



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Expressão heteróloga de duas lipases em *Komagataella phaffii* utilizando promotores constitutivos

Roberta Ferreira Barros

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Brasília

2019

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Expressão heteróloga de duas lipases em *Komagataella phaffii* utilizando promotores constitutivos

Roberta Ferreira Barros

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

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

Brasília, 2019

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Fernando Araripe Gonçalves Torres e com apoio financeiro da CAPES.

Banca Examinadora

Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Universidade de Brasília

Presidente da Banca

Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha

Universidade de Brasília

Membro Efetivo

Professora Dra. Mônica Caraméz Triches Damaso

EMBRAPA Agroenergia

Membro Efetivo

Professora Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Universidade de Brasília

Membro Suplente

“A nossa palida razao esconde-nos o infinito.”

Arthur Rimbaud

Aos meus pais que, mesmo discordando entre si em vários aspectos na vida, sempre tiveram o objetivo comum de oferecer a mim a melhor educação e formação acadêmica que puderam dar. Espero fazer justiça à toda sua dedicação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à minha mãe, Dra. Márcia que, além de ser meu exemplo de cientista e pesquisadora, foi quem me trouxe para Brasília e me colocou em contato com o Prof. Dr. Fernando. E também ao meu pai, Professor Roberto, que sempre me incentivou a sair da minha zona de conforto e ir atrás do que me faz feliz, sem julgamentos. Amo vocês!

Ao Professor Fernando Araripe, meu orientador, que me recebeu em seu laboratório e teve toda paciência em me ensinar e mostrar os caminhos da Biologia Molecular, acreditou em mim, contribuindo com o meu crescimento científico e intelectual.

Às Professoras Lídia, Janice e Viviane por toda a disposição em ensinar e acompanhar as práticas em bancada, ensinando vários “truques” na manipulação de DNA e proteínas.

Um agradecimento mais que especial à Luíza e Ana Laura, minhas coorientadoras não oficiais. Aprendi mais com vocês do que com qualquer livro, artigo ou protocolo. Obrigada pela paciência infinita em responder todas as minhas milhares de perguntas, e por sempre dizerem que tudo ia dar certo, por mais errado que parecesse estar!

Às minhas colegas de mestrado Carol, Dani e Yasmin, obrigada por dividirem comigo os momentos bons e ruins, tanto no laboratório, quanto fora dele. Obrigada pela amizade e pelos conselhos de vida e científicos. Vocês moram no meu coração!

Não tenho nem palavras suficientes para agradecer ao Pedro, pois sem ele não haveria ensaio enzimático nenhum neste trabalho!

Obrigado a todos os amigos do Lab 2: Myrna, Francisco, Tiago, Marciano, Igor, Chris, Vanessa e Júlia, pelos ensinamentos, pelos reagentes emprestados e pela companhia nos cafezinhos na copa! Agradeço também aos técnicos da Biologia Molecular, Thompson e José.

Também gostaria de agradecer ao meu namorado Marcos que, além de ser um grande companheiro, foi um dos meus maiores incentivadores durante

o Mestrado, sempre vindo em meu socorro com planilhas e esquemas de organização quando eu achava que tudo ia dar errado. Obrigada pelas noites tranquilas e pelos cafés-da-manhã reforçados!

Aos membros da banca examinadora pela paciência e disposição de ler, corrigir e contribuir com meu trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

E por último, mas não menos importante, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro durante esses 24 meses.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
ABREVIACÕES.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Komagataella phaffii</i> como sistema de expressão de proteínas recombinantes.....	1
1.2. Promotores para expressão em <i>K. phaffii</i>	2
1.3. Uso de lipases na indústria	5
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
4. ESTRATÉGIA.....	10
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
5.1. MATERIAL	11
5.1.2. Microrganismos.....	11
5.1.3. Meios de cultura.....	11
5.1.4. Tampões e soluções.....	13
5.1.5. Marcadores moleculares.....	17
5.1.6. Enzimas.....	17
5.1.7. Vetores.....	18
5.1.8. Oligonucleotídeos.....	18
5.2. MÉTODOS.....	19
5.2.1. Cultivo de microrganismos.....	19
5.2.2. Preparação de células bacterianas competentes.....	19
5.2.3. Transformação bacteriana por choque térmico.....	19
5.2.4. Preparação de DNA plasmidial em pequena escala.....	20
5.2.5. Preparação de DNA plasmidial em grande escala.....	21

5.2.6. Análise de DNA por eletroforese.....	21
5.2.7. Purificação e eluição de DNA.....	21
5.2.8. Precipitação de DNA.....	21
5.2.9. Transformação em <i>K. phaffii</i> com alta eficiência.....	21
5.2.10. Extração de DNA total de levedura para PCR.....	22
5.2.11. Curva de crescimento.....	22
5.2.12. Crescimento e expressão de proteínas em frasco.....	22
5.2.13. Precipitação de proteínas com TCA.....	22
5.2.14. Análise de proteínas por eletroforese em SDS-PAGE 12%.....	22
5.2.15. Zimograma para lipase com MUF-butirato.....	23
5.2.16. Visualização de proteínas com corante Comassie Blue.....	23
5.2.17. Cinética enzimática.....	23
5.2.18. Análise dos dados.....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	255
6.1. Construção do sistema de expressão.....	25
6.2. Montagem do gene <i>RML</i> por PCR overlap para retirada do sítio de <i>Scal</i> ..	26
6.3. Construção dos vetores pPICTEFRML e pPICGAPRML.....	30
6.4. Construção dos vetores pPICTEFLIPB e pPICGAPLIPB.....	35
6.5. Transformação de <i>K. phaffii</i> e triagem de clones secretores de lipase.....	38
6.6. Curva de crescimento em YNB-glicose.....	42
6.7. Análise em SDS-PAGE 12% e zimograma.....	43
6.8. Ensaio de atividade enzimática.....	46
7. CONCLUSÕES.....	53
8. PERSPECTIVAS.....	535
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	544

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do vetor pPICK2.....	26
Figura 2. Estratégia de PCR overlap para amplificação de <i>RML</i>	27
Figura 3. Amplificação do gene <i>RML</i>	27
Figura 4. Mapa do plasmídeo pPICK2RML.....	30
Figura 5. Digestão do plasmídeo pPICK2RML com XhoI e NotI.	30
Figura 6. Digestão do plasmídeo pPICK2RML com BstBI e BglII.	31
Figura 7. Amplificação de P_{TEF1} e P_{GAP} por PCR.....	32
Figura 8. Mapa do vetor pPICTEFLRML.	33
Figura 9. Mapa do vetor pPICGAPRML	34
Figura 10. Linearização dos plasmídeos pPICGAPRML e pPICTEFRML.....	34
Figura 11. Análise de restrição dos vetores.	35
Figura 12. Purificação do fragmento correspondente ao gene <i>LIPB</i>	35
Figura 13. Mapa do vetor pPICGAPLIPB..	36
Figura 14. Mapa do vetor pPICTEFLIPB.....	37
Figura 15. Análise de restrição dos vetores pPICTEFLIPB e pPICGAPLIPB....	37
Figura 16. Análise da expressão de lipase em placa.	39
Figura 17. Identificação do gene <i>RML</i> por PCR em clones transformados.	41
Figura 18. Curva de crescimento..	42
Figura 19. Análise de proteínas secretadas dos clones recombinantes.....	44
Figura 21. Atividades enzimáticas dos clones recombinantes.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Enzimas de restrição utilizadas.....	17
Tabela 2 Vetores utilizados.....	18
Tabela 3 Primers utilizados para amplificação do gene <i>RML</i>	18
Tabela 4 Primers utilizados para amplificação de <i>P_{TEF1}</i> e <i>P_{GAP}</i>	19

ABREVIACOES

APS - persulfato de amônio

DNA - cido desoxirribonucleico

EDTA - cido etilenodiaminotetracético

EtBr - Brometo de etídio

g - Aceleração da gravidade

eGFP - Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)

KanR - Gene que confere resistência a kanamicina/G418

kb - Quilobase

mRNA - RNA mensageiro

OD600 - Densidade tica a 600 nm

pb - Par de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

p/v - Peso por volume

pNP - para-nitrofenol

RNA - cido ribonucleico

RNase A - Ribonuclease A

rpm - Rotações por minuto

s - Segundo

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TAE - Tampão tris-acetato-EDTA

v - Volume

V - Volt

v/v - Volume por volume

YNB - Yeast nitrogen base

TCA - cido tricloroacético

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina

RESUMO

A levedura metilotrófica *Komagataella phaffii* destaca-se como sistema de expressão de proteínas recombinantes por ser capaz de produzir e secretar grandes quantidades de proteínas em altas densidades celulares, além de realizar modificações pós-traducionais típicas de eucariotos, o que a torna ideal para a produção de biocatalisadores industriais. Atualmente, os promotores constitutivos de *K. phaffii* têm sido pesquisados e testados devido ao interesse na capacidade de transcrição contínua do gene alvo em todas as fases de crescimento do microrganismo. Os promotores constitutivos P_{GAP} e P_{TEF1} , que controlam a expressão dos genes codificadores da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e do fator de alongação da tradução, respectivamente, são considerados eficientes na produção de proteína heteróloga em *K. phaffii*. As lipases são uma classe de enzimas com aplicações na indústria de alimentos, na indústria têxtil, farmacêutica, cosmética, na produção de biodiesel e detergentes, dentre outros. Entre as lipases mais importantes de uso industrial, destacam-se as lipases de *Rhizomucor miehei* (RML) e de *Pseudozyma antarctica* (lipase B/CALB). No presente trabalho, foram construídos novos vetores integrativos com expressão baseada nos promotores P_{GAP} e P_{TEF1} , com o estabelecimento de uma metodologia de clonagem *in vivo* em *E. coli*, que não necessita do uso de enzimas e reagentes específicos. As construções plasmidiais foram usadas para transformar levedura. Foi obtida a produção de RML dirigida pelo promotor P_{TEF1} pela primeira vez em *K. phaffii*, e a CALB foi expressa sob controle dos promotores P_{GAP} e P_{TEF1} . A enzima CALB foi identificada em SDS-PAGE desnaturante como uma banda de aproximadamente 37 kDa presente no sobrenadante e confirmada como lipase em zimograma utilizando o substrato MUF-butilato. Em relação aos ensaios de atividade enzimática nas condições testadas, não foi observada diferença significativa na produção de CALB pelos diferentes promotores.

ABSTRACT

The methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* stands out as a recombinant protein expression system by being able to produce and secrete large amounts of proteins at high cell densities, in addition to performing post-translational modifications typical of eukaryotes, which makes it ideal for production of industrial biocatalysts. Currently, constitutive promoters of *K. phaffii* have been researched and tested because of the interest in its ability to perform the transcription of the target gene at all stages of the growth of the microorganism. The constitutive promoters P_{GAP} and P_{TEF1} , which control the genes of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and the elongation factor of the translation, respectively, are considered efficient in the production of heterologous protein in *K. phaffii*. Lipases are a class of enzymes with applications in the food industry, the textile industry, pharmaceuticals, cosmetics, in the production of biodiesel and detergents, among others. Among the most important lipases for industrial use, the lipases of *Rhizomucor miehei* (RML) and lipase B of *Pseudozyma antarctica* (CALB) stand out. In the present work new integrative vectors were constructed with their expression based on the *TEF1* and *GAP* promoters establishing an *in vivo* cloning methodology in *E. coli*, which does not require the use of enzymes and specific reagents. The plasmids constructed were used to transform yeasts. The production of the *Rhizomucor miehei* lipase was driven by the P_{TEF1} promoter for the first time in *K. phaffii*, and the *Pseudozyma antarctica* lipase was expressed under the control of P_{GAP} and P_{TEF1} . The CALB enzyme was identified on denaturing SDS-PAGE as a band of approximately 37 kDa and confirmed as lipase in zygogram using the MUF-butyrate substrate. In relation to the enzymatic assays performed, under the tested conditions, no significant difference in CALB production was observed by the different promoters.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Komagataella phaffii* como sistema de expressão de proteínas recombinantes

A levedura metilotrófica *Komagataella phaffii* foi introduzida há mais de 40 anos pela Phillips Petroleum para produção comercial de “single cell protein”, como aditivo na alimentação animal, devido ao seu processo fermentativo em alta densidade celular e utilizando o metanol como fonte de carbono (Cregg *et al*, 1985).

Foi apenas quando a Phillips Petroleum, juntamente com o Instituto Biotecnologia Salk/Industrial Associates Inc. (SIBIA, La Jolla, CA, EUA) usaram esta levedura metilotrófica como um sistema para expressão de proteínas heterólogas, com transcrição baseada no promotor P_{AOX1} , que a mesma passou a ser considerada uma escolha bem sucedida para fins acadêmicos e industriais e, atualmente, mais de 500 proteínas foram clonadas e expressas usando esse sistema (Cos *et al*, 2006).

Leveduras metilotróficas como *K. phaffii*, *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha* e *Pichia methanolica* unem os benefícios de um sistema de expressão eucarioto, como secreção eficiente e modificações pós-traducionais, com as propriedades de crescimento desejáveis de organismos unicelulares robustos, crescendo rapidamente em meio mínimo, além de não produzirem endotoxinas intrínsecas ou DNA viral (Joan Lin *et al*, 2000).

K. phaffii apresenta vantagens sobre as demais fábricas celulares pois, além ser capaz de realizar modificações pós-traducionais como glicosilação e adição de pontes dissulfeto, também pode atingir altas densidades celulares e dá preferência ao metabolismo aeróbico em comparação com a fermentação, não produzindo etanol que poderia ser prejudicial ao processo (Eda *et al*. 2012; Potvin, Ahmad & Zhang, 2012).

Atualmente essa levedura tem recebido muito mais atenção por produzir *commodities* químicas e ativos farmacêuticos devido seu padrão de

glicosilação semelhante ao humano (Vogl & Glieder, 2013) e foi classificada como uma linhagem GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA para ser usada na indústria de alimentos (Thompson, 2010).

A produtividade de um sistema recombinante depende de vários fatores genéticos, como o uso de códons no gene expresso, o número de cópias do gene, transcrição eficiente com o uso de promotores fortes, sinais de tradução e a translocação determinada pelo peptídeo sinal de secreção; e também de fatores fisiológicos como o processamento e dobramento da proteína no retículo endoplasmático e no Golgi, a secreção para fora da célula e a otimização da estratégia de fermentação (Hohenblum *et al*, 2004).

No entanto, embora *K. phaffii* tenha sido estabelecida como hospedeira para produção há quase três décadas, a falta de informação genética tem prejudicado significativamente a pesquisa básica, de modo que a maioria das melhorias biotecnológicas se concentrou em meios de cultura e estratégias de fermentação (Gasser *et al*, 2013).

1.2. Promotores para expressão em *K. phaffii*

Os promotores são importantes reguladores da transcrição gênica fornecendo sítios específicos de ligação ao DNA para os fatores de transcrição e para maquinaria que realizará o processo (Riethoven, 2010).

A transcrição inicial do gene de interesse é frequentemente um passo crítico na produção de proteínas heterólogas, tanto em procariontes quanto eucariontes. Portanto, promotores fortes e controláveis são uma ferramenta crucial para a produção eficiente de proteínas heterólogas (Vogl & Glieder, 2013).

O primeiro sistema de expressão para *K. phaffii* foi baseado no promotor do gene da álcool oxidase (P_{AOX1}) que é induzido com uso de metanol, e foi parcialmente responsável pela popularidade desta levedura na produção de proteína heteróloga, razão pela qual grande parte dos trabalhos publicados utilizando *K. phaffii* é focada no uso deste promotor (Piva *et al*, 2017)

O uso de promotores fortemente regulados, como o P_{AOX1} , apresenta algumas vantagens na expressão de proteínas, pois quando a fase de crescimento celular não está atrelada à fase de produção, temos biomassa acumulada antes de produção da proteína. Dessa maneira evita-se estresse por acúmulo de proteína recombinante durante o crescimento, o que inclusive permite a produção de proteínas heterólogas que são tóxicas para *K. phaffii* (Ahmad *et al*, 2014).

No entanto, como este é um promotor que se baseia na utilização do metanol como fonte de carbono, uma substância altamente inflamável e, por consequência, indesejada para fermentações em larga escala, pois a implementação de biorreatores requer grandes medidas de segurança, tornando o processo mais oneroso (Sehoon *et al*, 2013).

Devido à toxicidade do metanol para a *K. phaffii* e para o ser humano, é mais vantajoso que a otimização da levedura como sistema de expressão seja baseada em outros promotores, induzíveis ou constitutivos, especialmente quando é direcionada à produtos alimentícios e farmacêuticos (Spohner *et al*, 2015).

A necessidade do metanol também não se adequa a produção contínua de proteínas recombinantes, pois o cultivo deve ser feito em bateladas. A identificação de promotores fortes, constitutivamente expressos, de utilidade comprovada em fermentações contínuas, continua sendo uma meta importante na indústria de biotecnologia (Cankorur-Cekinawa *et al*, 2018)

Promotores constitutivos simplificam o manejo, preterindo o uso de indutores potencialmente perigosos, e providenciam transcrição contínua do gene de interesse (Cankorur-Cekinawa *et al*, 2018).

Waterham *et al*. (1997) caracterizaram o gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAP) de *K. phaffii* e mostraram que com o uso deste promotor a produção de proteína heteróloga consegue atingir níveis semelhantes aos do P_{AOX1} .

O promotor P_{GAP} é ativo continuamente em várias fontes de carbono, incluindo glicose, glicerol, etanol e ácido oleico (Juturu & Wu, 2018), mesmo

assim, é possível observar um nível de indução deste promotor quando a fonte de carbono utilizada é glicose (Vogl & Glieder, 2013). Os níveis de mRNA do *GAP* foram maiores nas células crescidas com glicose e diminuíram aproximadamente dois terços em glicerol, metade em ácido oleico e um terço em metanol (Waterham *et al*, 1997).

O suprimento de oxigênio também mostrou afetar a produção de proteína heteróloga dirigida por P_{GAP} . Em hipóxia a atividade específica de três diferentes proteínas heterólogas testadas foi aumentada significativamente, enquanto o tempo de produção foi diminuído. Nestes experimentos foi observado que o metabolismo de *K. phaffii* altera-se de respiratório para fermentativo, indicando que condições hipóxicas levam a uma regulação positiva da transcrição de genes da glicólise, como o *GAP* (Baumann *et al*, 2008).

O uso desse promotor não requer a adição de metanol, portanto não se faz necessária a troca de fonte de carbono durante a fase de crescimento e no processo de indução. Essa característica facilita a implementação do cultivo e apresenta-se como uma ótima opção para a execução em cultivo contínuo (Vassileva *et al*, 2000).

Recentemente, novos promotores constitutivos têm sido desenvolvidos e estudados para *K. phaffii* como alternativa ao P_{GAP} , como o promissor P_{TEF1} que já foi estudado em vários fungos, como *Ashbya gossypii*, *Aspergillus oryzae* e *Yarrowia lipolytica*, e apresentou uma expressão constitutiva forte, adequada para a produção de proteínas heterólogas (Vogl & Glieder 2013). O fator 1- α de alongação é um componente crucial da maquinaria de tradução em eucariotos, fazendo a mediação da entrega de aminoacil tRNA ao ribossomo para manter a alongação da cadeia de peptídeos (Proud, 1994).

Em relação aos níveis de expressão para P_{TEF1} , foi observada forte atividade promotora capaz de produzir proteínas recombinantes em níveis semelhantes ou até mesmo superiores aos produzidos pelo P_{GAP} , e especialmente uma atividade promotora mais forte em sistema alimentado em batelada com limitação de carbono (Ahn *et al.*, 2007).

O promotor P_{TEF1} de *K. phaffii* já foi usado para expressão de CALB e eGFP com diferentes peptídeos sinais (Liang *et al.*, 2013), lipase de *Bacillus stearothermophilus* (Ahn *et al.*, 2007), anticorpo humano Fab-3H6 (Cankorur-Cekinawa *et al.*, 2018) e HSA (Stadlmayr *et al.*, 2010).

1.3. Uso de lipases na indústria

De acordo com a definição atual, as lipases são enzimas que hidrolisam os triglicerídeos emulsionados. Devido ao amplo campo de aplicações biotecnológicas dessas enzimas, essa definição está se tornando insuficiente, e uma nova e mais abrangente é necessária (Lopes *et al.*, 2011).

Duas classes principais de hidrolases são de extrema importância: as esterases (EC 3.1.1.1, hidrolases de éster carboxílico) e as lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolases) (Bornscheuer, 2002).

As esterases hidrolisam preferencialmente ésteres simples e geralmente apenas triglicérides compostos por ácidos graxos com menos de 6 carbonos (Bornscheuer, 2002).

As lipases são principalmente ativas contra substratos insolúveis em água, como os triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa podendo catalisar uma série de reações de síntese, além da hidrólise de lipídeos, como esterificações, transesterificações (acidólise, alcoólise e interesterificação), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) (Joseph, Rametek & Thomas, 2008).

As lipases também podem ser distinguidas das esterases pelo fenômeno de ativação interfacial, que é observado apenas para lipases (Bornscheuer, 2002). Elas exibem um subdomínio móvel chamado de tampa, que controla o acesso das moléculas do substrato ao centro catalítico. Esse domínio é capaz de adotar duas conformações distintas: fechada, quando o sítio ativo não está acessível ao solvente e a lipase é, sobretudo, hidrofílica e aberta, revelando uma grande superfície hidrofóbica, o que torna a enzima ativa (Bordes *et al.*, 2010). Esse rearranjo conformacional está relacionado com o fenômeno da

ativação interfacial e a concentração micelar crítica do substrato (Jaeger & Reetz, 1999).

A característica mais proeminente das lipases como biocatalisadores para a indústria é sua elevada especificidade na formação de produtos e propriedades de regio, quimio e enantiosseletividade (Joseph, Rametek & Thomas, 2008).

O número de lipases disponíveis aumentou desde os anos 80 e este resultado vem principalmente dos enormes avanços biotecnológicos na clonagem e expressão de enzimas de microrganismos, mas também da crescente demanda por estes biocatalisadores com aprimoramentos nas propriedades de especificidade, estabilidade, pH e temperatura (Bornscheuer *et al*, 2002).

Suas aplicações vão desde modificações de alimentos, formulação de detergentes, uso nas indústrias têxtil, de couro, papel, cosméticos e farmacêuticos, como na produção de biodiesel e biopolímeros e também no pré-tratamento de efluentes contaminados por lipídeos (Sharma, Chisti & Banerjee, 2001). Uma detalhada revisão com as mais variadas aplicações das lipases, entre outras enzimas, foi publicada em 2016 por Singh *et al*.

As lipases são produzidas por animais, plantas e microrganismos, mas as lipases microbianas ganharam especial atenção industrial devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade de substrato (Dutra *et al*, 2008).

A maioria das lipases comercialmente importantes produzidas por fungos são reconhecidas como pertencentes aos gêneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.* e *Rhizomucor sp* (Thakur, 2012).

A lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* (RML) é um biocatalizador altamente versátil com aplicações laboratoriais e industriais.

Esta enzima extracelular de 31.6 kDa (GenBank accession No. AO2536) foi descrita pela primeira vez em 1973, sendo a primeira lipase cuja estrutura

foi resolvida e, atualmente, duas formas da enzima, Palatase 2000 L na forma livre e Lipozyme RM IM na forma imobilizada, estão disponíveis comercialmente pela Novozymes (Rodrigues *et al*, 2010).

Devido à sua forte especificidade, a RML tem sido amplamente utilizada para a hidrólise e síntese de ésteres e em reações de transesterificação, e na produção de lipídios estruturais (Palla, Pacheco & Carrin, 2012).

Entre as lipases produzidas por leveduras, estão aquelas provenientes principalmente dos gêneros *Candida sp*, *Pichia sp*, *Geotrichum sp* e *Yarrowia lipolytica*. As lipases de *C. rugosa* e *Pseudozyma (Candida) antarctica* têm sido amplamente utilizadas em diferentes campos (Thakur, 2012).

A lipase de *Pseudozyma antarctica* (anteriormente conhecida como *Candida antarctica*), CALB, foi primeiramente purificada a partir da secreção de isolados dos sedimentos do Lago Vanda, Victoria Land, na Antártica (Patkar *et al*, 1993). O uso da lipase CALB em biocatálise tem aumentado constantemente nos últimos anos, sendo uma das enzimas mais amplamente utilizadas e estudadas (Yang *et al*, 2013).

Hoje, as lipases A e B dessa levedura pertencem aos mais importantes biocatalizadores industriais, com numerosas aplicações na indústria olequímica e de polímeros, na indústria têxtil, e na fabricação de biodiesel e detergente. A excelente enantiosseletividade da CALB para uma ampla gama de compostos quirais torna-a destaque entre os biocatalizadores mais aplicados (Kourist, 2014).

Desde que o gene foi inicialmente clonado, a CALB foi expressa com sucesso em uma série de hospedeiros, como *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae* e *K. phaffii* (Yang *et al*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por lipases como biocatalisadores industriais tem impulsionado o aprimoramento na produção heteróloga dessas enzimas. Dentre os sistemas de expressão recombinante, a levedura *K. phaffii* destaca-se por sua capacidade em alcançar altos níveis de densidade celular e de secreção de proteínas com modificações pós-traducionais. No entanto, o principal promotor usado para expressão de proteína é o P_{AOX1} induzido pelo metanol, substância indesejada no cultivo em larga escala. Diante disso a busca por novos promotores é essencial para o estabelecimento definitivo da levedura para a produção de biocatalisadores. Entre os promotores destacam-se aqueles de expressão constitutiva pela possibilidade da produção contínua de proteína heterólogas, como P_{GAP} e P_{TEF1} , em detrimento da produção em batelada que exige maior complexidade no manejo.

3. OBJETIVOS

I. Objetivo Geral:

O presente trabalho teve como objetivo geral construir vetores de expressão para a produção em *K. phaffii* de duas lipases industriais importantes, RML, de *R. mieheji*, e CALB, de *P. antarctica*, sob controle dos promotores constitutivos P_{GAP} e P_{TEF1} .

II. Objetivos específicos:

- Construir plasmídeos integrativos com a expressão dos genes *RML* e *CALB* baseada em P_{GAP} e P_{TEF1} utilizando o plasmídeo pPICK2 como base
- Transformar o vetor na levedura *K. phaffii* e selecionar clones que expressem as lipases em meio contendo tributirina
- Analisar a secreção das lipases em sobrenadante através de gel desnaturante e zimograma
- Comparar a produção de lipase entre os promotores testados

4. ESTRATÉGIA

- 1 • Amplificação do gene *RML* por PCR overlap para retirada do sitio de restrição *Scal*
- 2 • Clonagem do gene *RML* no plasmídeo pPICK2
- 3 • Amplificação dos fragmentos P_{TEF1} e P_{GAP1} a partir do DNA genômico de *K. phaffii* X-33
- 4 • Clonagem de P_{TEF1} e P_{GAP1} no vetor pPICK2RML originando pPICTEFRML e pPICGAPRML
- 5 • Construção dos vetores pPICTEFLIPB e pPICGAPLIPB a partir da retirada do gene *RML* e clonagem do gene *LIPB*
- 6 • Transformação em *K. phaffii* X-33
- 7 • Seleção de clones secretores de lipase em tributirina
- 8 • Identificação da lipase em zimograma e SDS-PAGE corado com Comassie
- 9 • Ensaio de atividade enzimática em sobrenadante

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. MATERIAL

5.1.1. MICRORGANISMOS

- Bactérias:

Escherichia coli XL10-Gold (Agilent Technologies, EUA): Tetr $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMRmrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIq Z\Delta M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]$

Escherichia coli DH5 α (NEB): *fhuA2 \Delta(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 \Phi80\Delta (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

- Levedura:

Komagataella phaffii X-33 *his4::HIS4* (derivada da linhagem GS115) (Invitrogen, EUA).

5.1.2. MEIOS DE CULTURA

- Meio Luria-Bertani – LB

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

Peptona 1% (p/v)

NaCl 1% (p/v).

O pH foi ajustado para 7,2. Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v).

- SOB

Triptona 20 g/L

Extrato de levedura 5 g/L

NaCl 0,6 g/L

KCl 0,5 g/L

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

Foram feitas soluções de MgCl₂ e MgSO₄ na concentração de 1 M e filtradas com membrana de 0,22 µm e foram adicionadas para a concentração final de 10 mM.

- YPD

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v).

- MD (Meio Mínimo com Dextrose)

YNB com sulfato de amônio 1,34% (p/v)

Biotina 4x10⁻⁵% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v)

- MD ágar com tributirina

YNB 10x 1% (p/v)

Biotina 4x10⁻⁵% (p/v)

Glicose 2%

Tampão Fosfato 100 mM

Tributirina 0,5%

Ágar 2%

- YPD ágar com tributirina

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Ágar 2%

Tampão fosfato 100 mM

Tributirina 0,5%

5.1.3.TAMPÕES E SOLUÇÕES

Soluções estoque para meios de cultura

- Solução YNB 10X com sulfato de amônio
YNB w/o Amino Acids/Ammonium Sulphate (Difco) 3,4% (p/v)
(NH₄)₂SO₄ 10% (p/v)
Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- Glicose 20X
Glicose 40% (p/v)
- Biotina 500X
Biotina 0,02% (p/v)
Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- Tampão Fosfato
KH₂PO₄ 1M
K₂HPO₄ 1M
Para 100 ml de tampão fosfato misturou-se 13,2 ml de K₂HPO₄ 1 M com 86,8 ml de KH₂PO₄ 1 M. O pH foi ajustado para 6,0 e 7,0.

Antibióticos

- Solução de kanamicina (1000X)
Solução de kanamicina 50 mg/mL. Dissolvida em água Milli Q e esterilizada por filtração.
- Solução de G418 (100X)
Solução de G418 50 mg/mL. Dissolvida em água Milli Q e esterilizada por filtração

Soluções para células bacterianas competentes

- Tampão de transformação I

RbCl 12 g/L

MnCl₂·4H₂O 9,9 g/L

Acetato de potássio 0,03 M

CaCl₂·2H₂O 1,5 g/L

Glicerol 150 g/L

O pH foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2 M e, a solução esterilizada por filtração.

Foi utilizado acetato de potássio a partir da solução estoque 1 M (pH 7,5) ajustado com ácido acético glacial) esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- Tampão de transformação II

MOPS 0,02 M

RbCl 1,2 g/L

CaCl₂ 11 g/L

Glicerol 150 g/L

O pH foi ajustado com NaOH para 6,8 e a solução esterilizada por filtração.

Foi usada uma solução estoque estéril de MOPS 1 M com o pH ajustado para 6,8 utilizando NaOH.

Soluções para extração de DNA plasmidial (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 sódio 3 M
Ácido acético 2 M
O pH foi ajustado para 5,0.

Soluções para eletroforese em gel de agarose

- Brometo de Etídio EtBr 10 mg/mL
- Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X
Tris-Acetato 2 M
EDTA 0,05M (pH 8,0).
- Tampão de amostra
Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye

Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida

- Acrilamida:bisacrilamida (29:1)
Acrilamida 29% (p/v)
Bisacrilamida 1% (p/v)
- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
- Tris-HCl 1 M pH 6,8
- SDS 10% (p/v)
- Persulfato de amônio 10% (p/v) Armazenado a -20°C.
- Tampão de amostra desnaturante 5X
Tris-HCl 60 mM pH 6,8
SDS 2% (p/v)
 β -Mercaptoetanol 14,4 mM
Glicerol 25% (p/v)
Azul de bromofenol 0,1% (p/v)

- Tampão de corrida Tris-Glicina 5X

Tris 16,7 g/L

Glicina 104,5 g/L

SDS 0,5% (p/v)

Solução para revelação de Zimograma

- Solução para zimograma com MUF-butirato

MUF-butirato 100 µm

Tampão fosfato 50 mM pH 7,0

Revelação de proteínas por coloração do gel com Azul de Coomassie

- Solução corante com Coomassie

Coomassie brilliant blue G-250 0,25% (p/v)

Metanol 30% (v/v)

Ácido acético glacial 7% (p/v)

- Solução descorante

Metanol 30% (v/v)

Ácido acético glacial 7% (p/v)

Soluções para análise de atividade enzimática

- Solução A

pNP éster $9,6 \times 10^{-6}$ M

Isopropanol

- Solução B

Tampão fosfato 50 mM pH 7,0

Goma Arábica 1,11g/L

Triton X-100 4,44 g/L

- Solução C

Misturar Solução B com Solução A na proporção 9:1

5.1.4. MARCADORES MOLECULARES

Para DNA

- TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)
- DNA Ladder 1KB PLUS (NEB)
- 1kb DNA Ladder (Promega)
- 1kb DNA Ladder (Sinapse)

Para proteína

- Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher)

5.1.5. ENZIMAS

Para PCR

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- GoTaq® DNA Polymerase (Promega)

Para ligação

- Ligase T4 (NEB Biolabs)

Enzimas de restrição

TABELA 1. Enzimas de restrição utilizadas.

ENZIMA	SÍTIO	TAMPÃO	T (°C)
SlaI	CTCGAG	NEB3	37
NotI	GCGGCCGC	NEB3	37
BstBI	TTCGAA	NEB4	65

TABELA 4. Primers utilizados para amplificação de P_{TEF1} e P_{GAP}

PRIMERS	SEQUÊNCIA (5'→3')
GAPBSTB	AATCTCATCGTTTTCGAAATAGTTGTTCAATTGATTG
BGL2GAP	TCATGAGATCAGATCTTTTTTGTAGAAATG
TEFBSTB	AATCTCATCGTTTTCGAACGAATAACTAAAATGTATG
BGL2TEF	TCATGAGATCAGATCTATAACTGTCGCCTCTTTTATC

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Cultivo de microrganismos

Para bactérias a temperatura de cultivo foi de 37 °C e as leveduras foram cultivadas a 28 °C. Para ambos os casos, a velocidade de agitação usada foi de 200 rpm quando em meio líquido.

5.2.2. Preparação de células bacterianas competentes

Células de *E. coli* XL10-Gold ou DH5 α foram semeadas em meio LB ágar e incubadas a 37 °C durante a noite. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB em Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 37 °C sob agitação por 16 h. Dois mililitros do pré-inóculo foram inoculados em 100 mL de meio SOB em um Erlenmeyer de 500 mL e incubados a 37 °C sob agitação por aproximadamente 1 hora, até atingir a OD₆₀₀ necessária de 0,3. A cultura foi resfriada por 15 minutos em banho de água e gelo para posteriormente, as células serem coletadas através de centrifugação a 3.000 x g por 5 min a 4 °C. O precipitado foi ressuscitado em 32 mL de tampão de transformação I e incubado no gelo por 15 minutos. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação sob as mesmas condições e ressuscitadas em 4 mL de tampão de transformação II. Ao final foram feitas alíquotas de 100 μ L que foram armazenadas a -80°C.

5.2.3. Transformação bacteriana por choque térmico

Em uma alíquota de células competentes foram adicionados 10 μ L do sistema de ligação. As células foram incubadas no gelo por 30 minutos e posteriormente foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 90 segundos. Foram adicionados 900 μ L de meio LB ao sistema, que foi incubado a 37 °C

por 1 hora. As células foram semeadas em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de kanamicina.

5.2.4. Extração de DNA plasmidial em pequena escala

Para extração de plasmídeos de células bacterianas em pequena escala foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook *et al* (2001), com adaptações. Cinco mililitros de meio LB contendo o antibiótico adequado foram inoculados com uma colônia transformante e incubados a 37 °C por 16-18 horas sob agitação. Três mililitros da cultura foram coletados por centrifugação a 10.000 x *g* por 2 minutos e o precipitado de células foi ressuscitado em 200 µL de solução I. Em seguida, foram adicionados 360 µL de solução II recém-preparada; a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de solução III gelada, a mistura homogeneizada e incubada no gelo por 5 minutos. Após esse tempo a amostra foi concentrada por centrifugação a 10.000 x *g* por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 µL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e submetida a centrifugação a 10.000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200 µL de solução I. Em seguida, foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e a mistura homogeneizada vigorosamente seguindo-se centrifugação a 10.000 x *g* por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 µL de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 10.000 x *g* por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% seguido de uma nova centrifugação a 10.000 x *g* por 2 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi seco à temperatura ambiente.

O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água Milli Q contendo RNase A (0,1 mg/mL) e incubado a 37 °C por 15 minutos. O DNA foi armazenado a -20 °C

5.2.5. Extração de DNA plasmidial em grande escala

Foi utilizado o kit de extração de plasmídeo Wizard Plus Midipreps DNA Purification System da Promega, de acordo com as indicações do fabricante.

5.2.6. Análise de DNA por eletroforese

A análise de DNA por eletroforese foi feita de acordo com Sambrook *et al* (2001), com adaptações. O gel foi feito utilizando tampão TAE 1X com uma concentração de 1% de agarose e 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma diferença de potencial provocando a migração e separação dos fragmentos de DNA. A visualização de bandas foi feita com a exposição do gel à luz ultravioleta.

5.2.7. Purificação e eluição de DNA

A purificação de DNA proveniente de reações de PCR, assim como de bandas provenientes de géis de agarose, foi feita com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

5.2.8. Precipitação de DNA

O DNA foi precipitado adicionando acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Após incubação a -20 °C por 16 horas, o sistema foi coletado por centrifugação a 10.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10.000 x *g* por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e depois de completamente seco o precipitado foi ressuscitado em 10 µL de água Milli Q.

5.2.9. Transformação em *K. phaffii* com alta eficiência

A transformação por eletroporação foi realizada de acordo com Letvhworth *et al* (2004). As células foram semeadas em YPD ágar com o antibiótico de seleção.

5.2.10. Extração de DNA total de leveduras para PCR

Protocolo realizado de acordo com Looke *et al* (2011) com modificações. Uma colônia isolada foi ressuscitada em 100 µL de solução de lise (acetato

de lítio 200 mM e SDS 1% foram utilizadas solução estoque de acetato de lítio 2M e SDS 10%). Foram incubadas a 70°C por 15 minutos. Depois, adicionou-se 300 µL de etanol 100% e a amostra foi submetida à agitação vigorosa. Após centrifugação a 15000 x g por 3 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 100 µL de água. Utilizar 1 µL da solução para a PCR.

5.2.11. Curva de crescimento

Foram feitos pré-inóculos em 500 µL de meio MD líquido em placa tipo “deep-well”, crescidos por 24 horas sob agitação a 28 °C. A análise de crescimento de levedura foi então realizada com o Espectrofotômetro de Microplacas Epoch™ (BioTek) em placas de 96 poços, utilizando 200 µL de meio MD, a 28°C sob agitação durante 96 horas. As leituras em 600 nm foram feitas a cada 2 horas.

5.2.12. Crescimento e expressão de proteínas em frasco

Uma colônia da levedura foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada a 28 °C por 16 h. O volume apropriado dessa cultura foi inoculado em 100 mL de meio YPD para começar a expressão com uma OD₆₀₀ de 0,05. A nova cultura foi incubada a 28 °C durante 72 horas e amostras foram coletadas a cada 24h de crescimento e a OD₆₀₀ era medida. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado para os ensaios enzimáticos.

5.2.13. Precipitação de proteínas com TCA

As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas com 250 µL de TCA 100% adicionados a 1 mL do sobrenadante. A mistura foi incubada a -20 °C durante a noite para depois ser centrifugada a 14000 x g por 15 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com acetona 100%. Ao final, o precipitado foi ressuscitado em 10 µL de tampão de amostra 5X, diluído em Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) para 1X, e fervido por 5 minutos em banho seco para aplicação em gel de poliacrilamida desnaturante SDS PAGE.

5.2.14. Análise de proteína por eletroforese em SDS PAGE 15%

Para separação eletroforética de proteínas foi utilizado o sistema SDS-PAGE na concentração de 15%. Foi utilizado um sistema de cubas verticais de eletroforese (BioRad, EUA). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão 1X com uma voltagem inicial de 80 V e depois de 200 V.

5.2.15. Zimograma para lipase com MUF-butirato

Após a eletroforese em SDS PAGE, incubar o gel em solução Triton 100-X 2,5% (p/v) a 25 °C por 30 minutos, sob agitação. Passados os 30 minutos lavar brevemente com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e cobrir com substrato MUF-butirato 100 mM. As bandas podem ser visualizadas em luz UV em menos de 15 minutos de reação.

5.2.16. Visualização de proteínas com corante Comassie Blue

O gel foi incubado na solução corante por no mínimo 1 hora sob agitação, seguido de incubação na solução descorante, sob agitação, até o aparecimento das bandas.

5.2.17. Ensaio enzimático

Realizada de acordo com a metodologia descrita por Winkler e Stuckmann (1979) com modificações, conforme descrito abaixo. O método de ensaio colorimétrico foi adaptado para utilização de microplacas ao invés de cubetas para a leitura. O *p*NP butirato é diluído em isopropanol para a solução A estoque e, para a realização do ensaio, é adicionada numa proporção de 1:9 na solução B a base de tampão fosfato pH 7,0, goma arábica e Triton 100-X. Cento e oitenta microlitros de Solução C (solução A mais solução B) foram adicionados com pipeta multicanal em 20 microlitros de sobrenadante. A leitura foi feita no modo Cinética Enzimática, de coluna em coluna, cada 20 segundos durante 10 minutos, no SPECTRAMax® (Molecular Devices) a 40°C. A atividade foi calculada comparando os valores da amostra com a curva padrão plotada com diferentes concentrações de *p*-nitrofenol. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*NP por minuto nas condições do ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para análise estatística.

5.2.18. Análise de dados

Os dados coletados para a curva de crescimento e atividade enzimática foram analisados no Excel do Microsoft Office 365 Home e GraphPad Prism 8.0.1

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Construção do sistema de expressão

Para expressão de proteínas heterólogas em *K. phaffii* é muito importante o desenho adequado de um sistema recombinante que inclui, além da escolha da linhagem hospedeira, o plasmídeo, promotor, marca de seleção e peptídeo sinal, pois todos esses fatores alteram-se com a proteína de interesse a ser expressa, e sua aplicação final (Juturu & Wu, 2018).

O plasmídeo utilizado para a realização deste trabalho foi o pPICK2 (Fig. 1), um vetor integrativo que possui um fragmento de 620 pb do promotor P_{PGK1} de *K. phaffii*.

A marca de seleção para bactéria e levedura usada foi gene *kan*, expresso pelo P_{TEF1} de *Saccharomyces cerevisiae*. Embora contribua para o aumento do tamanho do plasmídeo, esta marca oferece a vantagem de permitir o uso dos antibióticos kanamicina e G418 para a propagação de vetores bacterianos e para transformação em leveduras, respectivamente. Esses antibióticos são mais baratos que a zeocina, marca de seleção dominante geralmente presente nos plasmídeos comerciais. Além disso, os transformantes de levedura portadores de múltiplos vetores integrados podem ser identificados por triagem de clones resistentes às concentrações progressivamente mais altas de G418 (Arruda *et al*, 2016).

Quando clonado no sítio de XhoI presente em pPICK2, o sinal de secreção fator- α de *S. cerevisiae*, otimizado para *K. phaffii*, é regenerado.

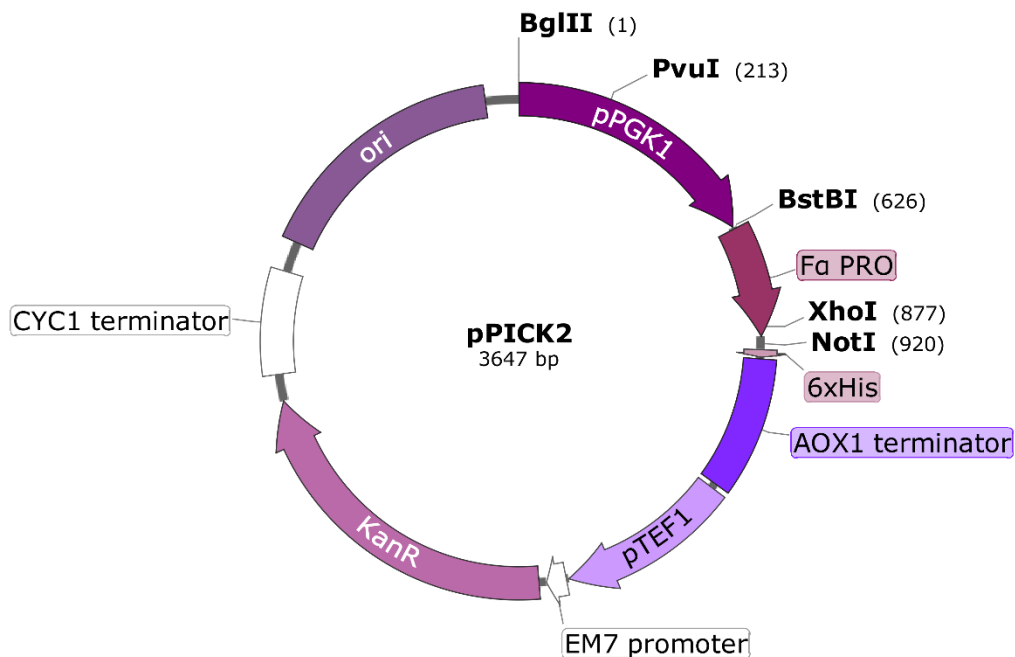


FIGURA 1. Mapa do vetor pPICK2. Os principais sítios de restrição estão indicados. Ori: origem de replicação; P_{PGK1}: promotor da fosfoglicerato quinase de *K. phaffii* para a transcrição de proteína heteróloga; α -PRO: sinal de secreção de *S. cerevisiae* otimizado para *K. phaffii*; 6xHis: Cauda de histidina; AOX1 terminator: terminador da transcrição do gene AOX1; P_{TEF1}: promotor do fator de alongação da tradução de *S. cerevisiae* para transcrição da marca de seleção para levedura; EM7 promoter: promotor da transcrição da marca de seleção em bactéria; KanR: marca de seleção dominante; CYC1 terminator: terminador da transcrição do gene CYC1.

6.2. Montagem do gene *RML* por PCR *overlap* para retirada do sítio de *Scal*

O gene que codifica para RML possui um sítio de *Scal* que também está presente no fragmento do promotor *TEF1*. Este sítio de restrição será usado na linearização do vetor e integração do fragmento na região do promotor do *TEF1* nativo de *K. phaffii*. Para a retirada deste sítio no gene *RML*, foram construídos 4 *primers* que amplificam o fragmento correspondente presente no plasmídeo pPirRML.

Os pares de *primers* utilizados foram AlfaO-RML-F com RML-1 originando um fragmento de 713 pb e, RML-2 com RMLRec-R que amplifica um fragmento de 186pb. Esses fragmentos passarão a servir de *primers* para a amplificação da RML a partir do plasmídeo retirando o sítio de *Scal*, pois os primer RML -1 e RML-2 possuem uma região de homologia que substitui

apenas uma base, destruindo o sítio de *ScaI*, sem alterar o aminoácido codificado (Fig. 2). Como produto foi obtido um fragmento de 880pb (Fig. 3).

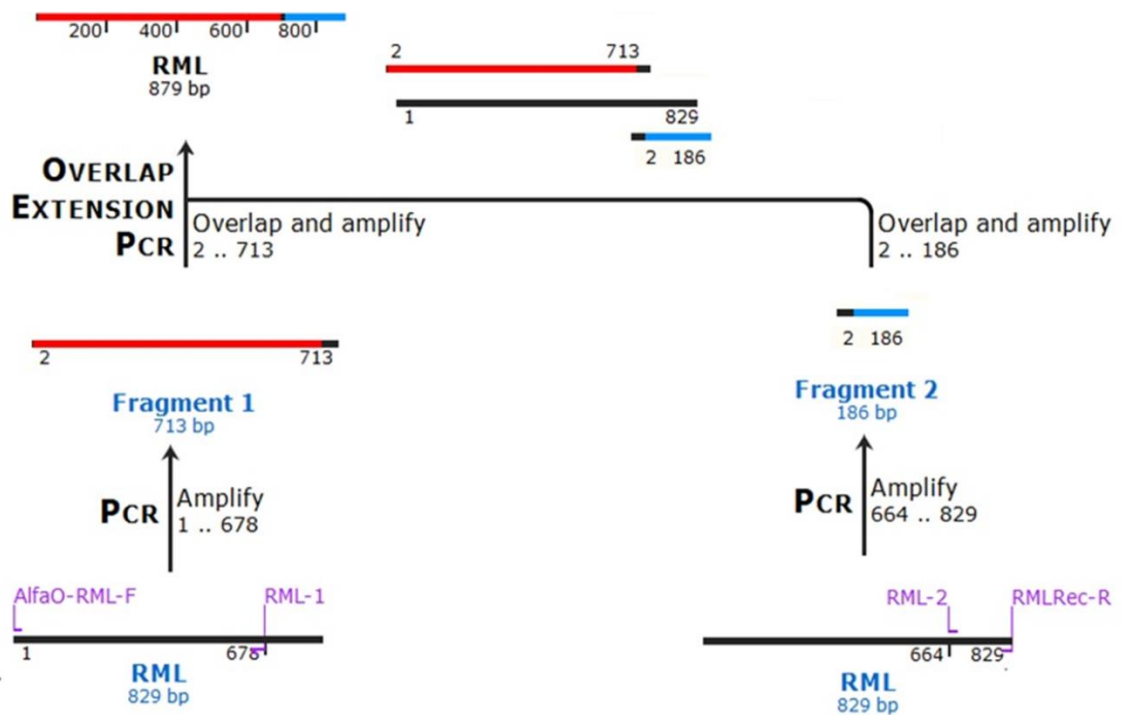


FIGURA 2. Estratégia de PCR overlap para amplificação de *RML*. Os quatro primers participam de uma mesma reação. Amplificando fragmentos do gene, um com 713 pb e outro com 186 pb. Estes passam a agir como primers, anelando-se ao vetor, que contém o gene *RML*, amplificando o fragmento desta vez por inteiro.

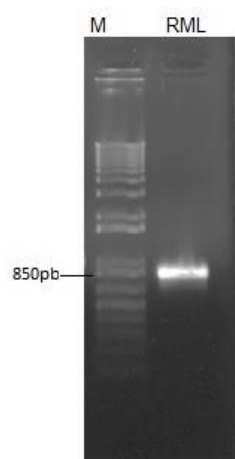


FIGURA 3. Amplificação do gene *RML*. Gel de eletroforese 1% para identificação da banda correspondente a *RML*, fragmento de aproximadamente 880pb. Marcador utilizado TrackIt 1 kb Plus ThermoFisher.

Para a clonagem de *RML* no plasmídeo pPICK2 foi utilizada a técnica de recombinação homóloga *in vivo*, em células de *E. coli* DH5 α .

A maneira clássica de construir plasmídeos recombinantes é através da preparação *in vitro*, sendo a etapa de transformação apenas uma forma de amplificação do vetor. A montagem precisa de sequências de DNA em plasmídeos é uma tarefa essencial na pesquisa em biociência, mas, embora várias técnicas de clonagem molecular tenham sido desenvolvidas, muitos desses métodos requerem reagentes caros especiais ou procedimentos experimentais trabalhosos que limitam sua aplicação.

Uma abordagem diferente seria explorar a maquinaria enzimática intracelular natural para produzir moléculas de DNA recombinante (Bubeck, Winkler & Bautsch 1993).

Fragmentos de PCR e vetores lineares contendo extremidades sobrepostas podem ser montados em um plasmídeo por recombinação homóloga em *E. coli*. Embora essa abordagem de clonagem de reparo seja direta, sua existência é praticamente desconhecida para a maioria dos biólogos moleculares (Jacobus & Gross, 2015).

Em 1985 Watt *et al* descreveu que, para realização de recombinação com sucesso em *E. coli*, faz-se necessário um mínimo de aproximadamente 20 pares de bases completamente homólogas em um segmento, e que há um aumento exponencial na frequência de recombinação quando o comprimento do DNA homólogo é aumentado de 20 pares de bases para 74 pares de bases, e um aumento aparentemente linear com segmentos de DNA ainda mais longos.

No entanto, oligonucleotídeos longos adicionam uma carga significativa na preparação do fragmento de DNA. Além de aumentarem o custo do *primer*, também pode gerar erros na sequência do oligonucleotídeo sintetizado e fragmentos de DNA indesejados. De acordo com Huang, Spangler & Huang (2017) oligonucleotídeos com 25 pb de homologia são recomendados para clonagem *in vivo* geral, embora possam ser utilizadas extremidades homólogas

tão curtas quanto 9 pb de homologia para a clonagem de até dois fragmentos de DNA em plasmídeos pequenos.

Em *E.coli* DH5 α a amplificação estável do DNA é assegurada pela eliminação da atividade da endonuclease não específica I (*endA1*) e a atividade de recombinação do DNA (*recA1*) é reduzida nessas células. As cepas de *E. coli* debilitadas para recombinação, no entanto, retêm atividade de recombinase suficiente para montagem in vivo de fragmentos de DNA com extremidades homólogas (Huang, Spangler & Huang 2017).

Com uma relação de inserto para vetor de 2:1, maiores números de formação de colônia são obtidos quando a quantidade de vetor está na faixa de 100 a 250ng (Jacobus & Gross, 2015).

Essa técnica foi demonstrada com sucesso em trabalhos onde foram testadas diferentes variáveis envolvidas no processo, desde o número de bases homólogas mínimas para uma melhor eficiência (Huang, Spangler & Huang, 2017; Bubeck, Winkler & Bautsch, 1993), quantidade de fragmentos a serem ligados (Jacobus & Gross, 2015; Cao *et al*, 2014) e tamanho do plasmídeo (Huang, Spangler & Huang 2017; Jacobus & Gross, 2015).

Para a clonagem do gene *RML*, o vetor foi linearizado com as enzimas XhoI e NotI (Fig. 4. e 5.). Os oligonucleotídeos usados para sua amplificação adicionaram, em cada extremidade, 15 pb de homologia em relação ao plasmídeo pPICK2. Para a reação de ligação em 20 μ L de volume total, foram adicionados inserto e vetor na proporção de 2:1, sendo a quantidade de vetor na faixa de 100 ng. Para a transformação em *E. coli* DH5 α foram utilizados apenas 5 μ L dessa reação.

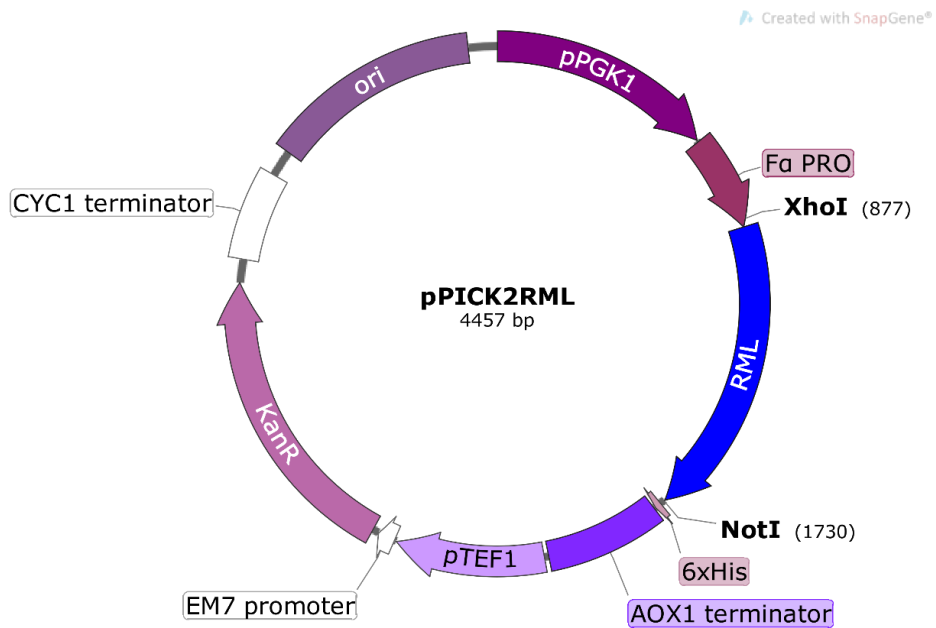


FIGURA 4. Mapa do plasmídeo pPICK2RML. Os principais sítios de descrição estão indicados.

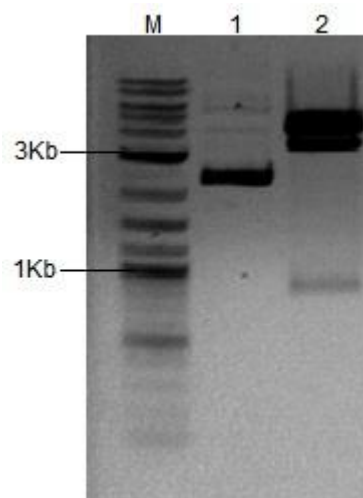


FIGURA 5. Digestão do plasmídeo pPICK2RML com XhoI e NotI. Amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1%. M - Marcador DNA Ladder NEB 1 kb PLUS; 1 - Plasmídeo pPICK2RML intacto; 2 - plasmídeo pPICK2RML digerido com XhoI e NotI apresentando uma banda menor que 1 kb, correspondente ao gene *RML*, uma banda entre 3 kb e 4 kb corresponde ao vetor sem o gene *RML* e uma banda de mais de 4 kb indicando digestão incompleta do plasmídeo.

6.3. Construção dos vetores pPICTEFRML e pPICGAPRML

Foram construídos vetores contendo cada um dos promotores avaliados, P_{TEF1} e P_{GAP} , substituindo-se o P_{PGK1} no vetor pPICK2RML pela digestão dos sítios BglII e BstBI (Fig. 6) .

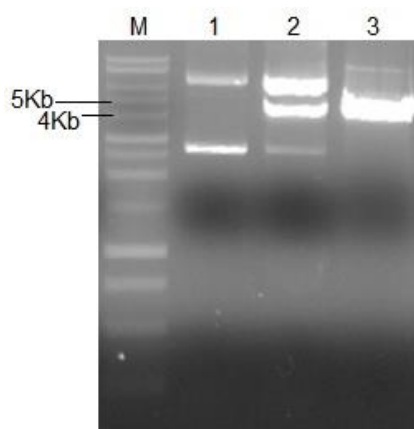


FIGURA 6. Digestão do plasmídeo pPICK2RML com BstBI e BglII. M: 1Kb Plus; 1- pPICK2RML intacto; 2:pPICK2RML digerido com BglII e 3-pPICK2RML digerido com BstBI.

O plasmídeo pPICK2RML foi digerido com BstBI e o produto foi precipitado para retirada do tampão. Depois foi submetido à uma segunda digestão com BglII, e o fragmento foi purificado do gel.de agarose.

O plasmídeo resultante, pPICRML, foi usado para a clonagem dos fragmentos dos promotores P_{TEF1} e P_{GAP1} .

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP) é uma enzima chave na glicólise, sendo o P_{GAP} um forte promotor constitutivo (Zhang *et al*, 2009). Este promotor foi isolado por Waterham em 1997 e desde então tem sido usado para expressão constitutiva de algumas proteínas heterólogas. A empresa Invitrogen comercializa vetores de expressão baseada no P_{GAP} , tanto para a produção de proteínas intracelulares, quanto para proteínas secretadas.

Algumas lipases foram expressas em *K. phaffii* sob o controle deste promotor, como as lipases de *Thermomyces dupontii* (Wang *et al*, 2019), de *Leishmania major* (Ayed *et al*, 2017) e de *Pseudozyma antarctica* (Liang *et al*, 2013). Alguns autores relataram que P_{GAP} é mais eficiente que P_{AOX1} para expressão de proteínas heterólogas (Zhang *et al*, 2009).

O promotor P_{TEF1} de *K. phaffii* já foi utilizado com sucesso na expressão das lipases de *Bacillus stearothermophilus* e *P. antarctica* (Ahn *et al*, 2007; Liang,*et al* 2013). No trabalho desenvolvido por Ahn *et al* (2007) em que a sequência de P_{TEF1} foi isolada, sequenciada e testada em comparação ao promotor P_{GAP} , o P_{TEF1} demonstrou características de expressão mais estreitamente associadas ao crescimento da levedura do que em relação ao P_{GAP} , e os níveis de expressão apresentaram uma forte atividade promotora capaz de produzir proteínas recombinantes em níveis semelhantes ou superiores aos produzidos pelo P_{GAP} .

A partir do DNA genômico de *K. phaffii* X-33 foram amplificados fragmentos dos promotores P_{TEF1} e P_{GAP1} , utilizando a polimerase Taq Platinum High Fidelity (Fig. 7). Os primers foram desenhados de maneira que os produtos de PCR tivessem, em cada extremidade, no mínimo 15 pb de homologia com a região de integração no plasmídeo para possibilitar a recombinação *in vivo*.

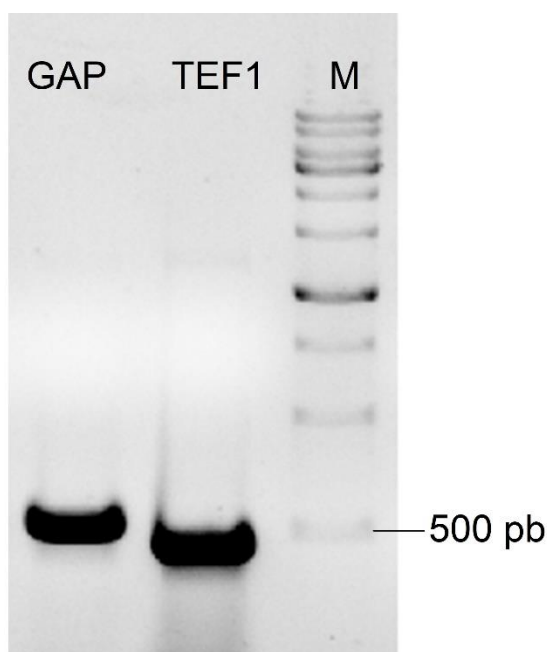


FIGURA 7. Amplificação de P_{TEF1} e P_{GAP} por PCR. Os amplicons representando os promotores P_{TEF1} (485 pb) e P_{GAP} (511 pb) foram analisados em gel de agarose 1%. Marcador 1Kb (SINAPSE).

Os fragmentos de *TEF1* e *GAP* foram clonados *in vivo* em DH5 α por recombinação homóloga, originando os vetores pPICTEFRML (Fig. 8) e pPICGAPRML (Fig. 9).

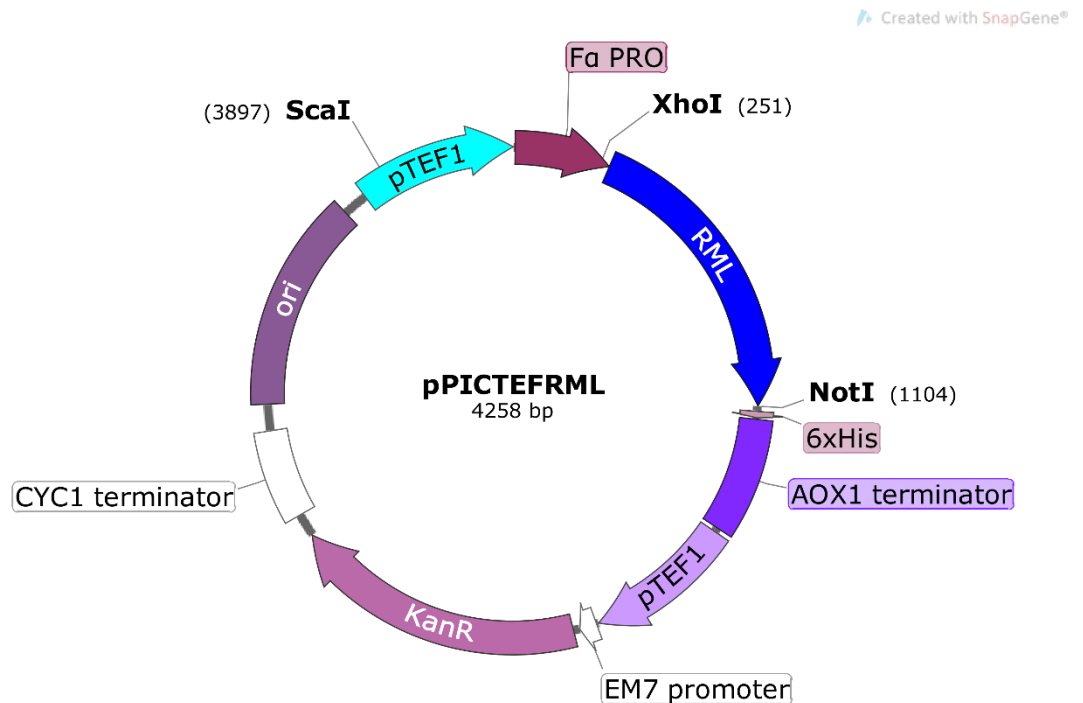


FIGURA 8. Mapa do vetor pPICTEFLRML. Estão indicados os sítios de restrição XhoI e NotI para clonagem de proteínas recombinantes, e o sítio de restrição ScaI para linearização e integração do vetor no P_{TEF1} nativo.

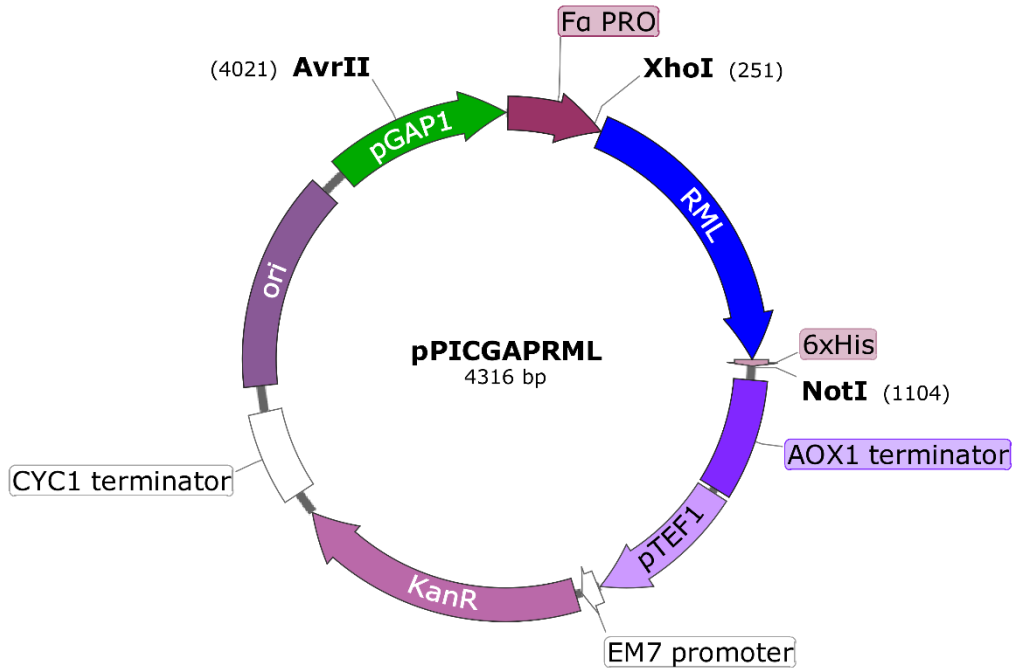


FIGURA 9. Mapa do vetor pPICGAPRML Estão indicados os sítios de restrição XhoI e NotI para clonagem de proteínas recombinantes, e o sítio de restrição AvrII para linearização e integração do vetor no locus P_{GAP} nativo.

As construções foram confirmadas pela linearização dos plasmídeos extraídos por minipreparação caseira, na região do promotor (Fig. 10). Para pPICK2RML foi usada a enzima PvuI, para pPICGAPRML, AvrII e, para pPICTEFRML, Scal.

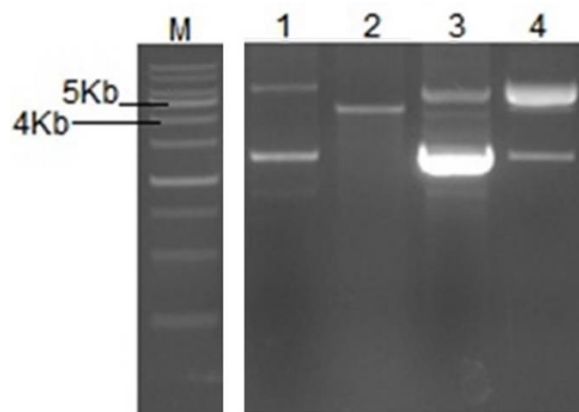


FIGURA 10. Linearização dos plasmídeos pPICGAPRML e pPICTEFRML. 1- pPICGAPRML intacto; 2- pPICGAPRML digerido com AvrII; 3- pPICTEFRML intacto e 4- pPICTEFRML digerido com Scal (digestão incompleta). Marcador 1kb ladder PROMEGA.

6.4. Construção dos vetores pPICTEFLIPB e pPIGAPLIPB

Com a construção dos vetores com os promotores correspondentes, os plasmídeos foram utilizados para a clonagem do gene para *LIPB*. Retirando-se o gene *RML* pela digestão dos sítios de *Xho*I e *Not*I, e purificando a banda correspondente ao plasmídeo sem o gene da proteína, obtivemos os vetores pPICTEF com 3378 pb e pPICGAP de 3436 pb (Fig. 11).

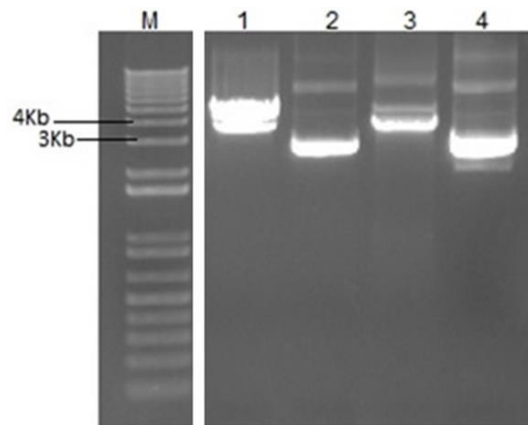


FIGURA 11. Análise de restrição dos vetores. 1 - pPICTEF digerido; 2 - pPICTEF intacto; 3 - pPICGAP digerido e 4 - pPICGAP intacto. M - Marcador TrackIt 1 kb Plus.

O gene *LIPB*, com códon otimizado para *K. phaffii*, foi retirado do plasmídeo pKId-lipb pela digestão dos sítios de *Xho*I e *Not*I. O fragmento foi purificado por banda de gel (Fig. 12) utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system.

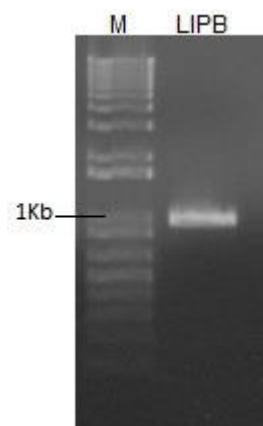


FIGURA 12. Purificação do fragmento correspondente ao gene *LIPB*. Fragmento identificado por banda de aproximadamente 1Kb. M - Marcador TrackIt 1Kb Plus.

Com a enzima ligase T4, o gene *LIPB* foi clonado nos plasmídeos pPICGAP (Fig.13) e pPICTEF (Fig.14), e transformados em *E.coli* XL-10-Gold. Os clones transformantes foram selecionados em kanamicina para extração de plasmídeos por minipreparação caseira.

As construções foram confirmadas pela digestão dos plasmídeos com *XhoI* e *NotI* (Fig. 15) .

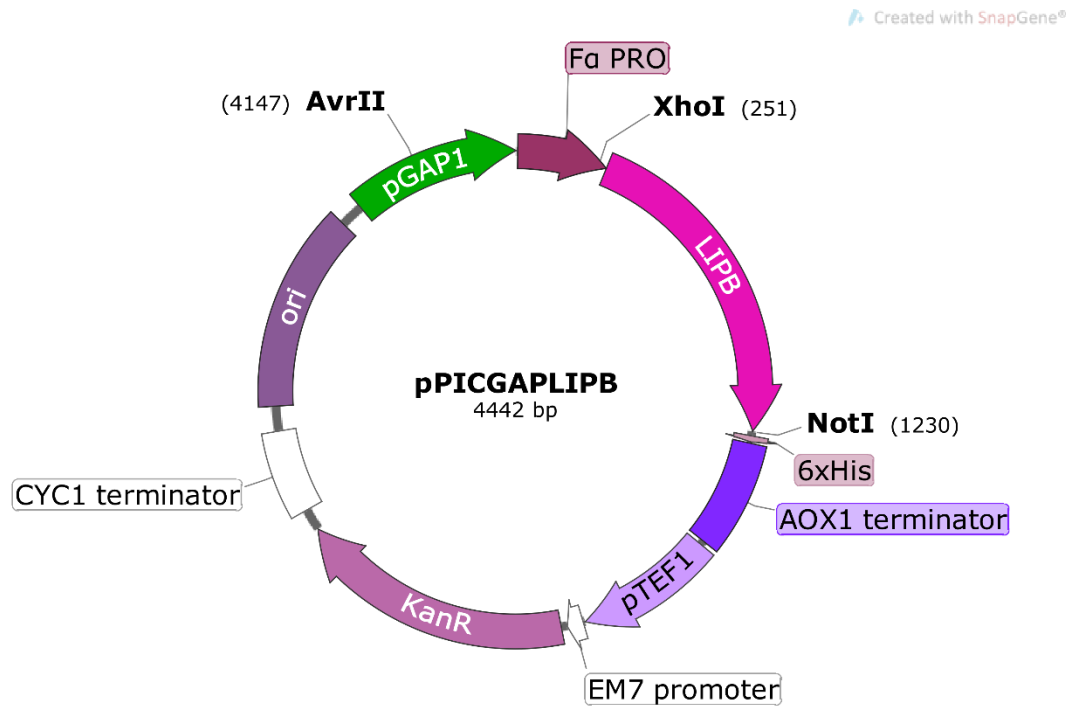


FIGURA 13. Mapa do vetor pPICGAPLIPB. Somente s sítios de restrição relevantes estão indicados.

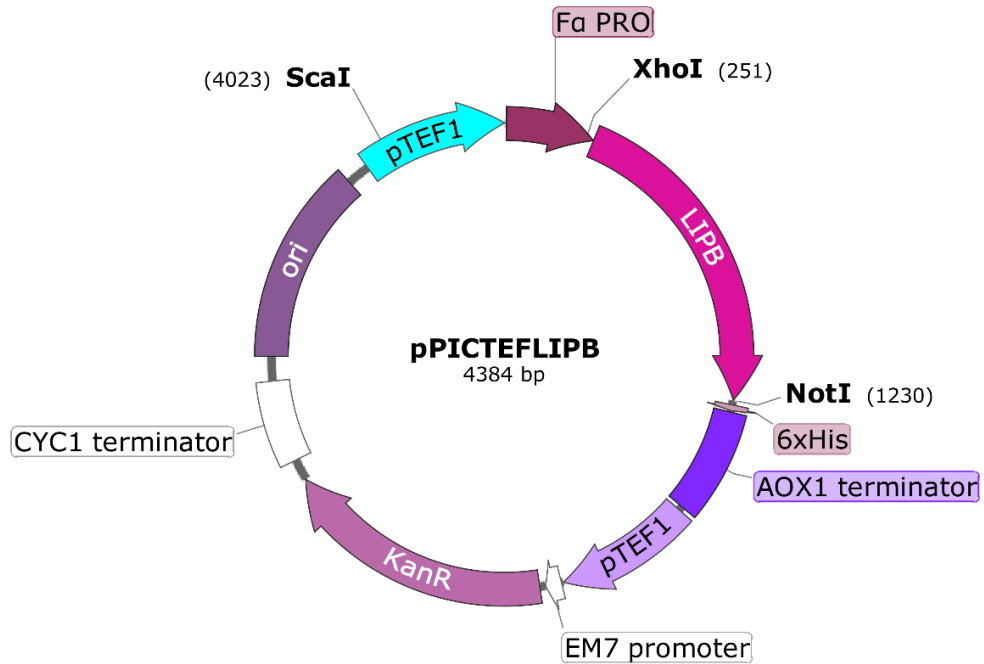


FIGURA 14. Mapa do vetor pPICTEFLIPB. Somente os sítios de restrição relevantes estão indicados.

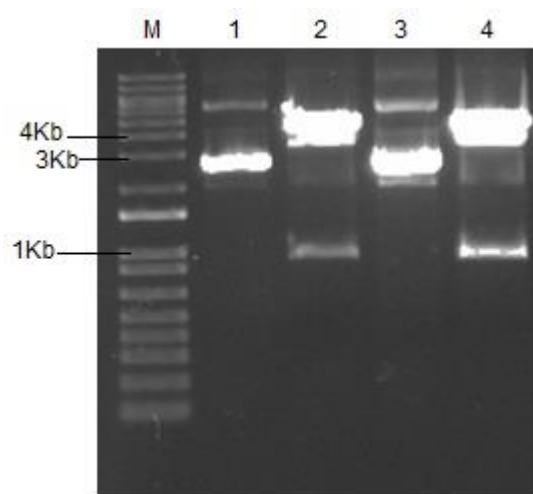


FIGURA 15. Análise de restrição dos vetores pPICTEFLIPB e pPICGAPLIPB. 1 - pPICTEFLIPB intacto; 2 - pPICTEFLIPB digerido com XhoI e NotI; 3 - pPICGAPLIPB intacto e 4 - pPICGAPLIPB digerido com XhoI e NotI. M- Marcador 1Kb Plus (ThermoFisher).

Confirmadas as construções dos vetores, foram realizadas midipreparações para extração de grande quantidade de plasmídeo necessária

para a transformação em levedura com o uso do kit de extração Wizard Plus Midipreps DNA Purification System.

6.5. Transformação de *K. phaffii* e triagem de clones secretores de lipase

Como na maioria das leveduras a transformação com vetores circulares resulta na ocorrência de transformantes com baixa eficiência, variando de aproximadamente 1 a 50 colônias por μg de DNA (Klinner & Schafer, 2004), os vetores foram linearizados na região do promotor para integração por recombinação homóloga em *K. phaffii*.

Os cassetes de expressão contendo o gene de interesse são tipicamente integrados no genoma para a obtenção de clones recombinantes (Vogl & Glieder, 2018). O DNA linearizado, resultando em cassetes do tipo *ends-in*, pode gerar transformantes estáveis de *K. phaffii* via recombinação homóloga entre o DNA transformador e regiões de homologia dentro do genoma (Cregg *et al*, 2001.)

Em contraste com o organismo modelo *S. cerevisiae*, em *K. phaffii*, é mais difícil a integração específica de cassetes em um *locus* desejado no genoma. Em *S. cerevisiae*, extremidades curtas de aproximadamente 50pb flanqueando os cassetes de expressão são suficientes para alcançar perto de 100% de integração correta. Em *K. phaffii*, mesmo extremidades de 500 kb de tamanho podem resultar em apenas 1 a 30% de integração específica (Vogl & Glieder, 2018).

A baixa eficiência de transformação tem sido aceita como inevitável para vetores de *K. phaffii*, pois o plasmídeo deve entrar na célula da levedura e se integrar em locais específicos no cromossomo hospedeiro, um processo inerentemente ineficiente (Wu & Letchworth, 2004) .

Para tentar contornar esse entrave, foi utilizado o protocolo de transformação de alta eficiência desenvolvido por Wu & Letchworth (2004) que descobriram que a eficiência de transformação em *K. phaffii*, assim como em *S. cerevisiae*, também pode ser aumentada aproximadamente cerca de 150 vezes

quando as células são tratadas com acetato de lítio e DTT antes da eletroporação.

As células foram semeadas em YPD com G418 (350 µg/mL). As colônias que cresceram foram isoladas em uma nova placa de YPD com G418 na concentração de 500 µg/mL.

Para triagem de clones produtores de lipase, foram plaqueados em MD-tributirina e selecionados através da formação de halo transparente em volta da colônia. Foram obtidos mais de 150 clones positivos para as construções pPICGAPLIPB e 19 clones para pPICTEFLIPB (Fig. 6A, B e C).

Os clones pPICTEFRML não cresceram em MD-tributirina portanto, para triagem de transformantes, foram plaqueados em YPD-tributirina, sendo possível a seleção de 10 clones através da formação de halo (Fig. 6D).

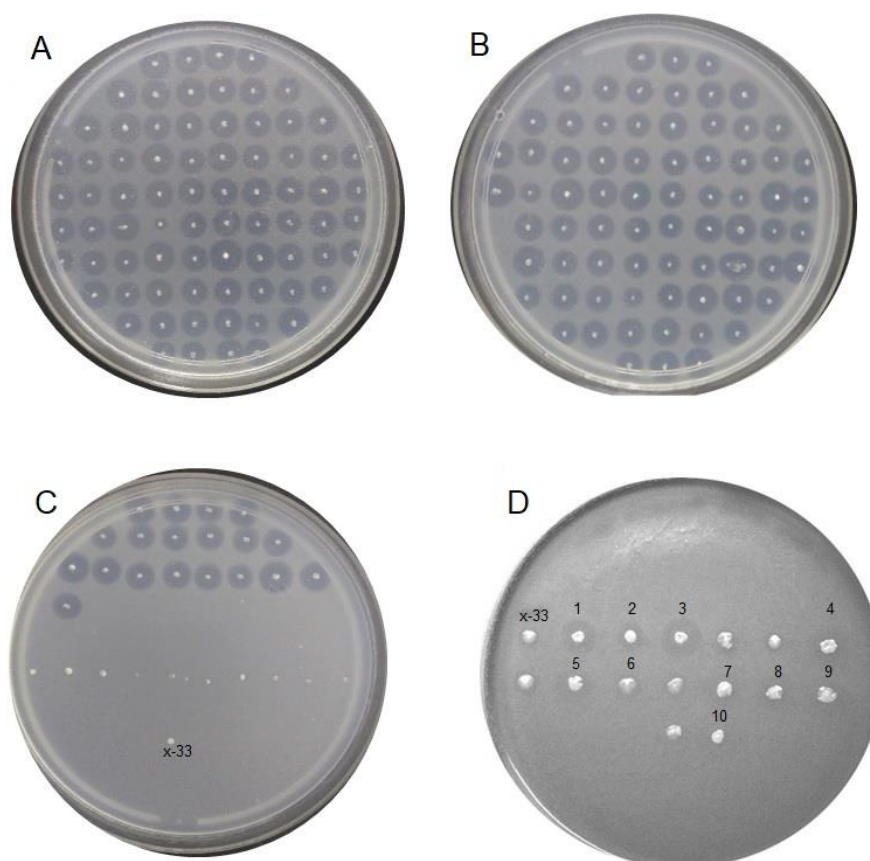


FIGURA 16. Análise da expressão de lipase em placa. A produção de lipase é observada em clones transformados de *K. phaffii* que apresentam um halo em torno da colônia. A – pPICGAPLIPB, B – pPICGAPLIPB, C – pPICTEFLIPB, D - pPICTEFRML.

Alguns dos clones pPICTEFRML secretores, apresentaram uma morfologia crenulada (Fig. 16D), diferente da levedura selvagem. Segundo (Schwarzahns *et al*, 2016) diferenças na morfologia podem indicar deficiências no crescimento, muitas vezes devido a interrupção de algum gene, consequência da integração fora da região-alvo por junções não-homólogas (NHEJ).

Schwarzahns *et al* (2016), estudando clones morfologicamente anormais, derivados de um experimento anterior, encontrou que, a integração do cassete em regiões aleatórias do genoma, sem regiões homólogas com o vetor, levou a interrupção de um gene para uma proteína relacionada à organização do citoesqueleto. Observou em outro caso que, mesmo com a integração correta do cassete no locus *AOX1* e expressão da proteína de interesse, o *AOX1* nativo excisado não foi degradado e, ao invés, realocou-se do cromossomo 4 para o cromossomo 2, causando a interrupção de um gene que codifica para uma proteína de resposta ao estresse oxidativo.

O fato de não crescerem em meio mínimo também pode indicar alguma mutação não identificada que ocorreu durante a construção da linhagem.

Alguns clones de pPICTEFRML, apesar de crescerem em antibiótico, não foram capazes de produzir halo transparente em tributirina. Os clones pPICTEFRML 1,2,3, 5 e 10 foram submetidos à extração rápida DNA de levedura para a realização de PCR que confirmasse a presença do gene *RML*. Somente houve amplificação da sequência correspondente para os clones 2 e 3.

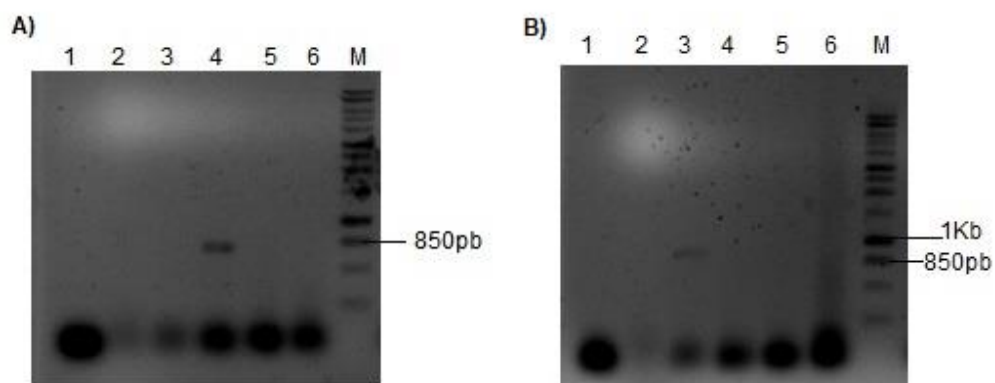


FIGURA 17. Identificação do gene *RML* por PCR em clones transformados. A) Utilizando um par de primers para *RML* que amplifica uma região de 713 pb e B) amplificação com um par de primers que amplifica a *RML* por inteiro representada por uma banda de 880 pb. 1 - Controle negativo da PCR; 2 - Clone 1; 3 - Clone 2; 4 - Clone 3; 5 - Clone 5 e 6 - Clone 10. Marcador 1 kb DNA Ladder (Sinapse).

Um problema comumente encontrado ao expressar proteínas em *K. phaffii* é a ocorrência de falsos positivos, ou seja, clones que têm a capacidade de crescer em altos níveis de antibióticos, mas expressam pouca ou nenhuma proteína recombinante (Joan Lin & James M, 2000; Norden *et al*, 2011).

Falsos positivos podem ocorrer no processo de amplificação vetorial pós-transformação (PTVA), por aumentar o número de cópias do fragmento contendo o gene de resistência flanqueado por dois braços homólogos, e não necessariamente o vetor inteiro com a proteína de interesse, como demonstrado por Jiao *et al* (2018) estudando as diferentes formas de integração entre regiões homólogas de um vetor usando a lipase de *Rhizopus oryzae* como gene repórter.

Até o momento a proteína RML só havia sido expressa em *K. phaffii* utilizando o promotor *AOX1* (Huang *et al*, 2014; Cai *et al*, 2017 e Han *et al*, 2009) e também com transcrição combinada com *AOX1* e *GAP1* (He *et al*, 2015). É a primeira vez que a expressão da lipase é realizada com o promotor *TEF1* de *K. phaffii* (Fig. 16D e Fig. 17A e B).

O cultivo dos clones pPICTEFRML está sendo otimizado para a detecção da RML em sobrenadante.

Foram selecionados três clones de cada construção para os demais experimentos: pPICGAPLIPB 34, pPICGAPLIPB 125, pPICGAPLIPB 154, pPICTEFLIPB 1, pPICTEFLIPB 12, pPICTEFLIPB 19.

6.6. Curva de crescimento em YNB-glicose

Para avaliar se havia diferença na velocidade de crescimento foram selecionados 3 clones de cada sistema e feita uma cinética de crescimento em MD. O crescimento foi comparado com o da levedura X-33. O gráfico mostra as curvas de crescimento com valores de OD₆₀₀ nm em função do tempo (Fig. 18)

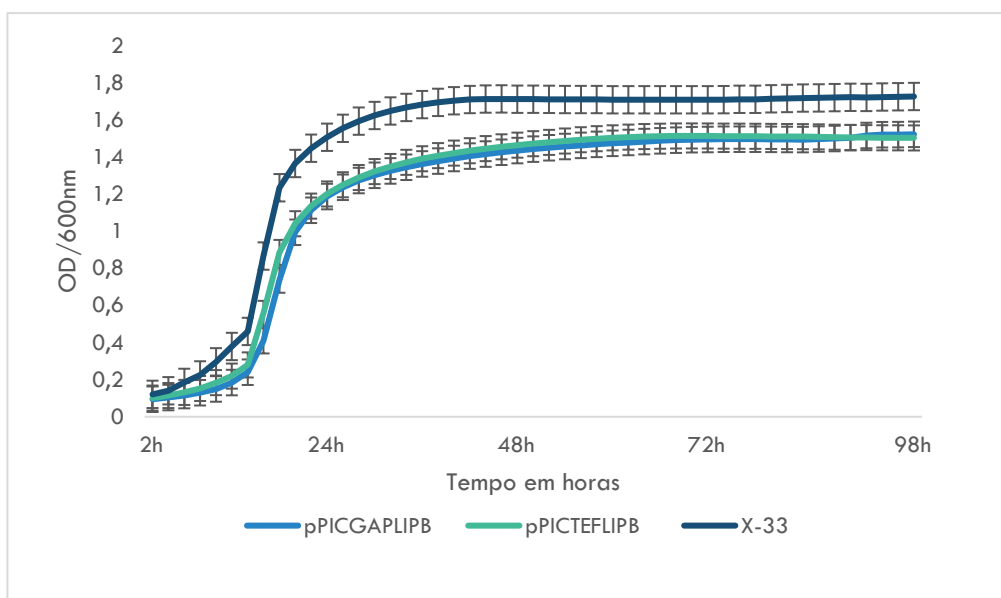


FIGURA 18. Curva de crescimento. Crescimento de clones transformados com os vetores pPICGAPLIPB e pPICTEFLIPB e a levedura selvagem *K. phaffii* X-33 em meio MD contendo glicose. A leitura de OD₆₀₀ foi feita em equipamento EPOCH durante 98 horas a 28 °C com medições de 2 em 2 horas. O experimento foi realizado em triplicata técnica para cada triplicata biológica, em meio MD.

A curva de crescimento originada mostra que os clones recombinantes e a levedura selvagem X-33 atingem O.D.₆₀₀ máxima após 24h de cultivo e estabiliza-se antes de 48h. Os clones recombinantes apresentam curvas de crescimento, mas não atingem a mesma O.D.₆₀₀ máxima que a levedura selvagem o que pode ser atribuído ao fato de haver uma sobrecarga metabólica devido à expressão dos genes heterólogos.

6.7. Análise em SDS-PAGE 12% e Zimograma

Para confirmar a presença da lipase no sobrenadante, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Fig. 19).

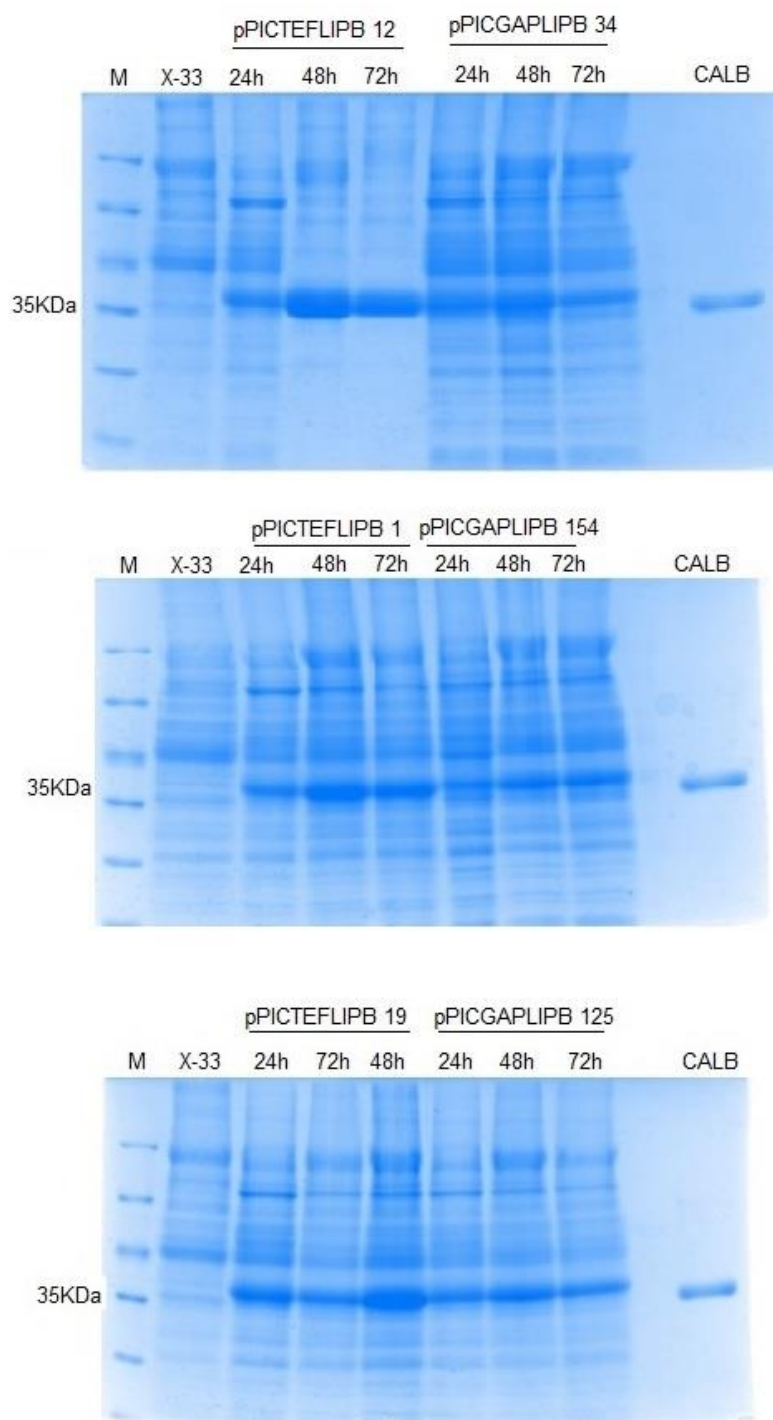


FIGURA 19. Análise de proteínas secretadas dos clones recombinantes. Análise feita por SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue. Os clones foram cultivados em meio YPD durante 72 h a 28 °C e 200 rpm. M: Marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher). CALB padrão (10 µL). A banda correspondente a LIPB é a de ~37 kDa e a de CALB padrão ~35 kDa. A levedura selvagem X-33 foi utilizada como controle negativo.

O tamanho da proteína desnaturada secretada tanto por pPICTEFLIPB quanto pPICGAPLIPB apresentaram-se ligeiramente maior que o padrão CALB utilizado neste trabalho. Este aumento na massa da proteína muito provavelmente é devido à glicosilação.

A glicosilação é um dos eventos críticos de processamento pós-traducional na síntese de proteínas, e a sua importância no dobramento de proteínas, montagem de oligômeros, estabilidade estrutural, transdução de sinal específica, processos de reconhecimento e secreção de glicoproteínas, tem sido bem documentado (Jenkins, Parekh & James, 1996)

Em *K. phaffii*, as cadeias oligossacarídicas ligadas às proteínas são mais curtas, de 8 a 14 resíduos de manose, do que em *S. cerevisiae* que tem de 40 a 150 resíduos (Li *et al*, 2007).

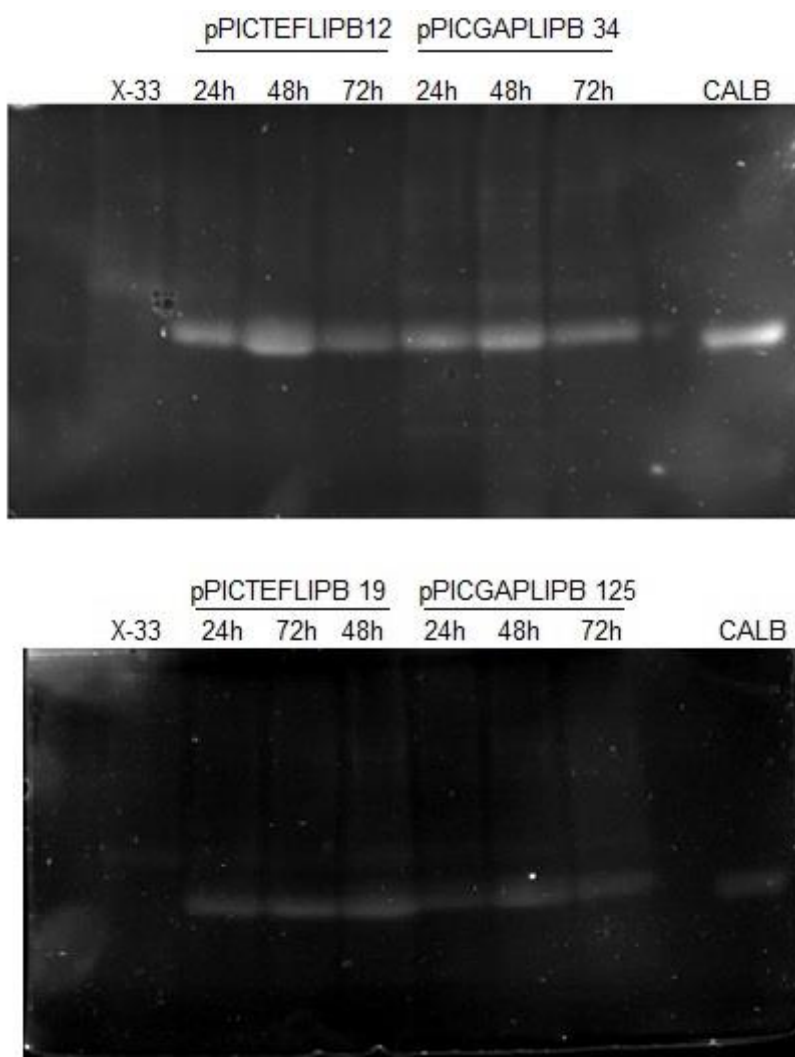
O tamanho esperado da lipase nativa de *P. antarctica* é de aproximadamente 33 kDa, no entanto, na literatura publicada quando a enzima é secretada por *K. phaffii*, os tamanhos variam de 36-37 kDa (Samuel *et al*, 2013; Yang *et al*, 2013; Liu *et al*, 2012) e 34-35KDa quando deglicosilada (Yang *et al*, 2013; Eom *et al*, 2013).

Pela análise em SDS-PAGE (Fig. 19) pode-se observar uma menor quantidade de proteínas endógenas presentes no sobrenadante do clone pPICTEFLIPB 12 a partir de 48h de cultivo.

No entanto, para os demais clones testados o padrão de bandas é diferente, com grande quantidade de proteínas presentes no sobrenadante, evidenciando uma diferença fisiológica entre os clones que independe do promotor usado (Fig. 19)

Neste trabalho foi realizado o zimograma com o uso de MUF-butirato para confirmar se a banda com maior intensidade detectada apenas nos sobrenadantes dos clones transformados corresponde à lipase (Fig. 20).

Para experimentos envolvendo amostras não purificadas, é conveniente o uso de substratos cromogênicos ou fluorogênicos para detecção de atividade específica, que simplificam e agilizam os testes. Entre os substratos fluorogênicos, os derivados de 4-metilumbeliferona, comercialmente disponíveis em uma ampla faixa de comprimento de cadeia, mostraram ser ferramentas úteis para a determinação da atividade de lipase (Prim *et al*, 2003).



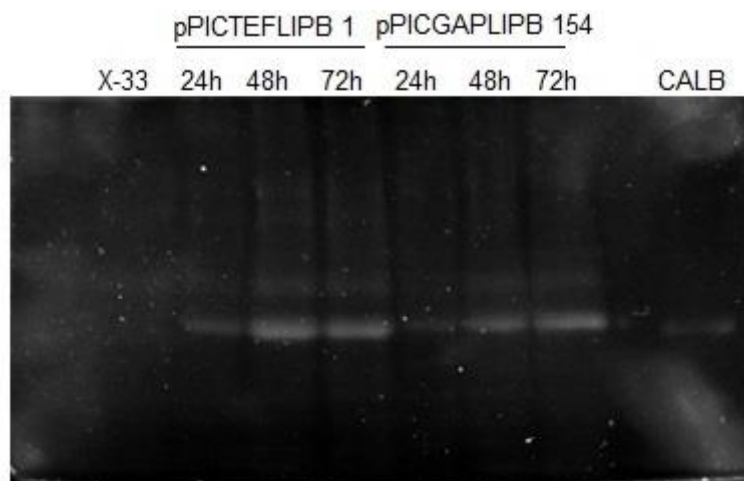


FIGURA 20. Zimograma para identificação de lipase secretada. Análise feita através da hidrólise do MUF-butirato. Sobrenadante dos clones selecionados pPICTEFLIPB e pPICGAPLIPB. Foram cultivados em YPD durante 72 h a 28°C a 200 rpm e os pontos foram coletados a cada 24h. CALB padrão (10 µL). A levedura selvagem X-33 foi utilizada como controle negativo.

As bandas fluorescentes indicando reação com o substrato correspondem às bandas mais intensas de aproximadamente 37 kDa encontradas no gel de poliacrilamida (Fig. 19). Esse resultado confirma a expressão e secreção da lipase B recombinante de *P. antarctica* ativa pelos dois promotores testados.

6.8. Ensaio de atividade enzimática

Ensaio de atividade enzimática permitem a quantificação em U/mL da expressão da proteína de interesse e, com isso, a comparação entre os clones e, para este trabalho, os promotores testados.

Para os ensaios de atividade lipolítica em sobrenadante dos clones pPICTEFLIPB e pPICGAPLIPB foi escolhido o método colorimétrico utilizando o substrato *p*-nitrofenol butirato. Este método colorimétrico é baseado na liberação de álcoois que podem ser monitorados continuamente e quantitativamente por espectrofotometria. A alteração de cor do *p*-nitrofenol para a cor amarela é monitorada pela leitura da absorbância a 410 nm (Liebeton, Zacharias & Jaeger, 2001).

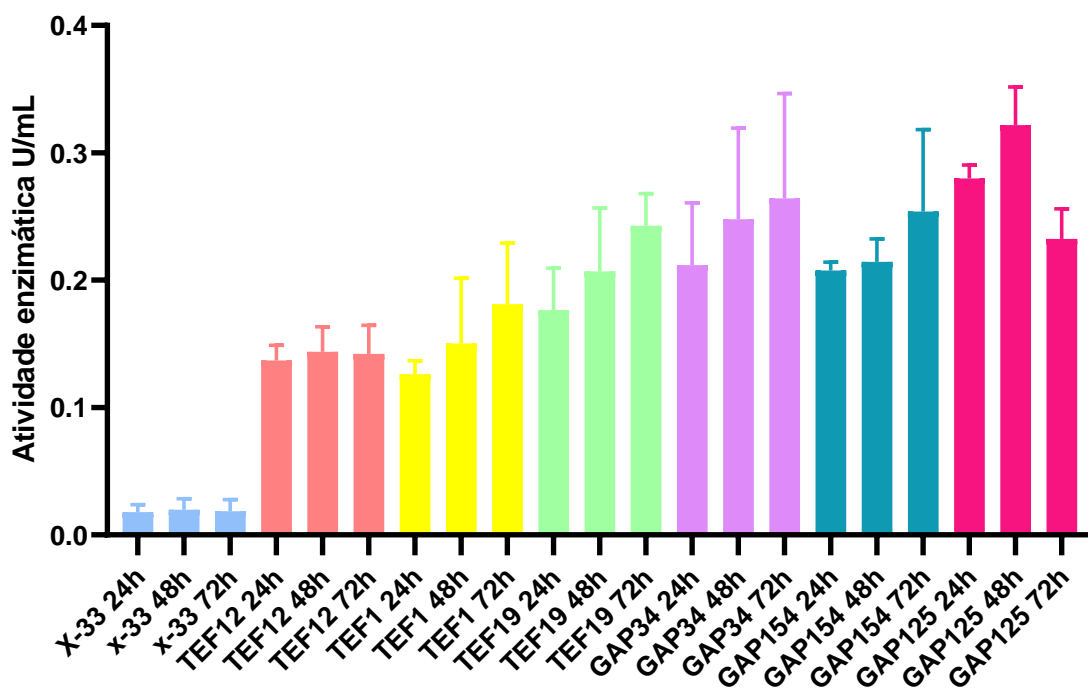


Figura 201. Atividades enzimáticas dos clones recombinantes. Os valores foram estatisticamente analisados usando ANOVA e Teste de Tukey. A levedura selvagem X-33 foi utilizada como controle negativo.

Nas condições testadas, a atividade enzimática obtida para o clone pPICGAPLIPB 125 é significativamente diferente das calculadas para os clones pPICTEFLIPB 1 e 12, embora não tenha sido diferente da atividade encontrada para o clone pPICTEFLIPB 19. Não houve diferença estatística nos valores obtidos dentro de cada sistema.

Os ensaios de atividade referenciados nesta discussão foram obtidos por diferentes laboratórios, com diferentes métodos de detecção, o que dificulta a comparação entre os trabalhos.

Como não existe um método universal de ensaio de lipase, a sensibilidade, a disponibilidade de substratos e a facilidade do procedimento devem ser consideradas na escolha do método de quantificação e detecção de lipase (Hasan, Shah & Hameed, 2009).

Segundo Hasan, Shan & Hameed (2009) vários métodos foram desenvolvidos para a medição de atividade lipolítica em preparações de lipase bruta ou purificada. As reações podem ser medidas determinando-se a taxa de desaparecimento do substrato, como o uso de tributirina no meio de cultura, método que foi realizado como etapa preliminar neste trabalho; a taxa de hidrólise, como o método titulométrico pela mudança de pH com a liberação de ácidos graxos e alguns métodos colorimétricos, ou a taxa de clarificação da emulsão, normalmente com o uso de kits comerciais.

As desvantagens de muitos substratos cromogênicos está no fato de apresentarem baixa especificidade e sensibilidade, e também de espontaneamente serem hidrolisados sob certas condições (Prim *et al*, 2003).

Cai *et al* (2017) usando o *p*NP acetato conseguiu detectar níveis de atividade de lipase para RML, em sinergismo com outra lipase recombinante, em *K. phaffii*, cultivada em frasco, de quase 300 U/mL, porém a técnica apresenta algumas diferenças em relação à usada neste trabalho, pois utiliza tampão Tris-HCl pH 8,0 com goma arábica, e a reação é do tipo *end point* e não cinética.

Em trabalho expressando CALB em *K. phaffii* Liu *et al* (2012) usou também o *p*NP acetato para ensaio de atividade e detectou menos de 17 U/mL, apesar da intensidade da banda encontrada em gel desnaturante correspondente a proteína secretada sugerirem uma atividade maior.

Eom *et al* (2013) expressaram a CALB utilizando o promotor P_{AOX1} em *K. phaffii* cultivada em fermentadores de 5L e detectou a atividade de lipase máxima de 12 U/mL usando o *p*NP palmitato, sem especificar o tempo de reação.

Os géis de poliacrilamida produzidos para os clones do sistema pPICTEFLIPB mostraram a banda corresponde à CALB recombinante mais intensamente corada do que a encontrada no sistema pPICGAPLIPB, o que poderia levar a dedução de que P_{TEF1} induz mais fortemente a transcrição do que P_{GAP} . No entanto, os ensaios de atividade apresentaram resultados dissonantes.

Comparando a intensidade das bandas coradas para cada um dos clones pPICTEFLIPB com os níveis de atividade em *pNP* butirato observamos que o clone 12, apesar de ter a banda mais fortemente corada entre os três clones testados, foi o que mostrou menor atividade de lipase nas condições testadas.

Esses resultados talvez signifiquem que o *pNP* butirato não seja o melhor substrato para avaliar a atividade enzimática de CALB secretada em sobrenadante nas condições em que foram submetidas neste trabalho, indicando que outra técnica pode ser usada, ou esta deve ser melhorada e readaptada.

Ainda comparando o perfil de bandas encontradas no gel, é possível identificar que o máximo de produção, evidenciado pela intensidade da banda, foi após 48 horas de indução nas condições testadas e que, exceto para o clone pPICGAPLIPB 125, a produção não decaiu após 72 horas, mesmo o cultivo não sendo quimiostático. Essa é uma das características que tornam interessante o uso de promotores constitutivos para a produção contínua de proteína heteróloga em grande escala.

O desejo de reduzir os custos de processamento enquanto aumenta-se a produção, além dos requisitos de entrega de produto de qualidade consistente, estão entre os principais impulsionadores da transição do cultivo em lote para contínuo no setor de biotecnologia (Rathore, Agarwal & Sharma, 2015).

Para um processo contínuo, uma consideração importante durante o desenvolvimento de novas linhagens celulares e meios de crescimento, deve ser gerar processos estáveis e robustos que sejam capazes de manter alta produtividade durante um período considerável de operação contínua (Cankorur-Cetinkawa *et al*, 2018).

Enquanto que o clone pPICTEFLIPB 12 apresentou diferença notória no perfil de bandas quando comparado com pPICTEFLIPB 1 e 19 nas condições testadas, pPICGAPLIPB 125 foi o único clone dentro de seu sistema de expressão que teve a atividade enzimática diminuída após 48 horas de indução.

Essa variação clonal, em que uma variedade de produtividade de proteínas secretadas é observada em transformantes supostamente idênticos, é um aspecto aceito trabalhando-se com *K. phaffii* (Aw, Barton & Leak, 2017)

Schwarzahns *et al.* (2016), através de testes com mais de 845 clones de *K. phaffii* expressando GFP utilizando o promotor P_{AOX1} , encontraram que a maior causa de variação na produção foi devido ao locus de integração, orientação do vetor e ao número de cópias da proteína recombinante.

No entanto, Aw, Barton & Leak (2017), em seu trabalho, identificaram que as diferenças na produção não podem ser atribuídas apenas ao sítio de integração ou ao número de cópias. Ao comparar clones com apenas uma cópia do cassete de expressão para os níveis de produção e o transcrito de albumina de soro humano expressa em *K. phaffii*, encontraram uma variação que pode ser atribuída a bloqueios transcricionais, bem como bloqueios na tradução.

Em 2005 Viader-Salvadó *et al* compararam, através de AFLP-PCR, os genótipos de 17 clones gerados de uma transformação e encontrou 16 genótipos diferentes, sendo 3 deles da própria levedura selvagem, o que indica que provavelmente existam variações inerentes em *K. phaffii*. Inclusive observou-se que os clones com o perfil mais próximo da levedura selvagem menos mutada eram aqueles com os maiores níveis de secreção de proteína heteróloga.

Os cientistas que trabalham com *K. phaffii* são desafiados com a tarefa de identificar o melhor produtor dentro de um grupo diverso de clones com características de produção variáveis, pois eventos desconhecidos durante a integração do cassete de expressão podem levar à características de produção drasticamente diferentes nos clones gerados de uma mesma transformação (Schwarzahns, 2016).

As evidências levantam a questão de onde a principal variação surge, seja de diferenças intrínsecas na população hospedeira ou se o método de transformação, ou seleção, pode dar origem à variação observada. Aw, Barton & Leak (2016) sugerem que, estudos da variação dentro da linhagem hospedeira poderiam fornecer um mecanismo para a pré-seleção de potenciais

secretores para a transformação, minimizando assim o exercício de seleção subsequente.

Foi também calculada a média das atividades enzimáticas registradas para cada clone, de cada sistema de expressão, em todos os tempos nas condições determinadas para este trabalho. Esses dados foram submetidos a ANOVA e o teste Tukey e as análises não indicaram diferença significativa entre a atividade exibida sob P_{TEF1} e P_{GAP} .

Os dois são considerados promotores constitutivos que levam à secreção semelhante de grandes títulos de proteínas heterólogas, embora apresentem comportamentos diferente de produção (Stadlmayr *et al*, 2010; Ahn *et al*, 2007; Lee *et al*, 2008)

Ahn *et al* (2007), quando expressaram a lipase de *Bacillus stearothermophilus*, observaram que as atividades totais medidas a partir do cultivo em lote foram semelhantes para ambos os promotores. No entanto, a expressão de P_{TEF1} começou mais cedo do que P_{GAP} e mostrou um maior acoplamento à taxa de crescimento e em cultivo alimentado com limitação de carbono os níveis de atividade de expressão dirigida por P_{TEF1} excederam o P_{GAP} quase duas vezes.

Estudos de adaptação fisiológica e metabólica de *K. phaffii* sob o promotor GAP utilizando a glicose como substrato, em uma ampla gama de disponibilidade de oxigênio, demonstraram um aumento na produção de proteínas como consequência da mudança metabólica das vias respiratórias para óxido-fermentativas (García Ortega *et al*, 2017).

Lee *et al* (2008), para determinar o nível do mRNA correspondente ao gene *TEF*, realizaram a análise de Northern blotting, pois, como o mRNA é sintetizado a partir de um gene através da transcrição, o nível de transcritos pode ser um indicador indireto da taxa de expressão do gene. Verificou-se que o *TEF* era expresso a uma taxa elevada na fase de crescimento exponencial da levedura e a uma taxa baixa na interfase. Estes resultados demonstram a forte expressão do gene, mesmo na ausência de um indutor, com o crescimento do microrganismo.

Em pesquisa expressando Fab-3H6 observou-se que a produção do anticorpo sob o controle do promotor *TEF1- α* teve maiores títulos de proteína do que com o promotor *GAP* em todas as diferentes condições de cultivo testadas e que, a adição de sorbitol como fonte dupla de carbono, juntamente com glicerol ou glicose na proporção 1: 1, melhorou a produção de proteína recombinante (Cankorur-Cetinkaya *et al*, 2018).

Para os níveis de produto por número de cópias do gene de HSA e eGFP foram igualmente elevados para P_{TEF1} e P_{GAP} , mas no caso do promotor *TEF1*, foram atingidos níveis de produto por transcrição de 2 a 4 vezes maiores, sugerindo que P_{TEF1} talvez tenha uma atividade traducional mais elevada (Stadlmayr *et al*, 2010).

Os trabalhos publicados comparando os dois promotores apontam a tendência de P_{GAP} , que geralmente é visto como promotor constitutivo, conduzir, de fato, a níveis constantes de expressão independente da taxa de crescimento específica, enquanto que o promotor do gene *TEF1* tem uma regulação mais fortemente associada ao crescimento, com a quantidade de proteína expressa diminuindo juntamente com a queda da taxa de crescimento específico (Ahn *et al*, 2007; Lee *et al*, 2008 e Stadlmayr *et al*, 2010).

Nas conclusões de Cankorur-Cetinkaya *et al* (2018), testando dois anticorpos diferentes com três promotores constitutivos de *K. phaffii*, apesar de ter reconhecido tendências dentro dos dados coletados, não foi possível inferir em geral como as células que expressam a mesma proteína recombinante usando diferentes promotores, ou mesmo diferentes proteínas recombinantes usando o mesmo promotor, irão desempenhar em diferentes condições.

Cankorur-Cetinkaya (2018) sugere que a comparação das forças do promotor sob apenas uma única condição selecionada pode levar os desenvolvedores de processo a descartar o promotor ideal para seu produto, especialmente se esse promotor for novo. Comparar os diferentes clones sob uma gama de condições de cultivo provou ser especialmente importante no caso dos clones produtores de lisozima humana que usaram o promotor *GAP*, onde detectaram grandes alterações no desempenho entre meios complexos, ricos e mínimos.

7. CONCLUSÕES

Foi estabelecido um protocolo para clonagem de fragmentos por recombinação homóloga *in vivo* em bactéria.

Foram construídos novos vetores de expressão para a produção de proteínas heterólogas controladas pelos promotores P_{TEF1} e P_{GAP} .

Pela primeira vez a lipase RML foi expressa pelo promotor P_{TEF1} de *K. phaffii*

Foi detectada a secreção de lipase CALB pelos promotores P_{TEF1} e P_{GAP} de *K. phaffii*.

8. PERSPECTIVAS

Otimização do cultivo em meio líquido para análise da RML em sobrenadante.

Adaptações no ensaio de atividade enzimática.

Realizar análise de número de cópias para comparação da expressão entre os promotores P_{TEF1} e P_{GAP} .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. & Schwab, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5301–5317 (2014).

Ahn, J, Hong J, Lee H, Park M, Lee E, Kim C, Choi E, Jung J, Lee H. Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: Molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 601–608 (2007).

Arruda, A. *et al.* A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter. *Biotechnol. Lett.* **38**, 509–517 (2016).

Aw, R., Barton, G. R. & Leak, D. J. Insights into the prevalence and underlying causes of clonal variation through transcriptomic analysis in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 5045–5058 (2017).

Baumann, K, Maurer, M, Dragosits, M, Cos, O, Ferrer, P, Mattanovich, D. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 177–183 (2008).

Ben Ayed, S. *et al.* Secretory lipase from the human pathogen *Leishmania major*: Heterologous expression in the yeast *Pichia pastoris* and biochemical characterization. *Biochimie* **146**, 119–126 (2018).

Bordes, F. *et al.* Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophys. J.* **99**, 2225–2234 (2010).

Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R. & Krishna, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.* **20**, 433–437 (2002).

Bornscheuer, U.T.; Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis, *FEMS Microbiology Reviews*, **26**:1, 73–81 (2002).

Bubeck, P., Winkler, M. & Bautsch, W. Rapid cloning by homologous recombination in vivo. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3601–3602 (1993).

Cai, H. *et al.* Co-expression of lipase isozymes for enhanced expression in *Pichia pastoris*. *Lett. Appl. Microbiol.* **65**, 335–342 (2017).

Cankorur-Cetinkaya, A. *et al.* Process development for the continuous production of heterologous proteins by the industrial yeast, *Komagataella phaffii*. *Biotechnol. Bioeng.* **115**, 2962–2973 (2018).

Cao, P., Wang, L., Zhou, G., Wang, Y. & Chen, Y. Rapid assembly of multiple DNA fragments through direct transformation of PCR products into *E. coli* and *Lactobacillus*. *Plasmid* **76**, 40–46 (2014).

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L. & Valero, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb. Cell Fact.* **5**, 1–20 (2006).

Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y. & Madden, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3376–3385 (1985).

Dutra, J. C. V *et al.* Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **147**, 63–75 (2008).

Eda Çelik, S., Ozbay, N., Otkar, N. & Çalik, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**, 2985–2990 (2008).

Eom, G. T. *et al.* High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 165–170 (2013).

Garcia-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P., Montesinos, J. L. & Valero, F. A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*:

From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem.* **51**, 681–691 (2016).

Gasser B, Prielhofer R, Marx H, Maurer M, Nocon J, Steiger M, Puxbaum V, Sauer M, Mattanovich D. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol.* **8**,191-208. (2013).

Han, Z. L., Han, S. Y., Zheng, S. P. & Lin, Y. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 117–126 (2009).

Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* **27**, 782–798 (2009).

He, D., Luo, W., Wang, Z., Lv, P. & Yuan, Z. Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of *Rhizomucor miehei* lipase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 1175–1182 (2015).

Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N. & Mattanovich, D. Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 367–375 (2004).

Huang, F., Spangler, J. R. & Huang, A. Y. In vivo cloning of up to 16 kb plasmids in *E. coli* is as simple as PCR. *PLoS One* **12**, 26–30 (2017).

Huang, J. *et al.* Improved production of a recombinant *Rhizomucor miehei* lipase expressed in *Pichia pastoris* and its application for conversion of microalgae oil to biodiesel. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 1–11 (2014).

Jacobus, A. P. & Gross, J. Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).

Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396–403 (1998).

Jenkins, N., Parekh, R. B. & James, D. C. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 975–981 (1996).

Jiao, L., Zhou, Q., Liu, W. & Yan, Y. New insight into the method of posttransformational vector amplification (PTVA) in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Methods* **148**, 151–154 (2018).

Joan Lin, C. & James, M. C. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45–66 (2000).

Joseph, B., Ramteke, P. W. & Thomas, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.* **26**, 457–70 (2008).

Juturu, V. & Wu, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem* **19**, 7–21 (2018).

Klinner, U. & Schäfer, B. Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 201–223 (2004).

Kourist, R. H. Lipases as sustainable biocatalysts for the sustainable industrial production of fine chemicals and cosmetics. *JSM Biotechnol. Biomed. Eng.* **2**, 12 (2014).

Lee HW, Ahn JO, Jung JK, Choi ES, Kim CS, Lee GL, *et al.*, inventors; Korean Research Institute of Bioscience (Daejeon, KR), assignee. Translational elongation factor promoter from *Pichia pastoris* and method for producing recombinant protein using the same. World patent WO2007/058407. Aug 19 (2008).

Liang, S., Li, C., Ye, Y. & Lin, Y. Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **35**, 97–105 (2013).

Liebeton, K., Zacharias, A. & Jaeger, K. E. Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.* **183**, 597–603 (2001).

Li, P. *et al.* Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **142**, 105–124 (2007).

Liu, Z.-Q., Zheng, X.-B., Zhang, S.-P. & Zheng, Y.-G. Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters. *Microbiol. Res.* **167**, 452–60 (2012).

Looke, M., Kristjuhan, K. & Kristjuhan, A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* **50**, 325–328 (2011).

Lopes, D.B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., Macedo, G. A. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately?. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **31**, 603-613 (2011).

Norden, K. *et al.* Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol.* **11**, 47 (2011).

Palla, C. A., Pacheco, C. & Carrín, M. E. Production of structured lipids by acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases: Selection of suitable reaction conditions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **76**, 106–115 (2012).

Patkar S.A. *et al.* Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Indian J Chem Sect B* **32**, 762-780 (1993).

Prim, N., Sánchez, M., Ruiz, C., Pastor, F. I. J. & Diaz, P. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **22**, 339–346 (2003).

Potvin, G., Ahmad, A. & Zhang, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem. Eng. J.* **64**, 91–105 (2012).

Proud, C. G. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **19**, 161–170 (1994).

Rathore, A. S., Agarwal, H. & Sharma, A. K. Preparative Biochemistry and Biotechnology Continuous Processing for Production of Biopharmaceuticals. *Prep Biochem Biotechnol.* **45**, 836-849 (2015).

Riethoven, J. -J. M. Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators. *Methods Mol. Biol.* **674**, 33–42 (2010).

Rodrigues, R. C. & Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **66**, 15–32 (2010).

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 3^o ed. New York. (2001).

Samuel, P., Prasanna Vadhana, A. K., Kamatchi, R., Antony, A. & Meenakshisundaram, S. Effect of molecular chaperones on the expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Microbiol. Res.* **168**, 615–620 (2013).

Schwarzans, J. P. *et al.* Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).

Sehoon, K., Shannon, W., Istvan, B., Cecilia, S., Liza, P., Marc d'Anjou, Terrance A. Stadheim, Byung-Kwon Choi, Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **166**, 174-181.(2013).

Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **19**, 627–662 (2001).

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. & Mehta, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* **6**, 174 (2016).

Spadiut, O. & Herwig, C. Dynamics in bioprocess development for *Pichia pastoris*. *Bioengineered* **5**, 401–404 (2014)

Spohner, S. C., Muller, H., Quitmann, H. & Czermak, P. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **202**, 118–134 (2015).

Stadlmayr, G. *et al.* Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J. Biotechnol.* **150**, 519–529 (2010).

Thakur, S. Lipases, Its sources, Properties and Applications: A Review. *Int. J. Sci. Eng. Res.* **3**, 1–29 (2012).

Thompson, C. A. FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* **67**, 93 (2010).

Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Biotechnol.* 88, 21-35.(2001).

Viader-Salvadó, J. M., Cab-Barrera, E. L., Galán-Wong, L. J. & Guerrero-Olazarán, M. Genotyping of recombinant *Pichia pastoris* strains. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **11**, 348–359 (2006).

Vogl, T. & Glieder, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N. Biotechnol.* **30**, 385–404 (2013).

Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. & Cregg, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**, 37–44 (1997).

Wang, J. *et al.* High-level expression of *Thermomyces dupontii* thermo-alkaline lipase in *Pichia pastoris* under the control of different promoters. *3 Biotech* **9**, 33 (2019).

Watt, V. M., Ingles, C. J., Urdea, M. S. & Rutter, W. J. Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 4768–4772 (1985).

Winkler, U. K. & Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138**, 663–670 (1979).

Wu, S. & Letchworth, G. J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques* **36**, 152–154 (2004).

Yang, J. K., Liu, L. Y., Dai, J. H. & Li, Q. de novo Design and Synthesis of *Candida antarctica* Lipase B Gene and α -Factor Leads to High-Level Expression in *Pichia pastoris*. *PLoS One* **8**, 1–8 (2013).

Zhang, A. L. *et al.* Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 1611–1619 (2009).