilia na agregação de *para-k*-caseína com outras caseínas presentes no leite, resultando na aglomeração de micelas livres e formação do coágulo micelar (parte sólida) gerando o soro (parte aquosa) (CREAMER *et al.*, 1998).

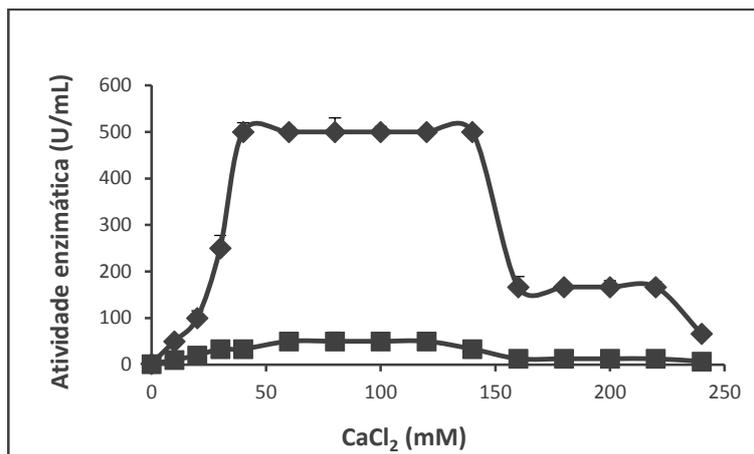


Figura 16. Caracterização enzimática de quimosina bovina (◆), e quimosina de camelo (■). Efeito de diferentes concentrações de Ca⁺² na atividade enzimática das respectivas quimosinas. Teste em triplicata técnica. O desvio padrão foi calculado e inserido no gráfico.

6.4.4 Efeito de Íons

O efeito de outros íons na atividade enzimática também foi avaliado. Como mostrado na tabela 2, o íon Mn⁺² proporcionou um aumento na atividade enzimática de até 100% para a quimosina bovina e de 66,6% para quimosina de camelo, quando comparado ao íon controle (Ca⁺²), seguido de Zn⁺². Os íons Co⁺², Mg⁺², Cu⁺² e K⁺ proporcionaram uma redução na atividade enzimática das quimosinas, sendo o íon K⁺ que mais inibiu a atividade enzimática de ambas as enzimas em torno de 97% e 93% para bovina e camelo, respectivamente. O teste foi realizado em triplicata técnica.

O efeito de diversos íons sobre a atividade quimosina bovina foi relatado na literatura (JIANG *et al.*, 2012). Foi verificado que o íon Mn⁺² proporcionou um aumento de 65%, e o íon Cu⁺² em contrapartida, inibiu em 83% a atividade enzimática. Os resultados descritos são semelhantes aos resultados obtidos neste trabalho. Até o momento, o efeito de diversos íons na atividade enzimática de quimosina de camelo não foi relatada, não nos proporcionando dados para comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 2. Análise do efeito de diferentes íons na atividade enzimática de quimosina bovina e de camelo.

QUIMOSINA BOVINA			
Íons/reagente (20 mM)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade relativa (%)	DP
Controle	100	100	2,22
Mn ⁺² (MnCl ₂)	200	200	18,89
Zn ⁺² (ZnCl ₂)	166,66	166,66	15,56
Co ⁺² (CoCl ₂)	50	50	0
Mg ⁺² (MgCl ₂)	50	50	4,44
Cu ⁺² (CuCl ₂)	20	20	7,78
K ⁺ (KCl)	3,33	3,33	4,44
QUIMOSINA DE CAMELO			
Íons/reagente (20 mM)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade relativa (%)	DP
Controle	20	100	2,22
Mn ⁺² (MnCl ₂)	33,33	166,65	2,22
Zn ⁺² (ZnCl ₂)	20	100	22,22
Co ⁺² (CoCl ₂)	8,33	41,65	5,56
Mg ⁺² (MgCl ₂)	8,33	41,65	6,67
Cu ⁺² (CuCl ₂)	4	20	17,78
K ⁺ (KCl)	1,42	7,11	0

Controle: Ca⁺²; DP: desvio padrão.

6.4.5 – Especificidade a substratos

Para analisar a especificidade das quimosinas, as amostras purificadas foram incubadas com α , β e κ caseínas a 37 °C por 90 minutos. Para os controles foram utilizados Hannilase (controle positivo) e água destilada (controle negativo). Os resultados podem ser observados na Figura 17. No controle negativo (Figura 17A) não foi observado hidrólise dos substratos. Um gradiente de concentração de quimosina bovina e de camelo foi feito (Figura 17D), onde na última concentração (~100 ug) ocorreu a hidrólise para k-caseína, propiciando o aparecimento de uma banda inferior e a redução da banda superior. Esta mesma concentração de quimosina foi testado para os substratos α e β caseínas (Figura 17C), não ocorrendo a hidrólise de ambos. A quimosina comercial hannilase foi capaz de hidrolisar somente o substrato contendo ligações específica para k-caseína (Figura 17B). Foi confirmada na literatura a especificidade da quimosina bovina para k-caseína usando o mesmo teste (ARAÚJO, 2008; JIANG *et al.*, 2012). Em outro estudo foi mostrado a especificidade de quimosina

bovina e de camelo para k-caseína (KAPPELER *et al.*, 2006). Todos os resultados descritos na literatura confirmaram o que obtivemos no trabalho: a especificidade das quimosinas bovina e de camelo para k caseína.

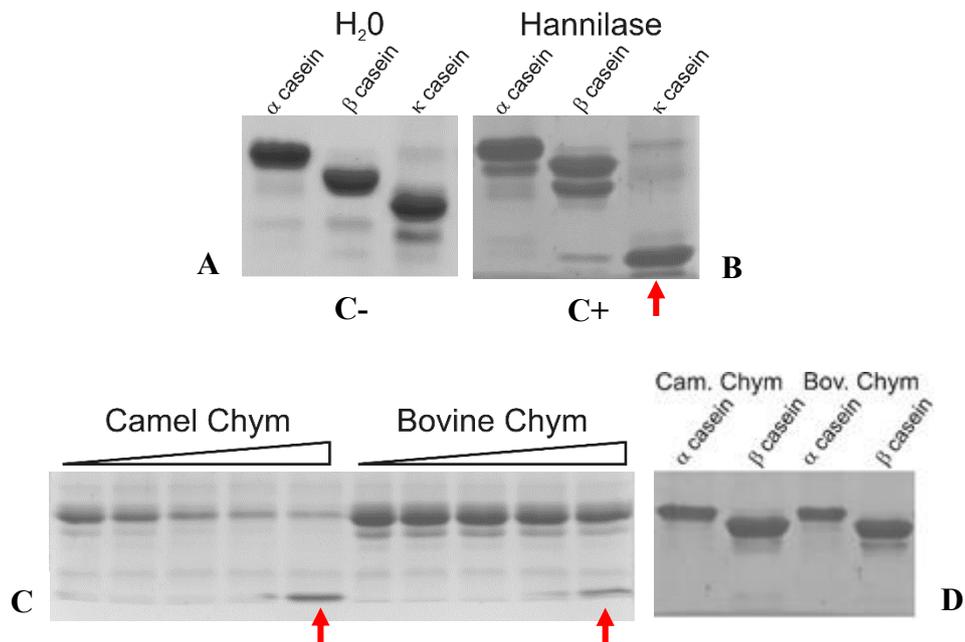


Figura 17. Teste de especificidade das quimosinas bovina e de camelo aos substratos α , β e κ -caseínas. **A:** α , β e κ -caseínas incubada com H₂O (C-); **B:** α , β e κ -caseínas incubadas com hannilase (C+); **C:** κ - caseína com um gradiente de concentração de quimosina bovina e de camelo (de 30 a 100 μ g, aproximadamente). **D:** α e β -caseínas incubada com quimosina bovina e de camelo (100 μ g); A concentração dos substratos foi de 1,5 mg/mL. As flechas em vermelho indicam a hidrólise das enzimas (na maior concentração de quimosinas) à k-caseína.

7 – CONCLUSÕES

- Os vetores de expressão contendo os genes da quimosina sobre o controle do promotor (P_{PGK1}) foram integrados com sucesso no genoma de *P. pastoris*, tornando possível a expressão constitutiva das quimosinas bovina e de camelo.
- A quimosina bovina purificada mostrou uma atividade enzimática superior em aproximadamente cinco vezes quando comparado com a quimosina de camelo.
- A purificação das enzimas quimosinas bovina e de camelo em coluna gel filtração (Sephacryl S-100) mostrou a eliminação de diversas proteínas, como verificado em gel SDS-PAGE em uma única etapa.
- A taxa de purificação foi maior para a para quimosina de camelo (4,72x), enquanto que o rendimento foi superior para a quimosina bovina (44%).
- Na caracterização enzimática:
 - O valor de pH 4,0 foi o que promoveu uma maior atividade enzimática de ambas quimosinas;
 - Temperaturas entre 55 e 60 °C foram mais efetivas na atividade enzimática para as quimosinas de camelo e bovina;
 - As concentrações entre 40 a 140 mM de Ca^{+2} proporcionaram aumento na atividade enzimática das enzimas;
 - O íon Mn^{+2} proporcionou um aumento na atividade enzimática de até 100% na quimosina bovina e 66,6% para quimosina de camelo, quando comparado ao íon controle (Ca^{+2}). O íon K^{+} proporcionou uma redução de até quase 100% na atividade enzimática de ambas quimosinas.
 - As enzimas quimosinas mostraram especificidade somente ao substrato k-caseína.

8 - PERSPECTIVAS

- Futuros testes de termoestabilidade para as enzimas quimosina bovina e de camelo deverão ser realizados para verificar a temperatura que as enzimas são mais ativas e estáveis durante uma longa faixa de tempo, já que a quimosina é de interesse industrial.
- Testes de cinética enzimática para as quimosinas como determinação de K_m e $V_{máx}$ também deverão ser realizados para melhor análise.
- Ensaios de glicosilação deverão ser refeitos, pois é fundamental compreender o padrão de glicosilação apresentado por essas enzimas quimosinas.
- Utilizar o glicerol bruto selecionado no último trabalho para o crescimento de *P. pastoris* e produção da quimosina bovina.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL MALAK, C. A.; ABOU EL ADAB, I. F.; VUKASHINOVIC, V.; ZALUNIN, I. A.; TIMOKHINA, E. A.; LAVRENOVA, G. I.; STEPANOV, V. M. (1996). Buffalo (*Bos buffali* L.) chymosin purification and properties. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 113: 57-62.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br/>>. Acessado em Abril, 2014.

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**. DOI 10.1007/s00253-014-5732-5.

AIKAWA, J.; YAMASHITA, T.; NISHIYAMA, M.; HORINOUCHE, S.; BEPPU, T. (1990). Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of Mucor rennin, an aspartic proteinase of Mucor pusillus, produced by recombinant yeast. **J Biol Chem**, 265: 13955-9.

ARAÚJO, J. A. (2008). **Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris***. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

ARRUDA, A. (2008). **Utilização do promotor do gene *PGK1* de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia celular, Universidade de Brasília, Brasil.

BANSAL, N.; DRAKE, M. A.; PIRAINO, P.; BROE, M. L.; HARBOE, M.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, 19: 510-517.

BARKHOLT PEDERSEN, V.; ASBÆK CHRISTENSEN, K.; FOLTMANN, B. (1979). Investigations on the Activation of Bovine Prochymosin. **European Journal of Biochemistry**, 94: 573-580.

BATISTA, V. D. F. (2012). **Construção de um vetor para expressão heteróloga em *Pichia pastoris***. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

BELDARRAIN, A.; ACOSTA, N.; MONTESINOS, R.; MATA, M.; CREMATA, J. (2000). Characterization of Mucor pusillus rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. **Biotechnol Appl Biochem**, 31: 77-84.

BEPPU, T. (1983). The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. **Trends in Biotechnology**, 1: 85-89.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (2008a) Enzimas na produção de alimentos e bebidas. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado** In: INTERCIÊNCIA, E. (Ed.). 7: 153-177.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (2008b) O uso de leveduras e fungos filamentosos para expressão heteróloga de enzimas. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. In: INTERCIÊNCIA (Ed.). 3: 55-69.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72: 248-54.

CARLSON, A.; HILL, C. G., JR.; OLSON, N. F. (1987). Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. **Biotechnol Bioeng**, 29: 582-9.

CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. **Food Chemistry**, 61: 395-418.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 69: 2110-4.

CREAMER, L. K.; PLOWMAN, JEFFREY E.; LIDDELL, MICHAEL J.; SMITH, MARK H.; HILL, JEREMY P. (1998). Micelle Stability: κ -Casein Structure and Function. **J Dairy Sci**, 81: 3004-3012.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotechnol**, 16: 23-52.

DE ALMEIDA, J. R.; DE MORAES, L. M.; TORRES, F. A. (2005). Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, 22: 725-37..

EMTAGE, J. S.; ANGAL, S.; DOEL, M. T.; HARRIS, T. J.; JENKINS, B.; LILLEY, G.; LOWE, P. A. (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 80: 3671-5.

ESPINOSA, A. E. S.; PEÑA, J. S.; SANTANA, V. M.; FERNÁNDEZ, R. G.; GRILLO J. M. (1999). Comparación de la quimiosina bovina secretada al medio de cultivo por cepas recombinantes de las levaduras *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*. **Biotecnologia Aplicada**, 16: 160-164.

EXPASY - SIB Bioinformatics Resource Portal. Disponível em <<http://www.expasy.org/>>. Acessado em: Abril de 2014.

FARRELL, H. M.; COOKE, P. H.; KING, G.; HOAGLAND, P. D.; GROVES, M. L.; KUMOSINSKI, T. F.; CHU, B. (1996). Particle Sizes of Casein Submicelles and Purified κ -Casein. In: (Ed.). **Macromolecular Interactions in Food Technology**: American Chemical Society, 650: 61-79.

FOLTMANN, B. (1969). Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). **Biochem J**, 115: 3-4.

FOLTMANN, B. *et al.* (1977). The complete amino acid sequence of prochymosin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 74: 2321-4.

FOX, P. F. (1988). Rennets and Their Action in Cheese Manufacture and Ripening. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 10: 522-535.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (1997a) Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: LAW, B. A. (Ed.). **Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk**: Springer US. 1: 1-49.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (1998b). **Dairy chemistry and biochemistry**. 1st. London; New York: Blackie Academic & Professional, xiv, p. 478.

GILLILAND, G. L.; WINBORNE, E. L.; NACHMAN, J.; WLODAWER, A. (1990). The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. **Proteins**, 8: 82-101.

GUSTCHINA, E.; RUMSH, L.; GINODMAN, L.; MAJER, P.; ANDREEVA, N. (1996). Post X-ray crystallographic studies of chymosin: the existence of two structural forms and the regulation of activity by the interaction with the histidine-proline cluster of κ -casein. **FEBS Letters**, 379: 60-62.

INVITROGEN. EasySelect *Pichia* Expression Kit. In: Carlsbad, CA: (s.n.)

JIANG, X. P.; YIN, M. L.; CHEN, P.; YANG, Q. (2012). Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28: 2087-2093.

KAPPELER, S. R.; VAN DEN BRINK, H. M.; RAHBK-NIELSEN, H.; FARAH, Z.; PUHAN, Z.; HANSEN, E. B.; JOHANSEN, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 342: 647-654.

KAWAGUCHI, Y.; KOSUGI, S.; SASAKI, K.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. (1987). Production of Chymosin in *Escherichia coli* Cells and Its Enzymatic Properties. **Agricultural and biological chemistry**, 51: 1871-1877.

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V. K. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Crit Rev Biotechnol**, 30: 243-58.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.

LANGHOLM JENSEN, J.; MOLGAARD, A.; NAVARRO POULSEN, J. C.; HARBOE, M. K.; SIMONSEN, J. B.; LORENTZEN, A. M.; HJERNO, K.; VAN DEN BRINK, J. M.; QVIST, K. B.; LARSEN, S. (2013). Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 69: 901-13.

MCCAMAN, M. T.; ANDREWS, W. H.; FILES, J. G. (1985). Enzymatic properties and processing of bovine prochymosin synthesized in *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, 2: 177-190.

MELLEMA, M.; WALSTRA, P.; VAN OPHEUSDEN, J. H.; VAN VLIET, T. (2002). Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. **Adv Colloid Interface Sci**, 98: 25-50.

MIYOSHI, M.; YOON, C.H.; IBUKI, F.; KANAMORI, M. (1976). The characterization of rennin action on kappa-casein using CM-cellulose. **Agricultural and biological chemistry**, 40: 347-352.

MOHANTY, A. K.; MUKHOPADHYAY, U. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. (1999). Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. **Biotechnol Adv**, 17: 205-17.

MOLLER, K. K.; RATTRAY, F. P.; SORENSEN, J. C.; ARDO, Y. (2012). Comparison of the hydrolysis of bovine kappa-casein by camel and bovine chymosin: a kinetic and specificity study. **J Agric Food Chem**, 60: 5454-60.

MOSCHOPOULOU, E. E.; KANDARAKIS, I. G.; ALICHANIDIS, E.; ANIFANTAKIS, E. M. (2006). Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. **J Dairy Res**, 73: 49-57.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. (1988). 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.

NEWMAN, M.; SAFRO, M.; FRAZAO, C.; KHAN, G.; ZDANOV, A.; TICKLE, I. J.; BLUNDELL, T. L.; ANDREEVA, N. (1991). X-ray analyses of aspartic proteinases. IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. **J Mol Biol**, 221: 1295-309.

PITTS, J. E.; UUSITALO, J. M.; MANTAFOUNIS, D.; NUGENT, P. G.; QUINN, D. D.; ORPRAYOON, P.; PENTTILA, M. E. (1993). Expression and characterisation of chymosin pH optima mutants produced in *Trichoderma reesei*. **J Biotechnol**, 28: 69-83.

PONTUAL, E. V.; CARVALHO, B. E.; BEZERRA, R. S.; COELHO, L. C.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, P. M. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chem**, 135: 1848-54.

RABERT, C.; WEINACKER, D.; PESSOA, A., JR.; FARIAS, J. G. (2013). Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. **Braz J Microbiol**, 44: 351-6.

RAMEZANI, F.; SADR MOHAMMAD BEIGI, S.; AHMADIAN, G.; SOUDI, M.; GHANDILI, S. (2013). Heterologous Expression of Bovine Prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. **Iran J Biotech**, 11: 59-63.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (2001). **Molecular cloning: A laboratory Manual**.

SARDINAS, J. L. (1968). Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. **Appl Microbiol**, 16: 248-55.

TICHY, P. J.; KAPRALEK, F.; JECMEN, P. (1993). Improved procedure for a high-yield recovery of enzymatically active recombinant calf chymosin from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Protein Expr Purif**, 4: 59-63.

TUINIER, R.; DE KRUIF, C. G. (2002). Stability of casein micelles in milk. **The Journal of Chemical Physics**, 117: 1290-1295.

USTUNOL, Z.; HICKS, C. L. (1990). Effect of Calcium Addition on Yield of Cheese Manufactured with *Endothia parasitica* Protease1. **J Dairy Sci**, 73: 17-25.

UUSITALO, J. M.; NEVALAINEN, K. M.; HARKKI, A. M.; KNOWLES, J. K.; PENTTILA, M. E. (1991). Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. **J Biotechnol**, 17: 35-49.

VALLEJO, J. A.; AGEITOS, J. M.; POZA, M.; VILLA, T. G. (2008). Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. **J Agric Food Chem**, 56: 10606-10.

VALLEJO, J. A.; AGEITOS, J. M.; POZA, M.; VILLA, T. G. (2012). Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. **J Dairy Sci**, 95: 609-13.

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. (1997). Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin. **Protein Eng**, 10: 991-7.

YOUSIF, B. H.; MCMAHON, D. J.; SHAMMET, K. M. (1996). Milk-clotting enzyme from *Solanum dobium* plant. **International Dairy Journal**, 6: 637-644.

ZHANG, Y.; LI, H.; WU, H.; DON, Y.; LIU, N.; YANG, K. (1997). Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin. **Biochim Biophys Acta**, 1343: 278-86.