

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA

Viviane Cristina Silva

**Indução da Expressão da Glicerol-3-Fosfato
Desidrogenase em Levedura**

ARARAQUARA – SP
2009

Viviane Cristina Silva

Indução da Expressão da Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase em Levedura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus Araraquara – UNESP, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Edwil Aparecida de Lucca Gattás

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maristela de Freitas Sanches Peres

**ARARAQUARA – SP
2009**

*A DEUS pela existência e toda providência em minha vida;
Meus pais, Mário e Méris,
Minha irmã, Mauricéia e sobrinhos, Thorn Gabriel e Clara,
pelo carinho, apoio, suporte, incentivo e amor incondicional;
A todos do G.O.U, pela força nos momentos de desespero e solidão;
Aos amigos conquistados ao longo da realização deste programa, em
especial a Ana Claudia, Iza, Caio, Nadi, Werner, Aline, Kátia, Lu, Ju,
Dri, Roseli.
As minhas orientadoras, Edwil e Maristela, pelo apoio, amizade e
ensinamentos prestados;
A todos os funcionários desta instituição;
A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.*

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse Amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse Amor, nada seria..."

I Corintios 13:1

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMO	11
ABSTRACT	12
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Leveduras Metilotróficas	19
1.2. Levedura <i>Pichia pastoris</i>	20
1.3. Enzima glicerol-3 fosfato desidrogenase	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Etapas Específicas	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Microorganismo	31
3.2. Meios de Cultura	31
3.2.1. YPDA	31
3.2.2. BMGY	32
3.2.3. BMMY	33
3.2.4. BSM	34
3.3. Crescimento Celular	34
3.4. Preparação das Células de <i>Pichia pastoris</i> para a Indução da G3PDH	35
3.6. Indução da Expressão da glicerol-3-fosfato desidrogenase	36
3.7. Ultrafiltração da Proteína Heteróloga	37
3.8. Liofilização da Proteína Recombinante	37
3.9. Obtenção de Extratos da Levedura <i>Pichia pastoris</i>	38
3.10. Ensaio de Enzima Aderida à Parede Celular	38
3.11. Ensaio da Atividade da glicerol-3 fosfato desidrogenase (G3PDH)	38
3.12. Determinação da Proteína Total do Extrato Celular da Levedura	40

3.13. Experimentos Planejados Utilizando a Matriz Plackett-Burman	43
3.14. Fluxograma do Ensaio Otimizado para Produção de Biomassa e Atividade da G3PDH a Partir do Clone de <i>Pichia pastoris</i>	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Seleção e Comparação de Clones	45
4.2. Atividade Enzimática em Células de <i>Pichia pastoris</i>	47
4.3. Seleção de Meio para Crescimento da Levedura Recombinante.....	48
4.3.1. Meio BSM	48
4.3.2. Meio BMGY.....	50
4.4. Padronização das Condições de Indução e Concentração da Enzima Recombinante	51
4.4.1. Efeito do Tamanho do Inóculo	51
4.4.2. Efeito da Concentração de Metanol no Meio BMMY	53
4.4.3. Efeito da natureza do tampão no meio BMMY.....	55
4.4.4. Efeito da suplementação do meio	56
4.4.5. Efeito da concentração do meio de cultura fermentado	58
4.4.6. Efeito de diferentes peptonas	59
4.4.7. Efeito do pH do meio de cultura.....	60
4.4.8. Efeito da adição de sulfato de amônio	61
4.4.9. Efeito de outras suplementações do meio	63
4.4.10. Efeito da pré-indução celular por estresse osmótico	64
4.4.11. Efeito da liofilização	68
4.5. Seleção de variáveis significativas na indução da expressão da enzima	69
5. CONCLUSÕES.....	70
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da repressão ou desrepressão em diferentes fontes de carbono sobre os genes de leveduras metilotróficas ^a	20
Tabela 2 – Ensaio enzimático da atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase excretada extracelularmente pelos clones ^a	45
Tabela 3 – Efeito da metodologia de rompimento celular em células de <i>Pichia pastoris</i> , para obtenção da enzima G3PDH.	48
Tabela 4 – Produção de biomassa e ensaio da atividade da G3PDH secretada extracelularmente pela levedura na presença de diferentes tampões ^a	56
Tabela 5 – Produção de biomassa e ensaio da atividade da G3PDH secretada extracelularmente pela levedura na presença de diferentes peptonas adicionadas no meio de cultura.....	60
Tabela 6 – Produção de biomassa e ensaio da atividade da G3PDH secretada extracelularmente pela levedura na presença de diferentes pH no meio de cultura.....	61
Tabela 7 – Efeito de adição de suplemento ao meio BMMY utilizando glicina 0,4M e caseína 1% e 2%.....	64
Tabela 8 –Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH em meio BMMY (experimento controle) ^a	66
Tabela 9 – Resultados da determinação de atividade da G3PDH a partir de células de <i>Pichia pastoris</i> submetidas ao tratamento com 0,35M de NaCl em meio BMGY ^a	66
Tabela 10 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de <i>Pichia pastoris</i> submetidas ao tratamento com BMGY + NaCl 0,35M ^a	67
Tabela 11 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de <i>Pichia pastoris</i> submetidas ao tratamento com BMGY + Sacarose 1M ^a	67
Tabela 12 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de <i>Pichia pastoris</i> submetidas ao tratamento com BMGY + Sorbitol 1M ^a	67
Tabela 13 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de <i>Pichia pastoris</i> submetidas ao tratamento com BMGY+ Acetato de Potássio 0,35M ^a	68
Tabela 15 – Efeito da liofilização no sobrenadante do meio de cultivo de <i>Pichia pastoris</i> contendo a enzima glicerol-3 fosfato desidrogenase.....	69
Tabela 16 – Produção de biomassa e atividade da G3PDH em função das variáveis selecionadas.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Via do metanol em <i>Pichia pastoris</i>	22
Figura 2 – Curva que relaciona a massa seca (mg células/mL) da Linhagem <i>P. pastoris</i> com a absorbância a 570 nm. A regressão linear $Y = A + B * X$ mostrou os seguintes parâmetros: A = 2,98189E-6 com desvio de 0.003950, B = 1,13083 com desvio de 0,01474 e o fator de correlação da reta (R = 0,99958). O coeficiente angular ($F = 1/B = 1/1,13083$) considerado foi o fator de correlação $F = 0,88431$ com desvio padrão (SD) de 0,00564.....	35
Figura 3 – Curva Padrão da Soroalbumina Bovina. A regressão linear da curva $Y = A + B * X$ mostrou os seguintes parâmetros: A = 0,07687 (intercepta com o eixo Y contendo desvio sd = 0,0177); B = 0,8346 (quando X = 1 contém desvio sd = 0,0286); R = 0,99532 (fator de correlação da reta); SD = 0,02602 (desvio padrão).....	42
Figura 4 – Produção de biomassa em função do tempo de crescimento e indução para os clones selecionados.....	46
Figura 5 – Atividade da enzima glicerol fosfato desidrogenase em função do tempo de crescimento e indução pelos clones selecionados.....	47
Figura 6 – Produção de biomassa em função do tempo de crescimento e indução utilizando o meio BSM.....	49
Figura 7 – Atividade da enzima glicerol fosfato desidrogenase em função do tempo de crescimento e indução utilizando o meio BSM.....	50
Figura 8 – Produção de biomassa em função da densidade inicial de células da levedura <i>P. pastoris</i>	52
Figura 9 – Atividade da enzima glicerol fosfato desidrogenase em função da densidade inicial de células da levedura <i>P. pastoris</i>	53
Figura 10 – Produção de biomassa analisada após 4 dias de crescimento e indução em função da concentração de metanol no meio BMMY.....	54
Figura 11 – Atividade da G3PDH após 4 dias de crescimento e indução em função da concentração de metanol no meio BMMY.....	55
Figura 12 – Acúmulo de Biomassa após 4 dias de crescimento em meio BMMY controle (1) com 1% de Sorbitol (2) e com 1% de Glicerol (3).....	57
Figura 13 – Produção de G3PDH após 4 dias de crescimento em meio BMMY controle (1), com 1% de Sorbitol (1) e com 1% de Glicerol (2).....	58

Figura 14 – Curva de atividade da G3PDH após 4 dias de crescimento e indução em função da concentração do meio de cultura fermentado.....	59
Figura 15 – Efeito do pH do meio BMMY contendo 1% de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ sobre a produção de biomassa.	62
Figura 16 – Efeito do pH do meio BMMY contendo 1% de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ sobre a atividade de G3PDH.	63

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ϵ	absortividade molar
λ	comprimento de onda (nm)
AOX	álcool oxidase
BMMY	Buffered complex medium containing methanol (Meio tamponado complexo contendo metanol)
BMGY	Buffered complex medium containing glycerol (Meio tamponado complexo contendo glicerol)
BSA	Albumina soro bovino
BSM	Basal Salt Médium – Meio Basal Salino
Da;kDa	Dalton; Kilodalton
EC	Enzyme Commission (Comissão de Enzima (IUBMB))
g	Força gravitacional
G3PDH	Glicerol-3 fosfato desidrogenase
HCl	Acido Clorídrico
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)
M	Molaridade (Mol/L)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaF	Fluoreto de sódio
NH ₄ SO ₄	Sulfato de amônio
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
Tris	Tris hidroximetilaminometano
U	Ultravioleta
YNB	Yeast Nitrogen Base (base nitrogenada de levedura)

RESUMO

O gene GPD2 de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH; EC 1.1.1.8; NAD⁺: oxidoreductase) foi clonado na levedura *Pichia pastoris* para expressar extracelularmente a enzima em meio de cultura. Essa enzima apresenta aplicação prática em diversos sistemas acoplados para determinação quantitativa de triacilglicerol, glicerol, ácido fosfatídico e outros fosfolípidios também podendo ser usada para medir atividades enzimáticas em diversos tipos de amostras. Para que a atividade extracelular fosse suficiente em ensaios industriais e biológicos, um estudo de indução da expressão da enzima foi realizado no presente trabalho, que consistiu em escolher o clone que melhor secreta a enzima e estudar o meio de crescimento (BMGY), a densidade inicial celular (0,05 mg/mL), o meio de indução enzimática (BMMY), a natureza do tampão (tampão fosfato), o pH (6,0), o tempo de produção da proteína (4 dias), a concentração da enzima através de membrana filtrante (120 vezes), a melhor fonte de peptona (Acumédia), o estudo de pré-indução celular por estresse osmótico (atividade de $0,477 \pm 0,0$ U/mL em 24 horas com NaCl 0,35M). O processo de produção da G3PDH mostrou que a máxima produtividade enzimática (795 U/mL e atividade específica de 44,49 U/mg) e biomassa final de 17,75 mg/mL foi obtida com as seguintes condições experimentais: 48 horas de indução com meio BMMY, utilizando 1% de metanol, 1% de glicerol, densidade inicial celular de 0,05 mg/mL, pH 5,0 e sobrenadante concentrado 120 vezes em membrana filtrante.

Palavras-chave: Levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, glicerol-3-fosfato desidrogenase.

ABSTRACT

The GPD2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*, which encodes the enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH, EC 1.1.1.8, NAD⁺: oxidoreductase) was cloned in the yeast *Pichia pastoris* to express the enzyme extracellularly in the culture medium. The enzyme G3PDH has practical application in various systems coupled to quantitative determination of triacylglycerol, glycerol, phosphatidic acid and other phospholipids. It can also be used to measure the enzymatic activities in diverse types of samples. For the application of the enzyme extracellular in industrial and biological tests, a study of induction of expression of the enzyme was accomplished in the present work, that consisted of to choose of clone that more expressing the enzyme, the growth medium (BMGY), the cellular initial density (0.05 mg/mL), the medium of enzymatic induction (BMMY), the buffer nature (phosphate potassium), pH (6.0), the time of production of the protein (4 days), the concentration of the protein (120-fold), the peptone source (Acumédia), the study of pre-induction cellular for osmotic stress (activity of 0.477 ± 0.0 U/mL in 24 hours with NaCl 0.35M). The study of the variable determinative in the process of production of the G3PDH it showed that the maximum enzymatic productivity (0.795 U/mL and 44.49 U/mg of specific activity) and final biomass of 17.75 mg/mL was obtained with the following experimental conditions: 48 hours of induction with medium BMMY, using 1% methanol, 1% glycerol, cellular initial density of 0.05mg/mL, pH 5.0 and the supernatant concentrated 120-fold in filter membrane.

Key words: Methylophilic yeast, *Pichia pastoris*, glycerol-3-phosphate dehydrogenase.

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são conhecidas como fungos unicelulares que se reproduzem vegetativamente por brotamento ou fissão. As leveduras são amplamente encontradas no meio ambiente, suas células não possuem clorofila (não são fotossintéticas), sendo estritamente quimiorganotróficas, ou seja, requerem formas orgânicas de carbono de diversas fontes, para seu crescimento, e suas fontes são muito diversas, tais como: açúcares, polióis, ácidos graxos e orgânicos, álcoois alifáticos, hidrocarbonos e vários compostos heterocíclicos e poliméricos, e sua seletividade nutricional determina a diversidade da espécie e seu nicho, em outras palavras, as leveduras exibem grande especialização de habitats (PHAFF et al, 1978), porém seu habitat preferido é tecido de plantas. Muitas espécies são encontradas em relações comensais ou parasitas com animais, algumas em particular são extremófilas, particularmente as osmofílicas, as quais são capazes de crescer em altas concentrações de açúcares, outras são encontradas em alimentos deteriorados, ou mesmo em processos fermentativos realizados pelo homem, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae* encontrado em superfícies vinícolas (MARTINI,1993), ao passo que em hospitais, diversas leveduras patogênicas são encontradas, em especial à *Candida* spp (*C. albicans*) que responde por 80% de toda infecção hospitalar (SCHABERG et al,1991).

Atualmente, a exploração de leveduras apresenta impactos significativos em relação ao suprimento de energia renovável, pois são capazes de fermentar carboidratos, produzindo etanol, e em estudos biotecnológicos, incluindo o controle de doenças, particularmente doenças genéticas e câncer. Grandes avanços foram realizados no campo da medicina, devido a produção de proteínas terapêuticas humanas utilizando a engenharia genética de leveduras. O uso de leveduras na medicina terapêutica não é somente ligada à moderna tecnologia do DNA recombinante, mas desde os tempos antigos as leveduras têm sido utilizadas no controle biológico de infecções bacteriológicas (WALKER, 2000).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve um papel de destaque, além de ser considerado um dos microrganismos mais úteis ao homem, essa levedura é um

dos sistemas eucarióticos mais bem conhecidos. O pão, a cerveja e o vinho representam os produtos mais expressivos do processo de manipulação desses microrganismos ao longo do tempo e cuja manipulação causou um grande impacto na produção de alimentos e, por conseguinte, influenciando o próprio processo de desenvolvimento sócio-econômico da humanidade.

O crescimento de um microrganismo, assim como, a vida de qualquer célula depende de dois processos básicos, catabolismo e anabolismo, que devem ocorrer, simultaneamente e com velocidades dependentes da disponibilidade de água e nutrientes. O processo denominado catabolismo gera energia a partir de nutrientes, bem como, os precursores de síntese para a renovação do material celular. Os processos de síntese são coletivamente denominados anabolismo. Um aspecto interessante referente ao anabolismo (biossíntese) é que uma de suas reservas de hidrato de carbono é um dissacarídeo simples denominado trealose. A outra reserva é o glicogênio encontrado também nos animais. A fisiologia das leveduras está relacionada com as formas pelas quais as células de leveduras captam os nutrientes do ambiente e os metabolizam, crescem, reproduzem-se, sobrevivem e por fim morrem. Assim, os microrganismos necessitam de uma série de elementos nutricionais, alguns necessários em quantidade elevadas (macronutrientes), e outros, em quantidades pequenas (micronutrientes).

As necessidades nutritivas dos microrganismos são, basicamente, as mesmas exigidas por todos os seres vivos para exercerem suas atividades. As necessidades nutricionais mais importantes para as leveduras, são as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo (BERRY ; BROWN, 1987).

Por serem organismos quimiorganotróficos, obtêm carbono e energia dos compostos através das ligações orgânicas. Estes compostos orgânicos tais como a glicose, têm duas funções fisiológicas: fornecer esqueletos de carbono e energia para sínteses. A fonte de carbono preferencialmente utilizada é a glicose, outras fontes de nutrientes contendo misturas de carboidratos são freqüentemente usados na indústria, como é o caso do melaço de beterraba que contém glicose, frutose, sacarose e rafinose. Outras fontes de nutrientes (etanol, acetato) podem agir como substrato na respiração, mas somente em *S. cerevisiae*.

Em relação à fonte de nitrogênio, as células de leveduras apresentam cerca de 10% de nitrogênio de seu peso seco, mas não fixam nitrogênio molecular. Portanto, fontes simples como sais de amônio são amplamente usadas, onde o mais utilizado é o sulfato de amônio. Algumas leveduras podem crescer em nitrato como fonte de nitrogênio, e são capazes de utilizar baixas concentrações de nitrito. A assimilação de nitrato tem sido usada como um teste fisiológico para diferenciar leveduras, a *Hansenula* spp, por exemplo, é nitrato positivo, enquanto que *Pichia* spp é nitrato negativo. Uma outra fonte de nitrogênio inorgânico é o NH_4Cl . O nitrogênio é utilizado para síntese de aminoácidos, nucleotídeos e outros compostos celulares. Assim, um grande número de substâncias pode ser empregado como fonte de nitrogênio pelas leveduras tais como:

A - Aminoácidos específicos - muitos aminoácidos podem ser utilizados como fonte de nitrogênio, mas a principal função de alguns deles consiste em servir como fator de crescimento como a arginina que favorece a velocidade de crescimento da levedura.

B - Mistura de Aminoácidos - hidrolisados de proteína, contendo misturas de aminoácidos, geralmente levam a altas velocidades específicas de crescimento com rendimentos celulares mais alto do que qualquer outro aminoácido separadamente.

C- Peptídeos - um número limitado de dipeptídeos e tripeptídeos podem ser utilizados pelas leveduras.

D - Uréia - a uréia constitui-se em uma boa fonte de nitrogênio, apesar da necessidade da suplementação com a vitamina biotina.

E - Purinas e Pirimidinas - as bases purinas e pirimidinas também podem servir como fonte de nitrogênio a célula.

As diversas fontes de nitrogênio não são assimiladas pela levedura, com a mesma velocidade, quando estão em meios industriais. Segundo Cooper (1982) uma boa fonte de nitrogênio deve apresentar as seguintes características:

- 1 - ser rapidamente consumida dentro da célula;
- 2- sofrer conversão, uma vez dentro da célula, com mínima interferência nas etapas de sua conversão em glutamato ou amônia, ou ambas e
- 3 - não causar efeitos tóxicos sobre as células.

O fósforo é assimilado somente na forma de íon fosfato de dihidrogênio (H_2PO_4^-) e atua sobre a regulação do metabolismo celular e na síntese de ácidos nucleicos. A concentração intracelular do PO_4^{2-} regula a síntese de lipídeos e carboidratos. Tanto o KH_2PO_4 quanto o Na_2HPO_4 podem servir como fontes de fósforo. As leveduras também podem estocar fosfato em organelas, segundo Okorokov et al (1980) a concentração de fosfato foi 110 vezes maior em vacúolos quando comparado com as quantidades presentes no citoplasma.

As vitaminas e fatores de crescimento são geralmente exigidas por muitas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* como elementos indispensáveis ao crescimento. Entre elas podemos destacar:

1 - Inositol - importante sobre a composição lipídica da célula que por sua vez atua como fator crítico para a manutenção do estado fisiológico da membrana celular. O inositol desempenha também um papel importante na regulação da velocidade de fermentação.

2 - Pantotenato - muitas espécies de *Saccharomyces* exigem esta vitamina. O pantotenato é normalmente encontrado em meios sintéticos, na forma de pantotenato de cálcio, mas encontra-se ligado à coenzima A na célula viva.

3 - Tiamina (vitamina B₁) - o efeito das deficiências de tiamina sobre os desequilíbrios nutricionais das leveduras (KAMIHARA ; NAKAMURA, 1982) podem ser observadas em relação à capacidade respiratória, formação de ácidos graxos, lipídeos e produção de etanol.

4 - Biotina - quantidades baixas, adicionadas aos meios sintéticos e complexos não refletem a principal importância desta vitamina a qual consiste em desempenhar papel essencial no crescimento de leveduras. A biotina atua, notadamente, sobre algumas áreas do metabolismo das leveduras, tais como: carboxilação do piruvato; síntese de nucleotídeos; síntese de ácidos nucléicos; formação de bases purina e pirimidinas; síntese de proteínas; síntese de polissacarídeos e síntese de ácidos graxos.

O nutriente hidrogênio para o crescimento de leveduras é principalmente obtido de carboidratos. Os íons hidrogênio são muito importantes na fisiologia celular da levedura, pois variações de pH podem influenciar dramaticamente no crescimento

e no metabolismo das leveduras. Geralmente, as leveduras crescem em pH entre 4-6, mas várias leveduras são capazes de crescer numa faixa de pH de 2-8. Em geral, a habilidade de crescer em baixo pH mostra que muito mais que as bactérias, as leveduras ocuparam diferentes nichos ecológicos, mas em geral as leveduras não conseguem crescer muito bem em pH alcalino.

As leveduras são incapazes de crescer bem na ausência de oxigênio, ou seja, este nutriente é um requisito necessário nas reações de hidroxilações que ocorrem durante o crescimento, tais como as biossínteses de esteróis e ácido graxos insaturados. Diferentes leveduras necessitam de quantidades diferentes de O₂ e alta pressão (BULL ; BUSHELL,1976).

O enxofre é requerido principalmente na biossíntese de aminoácidos e está presente em cerca de 0,3% do peso seco das leveduras. Fontes de enxofre podem estar em vários compostos, tais como: sulfato, sulfito, tiosulfato, metionina e glutatona. Entretanto, o sulfato e a metionina são compostos centrais do metabolismo das leveduras. Metionina é o aminoácido mais eficiente na nutrição desses microrganismos.

As leveduras também necessitam de minerais, geralmente os meios de cultura são suplementados com K, Mg e outros elementos traços. Em especial o K e o Mg são macronutrientes necessários a célula, extremamente importante, o K, atua como cofator para um grande número de enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa, biossíntese protéica e metabolismo de carboidrato, e representa 1-2% do peso seco da levedura, já o magnésio representa 0,3%. Na faixa de micromolar até nanomolar, outros minerais são nomeados como micronutrientes ou elemento traço que incluem: Mn, Ca, Fe, Zn, Cu, Ni, Co e Mo, além de Ag, As, Ba, Cs, Cd, Hg, Li e Pb onde estes no meio não devem ter concentrações elevadas (WALKER, 2000).

Em relação à genética, a levedura *S. cerevisiae* é bem estudada e seu genoma foi totalmente seqüenciado, fato este que representou uma das maiores conquistas da Biologia no século XX. Após o advento da tecnologia do DNA recombinante, esta levedura pôde ser empregada em estudos de genética molecular a partir do final dos anos 70, quando ela foi geneticamente transformada pela primeira vez. Desde então, vários tipos de vetores moleculares foram desenvolvidos,

inclusive cromossomos artificiais, mais conhecidos como YAC (Yeast Artificial Chromosomes). Com a obtenção de cepas de leveduras mutantes foi possível o isolamento de genes de outros organismos eucarióticos por complementação. No campo da pesquisa aplicada, a levedura *S. cerevisiae* logo se destacou como um interessante candidato para a expressão de genes heterólogos de interesse biotecnológico. O ambiente intracelular da levedura é adequado para a ocorrência de várias reações que normalmente ocorrem em células de mamíferos (TORRES ; MORAES, 2000).

Um outro microrganismo de interesse biotecnológico como *Escherichia coli* tem sido usado extensivamente como um hospedeiro celular, para a produção de proteínas heterólogas. No entanto, muitas aplicações não apresentaram o resultado esperado, pois esse simples microrganismo é deficiente de um sistema intracelular que dificulta a expressão da proteína recombinante. Expressão de proteína recombinante, de sucesso em *E. coli*, é, portanto muito dependente das conformações primárias, secundárias, terciárias e das características funcionais da proteína de interesse (DALY ; HEARN, 2005). Há uma grande variedade de proteínas que não podem ser expressas em *E. coli*, pois precisam de um nível correto de maturação pós-traducional, necessitando ser produzidas na levedura metilotrófica, *Pichia pastoris* (MONSALVE et al, 1999).

1.1. Leveduras Metilotróficas

Ao longo das últimas décadas, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae*. Entre esses novos sistemas, destacam-se as leveduras metilotróficas, ou seja, espécies de leveduras que são capazes de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono e energia. Todas as linhagens identificadas como metilotróficas, atualmente, pertencem a apenas quatro gêneros: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* e *Torulopsis* (FABER et al, 1995), e suas aplicações em biotecnologia se destacam na produção de proteínas recombinantes e porque as reações iniciais de utilização do metanol ocorrem nos peroxissomos, organela que é

fortemente induzida quando se utiliza somente metanol como fonte de carbono (VEENHUÍS ; Van Der KLEI, 2002; GOULD ; VALLE, 2000).

Mostra-se na tabela 1, estudos de comparação de diferentes espécies de leveduras metilotróficas em relação à fonte de carbono. Observa-se que a glicose reprime a expressão da proteína, enquanto que a adição de glicerol ou outra fonte de carbono é dependente do promotor e da levedura.

Tabela 1 – Efeito da repressão ou desrepressão em diferentes fontes de carbono sobre os genes de leveduras metilotróficas ^a

		Glicose, Etanol	Glicerol	Metanol	Glicerol+MeOH
<i>Pichia pastoris</i>	AOX1	Repressão	Repressão	Indução	Repressão
	AOX2	Repressão	Repressão	Indução	Repressão
<i>Hansenula polymorpha</i>	MOX	Repressão	Desrep. (~60-70%)	Indução	Indução (~100%)
	FMD	Repressão	Desrep. (~60%)	Indução	
<i>Cândida boidinii</i>	AOD1	Repressão	Desrep. (~3-30%)	Indução	Indução (~90%)
	FDL	Sem atividade	Desrep. (~20%)	Indução	Indução (~70%)
	FDH	Repressão	Sem atividade	Indução	Indução (~30%)
	DAS	Repressão	Desrep. (~2%)	Indução	Indução (~70%)
<i>Pichia methanolica</i>	MOD1	Repressão	Desrep. (~60-70%)	Indução	Indução (~100%)
	MOD2	Repressão	Sem atividade	Indução	Indução (~100%)
	FLD	Sem atividade	Desrep (~20%)	Indução	Indução (~70%)

Fonte: Adaptado HARTNER ; GLIEDER, 2006.

1.2. Levedura *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica também conhecida como *Endomyces pastori*, *Komagataella pastori*, *Petasospora pastori*, *Saccharomyces pastori*, *Zigosaccharomyces pastori*, *Zygowillia pastori* e *Zymopichia pastori*. Naturalmente encontrada no exsudato de castanheiro na França e em carvalho preto da *Quercus kelloggii* nos USA. Sua taxonomia é descrita como sendo do reino Fungi, filo *Ascomycota*, sub-filo *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordem

Saccharomycetales, família *Sacchamomycetaceae*, gênero *Pichia* e espécie *P. pastoris* (BARNETT et al, 2000).

Algumas leveduras do gênero *Pichia* são encontradas no solo, água doce, insetos, exsudatos de árvores, plantas e frutas e também como contaminantes em uma variedade de alimentos e bebidas, algumas destas espécies podem contribuir com efeitos desejáveis nas fases iniciais da fermentação de vinho, em vários tipos de salmoura, em diferentes tipos de queijos, enquanto que algumas espécies têm sido descritas como patógenos humanos (BAKIR et al, 2004; OTAG et al, 2005).

Todas elas utilizam uma via específica para o metanol, no qual envolve várias enzimas específicas. As reações iniciais ocorrem em organelas especializadas, os peroxissomos, seguido por passos metabólicos subseqüentes no citoplasma (Figura 1). Os peroxissomos desempenham um papel indispensável durante o crescimento, uma vez que possui três enzimas chaves para o metabolismo do metanol, a álcool oxidase, catalase e a diidroxiacetona sintase. As reações subseqüentes de assimilação e desassimilação do metanol estão localizadas no citosol (MACAULEY-PATRICK et al, 2005). A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa o primeiro passo na via de utilização do metanol, a oxidação do metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio, AOX é seqüestrado dentro do peroxissomo junto com a catalase, no qual degrada o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água. Uma parte do formaldeído gerada pela AOX deixa o peroxissomo e mais adiante é oxidada a formiato e dióxido de carbono por duas desidrogenases do citoplasma, reações que são fonte de energia para o crescimento celular em metanol (CEREGHINO ; CREGG, 2000). A enzima álcool oxidase é fortemente reprimida por várias fontes de carbono, tais como glicose e glicerol, e induzida por falta de fonte de carbono. A conversão de metanol a formaldeído é um passo limitante na utilização de metanol como fonte de carbono, e é regulado pela quantidade de enzima AOX presente na célula. Há demonstrações deste comportamento, quando se aumenta de repente à concentração de metanol, o crescimento celular é inibido.

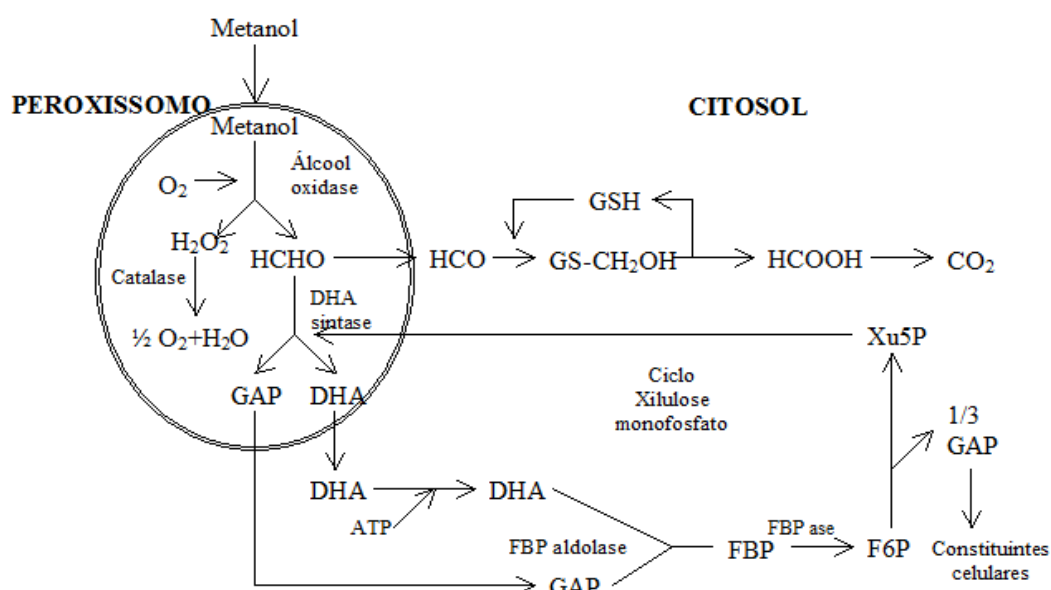


Figura 1 – Via do metanol em *Pichia pastoris*.
Fonte: Adaptado de Cereghino; Cregg, 2000.

O fato de a levedura *Pichia pastoris* crescer até alta densidade celular em um meio barato levou a empresa Phillips Petroleum Company a propor o uso dessa levedura como fonte de alimento (“single cell protein – SCP”). Após constatar que o processo de produção de SCP era inviável economicamente por causa do valor do metanol, devido à crise do petróleo na década de 1970 (COS et al, 2006), a empresa decidiu transformar *P. pastoris* em um sistema de produção de proteínas recombinantes. A levedura *P. pastoris* apresenta duas características que a tornam uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas. A primeira é o forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da álcool oxidase (AOX1) de *P. pastoris*. Esse promotor é regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. No entanto, ao contrário dos promotores glicolíticos, o promotor AOX1 é firmemente regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol. Uma vez que a maioria das proteínas heterólogas é de

alguma forma deletéria para a célula, quando expressas em altos níveis, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável. Trata-se de uma importante precaução para minimizar a seleção de mutantes que não expressam o produto heterólogo durante o crescimento da cultura. Para ser ativado, o promotor AOX1 requer a presença de metanol e, na ausência desse indutor, ele se torna reprimido. Além de metanol, o sistema AOX1 necessita da ausência de glicose para ser plenamente ativado. Uma vez que o promotor AOX1 é controlado pela manipulação da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris*, que expressam proteínas heterólogas, são facilmente obtidos em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores.

Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células. É necessário, pois, atingir níveis de alta densidade celular os quais não são facilmente obtidos com *S. cerevisiae*. Em contraste, as cepas produtoras de *P. pastoris* são facilmente cultivadas a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de peso seco, ou até maiores. Vários genes de diferentes procedências (bactérias, fungos, invertebrados, plantas e humanos) já foram expressos em *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX1. A maioria dos genes expressos teve seus produtos secretados para o meio extracelular e alguns, como o fator de necrose tumoral humano, foram produzidos no ambiente intracelular (TORRES ; MORAES, 2000).

Os sistemas de expressão neste microrganismo permitem a produção de proteínas tanto na forma intracelular quanto extracelular. Embora o sistema de produção extracelular apresente a vantagem da liberação da proteína de interesse no sobrenadante do meio de cultivo, ambos os modelos de expressão estão sendo amplamente estudados e precisam de quantidade suficiente de massa celular para que proteínas sejam purificadas para a utilização como produto (CEREGHINO ; CREGG, 2000).

Atualmente, mais de quinhentas proteínas foram clonadas e expressas usando o sistema *P. pastoris* (MACAULEY-PATRICK et al, 2005; CREGG, 2008). Cereghino ; Cregg (2000) descreveram algumas das proteínas expressas no sistema

P. pastoris, algumas originalmente encontradas em bactérias (α -amilase originalmente de *Bacillus licheniformis*, D-alanina carboxipeptidase de *Bacillus stearothermophilus*), outras encontradas em fungos, (glucoamilase de *Alternaria alt*, catalase L de *Aspergillus fumigatus*), outras encontradas em protistas, (hexose oxidase de *Chondrus crispus* (alga vermelha), ácido α -mannosidase de (*Trypanosom cruzi*), em plantas, (fitocromo B de batata, ácido fosfatase de nódulo de grão de soja), invertebrados (proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* (água viva). Alguns vertebrados, (β -caseína bovina, inibidor de tripsina pancreático bovino (aprotitina), gelatinase B de rato, transportador intestinal de peptídeo (PEPt1 e 2 de rato), albumina sérica, trombomodulina.

Segundo Cos et al (2006), a otimização da expressão de proteínas heterólogas, que consiste em maximizar o rendimento e a produtividade, depende de diferentes fenótipos com o promotor AOX, ou outros promotores, meios de cultura e estratégias operacionais.

Macauley-Patrick et al (2005) relatam que grande parte dos trabalhos em *P. pastoris* utiliza um meio complexo para o crescimento e indução da expressão protéica. As formulações destes meios encontram-se nos protocolos da Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA), e são dependentes do tipo de linhagem utilizada. A concentração de substratos (glicose ou glicerol) é uma limitação mais comum na produção em larga escala, porque a manutenção do substrato inicial em baixa concentração (não-inibitória) é essencial na otimização da produção de biomassa e conseqüentemente na proteína desejada.

Boze et al (2001) obtiveram quantidades suficientemente altas de expressão de proteína em biorreator, comparando com o cultivo em pequenos frascos, quando *P. pastoris* foi cultivada usando uma alta densidade celular em biorreator alimentado ou em processo contínuo de fermentação, onde o pH e a quantidade de oxigênio foram controlados.

Revisões bibliográficas sobre o sistema de produção de *Pichia pastoris* demonstraram que as melhores condições (meio de cultura, pH, temperatura, etc) variam de acordo com o tipo de linhagem usada e/ou o tipo de proteína heteróloga que se deseja expressar (SINHA et al, 2003; FILES et al, 2001). Choi; Park (2006)

relatam que em geral, para a produção de proteína heteróloga usando *P. pastoris* em fermentador, há três estágios nesse processo, primeiro, o acúmulo de biomassa utilizando o glicerol como fonte de carbono; segundo, uma fase de transição, no qual as células são adaptadas para a fase posterior (indução), ou seja, estratégias de adição de glicerol são realizadas para obter velocidades limitantes de crescimento, e terceiro é o início da fase de indução pela adição lenta de metanol.

Segundo a Invitrogen Co (2000), o meio mais comum para a obtenção de alta densidade celular em fermentações com essa levedura, é o meio BSM (“basalt salt medium”). O meio BSM é suplementado com micronutrientes como Fe, Mn, Cu e biotina, normalmente utilizando uma solução de traços de sais (PTM1) proposta pela Invitrogen. Considerado como um dos melhores meios, este meio pode não ser ótimo por possuir alguns problemas importantes (composição desbalanceada, precipitações, força iônica, etc). Dessa forma, algumas propostas alternativas para esse meio foram realizadas por D’Anjou ; Daugulis (2000), Stratton et al (1998), por exemplo, nas variações das concentrações de fósforo e potássio. Esses meios de cultura foram formulados para a obtenção de altas densidades celulares em culturas de batelada alimentada. A influência desses elementos no desenvolvimento de *P. pastoris* não é bem conhecida. Alguns autores (BOZE et al, 2001) encontraram uma suplementação basal para o meio com sete vitaminas e dois traços de sais que aumentam a produção do hormônio folículo-estimulante porcino, de 93 mg/mL (basal) para 187 mg/mL (suplementado), mostrando que a vitamina e os elementos traços requeridos tiveram um importante efeito no crescimento da célula e na produção da proteína recombinante em *P. pastoris*.

Xie et al (2005) utilizaram o meio BSM para a produção de angiostatina em biorreator, adicionaram no cultivo outras fontes de carbono (para uma melhora na produção da proteína), tais como glicerol, sorbitol, acetato e ácido láctico, no qual respectivamente, estas foram adicionadas juntamente com o metanol, na fase de expressão protéica. A produção de angiostatina era de 108 mg/L quando o glicerol foi adicionado. Com sorbitol como fonte de carbono, a concentração da proteína foi de 141 mg/L e somente 52 mg/L com o uso do acetato. A melhor produção foi de 191 mg/L, utilizando-se o ácido láctico. Experimentos iniciais foram realizados em

frascos com quatro diferentes fontes de carbono, nos quais indicaram melhoras no crescimento da *P. pastoris* e com efeitos diferentes de expressão da proteína. Como o controle de substrato e pH não pode ser realizado neste tipo de experimento, a comprovação dos resultados com diferentes fontes de carbono foram realizados em biorreatores. A estratégia empregada foi utilizar uma mistura de fontes de carbono, ou seja, glicerol foi adicionado ao metanol durante a fase de expressão protéica, mas tomando-se o cuidado do glicerol não reprimir o promotor AOX e diminuir a produção da proteína desejada (BRIERLEY et al, 1990). Sendo assim, o uso de fontes de carbono que melhoram o crescimento, mas não reprimem o promotor AOX é essencial para a melhora do controle do processo fermentativo.

Sorbitol é também aceito como fonte de carbono não-repressiva para *P. pastoris*, no qual o nível de produção pode ser comparado com os dados obtidos com glicerol (SREEKRISHNA et al,1997; THORPE et al, 1999). Manitol, alanina e trealose também são citados como fontes de carbono não repressoras em outros estudos (SREEKRISHNA et al, 1997; TORPE et al, 1999; SEARS et al, 1998), mas o uso do ácido láctico, não há citações.

Inan ; Meagher (2001) utilizaram como fontes de carbono, a alanina, sorbitol e manitol, cada uma dessas fontes mostrou uma incrível produção de β -galactosidase recombinante comparadas com células crescidas com glicerol ou glicose, bem como redução na concentração de metanol requerida para a indução da expressão de proteínas.

Chiruvolu et al (1997) mostraram que altas velocidades de alimentação de glicerol resultam em alta produção de biomassa, mas decréscimos na atividade da proteína, devido ao acúmulo de etanol como obtida pela linhagem Mut⁻ (CHIRUVOLU et al, 1997). Observa-se que longos períodos de velocidade de alimentação causam desequilíbrio na célula em termos de energia e aminoácidos (COS et al, 2006).

Um outro fator importante para que se obtenha sucesso na expressão de proteína heteróloga, é a fonte de nitrogênio. Para Cos et al (2006) um dos fatores mais importantes nos meios BSM e FM22 é a fonte de nitrogênio, que é adicionado na forma de hidróxido de amônio, para controle de pH. Macauley-Patrick et al (2005)

salienta que o aumento nas concentrações de amônio no meio de cultivo pode prolongar a fase lag e assim inibir o crescimento celular, especialmente nas concentrações iguais ou acima de 0,6mol/L. Porém, Kobayashi et al (2000) determinaram que para a produção da lipase em *Rhizopus orizae*, a falta de nitrogênio está diretamente relacionada com o aumento da atividade proteolítica e conseqüentemente na degradação das proteínas extracelulares.

Choi ; Park (2006) investigaram que o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, casaminoácidos, extrato de carne, e duas fontes inorgânicas, sulfato de amônio e uréia), para a produção de α -amilase de pâncreas de rato utilizando *P. pastoris* reprimiram a expressão e o crescimento da *P. pastoris* G2. Esses autores observaram que o extrato de levedura e a peptona foram às fontes mais apropriadas, principalmente quando utilizadas juntas, produzindo 300U/mL de α -amilase. Eles também observaram que a célula utilizada requer ácido glutâmico, alanina, valina, leucina e tirosina e que a variação do pH e a baixa quantidade de aminoácidos provinda do nitrogênio inorgânico proporcionaram um baixo crescimento celular e baixa expressão da enzima. Outros autores (CHAUHAN et al, 1999) utilizaram como fonte de nitrogênio, casaminoácidos e alanina para a produção do antígeno viral da hepatite B e observaram que a cultura suplementada foi a que obteve melhores resultados. Ohya et al (2002) verificou que a adição de 10% de peptona ou 0,2 mol/L de arginina ao meio de cultura fez com que a atividade da pro-uriquinase anexina V atingisse a 7,8 kU/mL em 168 horas de cultivo. Segundo Ohda et al (2000), a adição de sulfato de amônio foi importante na prevenção da degradação da sereprotease da albumina sérica humana secretada pela *P. pastoris* durante o seu crescimento.

Outros meios são utilizados como o BMGY e BMMY por vários autores (SHI et al, 2003; XIE et al, 2005; CHEN et al, 2004). Esses meios são utilizados para acúmulo de biomassa (BMGY) e indução da proteína (BMMY).

O pH também exerce um importante fator na manutenção e estabilidade da proteína heterólogas expressas por *Pichia pastoris*, e seu controle é necessário para minimizar a degradação proteolítica de proteínas heterólogas (WERTEN et al, 1999; SCORER et al, 1993). Saelens et al, (1999) observaram que o pH do meio de cultura

possui um importante efeito sobre a expressão do vírus influenza A (hemaglutinina) e neste caso, seu melhor rendimento foi obtido a pH 8,0. Para Rosenfeld et al (1996) a hirudina recombinante, um potente inibidor de trombina foi expresso a pH 5,0. Segundo Choi ; Park (2006), quando as culturas foram crescidas a pH 6,0, a atividade da α -amilase permaneceu estável e altos níveis de expressão da enzima foram obtidos. Portanto, a proteína que se deseja expressar é dependente do pH do meio de crescimento da levedura *Pichia pastoris*.

A temperatura ótima de crescimento, para a *Pichia pastoris* é 30°C e, acima de 32°C é notada uma queda na expressão protéica pela célula. Entretanto alguns autores utilizam baixas temperaturas na produção de proteínas heterológicas. Li et al (2001) mostraram que a diminuição da temperatura de 30°C para 23°C no crescimento desta levedura levou a um aumento de três vezes no teor de proteína. Jahic et al (2003) afirmam que o uso de baixas temperaturas durante a fase de indução faz decair atividade proteolítica e lise celular.

1.3. Enzima glicerol-3 fosfato desidrogenase

Neste trabalho, a enzima de interesse é a glicerol-3 fosfato desidrogenase (NAD⁺: oxidoreductase EC 1.1.1.8), enzima presente no metabolismo de todos os organismos vivos, ela tem como função catalisar a redução da dihidroxicetona fosfato, intermediário da via glicolítica, á glicerol fosfato de forma reversível. É uma das enzimas metabólicas cujo nível de atividade intracelular depende do estado fisiológico das células. Células em estado de transição entre fermentação e respiração ou em fase estacionária de crescimento mostram níveis altos desta enzima (ALBERTYN et al, 1994). A glicerol-3-fosfato desidrogenase é uma enzima bastante instável frente à estocagem (ALBERTYN et al, 1992), e com atividade máxima a pH 6,8 e a 51°C frente a dihidroxiacetona como substrato (CAIN et al, 1996). O seu PM é da ordem de 45 kDa. O aumento da temperatura de crescimento induz um aumento da velocidade do consumo de açúcar, provocando um aumento de acúmulo de produtos, tais como glicerol, arabitol e eritritol pelo *Saccharomyces rouxii* em meio contendo concentrações iniciais de glicose em torno de 200 g/L (ONISHI, 1963). Essa enzima apresenta aplicação prática em diversos sistemas

acoplados para determinação quantitativa de triacilglicerol, glicerol, ácido fosfatídico e outros fosfolípidios também podendo ser usada para medir atividades enzimáticas (glicerol quinase e enzimas similares opcionalmente acopladas a outras enzimas e a reagentes cromógenos) em soros sanguíneos ou outros materiais biológicos.

O aumento da temperatura até 37°C, atuou favoravelmente sobre o rendimento da glicerol fosfato desidrogenase pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Por outro lado, em concentrações iniciais de glicose no meio acima de 300 g/L, o aumento da temperatura de 30°C para 40°C provocou uma queda do rendimento dos produtos para cerca de 37%.

Os estágios do crescimento celular são caracterizados por níveis variados de enzimas (controle genético), forma e tamanho das células. A glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática (dependente de NAD⁺) é uma das enzimas metabólicas cujo nível de atividade intracelular depende do estado fisiológico das células. O estado fisiológico das células é variável durante o crescimento de uma cultura em consequência das mudanças da composição do meio (limitações por nutrientes, pH e produtos do metabolismo). Culturas em fase exponencial de crescimento são constituídas por uma população heterogênea de células que são reguladas através de diferentes sistemas metabólicos e/ou mecanismos de controle genético. Células em estado de transição entre fermentação e respiração ou em fase estacionária de crescimento mostram níveis altos desta enzima. A adaptação do *Sacharomyces cerevisiae* a altas concentrações salinas resulta na síntese de grande quantidade de glicerol-3-fosfato desidrogenase, em meio contendo glicose. O nível de atividade intracelular desta enzima pode ser um indicador da tolerância a situações de estresse provocado por fatores adversos: calor, irradiação ionizante ou altos teores de água intracelular (GATTÁS, 1997).

Segundo Larsson et al (1993), *Saccharomyces cerevisiae* responde ao stress osmótico pela variação da concentração intracelular de glicerol. Células na qual são revestidas com um aumento da osmolaridade externa, aumentam a produção e acumulação interna de glicerol em seqüência para recuperar a perda de água para o ambiente e reajustar o volume e a turgidez das células. A concentração intracelular de glicerol muda na proporção em que haja mudanças na osmolaridade externa e o

baixo potencial de água. Glicerol é sintetizado a partir de diidroxiacetona fosfato em dois processos. Primeiro a diidroxiacetona fosfato é reduzida por glicerol-3-fosfato desidrogenase NAD^+ -dependente à forma de glicerol-3-fosfato e este composto é desfosforilado a glicerol por uma específica glicerol-3-fosfatase (G3Pase). Portanto, as funções de glicerol-3-fosfato desidrogenase no metabolismo abrem uma ramificação entre a seqüência glicolítica e a via de síntese de glicerol (ANDRÉ et al, 1991).

2. OBJETIVOS

O objetivo primordial deste trabalho foi padronizar metodologia para a indução da produção da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase pela levedura *Pichia pastoris*, que foi modificada geneticamente para secretar a enzima extracelularmente em meio de cultura e estudar algumas estratégias de otimização da produção da enzima G3PDH.

2.1. Etapas Específicas

- a) Escolha do clone que melhor expressa a enzima G3PDH
- b) Padronização de metodologias: curva padrão de biomassa; dosagem da atividade enzimática;
- c) Padronização das condições operacionais da produção e concentração da enzima (densidade inicial celular, meio de cultura, concentração de metanol no meio de indução, tampão, pH, suplementações no meio de indução enzimática, pré-tratamento celular).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microorganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Pichia pastoris*, modificada geneticamente para produção extracelular da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH). Utilizou-se o sistema de expressão EasySelect™ Invitrogen para a produção da glicerol-3-fosfato desidrogenase de *S. cerevisiae*. A seqüência codificada para o gene GPD2 foi amplificada a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* e clonado no vetor pPICZ- α e integrado artificialmente no genoma de *Pichia pastoris* para a produção extracelular da enzima. Essa levedura foi obtida em parceria com o grupo do Prof. Dr. Sandro R. Valentini, FCFAR-Unesp.

3.2. Meios de Cultura

Utilizaram-se os seguintes meios:

3.2.1. YPDA

Extrato de levedo 1%

Peptona 2%

Glicose 2%

Ágar 2%

Conservaram-se as culturas em meio YPDA, e em geladeira a 4°C, através de transferências, seguidas de crescimento em meio novo (repicagem) a cada experimento.

3.2.2. BMGY

O meio BMGY foi usado para crescimento do inóculo, constituído por:

Extrato do levedo 1%

Peptona 2%

Tampão fosfato de potássio pH 6,0 100 mM

YNB 1,34 %

Biotina 4×10^{-5} %,

Glicerol 1%

PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUES:

Tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6: foi adicionado 13,2 mL de K_2HPO_4 1 M a 86,8 mL de KH_2PO_4 1M, se necessário, ajustou-se o pH com KOH para pH 6. Esterilizou-se em autoclave a 120°C, a 1 atm de pressão durante 20 minutos. O tempo de prateleira é maior que um ano quando conservado a 4°C.

Solução de YNB concentrada 10 vezes (10X): dissolveu-se 13,4 g de YNB (yeast nitrogen base) em 100 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22 μ m). O tempo de prateleira é de aproximadamente um ano quando conservado a 4°C.

Solução de biotina concentrada 500 vezes (500X): dissolveu-se 20 mg de biotina em 100mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana da Millipore de PVDF (0,22 μ m). O tempo de prateleira é de aproximadamente um ano quando conservado a 4°C.

PREPARO DO MEIO DE CULTURA: dissolveu-se 10 g de extrato de levedo, 20 g de peptona em 790mL de água. Autoclavou-se a 120°C, a 1 atm de pressão durante 20

minutos. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de potássio 100mM pH 6, 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X, 10 mL de glicerol concentrado.

3.2.3. BMMY

O meio BMMY foi usado na indução da produção da enzima que continha:

Extrato do levedo 1%

Peptona 2%

Tampão fosfato de potássio pH 6,0 100 mM

YNB 1,34 %

Metanol 0,5% ou 1%

PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUES:

As soluções de tampão, YNB e biotina foram preparadas como descrito anteriormente.

Solução de metanol concentrada 10 vezes (10X): adicionou-se 10 mL de metanol em 90 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22 μ m). O tempo de prateleira é de aproximadamente dois meses quando conservado a 4°C.

PREPARO DO MEIO DE CULTURA: suspendeu-se 10 g de extrato de levedo, 20 g de peptona em 700mL de água. Autoclavou-se a 120°C, a 1 atm de pressão durante 20 minutos.

Adicionar:

100 mL de tampão fosfato de potássio 1M, pH 6

100 mL de YNB 10X.

2 mL de biotina 500X

100 mL de metanol 10X.

3.2.4. BSM

O meio BSM foi utilizado no crescimento da levedura que continha a seguinte composição:

40g de glicerol, 26,7 mL (p/p) H₃PO₄ 85%, 0,93g de CaSO₄, 18,2g de K₂SO₄, 14,9g de MgSO₄.7H₂O, 4,13g de KOH. Solução de traço de sais (PTM): 6g de CuSO₄, 0,08g de KI, 3g de MnSO₄, 0,2g de Na₂MoO₄, 0,02g de H₃BO₃, 0,5g de CoCl₂, 20g de ZnCl₂, 65g de FeSO₄.7H₂O, 0,2g de biotina, 5 mL de H₂SO₄ 98% (p/p) composição descrita por Xie et al (2005).

PREPARO DO MEIO DE CULTURA: dissolveu-se 40g de glicerol, 26,7 mL (p/p) H₃PO₄ 85%, 0,93g de CaSO₄, 18,2g de K₂SO₄, 14,9g de MgSO₄.7H₂O, 4,13g de KOH quantidade suficiente de água, ajustar o pH 5, com NH₄OH 28%, completar para 1 litro e esterilizar em autoclave à 120°C por 15 min. Em temperatura ambiente, adicionar 4,35 mL de solução de traço de sais.

PREPARO DA SOLUÇÃO DE TRAÇO DE SAIS: Dissolveu-se os sais (p/p), em 1 litro de água, esterilizou-se por filtração e a solução foi estacada à 4°C (XIE et al, 2005).

3.3. Crescimento Celular

As células da levedura recombinante *Pichia pastoris* foram crescidas em meio BMGY e o seu crescimento quantificado por turbidimetria a 570 nm utilizando-se faixa de absorvância de 0,050-0,50. O fator de conversão (F) utilizado foi 0,88431 para a *P. pastoris* que foi obtido para o espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences) do nosso laboratório, e representa a correlação entre valores de massa seca e absorvância. A fórmula geral utilizada foi a seguinte:
[mg/ml] = F x ΔA x diluição

A massa seca das suspensões concentradas de células para a linhagem de levedura *P. pastoris* (7,21 mg/mL) foi determinada e a partir desta suspensão concentrada foi feita diluições. A figura 2 mostra a curva que relaciona as massas

secas equivalentes, de cada suspensão diluída, com as absorvâncias. O valor de F corresponde ao coeficiente angular desta curva.

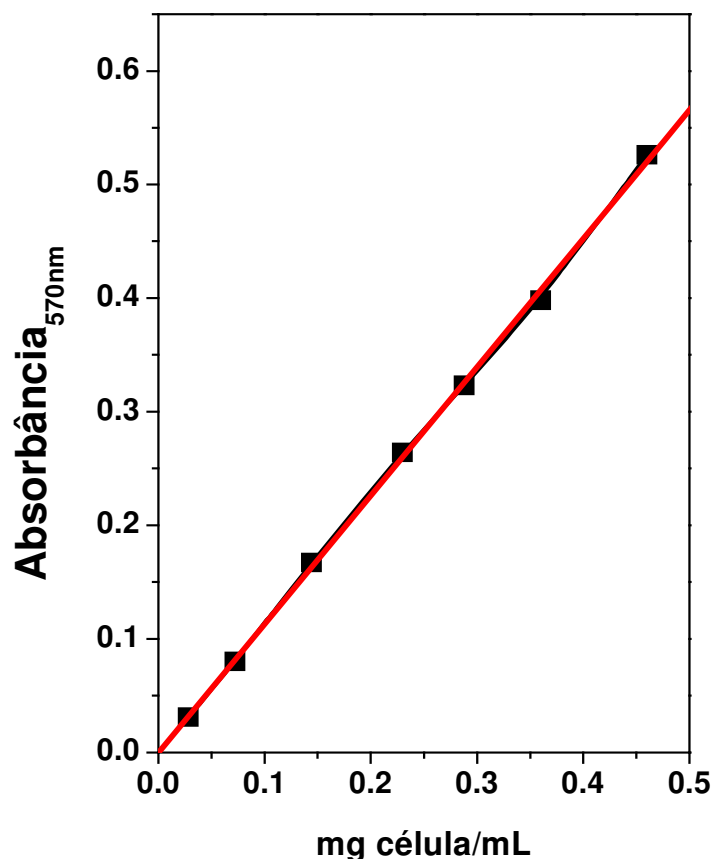


Figura 2 – Curva que relaciona a massa seca (mg células/mL) da Linhagem *P. pastoris* com a absorvância a 570 nm. A regressão linear $Y = A + B * X$ mostrou os seguintes parâmetros: $A = 2,98189E-6$ com desvio de 0,003950, $B = 1,13083$ com desvio de 0,01474 e o fator de correlação da reta ($R = 0,99958$). O coeficiente angular ($F = 1/B = 1/1,13083$) considerado foi o fator de correlação $F = 0,88431$ com desvio padrão (SD) de 0,00564.

3.4. Preparação das Células de *Pichia pastoris* para a Indução da G3PDH

As células foram crescidas em meio YPDA por 24 horas a 30°C, antes de serem utilizadas como pré-inóculo, em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio BMGY. Após a incubação por 24 horas a 30°C, as células foram conservadas por uma noite a 4°C, para sedimentação da biomassa. O sobrenadante foi

descartado, e as células concentradas (20-30 mg/mL) foram utilizadas como inóculo, com diferentes densidades iniciais de célula, em Erlenmeyer de 125 mL contendo volumes variados de meio BMMY. Os experimentos foram realizados em mesa agitadora Tecnal (incubadora refrigerada, TE- 421) operando a 120 rpm a 30°C durante os dias de indução.

3.5. Experimentos de Fermentação

As células foram crescidas, reunidas, utilizadas como pré-inóculos e fermentadas em fermentador de 5 litros contendo 2 litros de meio conforme descrito por Xie et al, 2005. Após a incubação do meio BSM por 17 horas a 30°C, a fermentação de batelada alimentada foi iniciada com a adição de solução de glicerol 50% suplementado com traços de sais a uma velocidade de 12 mL/L, após 24 horas a 30°C, a fase de indução da proteína heteróloga foi realizada com a adição de metanol na concentração de 5 g/L com fluxo de 0,012 h⁻¹. As células foram descartadas após centrifugação e o sobrenadante utilizado na dosagem da enzima e proteína. O meio BMGY utilizado na produção de biomassa celular foi testado na fermentação de batelada alimentada com as mesmas condições de indução anteriores para posterior análise enzimática.

3.6. Indução da Expressão da glicerol-3-fosfato desidrogenase

Os experimentos de indução foram realizados com o meio controle BMMY nas seguintes condições: em baixa densidade de célula (0,05, 0,1 mg/mL) e alta densidade de célula (0,2 mg/mL), em diferentes pH (5, 6, 7, 8), natureza do tampão ajustado para o pH 5 (tampão acetato) e pH 6-8 (tampão fosfato de potássio) e foi preparado com diferentes marcas de peptonas (Biobrás diagnósticos (peptona bacteriológica), Acumédia Peptone A (peptic digest of animal tissue), Difco (proteose peptone), Merck (peptona de caseína obtida por digestão pancreática), Acumédia (pancreatic digest gelatin), Peptone G Bacto Peptone). Além disso, este meio foi

suplementado com a adição de glicerol 1%, sorbitol 1%, caseína (1 e 2%) e glicina 0,4M.

Os experimentos de pré-indução por estresse osmótico foram realizados com concentrados de células em meio BMGY por 4 horas a 30°C (item 3.4) utilizando sais, açúcar e poliol, como: NaCl 0,35M; acetato de potássio 0,35M; sacarose 1M e sorbitol 1M, conforme descrito por Shi et al, 2003 e densidade inicial de células de 5mg/mL para posterior indução em meio de BMMY por 2-3 dias a 30°C. Os efeitos da pré-indução foram avaliados em função do tempo, onde alíquotas foram removidas para análise da produção de biomassa, proteína total e expressão da atividade da G3PDH. Um experimento sem a pré-indução foi realizado como controle.

3.7. Ultrafiltração da Proteína Heteróloga

Dois Erlenmeyers contendo 25 mL de meio foram inoculados como descrito no item 3.4, reunidos e centrifugados em centrífuga Sorvall Legend RT a 15.000 x *g* durante 10 minutos para a separação das células. O sobrenadante obtido foi concentrado na faixa de 63 a 160 vezes, utilizando membranas filtrantes da CENTRIPLUS® Centrifugal Filter Devices, User Guide MILLIPORE (modelo YM-10 cut-off: 10.000 MW) a 2800 x *g* por diferentes tempos de centrifugação a 17°C até atingir concentração desejada para posterior dosagem da enzima e proteína total.

3.8. Liofilização da Proteína Recombinante

Dois Erlenmeyers contendo 25 mL de meio foram inoculados como descrito no item 3.4, reunidos e centrifugados a 15.000 x *g* durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para frascos do liofilizador FR- Drying Digital Unit modelo modulyod-115, congelado por 24 horas a -20°C e submetidos a liofilização. Após 4 horas de liofilização, as amostras foram suspensas em 1 mL de solução tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2 e sua atividade quantificada.

3.9. Obtenção de Extratos da Levedura *Pichia pastoris*

Células de levedura *Pichia pastoris* foram crescidas de acordo com o item 3.4, centrifugadas a 12.000 x *g* por 10 minutos e lavadas com água destilada gelada por três vezes. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em água destilada gelada e a biomassa quantificada a 570nm, em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences). Células na concentração de 100 mg/mL foram adicionadas em tubos de vidro, de fundo chato com tampa, contendo 1,5 g de pérolas de vidro de 425-600 μm (Sigma no. G-8772), 1 mL tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 e congelados por 24 horas. Após o congelamento, as células foram rompidas em vortex por 6 ciclos (teste padronizado em nosso laboratório) com intervalos de tempo de 30 segundos em banho de gelo para não desnaturação, depois do rompimento celular o extrato foi centrifugado e o sobrenadante utilizado na dosagem da enzima e proteína.

3.10. Ensaio de Enzima Aderida à Parede Celular

As células foram crescidas e coletadas conforme item 3.4, após esta etapa as células foram lavadas uma única vez com água destilada gelada como tentativa de remoção de enzima aderida na parede celular seguido de centrifugação e coleta do sobrenadante para análise de atividade enzimática.

3.11. Ensaio da Atividade da glicerol-3 fosfato desidrogenase (G3PDH)

O ensaio utilizado é uma modificação do ensaio (WIELAND, 1974) que baseia-se na conversão enzimática do glicerol-fosfato em diidroxiketona-fosfato, com redução do NAD^+ a NADH.

A formação de NADH foi acompanhada espectrofotometricamente a 340nm, em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences).

A atividade da enzima frente ao glicerol-fosfato foi observada mediante aos seguintes passos:

- 1) O espectrofotômetro foi ajustado a 340 nm e a velocidade da reação foi ajustada de 15 em 15 segundos durante um intervalo de 120 segundos.
- 2) O aparelho foi zerado com o branco substrato, este branco é preparado com todos os reagentes da reação excetuando-se a amostra enzimática que é substituída por água destilada, tendo como objetivo descontar a contribuição de cor dada por cada reagente na reação final.
- 3) Iniciou-se o processo com a leitura do branco enzima, preparado com todos os reagentes excetuando-se o substrato, este branco tem como objetivo descontar da reação a contribuição de cor dada pela amostra contendo a enzima.
- 4) Fez-se a leitura da reação contendo todos os reagentes e a amostra contendo a enzima. Reagentes utilizados na reação: 0,07 mL de NAD^+ 20mM; 0,9 mL de glicerol fosfato 50mM; 0,9 mL de tampão glicina/NaOH 0,1M pH 9,8, contendo hidrato de hidrazina 0,88M; 0,330 mL de cloreto de cálcio 100 mM; 0,7 mL de água destilada; 0,4 mL de amostra diluída 20 vezes em tampão Tris-NaF 10 mM, pH 7,2 totalizando 3,3 mL em cubeta de quartzo.
- 5) Os valores do branco enzima foram subtraídos dos valores da reação contendo a amostra enzimática e as diferenças foram utilizadas para a realização dos cálculos de atividade e a obtenção das curvas de tempo.

$$U/mL = \frac{\Delta A \times V \times dil}{\Delta t \times \epsilon \times d \times v}$$

Onde:

ΔA = variação da absorbância a 340nm

V = volume do ensaio (mL)

dil = diluição

Δt = variação do tempo (min)

ϵ = coeficiente de absorvidade molar do NADH ($6,22\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$)

d = caminho ótico (cm)

v = volume de amostra no ensaio (mL)

A atividade catalítica específica foi calculada através do quociente da atividade (U/mL) e pelo conteúdo protéico (Cp) (mg/mL), sendo expressa portanto em U/mg.

PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUES:

Solução tampão de diluição: foi usado solução tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, contendo 10mM de NaF. Pesou-se 0,1211g de Tris(hidroximetilamino metano -Inlab) e 0,042g de NaF(fluoreto de sódio-Merk) adicionou-se 80mL de água destilada, ajustou o pH com HCl 6M e completou-se o volume para 100mL.

Solução tampão de dosagem: foi usado solução tampão glicina-hidrazina, pH 9,8: pesou-se 0,75g de glicina (Mallinckrodt GenAR®), adicionou-se 19,3 mL de hidrato de hidrazina (solução 24%, Vetec), ajustou-se o pH para 9,8 com HCl 6M e completou-se o volume para 25 mL.

Glicerol fosfato 50 mM: pesou-se 0,65 g de glicerol fosfato (Sigma), dissolveu-se em 40 mL de água destilada e completou-se o volume para 50mL com água destilada. Conservou-se a solução em geladeira.

Solução NAD⁺ 20 mM: pesou-se 0,0265 g de β NAD⁺ (Sigma) e dissolveu-se em 2 mL de água destilada. Preparou-se no instante do uso e manteve-se a solução em banho de gelo.

Solução de cloreto de cálcio 100 mM: pesou-se 0,3676g de CaCl₂ 2H₂O (Synth), dissolveu-se em 15mL de água destilada e completou-se o volume para 25 mL.

3.12. Determinação da Proteína Total do Extrato Celular da Levedura

O conteúdo protéico (Cp) do extrato celular de levedura foi determinado pelo método Lowry modificado por LAYNE (1957) tendo soroalbumina bovina como padrão e utilizando as seguintes soluções:

- Solução A: 10mL de carbonato de sódio 20% acrescido de 10mL de hidróxido de sódio 1M;
- Solução B: 1mL de sulfato de cobre 5% acrescido de 1 mL de tartarato de sódio 10%;
- Solução C: solução A acrescido de 2mL do solução B e água para volume final de 100mL.

Ensaio:

A seguinte mistura de reação foi preparada e incubada: 1mL de amostra diluída e 6mL da solução C foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 0,58 mL do reagente de Folin-Ciocalteau (diluído em água destilada em proporção de 1:2) e esperou-se mais 30 minutos para realizarem-se as leituras à 600nm.

Uma curva padrão (Figura 3) foi construída utilizando-se uma solução de soroalbumina bovina de procedência Sigma A-4503 (2,5 vezes diluída a partir de uma solução estoque de 0,06% ou 0,6mg/mL). Frações da solução padrão (0,3mL) foram armazenadas em congelador (porções de 0,5mL) e ensaiadas em duplicata para cada ensaio. O branco (Br) da reação foi obtido substituindo-se a amostra por água. O cálculo de proteína total expressa em mg proteínas/mL, foram obtidos utilizando-se a solução padrão (0,6mg/mL) e à seguinte fórmula:

$$C = \frac{A^{600nm}(\text{amostra}) - A^{600nm}(\text{Br})}{A^{600nm}(\text{padrão}) - A^{600nm}(\text{Br})} \times \text{Dil.} \times F$$

Onde:

$A^{600nm}(\text{amostra})$ = absorbância da amostra;

$A^{600nm}(\text{Br})$ = absorbância do branco;

$A^{600nm}(\text{padrão})$ = absorbância do padrão;

Dil. = diluição;

F = 0,18: é o fator de conversão da concentração da solução padrão de soroalbumina (mg/ml) na quantidade de proteína por mililitro de amostra (concentração do padrão 0,6mg/mL x 0,3mL de volume utilizado).

A atividade específica (U/mg) foi considerada como sendo:

$$\text{U/mg} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg/ml}}$$

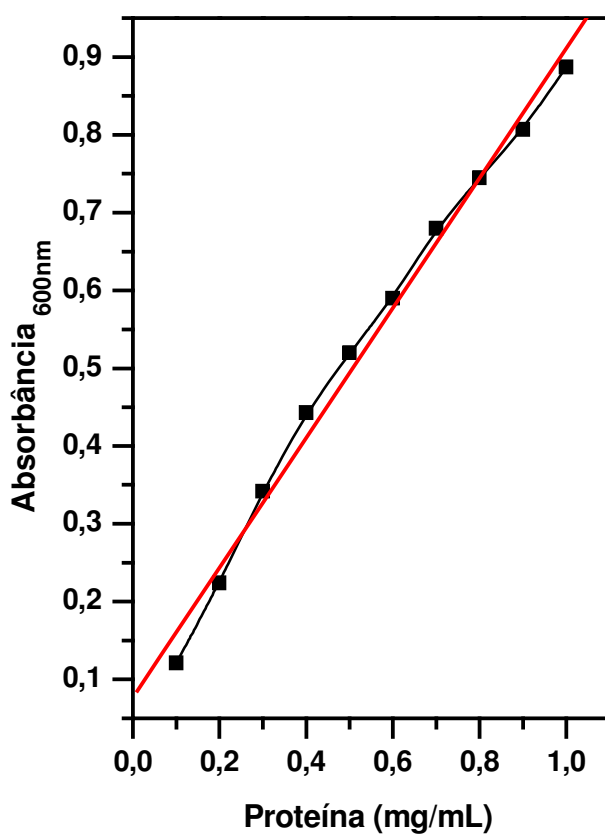
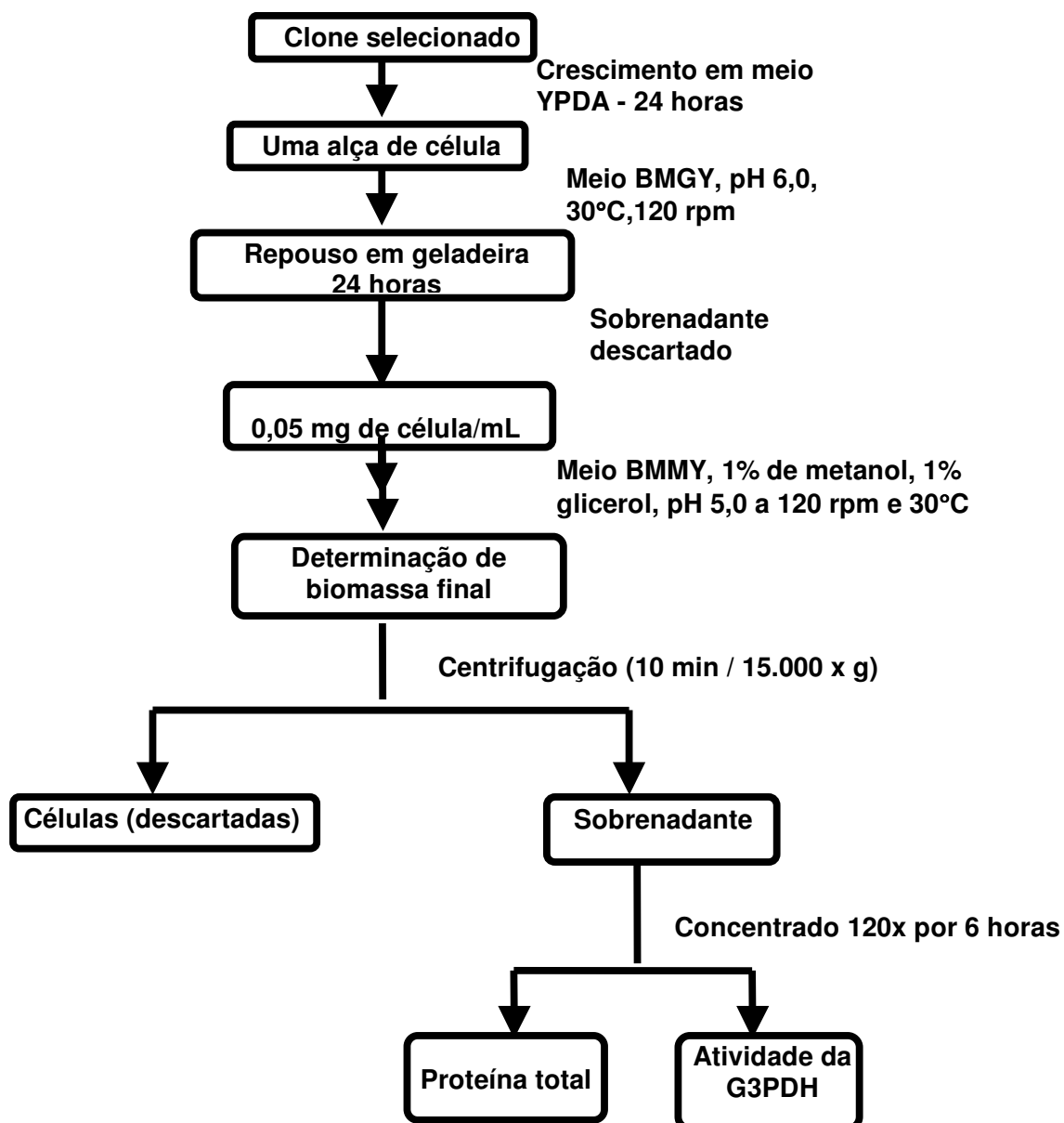


Figura 3 – Curva Padrão da Soroalbumina Bovina. A regressão linear da curva $Y = A + B * X$ mostrou os seguintes parâmetros: A = 0,07687 (intercepta com o eixo Y contendo desvio sd = 0,0177); B = 0,8346 (quando X = 1 contém desvio sd = 0,0286); R = 0,99532 (fator de correlação da reta); SD = 0,02602 (desvio padrão).

3.13. Experimentos Planejados Utilizando a Matriz Plackett-Burman

Os experimentos foram realizados seguindo orientação da Profa. Dra. Suzana Ferreira-Dias do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa - Portugal, para seleção de variáveis com efeito significativo pela matriz de Plackett-Burman. As variáveis selecionadas foram concentração de metanol (0,5% ou 1%), glicerol (1% ou zero), densidade de células (0,2 ou 0,05 mg/mL), meio de indução, pH de meio (5 ou 6), tempo de indução da levedura recombinante (48 ou 192 horas) e concentração da proteína (63 ou 120 vezes).

3.14. Fluxograma do Ensaio Otimizado para Produção de Biomassa e Atividade da G3PDH a Partir do Clone de *Pichia pastoris*.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção e Comparação de Clones

Dos vários transformantes obtidos, ao menos 10 clones foram submetidos à indução da produção da enzima G3PDH de acordo com o protocolo sugerido pelo sistema EasySelect™ Invitrogen em material e métodos e os resultados estão apresentados na Tabela 2. Dois clones foram selecionados e comparados quanto ao crescimento e a atividade da G3PDH durante 10 dias a 30°C. A cada dia foi adicionado volume de metanol para concentração final de 0,5% para manutenção da indução e alíquotas foram removidas do meio de cultura para análise da produção da proteína recombinante e biomassa. Dois clones selecionados que apresentaram maior atividade específica foram comparados nas Figuras 4 e 5, o clone selecionado foi o que apresentou maior produção de biomassa (Figura 4) e atividade enzimática (Figura 5) no menor tempo de indução (4 dias).

Tabela 2 – Ensaio enzimático da atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase excretada extracelularmente pelos clones ^a.

Clones	Proteína total (mg/mL)	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
1	16,69 ± 0,17	0,065 ± 0,00	3,89 ± 0,48
2	15,06 ± 0,23	0,087 ± 0,01	5,78 ± 0,07
3	15,44 ± 0,23	0,130 ± 0,04	8,42 ± 0,91
4	16,33 ± 0,45	0,101 ± 0,05	6,18 ± 0,31
5	14,27 ± 0,17	0,039 ± 0,00	2,73 ± 0,14
6	13,10 ± 0,05	0,043 ± 0,02	3,28 ± 0,15
7	14,61 ± 0,24	0,143 ± 0,0	9,8 ± 0,0
8	14,30 ± 0,29	0,159 ± 0,0	11,1 ± 0,0
9	15,02 ± 0,33	0,159 ± 0,0	10,6 ± 0,0
10	15,43 ± 0,25	0,04 ± 0,0	2,6 ± 0,0

^a Condições: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e dois dias de indução.

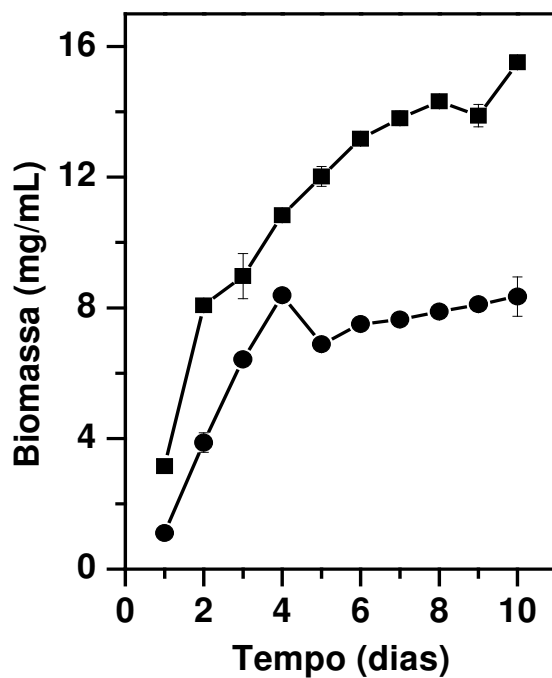


Figura 4 – Produção de biomassa em função do tempo de crescimento e indução para os clones selecionados.

Condições de cultivo: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e dez dias de indução.

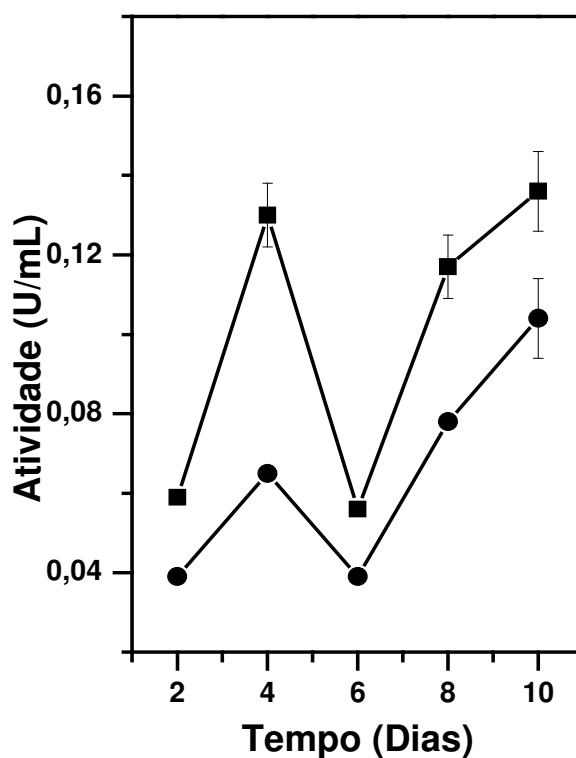


Figura 5 – Atividade da enzima glicerol fosfato desidrogenase em função do tempo de crescimento e indução pelos clones selecionados.

Condições de cultivo: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e dez dias de indução

4.2. Atividade Enzimática em Células de *Pichia pastoris*

Microrganismos são fontes significativa de enzimas. A maioria das enzimas usadas comercialmente são extracelulares, e a primeira etapa no seu isolamento é a separação das células da solução. Para enzimas intracelulares, o primeiro passo envolve a ruptura das células (GERHARTZ, 1990). Inúmeras técnicas são usadas para a extração de enzimas de células e têm como principal objetivo à obtenção da enzima com máxima atividade catalítica. Células microbianas podem ser rompidas, por exemplo, por trituração com areia ou homogeneização com esferas de vidro, que envolve a agitação de uma suspensão de células com pequenas esferas de vidro. Após o procedimento as esferas de vidro são removidas por filtração em várias camadas de gaze ou, por centrifugação (CAMARGO, 2007). Assim, as células do

clone selecionado de *Pichia pastoris* foram crescidas e utilizado conforme descrito em material e métodos para obtenção do extrato celular (item 3.9) e análise de atividade enzimática aderida à parede celular (item 3.10). A atividade da G3PDH foi muito baixa (0,030 U/mL) como observado na Tabela 3 para o extrato de células quando comparado com o obtido no meio de cultura (controle). Em relação à atividade enzimática aderida à parede celular nenhuma atividade da G3PDH foi observada (dados não mostrados). Assim, os resultados de atividade da G3PDH ligada à parede celular não foram considerados, uma vez que não foram significativos.

Tabela 3 – Efeito da metodologia de rompimento celular em células de *Pichia pastoris*, para obtenção da enzima G3PDH.

	Biomassa	Atividade
	mg/mL	U/mL
Controle	17,43 ± 0,28	0,159 ± 0,0
Extrato celular	17,43 ± 0,28	0,030 ± 0,0

4.3. Seleção de Meio para Crescimento da Levedura Recombinante

4.3.1. Meio BSM

Segundo CÓS et al (2006) um dos meios de cultivo mais indicados para a alta densidade de célula da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, é o meio BSM. *Pichia pastoris* pode atingir altas densidades celulares de até 130 g células secas/L em meio BSM. Assim, Xie et al (2005) obteve uma produção de angiostatina neste meio de cultura de 108 mg/mL quando glicerol foi adicionado, utilizando o sistema de expressão *Pichia pastoris*. Em ensaios de baixa densidade de célula os níveis de expressão de angiostatina foram diferentes para diferentes fontes de carbono (XIE et al, 2005). Com base nestas literaturas, experimentos foram realizados utilizando este meio e os resultados estão apresentados nas Figuras 6 e 7. Os resultados obtidos

não foram os esperados, sem crescimento da levedura provavelmente por problemas no preparo do meio, tais como, precipitação e turvação, como já relatado por Zhang et al, 2006, pois o meio BSM contém sais de cátions bivalentes e trivalentes que precipitam a pH acima de 5,5, além de precipitação de proteínas no momento do ensaio (Figura 7 com 2 dias de indução). Apesar das dificuldades apresentadas decidimos testá-lo em fermentação, mas tal realização somente foi possível na Unesp em Rio Claro, onde gentilmente o Prof. Dr. Jonas Contiero nos auxiliou no experimento. As dificuldades encontradas anteriormente também se apresentaram aqui, com isso, optamos por testar o meio BMGY que não apresentava tais problemas.

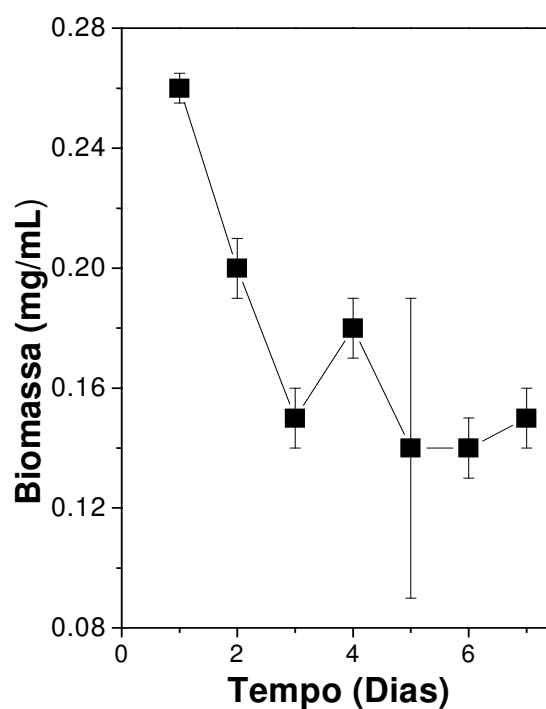


Figura 6 – Produção de biomassa em função do tempo de crescimento e indução utilizando o meio BSM.

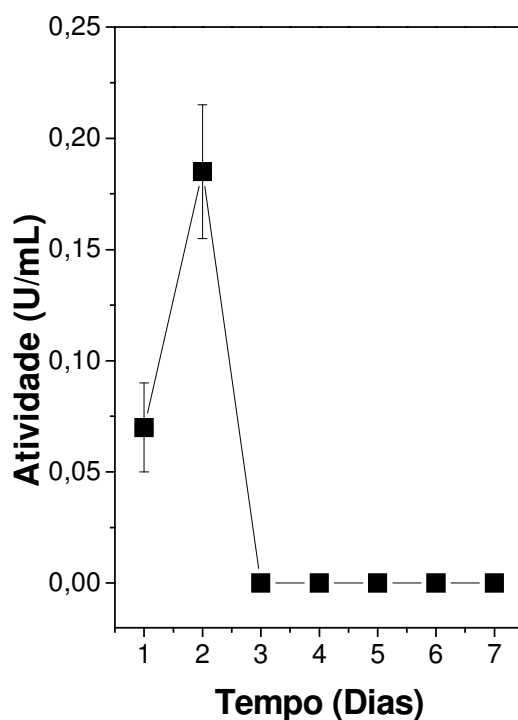


Figura 7 – Atividade da enzima glicerol fosfato desidrogenase em função do tempo de crescimento e indução utilizando o meio BSM.

4.3.2. Meio BMGY

Segundo o manual EasySelect™ Invitrogen, o meio BMGY é utilizado no crescimento de *Pichia pastoris* o qual neste caso, foi testado em experimentos de fermentação com o objetivo de aumentar o rendimento de biomassa e utilizar essa massa de célula na indução da proteína. Apesar de altos rendimentos obtidos de biomassa de 60g/L, a expressão extracelular da proteína não foi observada (sem atividade de G3PDH), por isso, focamos nossa atenção na padronização do meio de indução da proteína e fixamos como meio de crescimento o meio BMGY.

4.4. Padronização das Condições de Indução e Concentração da Enzima Recombinante

4.4.1. Efeito do Tamanho do Inóculo

De acordo com Daly ; Hearn (2005) e Barr et al (1992) para conseguir alta produção de proteína recombinante, é necessário considerar vários fatores, além do meio de cultura (pH, temperatura, etc). A produção de enzima em pequenos frascos costuma ser menor do que em fermentadores (produção em larga escala), sendo assim, Barr et al (1992) desenvolveu condições de expressão muito semelhantes utilizadas em fermentadores, só que em pequenos frascos, utilizando uma alta densidade celular inicial (tamanho do inóculo). Assim, curvas de tempo de biomassa e atividade de glicerol 3-fosfato desidrogenase foram obtidas, variando as densidades iniciais de célula (tamanho do inóculo) de 0,05, 0,1 e 0,2 mg/mL e os resultados estão representados nas Figuras 8 e 9. Optamos pela concentração inicial de célula de 0,05 mg/mL como sendo a ideal, pois apesar de de não haver diferenças significativas em 24 horas para os diferentes inóculos, na produção de proteína o inoculo com densidade inicial de 0,05 mg/mL é superior com 24 horas de cultivo.

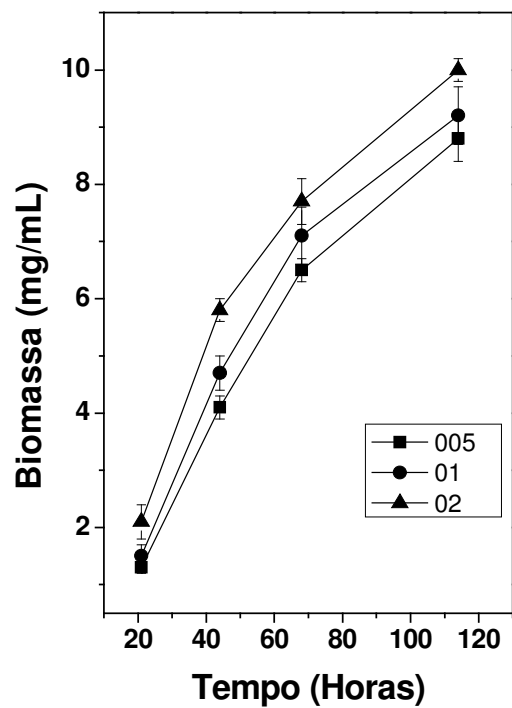


Figura 8 – Produção de biomassa em função da densidade inicial de células da levedura *P. pastoris*.

Condições de cultivo: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, 120 horas de indução.

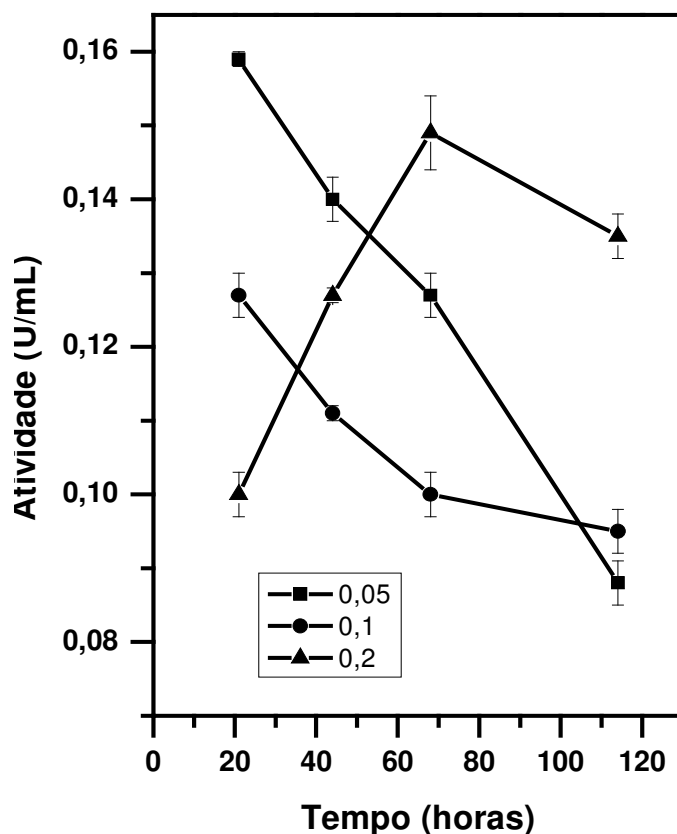


Figura 9 – Atividade da enzima glicerol fosfato desidrogenase em função da densidade inicial de células da levedura *P. pastoris*.

Condições de cultivo: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, 120 horas de indução.

4.4.2. Efeito da Concentração de Metanol no Meio BMMY

Normalmente, a concentração de metanol no meio de cultura para indução de proteínas recombinantes varia de 0,5 -1,0% (v/v) usando o sistema *Pichia pastoris*. Mas, há variações na concentração de metanol, de 0,15 à 1,0% (v/v) como foi utilizado para a elevação dos níveis de expressão da β -2-glicoproteína I domínio V (DALY ; HEARN, 2005). Por isso, concentrações de 0,5% e 1% no meio de cultura foram testadas e após 4 dias de crescimento e indução, os dados obtidos estão expressos nas Figuras 10 e 11. Diferenças não significativas foram obtidas na

atividade enzimática e na produção de biomassa, assim, optamos por utilizar a concentração de 0,5% de metanol no meio BMMY nos próximos experimentos.

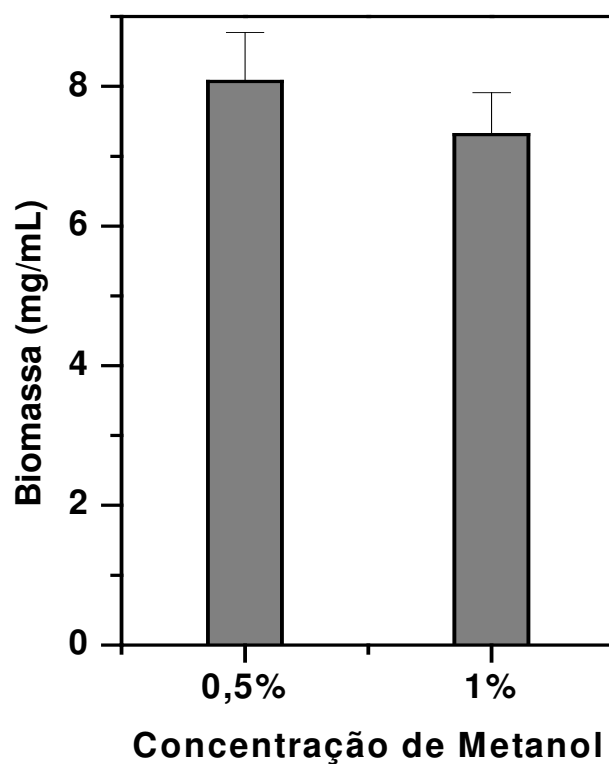


Figura 10 – Produção de biomassa analisada após 4 dias de crescimento e indução em função da concentração de metanol no meio BMMY.

Condições de cultivo: meio BMMY, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

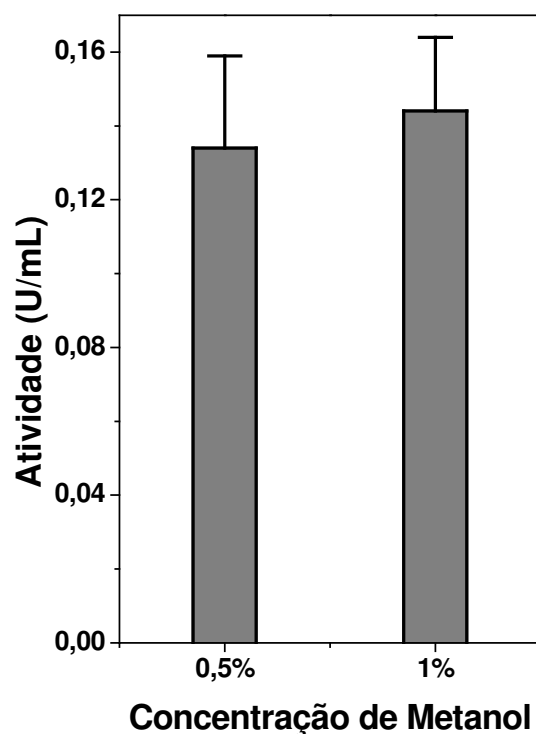


Figura 11 – Atividade da G3PDH após 4 dias de crescimento e indução em função da concentração de metanol no meio BMMY.

Condições de cultivo: meio BMMY, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

4.4.3. Efeito da natureza do tampão no meio BMMY

De acordo com a literatura, o pH de melhor expressão para diferentes enzimas pode variar (CREGG et al,1993), por isso, experimentos foram realizados utilizando o meio BMMY contendo tampão fosfato de potássio (controle) e tampão citrato a pH 6,0 para determinar a natureza do tampão que melhor induzisse a enzima G3PDH. Os dados de produção de biomassa e atividade estão apresentados na Tabela 4. Em relação ao acúmulo de biomassa, inicialmente os dois tampões foram iguais, mas com o decorrer do tempo, o tampão fosfato mostrou-se melhor em

atividade enzimática e biomassa, assim, o tampão fosfato foi considerado como ideal para os próximos experimentos.

Tabela 4 – Produção de biomassa e ensaio da atividade da G3PDH secretada extracelularmente pela levedura na presença de diferentes tampões^a.

Tampão	Biomassa (mg/mL)			Atividade (U/mL)	
	24h	48h	72h	24h	48h
Fosfato	1,49	4,64	6,59	0,111	0,151
Citrato	1,57	3,50	4,28	0,079	0,015

^a Condição: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL.

4.4.4. Efeito da suplementação do meio

De acordo com os estudos da literatura a suplementação do meio com outros substratos diferentes do metanol, contribuem com o maior crescimento da levedura *Pichia pastoris*, podendo ser relevante para a atividade da enzima que se deseja expressar (JUNGO et al, 2007; ZHANG et al, 2000; KATAKURA et al, 1998; ZHANG et al, 2003). Alguns estudos demonstraram que o glicerol é um dos melhores co-substratos utilizados com a finalidade de melhorar a produtividade da levedura (THORPE et al, 1999; CREGG et al, 1993; LOEWEN et al, 1997; MCGREW et al, 1997). Alguns autores apontam que o uso de outras fontes de carbono, além do glicerol, por exemplo, o sorbitol é uma fonte de carbono adicional interessante (SREEKRISHNA et al, 1997; THORPE et al, 1999; BOZE et al, 2001; INAN ; MEAGHER, 2001; XIE et al, 2005), pois o acúmulo de sorbitol durante a fase de indução não afeta os níveis de expressão de proteína recombinante. Portanto, o controle de resíduos da concentração de sorbitol durante a fase de indução é menos crítica que misturas com glicerol e metanol (JUNGO et al, 2007). Assim, decidimos utilizar glicerol e sorbitol como suplemento do meio na concentração de 1% e os resultados quanto ao crescimento e produção da enzima G3PDH após 4 dias estão apresentados nas Figuras 12 e 13. Em relação ao acúmulo de biomassa, o meio suplementado com sorbitol apresentou maior biomassa, quanto à atividade

enzimática. Da forma que foram conduzidos os experimentos, os dois suplementos não apresentaram diferenças significativas, assim optamos por continuar trabalhando com o meio controle sem suplementação os dois suplementos não apresentaram diferenças significativas em relação ao meio BMMY (dados anteriores), portanto optamos por trabalhar com o meio controle sem suplementação.

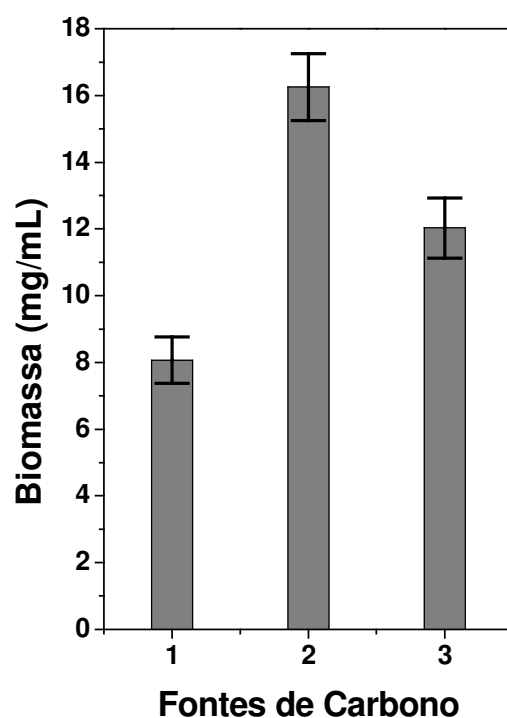


Figura 12 – Acúmulo de Biomassa após 4 dias de crescimento em meio BMMY controle (1) com 1% de Sorbitol (2) e com 1% de Glicerol (3).

Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

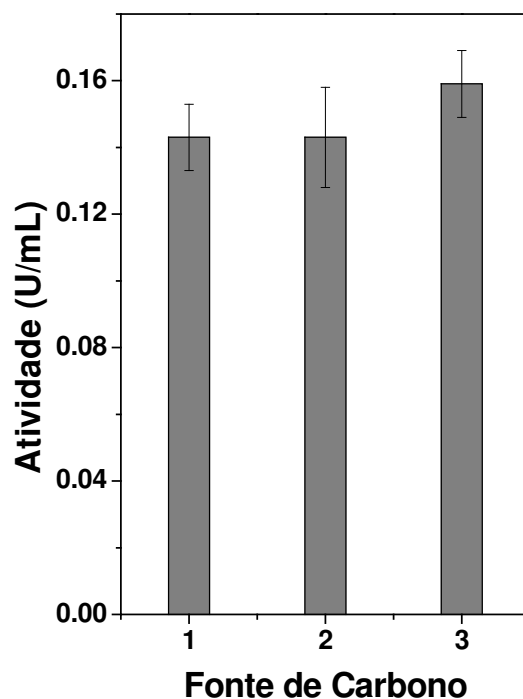


Figura 13 – Produção de G3PDH após 4 dias de crescimento em meio BMMY controle (1), com 1% de Sorbitol (1) e com 1% de Glicerol (2). Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

4.4.5. Efeito da concentração do meio de cultura fermentado

Com o objetivo de aumentar a atividade da G3PDH, o meio de cultura foi concentrado através de membranas filtrantes, conforme descrito em material e métodos, e o concentrado obtido utilizado na dosagem analítica da G3PDH. De acordo com os resultados da Figura 14, o meio concentrado 120 vezes aumentou a atividade em 3 vezes, valores maiores e significativos, quando comparado com a dosagem que utiliza o meio de cultura sem concentrar (Figura 5), portanto, estamos utilizando esta técnica para melhor quantificar os efeitos na atividade da G3PDH.

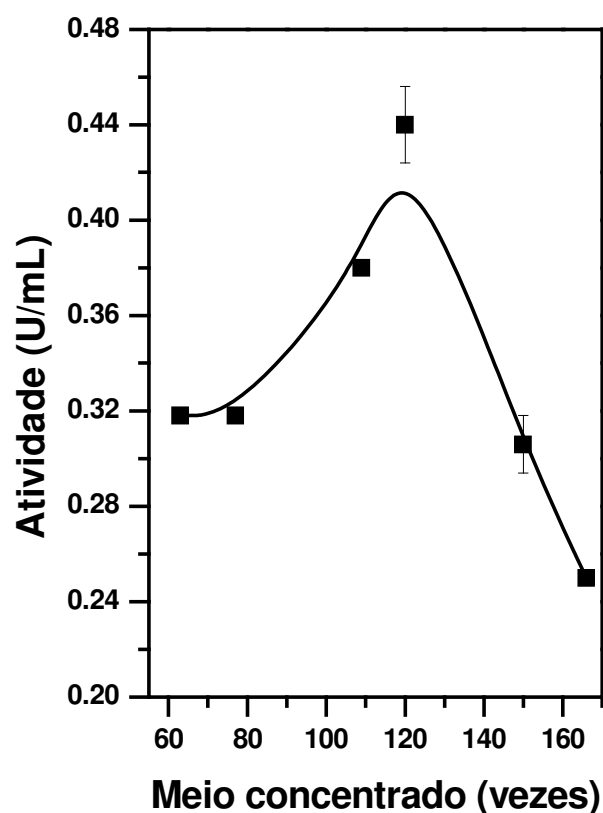


Figura 14 – Curva de atividade da G3PDH após 4 dias de crescimento e indução em função da concentração do meio de cultura fermentado.

Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

4.4.6. Efeito de diferentes peptonas

Diferentes quantidades dos elementos N, P, K, Mg, Ca e S nas formulações dos meios são citados em estudos de indução de proteínas heterólogas (D'ANJOU ; DAUGULIS, 2000; INVITROGEN, 2000; STRATTON et al,1998). Um dos mais importantes pontos da formulação do meio é a fonte de nitrogênio. O nitrogênio é um elemento essencial encontrado em quase todas as macromoléculas dos organismos vivos. Em fermentadores quando mistura-se 20g/L de peptona e 20g/L de extrato de levedura, a atividade da α -amilase atinge 300 U/mL (CHOI ; PARK, 2006). Assim,

com base nestas informações, testamos diferentes marcas de peptonas no meio controle de indução (BMMY) e os dados estão expressos na Tabela 5. A peptona A da Acumédia foi a melhor quanto ao acúmulo de biomassa e atividade específica de G3PDH e utilizada nos próximos experimentos.

Tabela 5 – Produção de biomassa e ensaio da atividade da G3PDH secretada extracelularmente pela levedura na presença de diferentes peptonas adicionadas no meio de cultura

Peptonas	Biomassa mg/mL	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
Biobrás	13,75± 0,46	0	0
Difco	13,79± 0,07	0,477 ± 0,2	11,22 ± 0,004
Merck	11,81± 0,25	0,60 ± 0,08	31,48 ± 0,004
Acumédia (Peptone G)	12,60± 1,5	0	0
Acumédia (Peptone A)	16,67± 0,72	0,58 ± 0,11	38,36 ± 0,007
Bacto Peptone	14,62± 0,3	0	0

Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

4.4.7. Efeito do pH do meio de cultura

Segundo Cregg et al (1993), o melhor pH do meio de cultura para *P. pastoris* para expressão de proteínas recombinantes, pode variar na faixa de pH de 3 a 7. Com base nestes dados, realizamos experimentos na faixa de pH 4,0 a 8,0, mas meios com pH de 7,0 e 8,0 não foram serem realizados, pois apresentaram turvação. Os dados de produção possíveis de biomassa e atividade da G3PDH estão apresentados na Tabela 6. Observa-se, que o pH 6,0 foi o melhor e que coincide com os protocolos sugeridos EasySelect™ (Invitrogen), onde este meio é mais indicado na indução da expressão de proteínas heterólogas.

Tabela 6 – Produção de biomassa e ensaio da atividade da G3PDH secretada extracelularmente pela levedura na presença de diferentes pH no meio de cultura

pH	Biomassa (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade	
			(U/mL)	U/mg x 10 ⁻³
4,0	14,27 ± 0,55	-	0,0	-
5,0	12,48 ± 0,88	14,68 ± 0,24	0,318 ± 0,0	21,7 ± 0,4
6,0	16,81 ± 0,08	17,27 ± 0,41	0,43 ± 0,0	24,67 ± 0,5

Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05mg/mL e quatro dias de indução.

4.4.8. Efeito da adição de sulfato de amônio

As leveduras podem utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados e dentre estes estão o íon amônio, aminoácidos e peptídeos. A adição do nitrogênio esta diretamente relacionada com o aumento da atividade proteolítica, e como controle do pH e redução da fase lag do crescimento (YANG et al, 2004). Entretanto, nem todas as fontes de nitrogênio propiciam crescimento igualmente eficiente: a glutamina juntamente com o glutamato, o amônio e a asparagina são considerados fontes primárias de nitrogênio, e por isso utilizadas preferencialmente como fontes de nitrogênio. Quando estas fontes primárias estão limitadas ou próximas à exaustão, um organismo pode expressar, seletivamente, genes cujos produtos capacitam-nos a utilizar muitas outras fontes de nitrogênio secundárias, incluindo nitrito, nitrato, purinas, ácidos nucleicos, proteínas e também aminoácidos (CRUZ, 2002). Assim, realizamos ensaios com culturas crescidas em meio BMMY com adição de 1% de (NH₄)SO₄ e variamos o pH na faixa de 4 - 8. Os dados estão apresentados nas Figuras 15 e 16, observa-se que a atividade proteolítica aumenta, drasticamente, nos extremos de pH do meio de cultura com a adição de sulfato de amônio, e que não houve melhorias na produção enzimática com a adição de sulfato de amônio, sendo o pH 6,0 o melhor para o crescimento e com diferenças não significativas para a indução que é o sugerido também pela EasySelectTM (Invitrogen), e que foi utilizado nos próximos experimentos.

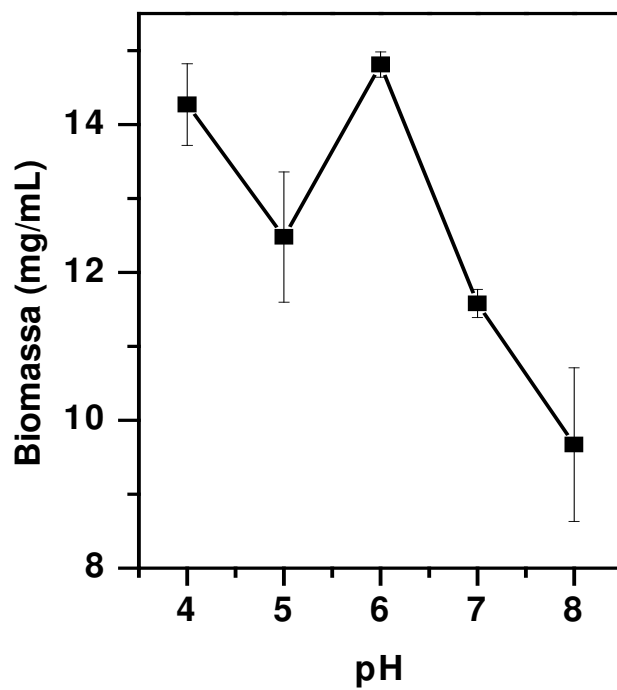


Figura 15 – Efeito do pH do meio BMMY contendo 1% de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ sobre a produção de biomassa.

Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

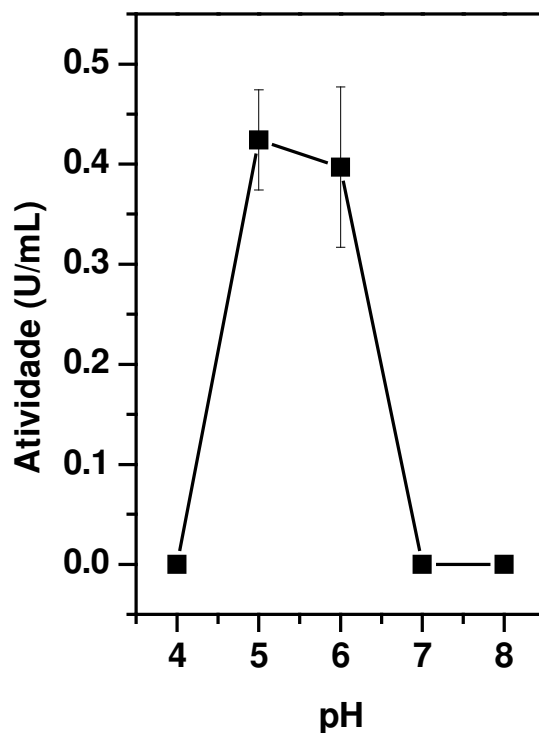


Figura 16 – Efeito do pH do meio BMMY contendo 1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre a atividade de G3PDH.

Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

4.4.9. Efeito de outras suplementações do meio

Caseínas pertencem a um grupo heterogêneo de fosfoproteínas, encontradas como micelas coloidais, no leite bovino, constituindo cerca de 76% a 86% no mesmo. Podem ser isoladas por meios químicos e físicos (LOURENÇO, 2000).

Glicina (do grego glykos, “doce”, nome devido ao seu sabor adocicado), é um aminoácido encontrado nas proteínas dos seres vivos e serve também como precursor de diversas espécies químicas, como porfirinas, purinas, etc. (NELSON ; COX, 2002).

Estudos de efeito da suplementação do meio de indução foram realizados por Hu et al (2006) e Riedstra et al (2007) utilizando a adição de 2% casaminoácidos em meio BMMY para produção de anticorpo de cadeia simples (scFv) em *Pichia pastoris*, que aumentou cerca de 1,5 vezes, enquanto que a utilização de 0,4M de glicina no meio BMMY mostrou redução significativa do anticorpo (RIEDSTRA et al, 2007). A fim de aumentar a produção enzimática, testamos a adição de glicina 0,4M e caseína 1 e 2% ao meio BMMY .

Nossos resultados (Tabela 7) mostraram que não houve aumento da síntese da G3PDH pela levedura, com a adição de glicina 0,4M e caseína 1% e 2% em meio BMMY em relação ao controle (sem suplementação).

Tabela 7 – Efeito de adição de suplemento ao meio BMMY utilizando glicina 0,4M e caseína 1% e 2%.

Meio	Biomassa mg/mL	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
BMMY controle	18,69 ± 0,16	0,8745 ± 0,08	8,92 ± 0,04
BMMY + Glicina 0,4M	15,08 ± 0,02	0,834 ± 0,2	4,88 ± 0,06
BMMY + Caseína 1%	12,85 ± 0,76	0,398 ± 0,016	5,75 ± 0,05
BMMY + Caseína 2%	15,58 ± 0,44	0,398 ± 0,02	5,66 ± 0,09

Condições de cultivo: meio BMMY com 0,5% de metanol, mais complemento, densidade inicial de células de 0,05 mg/mL e quatro dias de indução.

4.4.10. Efeito da pré-indução celular por estresse osmótico

Células de leveduras podem responder e se adaptar ao estresse osmótico. O acúmulo de glicerol é um mecanismo que permite que as células não percam água para o ambiente, permanecendo com seu tamanho natural para que continuem a viver (ALONSOMONGE et al, 2001).

O glicerol é produzido a partir da redução de intermediários da via glicolítica, como diidroxiacetona fosfato a glicerol-3 fosfato (G3P), seguido pela desfosforilação deste, a glicerol. O primeiro passo é catalizado por glicerol-3 fosfato desidrogenase

NAD-dependente. Alta expressão desta enzima, de *Saccharomyces cerevisiae* obtida em meio de crescimento com alta osmolaridade, isto é, induzido por estresse e hiperosmótico (PÅLMAN et al, 2001). Bruinemberg (1985) verificou que células *Debaryomyces hansenii* apresentavam altos níveis de glicerol-3-fosfato desidrogenase em meio contendo glicose e NaCl 8%.

Riedstra et al (2007) realizaram experimentos de pré-indução de estresse osmótico em células de *Pichia pastoris*, complementando o meio BMGY com 0,35M de NaCl ou sacarose a 1M e observaram aumento significativo na produção de anti-corpo de cadeia simples (scFv).

Em nossos experimentos realizamos o pré-tratamento de estresse osmótico celular com NaCl 0,35M (Tabela 10) ou Sacarose 1M (Tabela 11) ou Sorbitol 1M (Tabela 12) ou Acetato de Potássio 0,35M (Tabela 13) em meio BMGY, com 4 horas de pré-indução osmótica. O controle foi feito, sem pré-tratamento de estresse osmótico e com densidade inicial de célula de 5 mg/mL (Tabela 9). A Tabela 9 mostra os resultados de biomassa e atividade da G3PDH em amostras obtidas diretamente do meio fermentado, sem concentração (controle da pré-indução). Este experimento foi realizado com adição de 0,35M de NaCl em meio BMGY inoculado com 5 mg/mL de células.

Analisando os resultados apresentados abaixo, observa-se que o experimento com pré-tratamento de NaCl 0,35M, em 24 horas chegou a uma atividade de 0,477 U/mL e atividade específica de $30,9 \times 10^{-3}$ U/mg (Tabela 10) . Em relação ao acúmulo de biomassa, o pré-tratamento com sorbitol com 72 horas de indução, chegou a 27,85 mg/mL de células (Tabela 12).

Tabela 8 –Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH em meio BMMY (experimento controle)^a.

Tempo (h)	Biomassa mg/mL	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
12	12,37 ± 0,03	0,143 ± 0,016	10,13 ± 0,23
24	12,36 ± 0,38	0,159 ± 0,00	11,1 ± 0,0
48	16,67 ± 0,05	0,398 ± 0,08	26,3 ± 0,36
72	18,83 ± 0,35	0,182 ± 0,00	10,5 ± 0,02

^a Condição de indução: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 5 mg/mL e concentração de meio.

Tabela 9 – Resultados da determinação de atividade da G3PDH a partir de células de *Pichia pastoris* submetidas ao tratamento com 0,35M de NaCl em meio BMGY^a.

Tempo (h)	Atividade	
	U/mL	U/mg x 10 ⁻³
2	0,148 ± 0,01	10,3 ± 0,0
5	0,143 ± 0,02	10,6 ± 0,1
24	0,111 ± 0,01	11,1 ± 0,09
48	0,159 ± 0,00	12,3 ± 0,09

^a Condição de pré-indução: células crescidas em meio BMGY contendo 0,35M de NaCl; condição de indução: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 5 mg/mL e meio sem concentrar.

Tabela 10 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de *Pichia pastoris* submetidas ao tratamento com BMGY + NaCl 0,35M^a.

Tempo (h)	Biomassa mg/mL	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
12	10,82 ± 0,18	0	-
24	14,05 ± 0,26	0,477 ± 0,0	30,9 ± 0,01
48	17,79 ± 0,09	0,215 ± 0,09	13,2 ± 0,04
72	19,98 ± 0,09	0,143 ± 0,02	9,5 ± 0,07

^a condição de pré-indução: células crescidas em meio BMGY contendo 0,35M de NaCl; condição de indução: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 5 mg/mL e meio concentrado.

Tabela 11 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de *Pichia pastoris* submetidas ao tratamento com BMGY + Sacarose 1M^a.

Tempo (h)	Biomassa mg/mL	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
24	15,47 ± 0,35	0,318 ± 0,0	22,6 ± 0,4
48	17,59 ± 1,06	0,151 ± 0,008	10,47 ± 0,06

^a condição de pré-indução: células crescidas em meio BMGY contendo 0,35M de NaCl; condição de indução: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 5 mg/mL e meio concentrado.

Tabela 12 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de *Pichia pastoris* submetidas ao tratamento com BMGY + Sorbitol 1M^a.

Tempo (h)	Biomassa mg/mL	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
24	18,78 ± 0,13	0,339 ± 0,09	23,50 ± 0,1
48	22,73 ± 0,79	0,159 ± 0,02	11,0 ± 0,1
72	27,85 ± 0,175	0	0

^a condição de pré-indução: células crescidas em meio BMGY contendo sorbitol 1M; condição de indução: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 5 mg/mL e meio concentrado.

Tabela 13 – Determinação de biomassa final e atividade de G3PDH a partir de células de *Pichia pastoris* submetidas ao tratamento com BMGY+ Acetato de Potássio 0,35M^a.

Tempo (h)	Biomassa mg/mL	Atividade	
		U/mL	U/mg x 10 ⁻³
24	15,91 ± 0,35	0	0
48	18,79 ± 1,28	0,179 ± 0,02	12,41 ± 0,07

a condição de pré-indução: células crescidas em meio BMGY contendo acetato de potássio 0,35M; condição de indução: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de células de 5 mg/mL e meio concentrado.

4.4.11. Efeito da liofilização

A liofilização é um processo que permite a desidratação em baixas temperaturas de produtos sensíveis ao calor, tais como princípios ativos de fármacos, microrganismos, alimentos e enzimas. Neste processo, a água do material é retirada por sublimação, passando de sólida a gás com a utilização de baixíssima temperatura e vácuo. O material permanece congelado até estar completamente seco e, portanto, elimina-se o encolhimento e a migração dos constituintes dissolvidos, ou seja, o processo retém a forma original do material. Modificações físico-químicas são inibidas, minimizando a perda de constituintes voláteis ou a perda de atividade biológica ou outra atividade na preservação da estrutura molecular (PITOMBO, 2005). Após o processo, o produto pode ser armazenado em temperatura ambiente, e para posterior utilização pode ser reconstituída de forma rápida e fácil. Por não utilizar o calor, a liofilização tende a danificar menos o produto a ser desidratado, fazendo com que cor, sabor, atividade, permaneçam praticamente inalterados neste processo.

Na tentativa de otimizar o processo de produção da G3PDH, utilizamos o processo de liofilização para concentrar a enzima. Neste ensaio, após o cultivo da levedura e indução da G3PDH em meio BMMY as células foram separadas por centrifugação e o sobrenadante, foi liofilizado e suspenso em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2 para posterior dosagem de atividade da G3PDH. O experimento

controle, onde o sobrenadante do meio foi concentrado 120x em membrana filtrante foi realizado para comparação. Na Tabela 14 apresentam-se os resultados de biomassa, atividade e atividade específica da G3PDH, evidenciando que a técnica de liofilização reduziu a atividade específica da ordem de 3,7 vezes, pelo fato de ter concentrado os interferentes.

Tabela 14 – Efeito da liofilização no sobrenadante do meio de cultivo de *Pichia pastoris* contendo a enzima glicerol-3 fosfato desidrogenase.

Amostras	Biomassa (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade	
			U/mL	U/mg x 10 ⁻³
Controle	15,52 ± 0,04	15,0 ± 0,2	0,60 ± 0,07	40,00 ± 0,05
Liofilizado	15,84 ± 0,09	122,0 ± 0,5	1,33 ± 0,07	10,90 ± 0,03

4.5. Seleção de variáveis significativas na indução da expressão da enzima

Seguindo orientação da Profa. Dra. Suzana Ferreira-Dias do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa – Portugal, a partir da análise dos experimentos realizados, foram aplicados na matriz de Plackett-Burman para a determinação de variáveis com efeito significativo. A Tabela 15 mostra as diferentes combinações das variáveis dos ensaios de crescimento e indução para produção da G3PDH e seus efeitos sobre a biomassa final, proteína total e atividade enzimática. As variáveis selecionadas foram: (metanol (MeOH), glicerol (Gli), tamanho de inóculo, concentração da amostra (número de vezes), pH do meio, tempo de indução e cultivo (h)). De acordo com os dados obtidos podemos observar no experimento 1 alto valor de atividade da G3PDH com 192 horas e no experimento 8, apesar de não apresentar atividade, alto acúmulo de biomassa. A combinação de variáveis mostrada no experimento 4 levou ao maior acúmulo de biomassa e síntese da G3PDH em menor tempo de indução com metanol e glicerol (48 horas), conforme tabela abaixo.

Tabela 15 – Produção de biomassa e atividade da G3PDH em função das variáveis selecionadas.

Exp	MeOH (%)	Gli (%)	Inóculo (mg/mL)	Conc vezes	pH	Tempo (horas)	Biomassa (mg/mL)	Atividade	
								(U/mL)	U/mg x 10 ⁻³
1	0,5	0	0,05	120	6	192	22,47 ± 0,47	0,917 ± 0,12	55,5 ± 0,9
2	1	0	0,05	63	5	192	15,95 ± 0,25	0,265 ± 0,05	16,21 ± 0,03
3	0,5	1	0,05	63	6	48	19,08 ± 0,23	0,0	nd
4	1	1	0,05	120	5	48	17,75 ± 0,00	0,795 ± 0,16	44,49 ± 2,49
5	0,5	0	0,2	120	5	48	12,87 ± 0,08	0,312 ± 0,09	25,77 ± 0,4
6	1	0	0,2	63	6	48	11,88 ± 0,36	0,371 ± 0,08	24,5 ± 0,05
7	0,5	1	0,2	63	5	192	21,10 ± 0,50	0,0	nd
8	1	1	0,2	120	6	192	24,33 ± 0,07	0,0	nd

5. CONCLUSÕES

Este trabalho representa um estado inicial sobre a produção extracelular da enzima glicerol-3 fosfato desidrogenase em *Pichia pastoris*.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Após análises de diversos clones, foi escolhido o clone que apresentou uma maior atividade da G3PDH e alta produção de biomassa.
- A concentração inicial de célula ideal foi de 0,05 mg/mL, pois a produção de enzima em 24 horas de cultivo com essa densidade celular foi superior aos demais inóculos.
- O tampão fosfato mostrou-se melhor em atividade enzimática e na produção de biomassa, sendo considerado como ideal para os experimentos.
- O meio de crescimento celular BMGY mostrou-se mais eficaz que o BSM.
- O meio de cultura BMMY mostrou-se eficaz na produção enzimática.
- Em relação ao efeito de suplementação do meio BMMY com 1% de sorbitol ou glicerol, quanto à atividade enzimática, os dois suplementos não apresentaram

diferenças significativas em relação ao meio BMMY sem suplementação, portanto escolhemos trabalhar com o meio BMMY sem suplementação.

- A estratégia de concentração de meio de cultura fermentado com membranas filtrantes apresentou valores mais significativos, sendo que após 4 dias de cultivo da levedura e indução enzimática, concentrado 120 vezes, foram os melhores resultados.
- A peptona A da marca Acumédia apresentou melhores resultados na produção enzimática e de acúmulo de biomassa.
- O pH 6,0 foi o melhor na produção enzimática, coincidindo com os protocolos sugeridos EasySelect™ (Invitrogen), onde é o mais indicado para essas finalidades acima citados.
- Não houve melhorias na produção enzimática, com a adição de sulfato de amônio em meio de cultura com variação de pH, sendo o melhor pH de indução o pH 6,0 sugerido pela EasySelect (Invitrogen).
- O pré-tratamento celular com NaCl, sacarose e sorbitol, ativa a indução da síntese da G3PDH após 24 horas deste tratamento.
- O acúmulo de biomassa final foi máximo no meio BMGY acrescido de 1M de sorbitol, após 72 horas de crescimento a 30°C, porém com atividade nula da G3PDH.
- A concentração do sobrenadante foi 3,66 vezes mais eficiente em atividade específica da enzima, quando realizado através de membrana filtrante do que pela liofilização.
- A melhor combinação de variáveis otimizada, para a produção de biomassa e atividade da G3PDH, em um experimento por 48 horas de indução com metanol, foram as seguintes:
 - Adição de 1% de metanol no meio
 - Adição de 1% de glicerol no meio
 - Tamanho de inóculo de 0,05 mg/mL
 - pH do meio igual a 5,0
 - Sobrenadante concentrado 120 vezes em membrana filtrante.

Através da otimização (combinação de variáveis do experimento 4) foi possível conseguir: biomassa final de 17,75 mg/mL, atividade de G3PDH de 0,795 U/mL e atividade específica da G3PDH de 44,49 U/mg de proteína.

- Estes estudos terão prosseguimento com investigações envolvendo outras variáveis, tais como a oxigenação e agitação do meio de produção.
- A otimização dos parâmetros de fermentação realizados neste trabalho, poderá resultar na montagem de "Kit" de determinação de glicerol para diversos tipos de amostras.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTYN, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B.A. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v.308, p.130-132, 1992.

ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; PRIOR, B.A. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate desidrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. **Mol. Cell Biol.**, v.14, p.4135-4144, 1994.

ALONSOMONGE, R.; REAL, E.; WOJDA, I.; BEBELMAN, J.P.; MAGER, W.H.; SIDERIUS, M. Hyperosmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. **Mol. Microb.**, v.41, p.717-730, 2001.

ANDRÉ, L.; HEMMING, A.; ADLER, L. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). **FEBS.**, v. 286, p.13-17, 1991.

BARR, K.A.; HOPKINS, S. A.; SREEKRISHNA, K. Protocol for efficient Secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. **Pharmac. Eng.**, v.12, p.48-51, 1992.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: Characteristics and identification, 3rd ed. Cambridge: University Press, ed. 2000.

BAKIR, M.; CERIKCIOĞLU, N.; TIRTIR, A.; BERRAK, S.; OZEK, E.; CANPOLAT, C. *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. **Mycoses**, v. 47. p.231-235, 2004.

BERRY, D. R.; BROWN, C. Physiology of yeast growth. In: BERRY, D. R.; RUSSEL, I. and STEWART, G. G., (Ed). **Yeast biotechnology**. London, Ontario: Labatt Brewing, , 1987. p. 159-146.

BOZE, H.; LABORDE, C.; CHEMARDIN, P.; FABIEN, R.; VENTURIN, C., COMBARNOUS, Y.; MOULIN, G. High- level secretory production of recombinant porcine folliclestimulating hormone by *Pichia pastoris*. **Process Biochem.**, v.36.p.907-913, 2001.

BULL, A.T.; BUSHELL, M.E. Environmental control of fungal growth. In: The filamentous Fungi. SMITH, J.E.;BERRY, D.R. (Ed.), New York: Willey,1976. p.1-31.

BRIERLEY, R.A.; BUSSINEAU, C.; KOSSON, R.; MELTON, A.; SIEGEL, R.S. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: Bovine lisozyme. **Ann N Y Acad Sci.**, v.589.p.350-362,1990.

BRUINEBERG, P.M. The NADP(H) redox couple in yeast metabolism: fundamental and applied aspects. 1985. 136f. Tese (Pós-Doutorado)- Delp University of Tecnology, The Netherlands. 136p. 1985.

CAIN, J.; PIETZSCH, M.; THEOBALD, U.; RIZZI, M. Fast purification and kinetic studies of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biotechnol.**, v.49.p.19-27.1996.

CAMARGO, L.A. Glicerol-3-fosfato oxidase em levedura de panificação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Unesp, Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Unesp, Araraquara, 2007.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHAUHAN, A.K.; AROA, D.; KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochem.**; v.34.p.139-145, 1999.

CHEN, C-C.; WU, P-H.; HUANG, C-T.; CHENG, K-J. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an Escherichia coli phytase. **Enzyme Microb Technol.**, v.35.p.315-320, 2004.

CHIRUVOLU, V.; CREGG, J.M.; MEAGHER, M.M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch. **Enzyme Microb Technol.**; v.21.p.277-283, 1997.

CHOI, D.B.; PARK, E.Y. Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochem.**, v.41.p.390-397, 2006.

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.**, v.6.p.5-17, 2006.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, edited by Strathern, J.N., Jones, E.

W. and Broach, J. R. Cold Spring Harbor Monograph Series. New York: Cold Spring Harbor Laboratories, pp.39-99, 1982.

CREGG, J.M. Heterologous proteins expressed in *Pichia pastoris*. Disponível em: <http://faculty.kgi.edu/cregg>. Acesso em: 10 fev. 2008.

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

CRUZ, S. H. Efeito da Natureza da Fonte de Nitrogênio no Fluxo Metabólico do Carbono em Microrganismos. **Instituto de Química-UNESP**, 2002.

DALY, R.; HEARN, M.T.W. Expression of Heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recognit.** v.18. p. 119-138, 2005

D'ANJOU, M.C.; DAUGULIS, A.J. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. **Biotechnol Lett.**,v.22.p.141-146, 2000.

EASYSELECT™ *Pichia* expression Kit - Version G 122701/25-0172 catalog n.K1740-01- Invitrogen.

FILES, D.; OGAWA, M.; SCAMAN, C.H.; BALDWIN, S.A. A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. **Enz Microb.**, v.29.p.335-340,2001.

FABER, K.N.; HARDER, W.; AB, G.; VEENHUIS, M. Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. **Yeast.**, v.11. p.1331-1344,1995.

GATTÁS, E.A de L. Obtenção de extrato celular bruto de levedura rico em atividades de glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase. 1997. **Instituto de Química e Física- USP**, São Carlos.

GHEHARTZ, W. (ed.) General productions methods. In: *Enzymes in industry: production and applications*. Weinheim (Alemanha):VCH,1990. Cap.3,p.43-53.

GOULD,S.J.; VALLE,D. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. **Trends Genet.**, v.16p.340-345,2000.

HARTNER, F.S.; GLIEDER, A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. **Microb Cell Fact.**v.5.p.39-59,2006.

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

INAN, M.; MEAGHER, M.M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. **J Biosci Bioeng.**,v.92.p.585-589, 2001.

INVITROGEN - *Pichia* fermentation process guidelines, 2000.

JAHIC, M.; GUSTAVSSON, M.; JANSEN, A. K.; MARTINELLE, M.; ENFORS, S. O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **J Biotechnol.**, v.102, p. 45-53, 2003.

JUNGO, C.; SCHENK, J.; PASQUIER, M.; MARISSON, I.W.; STOCKAR, U VON. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. **J Biotechnol.**, v.131.p.57–66,2007.

KAMIHARA, T.; NAKAMURA, I. Regulation of respiration and its related metabolism by vitamin B₁ and B₆ in *Saccharomyces* yeast. **Adv Bioch engin Biotechnol.**,v.29.p. 35-82, 1982.

KATAKURA, Y.; ZHANG, W.H.; ZHUANG, G.Q.; OMASA, T.; KISHIMOTO, M., GOTO, W.; SUGA, K.I. Effect of methanol concentration on the production of human beta(2)-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for de control of methanol concentration using a semiconductor Gas Sensor. **J. Ferment Bioeng.**, v. 86, p. 482-487, 1998.

KOBAYASHI, K.; KUWAE, S.; OHYA, T.; OHDA, T.; OHYAMA, M.; OHI, H.; TOMOMITSU, K.; OHMURA, T. Hight-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. **J Biscience Biotechnol.**, v.89.p.55-61, 2000.

LARSSON, K.; ERIKSSON, P.; ANSELL, R.; ADLER, L. Gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol.**, v.10.p. 1101-1111, 1993.

LAYNE E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *In*: Colowick, S. P., Kaplan, N. C (eds, **Methods in Enzymology**), Academic Press. v.3.p. 447-454, 1957.

LI, Z.J.; XIONG, F.; LIN, Q.S.; D'ANJOU, M.; DAUGULIS, A J.; YANG, D.S.C.; HEW, C.L. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Express Purif.**, v.21.p.438-445, 2001.

LOEWEN, M.C.; LIU, X.; DAUGULIS, A.J. Biosynthesis production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. **Appl Microbiol Biotechnol.**,v.48.p.480-486, 1997.

LOURENÇO, E. Proteínas do leite In: Proteínas de alimentos. Jaboticabal-SP. Cap.5.p.179-180.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast.**, v. 22. p.249-270, 2005.

MARTINI, A. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of wine research.**v.4.p.165-176, 1993.

MCGREW, J.T.; LEISK, D.; DELL, B.; KLINKE, R., KRASTS, D.; WEE, S.F.; ABBOT, N.; ARMITAGE, R.; HARRINGTON, K. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. **Gene.**,v.18.p.193-200, 1997.

MONSALVE, R.I.; LU, G.; KING, T.P. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. **Protein Express Purif.**, v.16.p.410-416, 1999.

NELSON, D.; COX, M. Lehninger- Princípios de bioquímica. Ed. Savier, São Paulo, 2002.

OHDA, T.; OHYAMA, M.; OHI, H.; TOMOMITSU, H.; OMURA, T. High-level expression of recombinant human serum albumin from methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. **J Biosc Bioeng.**, v.89.p.55-61, 2000.

OHYA, T.; MORITA, M.; MIURA, M.; KUWAE, S.; KOBAYASHI, K. High-level production of prourokinase-annexin V chimera in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **J Biosc Bioeng.** v.94. p.467-473, 2002.

ONISHI, H. Osmophilic yeasts. **Adv Food Res** .v.12.p.53-93, 1963.

OKOROKV, L.A.; LICHOKO, L.P.; KULAEV, I.S. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. **J Bacteriol.**,v.144.p.661-665, 1980.

OTAG, F.; KUYUCU, N.; ERTURAN, Z.; SEN, S.; EMEKDAS, G.; SUGITA, T. An outbreak of *Pichia ohmeri* infection in the pediatric intensive care unit: case reports and review of the literature. **Mycoses.**,v.48.p.265-269, 2005.

PAHLMAN, A.K.; GRANATH, K.; ANSELL, R.; HOHMANN, S.; ADLER, L. The yeast glycerol-3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic and oxidative stress. **J Biol Chemistry.**, v.276.p.3555-3563, 2001

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. The life of yeasts.2nd edn.Harvard University Press, Cambridge (mass) and London, 1978.

PITOMBO, R.N. de M. Liofilização. In:_Pessoa, Jr; Kilikian, B.V (coord). **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP. Manole,2005. cap. 17,p.32.

RIEDSTRA, S.; CEREJO, L.; BRÁS, S.; COSTA, P.M.P.; FERREIRA, J.P.M. Optimization of the conditions for the expression of na antitransthyretin scFv in *Pichia pastoris*. Abstracts/**J Biotec S.**, 179, 2007.

ROSENFELD, S.A.; NADEAU, D.; TIRADO, J.; HOLLIS, G.F.; KNABB, R.M.; JIA, S. Production and purification of recombinant Hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Exp Purif.**, v.8.p.476-482, 1996.

SAELENS, X.; VANLANDSCHOOT, P.; MARTINET, W.; MARAS, M.; NEIRYNCK, S.; CONTREBAS, R.; FIERS, W.; JOU, WM. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. **Eur J Biochem.**, v.260. p.166-175, 1999.

SCHABERG, D.R.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **American Journal of Medicine.**,v.91.p.727-755, 1991.

SCORER, C.A.; BUCKHOLS, R.G.; CLARE, J.J.; ROMANOS, M.A. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene.**,v.136.p.111-119, 1993.

SEARS, I.B.; O'CONNOR, J.; ROSSANESE, O.W., GLICK, B.S. A versatile set of vector for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast.**,v.14.p.783-790, 1998.

SHI, X.; KARKUT, T.; CHAMANKHAH, M.; ALTING-MEES, M.; HEMMINGSEN, S.M.; HEGEDUS, D. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. **Protein Express and Purif.**,v.28.p.321-330, 2003.

SINHA, J.; PLANTZ, B.A.; ZHANG, W.; GOUNTHRO, M.; SCHLEGEL, V.L.; LIU, C-P; MEAGHER, M.M. Improved production of recombinant ovine interferon-t by Mut+ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. **Biotechnol Prog.**,v.19.p.794-802, 2003.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R.G.; KROPP, K.E.; BLANKENSHIP, D.T.; TSAY, J.; SMITH, P.L.; WIERSCHKE, J.D.; SUBRAMANIAN, A.; BIRKENBERGER, L.A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene.**, v.190.p.55-62, 1997.

STRATTON, J.; CHIRUVOLU, V.; MEAGHER, M.M. High cell-density fermentation. In: Higgins DR, Cregg JM, editors *Methods in molecular biology* Totowa, NJ. **Humana Press.**, v.103.p.107-120, 1998.

THORPE, E.D.; D'ANJOU, M.C.; DAUGULIS, A. J. Sorbitol as a non-repression carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnol Lett.**, v.21.p.669-672, 1999.

TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M.P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.**, Brasil, v.12, p.20-22, 2000.

VEENHUÍIS, M.; van der KLEI, I.J. Peroxisomes: surprisingly versatile organelles. **Biochim Biophys Acta.**, v.1555.p.44-47, 2002.

WALKER, G.M. *Yeast- physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons, 2000.

WERTEN, M.W.; VANDEN BOSCH, T.J.; WIND, R.D.; MOOIBROEK, H.; De WOLF, F.A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast.**, v.15. p.1087-1096, 1999.

WIELAND, O. *Methods of enzymatic analysis*. 2.ed, p.1404-1409. , New York.1974

XIE, J.; ZHOU, Q.; DU, P.; GAN, R.; YE, Q. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. **Enzyme Microb Tech.**, v.36.p.210-216, 2005.

YANG, J.; ZHOU, X.S.; ZHANG, Y.X. Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH_4^+ concentration in *Pichia pastoris* fermentation. **Biotechnol Letters.**,v.26.p.1013-1017, 2004.

ZHANG, W.H.; INAN, M.; MEAGUER, M.M. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol.**,v.5.p. 275-287, 2000.

ZHANG, W.H.; SINHA, J.; SMITH, L.A.; INAN,M.; MEAGHER, M.M. Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. **Biotechnol Prog.**, v.21.p.386-393, 2006.

ZHANG, W.H.; POTTER, K.J.; PLANTZ, B.A.; SCHLEGEL, V.L.; SMITH, L.A.; MEAGHER, M.M. *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol : growth kinetics and production improvement. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v.30, p. 210-215, 2003